

МЫШИ С НОКАУТОМ ГЕНА *Muc2* – МОДЕЛЬ ДЛЯ ОЦЕНКИ СПОСОБОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА

© 2019 г. К. М. Ачасова^{1,2*}, Е. А. Литвинова^{2,1}

*E-mail: achasovaks@mail.ru

¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия;

²ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», Новосибирск, Россия

Поступила: 27.02.2019. Принята: 11.03.2019

В кишечнике обитает огромное количество бактерий, взаимодействующих с иммунной системой хозяина. Нарушение гомеостаза в кишечнике приводит к различным патологическим состояниям, которые необходимо корректировать путем воздействия на микрофлору. В работе представлены данные о влиянии изменения кишечной микрофлоры на жизнеспособность мышей с нарушенной барьерной функцией (*Muc2*^{-/-}). Выявленная чувствительность *Muc2*^{-/-}-мышей к изменению микрофлоры позволяет предложить данную линию в качестве хорошей модели для тестирования различных способов воздействия на микрофлору.

Ключевые слова: микрофлора, антибиотики, пробиотики, пребиотики, барьерная функция кишечника, мукозальный иммунитет

DOI: 10.31857/S102872210006753-3

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр. ак. Лаврентьева, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), лаборатория генетики лабораторных животных, Ачасова Ксения Михайловна.

Тел.: 8 923 126 69 33

E-mail: achasovaks@mail.ru

Авторы:

Ачасова К. М., аспирант лаборатории генетики лабораторных животных, ФГБУН «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия; м.н.с. лаборатории регуляции микробиоценозов сельскохозяйственных животных и растений, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», Новосибирск, Россия;

Литвинова Е. А., в.н.с. лаборатории регуляции микробиоценозов сельскохозяйственных животных и растений, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», Новосибирск, Россия; с.н.с. лаборатории генетики лабораторных животных, ФГБУН «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия.

В здоровом кишечнике животных обитает огромное количество бактерий, которые находятся в просвете и практически не взаимодействуют с эпителиальными клетками благодаря специальному мукусному барьеру. При этом

бактерии модулируют иммунную систему кишечника хозяина, что с одной стороны препятствует развитию сильной иммунной реакции на антигены симбиотической микрофлоры, а с другой, обеспечивает быстрый иммунный ответ при появлении патогенных бактерий [1].

Нарушение гомеостаза в кишечнике, например, в результате нарушения микрофлоры, может приводить к различным патологическим состояниям, в том числе к воспалительным заболеваниям кишечника (ВЗК). Нарушение микрофлоры может происходить из-за воздействия на нее различных факторов (питание, прием антибиотиков для борьбы с инфекциями). В связи с этим, поддержание и корректирование кишечной микрофлоры при помощи антибиотиков, а также пре- и пробиотиков становится актуальной задачей в медицине, ведется активная разработка новых способов воздействия на микрофлору. При этом, в медицинской практике необходимо корректировать кишечную микрофлору как у здоровых людей, так и у пациентов с различными патологиями. В связи с этим, необходим поиск хороших экспериментальных

моделей для разработки и тестирования новых методов воздействия на кишечную микрофлору, а также оценка их безопасности для здоровья.

В данной работе в качестве потенциальной модели использовали мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2*^{-/-}) – модель с предрасположенностью к ВЗК. У *Muc2*^{-/-}-мышей нарушен синтез муцина-2, составляющего основу мукусного барьера в кишечнике, вследствие этого кишечные бактерии вступают в прямой контакт с эпителиальными клетками [2]. В качестве модели с нормальной барьерной функцией кишечника использовали мышей линии C57BL/6. Все манипуляции с животными были одобрены межведомственной комиссией по биоэтике СО РАН (протокол № 28, выдан 19.06.2015). В исследовании использовали мышей C57BL/6, свободных от специфических патогенов (расширенный список FELASA 2014), и *Muc2*^{-/-} мышей, положительных на инфекцию *Helicobacter spp.* Влияние дефицита муцина-2 на иммунные показатели исследовали на мышах в возрасте 8–10 недель, проводили гистологический анализ толстой кишки, анализ количества цитокинов и иммуноглобулинов в толстой кишке, а также количество IgG против собственной микрофлоры в крови. Затем мышам в возрасте 8–10 недель в течение двух недель предоставляли смесь антибиотиков широкого спектра действия (кларитромицин, амоксицилин, метронидазол) и оценивали общее состояние, вес животных, а также изменение кишечной микрофлоры.

На гистологических срезах восходящего отдела толстой кишки не было выявлено признаков острого воспаления таких как отек, эрозия эпителия и лейкоцитарные инфильтраты, ни у мышей *Muc2*^{-/-}, ни у мышей C57BL/6. Однако, у мышей *Muc2*^{-/-} была отмечена гиперплазия крипт, а также было обнаружено, что у *Muc2*^{-/-} мышей в ткани толстой кишки больше макрофагов, чем у C57BL/6. При этом количество провоспалительных цитокинов в толстой кишке у мутантных мышей не отличалось от C57BL/6. Таким образом, несмотря на тесный контакт с микрофлорой, содержащей инфекционный агент *Helicobacter spp.*, мыши с дефицитом муцина-2 не демонстрируют острого воспаления в кишечнике, однако, выявляются некоторые признаки хронического воспаления.

Анализ иммуноглобулинов показал, что у *Muc2*^{-/-} мышей больше IgG в толстой кишке по сравнению с C57BL/6. Помимо этого, в крови у *Muc2*^{-/-} мышей было обнаружено больше

IgG против собственной кишечной микрофлоры, чем у C57BL/6. Количество IgA в толстой кишке у мышей не отличалось. Таким образом, тесный контакт иммунной системы с симбиотической микрофлорой и инфекцией *Helicobacter spp.*, обусловленный нарушением барьера в кишечнике, приводит к активации специфического иммунитета и формированию адаптации иммунной системы для предотвращения острого воспаления против микрофлоры.

В результате приема антибиотиков, у мышей *Muc2*^{-/-} и C57BL/6 наблюдалось снижение количества бактерий в кишечнике, а также обеднение видового разнообразия. Нарушение микрофлоры сочеталось с негативными эффектами на состояние мышей. На 6 день предоставления антибиотиков масса тела мышей снижалась на 10–15%. На 10 день эксперимента масса тела C57BL/6 восстанавливалась до 100% от первоначальной. У *Muc2*^{-/-} мышей, наоборот, масса тела снижалась до 75–85%. Также у *Muc2*^{-/-} мышей наблюдалось ухудшение состояния, которое выражалось в снижении двигательной активности и появлении ректальных кровотечений. Через 14 дней приема антибиотиков, 35.7% *Muc2*^{-/-} мышей погибали (5 из 14 мышей), а среди C57BL/6 выживали 100% животных (8 из 8 мышей).

Результаты исследования демонстрируют, что при наличии тесного контакта с симбиотическими бактериями и инфекционным агентом *Helicobacter spp.* в условиях нарушения барьерной функции кишечника, у мышей развиваются адаптации иммунной системы. При нарушении сформировавшегося устойчивого состояния путем нарушения микрофлоры кишечника антибиотиками, наблюдаются негативные последствия для общего состояния организма, включая гибель животных. Таким образом, мыши *Muc2*^{-/-} могут выступать в качестве модели, чувствительной к воздействию на микрофлору. Данная модель может быть полезной для разработки и тестирования различных методов воздействия на кишечную микрофлору.

Исследование поддержано бюджетным проектом № 0533-2019-0003, расходные материалы приобретены за счет гранта РФФИ 18-015-00329. Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. // *Nat Rev Immunol.*— 2008.— V. 8.— N. 6.— P. 411–420. doi: 10.1038/nri2316.
2. Johansson M. E., Phillipson M., Petersson J., Velcich A., Holm L., Hansson G. C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. // *Proc Natl Acad Sci USA.*— 2008.— V. 105.— N. 39.— P. 15064–15069. doi: 10.1073/pnas.0803124105.

***Muc2* KNOCKOUT MICE AS A MODEL FOR TESTING APPROACHES TO ALTER GUT MICROBIOTA**

© 2019 K. M. Achasova^{1,2*}, E. A. Litvinova^{2,1}

*E-mail: achasovaks@mail.ru

¹The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

²Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Received: 27.02.2019. **Accepted:** 11.03.2019

Gut is inhabited by numerous of bacteria interacting with the immune system of the host. Disturbance of the gut homeostasis leads to various pathological states, which are to be treated by changing of microbiota. The study demonstrate the effects of microbiota alteration on viability of mice with deficient barrier function in the gut (*Muc2*^{-/-}). The susceptibility of *Muc2*^{-/-} mice to changing of microbiota suggesting the mice as an appropriate model for testing approaches to alter gut microbiota.

Key words: microbiota, antibiotics, probiotics, prebiotics, gut barrier function, mucosal immunity

Authors:

Achasova K. M., ✉ PhD student in the laboratory of genetics of laboratory animals, The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SBRAS, Novosibirsk; junior researcher in the laboratory for regulation of agricultural animals and plants microbiocenosis, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies RAS, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** achasovaks@mail.ru;
Litvinova E. A., leading researcher in the laboratory for regulation of agricultural animals and plants microbiocenosis, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies RAS, Novosibirsk; senior researcher in the laboratory of genetics of laboratory animals, The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, SBRAS, Novosibirsk, Russia.