

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной и клеточной биологии  
Сибирского отделения Российской академии наук

*На правах рукописи*

Кожевникова Елена Николаевна

**МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ  
РЕГУЛЯЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ И  
СИСТЕМНЫХ НАРУШЕНИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ  
ВОСПАЛЕНИЕМ КИШЕЧНИКА**

1.5.3 - молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Новосибирск – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение</b> . . . . .	<b>6</b>
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> . . . . .	<b>18</b>
1.1 Характеристика воспалительных заболеваний кишечника . . . . .	18
1.1.1 Эпидемиология, классификация и клиническая картина ВЗК .	18
1.1.2 Структурно-функциональная организация и механизмы дисфункции кишечного барьера . . . . .	26
1.1.3 Особенности организации мукозального иммунитета в норме и при воспалении . . . . .	31
1.1.4 Колоректальный рак, ассоциированный с колитом . . . . .	38
1.1.5 Современные подходы к терапии воспалительных заболеваний кишечника . . . . .	41
1.2 Ассоциированные с микробиотой механизмы регуляции кишечного барьера и иммунитета . . . . .	46
1.2.1 Микробиота кишечника в норме: состав, метаболическая активность и иммуномодулирующие функции . . . . .	46
1.2.2 Дисбиоз при ВЗК: таксономические и функциональные изменения	50
1.2.3 Роль бактериальных метаболитов в развитии кишечных нарушений и потенциальные терапевтические стратегии . . . . .	52
1.2.4 Регуляция взаимодействия «микробиота-кишечник-мозг», и его роль в формировании системных нарушений . . . . .	55
1.3 Метаболические аспекты воспаления кишечника . . . . .	57
1.3.1 Нарушение метаболизма короткоцепочечных жирных кислот .	57
1.3.2 Изменение энергетического метаболизма иммунных и эпителиальных клеток . . . . .	58
1.3.3 Нарушение метаболизма триптофана и других аминокислот . .	59
1.3.4 Особенности метаболизма фосфолипидов . . . . .	61
1.4 Экспериментальные модели ВЗК . . . . .	65
1.4.1 Химически индуцированные модели ВЗК на животных . . . . .	65
1.4.2 Генно-инженерные модели . . . . .	67
1.4.3 Модели на основе переноса иммунных клеток . . . . .	68
1.4.4 Специализированные модели для изучения роли микробиоты .	69
1.4.5 Клеточные модели для изучения функций кишечника . . . . .	70

<b>Глава 2. Материалы и Методы</b> . . . . .	<b>75</b>
2.1 Экспериментальные животные, клинический материал и этические аспекты	75
2.1.1 Клинический материал и пациенты . . . . .	75
2.1.2 Лабораторные животные . . . . .	77
2.1.3 Ключевые экспериментальные модели и объемы выборок . . . . .	79
2.2 Морфологические методы исследования . . . . .	82
2.2.1 Гистологический и иммуногистохимический анализ . . . . .	82
2.2.2 Трансмиссионная электронная микроскопия . . . . .	83
2.3 Молекулярно-биологические и биохимические методы . . . . .	84
2.3.1 Выделение РНК и количественная ПЦР . . . . .	84
2.3.2 Транскриптомный анализ и биоинформатические подходы . . . . .	84
2.3.3 Мультиплексный иммунологический анализ . . . . .	85
2.3.4 Иммуноблоттинг . . . . .	86
2.3.5 Иммунопреципитация и протеомный анализ . . . . .	86
2.3.6 Оценка биоэнергетики и митохондриальной функции . . . . .	89
2.3.7 Метаболомный анализ . . . . .	91
2.3.8 Культивирование органоидов кишечника . . . . .	92
2.4 Поведенческое фенотипирование . . . . .	93
2.4.1 Общая активность и тревожное поведение . . . . .	94
2.4.2 Депрессивно-подобное поведение . . . . .	94
2.4.3 Когнитивные функции . . . . .	95
2.4.4 Сенсомоторная фильтрация . . . . .	95
2.4.5 Стартл-рефлекс, преимпульсное ингибирование, габитуация . . . . .	95
2.4.6 Социальное поведение . . . . .	96
2.5 Статистическая обработка данных и визуализация . . . . .	96
<b>Глава 3. Нарушения цитоскелета как ключевая характеристика эпителия при хроническом воспалении</b> . . . . .	<b>98</b>
3.1 Ультраструктурная организация кишечного эпителия при воспалении . . . . .	98
3.1.1 Характер клеточных нарушений в кишечном эпителии на модели хронического колита . . . . .	98
3.1.2 Нарушение межклеточных контактов . . . . .	102
3.1.3 Структура микроворсинок и цитоскелет . . . . .	105
3.1.4 Нарушение структуры и функции митохондрий при хроническом колите . . . . .	107
3.2 Системно-биологический подход к поиску генов-регуляторов цитоскелета	109
3.2.1 Применение байесовской сети для выявления ключевых генов-регуляторов цитоскелета . . . . .	113
3.2.2 Общие целевые гены для пациентов с БК и мышей линии <i>Muc2</i>	117
<b>Глава 4. Роль актина в поддержании эпителиального барьера</b> . . . . .	<b>121</b>

4.1	Анализ распределения белков плотных и адгезивных контактов и их взаимодействие с F-актином в модели хронического колита . . . . .	121
4.1.1	Анализ локализации белков плотных и адгезивных контактов на латеральных мембранах энтероцитов . . . . .	122
4.1.2	Анализ белковых взаимодействий белка клаудина-3 в норме и при воспалении . . . . .	125
4.2	Роль полимеризации F-актина в поддержании эпителиального барьера	127
4.3	Нарушение F-актина характерно для различных моделей колита и для пациентов с диагнозом язвенный колит . . . . .	130
4.3.1	F-актин в моделях химической индукции и адоптивного переноса	130
4.3.2	F-актин в эпителии пациентов с язвенным колитом . . . . .	132
<b>Глава 5. Роль метаболизма липидов в формировании эпителиального барьера . . . . .</b>		<b>134</b>
5.1	Метаболомный анализ крипт толстой кишки в норме и при воспалении	134
5.2	Роль фосфолипидов в поддержании функций мембранных органелл эпителия . . . . .	137
5.3	Роль церамидов в формировании эпителиального барьера . . . . .	142
<b>Глава 6. Микробиота и метаболизм аминокислот во взаимодействии «кишечник–мозг» . . . . .</b>		<b>146</b>
6.1	Оценка метаболизма и поведения на модели генетически обусловленного колита . . . . .	147
6.1.1	Поведенческий фенотип самцов мышей линии <i>Muc2<sup>-/-</sup></i> . . . . .	147
6.1.2	Оценка роли микробиоты кишечника в формировании поведенческих черт на модели <i>Muc2<sup>-/-</sup></i> . . . . .	153
6.1.3	Роль глицина в реализации поведенческого фенотипа у мышей с мутацией в гене <i>Muc2</i> . . . . .	157
6.2	Изменения поведения и метаболизма при химической индукции колите	163
6.2.1	Влияние фукозы на воспаление кишечника . . . . .	164
6.2.2	Оценка системного метаболизма и социального поведения мышей	167
6.2.3	Роль микробиоты в регуляции предпочтения запаха самки . . . . .	170
<b>Глава 7. Пропионат-продуцирующие бактерии в норме, при воспалении и колоректальном раке. . . . .</b>		<b>173</b>
7.1	Моделирование колоректального рака на мышах с различным составом микробиоты кишечника . . . . .	174
7.1.1	Особенности восприимчивости мышей из разных вивариев к АОМ/DSS. . . . .	174
7.1.2	Исходный уровень <i>A. muciniphila</i> определяет восприимчивость к колоректальному раку . . . . .	177
7.1.3	Различия в исходном разнообразии микробиоты . . . . .	180

7.2	Бактериальные маркеры образования опухолей толстой кишки . . . . .	181
7.2.1	Бактериальные маркеры КРР в исходной микробиоте . . . . .	181
7.2.2	Роль бактериальных маркеров до индукции колита . . . . .	183
<b>Глава 8. Обсуждение результатов . . . . .</b>		<b>185</b>
8.1	Энергетический метаболизм как основа целостности эпителиального барьера . . . . .	186
8.1.1	Митохондриальный метаболизм и его роль в формировании эпителиального барьера . . . . .	187
8.1.2	Актиновый цитоскелет как потенциальная мишень при нарушении энергетического метаболизма . . . . .	188
8.2	Роль актина в формировании эпителиального барьера в норме и при воспалении . . . . .	190
8.2.1	Динамика актина и его взаимодействие с белками клеточных контактов . . . . .	190
8.2.2	Транскрипционная регуляция и потенциальная роль гена <i>PREX1</i> . . . . .	191
8.3	Липидный метаболизм как регулятор проницаемости и воспаления . . . . .	193
8.3.1	Дисбаланс сфинголипидов и роль С16- и С24-церамидов . . . . .	194
8.3.2	Церамиды и барьерная функция . . . . .	195
8.3.3	Фосфолипидный профиль и ремоделирование жирных кислот . . . . .	197
8.3.4	Метаболизм липидов как регулятор функции митохондрий . . . . .	198
8.4	Метаболизм и микробиота в формировании расстройств поведения . . . . .	199
8.4.1	Глицин как регулятор тревожноподобного и социального поведения в модели колита <i>Muc2<sup>-/-</sup></i> . . . . .	199
8.4.2	Метаболизм триптофана и распознавание социальных запахов в модели химически индуцированного колита . . . . .	202
8.5	Пропионат-продуцирующие бактерии в канцерогенезе, ассоциированном с воспалением . . . . .	205
8.5.1	Пропионат-продуцирующие бактерии как прогностические маркеры канцерогенеза . . . . .	206
8.5.2	<i>A. muciniphila</i> и <i>B. acidifaciens</i> в воспалении . . . . .	207
8.5.3	Связь продуцентов пропионата с сульфатредуцирующими бактериями . . . . .	209
<b>Заключение . . . . .</b>		<b>211</b>
<b>Выводы . . . . .</b>		<b>214</b>
<b>Список сокращений . . . . .</b>		<b>215</b>
<b>Список использованной литературы . . . . .</b>		<b>219</b>

## Введение

**Актуальность исследования.** Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), такие как болезнь Крона и язвенный колит, представляют собой хронические рецидивирующие патологии со сложной, многофакторной этиологией. ВЗК характеризуются усилением воспалительных иммунных реакций в мукозальном слое кишечника, что приводит к инфильтрации иммунных клеток в слизистый и подслизистый слои, нарушению структуры эпителиальной ткани и снижению барьерных свойств эпителия. ВЗК демонстрируют неуклонный рост заболеваемости во всем мире и наиболее часто встречаются в развитых индустриализированных странах. В Северной Америке и Западной Европе распространенность ВЗК составляет более 0,3%, тогда как в России она оценивается в 0,03%. Отсутствие своевременной диагностики ВЗК приводит к ухудшению прогноза, усиливает тяжесть течения заболеваний, в результате чего увеличивается частота хирургического лечения и инвалидизации пациентов.

Несмотря на большой интерес к этим заболеваниям, полное излечение достигается лишь у небольшой части пациентов. Современные исследования все чаще указывают на критическую роль системных и кишечных метаболических изменений в развитии ВЗК, включая нарушения липидного и энергетического обмена, дисбаланс биосинтеза аминокислот и желчных кислот. Одним из ключевых аспектов ВЗК является нарушение кишечного эпителиального барьера, которое приводит к транслокации микробных антигенов в слизистый и подслизистый слои кишечника, поддержанию воспалительных реакций и формированию системных осложнений. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе нарушения барьерной функции кишечника, в особенности на фоне хронического воспаления, остаются недостаточно изученными. Выявление основных метаболических путей и отдельных метаболитов, влияющих на целостность эпителиального барьера кишечника, открывает новые перспективы для разработки

таргетной терапии ВЗК. Нарушения метаболизма, характерные для ВЗК, также связывают с развитием сопутствующих расстройств. Предполагается, что нарушения системного метаболизма на фоне хронического воспаления кишечника и ассоциированной с ним микробиоты также могут участвовать в патогенезе сопутствующих (коморбидных) состояний, включая колоректальный рак и нарушения со стороны центральной нервной системы, такие как тревожность и депрессия.

Ввиду ограниченной изученности молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе развития ВЗК, и отсутствия единой этиологии этих заболеваний, современные терапевтические подходы сводятся преимущественно к применению противовоспалительных и иммуносупрессивных препаратов. В результате выполнения настоящего исследования сформулирована гипотеза о том, что при ВЗК формируются сходные клеточные и метаболические нарушения эпителия кишечника вне зависимости от этиологии воспалительного процесса. В связи с этим основное внимание в исследовании уделено выявлению молекулярных и клеточных характеристик ВЗК, общих для различных этиологических вариантов заболевания. Для решения этой задачи применялся комплексный подход с использованием различных экспериментальных моделей *in vivo* и образцов от пациентов с диагнозом «ВЗК», что позволяет отделить универсальные механизмы тканевого повреждения от специфических для конкретной этиологии реакций.

В данной работе показано, что общей характеристикой эпителия при хроническом колите является нарушение динамики полимеризации актинового цитоскелета, что сопряжено с дисфункцией межклеточных контактов и нарушением эпителиального барьера. На молекулярном уровне это нарушение ассоциировано с изменением профиля белок-белковых взаимодействий актина и белка плотных контактов клаудина-3, что выявляет новые мишени для коррекции барьерной функции кишечника вне зависимости от этиологии воспаления. Развивая этот подход, в работе проанализирован метаболический профиль кишечного эпителия при хроническом воспалении. Показано, что метаболические изменения эпителия ассоциированы с нарушениями межклеточной коммуникации и определяют системный характер ВЗК, включая коморбидные расстройства. Выявление

ключевых метаболитов и сигнальных путей позволяет рассматривать метаболическую регуляцию как механизм, связывающий локальное повреждение кишечника с системными проявлениями заболевания.

В этом контексте использование экспериментальных моделей приобретает двойную роль. Они позволяют не только воспроизводить ключевые признаки ВЗК и оценивать эффективность потенциальных терапевтических агентов, но и служат физиологически значимыми моделями для изучения молекулярных механизмов взаимодействия иммунной системы, микробиоты кишечника, метаболических путей и центральной нервной системы.

**Цель исследования:** установление молекулярных и клеточных механизмов метаболической регуляции целостности кишечного эпителия и выявление роли отдельных метаболитов и ассоциированных с ними компонентов кишечной микробиоты в регуляции поведения и восприимчивости к колоректальному раку на модельных животных.

**Задачи исследования:**

1. Изучить ультраструктурную организацию кишечного эпителия в норме и при хроническом воспалении и провести предсказательный анализ генов-регуляторов, обеспечивающих структурную целостность эпителия, с использованием модели хронического воспаления кишечника на мышах и данных от пациентов с болезнью Крона.
2. Идентифицировать общие клеточные характеристики реорганизации кишечного эпителия на моделях хронического кишечного воспаления различной этиологии на лабораторных животных.
3. Выявить ключевые метаболические пути и отдельные метаболиты, обеспечивающие барьерную функцию кишечника в норме и при воспалении, с использованием интегративного транскриптомного и метаболомного анализа.
4. Оценить роль исходной микробиоты кишечника в модуляции восприимчивости к колоректальному раку и определить потенциальные бактериальные маркеры канцерогенеза.
5. Охарактеризовать механизмы, опосредующие влияние кишечной микробиоты и метаболитов, ассоциированных с хроническим воспалением кишечника, на нейромедиаторные пути центральной нервной системы и

поведение с использованием модельных животных.

### **Научная новизна результатов.**

Научная новизна работы определяется получением новых фундаментальных знаний о механизмах нарушения кишечного барьера и системных эффектах при хроническом воспалении. В частности, впервые на нескольких моделях *in vivo* и в биоптатах пациентов с язвенным колитом показано, что общей клеточной характеристикой эпителия кишечника при хроническом воспалении является дестабилизация актинового цитоскелета. С использованием клеточной модели органоидов кишечника и моделей *in vivo* установлено, что нарушение баланса полимерного и мономерного актина вызывает дисфункцию межклеточных контактов и снижает количество ключевых белков плотных и адгезивных контактов на плазматической мембране. Для одного из белков плотных контактов, клаудина-3, впервые методом ко-иммунопреципитации с последующей масс-спектрометрией охарактеризован профиль белковых взаимодействий в норме и на модели хронического колита *in vivo*. Показано, что при воспалении нарушается тесная связь клаудина-3 с сетью актин-связывающих белков, что имеет ключевое значение для развития клеточных дефектов эпителиального барьера.

Впервые охарактеризована роль биосинтеза керамидов в поддержании структуры актинового цитоскелета и формировании эпителиального барьера на моделях хронического воспаления кишечника. Интеграция метаболомных и транскриптомных данных выявила существенные изменения метаболизма фосфолипидов и сфинголипидов при хроническом воспалении, функциональная роль которых была подтверждена в тестах *in vivo*. Впервые установлено, что системный метаболизм триптофана и накопление глицина в мозге опосредуют формирование нарушений социального и тревожноподобного поведения, ассоциированных с воспалением кишечника. Впервые показана непосредственная роль нейромедиатора глицина в регуляции полового поведения через стрихнин-зависимые рецепторы к глицину.

Наконец, в работе впервые продемонстрировано, что компоненты кишечного микробиома могут служить прогностическими маркерами

восприимчивости к воспалительному канцерогенезу. Показано, что количество пропионат-продуцирующих бактерий *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides acidifaciens* в кишечнике коррелирует с риском развития колоректального рака в модели *in vivo*.

### **Теоретическая и практическая значимость.**

Настоящее исследование расширяет фундаментальные представления о патогенезе ВЗК и выявляет новые молекулярные мишени для направленной терапии. Теоретическая значимость работы заключается в установлении ключевых клеточных и метаболических закономерностей повреждения эпителиальной ткани при хроническом воспалении и их роли в развитии сопутствующих ВЗК расстройств.

В частности, выявление дестабилизации актинового цитоскелета эпителиоцитов как консервативной, этиологически независимой характеристики ВЗК представляется одним из ключевых системных обобщений данной работы. Оно позволяет объяснить молекулярные механизмы нарушения барьерных свойств эпителия при различной этиологии воспаления и рассматривать актиновый цитоскелет как центральное звено патогенеза ВЗК. С использованием методов системной биологии ген *PREX1* был предсказан в качестве одного из ключевых регуляторов динамики полимеризации актина в условиях хронического воспаления. Это дает теоретическую основу для проверки роли факторов обмена гуаниновых нуклеотидов в нарушении целостности эпителия при воспалении.

Полученные результаты устанавливают связь метаболизма липидов, аминокислот и летучих жирных кислот с локальными и внекишечными проявлениями ВЗК. Так, показана роль церамидов в формировании цитоскелета и межклеточных контактов. Данный результат позволяет предположить новые механизмы участия сфинголипидов в поддержании эпителиального барьера. Кроме того, представленная работа содержит экспериментальное подтверждение ассоциации микробиота-зависимого метаболизма аминокислот с регуляцией поведения и функций ЦНС, углубляя понимание основ функционирования взаимодействия «микробиота-кишечник-мозг». Выявление потенциальной предсказательной

роли пропионат-продуцирующих бактерий в отношении канцерогенеза позволяет предложить новые критерии для стратификации пациентов по риску развития колоректального рака.

Практическая значимость работы заключается в потенциальной применимости полученных результатов в клинической практике. Белки-регуляторы динамики актина, специфические церамиды и ферменты их биосинтеза, а также отдельные бактериальные таксоны представляются перспективными биомаркерами. Они могут быть рассмотрены для использования в ранней диагностики, оценки характера течения ВЗК и риска развития сопутствующих расстройств. Кроме того, работа выявляет новые потенциальные мишени для таргетной фармакологической терапии. Модуляторы активности актин-связывающих белков, ингибиторы синтеза церамидов, а также метаболические препараты на основе аналогов глицина или модуляторов метаболизма триптофана открывают возможности для создания новых классов лекарственных средств. Такой подход соответствует стратегии комплексного лечения ВЗК, направленной не только на подавление воспаления, но и на активное восстановление целостности эпителия и психоэмоционального состояния пациентов.

Данное исследование указывает на целесообразность оценки психоневрологического статуса в рамках стандартного мониторинга пациентов с ВЗК, более пристального внимания к исходному составу микробиоты как к фактору индивидуального риска, а также использования глубокого метаболического и микроскопического исследования биоптатов, что в целом формирует интегративный подход к изучению патогенеза ВЗК.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Снижение количества филаментного актина является универсальной клеточной характеристикой эпителия в условиях хронического воспаления кишечника. Изменение динамики полимеризации актина обуславливает нарушение плотных и адгезивных контактов и повышение проницаемости кишечного эпителия.
2. Нарушение регуляции актинового цитоскелета при хроническом воспалении кишечника ассоциировано с изменением профиля его белковых взаимодействий, в частности, с диссоциацией белка плотных контактов клаудин-3 и актин-связывающих белков.

3. Нарушение регуляции метаболизма сфинголипидов в кишечном эпителии ассоциировано с воспалением, дестабилизацией актинового цитоскелета и нарушением функции эпителиального барьера. Ингибирование синтеза керамидов частично восстанавливает барьерную функцию.
4. Исходный состав микробиоты кишечника, в частности, количество *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides acidifaciens*, ассоциирован с повышенной восприимчивостью к воспалительному канцерогенезу в химически индуцированной модели колоректального рака.
5. Хроническое воспаление кишечника ассоциировано со специфическими изменениями микробиоты, которые через модуляцию метаболизма триптофана и глицина влияют на социальное и тревожноподобное поведение.

**Апробация работы.** За последние пять лет основные результаты диссертации были представлены в 14 докладах на 10 международных и всероссийских научных конференциях, в том числе: III Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация и метаболизм, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 2026), II Всероссийской конференции с международным участием «Самойловские чтения» (Казань, 2026), 12th World Congress on Targeting Microbiota (Валенсия, Испания, 2025), IV Международной научной конференции «Future of Biomedicine 2025» (Владивосток, 2025), 20-й Юбилейной всероссийской конференции с международным участием «Проблема инфекции при критических состояниях» (Москва, 2025), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Учение академика И.П. Павлова в современной системе нейронаук» (Санкт-Петербург, 2024), II Российской конференции «Заболевания мозга – вызов XXI века» (Казань, 2024; два доклада), VI международной научной конференции «Микробиота человека и животных» (Санкт-Петербург, 2024), Международной мультikonференции BGRS/SB-2024 (Новосибирск, 2024; три доклада), 27-й Пущинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2024), а также на Девятой конференции специалистов по лабораторным животным в Сколтехе (Москва, 2021).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 25 научных работ, из них 25 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в Scopus,

Web of Science и РИНЦ.

1. Medvedeva S., Achasova K., Boldyreva L., Ogienko A., **Kozhevnikova E.** The application of explants, crypts, and organoids as models in intestinal barrier research. // *Tissue Barriers*. 2025. Vol. 13, No. 3. P. e2423137. DOI: 10.1080/21688370.2024.2423137. *ИФ (умпакт фактор) = 4.0 (Q2)*.
2. Nickelwart E.A., Medvedeva S.S., Popova J.V., **Kozhevnikova E.N.** The abundance of H3K27me3 histone modification in the mouse colon under chronic inflammation. // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2025. Vol. 61, No. 4. P. 1189–1199. DOI: 10.1134/S0022093025040192. *ИФ = 0.5 (Q4)*.
3. Achasova K.M., Snytnikova O.A., Chanushkina K.E., Morozova M.V., Tsentalovich Yu.P., **Kozhevnikova E.N.** Baseline abundance of *Akkermansia muciniphila* and *Bacteroides acidifaciens* in a healthy state predicts inflammation associated tumorigenesis in the AOM/DSS mouse model. // *Scientific Reports*. 2025. Vol. 15. P. 12241. DOI: 10.1038/s41598-025-96514-5. *ИФ = 3.9 (Q1)*.
4. Achasova K.M., **Kozhevnikova E.N.** A cohort effect on AOM/DSS colorectal cancer model performance in C57BL/6 mice. // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2025. Vol. 61. P. 438–449. DOI: 10.1134/S0022093025020061. *ИФ = 0.5 (Q4)*.
5. Попова Ю.В., Бец В.Д., Омелина Е.С., Болдырева Л.В., **Кожевникова Е.Н.** Адаптация метода получения трансгенных мышей на основе *in utero* электропорации // *Молекулярная биология*. 2024. Т. 58, № 6. С. 1041–1051. DOI: 10.1134/S0026893324060098. *ИФ = 1.2 (Q4)*.
6. Morozova M., Andrejeva J., Snytnikova O., Boldyreva L., Tsentalovich Y., **Kozhevnikova E.** Phospholipid supplementation inhibits male and female odor discrimination in mice // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2024. Vol. 18. DOI: 10.3389/fnbeh.2024.1397284. *ИФ = 2.9 (Q1)*.
7. Andrejeva E.A., Morozova M.V., Saeidi A., **Kozhevnikova E.N.** Evaluation of social odor preference and social communication with the same- and opposite-sex conspecifics in male mice // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2024. Vol. 60, No. 6. P. 2517–2527. DOI: 10.1134/S0022093024060292. *ИФ = 0.5 (Q4)*.
8. Boldyreva L.V., Morozova M.V., Pavlov K.S., **Kozhevnikova E.N.** Effect

- of Dietary Phospholipid on the Behavior in C57BL/6J Mice // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2024. Vol. 60. P. 409–419. ИФ = 0.5 (Q4) (DOI: 10.1134/S0022093024010319).
9. Morozova M.V., Boldyreva L.V., Borisova M.A., **Kozhevnikova E.N.** Investigating social communication in mice: a Two-intruders test approach // *Journal of Neuroscience Research*. 2024. Vol. 102, No. 7. DOI: 10.1002/jnr.25365. ИФ = 3.4 (Q2).
  10. Saydakova S., Morozova K., Snytnikova O., Morozova M., Boldyreva L., Kiseleva E., Tsentalovich Y., **Kozhevnikova E.** The Effect of Dietary Phospholipids on the Ultrastructure and Function of Intestinal Epithelial Cells // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, No. 2. P. 1788. DOI: 10.3390/ijms24021788. ИФ = 4.9 (Q1).
  11. Popova J., Bets V., **Kozhevnikova E.** Perspectives in Genome-Editing Techniques for Livestock // *Animals*. 2023. Vol. 13, No. 16. P. 2580. DOI: 10.3390/ani13162580. ИФ = 2.7 (Q1).
  12. Morozova M., Borisova M., Snytnikova O., Achasova K., Litvinova E., Tsentalovich Y., **Kozhevnikova E.** Colitis-associated intestinal microbiota regulates brain glycine and host behavior in mice // *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12. P. 16345. DOI: 10.1038/s41598-022-19219-z. ИФ = 3.9 (Q1).
  13. Бец В.Д., Ачасова К.М., Борисова М.А., **Кожевникова Е.Н.**, Литвинова Е.А. Роль гликопротеина муцин и L-фукозы во взаимодействии иммунитета и микрофлоры на примере экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника // *Биохимия*. 2022. Т. 87, № 3. С. 356–375. DOI: 10.1134/S0006297922040010. ИФ = 2.2 (Q3).
  14. Boldyreva L.V., Morozova M.V., Saydakova S.S., **Kozhevnikova E.N.** Fat of the Gut: Epithelial Phospholipids in Inflammatory Bowel Diseases // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, No. 21. P. 11682. DOI: 10.3390/ijms222111682. ИФ = 4.9 (Q1).
  15. Achasova K.M., **Kozhevnikova E.N.**, Borisova M.A., Litvinova E.A. Fucose Ameliorates *Tritrichomonas* sp.-Associated Illness in Antibiotic-Treated *Muc2<sup>-/-</sup>* Mice. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, No. 19. P. 10699. DOI: 10.3390/ijms221910699. ИФ = 4.9 (Q1).
  16. Litvinova E.A., Bets V.D., Feofanova N.A., Gvozdeva O.V., Achasova K.M., Alperina E.L., **Kozhevnikova E.N.** Dietary Fucose Affects Macrophage

- Polarization and Reproductive Performance in Mice // *Nutrients*. 2021. Vol. 13, No. 3. P. 855. DOI: 10.3390/nu13030855.  $ИФ = 5.0$  (Q1).
17. Borisova M.A., Achasova K.M., Morozova K.N., Andreyeva E.N., Litvinova E.A., Ogienko A.A., Morozova M.V., Berkaeva M.B., Kiseleva E., **Kozhevnikova E.N.** Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10. P. 21135. DOI: 10.1038/s41598-020-78141-4.  $ИФ = 3.9$  (Q1).
  18. Borisova M.A., Snytnikova O.A., Litvinova E.A., Achasova K.M., Babochkina T.I., Pindyurin A.V., Tsentalovich Y.P., **Kozhevnikova E.N.** Fucose Ameliorates Tryptophan Metabolism and Behavioral Abnormalities in a Mouse Model of Chronic Colitis // *Nutrients*. 2020. Vol. 12, No. 2. P. 445. DOI: 10.3390/nu12020445.  $ИФ = 5.0$  (Q1).
  19. Литвинова Е.А., Ачасова К.М., Борисова М.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б., **Кожевникова Е.Н.** Роль гена *Kaiso* в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2 // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018. Т. 22, № 8. С. 1078–1083. DOI: 10.18699/VJ18.453.  $ИФ \approx 0.7$  (Q4).
  20. **Кожевникова Е.Н.**, Лещенко А.Е., Пиндюрин А.В. Индуцируемая система DamID для определения взаимодействий белка ядерной ламины Lamin B1 с хромосомами в клетках мыши // *Биохимия*. 2018. Т. 83, № 5. С. 763–773. DOI: 10.1134/S0006297918050115.  $ИФ = 2.2$  (Q3).
  21. Zolotykh M.A., **Kozhevnikova E.N.** The effect of social experience on olfactory preference in male mice // *Applied Animal Behaviour Science*. 2017. DOI: 10.1016/j.applanim.2017.01.013.  $ИФ = 2.0$  (Q1).
  22. Litvinova E.A., **Kozhevnikova E.N.**, Achasova K.M., Kontsevaya G.V., Moshkin M.P. Eradication of *Helicobacter* spp. in Mucin-2 deficient mice // *Laboratory Animals*. 2016. DOI: 10.1177/0023677216670687.  $ИФ = 1.3$  (Q2).
  23. Pindyurin A.V., Pagie L., **Kozhevnikova E.**, van Arensbergen J., van Steensel B. Inducible DamID systems for genomic mapping of chromatin proteins in *Drosophila* // *Nucleic Acids Research*. 2016. Vol. 44, No. 7. DOI: 10.1093/nar/gkw176.  $ИФ = 13.1$  (Q1).
  24. Литвинова Е.А., Беляев М.Д., Прохорчук А.В., Коростина В.С., Прохорчук Е.Б., **Кожевникова Е.Н.** Вклад кишечного муцина-2

в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter* spp. у лабораторных мышей // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015. Т. 19, № 4. С. 494–498. DOI: 10.18699/VJ15.066. ИФ  $\approx 0.7$  (Q4).

25. **Кожевникова Е.Н.**, Ачасова К.М., Коростина В.С., Прохорчук Е.Б., Литвинова Е.А. Роль генов *Mucin-2* и *Kaiso* в социальном поведении мышей // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015. Т. 19, № 4. С. 410–412. DOI: 10.18699/VJ15.053. ИФ  $\approx 0.7$  (Q4).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 266 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, глав с результатами собственного исследования, обсуждения, выводов, списка литературы и списка сокращений. Работа содержит 36 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 516 источников.

**Личный вклад автора.** В цикле исследований, составляющих диссертационную работу, автору принадлежит решающая роль в выборе направления исследований, постановке задач, разработке дизайна эксперимента. Также автор участвовал в проведении всех экспериментов, подготовке образцов и биоинформатическом и статистическом анализе полученных данных, их интерпретации, обобщении и публикации. Метаболомный и транскриптомный анализы выполнялись на базе центров коллективного пользования и в коммерческих организациях. В работах, опубликованных в соавторстве, личный вклад автора заключается в участии на всех этапах: от подготовки биологического материала и контроля качества образцов до обработки первичных данных, их анализа, формулировки выводов и оформления результатов.

**Благодарности.** Автор благодарит Борисову М.А., к.б.н. Морозову М.В. и к.б.н. Литвинову Е.А. за совместную работу по оценке поведенческих фенотипов, к.б.н. Ачасову К.М. и к.б.н. Попову Ю.В. за совместную работу по созданию сложных моделей *in vivo* и анализ данных, к.б.н. Медведеву С.С., к.б.н. Огиенко А.А., к.б.н. Морозову К.Н. и к.б.н. Киселеву Е.В. за совместную работу по оценке морфологии тканей и локализации белков с помощью конфокальной и электронной микроскопии, к.х.н. Снытникову О.А. и д.х.н. Центаловича Ю.П. за совместную работу по анализу метаболомных профилей тканей и крови с помощью ЯМР-спектроскопии,

к.м.н. Кулыгину Ю.А. и д.м.н. Осипенко М.Ф. за совместную работу с образцами биопсии пациентов, а также весь коллектив соавторов за помощь и сотрудничество при проведении настоящей работы. Автор выражает глубокую признательность академику, д.б.н. Игорю Федоровичу Жимулеву и д.б.н. Сергею Анатольевичу Демакову за наставничество при подготовке диссертации. Автор сердечно благодарит всю свою семью за многолетнюю поддержку, любовь и помощь.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Характеристика воспалительных заболеваний кишечника

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) представляют собой группу хронических рецидивирующих патологий, характеризующихся воспалением слизистой оболочки кишечника различной локализации и морфологических особенностей (de Souza *et al.*, 2016). Среди них наиболее изученными и клинически значимыми являются язвенный колит и болезнь Крона.

#### 1.1.1 Эпидемиология, классификация и клиническая картина ВЗК

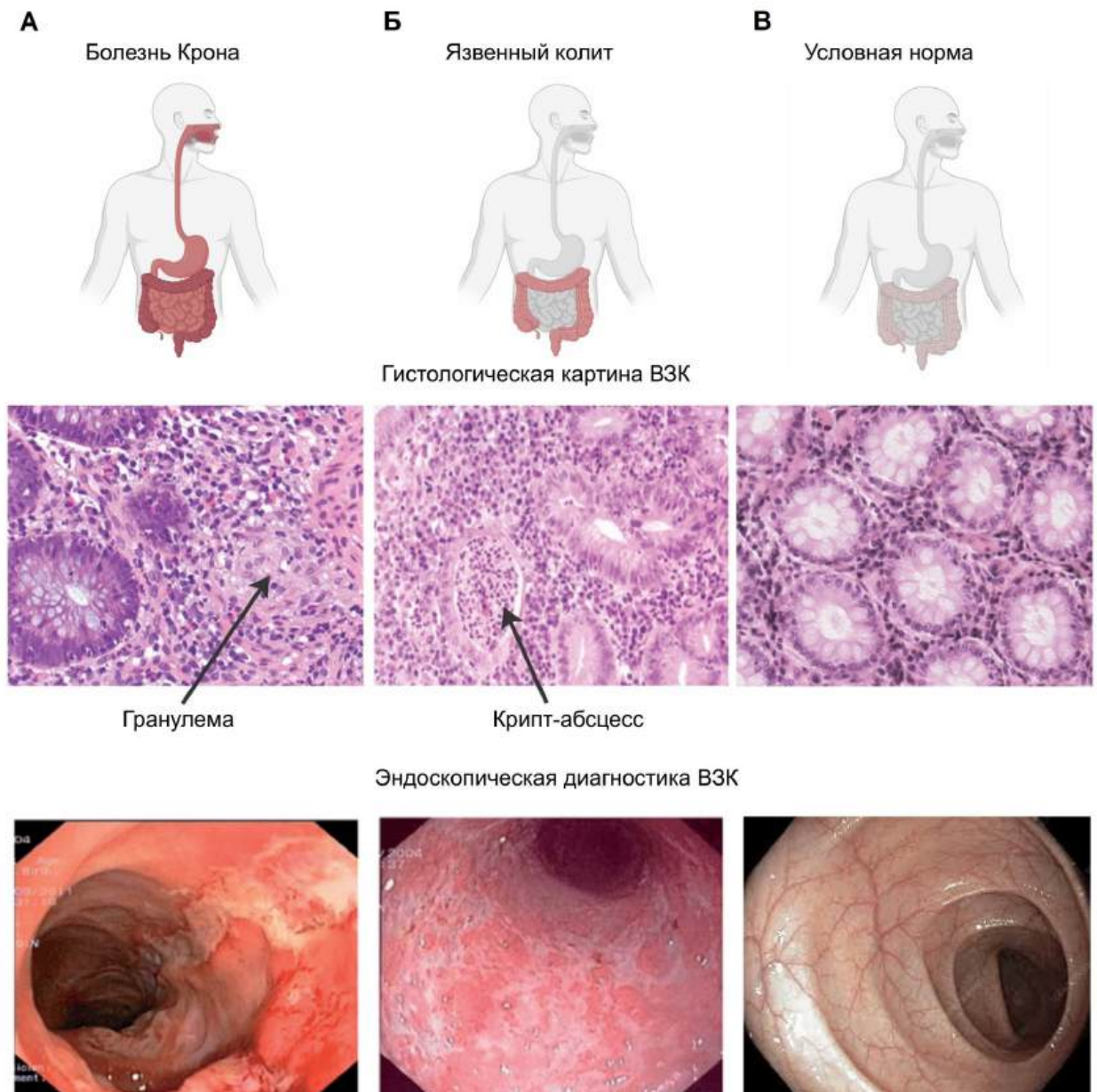
Язвенный колит (ЯК) — это хроническое воспалительное заболевание, которое характеризуется локализацией поражения преимущественно в толстой кишке (Kaplan *et al.*, 2025). К клиническим признакам ЯК относят частые диареи с кровью и слизью, боли внизу живота, учащенные позывы к дефекации, а также признаки интоксикации и общего воспаления. Морфологически слизистая оболочка при ЯК утолщается за счет отека, гиперемии и инфильтрации иммунных клеток, формируются эрозии и язвы, которые имеют преимущественно гнойный характер (Segal *et al.*, 2021). В отличие от БК, воспаление при ЯК непрерывное и охватывает всю толщину слизистого и подслизистого слоя (Xavier и Podolsky, 2007) (Рисунок 1).

В противоположность ЯК, болезнь Крона (БК) может поражать любой отдел желудочно-кишечного тракта. Наиболее часто БК локализуется в терминальном отделе подвздошной кишки, слепой и восходящей части ободочной кишки. К клиническим признакам БК относят боли в животе, диарею, усталость, снижение массы тела, лихорадку и системные проявления воспаления (Kaplan *et al.*, 2025). Важной чертой БК является ее сегментарный характер: воспаление возникает в отдельных участках кишки,

разделенных участками неповрежденной ткани. По морфологическим признакам БК характеризуется наличием очагов гранулематозного воспаления, утолщением стенки кишечника, фиброзом, язвами, трещинами и образованием свищей. Гранулемы являются одной из наиболее специфичных морфологических черт БК и служат важным диагностическим критерием. При БК стенки пораженных участков утолщены за счет гиперплазии соединительной ткани, а воспаление проникает через все оболочки кишки от слизистого до серозного, что способствует развитию таких осложнений, как свищи и абсцессы (Dolinger и Torres, 2024).

Эндоскопический анализ является ключевым в диагностике ВЗК. При БК обнаруживаются сегментарные участки воспаления, которые перемежаются участками интактной или гиперплазированной ткани. В этих сегментах могут присутствовать язвы, гипертрофия стенки кишки, свищи. Эти изменения наиболее часто локализуются в илеоцекальной области, хотя могут обнаруживаться и в прямой кишке. В случае ЯК эндоскопическое исследование выявляет равномерное воспаление с множественными эрозиями и язвами, с гиперемией и отеком слизистой. У большинства пациентов, не получавших ранее лечения, воспаление начинается в прямой кишке и распространяется проксимально. Хотя ЯК поражает преимущественно толстую кишку, при тотальном колите (панколите) возможно воспаление терминального отдела подвздошной кишки, эндоскопически напоминающее изменения в толстой кишке (Vucop, 2025).

Дифференциальная диагностика между БК и ЯК основывается на комплексе клинических, эндоскопических и морфологических признаков. Основные критерии включают характер и локализацию поражения. Для БК характерны сегментарность, трансмуральное воспаление, наличие свищей и эпителиоидных гранулем. В то же время ЯК характеризуется диффузным поверхностным воспалением, распространяющимся от прямой кишки (Gecse и Vermeire, 2018).



**Рисунок 1.** Гистологическая характеристика болезни Крона и язвенного колита и их эндоскопическая картина (Xavier и Podolsky, 2007). **(А)** Болезнь Крона — биоптат из терминального отдела подвздошной кишки при активной форме заболевания. На рисунке показана изолированная гранулема, состоящая из плотно расположенных макрофагов, гигантских многоядерных клеток и эпителиоидных клеток. Вокруг узелка отмечается выраженная инфильтрация лимфоидными клетками, плазматическими клетками и другими клетками воспаления. **(Б)** Язвенный колит — биоптат слизистой оболочки толстой кишки, взятый у пациента с активной формой заболевания. Крипт-абсцесс состоит из мигрировавших нейтрофилов, а окружающий эпителий демонстрирует признаки острого повреждения слизистой оболочки. **(В)** Изображения здоровой толстой кишки.

Количественная оценка патологических изменений слизистой оболочки проводится с использованием общепринятых эндоскопических и гистологических шкал. Балльные системы позволяют объективно оценить картину заболевания и провести статистический анализ корреляции между выраженностью морфологических повреждений и биохимическими параметрами (Daperno *et al.*, 2004; Schroeder *et al.*, 1987).

## Распространенность ВЗК

Оценка распространенности ВЗК в мире и в Российской Федерации показывает активный рост заболеваемости этими нозологиями. В последние десятилетия отмечается значительный рост количества новых случаев, особенно в странах с высоким уровнем экономического развития. В частности, в Северной Америке, Западной Европе и странах Азии показатели заболеваемости достигают 20–30 случаев на 100 тысяч населения в год, а распространенность превышает 1% (Hracs *et al.*, 2025). Также растет число молодых пациентов, что, вероятно, связано с изменением образа жизни, диеты, окружающей среды и микробиома кишечника. По оценкам данных по России, опубликованным И.В. Маевым и соавт. (2023), официальная распространенность ЯК составляет 16,6, а БК — 5,6 на 100 тысяч населения. В то же время ежегодный регистрируемый прирост составляет 11,3% для ЯК и 13,7% для БК. При этом в крупных городах реальные цифры могут быть значительно выше официальной статистики. Например, по данным первого популяционного регистра Санкт-Петербурга (Успенский и соавт., 2025), частота встречаемости в мегаполисе достигла 157 случаев ЯК и 140 случаев БК на 100 тысяч населения, что в 9–25 раз превышает средние значения по стране и соответствует показателям стран Западной Европы и Северной Америки.

Важно отметить существенное значение задержки постановки диагноза для полноценной характеристики распространенности ВЗК. Как пишет И.В. Маев и соавторы (2023), постановка диагноза в течение первых двух лет от дебюта симптомов происходит лишь у 72,6% пациентов с БК и 89,3% с ЯК. Средний возраст дебюта заболевания в России приходится на наиболее трудоспособный период: 35,3 года для ЯК и 31,2 года для БК. Учитывая высокую частоту внекишечных проявлений (до 50–60% случаев), можно говорить о высокой социальной значимости ВЗК.

В современных представлениях рост заболеваемости ВЗК происходит в результате взаимодействия таких факторов, как генетическая предрасположенность и изменение условий окружающей среды вследствие индустриализации развитых стран. К таким условиям можно отнести увеличенное потребление переработанных продуктов, богатых рафинированными жирами и простыми сахарами, и снижение доли сырых

и богатых клетчаткой продуктов. Кроме того, воздействие промышленных загрязнений, широкое применение антибактериальных препаратов и снижение контакта с естественной микробиотой окружающей среды могут способствовать развитию иммунных нарушений, предрасполагающих к ВЗК (Kaplan, 2025). Некоторые исследования также указывают на значимую роль факторов психологического стресса, курения, а также региональных особенностей проживания (Mi *et al.*, 2025; Schoultz *et al.*, 2020). Таким образом, этиология ВЗК представляет собой сложное и индивидуальное взаимодействие социальных и средовых компонентов, которые могут способствовать реализации генетической предрасположенности к этим заболеваниям. Это указывает на необходимость комплексного подхода к поиску новых таргетных стратегий профилактики и лечения ВЗК.

### **Внекишечные проявления ВЗК**

ВЗК представляют собой системные патологии, которым сопутствуют иные расстройства кишечника и других органов (коморбидные расстройства). Понимание механизмов, связывающих кишечное воспаление с развитием коморбидных проявлений, необходимо для разработки комплексных подходов при лечении ВЗК. Внекишечные проявления встречаются у 50% пациентов с ВЗК и могут предшествовать кишечным симптомам, развиваться одновременно с ними или появляться в ходе заболевания. Наиболее частыми внекишечными проявлениями являются артропатии (10–39% случаев), которые обычно коррелируют с активностью кишечного воспаления (Yang *et al.*, 2025). В основе взаимосвязи между ВЗК и артритом лежат общие генетические локусы риска, системность воспалительных реакций и миграция активированных Т-лимфоцитов из кишечника в синовиальную ткань (Fantini *et al.*, 2009). Поражения кожи встречаются у 6–17% пациентов, а глазные проявления наблюдаются у 2–9% пациентов (Shah *et al.*, 2021). Особое место занимает первичный склерозирующий холангит — прогрессирующее воспаление и фиброз желчных протоков, встречающееся у 2–8% пациентов с ЯК. Течение этой патологии не зависит от активности колита, что связывают с миграцией лимфоцитов, праймированных в кишечнике, в печень через систему воротной вены (Trivedi и Adams, 2018). Также к внекишечным проявлениям

ВЗК можно отнести нарушения со стороны центральной нервной системы: развитие аффективных и тревожных расстройств. Они будут более подробно рассмотрены в разделе 1.2.4.

### **Молекулярно-генетические аспекты патогенеза воспалительных заболеваний кишечника**

Генетическая предрасположенность является одной из ключевых составляющих патогенеза ВЗК и вносит существенный вклад в характер течения заболевания. Подтверждением этого служат данные о том, что риск развития ВЗК у родственников больных этими патологиями значительно выше, чем у представителей общей популяции. Согласно масштабному популяционному исследованию Moller *et al.* (2015), риск возникновения БК у родственников первого порядка повышен в 8 раз, а ЯК — в 4 раза. Результаты исследований, проведенных на близнецовых парах, подтверждают вклад генетического фактора в патогенез ВЗК. Согласно данным S.M. Borowitz (2023), частота сочетанного проявления у монозиготных близнецов достигает 50–65% для БК, а у дизиготных пар этот показатель составляет лишь около 3–9%. Для ЯК степень фенотипического соответствия ниже — около 17–18% у монозиготных пар.

Молекулярно-генетические исследования выявили ряд генов, ассоциированных с развитием ВЗК. Одним из наиболее изученных и подтвержденных является ген *NOD2/CARD15*. Этот ген кодирует внутриклеточный рецептор, который реализует распознавание молекул мурамилдипептида (компонент пептидогликана клеточной стенки бактерий) и регулирует иммунный ответ. Мутации в гене *NOD2* связаны с повышенным риском возникновения болезни Крона, особенно у пациентов европеоидной расы (Hugot *et al.*, 2001; Lesage *et al.*, 2002). Выявлены три основных варианта мутаций (*R702W*, *G908R* и *1007fs*), которые снижают способность рецептора распознавать микробные паттерны, что проявляется в нарушении толерантности к микробиоте и хроническом воспалении. Эти мутации также ассоциированы с более тяжелым течением заболевания, развитием фистул и стенозов (Liu *et al.*, 2015). Важно отметить, что полиморфизмы в гене *NOD2* не являются причиной развития ВЗК, а лишь ассоциированы с предрасположенностью к ним.

Помимо гена *NOD2*, в ходе полногеномных ассоциативных исследований было идентифицировано более 240 локусов предрасположенности к ВЗК, значительная часть которых вовлечена в процессы иммунной регуляции, поддержание барьерной функции и контроль воспалительного ответа (Liu *et al.*, 2015; Hracs *et al.*, 2025). Примечательно, что около 60–70% из этих локусов содержат гены, специфические прежде всего для иммунных клеток, что указывает на первичную роль нарушений иммунитета в патогенезе этих заболеваний. В частности, полиморфизмы гена *IL23R* определяют активность сигнального пути интерлейкина (IL)-23 и Th17-зависимого иммунного ответа (Jostins *et al.*, 2012). Гены аутофагии, такие как *ATG16L1* и *IRGM*, играют ключевую роль в механизмах внутриклеточной деградации патогенов и поддержании секреторной активности клеток Панета. Гены системы Янус-киназы и сигнального трансдуктора и активатора транскрипции (Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription, JAK-STAT) (например, *JAK2* и *STAT3*) участвуют в реализации сигналов широкого спектра провоспалительных цитокинов (Salas *et al.*, 2020).

Еще одной важной областью исследований является изучение роли вариантов генов, вовлеченных в формирование барьерных функций кишечника. Нарушение целостности кишечного барьера способствует проникновению бактерий и молекул бактериальной природы в собственную пластинку и в подслизистый слой, что вызывает активацию иммунного ответа. Основным компонентом первичной защиты слизистой оболочки кишечника является муциновый слой и гликокаликс. Роль эпителиального барьера в патогенезе ВЗК подтверждается выраженной ассоциацией полиморфизмов в генах, ответственных за формирование этих структур. Например, нарушение функции гена *FUT2*, кодирующего фукозилтрансферазу-2, ведет к нарушению фукозилирования мембранных гликопротеинов и муцинов, что приводит к адгезии патогенов к апикальной мембране эпителиоцитов и снижению защитных свойств гликокаликса (McGovern *et al.*, 2010; Rausch *et al.*, 2011). Одновременно с этим полиморфизмы в локусе гена, кодирующего белок муцин MUC19, ассоциированы с нарушением целостности мукусового слоя и способствуют прямому контакту бактериальных клеток с клетками

эпителия, реорганизации цитоскелета и активации иммунного ответа (Jostins *et al.*, 2012).

Мутации в генах, вовлеченных в формирование мукозального барьера, способны приводить к развитию воспаления кишечника в экспериментальных моделях *in vivo*. Кроме того, такие модели могут быть использованы для поиска генов-модификаторов воспаления и барьерной функции кишечника. Например, ранее на модели с нокаутом гена *Muc2*, кодирующего основной белок мукуса муцин-2, мы показали, что ген *Kaiso* (*Zbtb33*), кодирующий белок с двойной специфичностью к метилированной ДНК и последовательности Kaiso-связывающих сайтов, вовлечён в развитие воспалительного ответа (Литвинова и соавт., 2018). Дефицит Kaiso модулировал экспрессию провоспалительных цитокинов в кишечнике. Из литературы известно, что транскрипционный фактор Kaiso индуцирует воспаление и дифференцировку клеток-предшественников в кишечнике мышей. Животные с дефицитом Kaiso демонстрируют повышенную инфильтрацию нейтрофилов, активацию иммунных клеток, гиперплазию крипт, а также снижение экспрессии E-кадгерина, что приводит к нарушению целостности кишечного эпителия (Robinson *et al.*, 2019). В наших работах также была показана возможная кооперация между Kaiso и муциновым барьером в контроле социального поведения (Литвинова и соавт., 2015), что расширяет представление о плейотропной роли этого эпигенетического регулятора.

Следующим компонентом защиты является эпителиальный барьер, структурная целостность которого обеспечивается межклеточными комплексами плотных и адгезивных контактов. Среди генов, ассоциированных с развитием ВЗК, выявлено несколько регуляторов межклеточного эпителиального барьера. Например, ген *HNF4A* (Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha, ядерный фактор гепатоцитов 4-альфа) является транскрипционным фактором, регулирующим уровень белков плотных контактов, в частности клаудинов и окклюдина (Barrett *et al.*, 2008). Мутации в гене *CDH1*, кодирующем основной компонент адгезивных контактов E-кадгерин, ведут к диссоциации межклеточных связей и ассоциированы с ВЗК (Muisie *et al.*, 2009). Полногеномные исследования также выявили ассоциацию гена-регулятора актинового цитоскелета

*RAC1* с риском развития ВЗК. Поскольку белки плотных контактов функционально связаны с актиновым цитоскелетом, нарушения цитоскелета могут вести к снижению барьерной функции эпителия (Jostins *et al.*, 2012).

Также следует отметить непрямую генетическую регуляцию воспалительного фона через формирование состава и функциональных характеристик микробиома кишечника. Классическим примером служит ген *NOD2*, ассоциированный с изменением состава бактериального сообщества и усилением провоспалительного потенциала микробиоты (Knights *et al.*, 2013). Не менее значимо влияние полиморфизмов гена *ATG16L1*, которые через нарушение секреторной функции клеток Панета и снижение продукции антимикробных пептидов ведут к качественному сдвигу микробиомного профиля (Cadwell *et al.*, 2010). Также доказано, что мутации в гене *FUT2* определяют доступность фукозы в муциновом слое, которая служит специфическим субстратом для большого количества комменсальных бактерий (Rausch *et al.*, 2011). Таким образом, взаимодействие генетических и микробиомных факторов определяет порог активации воспалительных реакций мукозального иммунитета и предрасположенность к ВЗК.

### **1.1.2 Структурно-функциональная организация и механизмы дисфункции кишечного барьера**

Кишечный мукозальный барьер представляет собой единую структурно-функциональную общность, которая включает пристеночный слой мукуса, эпителий слизистой оболочки и клетки мукозального иммунитета. Он обеспечивает защиту внутренней среды организма от внешних факторов, таких как компоненты микробиоты, токсины и антигены (Turner, 2009). Одним из важнейших составляющих этого барьера являются муцин и гликокаликс, которые образуют слизистую пленку на поверхности эпителиальных клеток. Секреция муцинов происходит в бокаловидных клетках, и в кишечнике основным секретиремым муцином является муцин-2. Муцин активно гликозилируется, накапливает жидкость и формирует густой слой, более плотный в области апикальных частей эпителиоцитов и более рыхлый ближе к просвету кишечника (Bergstrom *et al.*, 2010). Бактериальные компоненты микробиоты кишечника населяют внешний, более рыхлый слой, тогда как внутренний слой

муцина в большей части свободен от микроорганизмов (Johansson *et al.*, 2011). Гликокаликс — это комплекс муцинов, ассоциированных с клеточной мембраной на поверхности микроворсинок эпителиальных клеток, который формирует дополнительный уровень защиты и участвует в межклеточной коммуникации и регуляции взаимодействия с патогенными микроорганизмами. Гликокаликс формируют трансмембранные муцины MUC1, MUC3, MUC13 и MUC17 (Pelaseyed *et al.*, 2014).

Второй ключевой уровень мукозального барьера обеспечивает монослой кишечных эпителиоцитов. Его структурная целостность и селективная параклеточная проницаемость формируются за счет апикального соединительного комплекса. В состав этого комплекса входят два типа межклеточных контактов: адгезивные и плотные (Turner, 2009). В апикальной части эпителиоцитов располагаются плотные контакты (ПК), которые обеспечивают физическое соединение между соседними клетками и перекрывают межклеточное пространство. Кроме того, они способны образовывать селективный фильтр для ионов, а также способствовать формированию апикально-базальной полярности эпителиоцитов (Citi, 2018). ПК состоят из комплексов трансмембранных и внутриклеточных белков. Трансмембранные компоненты представлены белками семейства клаудинов, которые определяют ионную проницаемость барьера, и белками окклюдина и трицеллюлина, которые выполняют регуляторные и стабилизирующие функции (Van Itallie и Anderson, 2006). И клаудины, и окклюдин имеют по 4 трансмембранных домена. Такая структура белков формирует два цитоплазматических конца и две внеклеточные петли. Именно внеклеточные петли определяют барьерные свойства ПК. Первая внеклеточная петля клаудинов содержит специфические заряженные аминокислоты, которые формируют ион-селективный фильтр внутри поры. Вторая внеклеточная петля клаудинов и петли окклюдина участвуют в сужении межклеточной щели и стабилизации адгезии между клетками (Günzel и Yu, 2013; Suzuki *et al.*, 2014).

Центральную роль в организации ПК со стороны цитоплазмы играют каркасные белки семейства Zonula Occludens, прежде всего ZO-1 (Zihni *et al.*, 2016). Белок ZO-1 представляет собой многодоменный полипептид и осуществляет интеграцию мембранных компонентов ПК и цитоскелета за

счет специфических белок-белковых взаимодействий. Белок ZO-1 напрямую взаимодействует с филаментным актином (F-актином) актомиозинового кольца через C-концевой участок, содержащий актин-связывающий домен (Fanning *et al.*, 1998). Это взаимодействие позволяет клетке регулировать проницаемость барьера, изменяя натяжение актинового кольца с помощью миозиновых моторов (Zihni *et al.*, 2016).

Базальнее ПК, в непосредственной близости от них, локализуются адгезивные контакты (АК). Они не только выступают в роли инициатора сборки всего апикального комплекса, но и формируют непрерывный адгезивный пояс по периметру клетки и обеспечивают механическую целостность эпителиального слоя (Hartsock и Nelson, 2008). Молекулярную основу АК составляет кальций-зависимый трансмембранный белок E-кадгерин. Его внеклеточные домены формируют гомофильные транс-взаимодействия с молекулами E-кадгерина соседних клеток и физически соединяют их мембраны. Цитоплазматический домен E-кадгерина служит платформой для сборки цитозольного комплекса катенинов. Непосредственно с дистальным участком этого домена связывается  $\beta$ -катенин. Он выполняет функцию адаптера, рекрутируя мономер  $\alpha$ -катенина. В свою очередь,  $\alpha$ -катенин является ключевым механосенсором и осуществляет динамическую связь АК с F-актиновым цитоскелетом (Takeichi, 2014).

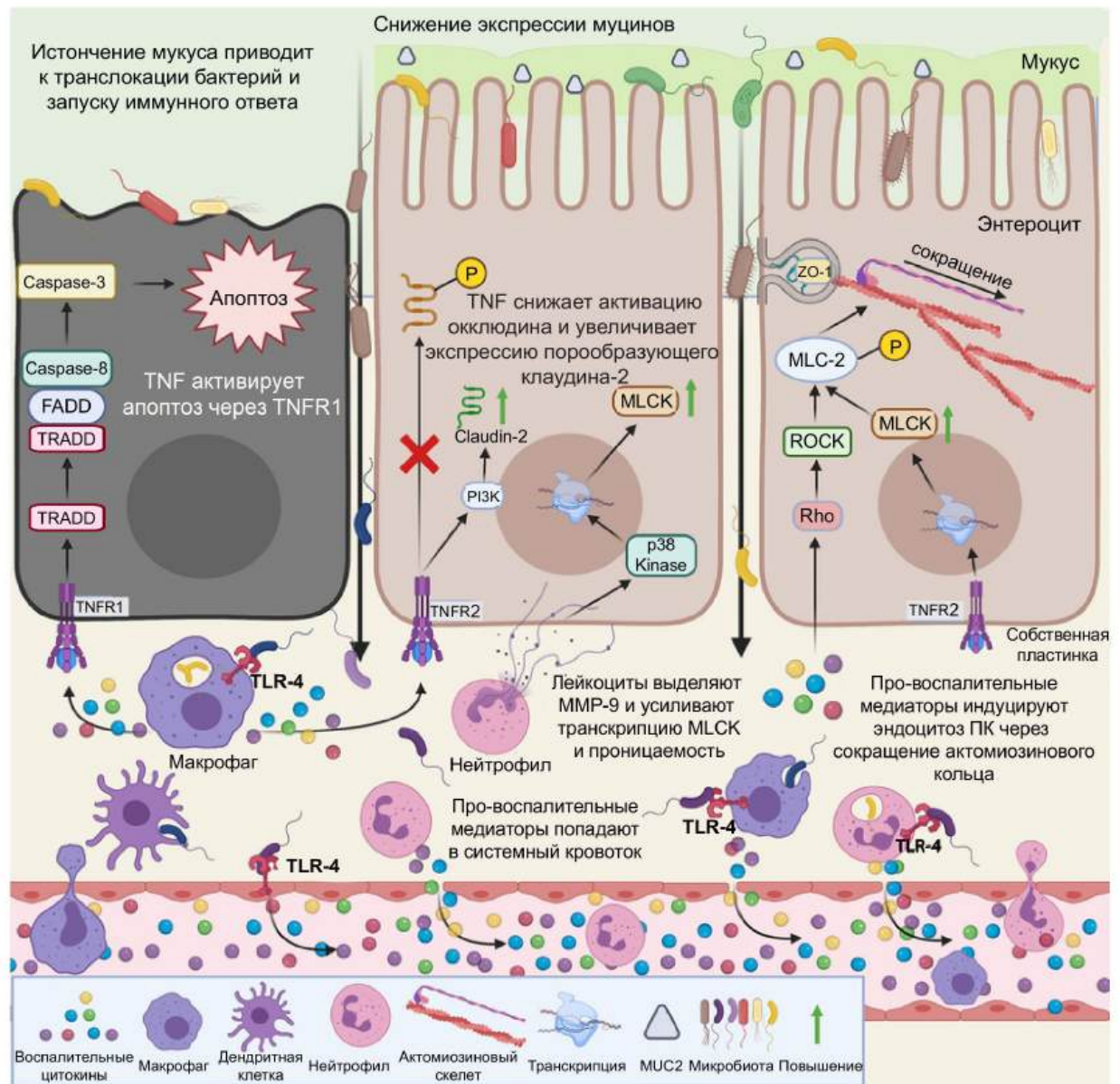
Помимо белковых взаимодействий, пространственная организация и стабильность апикальных комплексов обеспечиваются специализированным липидным микроокружением. Трансмембранные компоненты контактов не распределены в мембране диффузно, а объединяются в нанодомены, обогащенные холестерином и сфинголипидами — липидные рафты. Эти участки плазматической мембраны находятся в жидко-упорядоченной фазе и служат платформой для связывания и кластеризации трансмембранных и мембрана-связанных белков, предотвращая их преждевременный эндоцитоз и участвуя в передаче внутриклеточных сигналов (Seebach *et al.*, 2015; Nusrat *et al.*, 2000). Показано, что АК регулируют формирование ПК именно через модуляцию липидного состава мембраны, контролируя активность сигнального каскада Wnt белком  $\alpha$ -катенином (Shigetomi *et al.*, 2018). Накопление клаудинов и окклюдина в липидных рафтах часто опосредовано

их пальмитилированием, которое задерживает эти белки в богатых холестерином доменах и опосредует формирование ПК (Shen *et al.*, 2012). В современных представлениях формирование комплексов ПК можно описать механизмом жидко-жидкостного фазового разделения. Например, было показано, что на границе раздела фаз мембрана–цитоплазма белок ZO-1 способен к самоорганизации в так называемые «конденсаты» со свойствами жидкости (Beutel *et al.*, 2019; Citi, 2020). При этом полимеризация актина играет ключевую роль в процессе «растекания» конденсата белка ZO-1 по апикальной мембране (Beutel *et al.*, 2019; Pombo-García *et al.*, 2024). Таким образом, плазматическая мембрана и ее липидное разнообразие скорее регулируют процесс формирования апикальных комплексов, нежели просто служат основой для связывания белков ПК и АК.

Провоспалительные цитокины, такие как интерлейкины (например, IL1 $\beta$ , IL6), фактор некроза опухоли альфа (TNF) и интерфероны, вызывают нарушение целостности эпителиального барьера при ВЗК. Эти цитокины активируют внутриклеточные сигнальные каскады ядерного фактора каппа-B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) и митоген-активируемой протеинкиназы (mitogen-activated protein kinases, MAPK) (Bruewer *et al.*, 2003; Al-Sadi *et al.*, 2009) (Рисунок 2). В контексте регуляции эпителиального барьера активация этих путей запускает следующие механизмы. Во-первых, киназа легких цепей миозина (MLCK), экспрессия которой индуцируется TNF, фосфорилирует легкие цепи миозина II, что вызывает сокращение актомиозинового кольца и механическое расхождение ПК (Turner *et al.*, 2014; Cunningham *et al.*, 2012). Во-вторых, воспалительные сигналы стимулируют клатрин-зависимый эндоцитоз белков ПК, таких как окклюдин, клаудины и ZO-1 (Liang *et al.*, 2022; Marchiando *et al.*, 2010). В результате бактериальные липополисахариды (LPS) и другие антигены микробного происхождения перемещаются в собственную пластинку слизистой оболочки. Это вызывает вторичную активацию иммунных клеток и поддерживает процесс хронического воспаления, характерный для ВЗК (Neurath, 2014) (Рисунок 2).

Важно отметить, что при ВЗК также наблюдается нарушение барьерных свойств эпителия за счет апоптоза клеток (Рисунок 2). В норме удаление стареющих энтероцитов происходит путем слущивания в

апикальной части ворсинок или крипт в зависимости от отдела кишечника.



**Рисунок 2.** Схематическое изображение механизмов нарушения барьерной функции кишечника при воспалении (по данным Craig *et al.*, 2022). Нарушение продукции и состава муцина и/или нарушение локализации и продукции белков плотных контактов приводит к парацеллюлярной транслокации микробиоты и токсинов просвета кишечника в собственный слой слизистой оболочки кишечника. Иммунные клетки в этой области, взаимодействуя с антигенами, запускают выработку медиаторов воспаления, которые способствуют рекрутированию других лейкоцитов и лимфоцитов. Медиаторы воспаления попадают в системный кровоток, где могут вызывать иммунную активацию в отдаленных органах. FADD – Fas-associated protein with death domain (белок, ассоциированный с Fas-рецептором, содержащий домен смерти); IFN – интерферон; IL – интерлейкин; MLC – легкая цепь миозина; MLCK – киназа легкой цепи миозина; MMP – матриксная металлопротеиназа; P – фосфат; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; ROCK – Rho-ассоциированная протеинкиназа; TJ – плотный контакт; TLR – толл-подобный рецептор; TNF – фактор некроза опухоли; ZO – zona occludens (белок ПК).

Однако под действием высоких концентраций TNF запускается патологический апоптоз эпителиоцитов (Edelblum *et al.*, 2006), который усугубляется нарушением процесса аутофагии. В частности, мутации

в генах, ответственных за аутофагию (например, *ATG16L1* или *NOD2*), ассоциированных с болезнью Крона, приводят к накоплению поврежденных органелл, эндоплазматическому стрессу и снижению секреции антимикробных пептидов клетками Панета (Kaser *et al.*, 2008; Cadwell *et al.*, 2008) (Рисунок 2).

Таким образом, патогенез повышенной кишечной проницаемости при ВЗК носит многофакторный характер. Он включает в себя нарушение муцинового слоя, диссоциацию апикальных контактов, а также сдвиг баланса между апоптозом и регенерацией эпителия. Совокупность этих факторов приводит к образованию язв и эрозий и запускает хронизацию заболевания. Следовательно, терапевтические стратегии, направленные не только на подавление иммунного ответа, но и на восстановление структурной целостности эпителиального барьера, составляют основу современного подхода в терапии ВЗК (Neurath, 2017).

### **1.1.3 Особенности организации мукозального иммунитета в норме и при воспалении**

Мукозальный иммунитет представляет собой организованную лимфоидную ткань кишечника (пейеровы бляшки и изолированные лимфоидные фолликулы) и собственную пластинку с эпителиальным слоем, где располагаются резидентные клетки иммунной системы. В пейеровых бляшках происходит первичное распознавание антигена и программирование адаптивного иммунного ответа. Ключевую роль в представлении антигенов из просвета кишки играют специализированные эпителиальные М-клетки, которые осуществляют транцитоз бактериальных и пищевых частиц для презентации дендритным клеткам и макрофагам (Mowat и Agace, 2014). Дендритные клетки захватывают и процессируют антигены, затем мигрируют в Т-клеточные зоны, где презентуют их наивным Т-лимфоцитам, определяя вектор их дифференцировки. В условиях нормы резидентные дендритные клетки слизистой оболочки обладают толерогенным фенотипом: они продуцируют ретиноевую кислоту и трансформирующий фактор роста-бета (transforming growth factor, TGF- $\beta$ ), которые способствуют экспрессии на лимфоцитах специфических хоминговых рецепторов и стимулируют дифференцировку

регуляторных Т-клеток (Sun *et al.*, 2007; Coombes и Powrie, 2008).

Основным эффекторным звеном являются иммунные клетки, которые содержатся в собственной пластинке и в эпителиальном слое. Сюда мигрируют активированные в организованной лимфоидной ткани лимфоциты. Кроме того, этот слой содержит обширную популяцию резидентных клеток врожденного иммунитета, включая макрофаги, дендритные клетки и врожденные лимфоидные клетки. Эти клетки обеспечивают первую линию защиты и поддерживают равновесие между про- и противовоспалительными реакциями (Таблица 1) (Pabst и Slack, 2020; Cerutti и Rescigno, 2008).

Помимо М-клеток и бокаловидных клеток, клетки Панета в криптах тонкой кишки продуцируют широкий спектр антимикробных пептидов (например,  $\alpha$ -дефензины, лизоцим), создающих антимикробный градиент и селективно регулирующих состав прилегающей микробиоты (Bevins и Salzman, 2011). Энтероциты экспрессируют паттерн-распознающие рецепторы (Pattern Recognition Receptor, PRR), включая Toll-подобные и NOD-подобные рецепторы. В норме эта экспрессия строго контролируется, что позволяет осуществлять постоянный мониторинг микробной среды и не допускать запуска воспаления (Peterson и Artis, 2014).

**Таблица 1. Клеточный состав и функциональная организация мукозального иммунитета кишечника в норме.**

Тип клетки	Локализация	Статус и происхождение	Функция в норме
<i>I. Индуктивные сайты (GALT: пейеровы бляшки и фолликулы)</i>			
М-клетки (Microfold cells)	Фолликул-ассоц. эпителий	Специализированные эпителиоциты	Транзитоз корпускулярных антигенов и бактерий из просвета в субэпителиальный слой.
Наивные Т- и В-лимфоциты	Лимфоидные фолликулы GALT	Мигрируют из кровотока через высокие эндотелиальные вены	Сканирование антигенов, представленных дендритными клетками. При отсутствии антигена возвращаются в циркуляцию.
Фолликулярные дендритные клетки	В-клеточные зоны фолликулов	Резидентные стромальные клетки	Поддержание архитектуры фолликула, презентация нативного антигена В-клеткам.
<i>II. Эффекторные сайты: Резидентные популяции (преимущественно врожденный иммунитет)</i>			
Кишечные макрофаги (CX3CR1 <sup>+</sup> )	Собственная пластинка	Условно резидентные. Постоянно пополняются за счет моноцитов крови, теряя CD14.	Высокоактивный фагоцитоз бактерий без индукции воспаления. Поддержание толерантности (продукция белков IL10, TGF- $\beta$ ).

Таблица 1. Продолжение таблицы 1

Тип клетки	Локализация	Статус и происхождение	Функция в норме
Врожденные лимфоидные клетки (ILCs, особенно ILC3)	Собственная пластинка	Истинные тканевые резиденты (заселяются в онтогенезе)	Быстрый ответ на сигналы повреждения эпителия. Продуцируют IL22, укрепляя барьер и стимулируя продукцию антимикробных пептидов.
Интра-эпителиальные лимфоциты (IELs)	Между эпителиоцитами	Тканевые резиденты (преимущественно CD8 <sup>+</sup> Т-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки)	«Иммунный надзор» эпителия. Немедленное устранение инфицированных или стрессированных эпителиоцитов.
<b>III. Эффекторный сайт: Мигрирующие популяции (адаптивный иммунитет)</b>			
Дендритные клетки (DCs)	Собственная пластинка и GALT	Мигрирующие. Происходят из костного мозга.	Захват антигена в слизистой и миграция в мезентериальные лимфоузлы для праймирования Т-клеток и импринтинга хоминговых рецепторов.
Плазматические клетки	Собственная пластинка	Терминально дифференцированные В-клетки, пришедшие из GALT/ЛУ	Массивная продукция димерного IgA для формирования секреторного SIgA на поверхности слизистого слоя.
Эффекторные CD4 <sup>+</sup> Т-клетки (Treg, Th17)	Собственная пластинка	Активированные (праймированные) лимфоциты, мигрировавшие из ЛУ	Клетки Treg (Foxp3 <sup>+</sup> ) обеспечивают иммунную толерантность к микробиоте. Клетки Th17 обеспечивают защиту от внеклеточных патогенов и грибов.

Примечание: GALT — ассоциированная с кишечником лимфоидная ткань; ЛУ — лимфоузлы.

В условиях физиологической нормы в слизистой оболочке доминируют механизмы активного подавления иммунного ответа. Центральными эффекторами иммунной толерантности выступают регуляторные Т-клетки (Treg), характеризующиеся экспрессией транскрипционного фактора FoxP3 (Forkhead Box P3). Их супрессорные функции реализуются преимущественно через секрецию противовоспалительных цитокинов (IL10 и TGF- $\beta$ ) и контакт-зависимые механизмы (Bilate и Lafaille, 2012; Sebula *et al.*, 2013). Кроме того, собственная пластинка содержит значительное число резидентных макрофагов с толерогенными свойствами. Эти клетки обладают высокой фагоцитарной активностью, эффективно удаляя поврежденные клетки и бактерии. В ответ на стимуляцию антигенами комменсальной микробиоты эти макрофаги не продуцируют провоспалительные медиаторы, а активно секретируют IL10 и TGF- $\beta$  (Bain и Mowat, 2014; Smythies *et al.*, 2005).

Началом хронического воспаления при ВЗК является нарушение

равновесия между иммунной системой слизистой оболочки и кишечной микробиотой. В основе этого лежит нарушение функции врожденного иммунитета, проявляющееся в виде усиления распознавания микробных сигналов и повышенной активации провоспалительных сигнальных путей. В норме экспрессия Toll-подобных рецепторов (Toll-like Receptor, TLR) на кишечном эпителии ограничена, что предотвращает избыточные реакции на комменсальную микробиоту. При ВЗК наблюдается патологическое повышение экспрессии ключевых рецепторов, в частности TLR4 (использует липополисахарид грамотрицательных бактерий в качестве лиганда) и TLR5 (использует флагеллин как лиганд), как на поверхности энтероцитов, так и на иммунных клетках собственной пластинки (Cario и Podolsky, 2000; Abreu, 2010). Активация TLR4 и TLR5 запускает каскад NF- $\kappa$ B, активируя выработку интерлейкина-8 (IL8), TNF и хемокинов, рекрутирующих нейтрофилы и другие иммунные клетки в очаг воспаления.

Важное место в патогенезе, прежде всего БК, занимают мутации в гене *NOD2*. Во-первых, нарушается способность белка NOD2 индуцировать экспрессию антимикробных пептидов, в частности  $\alpha$ -дефензинов, продуцируемых клетками Панета (Wehkamp *et al.*, 2004). Это приводит к ослаблению врожденной защиты и изменению микробного профиля в пользу более иммуногенных бактерий. Во-вторых, мутантный белок NOD2 теряет способность эффективно инициировать аутофагию (Cooney *et al.*, 2010). Нарушение процесса аутофагии негативно влияет на процессинг и презентацию антигенов, а также способствует выживанию адгезивно-инвазивных штаммов *Escherichia coli*. В-третьих, белок NOD2 в норме играет роль негативного регулятора реакций, опосредованных TLR, и препятствует развитию иммунного ответа на симбиотические микроорганизмы (Hedl и Abraham, 2011).

Хотя мутации в гене *NOD2* являются наиболее сильным генетическим фактором риска для БК, они выявляются лишь у 30–40% пациентов европеоидной расы и практически отсутствуют в азиатских популяциях (Hugot *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2015). Более того, низкая пенетрантность этих мутаций (менее 10%) указывает на критическую роль других факторов в патогенезе ВЗК. Помимо описанных выше регуляции аутофагии и поддержания эпителиального барьера, полногеномные ассоциативные

исследования выявили контроль адаптивного иммунного ответа в сигнальном пути IL23/Th17 как фактор восприимчивости к ВЗК (Jostins *et al.*, 2012; Khor *et al.*, 2011).

Конвергенция сигналов от активированных TLR, NOD2 и рецепторов провоспалительных цитокинов (TNF, IL1 $\beta$ ) происходит на уровне активации каскада NF- $\kappa$ B. Это делает его ключевым регулятором воспалительного ответа при ВЗК. В физиологических условиях наблюдается лишь транзиторный запуск каскада NF- $\kappa$ B. Напротив, при ВЗК происходит его гиперактивация, особенно в макрофагах и дендритных клетках собственной пластинки слизистой оболочки кишечника. Основным механизмом передачи сигнала в этом каскаде является активация канонического пути NF- $\kappa$ B (Karin, 2009). Активированный димер NF- $\kappa$ B транслоцируется в ядро и инициирует транскрипцию широкого спектра генов: провоспалительных цитокинов (TNF, IL1 $\beta$ , IL6, IL12, IL23), хемокинов (CXCL8, CCL2, CCL20), молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1) и ферментов (COX-2, iNOS), что приводит к хроническому повреждению ткани. Также активируется и неканонический путь NF- $\kappa$ B, который отвечает за формирование и поддержание вторичных лимфоидных органов (Mackay и Schneider, 2009). Это способствует хронической инфильтрации лимфоцитов и образованию изолированных лимфоидных фолликулов.

В основе хронизации воспалительного процесса при ВЗК лежит нарушение толерантности адаптивного иммунитета. В частности, наблюдается патологическое преобладание агрессивных субпопуляций Т-хелперов (Th) и снижение количества регуляторных клеток. Важно отметить, что профили иммунных клеток являются специфическими для конкретной нозологии.

При БК наблюдается доминирование клеточного иммунного ответа 1-го и 17-го типов. Активация макрофагов и дендритных клеток через паттерн-распознающие рецепторы приводит к гиперпродукции ключевых поляризирующих цитокинов — IL12 и IL23. IL12 через транскрипционный фактор T-bet индуцирует дифференцировку наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в Th1, продуцирующие высокие дозы интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ) и TNF (Neurath, 2014). Параллельно с этим IL23 поддерживает популяцию Th17. Через активацию фактора ROR $\gamma$ t (ретиноид-связанный орфановый

рецептор гамма-t) они продуцируют интерлейкины IL17A, IL17F, IL22 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (Harbour *et al.*, 2015). Эти медиаторы обеспечивают привлечение нейтрофилов и поддерживают трансмуральное гранулематозное воспаление (Harbour *et al.*, 2015) (Таблица 2).

В отличие от БК, при ЯК иммунный ответ характеризуется атипичным Th2-иммунным ответом. Ключевую патогенную роль играет не классический IL4, а интерлейкин-13 (IL13), продуцируемый CD1d-позитивными натуральными киллерами Т (natural killer Т, НКТ) II типа (Heller *et al.*, 2002; Fuss *et al.*, 2004; Fuss *et al.*, 2014). IL13 через рецептор IL13R $\alpha$ 1/IL4R $\alpha$  на эпителиоцитах индуцирует экспрессию клаудина-2, усиливает апоптоз и подавляет реституцию эпителия, что клинически проявляется поверхностным изъязвлением слизистой оболочки (Heller *et al.*, 2005). Одновременно с этим Th9-клетки через продукцию IL9 и активацию IL9R на эпителии вносят вклад в нарушение барьерной функции (Gerlach *et al.*, 2014) (Таблица 2).

У пациентов с ВЗК снижается количество регуляторных Т-клеток (Treg, FoxP3<sup>+</sup>) или нарушается их функционирование, что является важным фактором патогенеза этих заболеваний. Цитокины IL6, TNF и IL1 $\beta$  блокируют супрессорную активность клеток Treg. Более того, в присутствии IL6 происходит перепрограммирование клеток Treg, и они могут дифференцироваться в патогенные Th17-клетки (Bettelli *et al.*, 2006). Кроме того, у клеток-мишеней, эффекторных лимфоцитов Th1 и Th17, снижается чувствительность к ингибирующим сигналам TGF- $\beta$  и IL10 (Saruta *et al.*, 2007; Vignali *et al.*, 2008) (Таблица 2).

В результате нарушения Т-клеточной регуляции происходит снижение толерантности В-клеток. Транслокация бактериальных антигенов через поврежденный барьер в условиях повышенной активации через Т-хелперы приводит к выработке В-клетками антител против антигенов комменсальной микробиоты и собственных антигенов. Клинически значимыми маркерами этого процесса служат антитела к *Saccharomyces cerevisiae* (Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody, ASCA), характерные для БК, и перинуклеарные антинейтрофильные цитоплазматические

антитела (Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody, pANCA), ассоциированные с ЯК (Rieder *et al.*, 2017). Гиперактивация системы комплемента способствует поддержанию хронического воспаления и развитию коморбидных расстройств.

Таким образом, патогенез ВЗК представляет собой замкнутый круг, в котором нарушение барьерной функции и врожденного иммунитета приводят как к активации иммунного ответа, так и к нарушению регуляторных механизмов.

**Таблица 2. Субпопуляции CD4+ Т-хелперов.**

Тип	Ключевые цитокины и факторы транскрипции	Дифференцировка и механизмы действия	Функции и патологии
<i>I. Классические субпопуляции</i>			
<b>Th1</b>	IFN- $\gamma$ , IL2, TNF; T-bet, STAT1, STAT4	Дифференцировка: IL12, IFN- $\gamma$ (Mosmann <i>et al.</i> , 1986; Куприянов <i>et al.</i> , 2021). Механизмы: Активация макрофагов, стимуляция IgG1/IgG3, усиление презентации антигенов	Норма: Защита от внутриклеточных патогенов (микобактерии, вирусы). Патология: Диабет 1 типа, рассеянный склероз, болезнь Крона, отторжение трансплантата
<b>Th2</b>	IL4, IL5, IL13, IL10; GATA3, STAT6	Дифференцировка: IL4 (Mosmann <i>et al.</i> , 1986; Mannion <i>et al.</i> , 2025). Механизмы: Переключение Ig на IgE, активация эозинофилов, дегрануляция тучных клеток	Норма: Защита от гельминтов и эктопаразитов. Патология: Астма, атопический дерматит, аллергический ринит, анафилаксия
<i>II. Субпопуляции, ассоциированные с барьерными тканями</i>			
<b>Th17</b>	IL17A, IL17F, IL21, IL22; ROR $\gamma$ t, ROR $\alpha$ , STAT3	Дифференцировка: TGF- $\beta$ +IL6, IL21, IL23 (Louten <i>et al.</i> , 2009). Механизмы: Рекрутирование нейтрофилов, индукция антимикробных пептидов, усиление барьера	Норма: Защита от внеклеточных бактерий и грибов, поддержание слизистых. Патология: Псориаз, анкилозирующий спондилит, ревматоидный артрит, ВЗК
<b>Th9</b>	IL9, IL10; PU.1, IRF4, STAT6	Дифференцировка: TGF- $\beta$ +IL4 (Schmitt <i>et al.</i> , 2014). Механизмы: Стимуляция тучных клеток, продукция муцина, цитотоксичность к опухолям	Норма: Противоопухолевый иммунитет, защита от нематод. Патология: Аллергическое воспаление, фиброз легких, аутоиммунные заболевания
<b>Th22</b>	IL22, TNF, IL13; AHR	Дифференцировка: IL6+TNF (Trifari <i>et al.</i> , 2009; Hossein-Khannazer <i>et al.</i> , 2021). Механизмы: Регенерация эпителия, продукция антимикробных пептидов	Норма: Репарация тканей, защита барьерных поверхностей. Патология: Псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит
<i>III. Регуляторные и специализированные субпопуляции</i>			
<b>Treg</b>	IL10, TGF- $\beta$ , IL35; FoxP3, STAT5	Дифференцировка: TGF- $\beta$ +IL2 (Куклина и соавт., 2025). Механизмы: Супрессия эффекторных Т-клеток, секреция противовоспалительных цитокинов, индукция толерогенных дендритных клеток	Норма: Поддержание толерантности, предотвращение аутоиммунитета. Патология: X-сцепленный синдром иммунной дисрегуляции с энтеропатией, эндокринопатией и дерматитом, подавление противоопухолевого иммунитета

Таблица 2. Продолжение таблицы 2

Тип	Ключевые цитокины и факторы транскрипции	Дифференцировка и механизмы действия	Функции и патологии
<b>Tfh</b>	IL21, IL4; Vcl-6, STAT3	Дифференцировка: IL6, IL12 (Johnston <i>et al.</i> , 2009; Nurieva <i>et al.</i> , 2009; Eisenbarth <i>et al.</i> , 2021). Механизмы: Помощь В-клеткам в герминативных центрах, переключение классов антител	Норма: Гуморальная память, высокоаффинные антитела. Патология: Красная волчанка, синдром Шегрена, аутоиммунный тиреоидит
<b>Tr1</b>	IL10, TGF- $\beta$ ; c-Maf, Blimp-1	Дифференцировка: IL27, IL10 (Battaglia <i>et al.</i> , 2006). Механизмы: Супрессия через IL10, подавление презентации антигенов	Норма: Периферическая толерантность, контроль хронического воспаления. Патология: ВЗК, отторжение трансплантата
<b>IV. Гибридные и пластичные формы</b>			
<b>Th17.1 / ex-Th17</b>	IFN- $\gamma$ , IL17A (вариабельно); T-bet + ROR $\gamma$ t	Дифференцировка: IL12, IL23 (пластичность Th17) (Куклина и соавт., 2025). Механизмы: Агрессивное макрофагальное воспаление, высокая цитотоксичность	Норма: Не описана. Патология: Наиболее патогенный фенотип при рассеянном склерозе, болезни Крона, ювенильном артрите, анкилозирующем спондилите

#### 1.1.4 Колоректальный рак, ассоциированный с колитом

Колоректальный рак (КРР), ассоциированный с колитом, представляет собой наиболее тяжелое осложнение ВЗК, приводящее к летальному исходу у 10-15% пациентов. Общий риск развития колоректальной карциномы при язвенном колите составляет около 1–2% через 10 лет после дебюта заболевания, увеличивается до 4–8% через 20 лет и может достигать 14–18% через 30 лет. Вероятность злокачественной трансформации коррелирует с длительностью заболевания, протяженностью поражения кишечника, наличием сопутствующего первичного склерозирующего холангита, а также с тяжестью хронического воспаления слизистой оболочки (Beaugerie и Itzkowitz, 2015). Путь канцерогенеза от воспаления через дисплазию ткани к карциноме определяет уникальные молекулярные и морфологические характеристики опухоли. К ним относятся ранние мутации в гене *TP53*, а также высокая частота множественных поражений и синхронно возникающих опухолей. В этом случае основным драйвером канцерогенеза является хроническое неразрешающееся воспаление. Инфильтрация иммунных

клеток в слизистый слой приводит к образованию активных форм кислорода и азота, которые вызывают окислительное повреждение ДНК и формирование уникальных патогенетических черт КРР (Robles *et al.*, 2016). Провоспалительные цитокины запускают процесс пролиферации трансформированных клеток. В частности, IL6 и IL23 активируют сигнальные пути JAK/STAT3 и индуцируют экспрессию антиапоптотических белков и факторов роста. Одновременно активируется транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, контролирующий гены клеточной пролиферации и устойчивости к апоптозу. Хроническая активация этих осей создает систему обратной связи, обеспечивающую цикл воспаления и пролиферации (Grivennikov, 2013).

Существенный вклад в развитие рака на фоне воспаления вносят сопутствующие ВЗК метаболические нарушения. Наблюдается дисбаланс в метаболизме сфинголипидов: продукция сфинголипида церамида снижается, а сфингозин-1-фосфата повышается. Считается, что последний, взаимодействуя со специфическим рецептором, стимулирует пролиферацию, ангиогенез и подавляет апоптоз (Liang *et al.*, 2013). Одновременно с этим при хроническом колите развивается дефицит масляной кислоты из-за снижения численности бутират-продуцирующих бактерий, и происходит метаболическое переключение колоноцитов с окислительного фосфорилирования на аэробный гликолиз, что способствует формированию про-ракового фенотипа (Donohoe *et al.*, 2012). Снижение окисления бутирата в митохондриях также ведет к повышению концентрации кислорода в просвете кишки, что способствует размножению патогенных штаммов *Enterobacteriaceae*, в частности, *E. coli*.

Кишечная микробиота сама по себе также выступает важным фактором канцерогенеза (Dan *et al.*, 2025). Дисбиоз при ВЗК создает нишу для колонизации так называемых «онкобактерий», которые участвуют в репрограммировании эпителиальных клеток через специализированные механизмы мутагенеза, модуляцию онкогенных сигнальных путей и взаимодействие с иммунным микроокружением (González *et al.*, 2024). Наиболее изученными проканцерогенными микроорганизмами являются штаммы *E. coli*, несущие гены, которые кодируют поликетидсинтазы (polyketide synthase, *pks*<sup>+</sup>). Такие бактерии продуцируют генотоксичный

колибактин, который вызывает двуцепочечные разрывы ДНК и блокирует репликацию в эпителиоцитах (Arthur *et al.*, 2012). Благодаря наличию электрофильного циклопропанового кольца колибактин ковалентно алкилирует адениновые основания в локусах, богатых аденином и тиминном. Это препятствует продвижению репликативной вилки и вызывает образование двуцепочечных разрывов в эпителиоцитах (Arthur *et al.*, 2012). Процесс репарации этих повреждений приводит к образованию специфических мутаций в гене-онкосупрессоре *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) (Agrawal *et al.*, 2025; Yang *et al.*, 2026). Повышенная распространенность *pks*<sup>+</sup> *E. coli* у пациентов с ВЗК коррелирует с более высоким риском дисплазии и рака (Arthur *et al.*, 2012).

Еще одним промотором канцерогенеза можно назвать патогенный вариант микроорганизма *Bacteroides fragilis*, который продуцирует токсичную металлопротеиназу (токсин *B. fragilis*). Механизм его действия основан на селективном расщеплении внеклеточного домена эпителиального кадгерина, что приводит к нарушению межклеточной адгезии и высвобождению цитоплазматического  $\beta$ -катенина. Свободный  $\beta$ -катенин транслоцируется в ядро, активируя сигнальные пути Wnt и NF- $\kappa$ B в эпителиальных клетках (Chung *et al.*, 2018). В результате происходит выключение противоопухолевого T-клеточного ответа (Hwang *et al.*, 2024). Установлено, что патогенные *B. fragilis* индуцируют эпителиально-мезенхимальный переход и регулируют экспрессию онкогенных длинных некодирующих РНК, в частности LRP11-AS1, которая выступает в роли молекулярного триггера пролиферации и миграции колоноцитов (Wu *et al.*, 2024).

Особое значение в контексте ВЗК имеет увеличение численности сульфатредуцирующих бактерий, преимущественно *Desulfovibrio* spp., которые выделяют сероводород в ходе анаэробного дыхания (Li *et al.*, 2025). При его избыточном накоплении происходит подавление активности цитохром-с-оксидазы, нарушается  $\beta$ -окисление бутирата, что способствует переключению колоноцитов на анаэробный гликолиз (Attene-Ramos *et al.*, 2006). Кроме того, сероводород повреждает ДНК, ингибирует репарацию, и может индуцировать персульфидирование белков (Cao *et al.*, 2025). В экспериментальных моделях показано, что *Desulfovibrio* могут также

модулировать микроокружение опухоли, нарушая метаболизм лактата и способствуя иммуносупрессии (Li *et al.*, 2025).

Важную роль в патогенезе КРР на фоне ВЗК играет эпигенетическая регуляция в клетках эпителия и иммунных клетках. К ней относятся посттрансляционные модификации гистонов, изменение архитектуры ядра и ремоделирование хроматина. Ряд современных методов позволяет изучать эпигенетическую регуляцию за счет изменения пространственной локализации хроматина. В частности, нами был разработан и адаптирован индуцируемый вариант метода картирования хроматина DamID (DNA adenine methyltransferase Identification, идентификация с помощью ДНК-аденин-метилтрансферазы), позволяющий картировать участки хроматина, ассоциированные с ламином В1 в клетках млекопитающих (Кожевникова и соавт., 2018). Этот подход, ранее валидированный на *Drosophila melanogaster* (Pindyurin *et al.*, 2016), даёт возможность исследовать изменения ядерной архитектуры при воспалении. При канцерогенезе происходит перестройка ламин-ассоциированных доменов, что может приводить к aberrантной экспрессии онкосупрессоров и онкогенов (Shah *et al.*, 2022). Этот процесс отражает существенную реорганизацию хроматина при ВЗК и ассоциированном с ним канцерогенезе, что является следствием хронизации воспаления и активации описанных выше путей.

Таким образом, микробиом, ассоциированный с ВЗК, может влиять на канцерогенез посредством прямой генотоксичности, модуляции онкогенных сигнальных путей и воспалительного микроокружения, а также через нарушение энергетического метаболизма колоноцитов. Совокупность этих факторов создает проканцерогенный фон, что обосновывает поиск микробиом-ориентированных стратегий профилактики и терапии КРР-ВЗК (Dan *et al.*, 2025; González *et al.*, 2024).

### **1.1.5 Современные подходы к терапии воспалительных заболеваний кишечника**

Современная терапия ВЗК представляет собой многоуровневую систему, которая включает как традиционные противовоспалительные средства и иммуносупрессоры, так и новейшие таргетные препараты. Кроме того, в разработке находятся перспективные направления клеточной

терапии (Neurath, 2019; Feuerstein *et al.*, 2020). Выбор стратегии лечения ВЗК определяется нозологией, активностью воспаления, локализацией поражения, наличием внекишечных проявлений и ответом на предыдущую терапию (Feuerstein *et al.*, 2020; Rubin *et al.*, 2019). Обзор одобренных препаратов, а также молекул на стадии клинических испытаний приведен на Рисунке 3.

Препаратом первой линии для лечения легких и среднетяжелых форм ЯК остаются препараты 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК, месалазин). Месалазин обладает локальным противовоспалительным действием, ингибируя циклооксигеназу, липоксигеназу и продукцию провоспалительных цитокинов (Feuerstein *et al.*, 2020). В отличие от ЯК, при лечении БК эффективность препаратов 5-АСК крайне ограничена, ввиду чего их применение не рассматривается в качестве первой линии терапии (Gomollón *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017). Для борьбы с обострениями БК и ЯК используются системные и топические глюкокортикостероиды (преднизолон и будесонид соответственно). Однако их длительное применение ограничено развитием системных побочных эффектов и формированием гормональной зависимости (Feuerstein *et al.*, 2020). В связи с этим стероиды не применяются для поддерживающей терапии. Тиопурины (азатиоприн, 6-меркаптопурин) и метотрексат используются в качестве средств для поддержания ремиссии (Chande *et al.*, 2015; Feuerstein *et al.*, 2020). В то же время эти препараты характеризуются медленным наступлением эффекта (от 8 до 12 недель), и их использование сопряжено с риском миелосупрессии, гепатотоксичности и лимфопролиферативных заболеваний (Kotlyar *et al.*, 2015).

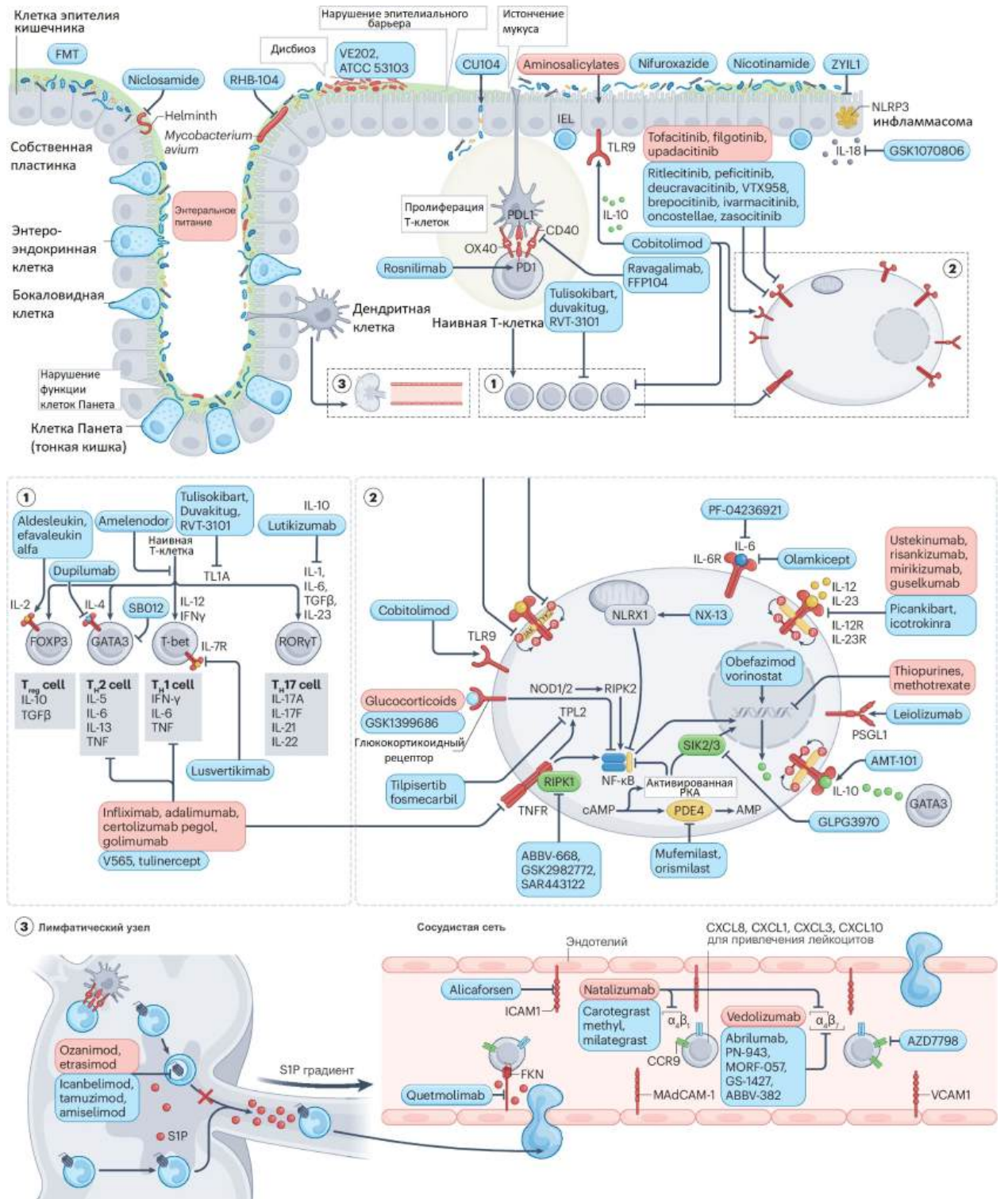
Внедрение препаратов биологической терапии стало важнейшим этапом в лечении ВЗК и помогло достичь ремиссии у значительной доли пациентов с рефрактерными и осложненными формами заболевания (Neurath, 2019). Первыми и наиболее изученными биологическими агентами являются моноклональные антитела к TNF. Инфликсимаб (химерные антитела), адалимумаб и голимумаб (полностью человеческие антитела), а также цертолизумаб пэгол блокируют связывание TNF с его рецепторами и ингибируют воспалительный ответ (Hanauer *et al.*, 2006; Sandborn *et al.*, 2007). Анти-TNF-терапия эффективна как при БК, так и при ЯК, однако

у 20–40% пациентов происходит первичная или вторичная потеря ответа (Roda *et al.*, 2016). Роль IL12 и IL23 в дифференцировке и поддержании провоспалительных Th1- и Th17-клеток послужила обоснованием для разработки ингибиторов этих процессов. Устекинумаб – моноклональное антитело к общей субъединице IL12 и IL23. Оно блокирует оба цитокина и подавляет эффекторные функции Т-хелперов 1-го и 17-го типов (Teng *et al.*, 2015). Препарат одобрен для лечения БК средней и тяжелой степени, а также ЯК (Feagan *et al.*, 2016; Sands *et al.*, 2022). Кроме того, были разработаны селективные ингибиторы IL23: ризанкизумаб, гуселькумаб и мирикизумаб (D’Haens *et al.*, 2022; Danese *et al.*, 2024). Они направленно блокируют только IL23, сохраняя работу IL12, что может снижать риск инфекционных осложнений (Danese *et al.*, 2024).

В качестве терапии ВЗК также используются антагонисты интегринов, но они действуют через другой механизм. Ведолизумаб – гуманизированное моноклональное антитело к интегрина лимфоцитов  $\alpha_4\beta_7$ , которое селективно блокирует взаимодействие этого интегрин с адгезивной молекулой MAdCAM-1 на эндотелии сосудов кишечника (Soler *et al.*, 2009). В результате нарушается миграция лимфоцитов в слизистую оболочку кишечника без нарушения системного иммунного ответа. Ведолизумаб показал высокий профиль безопасности и эффективности как при БК, так и при ЯК (Sandborn *et al.*, 2013; Feagan *et al.*, 2013). Тем не менее, антагонисты интегринов, как и другие классы таргетных препаратов, не позволяют достичь полного и устойчивого излечения у большинства пациентов с ВЗК.

Также среди препаратов последнего поколения можно отметить низкомолекулярные соединения, к преимуществам которых можно отнести пероральный путь введения, быстрое начало действия и отсутствие иммуногенности (Danese *et al.*, 2024). Тофацитиниб (ингибитор JAK1/JAK3), упадацитиниб (селективный ингибитор JAK1) и филготиниб (ингибитор JAK1) блокируют внутриклеточные сигнальные каскады, которые обеспечивают провоспалительный эффект цитокинов IL6, IL12, IL23 и IFN $\gamma$  (Danese *et al.*, 2024; Sandborn *et al.*, 2020). Тофацитиниб одобрен для лечения ЯК (Sandborn *et al.*, 2017), упадацитиниб – как для ЯК, так и для БК (Danese *et al.*, 2022; Loftus *et al.*, 2023). К числу ограничений препаратов этого класса относятся повышенный риск опоясывающего герпеса и венозных

тромбоэмболий (Sandborn *et al.*, 2017).



**Рисунок 3.** Механизмы действия препаратов, одобренных в настоящее время (красная рамка), или проходящих клинические испытания II и III фазы (синяя рамка) для лечения ВЗК (по Vieujean *et al.*, 2025).

**Блокаторы цитокинов:** анти-TNF (инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаба пэгол, голимумаб); анти-IL12/23 (устекинумаб); анти-IL23 (ризанкизумаб, гуселькумаб, мирикизумаб); ингибиторы  $IL1\alpha/\beta$  (лутикизумаб), IL2 (алдеслейкин, эфавалейкин), IL6 (оламкицепт), IL7 (луспертикимаб), IL18 (GSK1070806).

**Ингибиторы TL1A** (тулисокибарт, дувакитуг, RVT-3101) — подавляют дифференцировку Th17-клеток и фиброз.

**Блокаторы миграции лимфоцитов:** анти- $\alpha_4\beta_7$ -интегрин (ведолизумаб, абрилумаб, PN-943, MORF-057, GS-1427, ABBV-382); анти- $\alpha_4$ -интегрин (натализумаб, каротеграст метил, милатеграст); блокаторы молекул адгезии (аликафорсен — ICAM1; кветмолимаб — фракталкин; AZD7798 — CCR9); модуляторы S1P-рецепторов (озанимод, этрасимод, иканбелिमод, тамузимод, амиселимод).

**Низкомолекулярные ингибиторы внутриклеточных сигнальных путей:** ингибиторы JAK (тофацитиниб, упадацитиниб, филготиниб); ингибиторы RIPK1 (ABBV-668, GSK2982772, SAR443122); ингибиторы PDE4 (муфемиласт, орисмиласт); ингибиторы SIK2/3 (GLPG3970).

**Прочие мишени:** ингибиторы PD1 (роснилимаб), CD40 (равагалимаб, FFP104); антагонист GATA3 (SB012); модулятор дифференцировки Th1/Th17 (амеленодор).

**Аббревиатуры:** CCR — хемокиновый рецептор; CXCL — хемокиновый лиганд; FKN — фракталкин; FMT — трансплантация фекальной микробиоты; IEL — интраэпителиальный лимфоцит; IFN $\gamma$  — интерферон- $\gamma$ ; MAdCAM-1 — молекула адгезии сосудистого эндотелия слизистых оболочек 1; NF- $\kappa$ B — ядерный фактор  $\kappa$ B; NLRP3 — NOD-подобный рецептор семейства пириновых доменов 3; NLRX-1 — NOD-подобный рецептор X1; PDE4 — фосфодиэстераза 4; PKA — протеинкиназа A; PSGL1 — P-селектиновый гликопротеиновый лиганд-1; R — рецептор; RIPK — рецептор-взаимодействующая серин/треониновая протеинкиназа; S1P — сфингозин-1-фосфат; SIK2/3 — соль-индуцибельные киназы 2/3; TGF- $\beta$  — трансформирующий фактор роста  $\beta$ ; TLR9 — Toll-подобный рецептор 9; TPL2 — локус прогрессии опухоли 2; TNFR — рецептор фактора некроза опухоли; Treg — регуляторные T-клетки; VCAM1 — молекула адгезии сосудистых клеток 1.

Озанимод — пероральный агонист рецепторов S1P1 и S1P5. Препарат вызывает интернализацию рецепторов S1P на лимфоцитах, удерживая их в лимфатических узлах и предотвращая миграцию в кишечник (Danese *et al.*, 2024). Озанимод оказался эффективным для индукции и поддержания ремиссии при ЯК и одобрен для клинического применения (Sandborn *et al.*, 2021).

Кроме фармакологических подходов активно развиваются направления клеточной терапии, нацеленные на восстановление иммунной толерантности и целостности тканей. В 2025 году начаты клинические испытания препарата аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (remestemcel-L) при рефрактерных формах БК (Panés *et al.*, 2022; García-Olmo *et al.*, 2025). В сентябре 2025 года группа М.Ф. Нойрата (Университет Эрлангена–Нюрнберга, Германия) впервые в мире сообщила об успешном применении аутологичных T-клеток с химерным антигенным рецептором (Chimeric Antigen Receptor T-cells, CAR-T) специфичных к CD19, у пациентки с мультирезистентным язвенным колитом (Müller *et al.*, 2025). Инфузия CAR-T-клеток привела к быстрому истощению B-клеток в периферической крови и слизистой оболочке. У пациентки наблюдалась клиничко-эндоскопическая ремиссия, нормализация массы тела и восстановление качества жизни. Авторы подчеркивают, что данный случай является единственным и требует подтверждения в контролируемых клинических исследованиях (Müller *et al.*, 2025).

При описанном многообразии терапевтических подходов существенная

доля пациентов с ВЗК не достигает устойчивой ремиссии, теряет ответ на терапию или сталкивается с побочными эффектами (Roda *et al.*, 2016). Проблема первичной и вторичной неэффективности биологических препаратов, а также отсутствие надежных предсказательных маркеров ответа на терапию остаются нерешенными (Danese *et al.*, 2024). Это обосновывает необходимость дальнейшего изучения патогенетических механизмов ВЗК, поиска новых терапевтических мишеней и разработки альтернативных подходов к лечению.

## 1.2 Ассоциированные с микробиотой механизмы регуляции кишечного барьера и иммунитета

### 1.2.1 Микробиота кишечника в норме: состав, метаболическая активность и иммуномодулирующие функции

Микробиота кишечника представляет собой сложную экосистему, включающую бактерии, археи, вирусы и эукариотические микроорганизмы. Совокупный генетический материал этого сообщества, микробиом, по оценкам, превышает количество генов человека в 100–150 раз (Qin *et al.*, 2010). Внутренний, непосредственно прилегающий к эпителию слой муцина в норме практически стерилен благодаря высокой концентрации антимикробных пептидов (Vaishnava *et al.*, 2011). Комменсальные бактерии локализуются преимущественно во внешнем слое муцина и в просвете кишечника, что предотвращает прямой контакт бактериальных клеток с эпителием и патологическую активацию иммунитета (Johansson *et al.*, 2011).

В толстой кишке, где плотность микроорганизмов достигает  $10^{11}$ – $10^{12}$  КОЕ/мл, доминируют бактерии двух основных типов: *Firmicutes* (грамположительные, 60–80%) и *Bacteroidetes* (грамотрицательные, 20–40%), тогда как *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia* присутствуют в значительно меньших количествах (Eckburg *et al.*, 2005). Современные метаанализы подтверждают, что такое соотношение таксонов характерно для здорового микробиома независимо от географического региона (Hou *et al.*, 2025).

Среди *Firmicutes* преобладают представители кластеров *Clostridium leptum* и *Clostridium coccoides* (ныне классифицируемый как *Blautia*

*coccoides*), к которым относятся ключевые продуценты бутирата. *Bacteroidetes* представлены родами *Bacteroides*, *Prevotella* и *Alistipes*, которые специализируются на ферментации полисахаридов и продукции ацетата и пропионата (Oliphant и Allen-Vercoe, 2019). *Actinobacteria* включают *Bifidobacterium* spp., обладающие пребиотической активностью, а *Verrucomicrobia* — *Akkermansia muciniphila*, которая участвует в деградации муцина и поддержании целостности слизистого слоя (Derrien *et al.*, 2011).

С позиции нормальной физиологии микробиоту следует рассматривать как интегрированный метаболический орган, который реализует свою функцию через продукцию низкомолекулярных соединений, вовлеченных в регуляцию барьерной функции, иммунитета и системного метаболизма. Ключевыми классами таких соединений являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), вторичные желчные кислоты, полиамины, производные триптофана, а также компоненты клеточной стенки бактерий (липополисахариды, пептидогликан, флагеллин).

КЦЖК образуются в результате бактериальной ферментации пищевых волокон и резистентного крахмала. Уксусная кислота (ацетат, C2), пропионовая кислота (пропионат, C3) и масляная кислота (бутират, C4) составляют более 95% всех КЦЖК в толстой кишке (Cumings *et al.*, 1987). Концентрация КЦЖК в просвете толстой кишки может достигать 50–150 мМ, причем соотношение ацетат:пропионат:бутират в норме составляет примерно 60:20:20 (den Besten *et al.*, 2013).

Бутират является основным источником энергии для колоноцитов и регулирует поддержание кишечного барьера. В отличие от других тканей, где доминирует окисление глюкозы, колоноциты в физиологических условиях метаболизируют бутират для производства АТФ через  $\beta$ -окисление жирных кислот и цикл Кребса (Donohoe *et al.*, 2011). Важно отметить, что в здоровых колоноцитах бутират активно метаболизируется и не накапливается в ядре в концентрациях, достаточных для ингибирования гистоновых деацетилаз (Histone deacetylase, HDAC) (Donohoe *et al.*, 2012). Энергия, полученная из бутирата, необходима для поддержания активного эпителиального транспорта и синтеза белков ПК (Peng *et al.*, 2009). Кроме того, бутират через активацию G-белок-связанных рецепторов (GPR41, GPR43, GPR109A) на эпителиоцитах стимулирует продукцию IL18, который

способствует восстановлению эпителия (Macia *et al.*, 2015). Пропионат метаболизируется преимущественно в печени и участвует в глюконеогенезе, тогда как ацетат служит субстратом для синтеза липидов (den Besten *et al.*, 2013). В последних обзорах подчеркивается, что именно баланс этих трех основных КЦЖК определяет не только локальный, но и системный метаболический статус организма (Hou *et al.*, 2025).

Важно отметить, что КЦЖК модулируют не только метаболизм, но и иммунный ответ. Бутират и пропионат ингибируют активность HDAC в иммунных клетках, что способствует дифференцировке клеток Treg в толстой кишке (Furusawa *et al.*, 2013; Arpaia *et al.*, 2013). Показано, что бутират усиливает ацетилирование гистонов в локусе гена *Foxp3*, стабилизируя клетки Treg и увеличивая их супрессорную активность (Furusawa *et al.*, 2013). В свою очередь, клетки Treg, продуцируя IL10, подавляют избыточные Th1- и Th17-ответы на комменсальные бактерии. Ацетат выступает в роли иммуномодулирующей сигнальной молекулы, активирующей G-белок-связанные рецепторы FFAR2 и FFAR3 на энтероэндокринных клетках и моноцитах (Ang *et al.*, 2016).

Другим важным классом микробных метаболитов являются вторичные желчные кислоты. Первичные желчные кислоты (холевая и хенодезоксихолевая), синтезируемые в печени из холестерина и конъюгированные с таурином или глицином, поступают в кишечник, где подвергаются деконъюгации и  $7\alpha$ -дегидроксилированию под действием бактерий (Ridlon *et al.*, 2016). В результате образуются вторичные желчные кислоты: дезоксихолевая и литохолевая. Эти соединения являются естественными лигандами ядерного рецептора фарнезоида X (Farnesoid X receptor, FXR) и G-белок-связанного рецептора TGR5 (Wahlström *et al.*, 2016). Активация FXR в эпителиоцитах кишечника индуцирует экспрессию антимикробных пептидов, таких как ангиогенин-1 и РНКазы-4, и ограничивает бактериальную транслокацию (Inagaki *et al.*, 2006). Кроме того, сигналинг через FXR подавляет провоспалительные пути NF- $\kappa$ B (Gadaleta *et al.*, 2011).

Микробиота также участвует в метаболизме аминокислот (Matsumoto *et al.*, 2011). Особого внимания заслуживает метаболизм триптофана. Триптофан может метаболизироваться кишечными бактериями с

образованием индола и его производных (индол-3-пропионовая, индол-3-уксусная, индол-3-альдегид) (Agus *et al.*, 2018). Индольные производные являются лигандами арил-углеводородного рецептора (Aryl hydrocarbon receptor, AHR), транскрипционного фактора, критического для поддержания популяции внутриэпителиальных лимфоцитов и продукции IL22 (Zelante *et al.*, 2013; Lamas *et al.*, 2016). IL22, в свою очередь, стимулирует секрецию антимикробных пептидов (Reg3 $\beta$ , Reg3 $\gamma$ ) и усиливает продукцию муцина, укрепляя барьер. Современные исследования подчеркивают, что нарушение этого пути непосредственно связано с развитием не только кишечного воспаления, но и поведенческих расстройств через ось «микробиота-кишечник-мозг» (Dicks *et al.*, 2025). В кишечнике триптофан может не только расщепляться, но и синтезироваться некоторыми комменсальными бактериями. Показано, что у *Bacteroides thetaiotaomicron* транскрипция оперона биосинтеза триптофана регулируется человеческой микроРНК-21 (Cellano *et al.*, 2025). Классическим примером бактерии, способной к синтезу триптофана, является *E. coli*, у которой полный биосинтетический путь триптофана закодирован в trp-опероне (KEGG Pathway, 2025; Hou *et al.*, 2023).

Важным аспектом взаимодействия микробиоты и иммунной системы является формирование и поддержание иммунной толерантности. Например, специфические бактериальные штаммы, такие как кластеры *Clostridium* IV и XIVa, *B. fragilis* и некоторые штаммы *Lactobacillus*, способны активно индуцировать клетки Treg через продукцию КЦЖК или специфических полисахаридов (Atarashi *et al.*, 2013; Round и Mazmanian, 2010). Полисахарид А *B. fragilis* напрямую усиливает супрессорную функцию клеток Treg и продукцию IL10 через связывание с рецептором TLR2 (Round *et al.*, 2011).

Таким образом, микробиота кишечника в норме выступает не просто пассивным комменсалом, а активным участником метаболических и иммунных процессов, обеспечивая трофику эпителия, продукцию сигнальных молекул и поддержание иммунной толерантности.

### 1.2.2 Дисбиоз при ВЗК: таксономические и функциональные изменения

Дисбиоз кишечника при ВЗК представляет собой нарушение баланса микробного сообщества и проявляется изменением его таксономического состава, снижением разнообразия и потерей физиологических функций (Ni *et al.*, 2017). Для ВЗК характерно снижение  $\alpha$ -разнообразия, уменьшение доли *Firmicutes* (особенно *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia spp.*, *Eubacterium rectale*) и увеличение доли *Proteobacteria* (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) (Frank *et al.*, 2007; Gevers *et al.*, 2014). Снижение доли *F. prausnitzii* коррелирует с более высоким риском рецидива БК после резекции кишечника (Sokol *et al.*, 2008). Популяционные исследования на более чем трех тысячах родственников пациентов с БК показали, что изменения микробиоты могут обнаруживаться за несколько лет до появления клинических признаков, что подтверждает роль микробиоты в этиологии ВЗК (Raygoza Garay *et al.*, 2025).

Помимо продукции бутирата, *F. prausnitzii* секретирует неидентифицированный белок с противовоспалительной активностью, подавляющий активацию NF- $\kappa$ B и продукцию IL8 в эпителиальных клетках (Quévrain *et al.*, 2016). Другие бутират-продуцирующие бактерии, такие как *Roseburia spp.* и *Eubacterium spp.*, также снижаются при ВЗК (Machiels *et al.*, 2014). В последнее время внимание привлекает вид *Clostridium sporogenes*, который продуцирует противовоспалительные метаболиты и ослабляет проявления экспериментального колита (Geirnaert *et al.*, 2024). При БК эти изменения выражены сильнее, чем при ЯК, и коррелируют с тяжестью воспаления. Характерно также увеличение численности бактерий, ассоциированных с мукусом, которые в норме присутствуют преимущественно в просвете кишки (*B. fragilis*, *Enterococcus faecalis*), что усиливает контакт бактериальных антигенов с иммунными клетками слизистого и подслизистого слоев.

Одновременно со снижением представленности *Firmicutes* наблюдается увеличение количества протеобактерий, особенно семейства *Enterobacteriaceae* (Morgan *et al.*, 2012; Gevers *et al.*, 2014). Повышение относительной численности микроорганизмов, относящихся к данному таксону, таких как *E. coli*, *Klebsiella* и *Proteus*, является одним из

наиболее ярких маркеров дисбиоза при ВЗК и часто коррелирует с активностью заболевания. Воспалительное микроокружение с высокой концентрацией активных форм кислорода и оксида азота создает преимущество для факультативных анаэробов *Enterobacteriaceae*, которые вытесняют облигатные анаэробные бактерии из таксонов Firmicutes и Bacteroidetes (Winter *et al.*, 2013). При БК часто выявляются адгезивно-инвазивные штаммы *E. coli*, способные прикрепляться к эпителию за счет маннозосодержащих рецепторов, вызывая хроническое воспаление (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

Снижается также численность Bacteroidetes, хотя этот эффект менее стабилен в различных исследованиях. Примечательно, что некоторые виды Bacteroides, такие как *B. vulgatus* и *B. uniformis*, могут обладать провоспалительным потенциалом в контексте ВЗК, тогда как *B. fragilis*, способный секретировать полисахарид А, сохраняет протективные свойства (Mazmanian *et al.*, 2008).

Наиболее значительные метаболические последствия дисбиоза включают снижение продукции КЦЖК, нарушение метаболизма желчных кислот и изменение метаболизма триптофана. Уменьшение концентрации бутирата, пропионата и ацетата в кале пациентов с ВЗК подтверждено многократно (Machiels *et al.*, 2014; Huda-Faujan *et al.*, 2010). Дефицит бутирата лишает колоноциты основного источника энергии, что усугубляет нарушение барьерной функции. Эксперименты *in vitro* показывают, что добавление бутирата восстанавливает трансэпителиальное электрическое сопротивление в монослоях клеток Caco-2, обработанных провоспалительными цитокинами (Peng *et al.*, 2009). Также при ВЗК снижается содержание вторичных желчных кислот и увеличивается доля первичных, особенно таурин-конъюгированных (Duboc *et al.*, 2013). Поскольку вторичные желчные кислоты являются естественными агонистами рецептора FXR, их дефицит может приводить к снижению активности FXR-зависимого сигнального каскада и, как следствие, к ослаблению барьерной функции (Gadaleta *et al.*, 2011). Нарушение метаболизма триптофана прежде всего выражается в снижении продукции индольных производных микробиотой. Это приводит к недостаточной активации рецептора AHR и уменьшению продукции IL22, что

поддерживает активацию иммунного ответа (Lamas *et al.*, 2016). В то же время активность кинуренинового пути в иммунных клетках может возрастать под влиянием провоспалительных цитокинов (IFN- $\gamma$ ), и усиливать дисбаланс метаболизма триптофана. Интегративный анализ метаболомных и метагеномных данных подтверждает, что именно сочетание этих трех типов нарушений определяет тяжесть течения ВЗК и ответ на терапию (Ning *et al.*, 2025).

Важно отметить, что дисбиоз при ВЗК не ограничивается изменениями бактериального состава. Нарушается также состав вирома и микобиома. Показано увеличение численности грибов рода *Candida* и *Malassezia* при БК, что может дополнительно стимулировать иммунный ответ через паттерн-распознающие рецепторы (Limon *et al.*, 2019; Sokol *et al.*, 2017).

### **1.2.3 Роль бактериальных метаболитов в развитии кишечных нарушений и потенциальные терапевтические стратегии**

Дисбиоз при ВЗК ведет не только к изменению таксономического состава, но и к функциональной перестройке микробного сообщества, и проявляется в изменении бактериального метаболомного профиля. Эти метаболические сдвиги могут непосредственно влиять на барьерную функцию кишечника и иммунный ответ. Центральным метаболическим изменением при ВЗК является дефицит бутирата. Кроме энергетического голодания колоноцитов, снижение бутирата приводит к активации HDAC в эпителиальных клетках. При концентрации бутирата менее 1 мМ ингибирование HDAC существенно ослабляется, что может усиливать воспаление (Donohoe *et al.*, 2012). Показано, что пероральное введение бутирата уменьшает выраженность воспаления и восстанавливает барьерную функцию в экспериментальных моделях колита (Vieira *et al.*, 2012; Leonel *et al.*, 2013).

Другим важным классом метаболитов при ВЗК являются индольные производные триптофана. Введение индол-3-карбинола или индол-3-пропионовой кислоты активирует AHR, увеличивает продукцию IL22 и снижает гистологическую тяжесть повреждения в модели химически-индуцированного колита (Lamas *et al.*, 2016; Alexeev

*et al.*, 2018). Важно отметить, что некоторые пробиотические штаммы (*Lactobacillus reuteri*) способны продуцировать индольные производные из триптофана, и их введение снижает тяжесть экспериментального колита через АНР-зависимый механизм (Zelante *et al.*, 2013).

Полиамины (путресцин, спермидин, спермин), продуцируемые как бактериями, так и клетками хозяина, играют двойственную роль. С одной стороны, они необходимы для пролиферации и восстановления эпителия. С другой стороны, в высоких концентрациях они могут быть токсичны и способствовать апоптозу (Matsumoto *et al.*, 2011). При ВЗК концентрация полиаминов в кале часто повышена, что может отражать усиление протеолитической активности микробиоты (Le Gall *et al.*, 2011).

Следует отметить немаловажную роль метаболитов серосодержащих аминокислот. Дегградация цистеина и метионина микробиотой ведет к образованию сероводорода ( $H_2S$ ). В физиологических концентрациях  $H_2S$  выступает в роли газомедиатора, вызывает вазодилатацию и снижает воспалительный ответ (Wallace *et al.*, 2018). Однако увеличение представленности сульфатредуцирующих бактерий (*Desulfovibrio* spp.) приводит к значительному повышению уровня  $H_2S$  и нарушению  $\beta$ -окисления бутирата в митохондриях колоноцитов (Beaumont *et al.*, 2016). Показано, что у части пациентов с ЯК повышено содержание сульфатредуцирующих бактерий и концентрация  $H_2S$  в кале (Gibson *et al.*, 1991).

Терапевтические стратегии, направленные на коррекцию микробиоты и ее метаболической активности, включают использование пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков. В качестве пробиотиков наиболее изученными являются штаммы *E. coli* Nissle 1917, которые эффективны для поддержания ремиссии при ЯК (Kruis *et al.*, 2004). Мультивидовые пробиотики (VSL#3, содержащий 8 штаммов лактобактерий, бифидобактерий и стрептококков) также показали эффективность в индукции ремиссии при легком и среднетяжелом ЯК (Tursi *et al.*, 2010). Согласно последним клиническим рекомендациям Американской гастроэнтерологической ассоциации, применение конкретных штаммов пробиотиков может быть рекомендовано при определенных формах ВЗК (Preidis *et al.*, 2024). Среди пребиотиков были исследованы

инулин, фруктоолигосахариды и лактулоза. Они стимулируют рост бутират-продуцирующих бактерий и увеличивают продукцию КЦЖК. Однако клинические исследования дают противоречивые результаты, возможно, из-за различий исходного состава микробиоты пациентов (Benjamin *et al.*, 2011). Термин «синбиотик» обозначает физиологически функциональную комбинацию пробиотика и пребиотика. Такие комбинации могут быть более эффективными, чем их компоненты по отдельности. Например, синбиотик, содержащий *Bifidobacterium longum* и фруктоолигосахариды, снижал активность воспаления при ЯК (Furrie *et al.*, 2005).

К альтернативным стратегиям модуляции микробиоты также можно отнести трансплантацию микробиоты фекалий (ТФМ). ТФМ от здорового донора показала впечатляющие результаты при рецидивирующей инфекции *Clostridioides difficile* (van Nood *et al.*, 2013). Последующие мета-анализы, включая работы Ray и соавторов (Ray *et al.*, 2025) и Berry и соавторов (Berry *et al.*, 2025), не только подтвердили высокую эффективность ТФМ, но и показали ее безопасность. При ВЗК эффективность ТФМ ниже и варьирует в зависимости от протокола. Метаанализы показывают, что ТФМ может индуцировать клиническую ремиссию у 30–50% пациентов с ЯК, причем эффективность выше при использовании анаэробной подготовки образца и многократном введении (Paramsothy *et al.*, 2017; Costello *et al.*, 2019). Недавнее пятилетнее наблюдение за участниками рандомизированного исследования подтвердило долгосрочную безопасность и сохранение эффекта у части пациентов (Paramsothy *et al.*, 2025). Для БК данные остаются менее убедительными. Также к непрямым методам модуляции микробиоты можно отнести диетические вмешательства. Исключающие диеты (например, диета с низким содержанием ферментируемых олиго-, ди-, моносахаридов и полиолов) могут уменьшать симптомы ВЗК, вероятно, за счет изменения качественного состава субстрата для микробиоты (Kakodkar и Mutlu, 2017). Развитие методов метагеномного и метаболомного анализа открывает перспективы для стратификации пациентов и выбора индивидуальных стратегий коррекции дисбиоза (Zmora *et al.*, 2019; De Paere *et al.*, 2025).

#### 1.2.4 Регуляция взаимодействия «микробиота-кишечник-мозг», и его роль в формировании системных нарушений

Психические коморбидности, прежде всего тревога и депрессия, представляют собой одну из наиболее значимых внекишечных проблем у пациентов с ВЗК. Многочисленные эпидемиологические исследования, включая крупные популяционные когорты, демонстрируют, что риск развития тревожных расстройств и депрессии у пациентов с ВЗК повышен в 1,5–2 раза по сравнению с общей популяцией (Bisgaard *et al.*, 2022). Распространенность клинически значимых симптомов тревоги достигает 20–35%, а депрессии — 15–25% (Neuendorf *et al.*, 2016). Эти состояния не только существенно ухудшают качество жизни, но и связаны с более тяжелым течением ВЗК, включая более частые обострения, низкую приверженность терапии и худший ответ на лечение (Bisgaard *et al.*, 2022).

Важной особенностью является двунаправленный характер связи между ВЗК и психическими расстройствами. С одной стороны, диагноз хронического воспалительного заболевания и связанный с ним стресс повышают риск развития тревоги и депрессии. С другой стороны, систематический обзор и мета-анализ 2023 года показал, что у людей с тревогой или депрессией риск последующего развития ВЗК повышен вдвое, что указывает на наличие общих патофизиологических механизмов (Bisgaard *et al.*, 2023). Более того, исследования свидетельствуют о том, что повышенный риск психических расстройств может наблюдаться уже за 5 лет до постановки диагноза ВЗК, что предполагает либо наличие продромальной фазы, либо общую генетическую или средовую предрасположенность (Bisgaard *et al.*, 2022; Marrie *et al.*, 2019).

Патогенез психических коморбидностей при ВЗК сложен и многофакторен и описывается в рамках концепции взаимодействия «микробиота-кишечник-мозг». Ключевые механизмы включают системное воспаление, нарушение метаболизма триптофана, нарушение регуляции взаимодействия «микробиота-кишечник-мозг», микробиоту и связанные с ней метаболиты, а также генетические факторы.

**Системное воспаление.** Провоспалительные цитокины (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6), продукция которых повышена при ВЗК, могут проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) или воздействовать на

него опосредованно, активируя цереброваскулярный эндотелий. В мозге они влияют на нейромедиаторные системы, нейроэндокринную функцию и нейропластичность. В частности, TNF- $\alpha$  ингибирует триптофангидроксилазу — ключевой фермент синтеза серотонина, а IL1 $\beta$  активирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось, приводя к хронической гиперкортизолемии и повреждению гиппокампа (Dantzer *et al.*, 2008). Цитокины также могут влиять на метаболизм дофамина и норадреналина, снижая их доступность в синапсах.

**Нарушение метаболизма триптофана.** Под действием провоспалительных цитокинов, особенно IFN- $\gamma$ , активируется фермент индоламин-2,3-диоксигеназа (Indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO), что смещает баланс метаболизма триптофана от синтеза серотонина в сторону кинуренинового пути. Это приводит к образованию кинуренина и его нейроактивных метаболитов — кинуреновой кислоты (антагониста NMDA-рецепторов) и, что более важно, хинолиновой кислоты (агониста NMDA-рецепторов). Накопление хинолиновой кислоты в мозге вызывает эксайтотоксичность, оксидативный стресс и апоптоз нейронов, особенно в гиппокампе (Schwarcz *et al.*, 2012; Boros *et al.*, 2024).

**Регуляция взаимодействия «микробиота-кишечник–мозг».** Блуждающий нерв обеспечивает прямую двунаправленную связь между кишечником и мозгом. Аfferентные волокна передают сигналы о локальном воспалении, висцеральной боли и изменении микробного состава в ядро одиночного тракта и далее в лимбические структуры, способствуя развитию тревоги. Эfferентные волокна реализуют противовоспалительный холинергический путь, который при ВЗК может быть нарушен (Bonaz *et al.*, 2018). Кроме того, в патогенез вовлечена дисфункция сигнального пути оксида азота (NO), играющего роль в нейротрансмиссии и регуляции церебрального кровотока (Bisgaard *et al.*, 2022).

**Микробиота и ее метаболиты.** Дисбиоз, характерный для ВЗК, приводит к изменению продукции нейроактивных микробных метаболитов. Снижение уровня КЦЖК, таких как бутират, лишает мозг их защитного действия: бутират обладает противовоспалительными свойствами в микроглии, повышает экспрессию нейротрофического фактора

мозга (Brain derived neurotrophic factor, BDNF) и поддерживает целостность ГЭБ (Braniste *et al.*, 2014). Дисбиоз также влияет на метаболизм триптофана и продукцию других нейромедиаторов (ГАБА, серотонин), модулируя функцию мозга (Cryan *et al.*, 2019).

**Генетические факторы.** Исследования показывают наличие общей генетической составляющей между ВЗК и психическими расстройствами. Выявлены общие локусы риска, вовлеченные в регуляцию иммунного ответа и функцию мозга, что отчасти объясняет двунаправленный характер связи (Bisgaard *et al.*, 2022).

Таким образом, сопутствующие ВЗК психиатрические нарушения являются не просто психологической реакцией на хронический стресс, а результатом сложного, многоуровневого взаимодействия между периферическим воспалением, нейроиммунными механизмами, микробиотой и генетической предрасположенностью. Это понимание имеет важные клинические последствия, подчеркивая необходимость интеграции скрининга и терапии психических расстройств в стандартную практику ведения пациентов с ВЗК (Bisgaard *et al.*, 2022).

### **1.3 Метаболические аспекты воспаления кишечника**

Метаболические нарушения являются одним из ключевых компонентов в этиологии ВЗК и формируют патологические фенотипы как эпителиальных, так и иммунных клеток слизистой оболочки кишечника. Изменения клеточного метаболизма не только являются следствием воспаления кишечника, но и активно участвуют в его поддержании.

#### **1.3.1 Нарушение метаболизма короткоцепочечных жирных кислот**

Согласно последним мета-анализам, снижение уровней бутирата, ацетата и пропионата в кале является одним из наиболее воспроизводимых признаков ВЗК, причем наиболее выраженный дефицит бутирата наблюдается в активную фазу заболевания (Chulenbayeva *et al.*, 2025; Zhuang *et al.*, 2019). Дефицит бутирата приводит к энергетическому голоданию колоноцитов, что проявляется снижением окислительного

фосфорилирования в митохондриях и нарушением синтеза АТФ (Donohoe *et al.*, 2012). Противовоспалительное действие бутирата осуществляется через несколько механизмов. Бутират является естественным ингибитором HDAC, что приводит к гиперацетилированию гистонов и изменению экспрессии генов, вовлеченных в воспалительный ответ (Davie, 2003). Ингибирование HDAC увеличивает ацетилирование гистона H3 в промоторах генов противовоспалительных цитокинов, таких как IL10, и усиливает экспрессию белка клаудина-1, важного компонента плотных контактов. Кроме того, бутират активирует G-белок-сопряженные рецепторы GPR41, GPR43 и GPR109A, экспрессируемые на эпителиальных и иммунных клетках (Brown *et al.*, 2003; Macia *et al.*, 2015). Активация GPR43 на нейтрофилах ингибирует их хемотаксис и продукцию активных форм кислорода, а стимуляция GPR109A на макрофагах и дендритных клетках способствует дифференцировке регуляторных T-клеток и продукции IL10 (Singh *et al.*, 2014). Восстановление содержания бутирата до физиологического уровня или применение его производных рассматривается как перспективная терапевтическая стратегия при ВЗК (Ventura *et al.*, 2024).

### **1.3.2 Изменение энергетического метаболизма иммунных и эпителиальных клеток**

Воспалительный процесс при ВЗК сопровождается значительной перестройкой энергетического метаболизма как в иммунных, так и в эпителиальных клетках. В иммунных клетках эта перестройка характеризуется переходом от окислительного фосфорилирования к аэробному гликолизу, известному как «эффект Варбурга». В клетках эпителия происходит нарушение  $\beta$ -окисления жирных кислот за счет снижения количества бутирата и дисфункции митохондрий, в результате чего формируется дефицит АТФ (Martínez-Ruiz *et al.*, 2025).

В иммунных клетках, особенно в активированных T-лимфоцитах и макрофагах, метаболическое переключение в пользу гликолиза позволяет быстро получать АТФ и промежуточные метаболиты, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот, аминокислот и пролиферации клеток (O'Neill *et al.*, 2016). Одновременно происходит активация сигнального каскада мишени рапамицина у млекопитающих (mammalian target

of rapamycin, mTOR), который является центральным регулятором метаболизма клетки. Комплекс mTOR 1 активирует синтез белков, липидов и нуклеотидов, а также подавляет аутофагию, способствуя поддержанию активированного состояния иммунных клеток. Такое метаболическое переключение иммунных клеток является важным механизмом патогенеза ВЗК. Например, клетки Th17 в значительной степени зависят от гликолиза для своего функционирования, тогда как клетки Treg преимущественно используют окислительное фосфорилирование (Michalek *et al.*, 2011).

В отличие от иммунных клеток, эпителиальные клетки кишечника при ВЗК испытывают метаболический стресс, связанный с нарушением окислительного фосфорилирования (Novak и Mollen, 2015). В митохондриях происходит снижение трансмембранного потенциала, увеличение продукции активных форм кислорода и нарушение  $\beta$ -окисления жирных кислот. Эти изменения приводят к снижению уровня АТФ в энтероцитах, что усиливает нарушение барьерной функции и снижает способность эпителия к восстановлению (Sifroni *et al.*, 2010). Кроме того, при ВЗК наблюдается снижение активности АМФ-активируемой протеинкиназы (AMP-activated protein kinase, AMPK), которая в норме активируется при увеличении соотношения АМР/АТФ в клетке и стимулирует окисление жирных кислот, поглощение глюкозы для синтеза АТФ и ингибирует энергозатратные пути биосинтеза (Hardie *et al.*, 2012).

### **1.3.3 Нарушение метаболизма триптофана и других аминокислот**

Триптофан относится к незаменимым аминокислотам, поэтому его уровень зависит от характера диеты и активности микробиоты кишечника. При ВЗК наблюдаются значительные нарушения метаболизма триптофана, которые проявляются, в частности, изменением соотношения между его метаболитами (Hua *et al.*, 2025). Кинурениновый путь, который активируется при воспалении, становится основным направлением метаболизма триптофана. Провоспалительные цитокины IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  индуцируют экспрессию гена, кодирующего фермент IDO. Этот фермент катализирует первую и лимитирующую стадию кинуренинового пути, что приводит к накоплению иммунорегуляторных метаболитов, таких как

кинуренин и кинуреновая кислота (Moffett и Namboodiri, 2003).

Исследования показывают, что у пациентов с ВЗК соотношение кинуренин/триптофан значительно повышено и коррелирует с активностью заболевания и уровнем кальпротектина в фекалиях (Uradhyay *et al.*, 2025). Предполагается, что при хроническом воспалении, характерном для ВЗК, происходит накопление нейротоксичной хинолиновой кислоты и снижение оксидированной формы никотинамидадениндинуклеотида (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, oxidized form, NAD<sup>+</sup>) (Welz *et al.*, 2024). Таким образом, нарушение баланса между метаболитами кинуренинового пути является важным звеном иммунной регуляции и энергетического метаболизма при ВЗК.

Серотонинергический путь метаболизма триптофана также претерпевает значительные изменения при ВЗК. Серотонин синтезируется в энтерохромаффинных клетках кишечника и осуществляет регуляцию моторики, секреции и восприятия боли (Gershon и Tack, 2007). При ВЗК наблюдается снижение уровня серотонина в слизистой оболочке кишечника, что связано как с уменьшением количества энтерохромаффинных клеток, так и с изменением экспрессии ключевого фермента его биосинтеза триптофангидроксилазы 1 (Coates *et al.*, 2004).

Нарушение метаболизма других аминокислот, таких как аргинин и глутамин, также вносит вклад в патогенез ВЗК. В макрофагах аргинин служит субстратом для двух конкурирующих ферментов – синтазы оксида азота (Nitric oxide synthase, NOS) и аргиназы. Индуцибельная NOS (inducible NOS, iNOS), экспрессия которой усиливается при воспалении, производит большие количества оксида азота. Этот газомедиатор может оказывать как защитное, так и повреждающее действие в зависимости от концентрации и клеточного контекста (Kolios *et al.*, 2004). В отличие от классически активированных М1-макрофагов, в альтернативно активированных М2-макрофагах аргиназа конвертирует аргинин в орнитин — предшественник полиаминов, необходимых для пролиферации и репарации эпителия (Gordon и Martinez, 2010). Глутамин, являющийся важным энергетическим субстратом для энтероцитов, при ВЗК активно метаболизируется иммунными клетками, что может приводить к относительному дефициту этой аминокислоты в эпителиальных клетках

(Newsholme *et al.*, 2003).

### 1.3.4 Особенности метаболизма фосфолипидов

Поскольку основная функция желудочно-кишечного тракта заключается в переваривании и всасывании питательных веществ, множество метаболических путей может быть нарушено при воспалении кишечника. Ряд пищевых компонентов, в первую очередь липидов, является не только источником энергии и компонентами клеточных структур, но и регулирует клеточные сигнальные каскады в эпителии кишечника (Boldyreva *et al.*, 2021). Многочисленные исследования сообщают о нарушении липидного обмена у пациентов с ЯК и БК, что дополнительно подтверждается на моделях ВЗК *in vivo* (Diab *et al.*, 2019; Scoville *et al.*, 2017).

Было показано, что провоспалительные цитокины могут регулировать гены, ответственные за метаболизм глюкозы и липидов (Hotamisligil, 2017). Снижение митохондриального метаболизма приводит к снижению АТФ в слизистой оболочке кишечника, что подтверждается клиническими и экспериментальными исследованиями (Novak и Mollen, 2015). Как упоминалось ранее, снижение уровня АТФ вызывает нарушение кишечного барьера и усугубляет течение колита (JanssenDuijghuijsen *et al.*, 2017). Ультраструктурный анализ выявляет изменения формы митохондрий, а также количества и структуры митохондриальных крист на электронных микрофотографиях и с помощью сверхразрешающей микроскопии биоптатов пациентов с ВЗК и в экспериментальных моделях (Бао *et al.*, 2025, Chojnacki *et al.*, 2023, Vorisova *et al.*, 2020). Эти наблюдения указывают на то, что регуляция мембранообразующих фосфолипидов может быть существенно нарушена при колите. В то же время эти липиды участвуют в реализации барьерной функции кишечника, являясь частью кишечного мукуса и плазматической мембраны эпителиоцитов.

Фосфатидилхолин (ФХ) составляет до 40% общего пула липидов в слизи толстой кишки. Он организован в везикулярные структуры и формирует гидрофобный барьер. Этот барьер препятствует прямому контакту бактерий и их токсинов с апикальной поверхностью эпителия (Stremmel *et al.*, 2012). При ЯК и в экспериментальных моделях

колита наблюдается значительное снижение уровня ФХ в слизистом слое. Его содержание может снижаться на 70%, и коррелирует с тяжестью клинических проявлений (Braun *et al.*, 2009). Считается, что снижение уровня ФХ вызвано нарушением его секреции бокаловидными клетками, нарушением синтеза и деградации. Активность секреторной фосфолипазы А2 повышается на фоне хронического воспаления, что приводит к гидролизу ФХ (Meuer *et al.*, 2005; Naarala *et al.*, 1999). Продукт этого гидролиза, лизофосфатидилхолин (ЛФХ), оказывает прямое цитотоксическое действие на эпителиальные клетки (Stremmel *et al.*, 2017). Накопление ЛФХ способствует дестабилизации мембран и увеличению парацеллюлярной проницаемости. Клинические исследования демонстрируют, что пероральный прием ФХ может стать перспективным терапевтическим подходом для стабилизации барьера при ЯК (Stremmel *et al.*, 2021; Karner *et al.*, 2014).

Помимо слизистого слоя, липидный состав самих клеточных мембран колоноцитов динамически изменяется при ВЗК. Текучесть и проницаемость мембран определяются соотношением насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, а также содержанием холестерина в фосфолипидном бислое (Yang *et al.*, 2025). Нарушение липидного метаболизма является важным фактором патогенеза ВЗК: показано, что диета с высоким содержанием холестерина усугубляет течение экспериментального колита, способствуя эндоцитозу и деградации белков плотных контактов (Yang *et al.*, 2025). При ВЗК изменяется не только количество, но и качественный состав фосфолипидов: наблюдается повышение содержания арахидоновой кислоты и снижение уровней линолевой и  $\alpha$ -линоленовой кислот (Boldyreva *et al.*, 2021). Соотношения фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин (ФХ/ФЭ) и лизофосфатидилхолин/фосфатидилхолин (ЛФХ/ФХ) коррелируют с тяжестью воспалительного процесса. Накопление некоторых липидных метаболитов, включая ЛФХ, S1P и церамиды, может усиливать воспаление, апоптоз и некроптоз в кишечном эпителии (Boldyreva *et al.*, 2021).

### **Нарушение метаболизма сфинголипидов при ВЗК**

Сфинголипиды являются еще одним классом регуляторных мембранных липидов, выполняющих роль вторичных посредников,

вовлеченных в такие клеточные процессы, как апоптоз, пролиферация и аутофагия (Hannun и Obeid, 2008). Поддержание жизнеспособности клеток отчасти определяется балансом между церамидами, которые запускают апоптоз, и S1P. Эта концепция известна как «сфинголипидный реостат» (sphingolipid rheostat) (Spiegel и Milstien, 2011; Newton *et al.*, 2015). Биосинтез церамидов происходит двумя основными путями: образованием *de novo* в эндоплазматическом ретикулуме из серина и пальмитоил-КоА под действием серинпальмитоилтрансферазы, а также через гидролиз сфингомиелина с участием сфингомиелиназ (Hannun и Obeid, 2008). Важно отметить, что два ключевых метаболита «сфинголипидного реостата» участвуют в общей цепи превращений из церамида в S1P через деацилирование церамида под действием церамидаз с образованием сфингозина, который затем фосфорилируется сфингозинкиназами с образованием S1P (Sukocheva *et al.*, 2020). Обратное превращение S1P в сфингозин катализируется S1P-фосфатазами, а деградация — S1P-лиазой (Sphingosine-1-phosphate lyase 1, SGPL1) (Schwiebs *et al.*, 2017).

При воспалении происходит нарушение экспрессии и активности ферментов метаболизма сфинголипидов, что приводит к накоплению церамидов (Bauer *et al.*, 2009; Vock *et al.*, 2012). Одновременно может изменяться активность ферментов деградации S1P: в дендритных клетках при воспалении снижается активность SGPL1, что способствует накоплению S1P (Schwiebs *et al.*, 2017). Важно отметить, что S1P имеет провоспалительный эффект, что подтверждается на модели химически индуцированного колита (Xi *et al.*, 2016; Vu *et al.*, 2021). Ключевую роль при воспалении может играть кислотная церамидаза, уровень которой повышен в ткани кишечника при ВЗК. Предполагается, что нарушение работы этого фермента в иммунных клетках снижает уровень S1P и защищает от хронического колита у мышей (Espinoza *et al.*, 2026, препринт). Нарушение баланса в сторону биосинтеза церамидов или, напротив, накопления S1P вносит вклад в поддержание воспаления, нарушение барьерной функции и, вероятно, в канцерогенез (Ueda, 2022; Sukocheva *et al.*, 2020). Этот тезис находит подтверждение в работах, выполненных на пациентах с ВЗК. Метаболомный анализ образцов фекалий и сыворотки крови пациентов с БК и ЯК выявил изменения концентраций множества метаболитов, включая

церамид и S1P, соответственно (Franzosa *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2019).

Биологический эффект церамидов зависит от длины их ацильной цепи, которая регулируется шестью ферментами церамидсинтазами (Ceramide synthase, CerS1–CerS6) (Park *et al.*, 2014; Grösch *et al.*, 2012). Каждый фермент синтезирует церамиды с определенной длиной цепи, что определяет их функциональную специализацию. Например, CerS2 преимущественно синтезирует церамиды с очень длинной цепью (C22–C24), необходимые для поддержания структуры мембран миелина. Напротив, CerS5 и CerS6 ответственны за синтез проапоптотических церамидов C16, которые накапливаются в ответ на стресс (Hartmann *et al.*, 2012). Установлено, что при хроническом колите происходит изменение экспрессии генов *CerS*, что приводит к накоплению именно проапоптотических коротко- и длинноцепочечных форм, таких как C16:0- и C18:0-церамиды (Helke *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2017). Эти церамиды не только запускают апоптоз, взаимодействуя с белками митохондриальной мембраны (Siskind, 2005), но и способствуют формированию липидных микродоменов, которые могут физически дестабилизировать плазматическую мембрану и нарушать работу встроенных в нее белков, включая компоненты межклеточных контактов (Bock *et al.*, 2012).

### **Связь метаболизма церамидов с актиновым цитоскелетом**

Накопление церамидов и нарушение целостности эпителиального барьера ассоциированы с ВЗК. Потенциальным механизмом, объединяющим эти два явления, является влияние церамидов на регуляцию актинового цитоскелета. Показано, что церамиды могут действовать как вторичные посредники, активируя серин/треониновые киназы, такие как протеинкиназа C- $\zeta$  (PKC- $\zeta$ ) (Wang *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2007). Активация PKC- $\zeta$  и фосфатазы 2A может приводить к нарушению фосфорилирования/дефосфорилирования ключевых регуляторов актинового цитоскелета, включая непосредственных белков-партнеров актина, таких как кофилин, эрзин и другие. Кроме того, мембранные домены, обогащенные церамидом, могут физически нарушать кластеризацию и стабильность белков межклеточных контактов и их связь с кортикальным филаментным актином (Bock *et al.*, 2012; De Souza

*et al.*, 2013). Вероятно, нарушение динамики актина, вызванное сдвигом метаболизма церамидов, приводит к диссоциации и делокализации белков плотных и адгезивных контактов. Экспериментальное подтверждение того, что церамиды активируют киназы и фосфатазы, которые влияют на полимерный актин, приводя к дестабилизации эпителиального барьера, создаст возможности для поиска новых мишеней лечения ВЗК, не связанных напрямую с контролем воспаления. Фармакологическое ингибирование специфических изоформ CerS, ответственных за синтез патогенных церамидов (например, CerS5 или CerS6), или модуляция активности сфингомиелиназ рассматриваются как перспективные стратегии для стабилизации актинового цитоскелета и восстановления барьерной функции кишечника (Helke *et al.*, 2018; Esposito *et al.*, 2024).

#### 1.4 Экспериментальные модели ВЗК

ВЗК представляют собой заболевания со сложным патогенезом, поэтому чаще всего в экспериментальных исследованиях используются модели *in vivo*. Разнообразие этих моделей велико в связи с комплексной этиологией ВЗК. Среди моделей *in vivo* есть линии генетически модифицированных животных, модели химической индукции колита, подходы с использованием адоптивного переноса иммунных клеток и модели спонтанного колита. Кроме того, в последние годы все более активно используются трехмерные органоиды кишечника *in vitro* и их совместная культивация с бактериальными и иммунными клетками.

##### 1.4.1 Химически индуцированные модели ВЗК на животных

Химически индуцированные модели являются широко используемыми и хорошо охарактеризованными подходами к моделированию ВЗК (Randhawa *et al.*, 2014). Модель колита, индуцируемая введением натриевой соли сульфата декстрана (dextran sulfate sodium salt, DSS) в питьевую воду животных, является одной из наиболее востребованных благодаря своей воспроизводимости и простоте (Yang *et al.*, 2024). Патогенез такого колита обусловлен прямым цитотоксическим действием на эпителиальные клетки слизистой оболочки толстой кишки, что приводит к нарушению

барьерной функции, обнажению собственной пластинки и последующей активации врожденного иммунного ответа (Abe *et al.*, 2007). Важным преимуществом данной модели является возможность контроля тяжести и продолжительности воспаления, что позволяет моделировать как острый, так и хронический колит (Thallmair *et al.*, 2025). Клиническими признаками DSS-индуцированного колита являются диарея, кровь в стуле, потеря массы тела и гистологические изменения, напоминающие язвенный колит у человека.

Еще одним из вариантов химического воспаления кишечника является ректальное введение 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS). Эта модель обусловлена T-клеточным ответом и характеризуется трансмуральным воспалением, сходным с болезнью Крона (Antonίου *et al.*, 2016). Патогенез TNBS-колита опосредован процессом гаптенизации собственных белков кишечной стенки и их антигенной презентации дендритными клетками, что приводит к развитию иммунного ответа по Th1-типу с характерной выработкой IFN- $\gamma$ , TNF и IL12 (Neurath *et al.*, 2000). На гистологическом уровне наблюдается трансмуральное воспаление, образование гранулем, гиперплазия лимфоидных фолликулов и фиброз (Silva *et al.*, 2019). Модель TNBS-индуцированного колита особенно ценится для изучения механизмов хронического воспаления и оценки эффективности иммуномодулирующей терапии (Antonίου *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019).

Также используются модели, основанные на активации оксидативного стресса, вызванного введением веществ, которые стимулируют продукцию активных форм кислорода (АФК), таких как пестициды или динитрохлорбензол. Они позволяют изучать роль окислительного стресса в патогенезе ВЗК (Ma *et al.*, 2023; Venkataranganna *et al.*, 2007). Образование большого количества АФК приводит к повреждению эпителиальных клеток через пероксидацию липидов, окисление белков и повреждение ДНК и запускает каскад воспалительных реакций (Yokota *et al.*, 2017). Характерными особенностями являются выраженная инфильтрация нейтрофилами, активация транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и дисрегуляция системы антиоксидантной защиты (Venkataranganna *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2024). Данная модель особенно интересна в контексте

изучения взаимодействия между окислительным стрессом и иммунными механизмами в патогенезе хронического воспаления кишечника (Ma *et al.*, 2023).

#### 1.4.2 Генно-инженерные модели

Одной из наиболее известных генетических моделей ВЗК является линия мышей с нокаутом гена *IL10*, который кодирует противовоспалительный интерлейкин 10 (Kühn *et al.*, 1993). У таких животных при конвенциональном содержании наблюдается прогрессирующее воспаление с характерными гистологическими изменениями: инфильтрацией мононуклеарными клетками, гиперплазией лимфоидных фолликулов и формированием язв (Palla, 2023). Мыши с мутациями в генах *Nod2* и *Atg16l1* также воспроизводят ключевые аспекты нарушения врожденного иммунитета и аутофагии, ассоциированные с предрасположенностью к болезни Крона у человека (Parkes, 2012; Marchiando *et al.*, 2013). В модели с мутацией в гене *Nod2* происходит нарушение распознавания мурамилдипептида бактериальной клеточной стенки, что приводит к неадекватному иммунному ответу на комменсальную микробиоту (Parkes, 2012). Мыши с мутацией в гене *Atg16l1* характеризуются дефектами процесса аутофагии, проявляющимися нарушением внутриклеточной деградации бактерий, дисфункцией бокаловидных клеток и измененной секрецией муцинов (Marchiando *et al.*, 2013). Получение трансгенных моделей на животных для моделирования ВЗК остается актуальной задачей, в частности, с использованием оптимизированных методов генной инженерии (Попова и соавт., 2024. Popova *et al.*, 2023)

Мыши с нокаутом экспрессии T-клеточных рецепторов представляют собой модель нарушения функции регуляторных T-клеток и изучения роли адаптивного иммунитета в патогенезе ВЗК (Ishihara *et al.*, 2022). В отсутствие функциональных T-лимфоцитов у этих животных развивается спонтанное воспаление кишечника, характеризующееся лимфоцитарной инфильтрацией, гиперплазией эпителия и нарушением структуры крипт (Nagahama *et al.*, 2008). Особый интерес представляют модели с селективной делецией субпопуляций T-клеток — например, мыши с дефицитом

регуляторных Т-клеток, у которых развивается тяжелый аутоиммунный колит, который показывает роль этой популяции лимфоцитов в поддержании толерантности мукозального иммунитета (Ishihara *et al.*, 2022).

Хорошо зарекомендовала себя модель колита на мышах с нокаутом гена *Muc2* (ген, кодирующий муцин-2, основной структурный компонент кишечного мукуса). Эта модель предоставляет возможность для изучения роли слизистого барьера в патогенезе ВЗК (Van der Sluis *et al.*, 2006; Wenzel *et al.*, 2015). У этих животных развивается спонтанный колит, характеризующийся непосредственным контактом комменсальных бактерий с эпителием, активацией врожденного иммунитета и прогрессирующим воспалением (Johansson *et al.*, 2008; Wenzel *et al.*, 2014). Гистологически наблюдается истончение слизистого слоя, повышенная проницаемость эпителиального барьера и выраженная инфильтрация нейтрофилами и лимфоцитами (Van der Sluis *et al.*, 2006; Wenzel *et al.*, 2015). Данная модель особенно ценна для исследования патогенетической роли дефектов слизистого барьера, изучения взаимодействия «хозяин-микробиота» и оценки терапевтических стратегий, направленных на восстановление барьерной функции (Wenzel *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2023).

### 1.4.3 Модели на основе переноса иммунных клеток

Модели на основе переноса иммунных клеток позволяют исследовать специфические субпопуляции лимфоцитов и их взаимодействие с микроокружением кишечника. Модель CD45RB<sup>high</sup> основана на переносе наивных Т-клеток, экспрессирующих высокие уровни изоформы CD45RB, иммунодефицитным мышам (чаще всего мышам с дефицитом рекомбиназ *Rag1*<sup>-/-</sup> или *Rag2*<sup>-/-</sup>, лишенным функциональных Т- и В-лимфоцитов) (Pearson *et al.*, 2024; Steinbach *et al.*, 2015). После адаптации в организме реципиента клетки CD45RB<sup>high</sup> дифференцируются в эффекторные Т-лимфоциты и мигрируют в кишечник, где инициируют развитие тяжелого колита, характеризующегося инфильтрацией мононуклеарными клетками и гиперплазией эпителия (Pearson *et al.*, 2024; Zhou *et al.*, 2025).

Ключевым преимуществом данной модели является возможность изучать вклад конкретных субпопуляций Т-клеток в развитие воспаления. Так, было показано, что перенос исключительно CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>

клеток достаточен для индукции колита, тогда как совместное введение регуляторных Т-клеток ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ) предотвращает развитие заболевания. Это подчеркивает роль нарушения баланса между эффекторными и регуляторными лимфоцитами в патогенезе ВЗК (Read *et al.*, 2000; Powrie *et al.*, 2003). Модель также позволяет исследовать взаимодействие между адаптивным иммунитетом и микробиотой. У мышей, содержащихся в стерильных условиях, перенос  $CD45RB^{high}$  клеток не приводит к развитию колита. Это показывает ключевую роль комменсальных бактерий в запуске иммунного ответа, лежащего в основе ВЗК (Feng *et al.*, 2010). Данная модель широко используется для доклинической оценки новых терапевтических стратегий, включая иммуномодулирующие препараты, биологические агенты и клеточную терапию (Neurath, 2019).

#### 1.4.4 Специализированные модели для изучения роли микробиоты

Модели с использованием гнотобиотических (без микробиоты кишечника) животных позволяют изучать роль микробиоты в патогенезе ВЗК (Round *et al.*, 2009, Naito *et al.*, 2024). Гнотобиотические мыши, которых содержат в стерильных изоляторах, имеют существенные отличия в развитии иммунной системы: уменьшение размеров лимфоидных фолликулов, снижение количества IgA-продуцирующих плазматических клеток и истончение слизистого барьера (Wang *et al.*, 2025). При переносе стерильным животным микробиоты от пациентов с ВЗК происходит развитие воспалительных изменений (Zhang *et al.*, 2025). Характерно, что перенос микробиоты от здоровых доноров не вызывает аналогичных патологических изменений, что подтверждает воспалительный потенциал микробиоты, ассоциированной с ВЗК (Xu *et al.*, 2025). Такие модели позволяют изучать функциональные последствия колонизации определенными бактериальными таксонами и выявлять ключевые микробные факторы, способствующие развитию воспаления (Chen *et al.*, 2024). Например, этот подход был использован для выявления роли нового штамма *E. coli* 301Y6A-8 из образцов фекалий пациента с тяжелой формой ЯК (Yan *et al.*, 2025). Ежедневное внутрижелудочное введение этого

штамма безмикробным мышам C57BL/6 в течение 7 дней приводило к значительной потере массы тела, повышению индекса активности заболевания, эрозии эпителия, деформации крипт и снижению количества белка ZO-1. Транскриптомный анализ выявил активацию пути Th17, что напрямую подтверждает способность конкретного штамма, выделенного от пациента с ВЗК, индуцировать колит в гнотобиотической системе (Yan *et al.*, 2025).

Роль состава микробиоты в вариабельности результатов на разных моделях представляет собой важный аспект, который необходимо учитывать при планировании и интерпретации экспериментальных исследований (Peng *et al.*, 2025). Например, мыши C57BL/6 и BALB/c демонстрируют различные профили чувствительности к химически индуцированному колиту, что частично объясняется различиями в их микробиоме и иммунном фоне (San Gabriel *et al.*, 2024). Кроме того, условия содержания животных (виварий-специфичные микробные сообщества, диета, плотность содержания) вносят значительный вклад в вариабельность экспериментальных результатов (Armstrong *et al.*, 2023). Стандартизация микробного статуса животных через использование стандартной микробиоты или контроль условий содержания позволяет уменьшить эту вариабельность и повысить воспроизводимость исследований. Недавние мета-анализы, включающие данные из множества независимых экспериментов, позволили разработать индекс микробного дисбиоза, который может служить стандартизированным инструментом для оценки состояния микробного сообщества в моделях колита (Wang *et al.*, 2024). Понимание влияния состава микробиоты на экспериментальные модели необходимо для адекватной интерпретации данных и их трансляции в клиническую практику.

#### **1.4.5 Клеточные модели для изучения функций кишечника**

Развитие методов культивирования клеток и тканевой инженерии значительно продвинуло исследование патогенеза ВЗК. Такие системы дают возможность для изучения молекулярных и клеточных механизмов в строго контролируемых условиях (Kim *et al.*, 2022). Клеточные модели позволяют проводить детализированный анализ патологических

процессов, осуществлять высокопроизводительный скрининг лекарственных препаратов и разрабатывать подходы персонализированной медицины (Beaurivage *et al.*, 2021). Основная задача таких систем — воспроизведение сложной структуры и функциональных особенностей кишечного эпителиального барьера, а также его двунаправленных взаимодействий с иммунными клетками и кишечной микробиотой (Puschhof *et al.*, 2021).

Наиболее простыми и широко используемыми клеточными моделями для изучения кишечного эпителиального барьера являются клеточные линии эпителия, такие как Caco-2, HT-29 и T84 (Cione *et al.*, 2025). Эти линии происходят из аденокарциномы толстой кишки человека и при культивировании способны формировать поляризованный монослой с экспрессией белков плотных контактов (Corbett *et al.*, 2025). Это позволяет проводить количественную оценку функции барьера путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления и анализа парацеллюлярной проницаемости для флуоресцентно меченых молекул (Srinivasan *et al.*, 2015). В то время как линия T84 считается золотым стандартом для оценки проницаемости благодаря формированию наиболее плотных контактов (Treveeravoot *et al.*, 2025), HT-29 активно используется для моделирования слизистого барьера (Cione *et al.*, 2025). Однако все двумерные модели имеют принципиальное ограничение: они не воспроизводят сложную клеточную гетерогенность и архитектуру крипт/ворсинок (Corbett *et al.*, 2025).

В последние годы активно используются трехмерные органоиды кишечника (Ren *et al.*, 2025). Органоиды представляют собой самоорганизующиеся структуры, развивающиеся из стволовых клеток кишечника. Они воспроизводят пространственную архитектуру и содержат все дифференцированные клеточные типы кишечного эпителия: энтероциты, клетки Панета, энтероэндокринные и бокаловидные клетки (Sugihara and Okamoto, 2025). Наиболее релевантными являются органоиды, полученные из биоптатов пациентов с ВЗК, поскольку они сохраняют уникальный набор генетических особенностей и молекулярных нарушений, характерных для конкретного пациента (Zhao *et al.*, 2025). Это открывает широкие возможности для тестирования индивидуального ответа на различные классы препаратов, от малых молекул до биологической терапии (Ren *et*

*al.*, 2025). Помимо этого, вместо первичного материала часто используют органоиды, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (Wang *et al.*, 2025).

Одним из подходов к тому, чтобы воспроизвести сложные системные взаимодействия в ткани кишечника при ВЗК, является совместное культивирование иммунных либо бактериальных клеток с клетками/органоидами эпителия. Иммунные клетки (например, макрофаги или лимфоциты) добавляют со стороны базальной части эпителия, имитируя собственную пластинку слизистой оболочки (Peddibhotla *et al.*, 2025a; Peddibhotla *et al.*, 2025b). Современные клеточные системы позволяют культивировать первичные эпителиальные клетки толстой кишки на подложке с макрофагами (в специализированных двухкамерных чашках Петри типа «Transwell»). Стимуляция такой системы LPS и IFN- $\gamma$  индуцирует воспалительный ответ, снижение трансэпителиального электрического сопротивления и повышение продукции провоспалительных цитокинов (Peddibhotla *et al.*, 2025b). Наибольшую ценность представляют исследования на первичных иммунных клетках из периферической крови или биоптатов пациентов с ВЗК, поскольку эти клетки уже несут патологические маркеры заболевания.

Наиболее сложные и современные системы — это комплексные модели с учетом микробиоты. Их создают на основе эпителиальных монослоев или органоидов, культивируемых совместно с бактериальными штаммами (например, *E. coli* Nissle 1917) или сложными консорциумами для изучения взаимодействия «микробиота-хозяин». В частности, такие работы проводятся и с применением анаэробных условий, необходимых важнейшим компонентам здоровой микробиоты — облигатным анаэробам, таким как *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila* (Puschhof *et al.*, 2021; Sen *et al.*, 2025). Особый интерес представляют работы с использованием органоидов, растущих монослоем, что обеспечивает прямой доступ бактерий к апикальной поверхности эпителия и позволяет изучать молекулярные механизмы взаимодействия в контролируемых условиях (Matsuzaki *et al.*, 2025).

Отдельно стоит отметить растущую область клеточной биологии, которая использует возможности микрофлюидных технологий, чтобы

воспроизводить сложные взаимодействия между микробиотой, кишечником и мозгом. Они позволяют в реальном времени отслеживать прохождение сигнальных молекул из просвета кишки через эпителий, кровоток и гематоэнцефалический барьер к нейронам (Jones *et al.*, 2024). Такие системы, как правило, имеют сложное техническое устройство. Например, Fanizza и соавторы (2025) представили мультиорганную платформу PEGASO, включающую пять соединенных модулей (кишечник, иммунная система, печень, гематоэнцефалический барьер и мозг) на основе микрофлюидного устройства MINERVA 2.0. В этой системе было показано, что препарат донепезил успешно транспортируется через все модули, снижает активность ацетилхолинэстеразы в мозговом модуле и повышает экспрессию Р-гликопротеина, подтверждая функциональность модели для тестирования лекарств, действующих на ЦНС.

Несмотря на преимущества клеточных моделей, они обладают существенными ограничениями. Основная проблема заключается в отсутствии возможности воспроизвести всю сложность физиологической среды *in vivo*. Клеточные системы лишены сосудистой сети, иннервации, гуморальных факторов из системного кровотока, а также механических воздействий. Таким образом, клеточные модели являются незаменимым инструментом для изучения конкретных молекулярных путей, но их результаты всегда требуют валидации в адекватных моделях *in vivo*.

Таким образом, литературные данные подтверждают, что воспаление кишечника является системной патологией, в основе которой лежит сложное взаимодействие генетических, иммунных, микробных и метаболических факторов. Ключевым звеном ВЗК является нарушение кишечного эпителиального барьера, ассоциированное с дефектами межклеточных контактов, изменением липидного профиля и перестройкой актинового цитоскелета. Несмотря на обширные данные, остается неясным, какие именно ультраструктурные перестройки эпителия являются универсальными для человека и экспериментальных моделей, и какие гены-регуляторы обеспечивают его целостность в условиях хронического воспаления.

Интеграция транскриптомных и метаболомных подходов начинает находить применение для поиска маркеров барьерной дисфункции.

Недостаточно изучена связь между метаболическими нарушениями, составом микробиоты и системной восприимчивостью к колоректальному раку при ВЗК. Наконец, формирующиеся данные о взаимодействии между кишечником и мозгом указывают на важную роль кишечной микробиоты и системного метаболизма в регуляции социального поведения, однако конкретные механизмы этого влияния при воспалении кишечника остаются малоизученными. Решение этих фундаментальных вопросов необходимо для разработки новых стратегий диагностики и терапии ВЗК, выходящих за рамки прямой иммуносупрессии.

## Глава 2. Материалы и Методы

### 2.1 Экспериментальные животные, клинический материал и этические аспекты

#### 2.1.1 Клинический материал и пациенты

В исследование были включены 3 взрослых пациента с подтвержденным диагнозом язвенного колита (ЯК) и 2 здоровых добровольца без анамнеза воспалительных заболеваний кишечника. У пациентов 1–3 заболевание соответствовало левостороннему колиту (Е2) или панколиту (Е3) по Монреальской классификации, с хроническим рецидивирующим или хроническим непрерывным течением. Длительность заболевания составляла 7–11 лет; во всех случаях отсутствовал семейный анамнез ЯК. Все пациенты получали базисную терапию азатиоприном и гуселькумабом в течение нескольких лет, имели в анамнезе не менее одного курса системных глюкокортикостероидов; у одного пациента на момент исследования проводилась текущая терапия преднизолоном (40 мг). Контрольная группа включала двух женщин, проходивших профилактическую колоноскопию и не имевших признаков ВЗК или семейного анамнеза ВЗК. Описание пациентов приведено в Таблице 3. Биоптаты слизистой оболочки толстой кишки и терминального отдела подвздошной кишки получали в ходе плановой колоноскопии: от каждого пациента получали образцы из прямой кишки и подвздошной кишки для анализа методом трансмиссионной электронной микроскопии и иммуногистохимического анализа.

Все процедуры с участием пациентов были одобрены этическим комитетом Новосибирского государственного медицинского университета (Новосибирск, Россия), протокол №164 от 24.02.2025. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией; от всех участников было получено письменное информированное согласие на использование

**Таблица 3. Клиническая характеристика пациентов с язвенным колитом и условно здоровых доноров**

Возраст	Пол	Раса	Диагноз: тип, локализация (Монреаль), длительность, течение, активность (DAI)	Базисная терапия
40	Ж	Европ.	Язвенный колит, левостороннее поражение (Е2), длительность 16 лет, хроническое рецидивирующее течение, средне-тяжелая атака (DAI 6)	1) Устекинумаб (ГИБТ); 2) азатиоприн; 3) 5-АСК. В анамнезе курсы кортикостероидов
37	М	Европ.	Язвенный колит, панколит (Е3), длительность 6 лет, хроническое рецидивирующее течение, ремиссия (DAI 0)	1) Гуселькумаб (ГИБТ); 2) азатиоприн; 3) кортикостероиды
35	М	Европ.	Язвенный колит, тотальное поражение (Е3), хроническое непрерывное течение, активная фаза (DAI 8)	1) Гуселькумаб (ГИБТ); 2) азатиоприн; 3) препараты 5-АСК; 4) преднизолон
32	Ж	Европ.	Без анамнеза ВЗК	здоровый контроль
66	Ж	Европ.	Без анамнеза ВЗК	здоровый контроль

DAI — индекс активности заболевания; Монреальская классификация: Е2 — левостороннее поражение, Е3 — панколит; ГИБТ — генно-инженерная биологическая терапия; КС — кортикостероиды, Европ. - европеоидная раса, 5-аминосалициловая кислота (месалазин).

клинических данных и биологического материала в научных целях.

### 2.1.2 Лабораторные животные

В экспериментальной части работы были использованы мыши линий C57BL/6JNskr и BALB/cNskrc (субколонии линий C57BL/6J и BALB/cJ, соответственно), которые разводили в Новосибирске (далее C57BL/6 и BALB/c). Разведение линий осуществлялось в Центре генетических ресурсов лабораторных животных, SPF (specific pathogen free)-виварии Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН, Новосибирск. Иммунодефицитных животных линии NU (субколония NU/J на генетическом фоне BALB/cJ), а также мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2<sup>-/-</sup>*) и их однопометников дикого типа (*Muc2<sup>+/+</sup>*) также разводили в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН как субколонию ранее полученных мышей *Muc2<sup>tm1Avel</sup>* на генетическом фоне C57BL/6. Перед проведением поведенческих тестов исходную линию *Muc2<sup>tm1Avel</sup>* переводили на генетический фон линии C57BL/6JNskr локального разведения с помощью пяти скрещиваний для устранения потенциальных генетических различий между двумя субпопуляциями C57BL/6. Кроме того, линия *Muc2<sup>-/-</sup>* поддерживалась в Институте нейронаук и медицины СО РАН и ИМКБ СО РАН. Мутантных животных и их однопометников дикого типа (*Muc2<sup>+/+</sup>*) получали скрещиванием самок и самцов генотипа *Muc2<sup>+/-</sup>*, при этом *Muc2<sup>+/+</sup>* служили контрольной группой в экспериментах с мышами *Muc2<sup>-/-</sup>*, если не указано иное.

Животных содержали в условиях SPF-вивария: кварталный мониторинг видоспецифических патогенов осуществляли в соответствии с международными рекомендациями. Линии мышей, полученные из конвенционального разведения, переводили в статус SPF посредством переноса эмбрионов (Litvinova *et al.*, 2016, Литвинова и соавт., 2015). Содержание вели в открытых или индивидуально вентилируемых клетках (Optimice, Animal Care Systems и АВТех, Россия) с подстилом из березовой стружки и укрытиями (бумажные стаканчики). Режим освещения составлял 12:12 или 14:10 (свет:темнота, свет выключался в 16:00 или в 12:00), температура поддерживалась на уровне 22–24°C, относительная влажность — 30–60%, воздухообмен — 14–16 объемов в час. Стандартный гранулированный корм (SSniff, Германия, или BioPro, Россия) и вода

предоставлялись *ad libitum*. Отъем от матерей проводился в возрасте 3–5 недель, далее животных содержали группами однополых однопометников; для поведенческих экспериментов взрослых самцов с половым опытом и самок (8–14 недель) дополнительно рассаживали в индивидуальные клетки за 3 суток до тестирования (Zolotykh et al., 2017).

Во всех сериях использовали взрослых мышей 8–14-недельного возраста. В подавляющем большинстве экспериментов применяли самцов, что отражено в описаниях отдельных моделей (DSS-колит, АОМ/DSS-канцерогенез, *Muc2*<sup>-/-</sup>, фосфолипидная диета, поведенческие тесты). Критериями исключения служили потеря массы тела более 20%, грубые неврологические нарушения, выраженное облысение, абсцессы, травмы; такие животные не включались в анализ и были выведены из эксперимента. Эвтаназию проводили методом ингаляции диоксида углерода или путем краниоцервикальной дислокации, в зависимости от требований протокола и последующих исследований.

Все процедуры с животными выполнялись в соответствии с российским законодательством и стандартами надлежащей лабораторной практики (приказ Минздрава РФ №267 от 19.06.2003), внутренними регламентами биоэтических комитетов и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Работа была одобрена следующими биоэтическими комитетами:

- межинститутский биоэтический комитет при ФИЦ ИЦиГ СО РАН, протокол №18.4 от 14.10.2013 (серии экспериментов с мышами линий *Muc2*<sup>-/-</sup> и C57BL/6, включая митохондриальный и морфологический анализ, а также поведенческое фенотипирование); - биоэтический комитет НИИ нейронаук и медицины, протокол №8 от 15.08.2019 (эксперименты по изучению взаимодействия «микробиота-кишечник-мозг» и поведенческие тесты на фоне хронического колита); - этический комитет НИИ нейронаук и медицины, протокол №3 от 19.05.2022 (эксперименты с диетическим введением фосфолипидов); - этический комитет ИМКБ СО РАН, протоколы №02 от 04.08.2021, №002 от 23.04.2025 и №003 от 24.06.2025 (комплексные эксперименты с моделями хронического колита и колоректального рака, животными линии *Muc2*<sup>-/-</sup>, метаболомным и транскриптомным анализом).

Объем выборки ( $n$ ) для каждой серии экспериментов определяли на основе ранее опубликованных данных и пилотных исследований, с учетом вариабельности показателей и требуемой статистической мощности. В экспериментах с мышами линии *Muc2<sup>-/-</sup>* и соответствующими контролями количество животных в группе составляло 8–12; для большинства серий с DSS-колитом и поведенческим тестированием  $n$  варьировало от 13 до 15 в каждой группе (конкретные значения указаны в главах 3-7).

### 2.1.3 Ключевые экспериментальные модели и объемы выборок

**Хронический DSS-индуцированный колит.** В экспериментах по химической индукции хронического воспаления использовали мышей-самцов линии C57BL/6 12–14-недельного возраста. В работе по влиянию фукозы на хронический колит сформированы четыре группы: «Контроль» ( $n = 15$ , вода), «DSS» ( $n = 15$ , 2% DSS), «DSS + фукоза» ( $n = 14$ , 2% DSS + 0,1% L-фукозы) и «Фукоза» ( $n = 13$ , только 0,1% фукозы в воде). Животные получали указанные растворы в течение 7 суток, затем в течение 7 суток - воду; цикл повторяли 3 раза (общая длительность 42 суток), после чего проводили поведенческие тесты, забор крови, ткани толстой кишки и фекалий.

В эксперименте по изучению динамики F-актина и митохондриальной функции при хроническом колите 12-недельные мыши C57BL/6 получали 2% DSS по протоколу с тремя циклами предоставления (7 дней DSS / 7 дней вода) по 6 животных в каждой группе.

**Модель адоптивного переноса T-клеток.** Селезёнки, полученные от мышей-доноров BALB/c, гомогенизировали в холодном (4 °C) PBS, дополненном 4% FBS, фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм. Эритроциты лизировали с помощью холодного (4 °C) гипотонического буфера на основе хлорида аммония (0,8% NH<sub>4</sub>Cl, 0,084% NaHCO<sub>3</sub>, 0,037% ЭДТА) в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки центрифугировали при 400 ×  $g$ , 4 °C в течение 5 мин и дважды отмывали 4% FBS в PBS (4 °C). После последней отмывки клетки ресуспендировали в буфере для сортировки (0,5% BSA, 2 мМ ЭДТА в PBS) до концентрации 10<sup>8</sup> клеток/мл. CD4-положительные клетки сортировали методом отрицательной селекции с использованием набора магнитных

частиц MojoSort Mouse CD4 T-Cell Isolation Kit (#480005, BioLegend) в соответствии с рекомендациями производителя. Затем выделенные клетки окрашивали антителами FITC anti-mouse CD45RB (#103305, BioLegend) и PE/Cyanine7 anti-mouse CD4 (#100421, BioLegend) в течение 45 мин на льду, отмывали 4% FBS в PBS (4 °C).

Клетки CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>High</sup> сортировали с использованием клеточного сортера Sony SH800, отбирая 24% наиболее ярких клеток, центрифугировали при 400 × *g*, 4 °C в течение 10 мин и ресуспендировали в стерильном PBS (4 °C). Полученную суспензию клеток вводили внутрибрюшинно мышам-реципиентам линии NU (самцы, *n* = 3) по 0,5 × 10<sup>6</sup> клеток в 250 мкл на мышь, как описано ранее (Kanai *et al.*, 2006). Контрольным мышам линии NU (*n* = 3) вводили 250 мкл стерильного PBS. Сортировку клеток проводили в Центре коллективного пользования "Дизайн рекомбинантных антител" при ИМКБ СО РАН (Новосибирск). Мышей взвешивали перед переносом Т-клеток (или инъекцией PBS), а затем два раза в неделю. Животных наблюдали на предмет клинических признаков воспаления: внешний вид, диарея, кровь в стуле и ректальное кровотечение. У мышей-реципиентов развивалось воспаление кишечника с диареей через 6 недель после переноса Т-клеток. Когда потеря массы тела после переноса превышала 20%, мышей-реципиентов выводили из эксперимента. Ткань толстой кишки подвергали патологическому исследованию и анализу цитокинового профиля в конечной точке.

**Модель *Muc2*<sup>-/-</sup>.** Мышей *Muc2*<sup>-/-</sup>, однопаметников генотипа *Muc2*<sup>+/+</sup> и генетически идентичных животных С57BL/6 использовали для изучения дефектов межклеточных контактов, митохондриального повреждения, проницаемости барьера и ассоциированных транскриптомных и метаболомных изменений. В большинстве экспериментов с использованием морфологического анализа, трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), проницаемости эпителиального барьера и оценки митохондриального дыхания группы включали по 3–8 самцов 12–14-недельного возраста (точные объемы выборки указаны в главах 3-7). В поведенческих тестах объем каждой группы составлял не менее 10 животных.

Каждая из представленных моделей воспроизводит ключевые

патогенетические и фенотипические черты ВЗК, однако ни одну из них нельзя строго отнести к ЯК или БК. Тем не менее, считается, что хронический DSS-индуцированный колит и модель генетически обусловленного колита *Muc2<sup>-/-</sup>* преимущественно воспроизводят ЯК, тогда как модель адоптивного переноса CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>High</sup> Т-клеток ближе к БК.

**Модель колоректального рака.** Для изучения влияния исходной микробиоты на риск развития колоректального рака использовали модель химической индукции с помощью азоксиметана (АОМ) и DSS (модель АОМ/DSS) на самцах C57BL/6 возрастом 8–12 недель. Животным однократно вводили азоксиметан (10 мг/кг, внутривентриально), далее проводили три цикла DSS (1,8% в воде, по 7 суток) с тремя недельными промежутками, когда животные принимали воду. Группы формировали из животных двух субколоний C57BL/6, различающихся по исходному составу микробиоты. Каждая группа включала 8–13 особей.

**Введение фосфолипидов через корм.** Эксперименты по оценке влияния длительного и краткосрочного введения фосфолипидов (смесь фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и фосфатидной кислоты) выполняли на самцах линии C57BL/6. В долгосрочном режиме беременным самкам C57BL/6 давали корм, обогащенный фосфолипидами, начиная с первого дня беременности; потомство получало тот же корм с момента отъема до возраста около 12 недель. В краткосрочном режиме 8-недельные самцы получали фосфолипидный корм в течение 2 недель. Животных выводили из эксперимента в возрасте 10–12 недель. Из нисходящего отдела толстой кишки отбирали образцы для ТЭМ, оценки митохондриального дыхания, окраски митохондрий и тестов проницаемости эпителиального барьера, из крови — для метаболомного анализа. Размеры групп в этих сериях составляли 6–10 животных на группу.

### **Ректальное введение ингибиторов**

Мыши (n = 3 на группу) были анестезированы внутривентриально (Домитор, 0,2 мг на 1 кг массы тела и Золетил, 20 мг на 1 кг массы тела) (Попова и соавт., 2024). Мышам ректально вводили 15 мкМ латрункулина А (#100-0562, Stemcell Technologies, Канада), 3 мкМ джасплакинолида (#sc-202191, Santa Cruz Biotechnology, США), 20 мкМ Y-27623 (Stemcell Technologies, Канада) или 20 мкМ фумонизина B1

(#73682, Stemcell Technologies, Канада), растворенных в 33 мкл 0,9% NaCl. Контрольным мышам вводили 33 мкл 0,9% NaCl. После этого мышей оставляли лежать на спине на теплой поверхности (37°C) с приподнятыми хвостами для предотвращения вытекания клизмы до пробуждения. Затем животных возвращали в их домашние клетки. Через 3 часа (латрункулин А/ясплакинолид) или 12 часов (Y-27623 или фумонизин B1) после введения мышей умерщвляли, и их нисходящую ободочную кишку извлекали для иммуногистохимического анализа.

**Поведенческие тесты.** В экспериментах по изучению влияния хронического колита и ассоциированной микробиоты на поведение использовали самцов C57BL/6 и, в отдельных сериях, самок для теста предпочтения сахарозы. Размер групп составлял 13–15 животных на группу для основных поведенческих тестов (Открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, темно-светлая камера, тест закапывания шариков, IntelliCage, когнитивные тесты). Для социальных тестов (тест в камере с тремя отсеками, тест «резидент–интродер») дополнительно использовали 10 самцов линии BALB/c в качестве объекта для оценки социального интереса, а 10 самцов и 10 самок BALB/c - в качестве интродеров в парадигме «резидент-интродер».

## 2.2 Морфологические методы исследования

### 2.2.1 Гистологический и иммуногистохимический анализ

Для световой микроскопии образцы толстой кишки фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине, обезживали в возрастающей серии спиртов и заключали в парафин. Срезы толщиной 4 мкм готовили на микротоме и окрашивали гематоксилином и эозином для общей оценки морфологии кишки. Детальную оценку воспалительной инфильтрации полиморфоядерных клеток проводили с помощью окрашивания азур-П–эозином.

Гистологические препараты анализировали в «слепом» режиме. Для количественной оценки тяжести колита использовали модифицированные шкалы Barthel и Bergstrom, суммируя баллы по трем параметрам: гиперплазия крипт (процент удлиненных крипт), повреждение

эпителия/эрозия (от десквамации до обширных изъязвлений) и степень воспалительной инфильтрации (число полиморфноядерных лейкоцитов в поле зрения при увеличении  $\times 1000$ ).

Для иммунофлуоресцентного анализа использовали криосрезы кишки пациентов и мышей. Образцы фиксировали перфузией или иммерсией в 4% параформальдегиде, криопротекцию осуществляли с помощью 15–30% сахарозы, заключали в смолу для заморозки и замораживали. Срезы толщиной 20–100 мкм получали на криостате Microm HM 550 (ThermoFisher). Пермеабелизацию проводили в 0.3% Triton X-100, блокирование неспецифического связывания — в 0.5% бычьим сывороточном альбумине (bovine serum albumin, BSA) или 1% BSA с детергентом Tween-20. Инкубировали при 4 °C в течение ночи с первичными антителами к белкам плотных контактов (Claudin-3, Claudin-7, ZO-1, JAM-A), адгезивных контактов ( $\beta$ -catenin, E-cadherin/CD324) и с фаллоидином, конъюгированным с TRITC или Alexa Fluor 568, для визуализации F-актина. Ядра окрашивали DAPI. Изображения получали на конфокальном микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss) с объективами Plan-Apo 40 $\times$  и 63 $\times$  (масляная иммерсия). Количественный анализ (интенсивность и распределение сигнала вдоль латеральных и апикальных мембран) выполняли в программе ImageJ, используя не менее 30 измерений на животное.

### 2.2.2 Трансмиссионная электронная микроскопия

Ультраструктурный анализ выполняли на биоптатах толстой кишки пациентов и мышей в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (Новосибирск). Образцы фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,4), постфиксировали в 1% OsO<sub>4</sub> с добавлением 0,8% ферроцианида калия, обезвоживали и заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим для выбора зон интереса. Ультратонкие срезы толщиной 60–70 нм получали на ультрамикротоме Leica EM UC7 и просматривали на электронном микроскопе JEM 1400 (JEOL). Морфометрический анализ проводили в iTEM (Olympus) в «слепом» режиме, оценивая ширину и протяженность плотных и адгезивных

контактов, число десмосом на единицу длины латеральной мембраны, ширину межклеточного пространства и структуру митохондрий (число крист на единицу площади митохондриального матрикса  $0,25 \text{ мкм}^2$ , долю «пустых» митохондрий с  $< 3$  кристами).

## 2.3 Молекулярно-биологические и биохимические методы

### 2.3.1 Выделение РНК и количественная ПЦР

Образцы дистального отдела толстой кишки отбирали непосредственно после эвтаназии и немедленно замораживали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific) или QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) согласно инструкциям производителей с последующей обработкой DNase I (Roche) для удаления геномной ДНК. Концентрацию и чистоту РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000.

Синтез кДНК проводили на матрице 1–5 мкг РНК с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (SibEnzyme) и смеси случайных гексамерных праймеров и универсального праймера, состоящего из остатков дезокситимидина. Количественную ПЦР в реальном времени выполняли на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad) с использованием набора BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (BioLabMix) и пар специфичных праймеров (конечная концентрация 250 нМ). Режим амплификации включал предварительную денатурацию ( $95^\circ\text{C}$ , 3 мин) и 40 циклов ( $95^\circ\text{C}$  — 15 с,  $62^\circ\text{C}$  — 25 с,  $72^\circ\text{C}$  — 25 с) с последующим анализом кривых плавления ( $65$ – $95^\circ\text{C}$ ). В качестве референсов использовали несколько генов, на изображениях показан результат нормирования на ген *Tubb5*, который согласовался с результатами нормирования на остальные референсные гены. Относительную экспрессию целевых генов рассчитывали по методу  $2^{-\Delta C_t}$ .

### 2.3.2 Транскриптомный анализ и биоинформатические подходы

Для транскриптомного анализа образцов толстой кишки мРНК выделяли на магнитных частицах и готовили библиотеки с использованием наборов NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit (New England Biolabs) или TruSeq DNA PCR-Free (Illumina). Секвенирование проводили на платформе

Иllumina в режиме парно-концевого чтения. Первичную обработку данных (обрезка адаптеров, контроль качества) выполняли стандартными инструментами. Выравнивание на референсный геном мыши осуществляли с помощью программы Hisat2 (v2.0.5). Эта часть работы проводилась силами коммерческой организации (для транскриптомного анализа ткани кишки мышей, BGI, Китай) либо были использованы общедоступные данные (для данных по экспрессии генов человека). Дифференциальную экспрессию генов анализировали в среде R с использованием пакетов DESeq2 или edgeR, статистически значимыми считали изменения при  $p < 0,05$  после применения поправки FDR.

Для анализа коэкспрессии генов применяли метод Weighted Gene Coexpression Network Analysis (WGCNA) с выделением модулей и идентификацией хаб-генов по интрамодульной связности и ассоциации с фенотипическими признаками. Направленные взаимодействия между генами оценивали с помощью байесовских сетей (пакет `bnlearn`, алгоритм hill-climbing с критерием BIC и bootstrap-ресемплированием), включая в итоговую сеть связи с высокой силой (коэффициент силы связи и вероятность направления связи  $> 0,7$ ).

### 2.3.3 Мультиплексный иммунологический анализ

Для измерения уровней цитокинов образец нисходящей ободочной кишки гомогенизировали в жидком азоте ( $n = 5$  для контроля,  $n = 6$  для *Muc2<sup>-/-</sup>*), добавляли 100 мкл PBS, затем образец центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 15 мин при 4 °C. Концентрацию цитокинов в супернатанте измеряли с использованием панели магнитных шариков для цитокинов/хемокинов мыши MILLIPLEX MAP (Merck, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Детекцию проводили с использованием системы Luminex 200 (Merck, Германия) с программным обеспечением xPONENT 3.1. Концентрацию цитокинов нормализовали к общему белку, который измеряли по методу Брэдфорда, и представляли как пг цитокина на мг общего белка.

### 2.3.4 Иммуноблоттинг

Для белкового анализа ткань толстой кишки гомогенизировали в буфере RIPA (150 ммоль/л NaCl, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% SDS, 25 ммоль/л Tris-HCl, pH 7,4) с добавлением ингибитора протеаз (1 ммоль/л PMSF) и восстановителя DTT (1 ммоль/л). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда. Белковые образцы (40 мкг на дорожку) разделяли в 15%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и переносили на нитроцеллюлозные мембраны.

Мембраны блокировали в 5% BSA и инкубировали с первичными антителами к клаудинам 3 и 7,  $\beta$ -катенину, E-кадгерину в разведении 1:1000 в течение ночи при 4°C, затем инкубировали с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. В качестве белков нормировки использовали  $\beta$ -тубулин или глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH). Сигнал визуализировали с помощью хемилюминесцентного субстрата, а денситометрический анализ выполняли в программе ImageJ.

### 2.3.5 Иммунопреципитация и протеомный анализ

Для идентификации белковых партнеров белка клаудин-3 проводили иммунопреципитацию из нативных белковых экстрактов ткани толстой кишки мышей *Muc2<sup>+/+</sup>* и *Muc2<sup>-/-</sup>* ( $n = 6$  в каждой группе). Образцы дистального отдела толстой кишки сразу после извлечения гомогенизировали на льду в лизирующем буфере (25 ммоль/л HEPES, pH 8,0; 200 ммоль/л NaCl; 5 ммоль/л EDTA; 0,1% Triton X-100) с добавлением ингибиторов окисления и протеолиза (1 ммоль/л натрия метабисульфита, 1 ммоль/л PMSF). Для каждого генотипа брали по 2,5 мг общего белка, добавляли антитела к белку клаудин 3 и сорбент Protein A Sepharose и инкубировали при 4°C в буфере для связывания (25 ммоль/л HEPES, pH 8,0, 200 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л EDTA, 0,1% NP-40, 1 ммоль/л натрия метабисульфита, 1 ммоль/л PMSF) в течение 4 часов. После связывания иммунные комплексы многократно отмывали буфером повышенной ионной силы (HEPES, pH 8,0, 500 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л

EDTA, 0,1% NP-40, 1 ммоль/л натрия метабисульфита, 1 ммоль/л PMSF). Элюцию комплексов осуществляли с помощью цитратного буфера, pH 3,0. Белки осаждали смесью трихлоруксусной кислоты и дезоксихолата натрия, осадки ресуспендировали в буфере Лэммли и денатурировали нагреванием. Полученные образцы отправляли на анализ в коммерческую организацию BGI (Китай) в буфере Лэммли. Для контроля неспецифического связывания параллельно выполняли «пустую» иммунопреципитацию с использованием неспецифических к белкам мыши антител.

Идентификация белков заключалась в разделении белковой смеси в образцах с помощью гель-электрофореза, разделении геля на фрагменты из области нанесения образца, экстракции, проведении масс-спектрометрического анализа на приборе Q-Exactive HF X и, наконец, с помощью программного обеспечения проводилась идентификация белков. Ниже приведен метод экстракции, разделения, идентификации и аннотации пептидов согласно отчету коммерческой организации-исполнителя.

Гель замачивали в 50 мкл воды на 30 минут, затем нарезали на фрагменты размером 1–2 мм и переносили в пробирки. Добавляли 1 мл обесцвечивающего раствора (50 mM NH<sub>4</sub>SCN : ацетонитрил в соотношении 1:1), встряхивали 10 с, обесцвечивали при 37 °C 30 мин, центрифугировали и высушивали; повторяли до исчезновения синего цвета. Затем добавляли 500 мкл ацетонитрила для дегидратации до побеления, ацетонитрил удаляли, подсушивали 10 мин. Добавляли 10 mM ДТТ до покрытия геля, инкубировали при 56 °C 1 ч, охлаждали, удаляли жидкость, быстро добавляли 55 mM йодацетамида и оставляли в темноте при комнатной температуре на 45 мин. Жидкость удаляли, дважды промывали обесцвечивающим раствором, один раз водой, затем добавляли 500 мкл ацетонитрила, встряхивали 5 мин, ацетонитрил удаляли, подсушивали 10 мин. Трипсин разводили до 0,01 мкг/мкл в 25 mM NH<sub>4</sub>SCN, покрывали гель, выдерживали 30 мин при 4 °C, после набухания добавляли 50 mM бикарбоната аммония и инкубировали при 37 °C в течение ночи. На следующий день добавляли 5-кратный объем 50% ацетонитрила, встряхивали 5 мин, центрифугировали 1 мин при 5000 g, супернатант переносили в новую пробирку; затем добавляли 5 объемов 100% ацетонитрила, снова встряхивали 5 мин и центрифугировали, супернатант

объединяли, центрифугировали при 25000 g 5 мин и лиофилизировали.

Высушенные пептидные образцы ресуспендировали в подвижной фазе А (2% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота), центрифугировали при  $20000 \times g$  в течение 10 минут, супернатант отбирали для инъекции. Разделение проводили на хроматографе Thermo UltiMate 3000 UHPLC. Образец сначала обогащали на колонке-ловушке и обессоливали, затем наносили на колонку C18 (внутренний диаметр 75 мкм, размер частиц 3 мкм, длина колонки 25 см) и разделяли при скорости потока 300 нл/мин по следующему эффективному градиенту: 0–5 мин, 5% подвижной фазы В (98% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота); 5–45 мин, подвижная фаза В линейно возрастала с 5% до 25%; 45–50 мин, подвижная фаза В возрастала с 25% до 35%; 50–52 мин, подвижная фаза В возрастала с 35% до 80%; 52–54 мин, 80% подвижной фазы В; 54–60 мин, 5% подвижной фазы В. Выход из нанолитровой жидкой хроматографической системы напрямую соединяли с масс-спектрометром.

Пептиды, разделённые жидкостной хроматографией, ионизировали с помощью наноисточника ESI и затем направляли в тандемный масс-спектрометр Q-Exactive HF X (Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, Калифорния) для детекции в режиме DDA. Основные параметры: напряжение источника ионов 1,9 кВ; диапазон сканирования MS1 350–1500 m/z; разрешение 60000; начальное m/z для MS2 фиксировано на 100; разрешение 15000. Условия отбора ионов для фрагментации MS2: заряд от 2+ до 6+, и топ-30 родительских ионов с интенсивностью пика >10000. Режим фрагментации ионов — HCD, фрагментные ионы детектировали в орбитальной ловушке. Время динамического исключения — 30 секунд. AGC: MS1 —  $3 \times 10^6$ , MS2 —  $1 \times 10^5$ .

Идентификация пептидов проводилась с помощью сервиса Mascot (Perkins *et al.*, 1999) — одного из наиболее широко используемых программных обеспечений для идентификации белков в области протеомики. Версия, использованная в данном проекте, — Mascot 2.3.02. В работе в качестве исходного файла использовался mgf-файл, выбиралась предварительно сконструированная база данных и затем выполнялся поиск по базе данных. Параметры поиска Mascot: поисковая система — Mascot v2.3; фермент — трипсин; допуск по массе пептида — 10 ppm;

допуск по массе фрагмента — 0,02 Да; фиксированные модификации — карбамидометилирование (C); переменные модификации — окисление (M), Gln→пиро-Glu (N-концевой Q), дезамидирование (NQ); максимальное число пропущенных расщеплений — 1; тип прибора — ESI-FTICR; база данных — SwPmmu\_nr.fasta (17102 последовательности).

Для получения значения iBAQ (Intensity-Based Absolute Quantification) каждого белка в этом конвейере использовалось собственное программное обеспечение BGI для экстракции пептидов и вычисления площади пика. Затем, на основе алгоритма iBAQ (Perkins *et al.*, 1999), общая площадь пика в каждой белковой группе делилась на количество теоретических пептидов для получения окончательного значения iBAQ.

Количественную оценку белков проводили по показателю iBAQ. Для учета фонового и неспецифического связывания из значений iBAQ, полученных после анализа иммунопреципитатов, полученных из экстрактов кишки животных *Muc2<sup>-/-</sup>* и *Muc2<sup>+/+</sup>*, вычитали соответствующие значения, зарегистрированные в контроле. Дополнительно из списков исключали белки, относящиеся к типичным контаминантам иммунопреципитации (шапероны семейства белков теплового шока, иммуноглобулины, кератины, рибосомные белки, факторы элонгации), вероятно, не имеющие отношения к структуре плотных контактов. Очищенные списки белков, специфически ассоциированных с белком клаудин 3, подвергали функциональной аннотации. Обогащение по категориям онтологии генов (Gene Ontology, раздел «Biological process») анализировали в среде R с использованием пакетов `clusterProfiler` и `org.Mm.eg.db`.

### 2.3.6 Оценка биоэнергетики и митохондриальной функции

Функциональное состояние митохондрий кишечного эпителия оценивали по скорости потребления кислорода (СПК), уровню АТФ и содержанию активных форм кислорода (АФК). Для анализа СПК выделенные крипты толстой кишки высаживали в покрытые матриксом (Martigel, Corning) планшеты и исследовали на анализаторе Seahorse XF (Agilent) в среде с глюкозой, глутамином и пируватом. Регистрировали базальный уровень СПК и его изменение при последовательном добавлении олигомицина, трифторметоксикарбонилцианида

фенилгидразона (Fluoro-Carbonyl Cyanide Phenylhydrazone, FCCP) и смеси ротенон/антимидин А. Результаты нормировали на общее содержание белка в лунке.

Восьмилуночные микротитровальные планшеты для клеточной культуры Seahorse XFp (#101037-004, Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) предварительно покрывали 10 мкл Matrigel (#354277, Corning, Нью-Йорк, США), разведённого 1:40 в DMEM, полимеризовали при 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C и хранили при 4 °C в течение 24 ч. В день анализа планшеты с предварительным покрытием Matrigel предварительно прогревали при 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C и использовали для высева 50 мкл выделенных крипт толстой кишки. Аликвоту каждого образца крипт использовали для анализа содержания общего белка методом Брэфорд для нормировки результатов. Планшеты использовали для измерения OCR с помощью анализатора Seahorse XF (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США).

В эксперименте с использованием 2,4-динитрофенола (dinitrophenol, DNP) была использована следующая программа: калибровка; уравнивание; начало цикла: 3× смешивание: 3 мин, измерение: 3 мин, конец цикла; инъекция: порт А (DNP, 100 мкМ); начало цикла: 3× смешивание: 3 мин, измерение: 3 мин, конец цикла; остановка. СПК нормализовали на общий белок, измеренный с помощью анализа Брэфорда в аликвоте соответствующего образца крипт. Первое базовое измерение использовали для сравнения СПК между генотипами. Весь набор данных использовали для анализа повторных измерений внутри каждого генотипа для оценки влияния DNP, указывающего на резервную дыхательную способность (Borisova *et al.*, 2020).

В эксперименте с фосфолипидами программа была следующей: калибровка; уравнивание; начало цикла: 3× смешивание: 3 мин, измерение: 3 мин, конец цикла; инъекция: порт А (олигомицин, 50 мкМ); начало цикла: 3× смешивание: 3 мин, измерение: 3 мин, конец цикла; инъекция: порт В (FCCP, 50 мкМ); начало цикла: 3× смешивание: 3 мин, измерение: 3 мин, конец цикла; инъекция: порт А (ротенон/антимидин А, 50 мкМ); начало цикла: 3× смешивание: 3 мин, измерение: 3 мин, конец цикла; остановка. Аликвоты крипт отбирали из каждого образца для измерения общего белка с помощью анализа Брэфорда и

использовали для нормализации СПК (Saydakova *et al.*, 2023). Анализ митохондриального дыхания проводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных, SPF-виварии ИЦиГ СО РАН (Новосибирск).

Содержание АТФ в образцах дистального отдела толстой кишки мышей C57BL ( $n = 15$  и  $8$ ), *Muc2*<sup>-/-</sup> ( $n = 15$ ) и C57BL/6 + DNP ( $n = 8$ ) определяли, как описано ранее с незначительными модификациями (De Kanter *et al.*, 2005). Кратко: образцы тканей помещали в 200 мкл 70% этанола (об./об.), содержащего 2 мМ ЭДТА (pH 10,9), и замораживали в жидком азоте. Образцы оттаивали и гомогенизировали с помощью ультразвуковой обработки. Экстракты АТФ разводили в 10 раз буфером, содержащим 0,1 М Tris-HCl и 2 мМ ЭДТА (pH 7,8). АТФ измеряли с использованием коммерчески доступного набора для анализа АТФ (#119107, Merck, Германия) в соответствии с инструкциями производителя на люминометре Berthold TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Германия). Концентрацию АТФ нормализовали по содержанию общего белка, который измеряли по методу Брэдфорда. Результат представляли как кратность изменения по сравнению с контролем.

### 2.3.7 Метаболомный анализ

Для метаболомного анализа применяли метод ядерного магнитного резонанса (<sup>1</sup>H-ЯМР) в лаборатории протеомики и метаболомики Международного томографического центра СО РАН и высокоэффективную жидкостную хроматографию с последующей масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в центре коллективного пользования Передовой масс-спектрометрии Сколтеха (Москва). Экстракцию низкомолекулярных метаболитов из сыворотки, ткани мозга и толстой кишки проводили смесью метанол-хлороформ-вода (для тканей, 2:2:1 по объему; для сыворотки, 1:1), водную фракцию лиофильно высушивали. Сухой остаток растворяли в тяжелой воде с фосфатным буфером (pH 7,4) и внутренним стандартом. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре AVANCE III HD (700 МГц), идентификацию и интеграцию сигналов проводили в программе MestReNova с использованием базы данных HMDB. Нецелевой анализ липидных метаболитов в ткани толстой кишки проводили методом ВЭЖХ-МС/МС после экстракции 80%-м метанолом. Обработку сырых

данных (выравнивание, фильтрация), нормировку (логарифмирование по основанию 10, Pareto-масштабирование) и анализ обогащения по метаболическим путям KEGG выполняли с помощью онлайн-платформы MetaboAnalyst 5.0.

### 2.3.8 Культивирование органоидов кишечника

Кишечные органоиды получали из эпителиальных крипт толстой кишки мышей. Для этого из дистального отдела толстой кишки вырезали фрагменты, удаляли содержимое просвета, многократно промывали охлажденным фосфатно-солевым буфером с добавлением смеси антибиотиков и антимикотиков и механически измельчали ткань до небольших фрагментов как описано ранее с дополнениями (Sato *et al.*, 2009).

Образцы толстой кишки забирали у мышей, промывали с помощью катетера 23 G холодным (4 °C) фосфатно-солевым буфером Дульбекко (DPBS) (#D5652, Sigma, США), содержащим 1% раствора смеси антибиотика и антимикотика (ABM) (#A5955, Sigma, США), затем разрезали продольно и трижды отмывали в холодном DPBS+ABM. Образцы нарезали на маленькие фрагменты (чтобы проходили через наконечник пипетки объемом 1 мл) и подвергали ферментативному расщеплению в растворе коллагеназы I (2 мг/мл) (#17018-029, Gibco, США) в среде DMEM/F12 (#D9785, Sigma-Aldrich, США), дополненной 5% фетальной бычьей сывороткой (FBS) (#SV30160.03, HyClone, США) и смесью антибиотика и антимикотика (#A5955, Sigma-Aldrich, США), в течение 30 мин при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Крипты высвобождали пипетированием с использованием наконечника на 1000 мкл, фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм, затем центрифугировали при 250 × *g*, 4 °C в течение 5 мин.

Крипты ресуспендировали в Organoid-Star Matrigengel (#0827555, ABW, США). Капли по 25 мкл высевали в 48-луночные культуральные планшеты. Планшеты инкубировали 5 мин при 37 °C для полимеризации матрикса. Культивирование проводили в среде IntestiCult Organoid Growth Medium (#06000, Stemcell Technologies, Канада) с добавлением 1% ABM при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Среду заменяли каждые три дня. Через 7–10

дней культивирования органоиды пассировали. Для пассирования среду IntestiCult удаляли, капли Matrigengel ресуспендировали в 0,25% растворе трипсин-ЭДТА (#Т4049, Sigma, США) и инкубировали 5 мин при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>. Органоиды отмывали средой DMEM/F12 с добавлением 10% FBS и 1% АВМ, центрифугировали при 200 × *g* в течение 5 мин. Супернатант удаляли, органоиды ресуспендировали в Matrigengel и высевали, как описано выше. Анализ проницаемости проводили через 3 дня после пассажа.

Тестирование проницаемости проводили следующим образом (Medvedeva *et al.*, 2025). Все лунки промывали средой DMEM/F12, содержащей 10% FBS и 1% АВМ, для сбора культивируемых органоидов из планшета. После центрифугирования при 300 × *g* и 4 °С супернатант удаляли, а органоиды ресуспендировали в культуральной среде, содержащей 2 мг/мл FITC-декстрана 4 кДа (FD4-100 мг, Sigma) + 10 мкг/мл Hoechst 33342 (G1127, ServiceBio) + 10 мкг/мл 7-аминоактиномицина D (A1310, Invitrogen). Для экспериментальных групп добавляли 10 мкМ U-73122 (ab120998, Abcam, США) или 5 мМ фосфатидилинозитола (#P6636, Sigma, США). После 1 часа инкубации органоиды переносили в 8-луночный  $\mu$ -слайд (SPL Lifesciences, Корея) и наблюдали под конфокальным микроскопом LSM 710 (Zeiss) с программным обеспечением ZEN 2012.  $\mu$ -слайд помещали на терморегулируемый столик микроскопа (37 °С) с подачей CO<sub>2</sub> и проводили прижизненную съемку в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (Новосибирск).

## 2.4 Поведенческое фенотипирование

Все поведенческие исследования проводили в Российском национальном центре генетических ресурсов лабораторных животных на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН и в виварии НИИНМ СО РАН. Тестирования проводили в темную фазу установленного в виварии светового дня при рассеянном освещении. Для снижения влияния фактора стресса тесты выполняли в порядке от наименее к наиболее стрессогенным. За 3 дня до начала эксперимента мышей рассаживали в индивидуальные клетки по одному животному. Перемещение животных в ходе тестов и поведенческие параметры регистрировали видеосистемой и анализировали в EthoVision XT 10 (Noldus) либо EthoStudio (Новосибирск), за исключением тестов, где

требовался ручной подсчет.

#### **2.4.1 Общая активность и тревожное поведение**

В тесте «Открытое поле» животное помещали в центр арены 40×40 см и в течение 5 минут регистрировали общую пройденную дистанцию, время и число заходов в центральную зону, а также количество вертикальных стоек. В тесте «Темно-светлая камера» (камера с освещенным и темным отсеком) в течение 5 минут измеряли латентное время выхода в светлый отсек, общее время пребывания в нем и число переходов; уменьшение времени на свету расценивали как повышение тревожности. В приподнятом крестообразном лабиринте оценивали время и число заходов в открытые рукава; избегание открытых рукавов интерпретировали как тревожно-подобное поведение. В тесте «Закапывание шариков» в клетке со слоем подстилки высотой 4 см раскладывали 20 стеклянных шариков и через 30 минут подсчитывали число шариков, закопанных не менее чем на 2/3 объема. Для мониторинга спонтанной активности и потребления корма/воды без стресса новизны использовали систему PhenoMaster (TSE Systems), где животных содержали индивидуально в течение 3 суток; анализировали локомоторную активность и периоды неподвижности (неподвижность > 40 секунд считали индикатором сна).

#### **2.4.2 Депрессивно-подобное поведение**

Депрессивно-подобный фенотип оценивали в тестах «Подвешивание за хвост» и «Принудительное плавание». В первом случае мышь подвешивали за хвост на высоте 30 см на 6 минут, регистрируя суммарное время неподвижности. Во втором — помещали животное в цилиндр с водой (25 °С, 6 минут), оценивая время пассивного плавания за последние 4 минуты. Ангедонию исследовали в системе IntelliCage (TSE Systems): чипированных мышей содержали в автоматизированной установке со свободным выбором между водой и 2% раствором сахарозы. Предпочтение сахарозы рассчитывали как долю подходов к поилке с сахарозой от общего числа подходов.

### 2.4.3 Когнитивные функции

Рабочую память оценивали в Т-образном лабиринте: мыши выполняли серию из 14 попыток, в каждой из которых регистрировали выбор рукава. Чередование рукавов между последовательными попытками расценивали как нормальную реакцию. Пространственную память изучали в лабиринте Барнса с круглой платформой и 40 отверстиями, под одним из которых располагалось убежище. В фазе обучения (4 дня) измеряли латентное время нахождения убежища, а в пробных тестах (5-й и 12-й дни) при отсутствии убежища оценивали время, проведенное в целевом секторе (место прежнего расположения убежища), как показатель кратковременной и долговременной памяти. Для оценки ассоциативного обучения и активного избегания применяли установку Gemini Avoidance System (San Diego Instruments Inc.). В течение 5 дней регистрировали количество успешных реакций избегания при предъявлении светового сигнала (условный стимул) и последующего слабого электростимула (0,4 мА).

### 2.4.4 Сенсомоторная фильтрация

#### 2.4.5 Стартл-рефлекс, преимпульсное ингибирование, габитуация

Оценку стартл-рефлекса, преимпульсного ингибирования (prepulse inhibition, PPI) и габитуации проводили на установке SR-Pilot (San Diego Instruments Inc.), представляющей собой пластиковую камеру со встроенными пьезоэлектрическими датчиками для регистрации движений и контролируемым источником звука. Стартл-рефлекс и габитуацию рассматривали как показатели сенсомоторной фильтрации, PPI использовали для выявления шизофреноподобных признаков. Животных помещали в камеру с датчиками движения и предъявляли серии акустических стимулов, включающих громкие одиночные звуки, комбинации «слабый сигнал + громкий звук», а также интервалы без стимуляции. По зарегистрированной амплитуде двигательного ответа рассчитывали силу стартл-рефлекса, степень преимпульсного ингибирования и выраженность привыкания к повторяющимся стимулам.

### 2.4.6 Социальное поведение

Аутичноподобное поведение изучали в трехкамерной установке, где сравнивали время, проведенное мышью в отсеке с незнакомым конспецификом (под сетчатым стаканом, мышь линии BALB/c), и в отсеке с пустым стаканом и неодушевленным предметом. Рассчитывали социальный индекс как отношение времени исследования мыши ко времени исследования объекта. Дополнительно проводили тест «резидент–интродер»: к самцу-резиденту подсаживали незнакомого интродера на 15 минут, и по видеозаписи вручную оценивали длительность социальных контактов и число агрессивных актов. Тест на предпочтение запаха использовали для оценки интереса животных к социально значимым запахам без прямого контакта с источником запаха. В клетку к тестируемой мыши помещали два носителя запаха (подстил от самцов и самок BALB/c), после чего в течение 5 минут регистрировали время обнюхивания каждого из образцов. Результаты выражали как долю времени, затраченного на исследование каждого запаха, по отношению к общему времени обнюхивания (Andrejeva *et al.*, 2024). Тесты в парадигме «резидент–интродер» применяли для анализа социального поведения, включая агрессию и половое поведение. Тестируемых самцов предварительно изолировали в индивидуальных клетках, после чего в их домашнюю клетку на ограниченное время подсаживали одного или двух интродеров (самцов или самок BALB/c). Поведение регистрировали на видео; по записям оценивали частоту и длительность социальных взаимодействий (обнюхивание, груминг), а также количество агрессивных и половых актов (Morozova *et al.*, 2024a). Между тестами с разными типами интродеров выдерживали интервалы не менее двух суток.

## 2.5 Статистическая обработка данных и визуализация

Статистический анализ проводили в среде R (версия 4.1.2) и с помощью программного обеспечения STATISTICA 12 (StatSoft). Характер распределения данных проверяли с помощью критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Результаты представляли как среднее  $\pm$  ошибка среднего и как диаграмму размаха (медиана и квартили 1 и 3). Для многогрупповых сравнений использовали одно- или двухфакторный

дисперсионный анализ (Analysis of Variance, ANOVA) либо критерий Краскела–Уоллиса. При анализе повторных измерений применяли ANOVA повторных измерений или тест Фридмана. Межгрупповые сравнения выполняли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента или  $U$ -теста Манна–Уитни для зависимых или независимых выборок в зависимости от эксперимента. Категориальные переменные сравнивали с помощью критерия  $\chi^2$  или точного теста Фишера. Корреляции оценивали по Пирсону или Спирмену. Для контроля ошибки первого рода при проведении множественных сравнений использовали поправку по Бенджамини–Хохбергу (False Discovery Rate, FDR).

Для транскриптомных и метаболомных данных проводили анализ главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) и кластеризацию (программные пакеты `FactoMineR`, `ggplot2`) (FDR < 0,05, кратное обогащение  $\geq 2,0$ ). Анализ микробиоты включал расчет бета-разнообразия (взвешенную/невзвешенную метрику `UniFrac`) и пермутационный дисперсионный анализ (Permutation Analysis of Variance, PERMANOVA, функция `adonis`, 999 пермутаций). Поиск микробных биомаркеров осуществляли методом линейного дискриминантного анализа (Linear Discriminant Analysis, LDA) размера эффекта (LDA Effect Size, `LefSE`) при  $LDA \geq 2.0$ . Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)). Везде в тексте, где использованы множественные сравнения, указаны значения  $p$  после применения поправки по Бенджамини–Хохбергу. Визуализацию графиков выполняли с помощью `ggplot2` и `ggbeeswarm` в программной среде `RStudio`.

### **Глава 3. Нарушения цитоскелета как ключевая характеристика эпителия при хроническом воспалении**

#### **3.1 Ультраструктурная организация кишечного эпителия при воспалении**

Патогенез ВЗК неразрывно связан с нарушением структурной и функциональной целостности кишечного эпителиального барьера. Нарушение барьерной функции кишечника может как предшествовать клиническому воспалению, так и сохраняться в состоянии ремиссии. Поэтому важной задачей является изучение механизмов формирования эпителиального барьера в условиях хронического, низкоуровневого воспаления. В настоящей главе в качестве основного объекта была выбрана генетическая модель мышей с нокаутом гена, кодирующего белок муцин-2 (*Muc2<sup>-/-</sup>*), которая была получена ранее (Velcich *et al.*, 2002) и предоставлена SPF-виварием ИЦиГ СО РАН. Мucin2 является основным секретиремым муцином толстой кишки и ключевым компонентом слизистого барьера. Эта модель успешно воссоздает клиническую картину, характерную для хронического воспаления кишечника у пациентов с ВЗК.

##### **3.1.1 Характер клеточных нарушений в кишечном эпителии на модели хронического колита**

У мышей с нокаутом гена, кодирующего муцин-2 (*Muc2<sup>-/-</sup>*), при содержании в условиях SPF-вивария развивается хроническое воспаление кишечника, характеризующееся рядом морфологических нарушений. На гистологических срезах отмечаются отдельные очаги эрозии, увеличение длины ворсин. В собственной пластинке слизистой оболочки наблюдается устойчивая, но умеренная инфильтрация полиморфоядерными клетками, характерная для хронического воспаления.

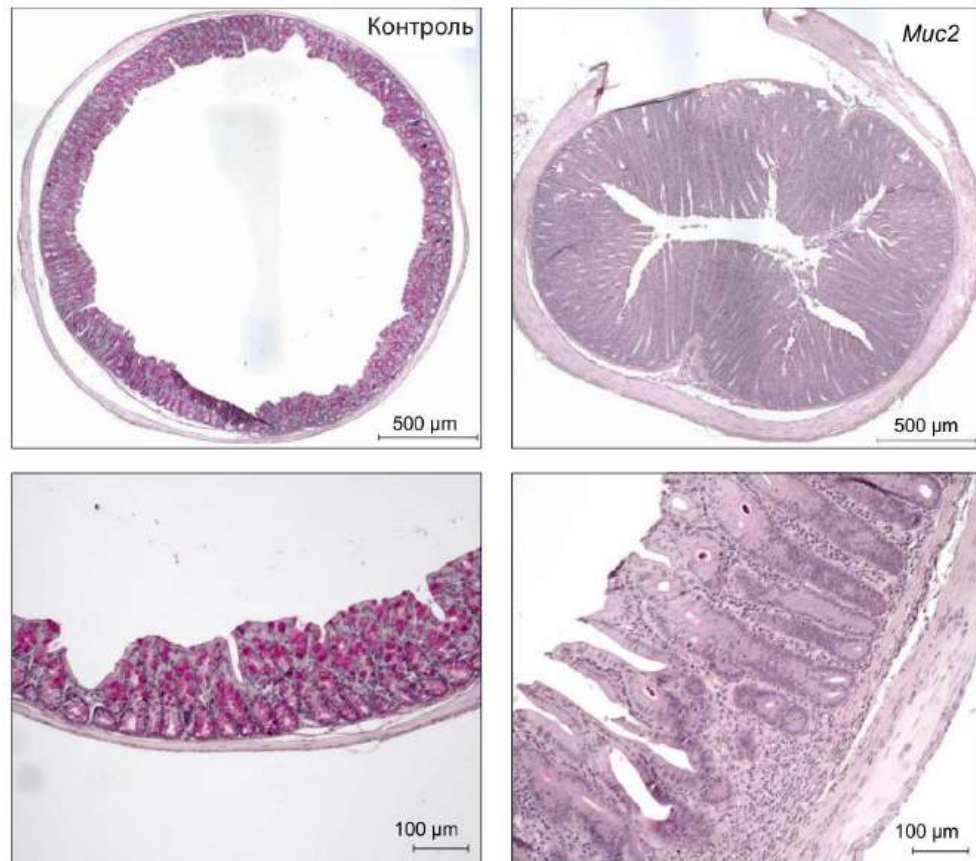
Гистологическое исследование выявило выраженное хроническое

воспаление толстой кишки у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> по сравнению с контрольными мышами линии C57BL/6 (Рисунок 4А). Бокаловидные клетки были лишены муцинового содержимого, что указывает на мутацию с потерей функции в гене *Muc2*. Крипты толстой кишки были достоверно длиннее у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> вследствие гиперпролиферации эпителиальных клеток (как для средней, так и для верхней трети крипты:  $Z = 1,96$ ,  $p = 0,0497$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Borisova *et al.*, 2020), поэтому показатель гиперплазии был выше у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> ( $Z = 2,80$ ,  $p = 0,005$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Рисунок 4Б). Инфильтрация полиморфноядерными клетками была значимо выше у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> по сравнению с C57BL/6 ( $Z = 2,28$ ,  $p = 0,022$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Рисунок 4Б). При этом явных отеков или изъязвлений не наблюдалось, и общая целостность эпителия толстой кишки была сохранена. Общий воспалительный индекс был выше у мышей с нокаутом гена *Muc2*, чем у мышей C57BL/6 ( $Z = 2,80$ ,  $p = 0,005$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Рисунок 4Б), что соответствует умеренному воспалению без явного повреждения тканей.

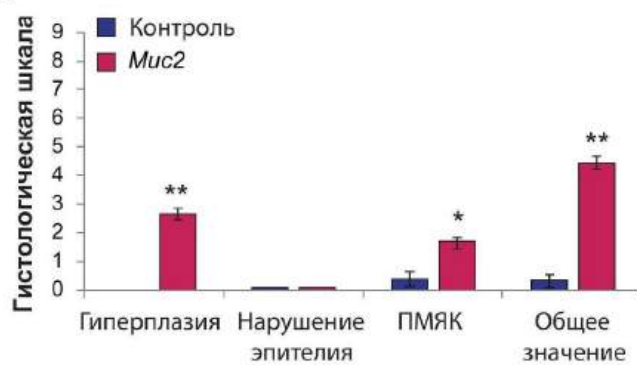
Клиническая оценка состояния животных дополнительно подтвердила полученные результаты. Общий внешний вид и активность мутантных мышей были удовлетворительными, однако мыши линии *Muc2*<sup>-/-</sup> теряли массу тела ( $Z = 3,31$ ,  $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Borisova *et al.*, 2020) и страдали от диареи ( $Z = 3,31$ ,  $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Рисунок 4В) без грубой примеси крови в стуле. Общий клинический индекс был достоверно выше у мутантов по сравнению с C57BL/6 ( $Z = 3,31$ ,  $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Borisova *et al.*, 2020), что указывает на клиническую релевантность модели.

Измерение содержания цитокинов в крови показало, что уровни многих медиаторов воспаления были повышены у мутантных мышей по сравнению с контролем. Провоспалительные цитокины IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF, IL-17 и MCP-1 были достоверно повышены у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> (IFN- $\gamma$ :  $Z = 2,10$ ,  $p = 0,036$ ; IL-1 $\beta$ :  $Z = 2,46$ ,  $p = 0,014$ ; TNF:  $Z = 2,65$ ,  $p = 0,008$ ; IL-17:  $Z = 2,46$ ,  $p = 0,014$ ; MCP-1:  $Z = 2,10$ ,  $p = 0,036$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Рисунок 4В). Одновременно были повышены и противовоспалительные цитокины или медиаторы, участвующие как в про-, так и в противовоспалительных реакциях (IL-3, IL-4, IL-10, IL-13).

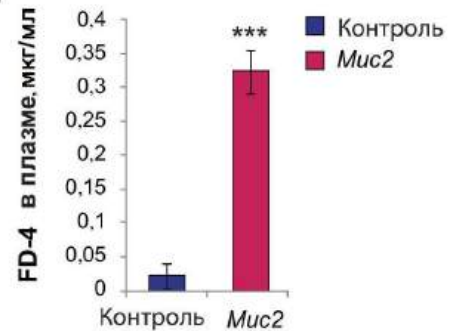
А



Б



Г



В

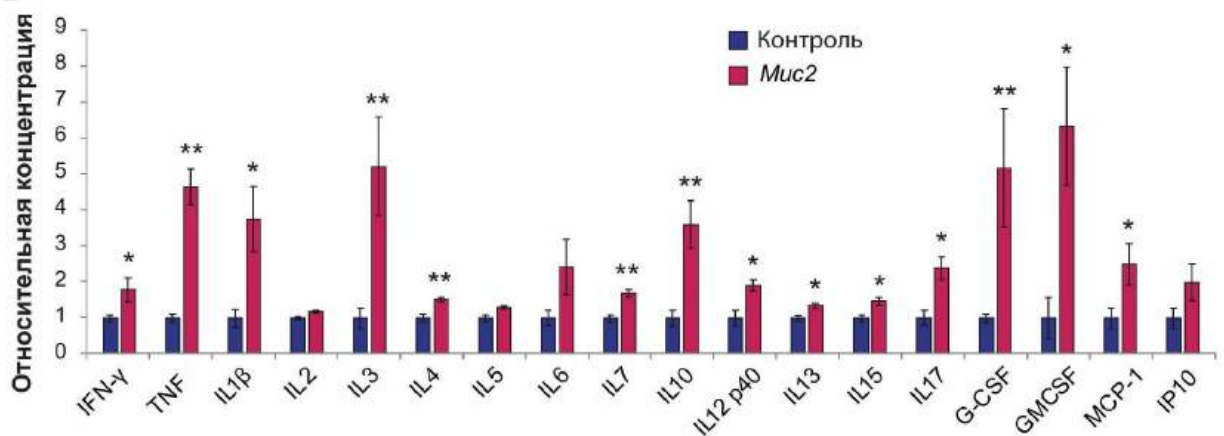
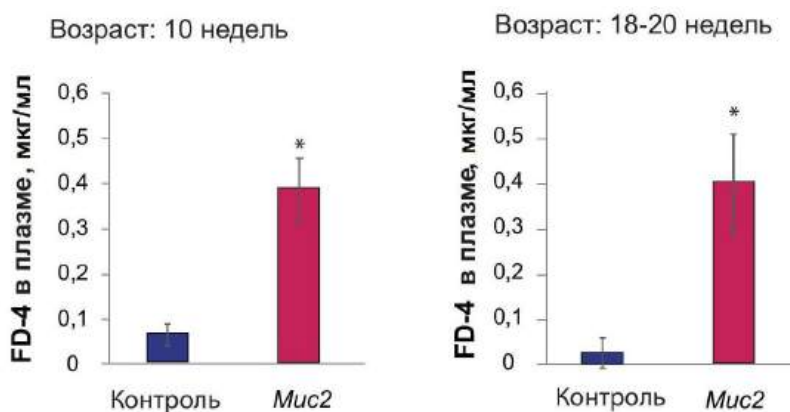


Рисунок 4. Нокаут гена *Muc2* как модель хронического воспаления кишечника и нарушения проницаемости кишечника. (А) Срезы толстой кишки, окрашенные ШИК-реакцией, у мышей линии C57BL/6 и *Muc2*<sup>-/-</sup>. (Б) Гистологическая оценка воспалительного ответа. \* $p < 0,05$ ,

\*\* $p < 0,01$  по сравнению с C57BL/6,  $U$ -тест Манна–Уитни. (В) Уровни цитокинов в толстой кишке. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  по сравнению с C57BL/6,  $U$ -тест Манна–Уитни. (Г) Кишечная проницаемость. \*\*\* $p < 0,001$  по сравнению с C57BL/6,  $t$ -критерий Стьюдента.

Цитокины G-CSF и GM-CSF, связанные с пролиферацией иммунных клеток, также были увеличены при нокауте *Muc2*. Отмечалось повышение уровней IL-7, IL-12p40 и IL-15, что в совокупности отражает активацию мукозальной иммунной системы в условиях хронического воспаления.



**Рисунок 5. Проницаемость кишечного барьера на модели мышей с нокаутом гена *Muc2*.** (А) Кишечная проницаемость. \* $p < 0,05$  по сравнению с C57BL/6,  $t$ -критерий Стьюдента.

Для оценки еще одного признака воспаления — повышенной проницаемости кишечного барьера — исследовали проникновение меченого флуоресцеина изотиоцианатом (Fluorescein isothiocyanate, FITC)-декстрана молекулярным весом 4 кДа, который в норме не проходит через эпителиальный барьер. После перорального введения FITC-декстрана его обнаруживали в плазме крови мышей *Muc2*<sup>-/-</sup>, но не у контрольных животных ( $t = 7,65$ ,  $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 4Г). Повышенная проницаемость для FITC-декстрана сохранялась как у 10-недельных ( $Z = 2,55$ ,  $p = 0,011$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Рисунок 5А), так и у 18–20-недельных мышей линии *Muc2*<sup>-/-</sup> ( $Z = 2,33$ ,  $p = 0,02$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Рисунок 5А).

Чтобы разделить вклад мутации в гене *Muc2* и возможных ассоциированных с ней изменений микробиоты, было проведено исследование проницаемости кишечника у однопометников дикого типа (*Muc2*<sup>+/+</sup>). Было выявлено, что в этой экспериментальной группе проницаемость не отличалась от таковой у мышей C57BL/6. Это показывает,

что изменения кишечной микробиоты не являются основной причиной повреждения эпителиального барьера (Borisova *et al.*, 2020).

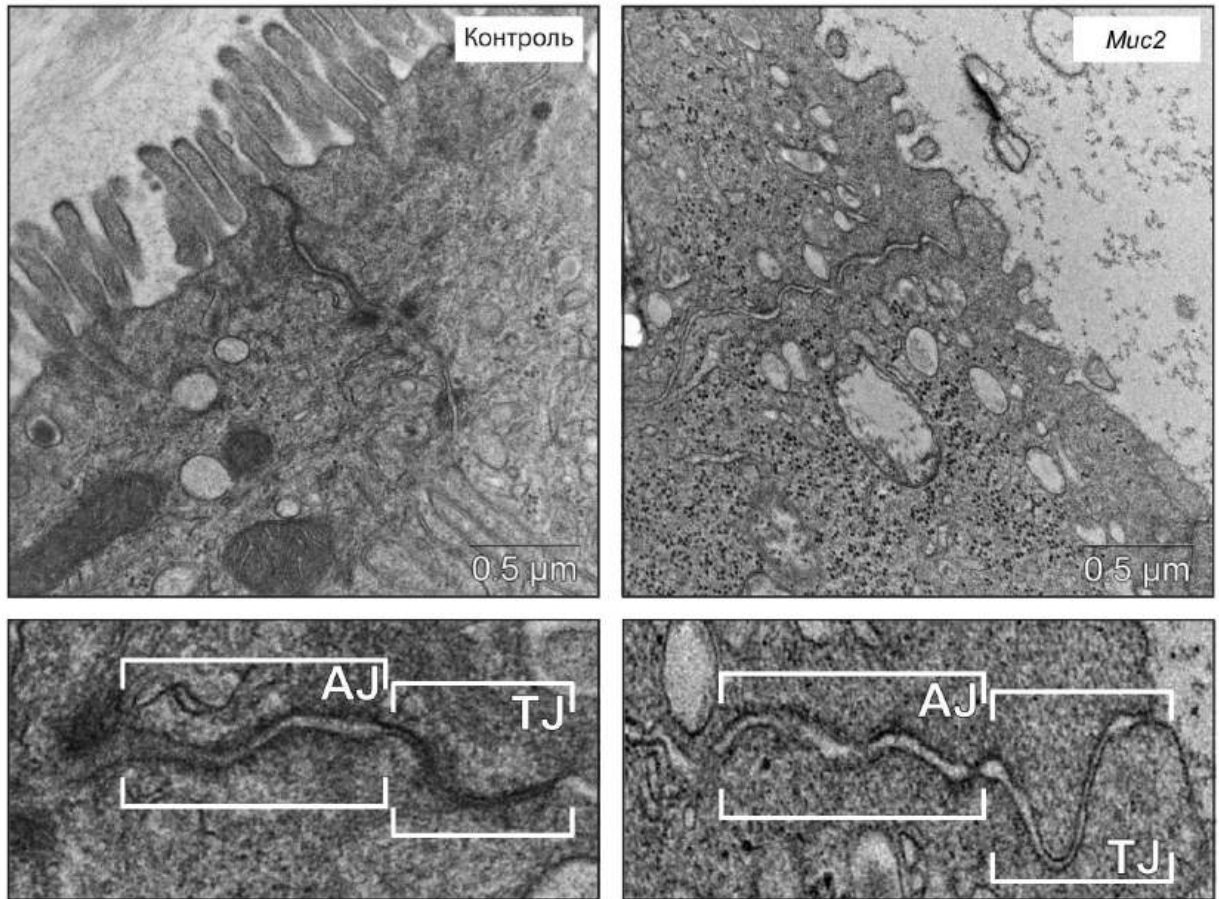
Таким образом, мыши линии *Muc2<sup>-/-</sup>* в условиях SPF представляют собой адекватную модель хронического воспаления с умеренной, но стойкой активацией мукозального иммунитета и повышенной парацеллюлярной проницаемостью при сохраненной общей целостности эпителия.

### 3.1.2 Нарушение межклеточных контактов

Учитывая противоречивые данные о кишечной проницаемости на модели мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>* в предыдущих исследованиях, была проведена оценка морфологических изменений в кишечном эпителии с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Ультраструктурный анализ кишечного эпителия выявил существенные морфологические дефекты, затрагивающие область апикального соединительного комплекса колоноцитов мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>*. Плотные контакты (ПК), которые обеспечивают запирающее межклеточное пространство и формируют избирательный барьер, нарушались в толстой кишке мутантных мышей. В исследуемой модели наблюдалось расширение межклеточного пространства в апикальной области клеток, что является прямым доказательством нарушения структуры ПК. Видимых повреждений тканей или разрывов в слое эпителиальных клеток не наблюдалось.

Детальный анализ ультраструктур выявил, что морфология ПК и адгезивных контактов (АК) была изменена у модельных животных (Рисунок 6А). В то время как у контрольных мышей ПК выглядели как плотно сомкнутые апикальные мембраны соседних клеток, у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* ПК были рыхлыми, с широкими промежутками между мембранами соседних клеток (Рисунок 6А). В некоторых случаях мембраны соседних клеток были полностью разомкнуты в апикальной части, или в пределах ПК обнаруживались пузырьвидные полости. АК также выглядели более широкими и с меньшей плотностью в межклеточных пространствах (Рисунок 6А). Морфометрический анализ подтвердил значимое увеличение ширины как ПК, так и АК в толстой кишке мышей генотипа *Muc2<sup>-/-</sup>* по сравнению с контролем (ПК:  $Z = 7,25$ ,  $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни; АК:  $t = 6,27$ ,  $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента).

A



Б

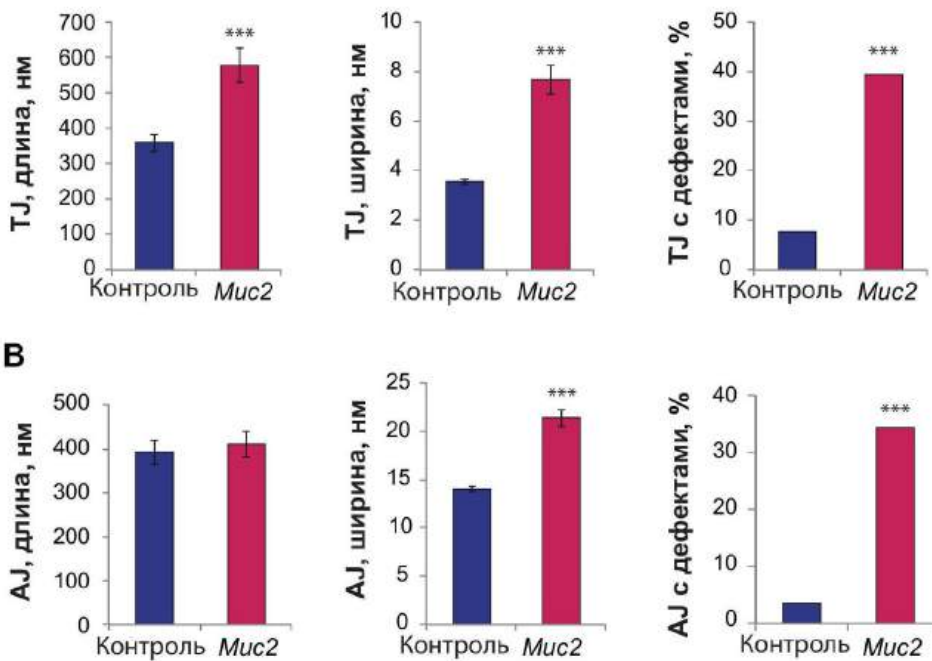


Рисунок 6. Структурные дефекты межклеточных контактов как причина повышенной проницаемости кишечника у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup>. Повышенная проницаемость кишечника является результатом нарушения структурной целостности плотных контактов. (А) Трансмиссионная электронная микроскопия эпителия толстой кишки мышей C57BL/6 и *Muc2*<sup>-/-</sup> с нарушенной морфологией плотных контактов (ПК, TJ) и адгезивных контактов (АК, AJ). (Б) Морфометрический

анализ плотных контактов (ТЖ): Длина ( $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни), ширина ( $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни) и процент дефектных плотных контактов ( $p < 0,001$ , тест  $\chi^2$ ). **(В)** Морфометрический анализ адгезивных контактов (АЖ): Длина, ширина ( $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента) и процент дефектных адгезивных контактов ( $p < 0,001$ , тест  $\chi^2$ ).

Процент дефектных ПК и АК (с разрывами, пузыревидными расширениями или асимметрией) также был существенно выше у мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>* ( $p < 0,001$ , критерий  $\chi^2$ ). При этом ПК у мутантных мышей были достоверно длиннее ( $Z = 3,62$ ,  $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни), что может отражать компенсаторные изменения архитектуры соединительного комплекса (Рисунок 6).

Нокаут гена *Muc2* оказывал значимое влияние на ультраструктуру десмосом. Количество десмосом на единицу длины латеральной клеточной мембраны было выше у мышей с мутацией *Muc2<sup>-/-</sup>*, однако увеличивалась и доля десмосом с дефектами (полудесмосомы, неполностью сформированные структуры). Межклеточные пространства в эпителии толстой кишки мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* были в среднем шире, чем у контрольных животных, причем более четверти измеренных межклеточных промежутков превышали 25 нм при среднем значении около 15 нм в контроле. Более того, было обнаружено, что межклеточные пространства в кишечном эпителии были достоверно шире у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* по сравнению с контролем, с частыми обширными расхождениями (Borisova *et al.*, 2020).

Поскольку ПК регулируют селективный парацеллюлярный транспорт веществ в зависимости от размера и заряда, выявленные структурные дефекты напрямую объясняют повышение кишечной проницаемости у животных *Muc2<sup>-/-</sup>*. Однако сопутствующие нарушения АК и десмосом указывает на более общий характер нарушений межклеточных контактов в эпителии мутантных мышей.

Несмотря на повышение уровней провоспалительных цитокинов, анализ экспрессии генов, кодирующих ключевые компоненты ПК и АК, не выявил существенных изменений по сравнению с контролем. Не изменялась и экспрессия генов матриксных металлопротеиназ *Mmp2* и *Mmp9*, а также гена *Ltc4* и ряда генов-мишеней  $\beta$ -катенин-зависимого пути (включая митохондриально кодируемые NADH-дегидрогеназы *Nd* и *Nd6*). Это указывает на то, что дисфункция барьера у мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>* обусловлена преимущественно посттранскрипционными механизмами и

структурными изменениями, а не снижением экспрессии генов, кодирующих барьерные белки (Рисунок 5Б) (Borisova *et al.*, 2020).

### 3.1.3 Структура микроворсинок и цитоскелет

Одним из ключевых структурных дефектов, выявленных с помощью ультраструктурного анализа, было нарушение морфологии щеточной каемки – микроворсинок. Актиновый цитоскелет обеспечивает форму и полярность клетки и служит платформой, к которой через адаптерные белки (ZO-1, эзрин) прикрепляются ПК и АК. Наряду с дефектами межклеточных контактов у мышей линии *Muc2*<sup>-/-</sup> наблюдалась выраженная дегградация щеточной каемки: в ряде областей кишечника структурно организованные микроворсинки практически отсутствовали. Тогда как у контрольных животных микроворсинки формировали регулярный, плотно организованный ряд.

Морфометрический анализ подтвердил, что у мышей с мутацией гена *Muc2* уменьшено количество микроворсинок на 1 мкм длины апикальной поверхности ( $Z = 6,30$ ,  $p < 0,001$ , *U*-тест Манна–Уитни) и увеличено среднее расстояние между соседними микроворсинками ( $Z = 7,27$ ,  $p < 0,001$ ). Там, где микроворсинки сохранялись, их длина была достоверно меньше, чем в контроле ( $t = 9,30$ ,  $p < 0,001$ , *t*-критерий Стьюдента).

Актиновые филаменты, формирующие стержень микроворсинки, были глубже погружены в цитоплазму, и длина корневого участка превышала длину надмембранной части микроворсинки. Отношение длины корешка к длине микроворсинки было существенно выше у мышей с мутацией ( $t = 8,02$ ,  $p < 0,001$ , Рисунок 7).

На молекулярном уровне эти изменения отражают нарушение динамики актина — дисбаланс между полимеризацией глобулярного актина (G-актин) в филаментный (F-актин), который формирует пучки микроворсинок. Динамика F-актина контролируется актин-связывающими белками, такими как виллин (Villin), организующий пучки, и эзрин (Ezrin), опосредующий связь актиновых филаментов с апикальной мембраной. Дестабилизация F-актинового цитоскелета приводит к потере механической опоры для ПК и АК и, как следствие, к их делокализации и повышению проницаемости.

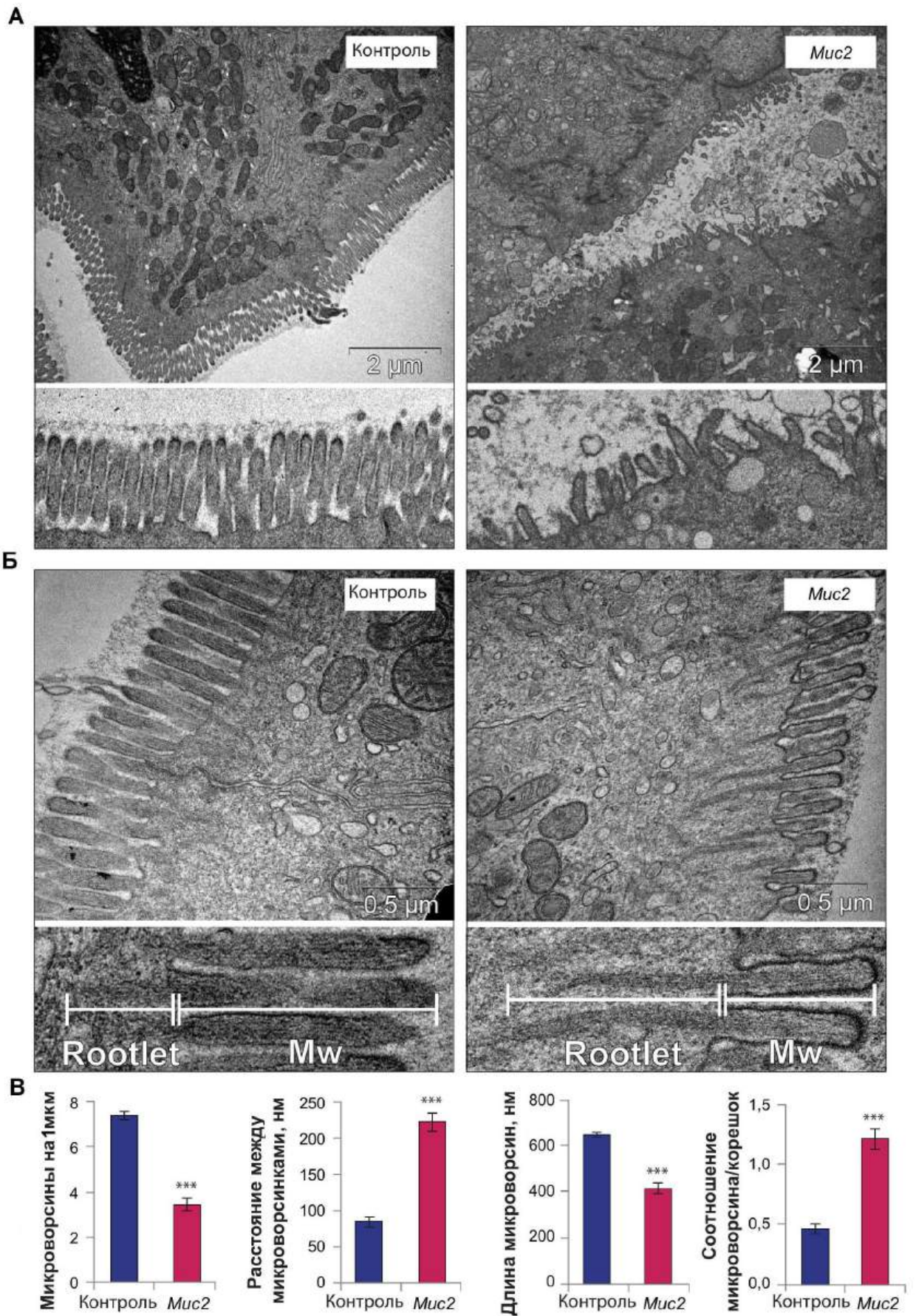


Рисунок 7. Дефектные микроворсинки при нокауте гена *Muc2*. (А) Просвечивающая электронная микроскопия кишки мышей линий C57Bl/6 и *Muc2*. (Б) Детальный вид структуры

микроворсинок (Mw). (В) Морфометрический анализ: количество микроворсинок на 1 мкм клеточной поверхности ( $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни), расстояние между микроворсинками ( $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни), длина микроворсинки ( $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента), отношение длины корешка к длине микроворсинки ( $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента). Rootlet - корешок, Mw - микроворсинка.

### 3.1.4 Нарушение структуры и функции митохондрий при хроническом колите

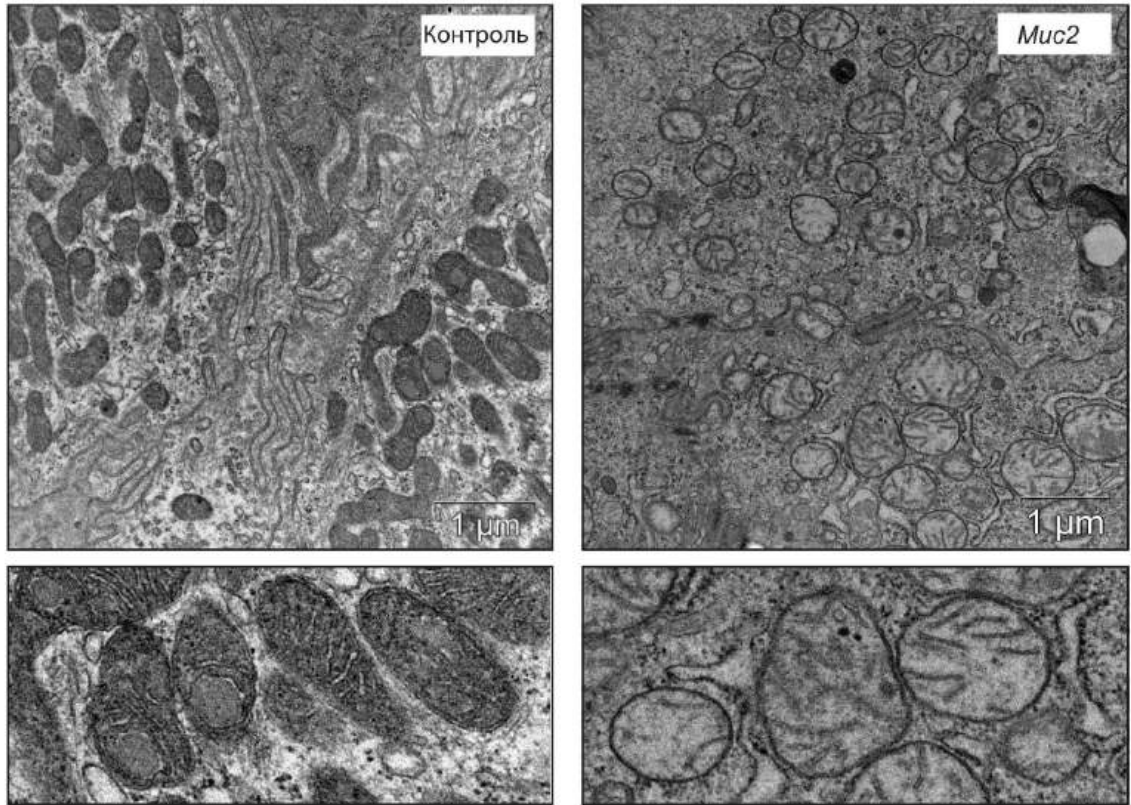
Митохондрии также демонстрировали выраженные ультраструктурные нарушения (Рисунок 6А) на фоне хронического колита у животных группы *Muc2<sup>-/-</sup>*. В частности, были отмечены увеличение их объема, нарушение организации матрикса и фрагментация крист.

Морфометрический анализ показал уменьшение числа митохондрий на клетку в кишечном эпителии мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* ( $t = 2,23$ ,  $p = 0,03$ ,  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 8А). Митохондрии в ткани кишки мутантных животных содержали меньше крист по сравнению с контролем ( $t = 10,28$ ,  $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 8Б), и «пустые» митохондрии обнаруживались чаще у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* ( $Z = 6,02$ ,  $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Рисунок 8Б). Повреждение митохондрий сопровождалось существенным снижением содержания АТФ в толстой кишке ( $t = 8,88$ ,  $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 8В), что свидетельствует о митохондриальной дисфункции при нокауте гена *Muc2*.

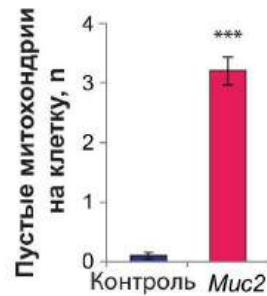
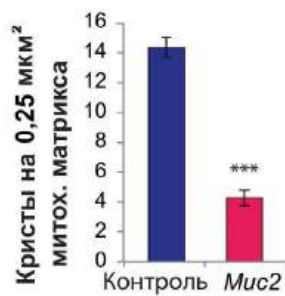
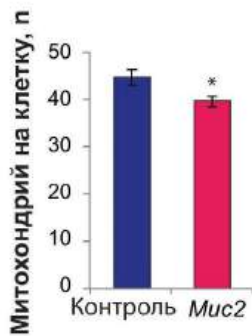
Морфологические дефекты митохондрий были функционально подтверждены с помощью анализа скорости потребления кислорода (СПК) в изолированных криптах толстой кишки на анализаторе Seahorse (Agilent). Протокол включал последовательное введение олигомицина, FCCP и смеси ротенона с антимицином А, что позволило оценить базальное дыхание, СПК, связанную с синтезом АТФ, утечку протонов, максимальное и немитохондриальное дыхание. СПК была на грани статистически достоверного снижения в криптах, полученных из толстой кишки мышей *Muc2<sup>-/-</sup>*, по сравнению с контролем ( $Z = 1,96$ ,  $p = 0,049$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Рисунок 8Г).

Для оценки резервной дыхательной мощности использовали описанный ранее 2,4-динитрофенол (dinitrophenol, DNP), разобщающий процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях.

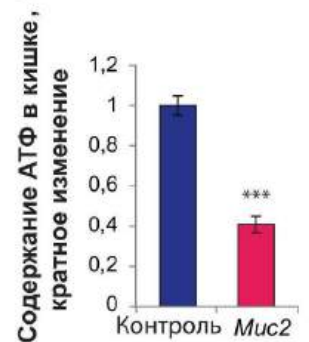
А



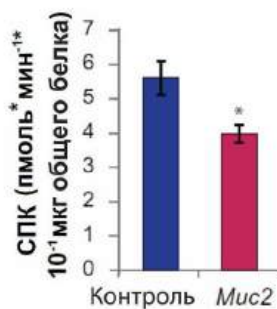
Б



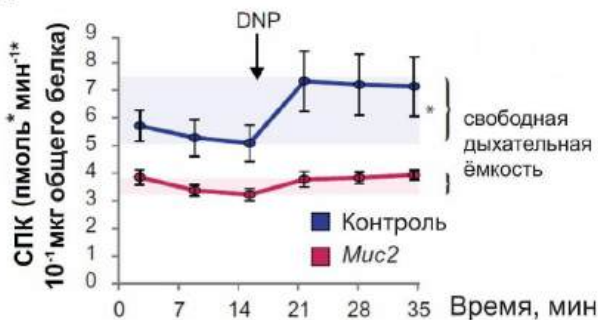
В



Г



Д



Е

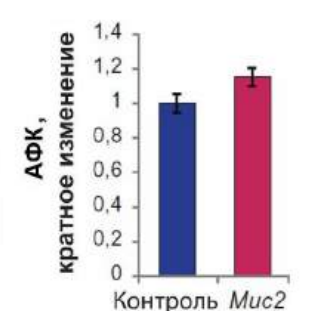


Рисунок 8. Повреждение митохондрий и снижение содержания АТФ в толстой кишке при нокауте гена *Muc2*. (А) Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ) митохондрий в эпителии толстой кишки мышей C57BL/6 и *Muc2*<sup>-/-</sup>. (Б) Морфометрический анализ: количество митохондрий на клетку ( $p < 0,05$ , по сравнению с C57BL/6,  $t$ -критерий Стьюдента), количество крист на  $0,25 \mu\text{м}^2$  митохондриального матрикса ( $p < 0,001$ , по сравнению с C57BL/6,  $t$ -критерий Стьюдента), количество пустых митохондрий на клетку ( $p < 0,001$ , по сравнению с C57BL/6,  $U$ -тест

Манна–Уитни). (В) Уровень АТФ в толстой кишке ( $p < 0,001$ , по сравнению с C57BL/6,  $t$ -критерий Стьюдента). (Г) Базальная СПК в митохондриях изолированных крипт толстой кишки ( $p < 0,05$ , по сравнению с C57BL/6,  $U$ -тест Манна–Уитни). (Д) Запасная дыхательная емкость, определенная при добавлении DNP изолированных крипт толстой кишки ( $p < 0,05$  для C57BL/6, тест Фридмана). (Е) Образование АФК в изолированных криптах толстой кишки.

В криптах, полученных из толстой кишки мышей C57BL/6, увеличивалась СПК в ответ на воздействие DNP, что соответствует нормальной работе электронной транспортной цепи ( $\chi^2(5) = 12,9$ ,  $p = 0,024$ , тест Фридмана, Рисунок 8Д). В криптах толстой кишки мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> увеличение СПК не отмечалось, что указывает на потерю дыхательного резерва. Окрашивание крипт чувствительным к АФК красителем CellROX не выявило значимых различий в продукции активных форм кислорода между группами, что говорит в пользу первичной энергетической дисфункции, а не нарушения митохондрий в результате окислительного стресса (Рисунок 8Е).

Для выявления причинно-следственной связи между митохондриальной дисфункцией и нарушением барьера, в питье интактных мышей C57BL/6 вводили DNP в качестве митохондриального разобщителя. После 24 часов приема DNP происходило повышение кишечной проницаемости для FITC-декстрана по сравнению с контролем *in vivo* ( $t = 2,80$ ,  $p = 0,019$ ,  $t$ -критерий Стьюдента). Содержание АТФ в ткани кишечника при этом имело тенденцию к снижению, однако статистически значимых различий выявлено не было.

Результаты этой части главы показывают, что при хроническом колите на модельной линии *Muc2*<sup>-/-</sup> структурные нарушения барьера включают нарушение структуры и функции межклеточных контактов, деградацию щеточной каемки и выраженную митохондриальную дисфункцию, приводящую к энергетическому дефициту в эпителии.

### 3.2 Системно-биологический подход к поиску генов-регуляторов цитоскелета

Анализ с помощью трансмиссионной электронной микроскопии показал, что ультраструктурные изменения архитектуры микроворсинок и организации актинового цитоскелета имеют существенное сходство в кишечном эпителии как пациентов с ВЗК, так и мышей с нокаутом гена

*Мис2* (Рисунок 9).

Для того чтобы оценить структуру микроворсинок в эпителии кишечника людей с диагнозом ВЗК был проведен пилотный эксперимент, в котором использовали биоптаты толстой и подвздошной кишки трех пациентов с диагнозом «язвенный колит». Поскольку ЯК затрагивает толстую кишку, образец тонкой кишки служил внутренним контролем общего состояния кишечника и качества образца. В качестве условно здорового контроля были взяты биоптаты толстой кишки двух людей без анамнеза ВЗК. Поскольку морфология эпителия толстой и тонкой кишки имеет ряд отличий, количественное сравнение ультраструктуры толстой кишки пациентов с ЯК разумно проводить с аналогичным отделом кишки условно здоровых людей. Выбранное количество пациентов является адекватным для пилотного эксперимента с использованием столь трудоемкого метода как ТЭМ, учитывая большое число индивидуальных клеток, которые используются для количественного обсчета. Следует отметить, что такой подход позволяет оценить гетерогенность клеточных изменений при воспалении. Также нужно учесть, что в литературе пока нет систематического анализа ультраструктуры эпителия кишечника на выборках пациентов с ВЗК, поэтому предложенная схема эксперимента позволяет получить новые данные, которые имеют ценность для современной гастроэнтерологии.

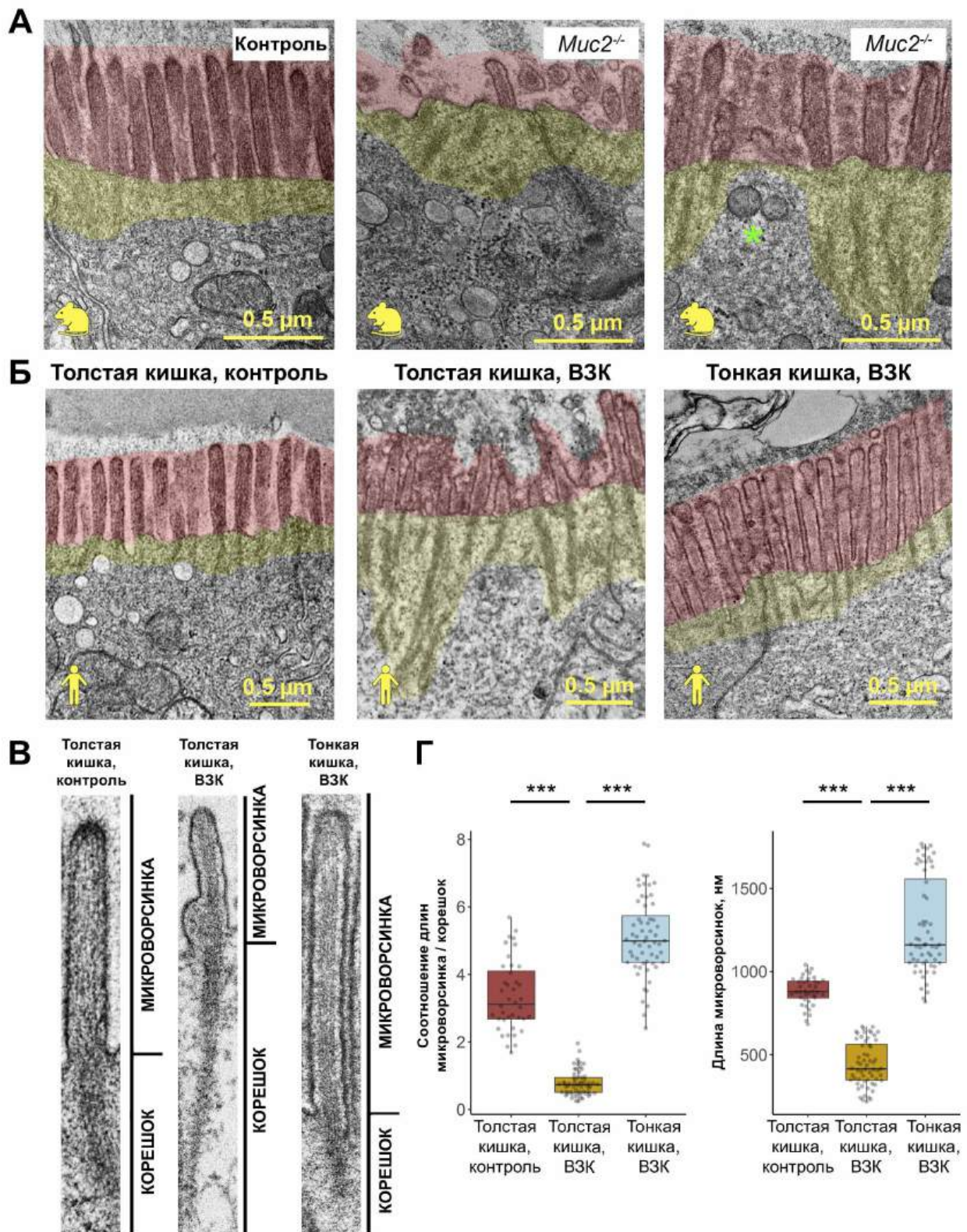
Сравнение структуры микроворсинок эпителия в толстой и подвздошной кишке людей в пилотном эксперименте выявил статистически значимые различия между группами. Для показателя «отношение длины микроворсинки к длине корешка» и длины микроворсинок были проведены попарные сравнения с использованием непараметрического *U*-теста Манна–Уитни с последующей поправкой на множественные сравнения по методу Бенджамини–Хохберга. При сравнении толстой кишки в контрольной группе с толстой кишкой в группе ВЗК по соотношению длин микроворсинок и их корешков выявлено высокодостоверное различие ( $n = 45 - 50$  полей зрения,  $Z = -8,41$ ,  $p < 0,001$ ). Различия между толстой кишкой в контроле и подвздошной кишкой у пациентов с ВЗК по этому параметру также оказались статистически значимыми ( $n = 45 - 50$  полей зрения,  $Z = 6,13$ ,  $p < 0,001$ ). Наиболее выраженные изменения наблюдались

при сравнении толстой и подвздошной кишки у пациентов с ВЗК ( $n = 45 - 50$  полей зрения,  $Z = 9,44$ ,  $p < 0,001$ ), что указывает на значительное укорочение функциональной части микроворсинок в толстой кишке при ЯК и «проваливанию» их основы из филаментного актина в цитоплазму.

Сходная картина отмечена и для абсолютной длины микроворсинок. При сравнении толстой кишки в контрольной группе с толстой кишкой в группе ВЗК выявлено высокодостоверное различие ( $n = 45 - 50$  полей зрения,  $Z = -8,44$ ,  $p < 0,001$ ). Между толстой кишкой в контроле и подвздошной кишкой у пациентов с ВЗК также получены достоверные различия ( $n = 45 - 50$  полей зрения,  $Z = 7,47$ ,  $p < 0,001$ ). Наиболее выраженные изменения наблюдались при сравнении толстой и подвздошной кишки у пациентов с ВЗК ( $n = 45 - 50$  полей зрения,  $Z = 9,44$ ,  $p < 0,001$ ), что свидетельствует о значительном укорочении микроворсинок в толстой кишке при ЯК и нарушении их цитоскелетной поддержки.

Таким образом, результаты пилотного эксперимента показали, что оба изученных параметра микроворсинок — отношение длины микроворсинки к длине корешка и абсолютная длина — значимо изменяются при воспалительных заболеваниях кишечника, причем наиболее выраженные отличия зарегистрированы между пораженными сегментами толстой и подвздошной кишки. Все эти особенности указывают на стойкое повреждение структуры терминальной сети, вызванное хроническим воспалением.

Как было описано выше, у родственников лиц с диагнозом БК повышен генетический риск развития ВЗК. Крупномасштабные полногеномные ассоциативные исследования выявили более 240 генетических локусов, ассоциированных с ВЗК. Большинство этих генов связано с высоким риском развития ВЗК, однако они объясняют лишь небольшую часть вариабельности восприимчивости к ЯК и БК. Поскольку ВЗК является сложным полигенным заболеванием, кумулятивный эффект множественных генетических факторов играет более значительную роль в общей предрасположенности к болезни, чем наличие отдельных аллелей повышенного риска развития ВЗК.



**Рисунок 9.** Ультраструктурный анализ щеточной каемки в толстой кишке мышей с дефицитом *Muc2* ( $n=2$ ) и в биоптатах толстой и тонкой кишки пациентов с ВЗК ( $n=3$ ) и людей без истории ВЗК ( $n=2$ ). В качестве контроля исследовали толстую кишку мышей дикого типа. Для оценки ультраструктуры эпителия пациентов использовали биоптаты тонкой (подвздошной) и толстой кишки пациентов с ВЗК и биоптаты толстой кишки людей без анамнеза ВЗК. Органеллы, проникающие в область терминальной сети, отмечены зеленой звездочкой. Микроворсинки и их корневые участки (корешки) выделены красным и желтым цветами соответственно. **(А)** Репрезентативные изображения ультраструктурного анализа кишки мышей. **(Б)** Репрезентативные изображения ультраструктурного анализа кишки пациентов. **(В)** Изображения микроворсинок и их

корешков. (Г) Количественный анализ соотношения длин микроворсинок к длинам корешков и оценка длины микроворсинок в нм. \*\*\* $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна-Уитни.

Учитывая сходные ультраструктурные нарушения на фоне хронического воспаления кишечника у пациентов с ВЗК и модельных животных, представляет интерес поиск генов, которые могут регулировать это проявление колита на клеточном уровне. Для решения этой задачи можно использовать транскриптомный анализ, который широко используется для выявления новых генов-мишеней и понимания патогенеза ВЗК. Однако среднее число генов, обнаруживаемых с помощью анализа дифференциальной экспрессии, достигает сотен или тысяч. Учитывая число дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), выявление наиболее релевантных генов-регуляторов отдельных процессов и потенциальных мишеней для терапии ВЗК представляет отдельную задачу.

Для оценки генетической регуляции ВЗК целесообразно проводить поиск генов-кандидатов на основе их потенциальной регуляторной роли. Для оценки функциональной значимости отдельных генов активно используется анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов (Weighted Gene Coexpression Network Analysis, WGCNA) (Langfelder and Horvath, 2008). WGCNA оценивает парные корреляции между транскриптами генов и использует эту информацию для определения взаимосвязей между генами, группируя их в модули коэкспрессии. Гены, наиболее тесно связанные с другими генами внутри модуля, рассматриваются как потенциальные регуляторы (хаб-гены). Эти хаб-гены могут быть в дальнейшем использованы для оценки их взаимодействий с остальными генами и предсказания иерархии регуляции генов с помощью байесовской сети (Agrahari *et al.*, 2018).

### **3.2.1 Применение байесовской сети для выявления ключевых генов-регуляторов цитоскелета**

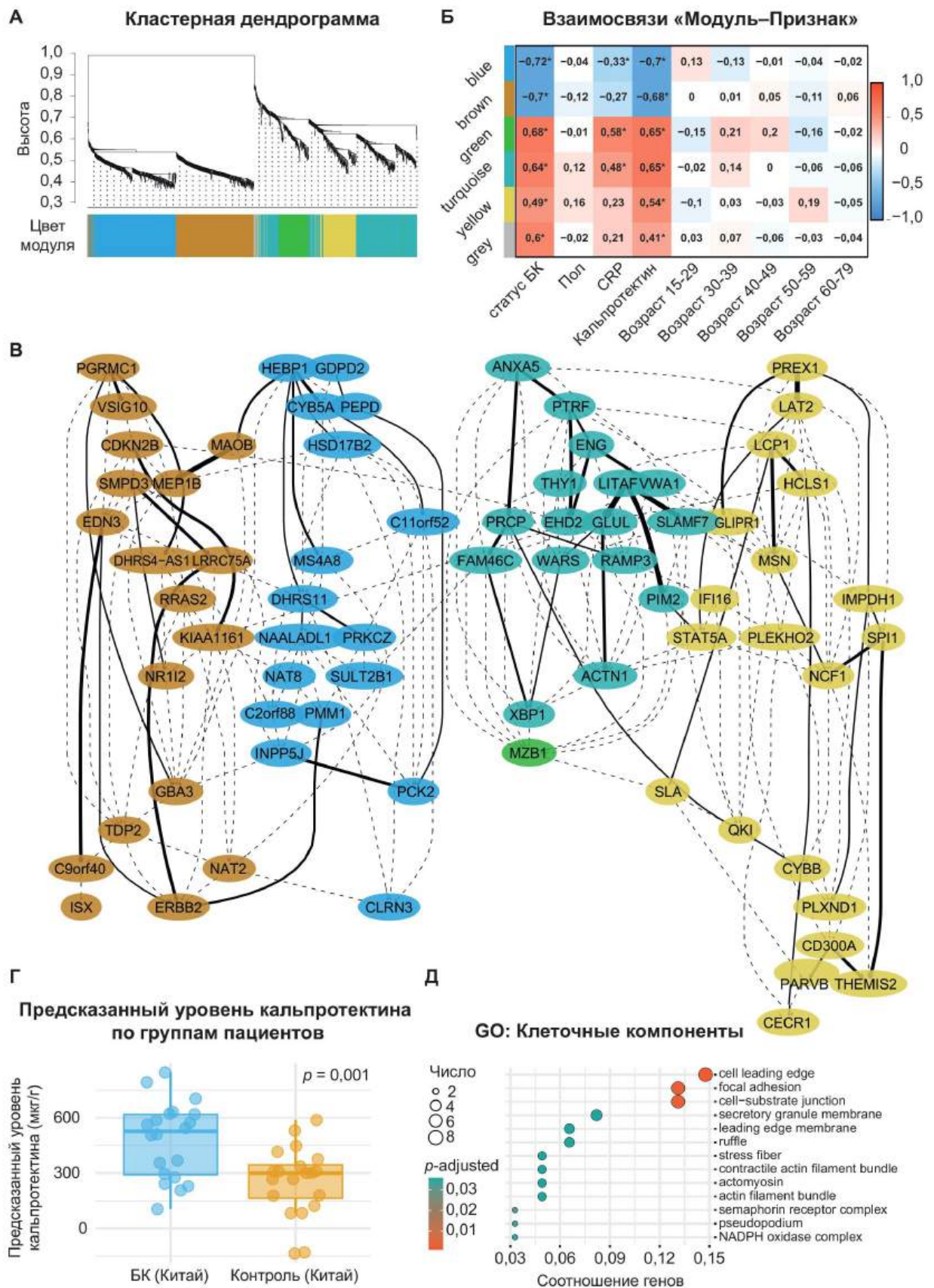
В качестве второго шага, позволяющего предсказывать взаимосвязи между генами, была использована байесовская сеть (БС). Это вероятностная графическая модель, которая представляет отношения между переменными с использованием направленного ациклического графа (Puga *et al.*, 2015). Таким образом, хаб-гены, выявленные в WGCNA, можно использовать в качестве узлов БС, ребра графа представляют собой ассоциации между

ними, а вектор ребер показывает направление регуляции. Такой подход был успешно использован ранее для классификации гематологических злокачественных новообразований (Agrahari *et al.*, 2018).

Для построения регуляторной сети использовали открытые транскриптомные и метаболомные данные пациентов с БК, поскольку на момент проведения исследований только в этой работе был представлен не только анализ экспрессии генов, но и метаболический профиль фекалий (Braun *et al.*, 2024). Автору не удалось найти открытые данные, совмещающие в себе и транскриптомный, и метаболомный анализ, выполненные в биоптатах кишечника от одних и тех же пациентов, что было необходимо для построения БС. Тем не менее, представляло интерес проанализировать потенциальную роль метаболитов в составе БС. В связи с этим предпочтение было отдано работе, которая, при отсутствии полного транскриптомного и метаболомного профиля биоптатов, содержала по крайней мере метаболомные данные, полученные из материала фекалий.

Когорта включала 42 участника из Израиля: 17 пациентов с диагностированной БК и 25 здоровых контролей. Для каждого пациента были доступны данные экспрессии 199 169 транскриптов из подвздошной кишки, концентрации 405 метаболитов в фекалиях и 5 клинических параметров (статус заболевания, пол, возраст, уровень С-реактивного белка (C-reactive protein, CRP) в крови и уровень кальпротектина в фекалиях). Также в этой работе были представлены данные для 40 участников из Китая: 20 пациентов с диагностированной БК и 20 здоровых контролей. Эти данные были использованы для оценки предсказательной силы БС, поэтому они не были взяты в анализ для ее построения.

Анализ экспрессии выявил 1117 ДЭГ и 5 дифференциально представленных метаболитов. Затем ДЭГ были разделены на 6 модулей коэкспрессии с помощью метода WGCNA, и каждый модуль был скоррелирован с метаданными (Рисунок 10А). Все модули коррелировали с уровнями кальпротектина и статусом БК, в то время как только синий, зеленый и бирюзовый модули коррелировали с CRP (Рисунок 10Б). Идентификация топ-20 наиболее важных хаб-генов в каждом модуле на основе комбинированного показателя значимости, рассчитанного в ходе WGCNA, позволила отобрать гены-кандидаты для БС.



**Рисунок 10.** Построение и валидация байесовской сети (БС) на основе мультиомиксных данных в когорте пациентов с болезнью Крона (БК). (А) Кластерная дендрограмма, показывающая идентификацию модулей генов с помощью WGCNA. (Б) Взаимосвязи «модуль–признак». Теплокарта показывает коэффициенты корреляции Пирсона между собственными генами модулей и клиническими признаками. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . (В) Финальная байесовская сеть. Сеть

построена с использованием 81 гена и демонстрирует иерархическую модульную структуру. Более толстые линии обозначают более сильные связи, пунктирные линии — более слабые взаимодействия. (Г) Предсказанные уровни кальпротектина, полученные с применением модели БС к транскриптомным данным независимой когорты пациентов ( $n = 20$  БК,  $n = 20$  контроль), были достоверно повышены у пациентов с БК ( $p = 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента). (Д) GO-анализ генов, идентифицированных в БС, по аннотации клеточных компонентов.

Серый модуль, содержащий всего 24 гена, в дальнейший анализ не включался, так как не позволил выявить хаб-гены. Гены иммуноглобулинов, составляющие зеленый модуль, были исключены из итогового списка генов, так как не являются ключевыми регуляторными компонентами сети, и их сложно рассматривать в качестве потенциальных мишеней для создания нового класса терапевтических препаратов. Таким образом, в итоговом списке из зеленого модуля остался только один ген — *MZB1*. Итого для построения БС был использован 81 ген (Рисунок 10В). К сожалению, ни один из метаболитов не сформировал значимых связей внутри сети, поэтому они были исключены из нее.

В итоговой БС была выявлена выраженная модульная структура, где узлы группировались в соответствии с их исходными модулями коэкспрессии генов. Такая организация отражает высокую корреляцию профилей экспрессии внутри каждого модуля. Сеть была организована иерархически в четыре основных кластера. Каждый кластер был структурирован в 9–12 слоев, с главным регуляторным геном в апикальном узле. Кроме того, анализ выявил регуляторные связи, соединяющие гены из разных модулей. Сеть предсказала четыре главных регуляторных узла: ген *PGRMC1* (коричневый модуль), ген *HEBP1* (синий модуль), ген *ANXA5* (бирюзовый модуль) и ген *PREX1* (желтый модуль), потенциально контролирующих большую часть сети.

Чтобы исследовать предсказательную силу сети, кальпротектин был включен в БС в качестве ключевого клинического биомаркера, отражающего тяжесть кишечного воспаления. БС выявила один родительский узел для кальпротектина — ген *ISX*, который, в свою очередь, был связан со всей сетью через ген с неизвестной функцией *C9orf40* из коричневого модуля. Затем была построена предсказательная модель на основе этой сети, чтобы оценить способность БС предсказывать кальпротектин как числовой фактор. У израильских пациентов, которые использовались в качестве обучающей выборки в модели на основе

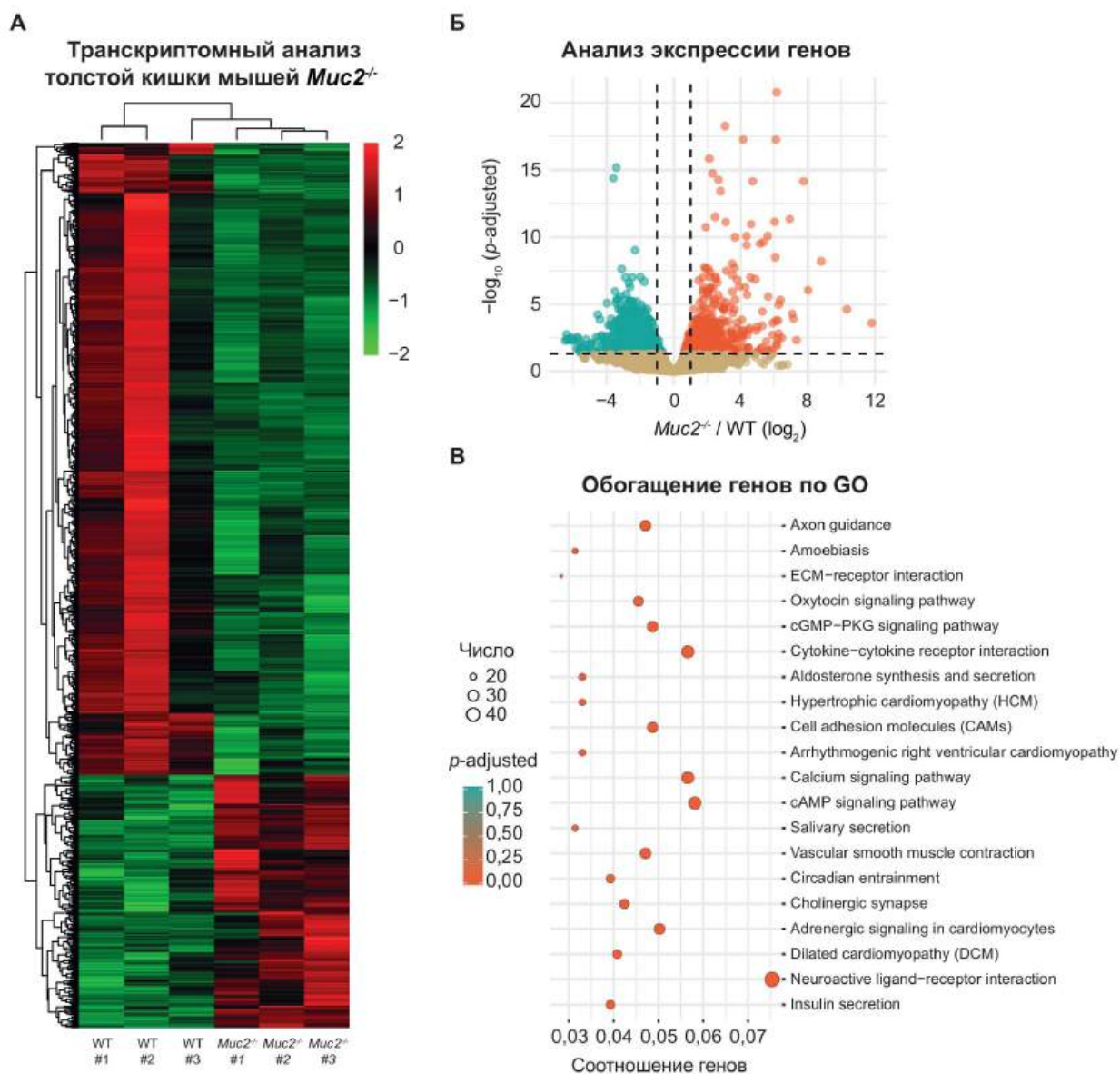
БС, транскриптомы объясняют приблизительно 63% вариабельности кальпротектина (фактический *vs* предсказанный кальпротектин,  $r = 0,793$ ,  $p < 0,001$ , корреляция Пирсона). Затем были использованы данные экспрессии генов пациентов из Китая из этого же исследования (Braun *et al.*, 2024) в качестве тестового набора данных для предсказания уровня кальпротектина с помощью полученной модели. Поскольку в исходном наборе данных для китайской выборки не было предоставлено клинических данных по кальпротектину, предсказанные значения были разделены по группам пациентов для проверки статистической разницы между ними. Модель на основе БС выявила значимое повышение уровня кальпротектина в группе пациентов по сравнению с контрольной выборкой (по 20 человек в каждой группе, БК *vs* контроль,  $t = 3,55$ ,  $p = 0,001$ , критерий Стьюдента, Рисунок 10Г). Этот результат показывает, что предсказательная модель на основе БС позволяет прогнозировать важный клинический параметр — уровень кальпротектина, что свидетельствует о ее биологической релевантности.

### 3.2.2 Общие целевые гены для пациентов с БК и мышей линии *Muc2*

Затем был проведен анализ онтологии (gene ontology, GO) для списка генов, выявленных БС в качестве узлов с сильными связями (вероятность наличия связи более 0,7 после применения бутстрэпа). Интересно, что большинство идентифицированных GO-групп были связаны с биологическими процессами, вовлекающими актиновый цитоскелет и клеточные структуры, ассоциированные с ним (Рисунок 10Е). Для оценки значимости полученных аннотаций в контексте структурных изменений микроворсинок при хроническом воспалении была использована мышьяная модель колита с нокаутом гена *Muc2*.

Транскриптомный анализ профиля экспрессии генов в толстой кишке мышей линии *Muc2*<sup>-/-</sup> выявил более тысячи ДЭГ (Рисунок 11А, 11Б). Затем была проведена идентификация генов, изменения экспрессии которых совпадают с изменениями генов-мишеней, обнаруженных с помощью БС. Данные по экспрессии мышьяных генов были напрямую использованы для GO-анализа в виде полного списка ДЭГ без дополнительного предварительного отбора, что не выявило специфических групп, связанных

с цитоскелетом (Рисунок 11В).



**Рисунок 11. Идентификация дифференциально экспрессирующихся генов в дистальном отделе толстой кишки мышей с нокаутом гена *Muc2*.** (А) Кластерная тепловая карта, показывающая ДЭГ в отдельных биологических повторах. (Б) Вулкан-плот, показывающий усредненные ДЭГ для каждой группы ( $n = 3$  на группу, разница рассчитана с помощью программного пакета DESeq2 с использованием отрицательной биномиальной обобщенной линейной модели и скорректирована с помощью FDR). (В) Анализ обогащения онтологий генов (gene ontology, GO) для полного списка дифференциально экспрессирующихся генов.

Затем была исследована экспрессия мышечных ортологов генов человека, которые относились к группам GO, связанным с цитоскелетом (Рисунок 10Д). Был обнаружен только один ген — *PREX1*, — экспрессия которого сонаправленно изменялась как у пациентов с БК, так и в мышечной модели *Muc2*<sup>-/-</sup>. *PREX1* является ключевым регулятором в сигнальном пути Rho, который модулирует как воспаление, так и динамику актина, и одним

из главных регуляторных узлов в полученной БС. Таким образом, его можно считать основной потенциальной мишенью для контроля структуры микроворсинок и целостности эпителия при хроническом колите, которую удалось выявить в данном исследовании.

Деградация щеточной каемки ассоциирована с рядом желудочно-кишечных патологий. Ультраструктурный анализ биоптатов кишечника пациентов с целиакией и образцов педиатрических ВЗК выявил укорочение и снижение плотности микроворсинок, деструкцию корневых участков и терминальной сети, что воспроизводится в экспериментальных моделях колита (например, индуцированного DSS) (Delacour *et al.*, 2016; Iancu и Manov, 2010; Rostami и Villanacci, 2009; Negroni *et al.*, 2012; Xiang *et al.*, 2021; Nascimento da Silva *et al.*, 2023). Эти данные указывают на то, что воспалительная среда индуцирует значительные изменения архитектуры щеточной каемки.

В данном исследовании описан сходный ультраструктурный фенотип кишечного эпителия как в модели *Muc2* КО, так и у пациентов с ВЗК. Аналогичное расширение терминальной сети ранее было описано при нокауте гена, кодирующего белок нуклеации актина *Cobl* и гена, кодирующего белок мембранного ремоделирования *PASCIN2*, что ведет к нарушению связи кортикального актина с корешками микроворсинок (Beer *et al.*, 2020; Grega-Larson *et al.*, 2015; Kessels & Qualmann, 2002; Postema *et al.*, 2019). Нокаут гена, кодирующего малую ГТФазу *Rab11a*, также вызывает сходные изменения (Feng *et al.*, 2017).

Приведенный в данном исследовании транскриптомный анализ выявил *PREX1* в качестве гена-кандидата, ассоциированного с ремоделированием щеточной каемки. Ген *PREX1* является фактором обмена гуаниновых нуклеотидов для ГТФаз семейства Ras (Ras-related Activated Channel substrate), регулирующих динамику актина. *PREX1* активирует RAC1, который, в свою очередь, индуцирует дефосфорилирование белков семейства ERM (эзрин/радиксин/мозин), приводя к разборке микроворсинок (Nijhara *et al.*, 2004). Активность RAC1 повышена при колите, а ее ингибирование ослабляет повреждение эпителия (Lin *et al.*, 2025). Вероятно, повышение уровня экспрессии гена *PREX1* при ВЗК может вести к гиперактивации RAC1 и дестабилизации кортикального

актина, что в итоге вызывает укорочение микроворсинок (Postema *et al.*, 2019). При этом полное подавление Rac1 также нарушает целостность эпителия (Martínez-Sánchez *et al.*, 2023), что подчеркивает важность баланса его активности.

Кроме гена *PREX1*, интерес представляют гены *ACTN1* и *EHD2*. *ACTN1* кодирует альфа-актинин-1, участвующий в организации кортикального цитоскелета и межклеточных контактов. Нарушение его регуляции может ослаблять связи между актином и адгезивными комплексами (Rajan *et al.*, 2023; Craig *et al.*, 2007). Белок EHD2 связывает F-актин с мембраной, регулируя клатрин-опосредованный эндоцитоз и взаимодействуя с белком PACSIN2. Изменение его экспрессии может влиять на ремоделирование мембраны в области микроворсинок (Postema *et al.*, 2019). Байесовская сеть также выявила ген *ANXA5* как один из главных регуляторных генов. Этот ген кодирует кальций-зависимый фосфолипид-связывающий белок, который стабилизирует кортикальный актиновый цитоскелет и способствует укреплению эпителиального барьера (Gerke *et al.*, 2024; Zamani *et al.*, 2023). Показано, что ген *ANXA5* ослабляет экспериментальный колит, ингибируя воспаление через взаимодействие с фосфатидилсерином (Zhang *et al.*, 2021). Еще одним ключевым эффекторным узлом в БС является ген *ISX* — кишечный транскрипционный фактор, интегрирующий пищевые сигналы (наличие  $\beta$ -каротина) с иммунным ответом слизистой оболочки, регулируя синтез ретиноевой кислоты, критичной для дифференцировки регуляторных Т-клеток (Widjaja-Adhi *et al.*, 2017; Lobo *et al.*, 2013; Erkelens & Mebius, 2017). Полиморфизмы в гене *ISX* ассоциированы с ВЗК (Dinu *et al.*, 2012), что делает его потенциальной терапевтической мишенью.

Таким образом, интегрированная модель выявила потенциальные гены-регуляторы, связывающие хроническое воспаление, дисфункцию цитоскелета и нарушение целостности эпителиального барьера при ВЗК.

## Глава 4. Роль актина в поддержании эпителиального барьера

Как описано в предыдущих главах, хроническое воспаление при ВЗК сопровождается нарушением целостности кишечного эпителиального барьера, что приводит к повышенной проницаемости и транслокации бактериальных антигенов в подлежащие слои. Ключевую роль в поддержании барьерной функции играет динамическая организация актинового цитоскелета, обеспечивающего стабильность плотных и адгезивных контактов (ПК и АК). Однако, несмотря на многочисленные исследования представленности белков ПК и АК при активном воспалении, данные о перестройке F-актина и его взаимодействии с белками ПК и АК при воспалении кишечника *in vivo* остаются ограниченными. В предыдущей главе на модели мышей с нокаутом гена, кодирующего муцин-2 (линия мышей *Muc2<sup>-/-</sup>*) были описаны ключевые цитологические особенности эпителия при ВЗК: дезорганизация актинового цитоскелета и нарушение структуры микроворсинок. Это позволило предположить, что именно дестабилизация F-актина в энтероцитах является причиной нарушений ПК и АК при хроническом воспалении. Настоящая глава посвящена детальному анализу молекулярных изменений на уровне F-актина и белков межклеточных контактов на трех моделях хронического воспаления *in vivo* и в биоптатах пациентов с ЯК.

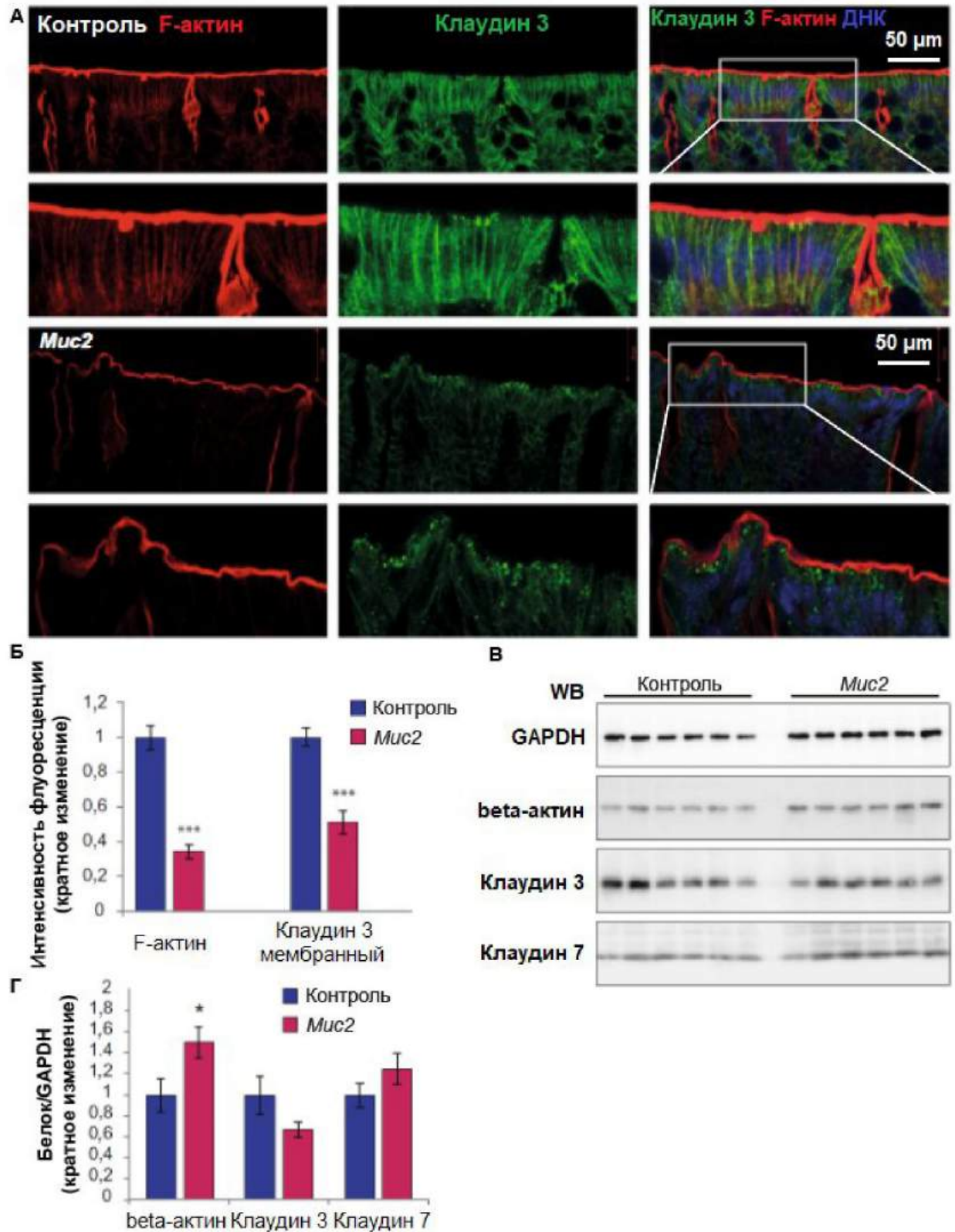
### 4.1 Анализ распределения белков плотных и адгезивных контактов и их взаимодействие с F-актином в модели хронического колита

Для оценки роли актинового цитоскелета в поддержании межклеточных контактов при хроническом воспалении был проведен анализ субклеточной локализации белков плотных и адгезивных контактов, а также их связи с филаментным актином в эпителии толстой кишки

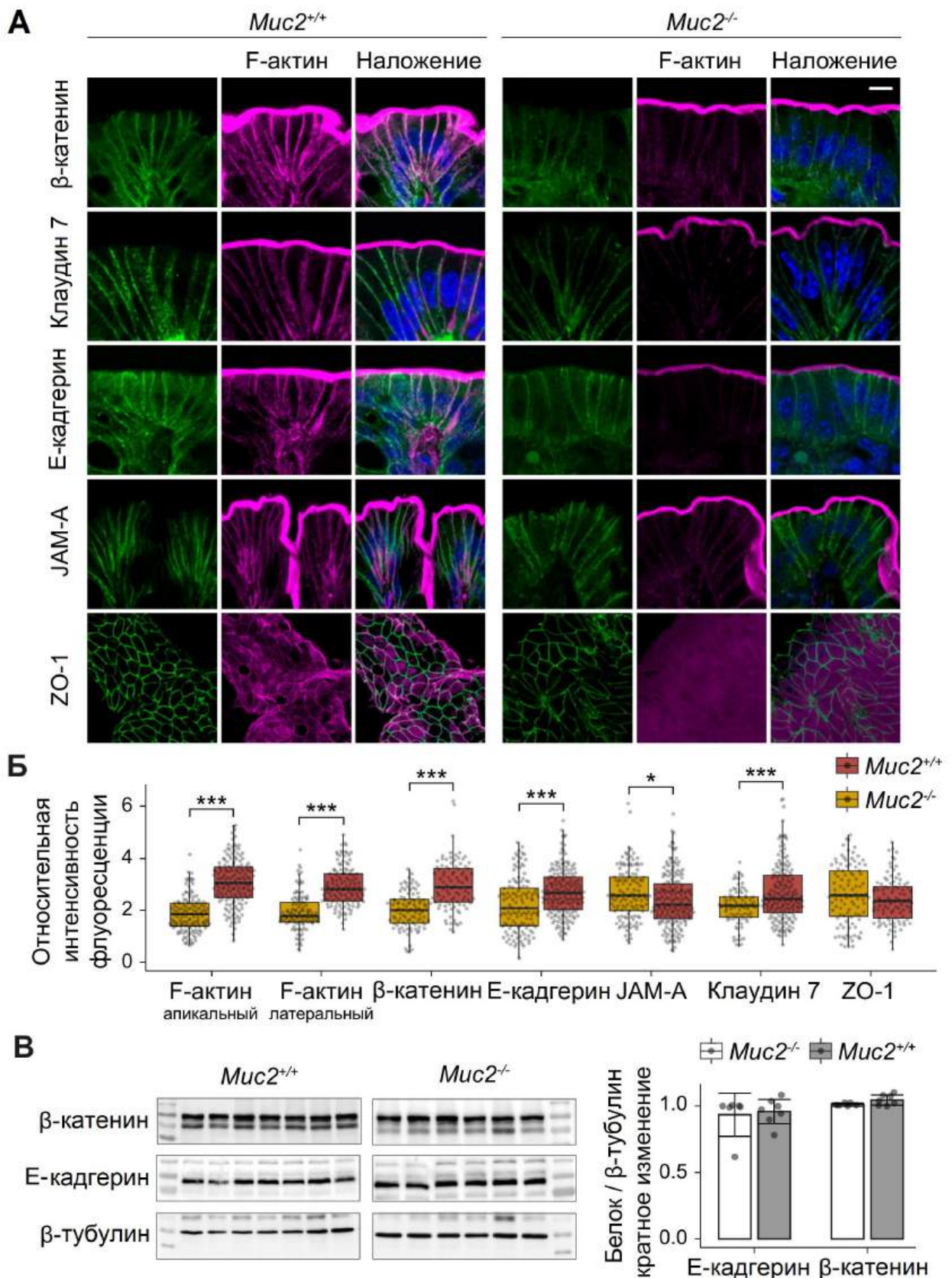
мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> и контрольных животных.

#### 4.1.1 Анализ локализации белков плотных и адгезивных контактов на латеральных мембранах энтероцитов

Для проверки этой гипотезы применялась конфокальная микроскопия с использованием флуоресцентно меченого фаллоидина, специфически связывающегося с F-актином. В контрольной группе наблюдалось выраженное связывание фаллоидина вдоль щеточной каемки на апикальной поверхности эпителиальных клеток тонкой кишки (Рисунок 12А), тогда как у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> сигнал фаллоидина был значительно слабее и более диффузным ( $t = 7,39$ ,  $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 12А,Б). Для оценки субклеточной локализации белков плотных контактов использовалось иммунное окрашивание клаудина-3 как маркера белковых комплексов плотных контактов. В контроле клаудин-3 преимущественно локализовался на латеральных мембранах эпителиальных клеток (Рисунок 12А), тогда как у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> доля мембранно связанного клаудина-3 была существенно ниже ( $t = 5,75$ ,  $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 12Б) и основная часть белка находилась в цитоплазме. Дополнительно, по данным окрашивания ДНК было показано, что в отдельных участках кишечника эпителиальные клетки у *Muc2*<sup>-/-</sup> мышей теряют характерную для поляризованного эпителия упорядоченную организацию вдоль поверхности крипт, наблюдаемую в контроле (Рисунок 12А). По результатам вестерн-блоттинга уровень  $\beta$ -актина у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> был немного повышен по сравнению с линией С57В1/6 ( $Z = 2,32$ ,  $p = 0,020$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни, Рисунок 12Г), тогда как содержание клаудина-3 не изменялось (Рисунок 12Г). В соответствии с данными вестерн-блот анализа белковых экстрактов толстой кишки, уровень белка клаудина-7 в толстой кишке также оставался неизменным (Рисунок 12Г), что поддерживает предположение о том, что нарушение барьерной функции кишечника не связано со снижением экспрессии генов белков плотных контактов.



**Рисунок 12.** Мембранная локализация белка клаудин-3 в модели хронического колита *Muc2*<sup>-/-</sup>. (А) Двойное иммуноокрашивание клаудина-3 и F-актина в толстой кишке мышей C57BL/6 (Контроль) и *Muc2*<sup>-/-</sup> (*Muc2*). (Б) Количественная оценка интенсивности флуоресценции белка клаудина-3 вдоль клеточной мембраны и F-актина в щеточной каемке ( $p < 0,001$ , по сравнению с C57BL/6,  $t$ -критерий Стьюдента). (В) Вестерн-блоттинг суммарного белка в образцах толстой кишки. (Г) Количественная оценка данных вестерн-блоттинга (нормированная по уровню белка GAPDH, кратность изменения),  $p < 0.05$ , по сравнению с C57BL/6,  $U$ -тест Манна-Уитни.



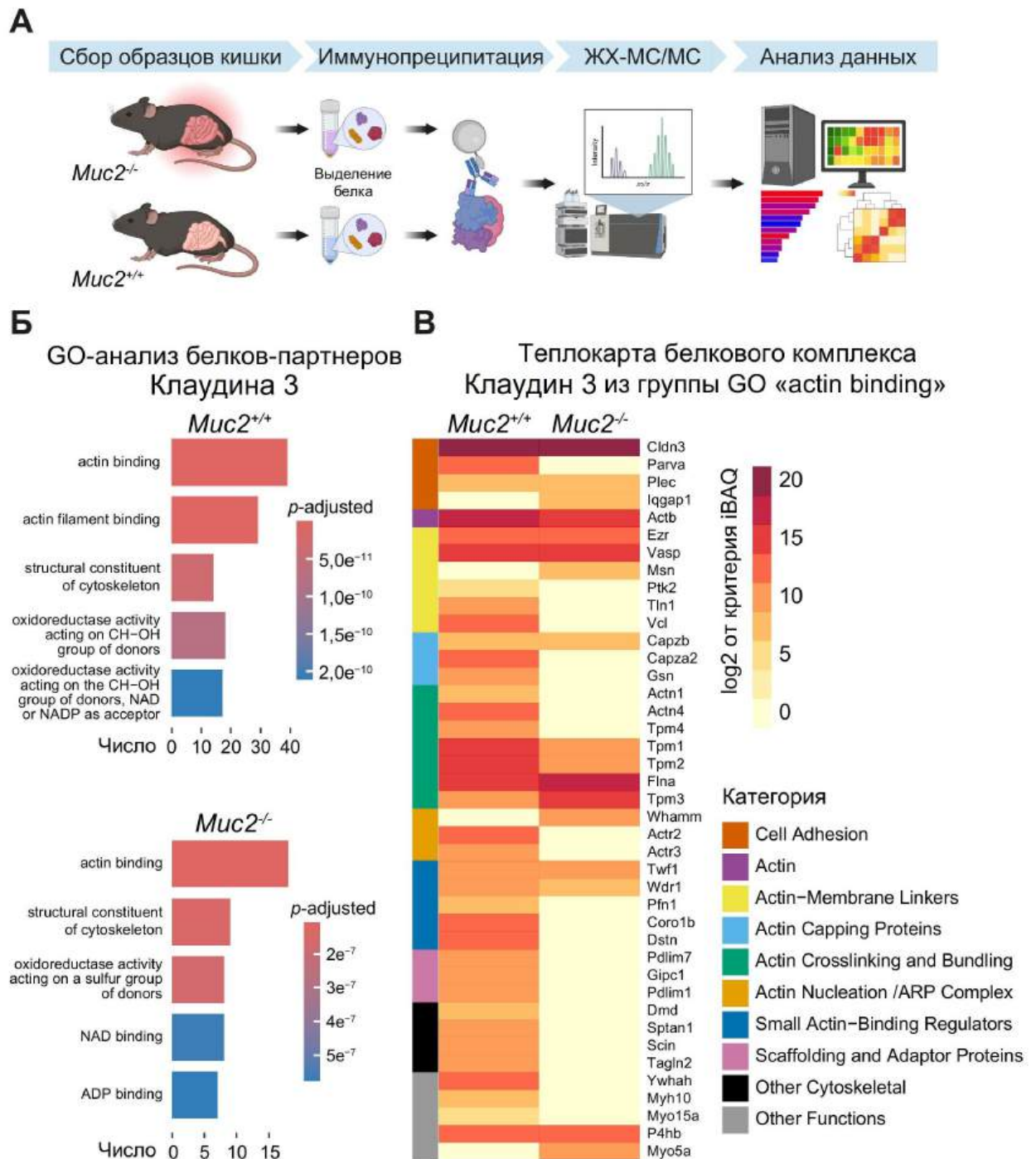
**Рисунок 13.** Мембранная локализация белков адгезивных контактов (АК) и плотных контактов (ПК) нарушена в модели хронического колита *Muc2<sup>-/-</sup>*. (А) Иммуноокрашивание белков АК и ПК в толстой кишке мышей *Muc2<sup>-/-</sup>*. ZO-1 показан в проекции со стороны просвета. Масштаб — 10 мкм. (Б) Количественная оценка интенсивности флуоресценции белков АК и ПК вдоль клеточной мембраны (\* -  $p < 0,05$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ,  $n = 3$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга). (В) Вестерн-блоттинг суммарного белка в образцах толстой кишки.  $\beta$ -тубулин

(55 кДа) использовался в качестве контроля загрузки. Данные показаны как среднее  $\pm 95\%$  с доверительным интервалом.

Затем в толстой кишке мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>* было оценено субклеточное распределение других белков ПК и АК. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что белок ПК клаудин-7, но не ZO-1, деллокализуется из латеральной мембраны колоноцитов кишки мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* (Рисунок 13А,Б) (*Muc2<sup>-/-</sup> vs Muc2<sup>+/+</sup>*, *U*-тест Манна–Уитни, клаудин-7:  $Z = -3,49$ ,  $p < 0,001$ ; JAM-A:  $Z = 2,39$ ,  $p = 0,0195$ ; ZO-1:  $Z = 1,35$ ,  $p = 0,178$ ). Аналогичное перераспределение было отмечено для белков АК E-кадгерина и  $\beta$ -катенина, что подтверждается количественной оценкой интенсивности флуоресценции (Рисунок 13А, Б) (*Muc2<sup>-/-</sup> vs Muc2<sup>+/+</sup>*, *U*-тест Манна–Уитни, E-кадгерин:  $Z = -4,43$ ,  $p < 0,001$ ;  $\beta$ -катенин:  $Z = -7,05$ ,  $p < 0,001$ ). По данным вестерн-блоттинга суммарных белковых экстрактов, уровни экспрессии E-кадгерина и  $\beta$ -катенина у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* не отличались от таковых у *Muc2<sup>+/+</sup>*, аналогично ранее показанным результатам для клаудинов (Рисунок 13В) (*Muc2<sup>-/-</sup> vs Muc2<sup>+/+</sup>*, *U*-тест Манна–Уитни, E-кадгерин:  $Z = 0,29$ ,  $p = 0,83$ ;  $\beta$ -катенин:  $Z = -1,14$ ,  $p = 0,57$ ). В соответствии с данными предыдущего исследования, уровни апикального и латерального F-актина были снижены.

#### 4.1.2 Анализ белковых взаимодействий белка клаудина-3 в норме и при воспалении

С помощью специфических антител против клаудина-3 и коиммунопреципитации с последующим анализом методом ВЭЖХ–МС/МС был идентифицирован комплекс белков, ассоциированных с клаудином-3 в эпителии толстой кишки мышей *Muc2<sup>+/+</sup>* и *Muc2<sup>-/-</sup>* (Рисунок 14). Протеомный анализ интерактома плотных контактов показал выраженную перестройку этого комплекса в образцах, полученных от мышей *Muc2<sup>-/-</sup>*. В тканях животных линии *Muc2<sup>+/+</sup>* клаудин-3 взаимодействовал с группой актин-связывающих белков, включая комплекс Ayr2/3,  $\alpha$ -актинин, эзрин, винкулин и ряд других белков (Рисунок 14), тогда как в образцах от животных *Muc2<sup>-/-</sup>* этот специфический интерактом был в значительной степени утрачен.



**Рисунок 14. Сравнительный анализ интерактома белка клаудина-3 в белковых экстрактах ткани кишки, полученных от животных линий *Muc2<sup>+/+</sup>* и *Muc2<sup>-/-</sup>*. (А) Блок-схема анализа интерактома. (Б) Обогащение онтологии генов (GO) для интерактома белка клаудина-3 в образцах, полученных от мышей двух групп. (В) Тепловая карта значений критерия  $\log_2$  iBAQ для белков, аннотированных в группе онтологии генов «связывание с актином», обнаруженных в иммунопреципитатах клаудина 3 из ткани толстой кишки мышей линий *Muc2<sup>+/+</sup>* и *Muc2<sup>-/-</sup>*.**

При этом суммарный уровень клаудина-3 оставался неизменным, что подтверждается сходными значениями критерия iBAQ (intensity-based absolute quantification, представляет собой индекс, учитывающий покрытие белка обнаруженными в ходе анализа пептидами с нормировкой на его

размер), сопоставимой степени покрытия, а также ранее проведенной валидацией по данным вестерн-блоттинга и ОТ-ПЦР экспрессии гена *Cldn3*, что указывает на посттрансляционный характер нарушений его белкового комплекса. Таким образом, дисфункция кишечного барьера у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> тесно связана с нарушением сети актин-зависимых белковых взаимодействий.

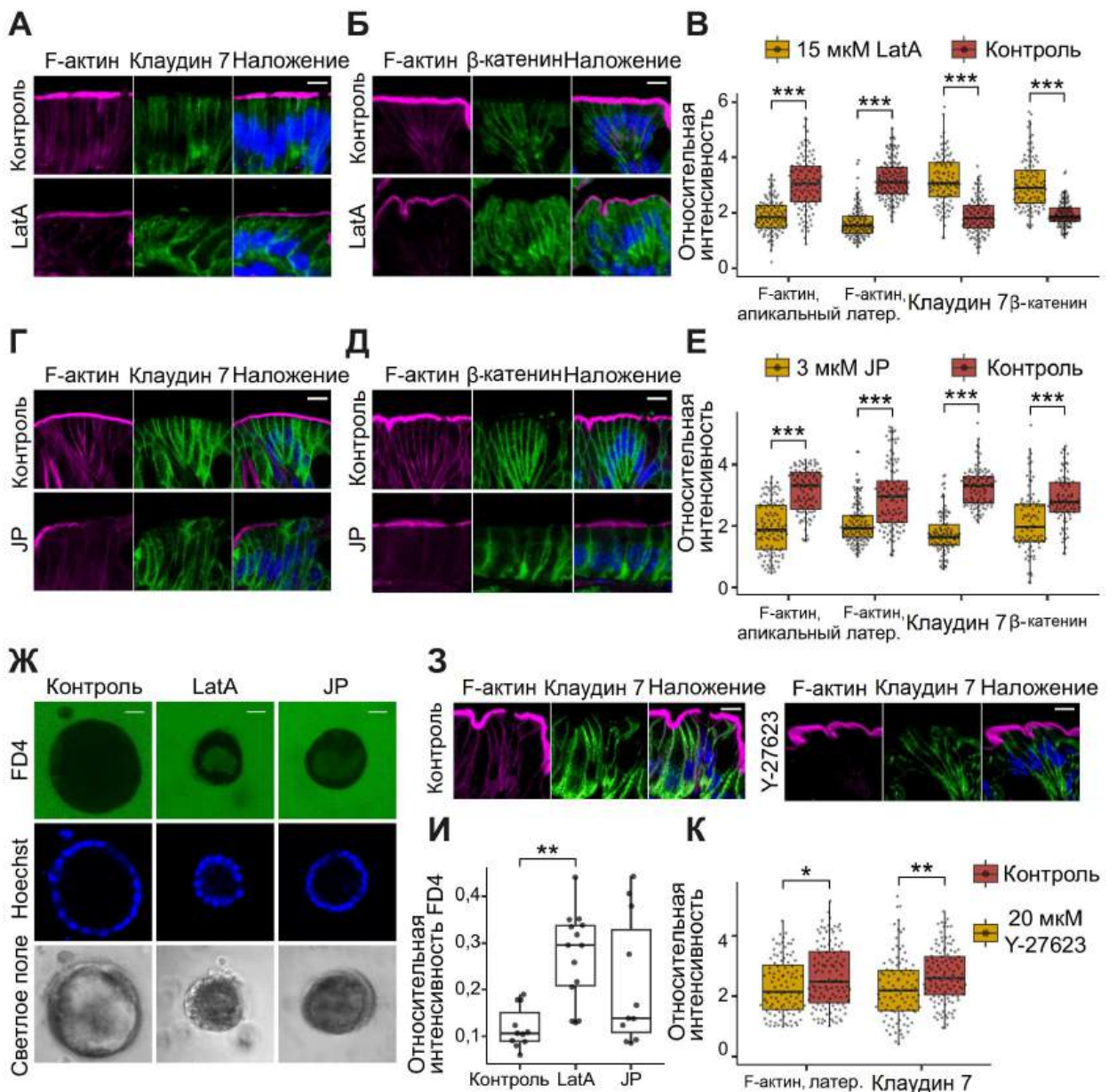
## 4.2 Роль полимеризации F-актина в поддержании эпителиального барьера

Чтобы выяснить, связана ли делокализация белков ПК и АК с нарушением организации F-актина, была проведена *in vivo* модификация баланса G-актин (мономерный актин) / F-актин с использованием латрункулина А (latrunculin A, LatA) и джасплакинолида (jasplakinolide, JP) у мышей линии C57BL/6. В качестве альтернативного агента, влияющего на актиновый цитоскелет, дополнительно применялся ингибитор киназы ROCK Y-27623. Иммунофлуоресцентный анализ эпителия кишечника показал, что все три препарата приводят к выраженному повреждению как апикальной, так и латеральной актиновых сетей, что подтверждено количественной оценкой интенсивности флуоресценции F-актина (Рисунок 15А–Е) (контроль *vs* LatA, *U*-тест Манна–Уитни, апикальный F-актин:  $Z = 8,56$ ,  $p < 0,001$ , латеральный F-актин:  $Z = 11,96$ ,  $p < 0,001$ ; контроль *vs* JP, *U*-тест Манна–Уитни, апикальный F-актин:  $Z = 8,64$ ,  $p < 0,001$ ; латеральный F-актин:  $Z = 6,75$ ,  $p < 0,001$ ; контроль *vs* Y-27623, *U*-тест Манна–Уитни, латеральный F-актин:  $Z = 2,26$ ,  $p = 0,023$ ). Несмотря на противоположные механизмы действия латрункулина А и джасплакинолида в отношении динамики актиновых филаментов, оба воздействия сопровождалось значительным снижением интенсивности флуоресценции F-актина, что указывает на зависимость стабильности микрофиламентной сети от тонкого баланса между мономерным G-актином и полимеризованным F-актином. Нарушение этого динамического равновесия в любом направлении оказывается достаточным для дестабилизации цитоскелета и утраты целостности актиновой сети.

Перестройка актинового цитоскелета напрямую отражалась на субклеточной локализации контактных белков клаудина-7 и  $\beta$ -катенина

(Рисунок 15) (контроль *vs* LatA, *U*-тест Манна–Уитни, клаудин-7:  $Z = -9,29$ ,  $p < 0,001$ ;  $\beta$ -катенин:  $Z = -9,90$ ,  $p < 0,001$ ; контроль *vs* JP, *U*-тест Манна–Уитни, клаудин-7:  $Z = 11,04$ ,  $p < 0,001$ ;  $\beta$ -катенин:  $Z = 5,05$ ,  $p < 0,001$ ). В соответствии с ожидаемым механизмом действия джасплакинолид, стабилизирующий F-актин и нарушающий его обновление, вызывал распад кортикальной актиновой сети и, как следствие, делокализацию клаудина-7 и  $\beta$ -катенина из латеральной мембраны (Рисунок 15Д). В противоположность этому латрункулин А, секвестрирующий G-актин и индуцирующий деполимеризацию актиновых филаментов, приводил к усилению мембранной локализации как клаудина-7, так и  $\beta$ -катенина (Рисунок 15А–В). Эти разнонаправленные эффекты демонстрируют, что стабильность плотных и адгезивных контактов не является простым пассивным следствием полимеризации F-актина, а дифференциально регулируется характером нарушения актиновой динамики. Введение ингибитора ROCK Y-27632 также сопровождалось нарушением организации F-актина и потерей клаудина-7 из латеральной мембраны (Рисунок 15И–К) (контроль *vs* Y-27623, *U*-тест Манна–Уитни, клаудин-7:  $Z = 3,35$ ,  $p = 0,00121$ ), однако влияние подавления ROCK на целостность контактных комплексов носило контекст-зависимый характер и отличалось от эффектов латрункулина А и джасплакинолида.

Учитывая ключевую роль актинового цитоскелета в поддержании соединительных комплексов, была выдвинута гипотеза о том, что дестабилизация микрофиламентов является основной причиной дисфункции эпителиального барьера. Для ее проверки была оценена проницаемость барьера в кишечных органоидах после фармакологического нарушения динамики актина. Обработка латрункулином А приводила к значительному увеличению проницаемости для FITC-декстрана 4 кДа (Рисунок 15Ж–З), что свидетельствует о том, что нарушения организации актинового цитоскелета сами по себе достаточны для нарушения целостности кишечного барьера (однофакторный ANOVA,  $F(2, 33) = 7,22$ ,  $p = 0,0025$ ; апостериорный тест Тьюки, контроль *vs* LatA:  $p = 0,0017$ ). Таким образом, полученные данные дополнительно подтверждают, что дестабилизация F-актина выступает одним из ключевых факторов дисфункции плотных и адгезивных контактов в эпителии кишечника у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup>.



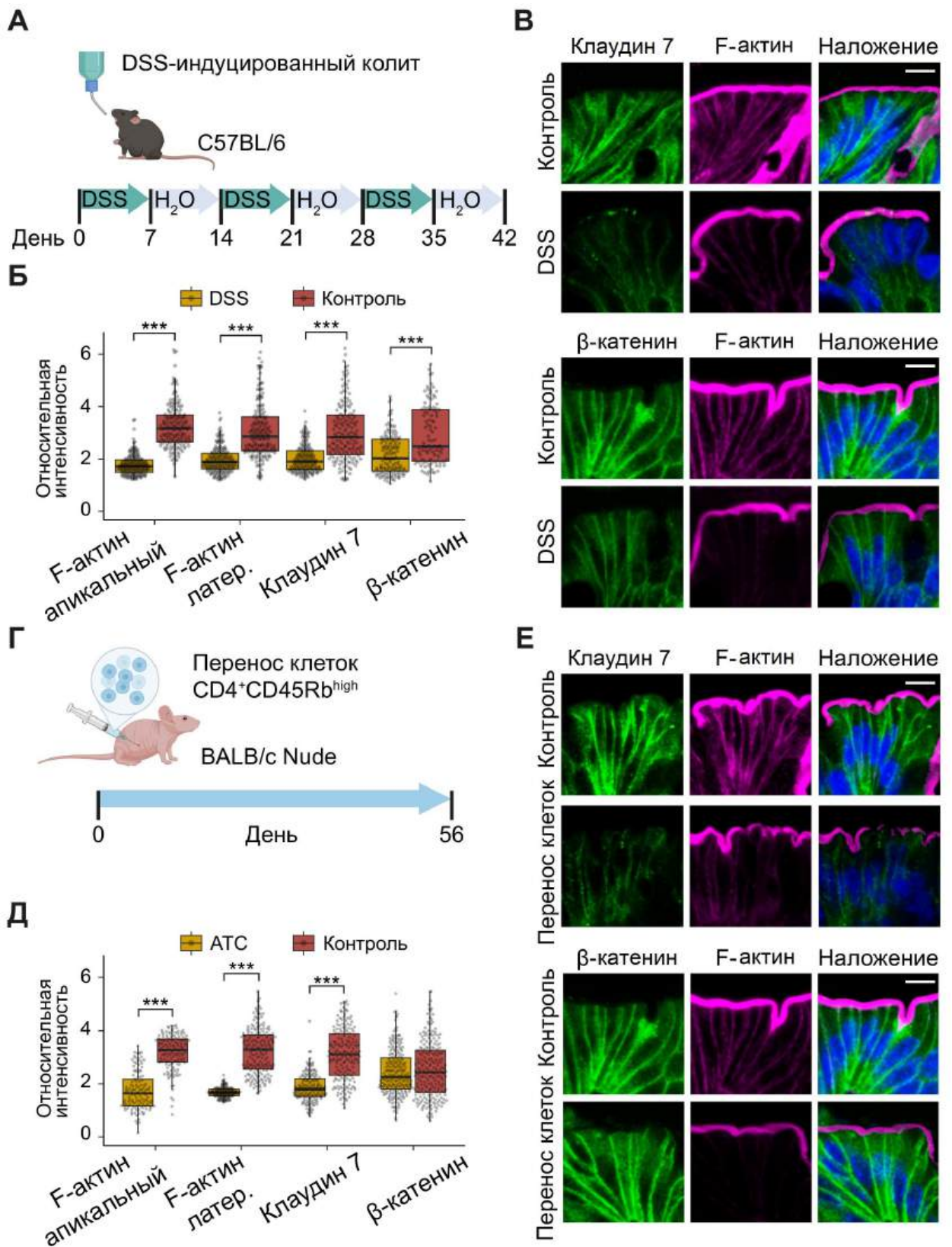
**Рисунок 15. F-актин определяет мембранную локализацию адгезивных контактов (АК) и плотных контактов (ПК) и проницаемость эпителия.** (А) Белки клаудин-7 и (Б)  $\beta$ -катенин: иммуноокрашивание толстой кишки мышей линии  $Muc2^{+/+}$  после ректального введения латрункулина А (LatA) в течение 90 минут. (В) Количественная оценка интенсивности флуоресценции F-актина, клаудина-7 и  $\beta$ -катенина на клеточной мембране эпителиоцитов толстой кишки мышей линии  $Muc2^{+/+}$  после введения латрункулина А ( $p < 0,001$ ,  $n = 3$ , U-тест Манна-Уитни). (Г) Белки клаудин-7 и (Д)  $\beta$ -катенин: иммуноокрашивание толстой кишки мышей линии  $Muc2^{+/+}$  после ректального введения джасплакинолида (JP) в течение 90 минут. (Е) Количественная оценка интенсивности флуоресценции F-актина, клаудина-7 и  $\beta$ -катенина вдоль клеточной мембраны эпителиоцитов кишечника мышей линии  $Muc2^{+/+}$ , обработанного джасплакинолидом ( $p < 0,001$ ,  $n = 3$ , U-тест Манна-Уитни). (Ж) Латрункулин А и джасплакинолид вызывают повышение проницаемости эпителиального барьера в органоидах кишечника мыши. Масштаб — 10 мкм. (З) Количественная оценка относительной интенсивности флуоресценции FITC-декстрана 4 кДа (FD4) ( $p < 0.01$ , однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Тьюки). (И) Белок клаудин-7: иммуноокрашивание в толстой кишке мышей в группе  $Muc2^{+/+}$  после ректального введения Y-27623 в течение 9 часов. (К) Количественная оценка интенсивности флуоресценции F-актина и клаудина-7 на клеточной мембране кишечника мышей группы  $Muc2^{+/+}$ , обработанного Y-27623 в течение 9 часов ( $p < 0,001$ ,  $n = 3$ , U-тест Манна-Уитни). Hoechst - окрашивание ДНК.

### 4.3 Нарушение F-актина характерно для различных моделей колита и для пациентов с диагнозом язвенный колит

#### 4.3.1 F-актин в моделях химической индукции и адоптивного переноса

Следующим шагом стала проверка, является ли дестабилизация F-актина общим патомеханизмом развития ВЗК вне зависимости от этиологии воспаления. Для этого были проанализированы еще две модели хронического колита: колит, индуцированный добавлением натриевой соли сульфата декстрана (dextran sulfate sodium salt, DSS) в питье мышей, и колит, индуцируемый адоптивным переносом наивных T-клеток (adoptive transfer colitis, АТС). Количественная оценка интенсивности флуоресценции показала, что обе модели воспроизводят цитологические дефекты, аналогичные наблюдаемым у мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>*, а именно нарушение организации актинового цитоскелета и изменение локализации клаудина-7 (DSS *vs* контроль, *U*-тест Манна–Уитни, апикальный F-актин:  $Z = -15,03$ ,  $p < 0,001$ ; латеральный F-актин:  $Z = -11,38$ ,  $p < 0,001$ ; клаудин-7:  $Z = -9,18$ ,  $p < 0,001$ , Рисунок 16А-В; АТС *vs* контроль, *U*-тест Манна–Уитни, апикальный F-актин:  $Z = -11,57$ ,  $p < 0,001$ ; латеральный F-актин:  $Z = -15,65$ ,  $p < 0,001$ ; клаудин-7:  $Z = -11,45$ ,  $p < 0,001$ , Рисунок 16Г-Е).

Изменение субклеточной локализации  $\beta$ -катенина было дополнительно подтверждено для модели DSS-колита (Рисунок 16) (DSS *vs* контроль, *U*-тест Манна–Уитни,  $\beta$ -катенин:  $Z = -5,07$ ,  $p < 0,001$ , Рисунок 16А-В; АТС *vs* контроль, *U*-тест Манна–Уитни,  $\beta$ -катенин:  $Z = -0,62$ ,  $p > 0,05$ , Рисунок 16Г-Е). Наблюдение сходного фенотипа в генетически, химически и иммунологически обусловленных моделях хронического колита убедительно свидетельствует о том, что дестабилизация микрофиламентов является одним из фундаментальных факторов нарушения барьерной функции кишечного эпителия при хроническом воспалении. При этом остается открытым вопрос о том, какой молекулярный механизм отвечает за перестройку актинового цитоскелета.



**Рисунок 16.** Динамика актина нарушена в различных моделях хронического колита. (А) Схема получения хронического химически индуцированного колита (DSS - натриевая соль сульфата декстрана). (Б) Количественная оценка интенсивности флуоресценции белков F-актина,  $\beta$ -катенина и клаудина-7 на клеточной мембране эпителиоцитов в толстой кишке мышей с DSS-индуцированным хроническим колитом (DSS vs контроль,  $p < 0,001$  для всех белков,  $n = 3$ ,  $U$ -тест Манна-Уитни). (В) Иммуноокрашивание белков  $\beta$ -катенина и клаудина-7 в толстой кишке мышей с хроническим колитом, индуцированным DSS. Масштаб — 10 мкм. (Г) Схема получения модели хронического

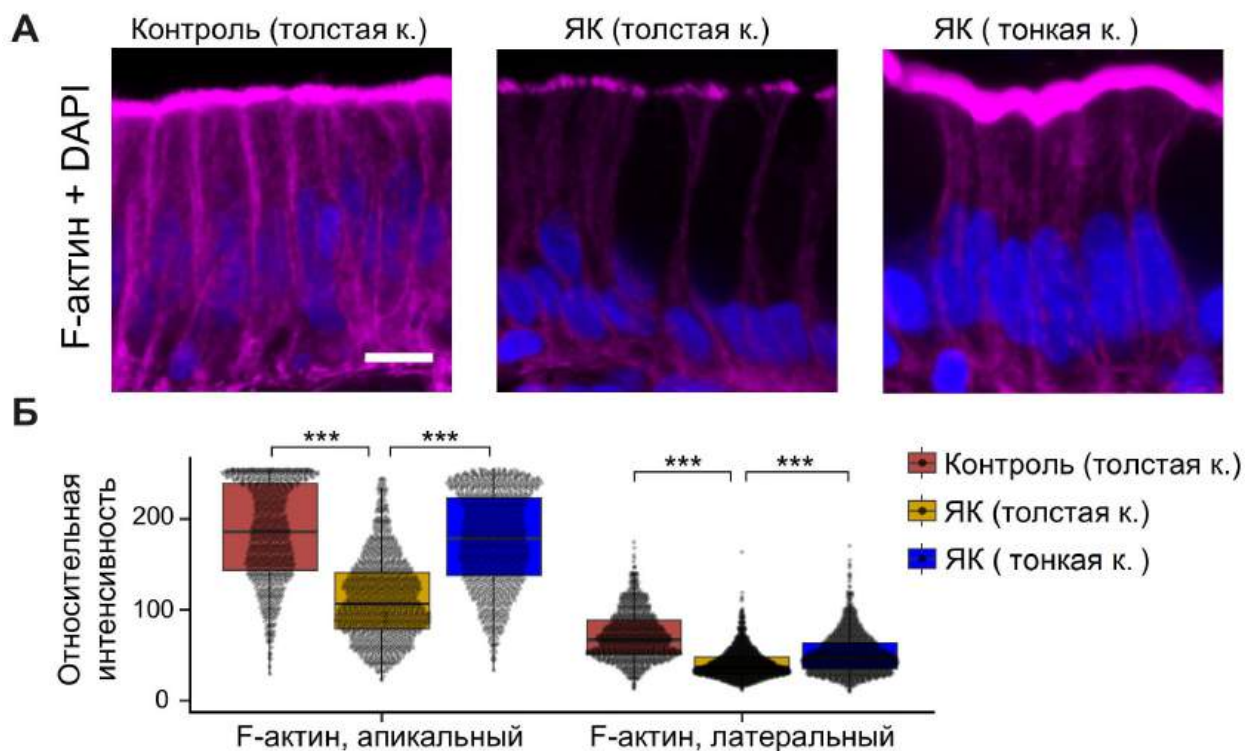
колита с помощью адоптивного переноса клеток CD45+Rb<sup>high</sup> (АТС). (Д) Количественная оценка интенсивности флуоресценции белков F-актина,  $\beta$ -катенина и клаудина-7 на клеточной мембране в толстой кишке мышей группы АТС (АТС *vs* контроль,  $p < 0,001$  для всех белков,  $n = 3$ , *U*-тест Манна–Уитни). (Е) Иммуноокрашивание  $\beta$ -катенина и клаудина-7 в толстой кишке мышей с АТС. Масштаб — 10 мкм.

#### 4.3.2 F-актин в эпителии пациентов с язвенным колитом

Затем была проведена оценка представленности F-актина в эпителии толстой и тонкой кишки пациентов с ЯК на небольшой тестовой выборке. Для валидации экспериментальных данных был выполнен иммуногистохимический анализ ткани пациентов и условно здоровых доноров без анамнеза ВЗК.

Так же как и в эксперименте с ультраструктурным анализом, был проведен пилотный эксперимент, в котором использовали биоптаты толстой и подвздошной кишки трех пациентов с диагнозом «язвенный колит». Образец тонкой кишки служил внутренним контролем, в качестве условно здорового контроля были взяты биоптаты толстой кишки двух людей без анамнеза ВЗК. Выбранное количество пациентов является адекватным для пилотного эксперимента с использованием конфокальной микроскопии, учитывая большое число индивидуальных клеток, которые используются для количественного обсчета. Важно отметить, что в литературе пока нет данных об использовании F-актина как маркера ВЗК, поэтому предложенная схема эксперимента позволяет получить новые данные, которые имеют ценность для современной гастроэнтерологии.

Флуоресцентная визуализация эпителиального F-актина на срезах ободочной кишки выявила выраженное снижение количества апикальных и латеральных микрофиламентов, что свидетельствует о глубокой перестройке цитоскелета у пациентов с ЯК (толстая кишка, контроль *vs* толстая кишка, ЯК, *U*-тест Манна–Уитни, апикальный F-актин:  $Z = -26,82$ ,  $p < 0,001$ ; латеральный F-актин:  $Z = -29,85$ ,  $p < 0,001$ ; толстая кишка, ЯК *vs* тонкая кишка, ЯК, апикальный F-актин:  $Z = 26,62$ ,  $p < 0,001$ ; латеральный F-актин:  $Z = 13,86$ ,  $p < 0,001$ , Рисунок 17). В совокупности с результатами ТЭМ эти данные указывают на значительное нарушение комплекса актин-межклеточные контакты в эпителии толстой кишки при ЯК.



**Рисунок 17. F-актин у пациентов с ЯК.** (А) Окрашивание F-актина в биоптатах ободочной и подвздошной кишки пациентов с ВЗК и в тканях ободочной кишки условно здоровых людей. Масштаб – 10 мкм. (Б) Количественная оценка интенсивности флуоресценции F-актина на клеточной мембране у пациентов с ВЗК (*U*-тест Манна–Уитни,  $***p < 0,001$ ,  $n = 3$  пациента с ВЗК,  $n = 2$  здоровых донора). DAPI окрашивает ДНК.

Наблюдения, полученные в трех независимых мышинных моделях хронического колита и в тканях пациентов с ЯК, сходятся к единому объединяющему механизму: нарушение архитектуры F-актина выступает потенциальным промежуточным звеном, приводящим к формированию дисфункции эпителиального барьера. Функциональные тесты с использованием фармакологического воздействия на полимеризацию актина как на органоидах толстой кишки *in vitro*, так и на мышцах *in vivo* показывают, что нарушения динамики полимеризации актина достаточно для того, чтобы индуцировать нарушения барьерной функции эпителия. Таким образом, снижение количества полимерного актина на моделях ВЗК и у пациентов с ЯК может являться одной из причин нарушения целостности межклеточных контактов.

## Глава 5. Роль метаболизма липидов в формировании эпителиального барьера

Метаболическое перепрограммирование является характерной чертой эпителия кишечника пациентов с ВЗК, при этом сами метаболиты способны модулировать ключевые клеточные процессы, включая поддержание барьерной функции кишечника. В связи с этим следующая глава посвящена исследованию роли метаболизма в регуляции целостности эпителиального барьера.

### 5.1 Метаболомный анализ крипт толстой кишки в норме и при воспалении

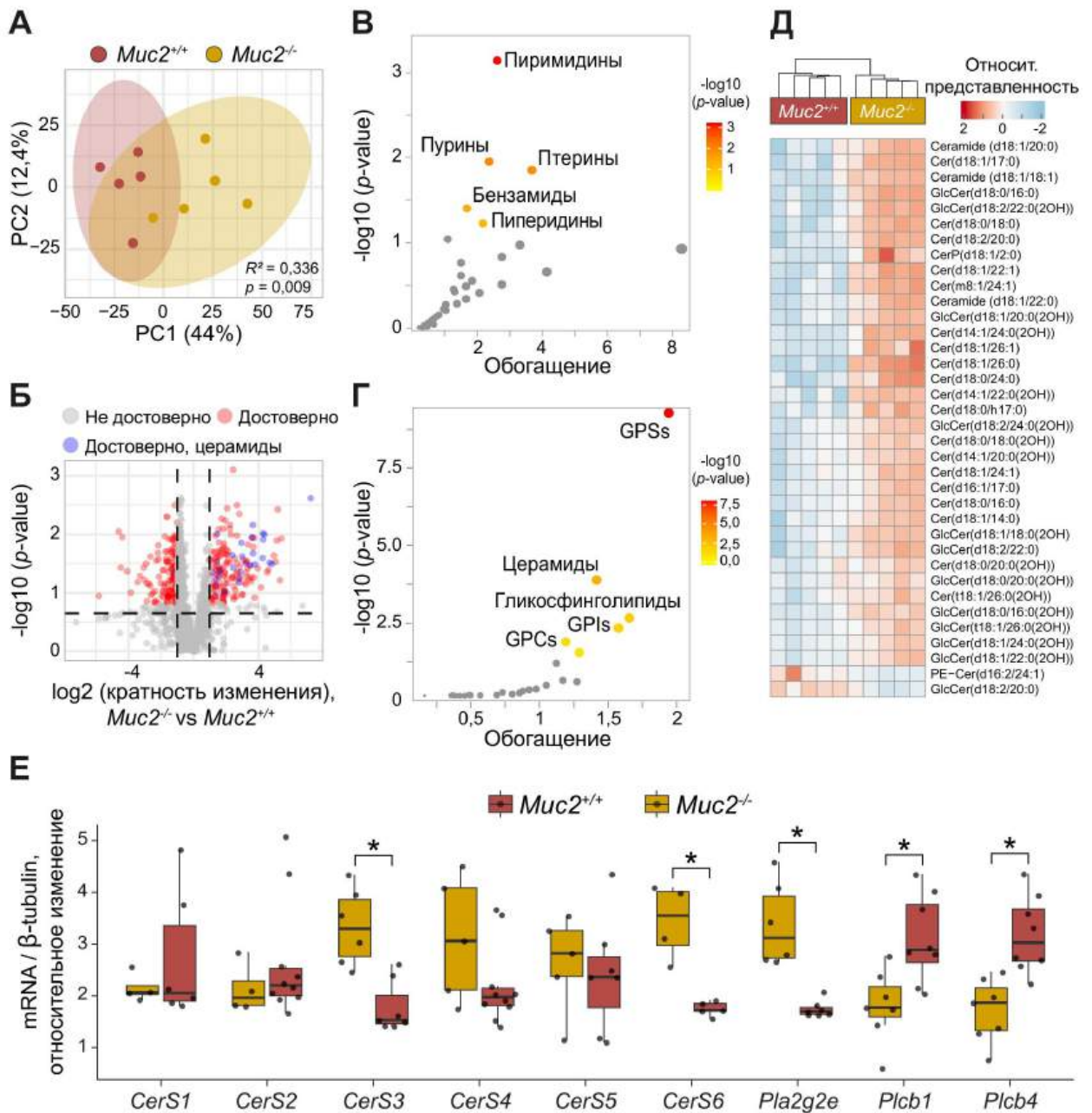
Для анализа метаболического профиля был выбран метод жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Комплексное метаболомное профилирование изолированных крипт толстой кишки выявило несколько тысяч соединений, большую часть которых составляли липиды. Анализ главных компонент (Principal component analysis, PCA) метаболомных профилей показал значительные различия между животными групп *Muc2<sup>-/-</sup>* и *Muc2<sup>+/+</sup>* ( $F = 4,04$ ,  $R^2 = 0,336$ ,  $p = 0,009$ , 999 перестановок), в то время как межгрупповые сравнения выявили сотни дифференциально регулируемых метаболитов, указывающих на значительный метаболический сдвиг при колите (Рисунок 18А, Б). Метаболомный анализ выявил значительное изменение метаболизма пуринов и пиримидинов, биосинтеза жирных кислот, метаболизма фосфолипидов и сфинголипидов (Рисунок 18В, Г). Уровень сфинголипидов был заметно повышен, с существенным накоплением церамидов и гликосфинголипидов (Рисунок 18Г).

Каждая группа липидов представляет широкий спектр соединений с различной длиной и насыщенностью жирных кислот. В частности,

значительные изменения наблюдались в широком спектре липидных видов, определяемых их головными группами и различными цепями жирных кислот. Были выявлены значительные изменения в 169 церамидах, 117 фосфатидилхолинах, 102 фосфатидилглицеринах, 43 фосфатидилсеринах, 25 фосфатидилинозитолах, 27 сфингомиелинах и 17 фосфатидных кислотах. Примечательно, что наиболее значительно повышенные церамиды были обогащены классами длинноцепочечных (C16 – C19), очень длинноцепочечных (C20 – C24), а также ультрадлинноцепочечных жирных кислот (> C24) (Рисунок 18Д).

Основываясь на предыдущих данных транскриптома, были выбраны конкретные гены, вовлеченные в регуляцию динамики F-актина и метаболизма липидов. Экспрессия этих кандидатов была количественно оценена с помощью ОТ-ПЦР в независимой выборке животных обоих генотипов для подтверждения результатов, полученных в ходе полногеномного анализа. В этом эксперименте было выявлено, что экспрессия генов, кодирующих белки-регуляторы актина, *Enah*, *Pfn2* и *Wasf1* была снижена у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup> (Рисунок 18). Кроме того, гены, кодирующие фосфолипазы А и С, существенно изменяли экспрессию (*Muc2*<sup>-/-</sup> vs *Muc2*<sup>+/+</sup>, U-тест Манна–Уитни, *Pla2g2e*:  $Z = 3$ ,  $p = 0,015$ ; *Plcb1*:  $Z = -2,77$ ,  $p = 0,015$ ; *Plcb4*:  $Z = -3$ ,  $p = 0,02$ ) (Рисунок 17 Е). Интересно, что экспрессия генов, кодирующих церамидсинтазы 3 и 6, была значительно повышена при колите у мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2*<sup>-/-</sup> vs *Muc2*<sup>+/+</sup>, U-тест Манна–Уитни, *CerS3*:  $Z = 2,86$ ,  $p = 0,015$ ; *CerS6*:  $Z = 2,45$ ,  $p = 0,02$ ).

Интеграция данных по экспрессии генов и метаболомного анализа позволяет предположить, что накопление липидов может быть связано с нарушением динамики цитоскелета. Учитывая изменение экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез сфинго- и фосфолипидов, эти классы веществ были приняты в качестве метаболитов-кандидатов, потенциально вовлеченных в регуляцию барьерной функции кишечника.



**Рисунок 18. Метаболический сдвиг и изменение уровня липидов в криптах толстой кишки мышей линии *Muc2*<sup>-/-</sup>.** (А) Анализ метаболомных профилей методом главных компонент (РСА) показал значительные различия между животными генотипа *Muc2*<sup>-/-</sup> и однопометниками дикого типа. (Б) Вулкан-плот показывает дифференциально представленные метаболиты (отмечены синим и красным). (В, Г) Оценка обогащения путей метаболизма пуринов и пиримидинов, биосинтеза жирных кислот, метаболизма фосфолипидов и сфинголипидов. Анализ накопления церамидов и гликофинголипидов с помощью инструментов MetaboAnalyst 5.0. (Д) Анализ накопления длинноцепочечных (С16 – С19) и очень длинноцепочечных (С20 – С24) церамидов. (Е) Изменение экспрессии генов, кодирующих регуляторы актина (*Enah*, *Pfn2*, *Wasf1*), фосфолипазы (*Pla2g2e*, *Plcb1*, *Plcb4*), и церамидсинтазы (*CerS3*, *CerS6*). \*  $p < 0,05$  по сравнению с *Muc2*<sup>+/+</sup>.

Можно предположить, что столь значительное накопление фосфолипидов и сфинголипидов способно вызывать нарушение структуры и функции мембранных органелл, отмеченное в толстой кишке животных линии *Muc2*<sup>-/-</sup> с помощью ТЭМ и описанное в главе 3.

## 5.2 Роль фосфолипидов в поддержании функций мембранных органелл эпителия

Для проверки роли фосфолипидов (ФЛ) в формировании клеточных нарушений была проведена оценка эффекта основных ФЛ, состав которых меняется у животных с хроническим генетически обусловленным колитом. В диету животным линии C57BL/6 добавляли фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидную кислоту (ФК) и изучали влияние приема ФЛ на системный метаболизм с помощью метаболомного профилирования сыворотки крови методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Экспериментальные группы взрослых половозрелых мышей получали 34,6 г/кг ФЛ в сбалансированном по составу корме в соотношении: ФХ:ФС:ФК = 8,4:1:1 в течение двух недель. Для двухнедельного кормления ФЛ стандартный корм (BioPro, Россия) смешивали с капсулами диетической добавки ФЛ, содержащими 840 мг фосфатидилхолина (ФХ) (Solgar, Leonia, NJ, США) и по 100 мг фосфатидной кислоты (ФК) и фосфатидилсерина (ФС) (4+NUTRITION, Padova, Италия) на каждые 30 г обогащенного корма. Средняя мышь массой 25 г потребляет примерно 5 г корма в день, что соответствует 5600 мг ФХ, 680 мг ФС и 680 мг ФК на кг массы тела в сутки. Согласно информации производителя корма для мышей (BioPro, Новосибирск), стандартный рацион лабораторных мышей содержит 6% жира. Жир преимущественно поступает из полножирной сои, подсолнечного масла, рыбьего жира, кукурузного глютена, а также мясокостной муки. Более 50% общего жира приходится на сою и примерно 15% — на подсолнечное масло. Точное содержание ФХ, ФС и ФК производителем не указано, но было оценено на основе опубликованных данных с учетом основных жировых компонентов корма следующим образом: 375 мг ФХ, 43 мг ФС и 31 мг ФК на кг массы тела в сутки (Morozova et al., 2024).

Образцы толстой кишки были проанализированы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) для оценки структуры митохондрий. Двухнедельное добавление ФЛ привело к значительному повреждению митохондрий и ультраструктурным изменениям в их архитектуре (Рисунок 19А–Д).



(Е) Измерение митохондриального дыхания с использованием анализатора Seahorse XF24. (Ж) Функциональные параметры митохондрий, оцененные с помощью анализатора Seahorse XF24. \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента; #  $p < 0,05$ , критерий Фридмана. СПК - скорость потребления кислорода.

Митохондрии в толстой кишке мышей после двухнедельного кормления ФЛ содержали значительно меньше крист (Рисунок 19Д). В то же время количество митохондрий с липидными каплями было больше, а сами капли имели больший размер по сравнению с таковыми в эпителии интактных животных (число животных, использованных для ТЭМ, равно 2 для обеих групп,  $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента)(Рисунок 19Д).

Учитывая, что морфология митохондрий была нарушена из-за образования липидных капель, было необходимо оценить, изменились ли их функциональные свойства. Для оценки функции митохондрий было измерено митохондриальное дыхание с использованием технологии Agilent Seahorse (Рисунок 19Е). Для этого были выделены кишечные крипты из кишки животных группы ФЛ и контрольных животных и использованы для измерения митохондриального дыхания. Полученные результаты показали, что базальное дыхание митохондрий группы ФЛ не отличалось от контроля. Однако их дыхательная емкость была снижена по сравнению с контрольной группой (Рисунок 19Ж) ( $n = 6$  для обеих групп,  $p < 0,001$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни).

Значительное усиление дыхания после обработки FCCP наблюдалось только в контрольной группе (по сравнению с олигомицином,  $p < 0,05$ , критерий Фридмана). В совокупности эти данные демонстрируют, что избыток фосфолипидов делает митохондрии более чувствительными к разобщению дыхания под действием FCCP (Рисунок 19Е).

Поскольку результаты, приведенные в главе 3, указывают на потенциальную роль митохондриальной дисфункции в регуляции проницаемости эпителиального барьера кишечника, была проверена гипотеза о том, влияет ли повреждение митохондрий при двухнедельном добавлении фосфолипидов на ПК и АК. Ультраструктурный анализ не выявил видимых различий в морфологии межклеточных контактов (рисунок 20А). Однако количественная оценка ширины ПК и АК на основе ТЭМ показала достоверные различия между контрольной группой и группой, принимавшей ФЛ ( $n = 3$  для обеих групп,  $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента) (Рисунок 20В). Было предположено, что столь

небольшие различия, даже будучи статистически значимыми, вряд ли имеют существенное физиологическое значение. Для проверки этой гипотезы использовали иммуногистохимическое окрашивание с антителами к клаудину-7 в качестве маркера локализации белков ПК (рисунок 20Б) и оценили его распределение в обеих группах животных. Этот эксперимент выявил значительную разницу в мембранной локализации клаудина-7 между двумя экспериментальными группами: апикальное связывание клаудина-7 в группе ФЛ было ниже, чем в контрольной группе ( $n = 3$  для обеих групп,  $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента) (Рисунок 20Г). Таким образом, краткосрочное добавление фосфолипидов влияет на связывание клаудина-7 и ширину ПК. Однако прямой анализ эпителиальной проницаемости с помощью перорального введения FITC-декстрана 4 кДа *in vivo* показал, что этих различий недостаточно для нарушения кишечного барьера на функциональном уровне (Рисунок 20Г).

Предположительно, двухнедельное накопление ФЛ в кишечнике животных не воспроизводит эффект хронического накопления ФЛ, характерного для врожденного дефекта кишечника и раннего начала воспаления в генетической модели с нокаутом гена *Muc2*. Для того чтобы воспроизвести накопление ФЛ в пре- и постнатальный период, был проведен эксперимент по их долгосрочному введению животным линии C57BL/6. Беременным самкам начали вводить смесь ФЛ в концентрациях и способом, описанным для двухнедельного эксперимента, причем такое кормление продолжалось до отъема потомства, после чего потомство получало ФЛ до конца эксперимента. Далее с помощью ТЭМ была исследована морфология клеток кишечного эпителия на ультраструктурном уровне.

Было обнаружено, что заметные различия касались только строения митохондрий и значительного накопления липидных капель в интракристальном пространстве митохондрий и в цитоплазме (Saydakova *et al.*, 2023). Далее была оценена структура ПК и АК, чтобы определить связь такого митохондриального повреждения и проницаемости кишечного барьера. Однако значимых изменений в организации межклеточных контактов на фоне длительного введения фосфолипидов выявлено не было (Рисунок 21).

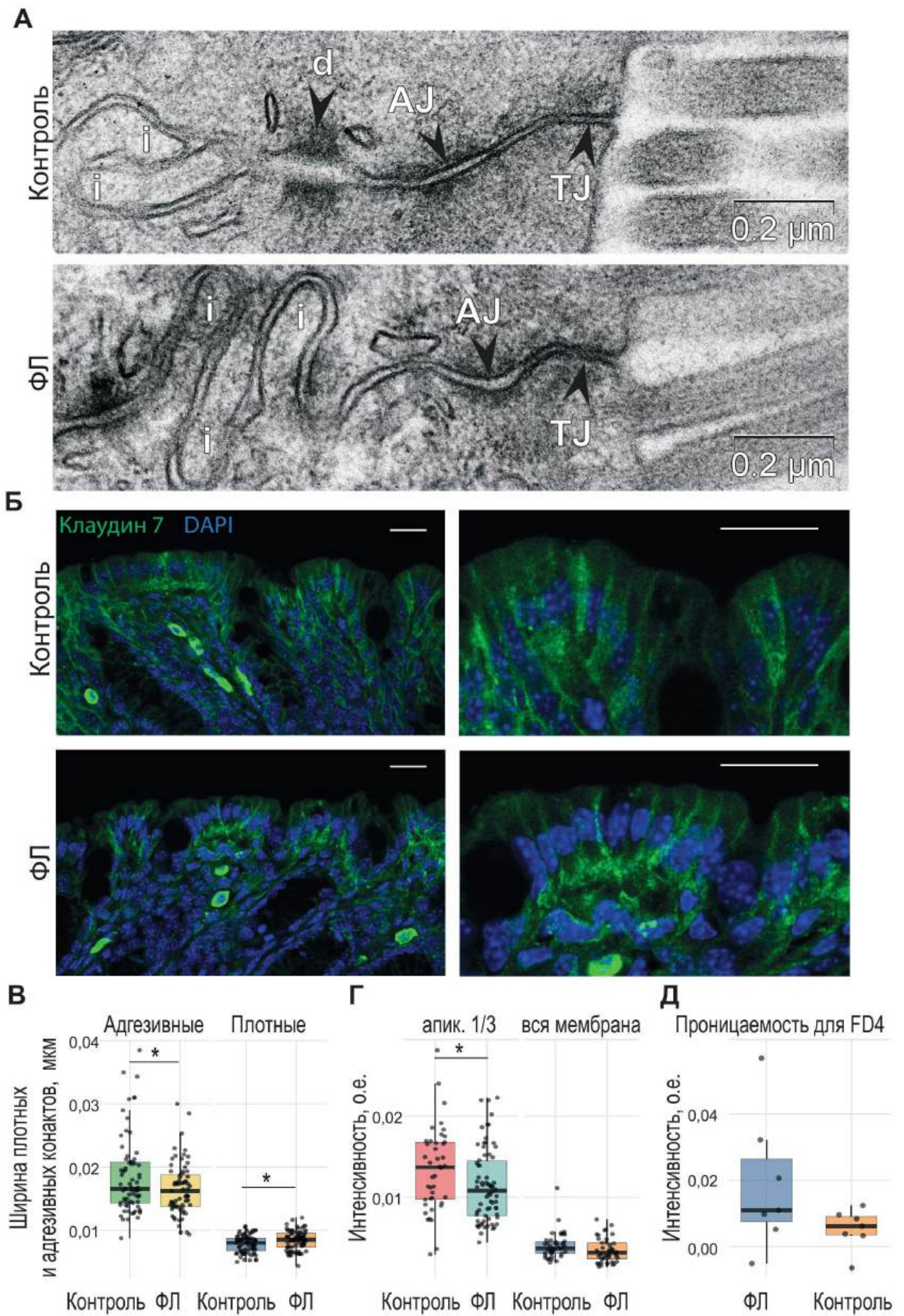
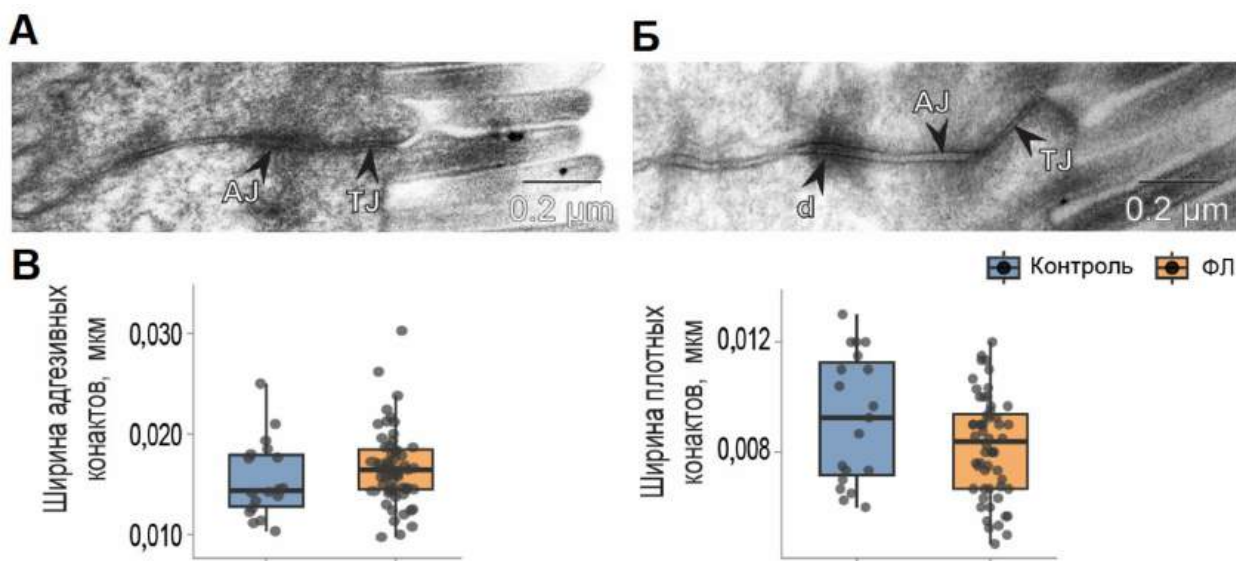


Рисунок 20. Ультраструктурный анализ морфологии плотных и адгезивных

контактов, иммуногистохимический анализ локализации клаудина-7 и кишечная проницаемость при добавлении фосфолипидов в диету мышей в течение двух недель. (А) Электронно-микроскопические изображения апикальных контактов между клетками. АЖ – адгезивный контакт; d – десмосома; i – интердигитации; TJ – плотный контакт. (Б) Иммуноокрашивание клаудина-7 в толстой кишке контрольных мышей и мышей, получавших ФЛ в течение двух недель. Масштаб – 15 мкм. (В) Морфометрический анализ ширины плотных (ТЖ) и адгезивных (АЖ) контактов. (Г) Количественная оценка интенсивности флуоресценции клаудина-7 на латеральной клеточной мембране и в ее апикальной трети. (Д) Оценка кишечной проницаемости с помощью FITC-декстран 4 кДа ( $n = 7$  для обеих групп, \*  $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента).

Таким образом, было показано, что увеличение дозы экзогенных ФЛ приводит к нарушениям структуры и функции митохондрий и накоплению липидных капель в эпителии толстой кишки мышей. Однако эти нарушения не являются достаточными для формирования барьерной дисфункции, характерной для ВЗК. Приведенные данные позволяют заключить, что из всех метаболитов, обнаруживших достоверные изменения на фоне хронического воспаления, накопление ФЛ, а именно ФХ, ФС и ФА, вероятно, не является причиной повреждения эпителиального барьера.



**Рисунок 21.** Длительное кормление ФЛ не вызывает нарушений плотных и адгезивных контактов в эпителии толстой кишки мышей. (А–Б) Электронно-микроскопические изображения толстой кишки мышей, получавших ФЛ в диете, начиная с внутриутробного развития и до взрослого возраста. (А) Контроль. (Б) Мыши после кормления ФЛ. АЖ – адгезивный контакт; d – десмосома; TJ – плотный контакт. (В) Морфометрический анализ АК и ПК ( $n = 3$  для обеих групп, \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $t$ -критерий Стьюдента).

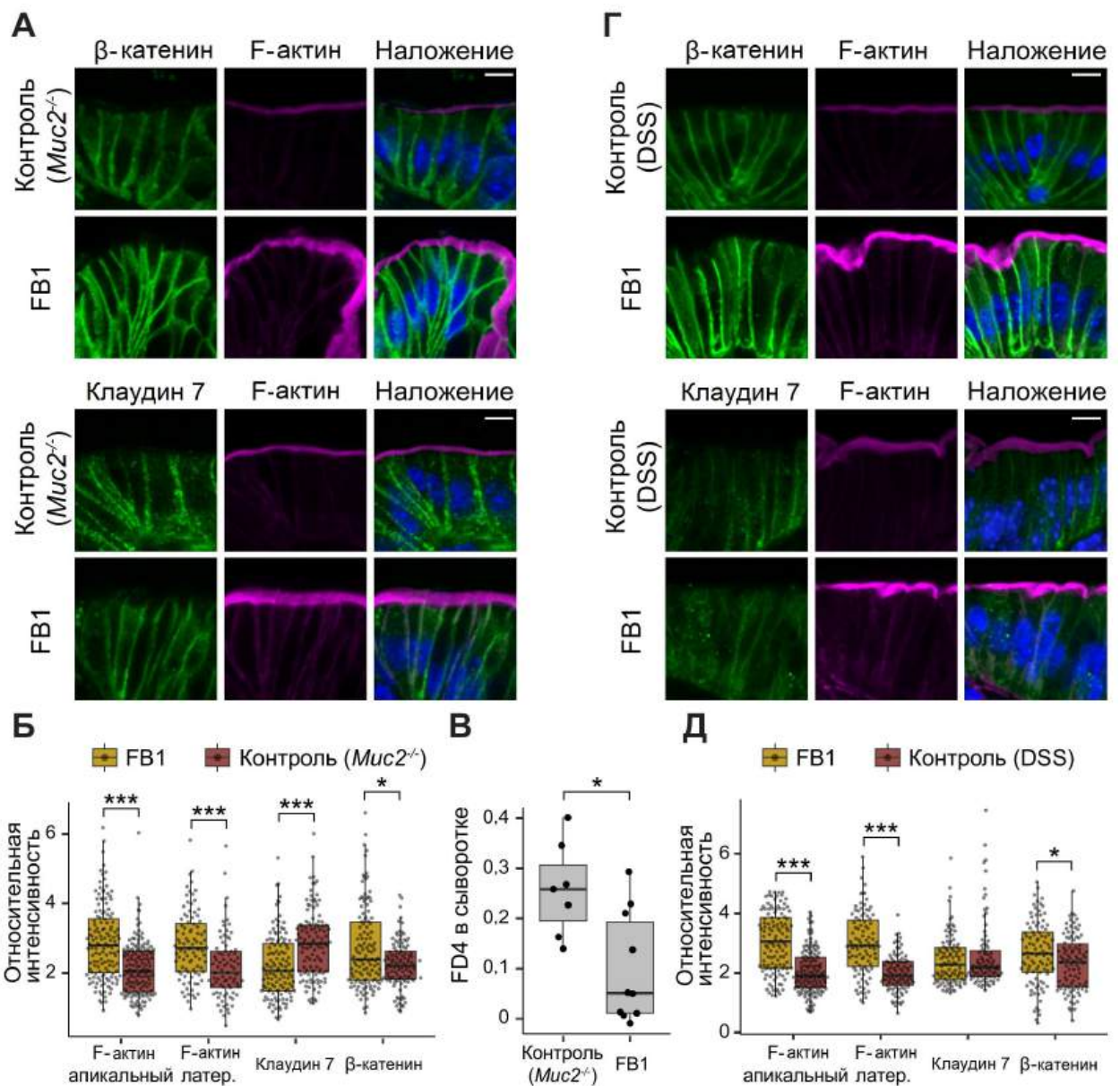
### 5.3 Роль церамидов в формировании эпителиального барьера

Результаты, приведенные в разделе 5.2 показали, что из тех липидов, повышение которых наблюдалось в кишечнике мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>*, ФЛ

не могут быть ответственны за нарушение эпителиального барьера у этих животных. Поэтому было сделано предположение, что сфинголипиды, а именно церамиды, могут быть потенциальным метаболическим регулятором барьерной функции кишечника.

Для функциональной проверки гипотезы о том, что накопление церамида нарушает эпителиальный барьер, синтез церамида ингибировали с использованием фумонизина В1. Фумонизин В1 (Fumonisin B1, FB1) является ингибитором церамидсинтаз и известен своей токсичностью, поэтому использовался в низких дозах посредством ректального введения. Такое введение частично восстановило организацию F-актина у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* (FB1-*Muc2<sup>-/-</sup>* vs *Muc2<sup>-/-</sup>*), согласно *U*-тесту Манна–Уитни (апикальный F-актин:  $Z = 6,24$ ,  $p < 0,001$ ; латеральный F-актин:  $Z = 4,37$ ,  $p < 0,001$ ) (Рисунок 22А-Б). Ингибирование биосинтеза церамида также повлияло на распределение белков межклеточных контактов, способствуя латеральной локализации  $\beta$ -катенина при смещении клаудина-7 (FB1-*Muc2<sup>-/-</sup>* vs *Muc2<sup>-/-</sup>*), согласно *U*-тесту Манна–Уитни ( $\beta$ -катенин:  $Z = 2,31$ ,  $p = 0,021$ ; клаудин-7:  $Z = -4,9$ ,  $p < 0,001$ ) (Рисунок 22А-Б).

Функциональный тест проницаемости кишечника *in vivo* показал, что ректальное введение фумонизина В1 снизило уровень FITC-декстрана 4 кДа в сыворотке крови у животных с дефицитом муцина, что указывает на частичное восстановление функции кишечного барьера (FB1-*Muc2<sup>-/-</sup>* vs *Muc2<sup>-/-</sup>*), согласно *U*-тесту Манна–Уитни ( $Z = -2,43$ ,  $p = 0,013$ ) (Рисунок 22В). У мышей, получавших DSS, воздействие фумонизина В1 также привело к значительному увеличению флуоресценции F-актина в срезах толстой кишки (FB1-DSS vs DSS), согласно *U*-тесту Манна–Уитни (апикальный F-актин:  $Z = 7,79$ ,  $p < 0,001$ ; латеральный F-актин:  $Z = 6,87$ ,  $p < 0,001$ ) (Рисунок 22Г, Д). Аналогично модели *Muc2<sup>-/-</sup>*, при DSS-индуцированном колите ингибитор церамидсинтаз также повлиял на локализацию  $\beta$ -катенина, но не клаудина-7 (FB1-DSS vs DSS), согласно *U*-тесту Манна–Уитни ( $\beta$ -катенин:  $Z = 2,43$ ,  $p = 0,0197$ ; клаудин-7:  $Z = -0,36$ ,  $p = 0,72$ ) (Рисунок 22Д).



**Рисунок 22. Ингибирование биосинтеза церамида частично восстанавливает проницаемость кишечного барьера в мышиных моделях хронического колита.** (А) Иммуноокрашивание клаудина-7 и β-катенина в толстой кишке мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>* после ректального введения фузонизина В1 (FB1) в течение 12 часов. Масштаб — 10 мкм. (Б) Количественная оценка интенсивности флуоресценции F-актина, клаудина-7 и β-катенина на клеточной мембране эпителиоцитов толстой кишки мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* после введения FB1 (*U*-тест Манна–Уитни,  $p < 0,001$ ,  $n = 3$ ). (В) Анализ проницаемости *in vivo* у мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>* после обработки FB1 (*U*-тест Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ,  $n = 7 - 10$ ). (Г) Иммуноокрашивание клаудина-7 и β-катенина в толстой кишке мышей с DSS-индуцированным колитом после ректального введения FB1 в течение 12 часов. Масштаб — 10 мкм. (Д) Количественная оценка интенсивности флуоресценции F-актина, клаудина-7 и β-катенина на клеточной мембране эпителиоцитов толстой кишки мышей с DSS-индуцированным колитом после введения FB1 (*U*-тест Манна–Уитни,  $p < 0,001$ ,  $n = 3$ ).

Эти данные свидетельствуют о том, что накопление церамидов в эпителии толстой кишки нарушает организацию актинового цитоскелета, что приводит к делокализации белков ПК и АК и последующему увеличению параклеточной проницаемости. Это согласуется с известными

механизмами, в которых церамиды, действуя как вторичные посредники, активируют ключевые эффекторы, такие как церамид-активируемая белковая фосфатаза и атипичная РКС $\zeta$ , которые, в свою очередь, модулируют передачу сигналов по МАРК-пути, способствуя развитию воспалительных и апоптотических ответов. В то же время ключевые ФЛ, которые увеличивались в составе метаболомного профиля мышей с генетической предрасположенностью к колиту, сами по себе не влияли на барьерную функцию кишечника и структуру ПК и АК. Таким образом, одним из ключевых классов метаболитов, опосредующих нарушение целостности эпителиального барьера при ВЗК, следует считать сфинголипиды, в частности, церамиды.

Ожидаемый эффект, который также был проверен здесь, — это связь между значительным повреждением митохондрий и проницаемостью кишечного барьера. Ряд работ, включая собственное исследование, предполагает, что митохондриальная дисфункция влияет на локализацию белков межклеточных контактов. Полученные данные показывают, что умеренное митохондриальное повреждение само по себе недостаточно для дестабилизации эпителиального барьера.

## Глава 6. Микробиота и метаболизм аминокислот во взаимодействии «кишечник–мозг»

Было замечено, что ВЗК часто сопровождаются психическими расстройствами, включая тревожность, депрессию, биполярное расстройство и бессонницу (Neuendorf *et al.*, 2016). По разным оценкам, до 35–40% пациентов с ВЗК страдают от тревожности, и до 22–25% — от депрессии, что указывает на сильное взаимодействие между кишечным воспалением и центральной нервной системой (ЦНС) (Moulton *et al.*, 2019). Связанные с микробиотой молекулы могут потенциально влиять на нейрофизиологию и поведение хозяина, служа предшественниками для биосинтеза нейромедиаторов и регулируя нейрогенез (Vuong *et al.*, 2017). В частности, микробный метаболизм существенно влияет на общий метаболомный профиль хозяина, включая аминокислоты, короткоцепочечные жирные кислоты, липиды и промежуточные метаболиты. Однако механизмы, лежащие в основе формирования психических расстройств при ВЗК, все еще не до конца ясны из-за сложности этого заболевания.

Модели хронического воспаления кишечника *in vivo* позволяют воспроизводить не только воспаление, но и ассоциированное с ним нарушение микробиоты кишечника. Они могут быть использованы для изучения взаимодействия микробного метаболизма и ЦНС в условиях физиологического дисбиоза. Для оценки поведенческих нарушений, связанных с изменением микробиоты и метаболизма при ВЗК, в этом исследовании применялись две модели хронического воспаления кишечника: линия мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* (модель генетически обусловленного колита) и модель химически индуцированного колита (индукция с помощью DSS).

## 6.1 Оценка метаболизма и поведения на модели генетически обусловленного колита

Для понимания взаимосвязи между хроническим колитом, микробиотой и функцией ЦНС были использованы мыши с нокаутом гена, кодирующего муцин-2 (*Muc2*<sup>-/-</sup>). Следует отметить, что у мышей с двойным нокаутом генов *Muc2* и *Kaiso* были обнаружены нарушения социального поведения (Кожевникова и соавт., 2015). Была исследована роль метаболизма, ассоциированного с микробиотой кишечника, в регуляции различных аспектов поведения хозяина.

### 6.1.1 Поведенческий фенотип самцов мышей линии *Muc2*<sup>-/-</sup>

Для оценки влияния хронического воспаления в модели с нокаутом гена *Muc2* на ЦНС было проведено поведенческое фенотипирование с использованием самцов мышей линии C57BL/6 в качестве контрольной группы. Поведенческие характеристики в условиях домашней клетки оценивали с использованием системы Phenomaster (TSE Systems) (Рисунок 23А). У самцов *Muc2*<sup>-/-</sup> по сравнению с контрольными животными выявлено статистически значимое снижение двигательной активности ( $n = 9-12$ ,  $t = 2,46$ ,  $p = 0,024$ ;  $t$ -критерий Стьюдента) и увеличение скорости потребления воды ( $t = -3,59$ ,  $p = 0,002$ ;  $t$ -критерий Стьюдента). Повышенное потребление воды, вероятнее всего, является следствием диареи у мутантных мышей.

Однако в условиях новизны локомоторная активность у самцов *Muc2*<sup>-/-</sup> была повышена, что было выявлено в тесте «Открытое поле» (Рисунок 23Б). У животных *Muc2*<sup>-/-</sup> наблюдалось увеличение пройденного расстояния на уровне тенденции ( $n = 18-20$ ,  $t = -1,91$ ,  $p = 0,06$ ;  $t$ -критерий Стьюдента), значимое увеличение вертикальной активности (стойки:  $t = -2,326$ ,  $p = 0,026$ ;  $t$ -критерий Стьюдента), а также увеличение времени пребывания в центре арены ( $Z = -3,333$ ,  $p < 0,001$ ;  $U$ -тест Манна–Уитни), что интерпретируется как снижение признаков тревожности. Эти результаты были подтверждены в тесте «Темно-светлая камера» (Рисунок 23В), где у животных *Muc2*<sup>-/-</sup> отмечалось большее пройденное расстояние ( $n = 17-20$ ,  $t = -3,067$ ,  $p = 0,004$ ;  $t$ -критерий Стьюдента), увеличенное время

пребывания в светлом отсеке ( $t = -3,08$ ,  $p = 0,004$ ;  $t$ -критерий Стьюдента) и большее число переходов между отсеками ( $t = -3,66$ ,  $p < 0,001$ ;  $t$ -критерий Стьюдента).

В тесте с закапыванием шариков животные *Muc2<sup>-/-</sup>* закапывали значительно меньше шариков по сравнению с животными дикого типа ( $n = 17-20$ ,  $Z = 2,93$ ,  $p = 0,003$ ;  $U$ -тест Манна–Уитни; Рисунок 23Г), что следует расценивать как снижение стереотипного поведения. Поведенческое фенотипирование не выявило депрессивно-подобных черт, но показало преимущество в моторных характеристиках у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* (Morozova *et al.*, 2022).

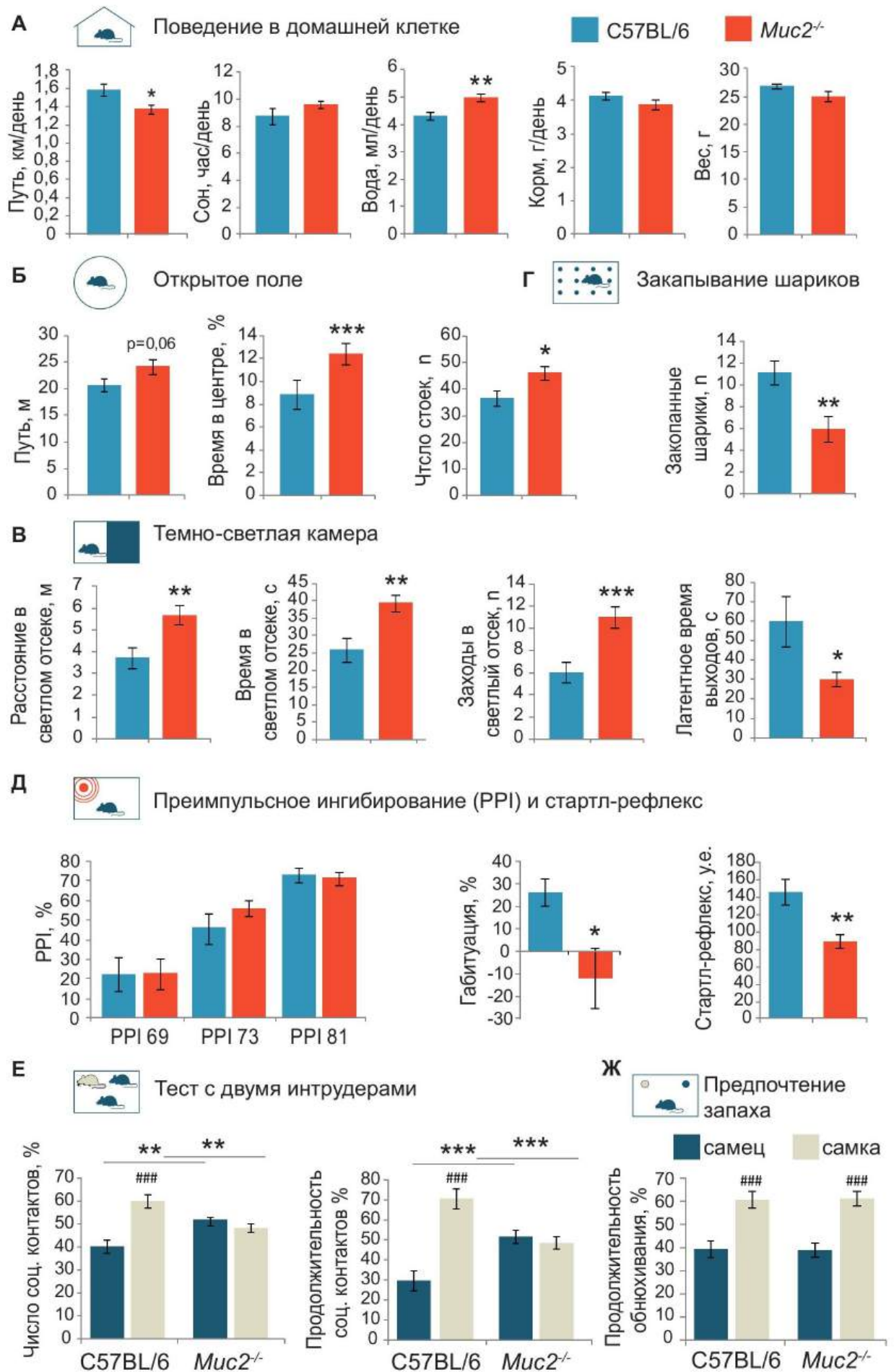
Сенсомоторная фильтрация (sensorimotor gating) в модели *Muc2<sup>-/-</sup>* оценивалась по преимпульсному торможению (Prepulse Inhibition, PPI), стартл-рефлексу и привыканию к акустическому сигналу. Существенных различий в PPI между контрольными животными и мышами линии *Muc2<sup>-/-</sup>* не наблюдалось, однако у мутантных мышей регистрировался более слабый стартл-рефлекс ( $n = 16-18$ ,  $t = 3,246$ ,  $p = 0,003$ ;  $t$ -критерий Стьюдента) и сниженная габитуация к звуку ( $Z = 2,17$ ,  $p = 0,03$ ;  $U$ -тест Манна–Уитни; Рисунок 23Д), что свидетельствует о вовлечении нейронных связей, отвечающих за сенсомоторную фильтрацию у мышей *Muc2<sup>-/-</sup>*.

Тест на социальное предпочтение показал, что мутация *Muc2<sup>-/-</sup>* не приводит к формированию аутичноподобного фенотипа, поскольку мутантные мыши сохраняют предпочтение другого животного по сравнению с неодушевленным объектом. Однако, в отличие от контрольных мышей, у самцов *Muc2<sup>-/-</sup>* отсутствовало предпочтение самок, и они демонстрировали сравнимый уровень интереса как к самцам, так и к самкам в поведенческой парадигме «резидент-интродер» (Рисунок 23Е). У контрольных самцов отмечалось выраженное предпочтение к самке, тогда как у мутантных животных предпочтение самки не выявлялось. Кроме того, самцы *Muc2<sup>-/-</sup>* проводили значительно больше времени во взаимодействии с самцом-интродером по сравнению с контрольными самцами, что указывает на существенный сдвиг социального предпочтения. Для оценки влияния генотипа резидента и пола интродера на количество и длительность социальных контактов был использован двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями по фактору «пол интродера» с

последующим апостериорным тестом Фишера LSD. Было выявлено статистически значимое взаимодействие между факторами ( $n = 10-11$ , количество контактов:  $F(1, 38) = 21,990$ ,  $p < 0,001$ ; длительность контактов:  $F(1, 38) = 26,045$ ,  $p < 0,001$ ). В этом тесте у самцов  $Muc2^{-/-}$  регистрировали большее количество контактов и их длительность по сравнению с контрольными животными. При использовании самки в качестве интродера по данным теста Фишера LSD самцы  $Muc2^{-/-}$  демонстрировали половое поведение реже, чем контрольные животные (количество контактов, C57BL/6, самец *vs* самка):  $p < 0,001$ , тест Фишера LSD; длительность контактов, C57BL/6, самец *vs* самка:  $p < 0,001$ , тест Фишера LSD. Количество контактов с интродером-самцом/самкой *vs* C57BL/6:  $p < 0,01$ , тест Фишера LSD; длительность контакта с интродером-самцом/самкой *vs* C57BL/6:  $p < 0,001$ , тест Фишера LSD, поправка Бенджамини-Хохберга).

Для проверки влияния мутации  $Muc2^{-/-}$  на восприятие социально значимых ольфакторных сигналов был проведен тест на предпочтение запахов с использованием подстила из клеток самок и самцов (Рисунок 23Ж). В этом тесте по данным дисперсионного анализа (ANOVA RM) выявлено статистически значимое влияние пола животного, чей запах предъявлялся тестируемому самцу ( $F(1, 62) = 34,17$ ,  $p < 0,001$ ), при этом самцы  $Muc2^{-/-}$  различали запахи самцов и самок с той же частотой, что и контрольные животные ( $n = 12-21$ , длительность обнюхивания, самец *vs* самка:  $p < 0,001$ , тест Фишера LSD с поправкой).

В целом, основными поведенческими особенностями самцов мышей линии  $Muc2^{-/-}$  являются повышенная локомоторная и исследовательская активность в ситуации новизны, снижение черт тревожного поведения, ослабленный стартл-рефлекс и отсутствие поведенческой дискриминации между самцами- и самками-интродерами. Эти изменения преимущественно характерны для самцов, и влияние мутации в гене  $Muc2$  на поведение самок еще предстоит изучить.



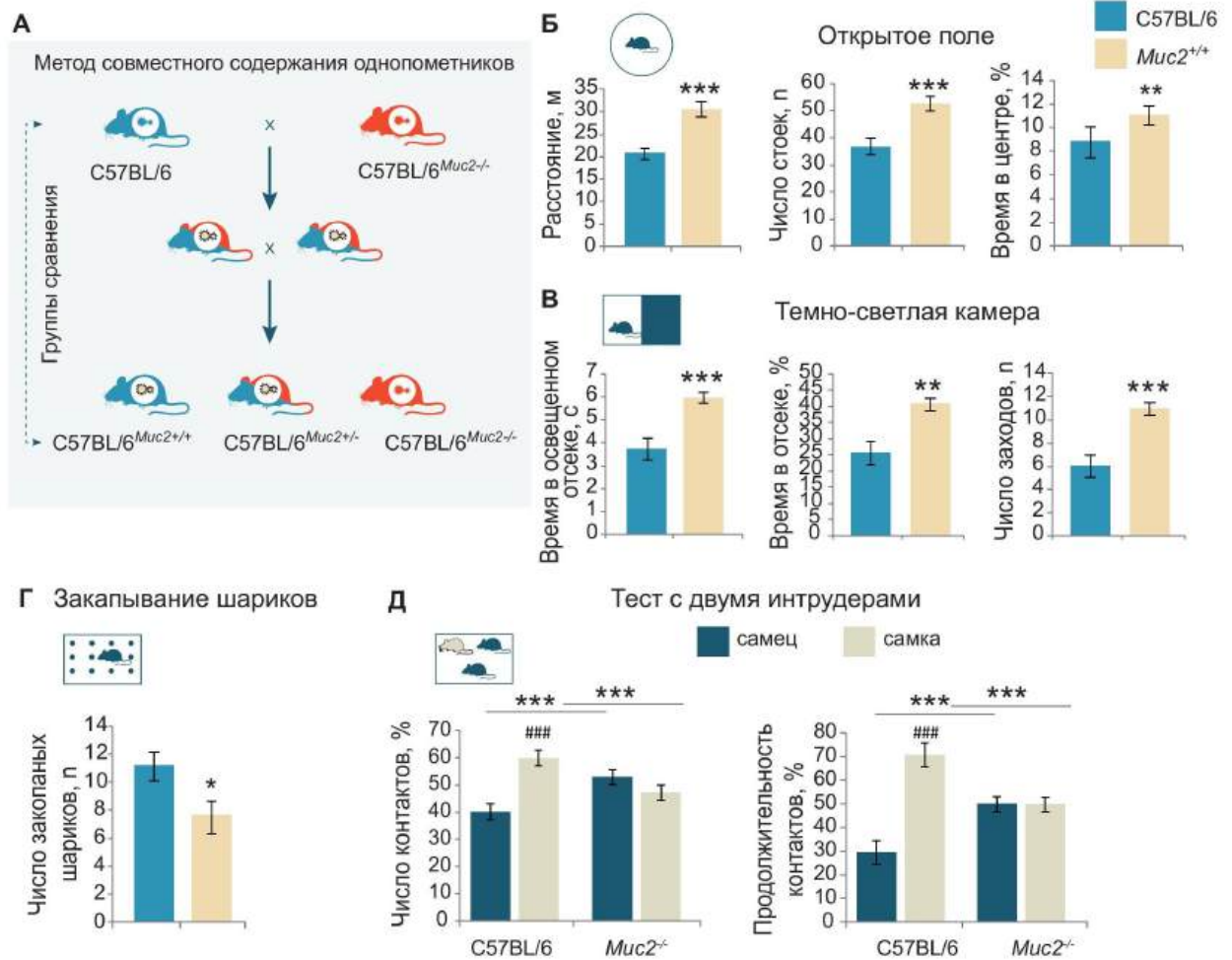
**Рисунок 23. Поведенческие характеристики самцов мышей *Musc2<sup>-/-</sup>*.** (А) Поведение в домашней клетке ( $n = 9 - 12$ ). (Б) Тест «Открытое поле» ( $n = 18 - 20$ ). (В) Тест «Темно-светлая камера» ( $n = 17 - 20$ ). (Г) Тест с закапыванием шариков ( $n = 17 - 20$ ). (Д) Габитуация и стартл-рефлекс ( $n = 16 - 18$ ). (Е) Тест с двумя интродуерами ( $n = 10 - 11$ ). (Ж) Тест предпочтения запахов ( $n = 12 - 21$ ). \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ , vs C57BL/6. ### -  $p < 0,001$ , самец vs самка.

Для проверки гипотезы о роли микробиоты в формировании поведенческого фенотипа было оценено поведение однопометников мутантных животных (группа *Musc2<sup>+/+</sup>*) в сравнении с животными C57BL/6 с идентичным генетическим фоном (Рисунок 24А). Целью эксперимента являлась оценка влияния микробиоты кишечника на поведение генетически интактных животных *Musc2<sup>+/+</sup>*, полученных от гетерозиготных родителей. Предположительно, именно совместное содержание животных *Musc2<sup>+/+</sup>* с мышами линии *Musc2<sup>-/-</sup>* в юном возрасте обеспечивало обмен микробиотой (метод совместного содержания, co-housing).

Мыши *Musc2<sup>+/+</sup>* воспроизвели многие поведенческие особенности животных *Musc2<sup>-/-</sup>* в тестах «Открытое поле», «Темно-светлая камера» и закапывания шариков (Рисунок 24). В тесте «Открытое поле» самцы группы *Musc2<sup>+/+</sup>* демонстрировали значительно большую общую двигательную активность по сравнению с животными C57BL/6 ( $n = 18-20$ , пройденное расстояние:  $t = -3,895$ ,  $p < 0,001$ ; вертикальные стойки:  $t = -4,97$ ,  $p < 0,001$ ;  $t$ -критерий Стьюдента) и сниженный уровень тревожных черт (увеличение времени пребывания в центре арены:  $Z = -2,997$ ,  $p < 0,001$ ;  $U$ -тест Манна–Уитни; Рисунок 24Б). В тесте «Темно-светлая камера» животные *Musc2<sup>+/+</sup>* были более активны в светлом отсеке по сравнению с C57BL/6 ( $n = 17-20$ , пройденное расстояние:  $t = -4,019$ ,  $p < 0,001$ ; время в светлом отсеке:  $t = -3,584$ ,  $p < 0,001$ ; количество переходов между отсеками:  $t = -4,26$ ,  $p < 0,001$ ;  $t$ -критерий Стьюдента; Рисунок 24В). В тесте с закапыванием шариков животные *Musc2<sup>+/+</sup>* закапывали меньше шариков по сравнению с C57BL/6 ( $n = 17-20$ ,  $Z = 2,22$ ,  $p = 0,026$ ;  $U$ -тест Манна–Уитни; Рисунок 24Г), что согласуется со сниженным стереотипным поведением у мутантов.

Социальное поведение у животных *Musc2<sup>+/+</sup>* также было схоже с таковым у мутантов *Musc2<sup>-/-</sup>*: самцы *Musc2<sup>+/+</sup>* не показывали предпочтения самок, демонстрировали большее количество контактов с самцом-интродуером по сравнению с самцами C57BL/6, а также атаковали

самок и предпринимали попытки садок на самцов-интродеров (Рисунок 24Д).



**Рисунок 24. Поведенческие особенности ассоциированы с микробиотой мышей линии *Muc2*<sup>-/-</sup>.** (А) Схема метода совместного содержания однопометников. (Б) Тест «Открытое поле». (В) Тест «Темно-светлая камера». (Г) Тест с закапыванием шариков. (Д) Тест с двумя интродерами. \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , vs C57BL/6. ### –  $p < 0,001$ , самец vs самка.

По данным дисперсионного анализа повторных измерений с последующим апостериорным тестом Фишера LSD в тесте с двумя интродерами было показано статистически значимое взаимодействие между генотипом резидента и полом интродера ( $n = 10-11$ , количество контактов:  $F(1, 38) = 15,490$ ,  $p < 0,001$ ; длительность контактов:  $F(1, 38) = 28,306$ ,  $p < 0,001$ ), а также различия в предпочтении в отношении самок и самцов-интродеров у контрольных животных C57BL/6 (количество контактов и их длительность:  $p < 0,01$ , тест Фишера LSD) и между *Muc2*<sup>+/+</sup> и C57BL/6 (количество контактов:  $p = 0,008$ ; длительность контактов:  $p < 0,01$ , тест Фишера LSD с поправкой).

Далее было выдвинуто предположение, что если поведенческие характеристики животных *Muc2<sup>+/+</sup>* формируются в результате переноса микробиоты от *Muc2<sup>-/-</sup>*, то прямое совместное содержание с контрольными мышами C57BL/6 должно минимизировать фенотипические различия между этими группами. Для проверки этой гипотезы было проведено совместное содержание генетически идентичного потомства-однопометников *Muc2<sup>+/+</sup>* и животных C57BL/6 с целью выравнивания состава их микробиоты, в результате чего значимых различий в той же панели поведенческих тестов обнаружено не было (Morozova *et al.*, 2022). Эти данные свидетельствуют о том, что поведенческие особенности у животных *Muc2<sup>-/-</sup>*, по крайней мере частично, связаны с изменением состава микробиоты, а не только кишечным воспалением. Вероятно, микробиота смягчает неблагоприятное влияние колита на физиологию центральной нервной системы и маскирует потенциальные поведенческие дефициты у мутантных мышей.

### 6.1.2 Оценка роли микробиоты кишечника в формировании поведенческих черт на модели *Muc2<sup>-/-</sup>*

Кишечное бактериальное сообщество у мутантных мышей и их однопометников без мутации охарактеризовали с использованием секвенирования нового поколения гипервариабельного региона V3–V4 гена 16S рРНК. Анализ главных компонент (РСА) показал, что у мутантных животных присутствуют существенные различия в составе кишечного бактериального сообщества, которые передаются однопометникам *Muc2<sup>+/+</sup>* при переносе микробиоты. По первой главной компоненте РС1 было выявлено значимое влияние группы ( $n = 4$  на группу, критерий Краскела–Уоллиса:  $p = 0,044$ ), а также статистически значимые отличия между группами C57BL/6 и *Muc2<sup>-/-</sup>* и между C57BL/6 и *Muc2<sup>+/+</sup>* ( $U$ -тест Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга: *Muc2<sup>-/-</sup>*:  $Z = 2,16$ ,  $p = 0,03$ ; *Muc2<sup>+/+</sup>*:  $Z = 2,16$ ,  $p = 0,03$ ; Рисунок 25А). Качественный анализ относительного содержания десяти наиболее распространенных бактериальных родов показал тенденцию к снижению доли *Blautia* и *Escherichia-Shigella* и увеличению доли *Akkermansia* при передаче ассоциированной с мутацией *Muc2* микробиоты (Рисунок 25Б). ПЦР в

реальном времени со специфичными праймерами подтвердила значимое увеличение *Akkermansia muciniphila* (Mogozova *et al.*, 2022).

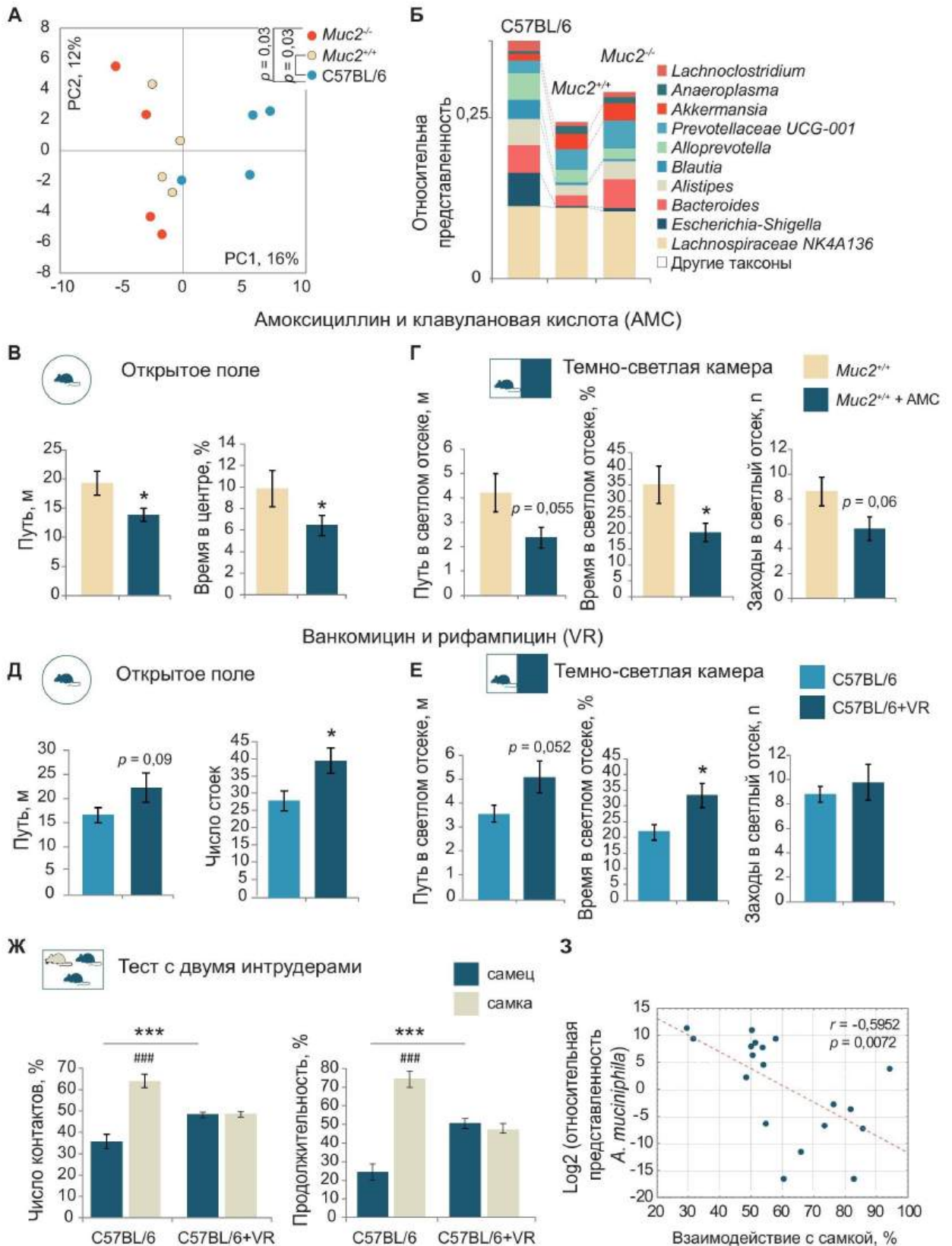
Связь между поведенческими особенностями и микробиотой у мышей группы *Muc2<sup>+/+</sup>* оценивали путем добавления в питье животных амоксициллина в комбинации с клавулановой кислотой (АМС) с последующим проведением тестов «Открытое поле» и «Темно-светлая камера». Значимое снижение содержания *A. muciniphila* в кишечнике *Muc2<sup>+/+</sup>* после добавления АМС было подтверждено методом ПЦР в реальном времени (Mogozova *et al.*, 2022). В тесте «Открытое поле» добавление АМС приводила к уменьшению двигательной активности ( $n = 10$  в группе, пройденное расстояние:  $t = 2,34$ ,  $p = 0,03$ ; двухвыборочный  $t$ -критерий Стьюдента), а также к усилению тревожных черт (время пребывания в центре:  $Z = -1,97$ ,  $p = 0,049$ ;  $U$ -тест Манна–Уитни; Рисунок 25В). В тесте «Темно-светлая камера» после предоставления АМС отмечалось увеличение времени пребывания в темном отсеке и тенденция к снижению исследовательской активности в светлом отсеке, ( $n = 10$  в группе, время в светлом отсеке:  $t = 2,30$ ,  $p = 0,034$ ; пройденное расстояние:  $t = 2,05$ ,  $p = 0,055$ ; количество переходов:  $t = 2,008$ ,  $p = 0,059$ ;  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 25Г). При этом клинический балл у животных *Muc2<sup>+/+</sup>* после добавления АМС оставался равным 0, и признаков болезненного поведения не наблюдалось (Mogozova *et al.*, 2022). Эти результаты указывают на то, что ингибирование роста кишечных бактерий, в частности, *A. muciniphila*, ассоциировано с нормализацией части поведенческих черт, связанных с хроническим колитом *Muc2*.

Было сделано предположение, что наблюдаемый поведенческий фенотип связан с повышенным содержанием *Akkermansia*, поскольку этот род был единственным, доля которого увеличивалась в составе микробиома как у мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>*, так и у животных группы *Muc2<sup>+/+</sup>*, а содержание *A. muciniphila* у животных *Muc2<sup>-/-</sup>* оказалось значимо выше, чем у C57BL/6 (Рисунок 25Б). Для проверки этой гипотезы пролиферацию *A. muciniphila* у мышей C57BL/6 стимулировали с помощью ванкомицина, который, как показано ранее, повышает долю *Akkermansia* в составе микробиома кишечника. С учетом того, что ванкомицин может вызывать выраженное увеличение доли *E. coli* и ранее

полученных данных о повышенной чувствительности, обнаруженной у C57BL/6 *E. coli* к рифампицину, в эксперименте использовали комбинацию ванкомицина и рифампицина (VR). ПЦР-анализ показал, что данная схема антибиотикотерапии эффективно повышает уровень *A. muciniphila* в содержимом кишечника и одновременно предотвращает рост *E. coli* (Morozova *et al.*, 2022).

Для оценки влияния увеличения доли *Akkermansia* на исследовательскую активность, тревожное поведение и социальные взаимодействия проводили тесты «Открытое поле», «Темно-светлая камера» и тест с двумя интродерами. В тесте «Открытое поле» у животных, получавших VR, отмечалась тенденция к увеличению пройденного расстояния ( $n = 9$  в группе,  $Z = -1,79$ ,  $p = 0,09$ ;  $t$ -критерий Стьюдента), значимое повышение вертикальной активности (стойки:  $Z = -2,47$ ,  $p = 0,025$ ) и увеличение времени пребывания в центре арены ( $Z = -1,97$ ,  $p = 0,049$ ;  $U$ -тест Манна–Уитни; Рисунок 25Д). В тесте «Темно-светлая камера» частичное воспроизведение фенотипа мутантов проявлялось в виде повышенной активности в светлом отсеке после предоставления VR ( $n = 10$  в группе, время в светлом отсеке:  $Z = -2,553$ ,  $p = 0,022$ ; пройденное расстояние:  $Z = -2,09$ ,  $p = 0,052$ ; количество переходов:  $Z = -0,643$ ,  $p = 0,529$ ;  $t$ -критерий Стьюдента; Рисунок 25Е).

Наиболее выраженное влияние антибиотика VR оказывали на социальное поведение. В тесте с двумя интродерами двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями по фактору «пол интродера» выявил статистически значимое взаимодействие между факторами воздействия и пола интродера (количество контактов:  $F(1, 34) = 28,181$ ,  $p < 0,001$ ; длительность контактов:  $F(1, 34) = 56,854$ ,  $p < 0,001$ ). Для последующего сравнения групп применяли апостериорный тест Фишера LSD с поправкой.



**Рисунок 25. Кишечная микробиота определяет поведенческий фенотип в модели колита *Muc2*<sup>-/-</sup>.** (А) Анализ главных компонент (PCA) метагеномных данных на основе 70 наиболее распространенных родов ( $n = 4$ ). (Б) Качественные изменения среднего относительного содержания 10 наиболее распространенных бактериальных родов. (В) Тест «Открытое поле» после добавления AMC (амоксициллин/клавулановая кислота) ( $n = 10$  на группу). (Г) Тест «Темно-светлая камера» после добавления AMC ( $n = 10$  на группу). (Д) Тест «Открытое поле» после добавления VR

(ванкомицин/рифампицин) ( $n = 9$  на группу). **(Е)** Тест «Темно-светлая камера» после добавления VR ( $n = 9$  на группу). **(Ж)** Тест с двумя интродерами после добавления VR ( $n = 9 - 10$ ). **(З)** Корреляционный анализ между социальным взаимодействием с самкой и относительной долей *A. muciniphila* в микробиоме кишечного содержимого у контрольных самцов и животных после воздействия VR:  $r = -0,595$ ,  $p = 0,007$ , корреляционный анализ Пирсона. \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , vs контрольная группа. ### –  $p < 0,001$ , самец vs самка.

Анализ показал, что у контрольных животных линии C57BL/6 количество и длительность контактов с самкой значительно превышают таковые с самцом (оба сравнения:  $p < 0,001$ ), тогда как у животных, получавших VR, эти различия нивелируются, и количество контактов и их длительность зависят как от воздействия, так и от пола интродера (количество контактов в зависимости от воздействия и пола интродера:  $p < 0,001$ ; длительность контактов:  $p = 0,001$ ; Рисунок 25Ж). Дополнительно было показано, что время социального взаимодействия с самкой отрицательно коррелирует с содержанием *A. muciniphila* в содержимом кишечника тестируемых животных (коэффициент корреляции Пирсона:  $r = -0,595$ ,  $p = 0,007$ ; Рисунок 25З). В совокупности полученные данные позволяют рассматривать *A. muciniphila* в качестве потенциального микроорганизма, связанного с особенностями функционирования ЦНС при колите *Muc2*.

### 6.1.3 Роль глицина в реализации поведенческого фенотипа у мышей с мутацией в гене *Muc2*.

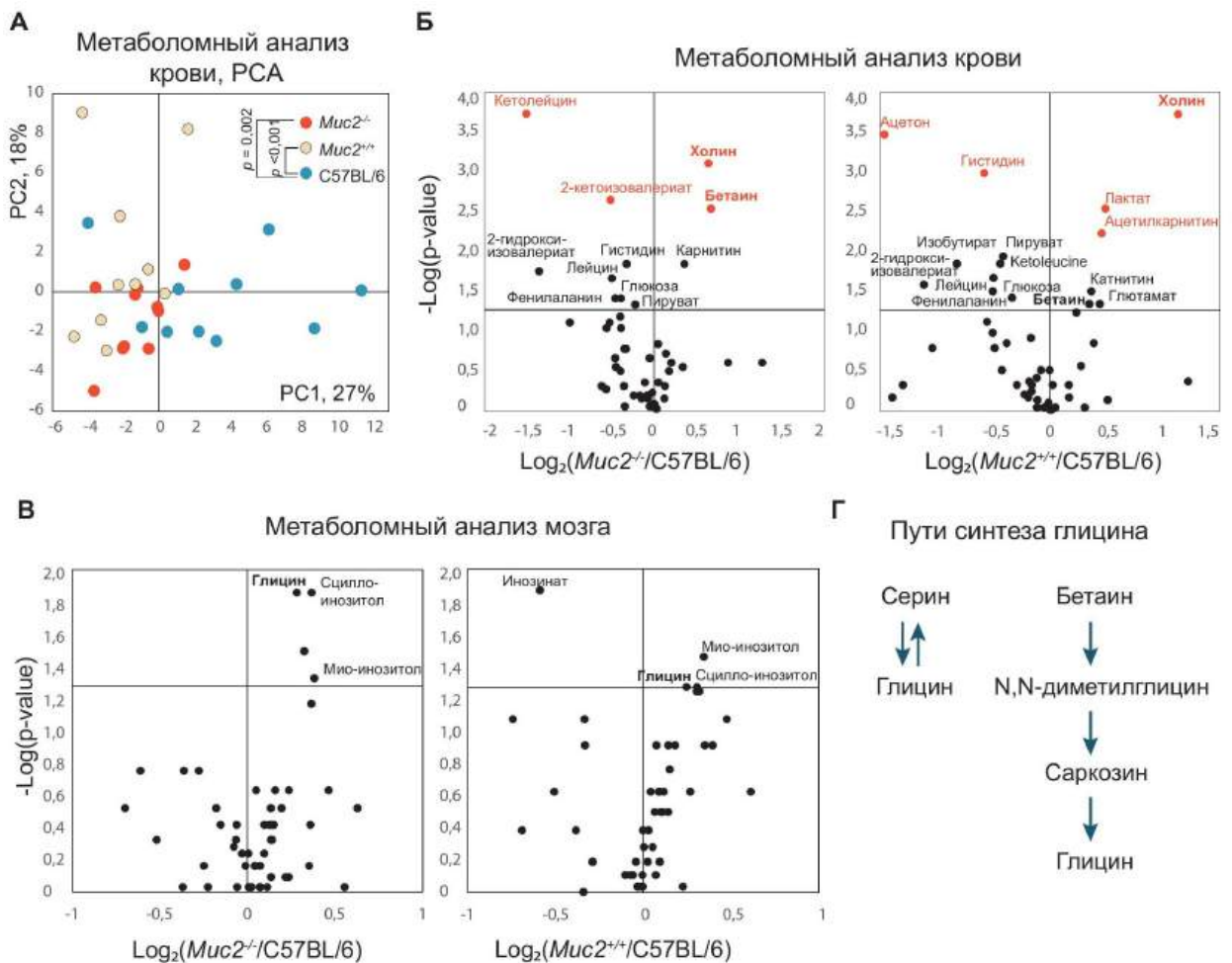
Поскольку перенос микробиоты частично воспроизводит поведенческие особенности у однопометников без мутации в отсутствие воспаления, было высказано предположение, что метаболомные изменения, индуцированные кишечными бактериями, могут опосредовать взаимодействие «кишечник–мозг» у животных линии *Muc2*<sup>-/-</sup>. Для проверки этой гипотезы было проведено метаболомное профилирование крови животных *Muc2*<sup>-/-</sup>, *Muc2*<sup>+/+</sup> и C57BL/6 с использованием ЯМР-спектроскопии. Анализ главных компонент показал, что совместное содержание однопометников *Muc2*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>+/+</sup> существенно влияет на метаболизм хозяина: метаболомный профиль C57BL/6 значимо отличался от двух других групп по первой главной компоненте PC1, объяснявшей около 26,6% дисперсии (однофакторный дисперсионный анализ с последующим пост-хок тестом Фишера LSD с поправкой, *Muc2*<sup>-/-</sup>

*vs* C57BL/6:  $p = 0,002$ ; *Muc2<sup>+/+</sup>* *vs* C57BL/6:  $p < 0,001$ , Рисунок 26А). Метаболиты со схожими изменениями у мышей групп *Muc2<sup>-/-</sup>* и *Muc2<sup>+/+</sup>* с большей вероятностью вовлечены в регуляцию поведенческого фенотипа, ассоциированного с мутацией в гене *Muc2*. К числу дифференциально представленных метаболитов относились холин, бетаин, кетолейцин, 2-гидроксиизовалерат, 2-кетоиовалерат, ацетилкарнитин, гистидин, а также ряд других аминокислот и митохондриальных метаболитов (Рисунок 26Б).

Для дальнейшего изучения эффекта совместного содержания на метаболизм мозга было проведено ЯМР-метаболическое профилирование ткани мозга животных групп *Muc2<sup>-/-</sup>*, *Muc2<sup>+/+</sup>* и C57BL/6. На основе 50 детектированных метаболитов РСА не выявил различий между группами. Однако по данным критерия Краскела–Уоллиса с последующим *U*-тестом Манна–Уитни были обнаружены значимые изменения ряда метаболитов в группах *Muc2<sup>-/-</sup>* и *Muc2<sup>+/+</sup>* по сравнению с C57BL/6 (Рисунок 26В,Д). В частности, уровни сцилло-инозитола, инозината и глицина (на уровне тенденции в группе *Muc2<sup>+/+</sup>*) в мозге были повышены в обеих тестовых группах (сцилло-инозитол: *Muc2<sup>-/-</sup>* *vs* C57BL/6,  $Z = -2,562$ ,  $p = 0,042$ ; *Muc2<sup>+/+</sup>* *vs* C57BL/6,  $Z = -2,008$ ,  $p = 0,067$ ; глицин: *Muc2<sup>-/-</sup>* *vs* C57BL/6,  $Z = -2,562$ ,  $p = 0,042$ ; *Muc2<sup>+/+</sup>* *vs* C57BL/6,  $Z = -2,008$ ,  $p = 0,067$ ; инозинат: *Muc2<sup>+/+</sup>* *vs* C57BL/6,  $Z = 2,556$ ,  $p = 0,042$ ). Из перечисленных соединений глицин представляет наибольший интерес, поскольку является нейромедиатором в центральной нервной системе и участвует в регуляции тревожности и сенсомоторной фильтрации.

Основной путь биосинтеза глицина — из серина через обратимую реакцию, катализируемую серингидрокси-метилтрансферазой. Также глицин может синтезироваться из холина через бетаин как промежуточный метаболит (Рисунок 26Г). Уровень серина был несколько повышен в мозге животных *Muc2<sup>+/+</sup>*, но значимых различий для этого метаболита обнаружено не было (Рисунок 26Д), в то время как ЯМР-анализ крови не выявил достоверного сигнала серина. При этом уровни холина и бетаина в крови были выше у животных *Muc2<sup>-/-</sup>* и *Muc2<sup>+/+</sup>* по сравнению с C57BL/6. ЯМР-анализ метаболитов мозга не показал различий по холину, тогда как бетаин не был обнаружен, но наблюдалось повышение глицерофосфохолина

в мозге. Таким образом, потенциальной причиной повышения уровня глицина в мозге могут быть связанные с бактериальным метаболизмом бетаин и холин крови.



**Рисунок 26.** Метаболомное профилирование крови и мозга мышей групп *Muc2*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>+/+</sup>. (А) Анализ главных компонент (PCA) метаболомных профилей крови по результатам ЯМР-спектроскопии ( $n = 10$  на группу). (Б) Вулкан-плоты метаболитов крови по данным ЯМР-спектроскопии. Горизонтальная линия соответствует уровню значимости  $p = 0,05$ . Вертикальная линия соответствует отношению, равному 1. Метаболиты с различиями при  $p < 0,01$  показаны красным цветом. На плотах приведены нескорректированные значения  $p$ -критерия. После применения поправки Бенжамина-Хохберга все изменения, отмеченные красным, сохраняются. (В) Вулкан-плоты метаболитов мозга по данным ЯМР-спектроскопии ( $n = 5-6$ ). На плотах приведены нескорректированные значения  $p$ -критерия. После применения поправки Бенжамина-Хохберга все изменения, отмеченные как достоверные, сохраняются, кроме различий по мио-инозитолу (нет различий) и по глицину в группах C57BL/6 и *Muc2*<sup>+/+</sup>, где  $p = 0,067$ . (Г) Схемы биосинтеза глицина из серина и бетаина. \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , vs C57BL/6. ## –  $p < 0,01$ , vs *Muc2*<sup>+/+</sup>.

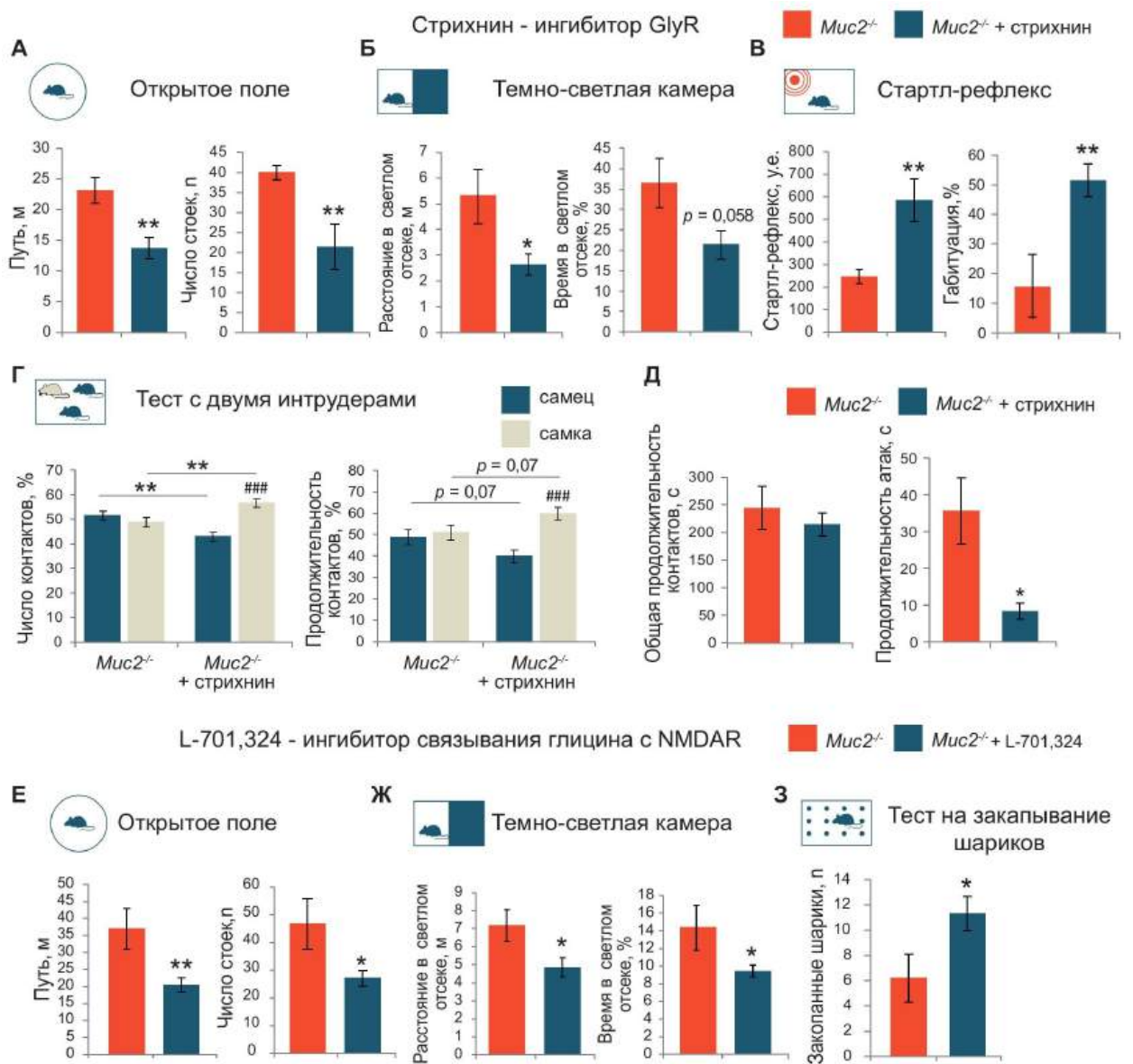
Глицин функционирует как тормозный нейромедиатор через стрихнин-чувствительные глициновые рецепторы (GlyR) и как ко-фактор активирующего нейромедиатора глутамата через глицин-связывающие сайты рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR). Для понимания роли глицин-зависимой нейротрансмиссии в регуляции поведения мышей с мутацией

в гене *Musc2* было проведено фармакологическое ингибирование GlyR и глицин-связывающих сайтов NMDAR. С этой целью проводили внутрибрюшинное введение стрихнина самцам *Musc2*<sup>-/-</sup> для блокирования GlyR с последующим поведенческим тестированием. В тесте «Открытое поле» у животных после введения стрихнина выявлялось снижение двигательной активности по сравнению с контрольной группой *Musc2*<sup>-/-</sup> (пройденное расстояние:  $n = 10-13$ ,  $Z = 3,53$ ,  $p = 0,001$ ; вертикальная активность:  $Z = 2,897$ ,  $p = 0,009$ ;  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 27А). В тесте «Темно-светлая камера» отмечалась тенденция к уменьшению исследовательской активности в светлом отсеке и увеличению избегания света (пройденное расстояние в светлом отсеке:  $n = 7-8$ ,  $Z = 2,21$ ,  $p = 0,045$ ; время в светлом отсеке:  $Z = 2,08$ ,  $p = 0,058$ ;  $t$ -критерий Стьюдента; Рисунок 27Б). Ингибирование GlyR также приводило к нормализации стартл-рефлекса и габитуации у мутантных самцов *Musc2*<sup>-/-</sup> (стартл-рефлекс:  $n = 10-12$ ,  $Z = -3,16$ ,  $p = 0,005$ ; габитуация:  $Z = -3,09$ ,  $p = 0,006$ ;  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 27В). В то же время поведение в тесте с закапыванием шариков на фоне стрихнина не изменялось.

С целью оценки влияния глициновой нейротрансмиссии на социальное поведение *Musc2*<sup>-/-</sup> использовали тест с двумя интродерами. Для оценки влияния стрихнина и пола интродера на количество и длительность социальных контактов применяли двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями по фактору «пол интродера» с последующим апостериорным тестом Фишера LSD с поправкой. Было выявлено статистически значимое взаимодействие между группой и полом интродера (количество контактов:  $n = 10$  на группу,  $F(1, 46) = 21,39$ ,  $p < 0,001$ ; длительность контактов:  $F(1, 46) = 6,95$ ,  $p = 0,011$ , Рисунок 27Г). После введения стрихнина у самцов *Musc2*<sup>-/-</sup> восстанавливалось предпочтение самок: количество и длительность контактов с самкой превышали таковые с самцом (самец *vs* самка:  $p < 0,001$ , тест Фишера LSD), а различия по количеству и длительности контактов с интродером-самцом/самкой по сравнению с интактными мышами *Musc2*<sup>-/-</sup> также были значимыми ( $p = 0,003$  для количества контактов, тест Фишера LSD). При этом общая длительность социальных контактов существенно не изменялась, тогда как длительность эпизодов агрессии у самцов *Musc2*<sup>-/-</sup> снижалась на фоне

введения стрихнина ( $n = 10$  на группу,  $Z = 2,75$ ,  $p = 0,022$ ;  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 27Д), что указывает на уменьшение агрессивности при сохранении общего уровня социальной активности.

Для ингибирования глициновой нейротрансмиссии на NMDAR применяли специфический антагонист глицин-связывающего сайта L-701,324, который вводили самцам линии *Muc2*<sup>-/-</sup> перед поведенческим тестированием. В тесте «Открытое поле» L-701,324 снижал двигательную активность (пройденное расстояние:  $n = 5-11$ ,  $Z = 3,303$ ,  $p = 0,005$ ; вертикальная активность:  $Z = 2,71$ ,  $p = 0,017$ ;  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 27Е). В тесте «Темно-светлая камера» животные после введения L-701,324 показывали более выраженное избегание света (пройденное расстояние в светлом отсеке:  $n = 5-11$ ,  $Z = 2,36$ ,  $p = 0,033$ ; время в светлом отсеке:  $Z = -2,56$ ,  $p = 0,023$ ;  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 27Ж), что указывает на нормализацию выраженности тревожных черт. Кроме того, L-701,324 нормализовал стереотипное поведение в тесте с закапыванием шариков: после введения ингибитора животные *Muc2*<sup>-/-</sup> закапывали больше шариков по сравнению с контролем ( $n = 9$  на группу,  $Z = -1,99$ ,  $p = 0,047$ ;  $U$ -тест Манна-Уитни, Рисунок 27З). При этом L-701,324 не оказывал выраженного влияния на социальное поведение и параметры стартл-рефлекса, что свидетельствует о различающихся вкладах GlyR и NMDAR в формирование сложного поведенческого фенотипа на фоне мутации в гене *Muc2*. В совокупности оба типа ингибиторов ослабляли ключевые поведенческие проявления, связанные с гиперактивностью в условиях новизны, тревожностью, нарушением сенсомоторной фильтрации и нетипичным социальным поведением, что подкрепляет представление о глицине как об одном из центральных регуляторов взаимодействия «микробиота–кишечник–мозг» в модели колита *Muc2*<sup>-/-</sup>.



**Рисунок 27.** Глициновая нейротрансдукция опосредует поведенческие нарушения в модели колита  $Muc2^{-/-}$ . (А) Поведение в тесте «Открытое поле» после введения стрихнина. (Б) Поведение в тесте «Темно-светлая камера» после введения стрихнина. (В) Стартл-рефлекс и габитуация после введения стрихнина. (Г) Поведение в тесте с двумя интродерами после введения стрихнина. (Д) Общая длительность социальных контактов и длительность агрессивного поведения в тесте с двумя интродерами после введения стрихнина. (Е) Поведение в тесте «Открытое поле» после введения L-701,324. (Ж) Поведение в тесте «Темно-светлая камера» после введения L-701,324. (З) Поведение в тесте с закапыванием шариков после введения L-701,324. \* –  $p < 0,05$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , *vs* C57BL/6. ### –  $p < 0,001$ , самец *vs* самка.

Таким образом, метаболическая регуляция представляет собой один из основных возможных путей коммуникации во взаимодействии «микробиота-кишечник-мозг». ЯМР-анализ метаболитов крови показал существенные изменения их профиля при передаче ассоциированной с мутацией *Muc2* микробиоты однопотомкам без мутации, что подтверждает значительное влияние микробиоты на метаболизм

хозяина. Глицин, действуя через свои рецепторы, формирует комплексный поведенческий фенотип, характеризующийся повышенной исследовательской активностью, сниженной тревожностью, нарушением сенсомоторной фильтрации и изменением социальных взаимодействий.

## **6.2 Изменения поведения и метаболизма при химической индукции колите**

Учитывая выявленные нарушения социального поведения у мышей с нокаутом гена *Muc2*, представляет интерес оценить, возникают ли сходные поведенческие изменения при хроническом химически индуцированном колите. В предыдущих исследованиях было показано, что колит, индуцированный DSS, сопровождается нарушением состава кишечной микробиоты, истощением слизистого слоя, а также характеризуется тревожноподобным поведением, снижением общей локомоторной активности и уменьшением социальных взаимодействий (Hassan *et al.*, 2014; Bercik *et al.*, 2011; Emge *et al.*, 2016).

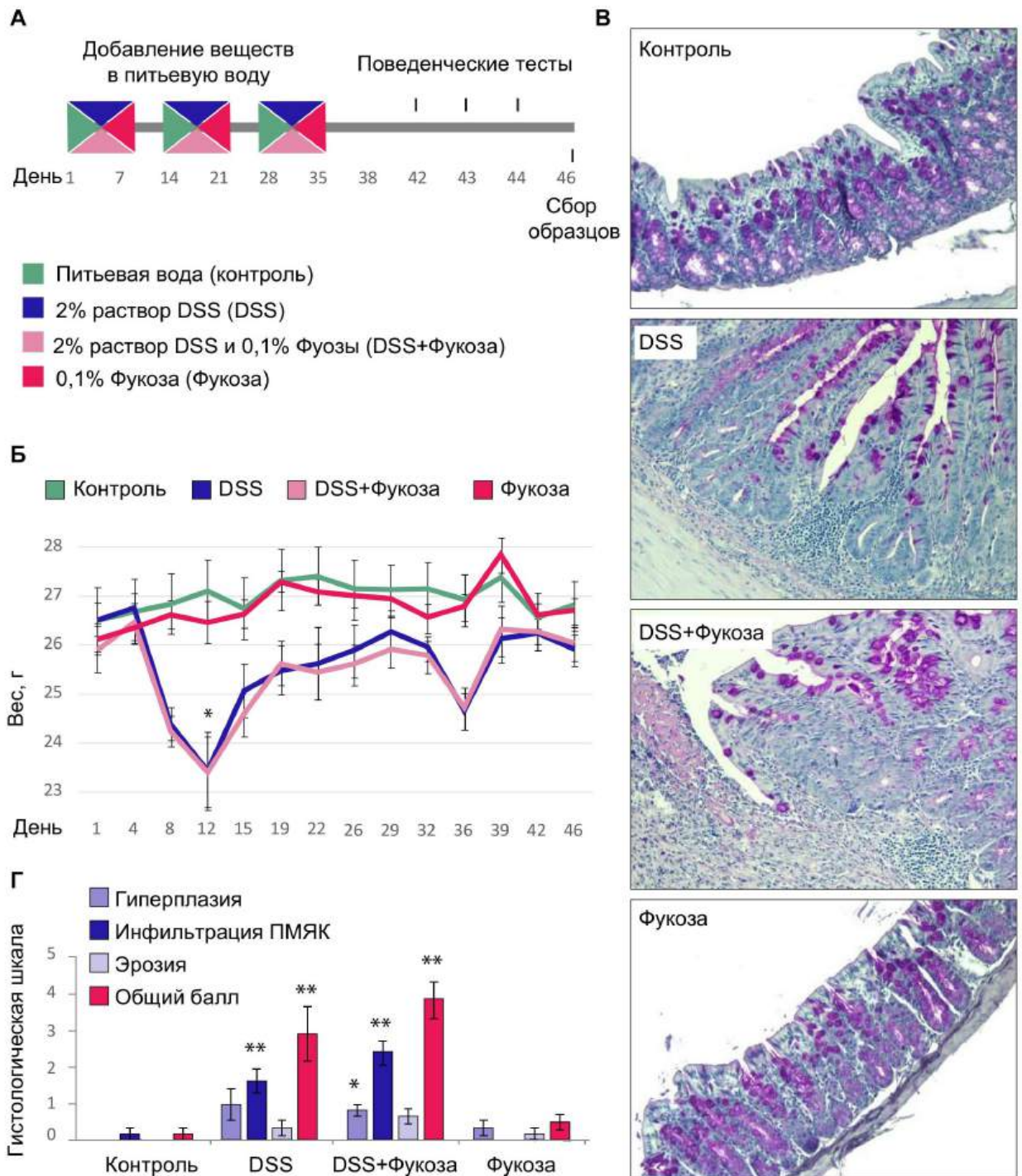
Особый интерес представляет роль фукозы как возможного модификатора микробиоты и барьерной функции кишечника (Бец и соавт., 2022). Около 80 % защитного протеогликанового слоя в кишечнике формируется полисахаридными боковыми цепями муцина-2, в которых фукоза за счет терминального положения является одним из двух наиболее доступных моносахаридов. Для бактерий она служит источником энергии, сайтом адгезии и фактором вирулентности (Sonnenburg *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2012). Было показано, что молекулы, содержащие фукозу, такие как фукоидан, ослабляют тяжесть колита, индуцированного DSS (O'Shea *et al.*, 2016). Также нами было показано, что экзогенная фукоза способна модифицировать поляризацию макрофагов и состав микробиоты кишечника (Litvinova *et al.*, 2021, Achasova *et al.*, 2021). В связи с этим в качестве метода модификации состава кишечной микробиоты в условиях колита, индуцированного DSS, была выбрана экзогенная фукоза.

### 6.2.1 Влияние фукозы на воспаление кишечника

На первом этапе была оценена способность фукозы смягчать течение колита, индуцированного DSS. Для этого анализировали динамику массы тела, гистологические изменения в толстой кишке, экспрессию провоспалительных цитокинов и количество иммунных клеток. Для гистологического анализа и оценки экспрессии генов использовали по 6 животных на группу, тогда как для измерения массы тела и проточной цитометрии — по 9–10 животных на группу. Схема индукции хронического воспаления и добавления фукозы показана на Рисунке 28А.

В группах «DSS» и «DSS + фукоза» была выявлена существенная потеря массы тела. По данным дисперсионного анализа с повторными измерениями было выявлено значимое влияние фактора DSS на массу тела ( $p < 0,001$ ), эффект повтора ( $p < 0,001$ ), а также значимое взаимодействие между факторами «DSS» и «повтор» ( $p < 0,001$ ). Добавление 0,1 % фукозы не предотвращало потерю веса на фоне поения DSS, влияния фактора фукозы не было. При попарном сравнении значимая потеря массы тела отмечалась на 8-й день в группе «DSS + фукоза» ( $p = 0,029$ ), а также на 12-й ( $p = 0,029$ ) и 36-й ( $p = 0,029$ ) дни в группе «DSS»,  $t$ -критерий Стьюдента с поправкой Бенджамини–Хохберга (Рисунок 28Б).

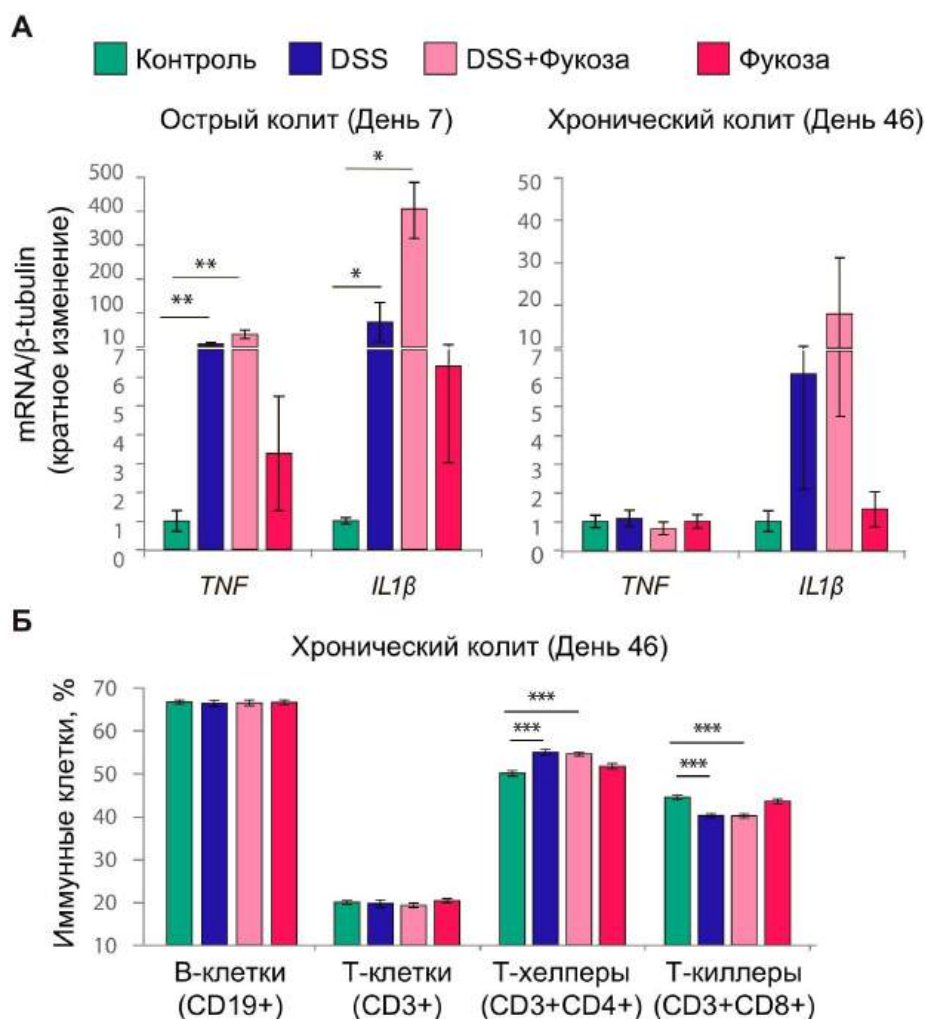
В толстой кишке мышей после индукции колита наблюдался выраженный воспалительный ответ (Рисунок 28В). Это проявлялось в удлинении крипт и увеличении количества клеток на крипту (гиперплазия), инфильтрации нейтрофилов и эозинофилов (полиморфноядерные клетки, ПМЯК) и разрушении структуры эпителия (эрозия). Было показано значимое влияние DSS на морфологию толстой кишки для всех оцениваемых параметров (гиперплазия:  $p < 0,01$ ; инфильтрация ПМЯК:  $p = 0,001$ ; эрозия:  $p < 0,05$ ; общий балл:  $p < 0,01$ , критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Бенджамини–Хохберга). Однако статистически значимого влияния фукозы выявлено не было. В группе «DSS» отмечались повышенная инфильтрация ПМЯК ( $p < 0,05$ ) и увеличение общего гистологического балла ( $p < 0,05$ ), а в группе «DSS + фукоза» — повышение гиперплазии ( $p < 0,05$ ), инфильтрации ПМЯК ( $p < 0,05$ ) и общего балла ( $p < 0,05$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни с поправкой, Рисунок 28Г).



**Рисунок 28. Добавление фукозы не влияет на гистологические и клинические признаки воспаления. (А)** Схема эксперимента. **(Б)** Динамика массы тела ( $n = 9 - 10$ ). **(В)** Репрезентативные гистологические изображения срезов толстой кишки (окрашивание гематоксилином и эозином). Масштабная линейка - 50 мкм. **(Г)** Количественный анализ воспаления ( $n = 6$ ). \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  в сравнении с контрольной группой. Показаны статистические значения до применения поправки на множественные сравнения. После ее применения все указанные различия остались значимыми.

Также была проведена оценка воспалительного ответа с помощью анализа экспрессии генов, кодирующих провоспалительные цитокины TNF и IL-1 $\beta$ , в острую фазу воспаления (8-й день) и при хроническом воспалении

(46-й день). Наблюдалась активация обоих генов в острую фазу, но не при хроническом колите. Обнаружено значимое влияние DSS на экспрессию генов провоспалительных цитокинов по критерию Краскела–Уоллиса ( $p < 0,001$  для *Tnf* и *Il-1 $\beta$* , с поправкой, Рисунок 28А). *U*-тест Манна–Уитни подтвердил, что в острую фазу происходило значительное увеличение экспрессии этих генов по сравнению с группой «Контроль» («DSS»: *Tnf*,  $p < 0,05$ , *Il-1 $\beta$* ,  $p < 0,05$ ; «DSS + фукоза»: *Tnf*,  $p < 0,05$ , *Il-1 $\beta$* ,  $p < 0,05$ ). Не отмечено статистически значимого влияния фукозы на экспрессию генов провоспалительных цитокинов при остром колите. Снижение экспрессии генов *Tnf* и *Il-1 $\beta$*  на позднем этапе при сохранении высоких гистологических баллов свидетельствовало о том, что у тестируемых животных развивалось хроническое воспаление.



**Рисунок 29.** Добавление фукозы не влияет на экспрессию генов провоспалительных цитокинов. (А) Экспрессия генов цитокинов в толстой кишке, нормированная на ген  $\beta$ -тубулина (*Tubb5*). \* –  $p < 0,05$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  в сравнении с контрольной группой.

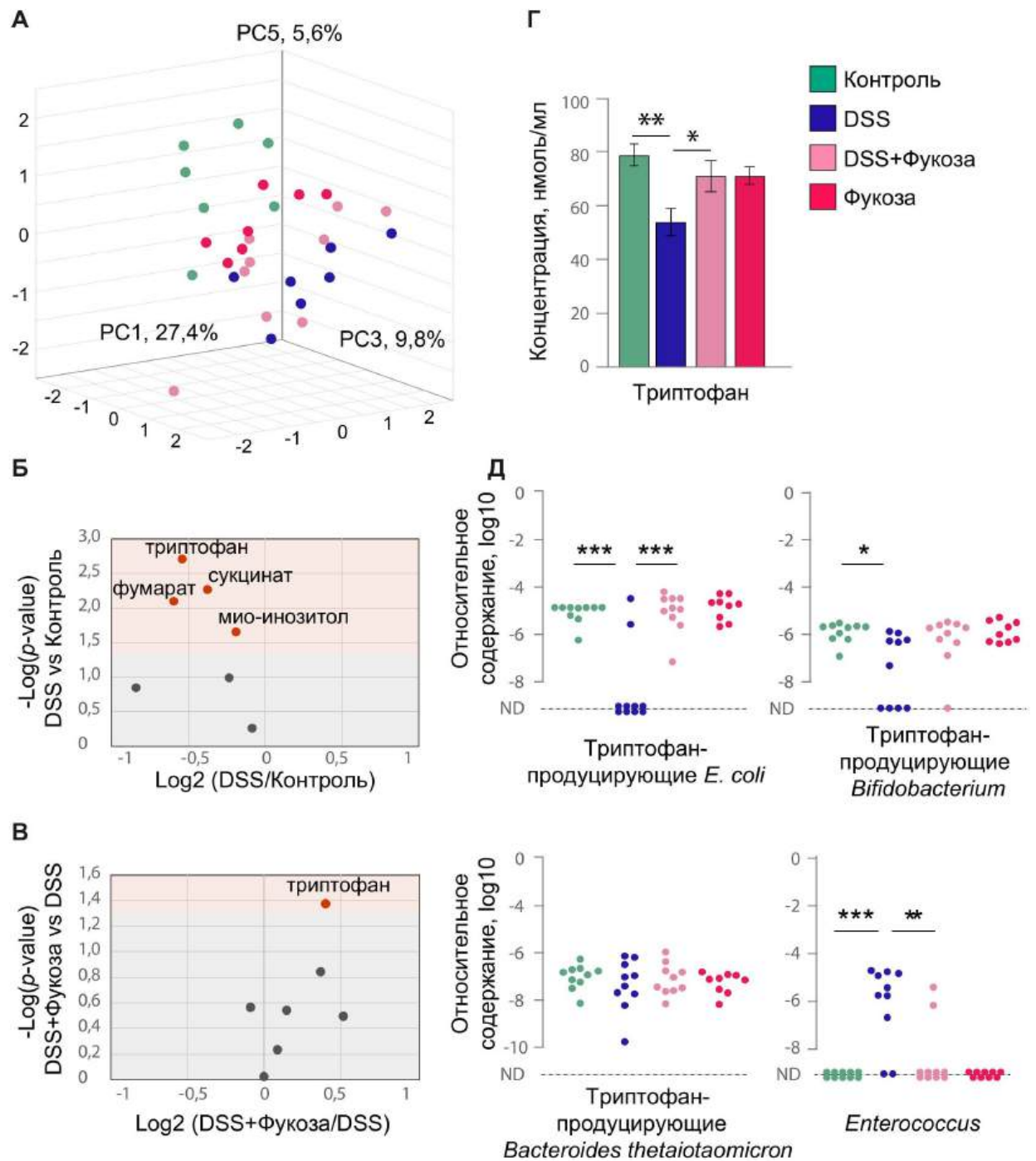
Эти результаты демонстрируют, что хроническое воспаление было

успешно индуцировано с помощью DSS, однако фукоза не оказывала влияния ни на один из параметров воспаления.

## 6.2.2 Оценка системного метаболизма и социального поведения мышцей

Для оценки влияния хронического колита на метаболизм хозяина был проведен метаболомный анализ сыворотки крови с помощью ЯМР-спектроскопии (для всех групп  $n = 7$ , за исключением «DSS + фукоза», где  $n = 9$ ). Этот подход позволил количественно определить 51 наиболее распространенное низкомолекулярное соединение. Предоставление DSS сопровождалась общим изменением метаболического профиля и значимыми сдвигами ряда отдельных метаболитов. PCA выявил 29 компонент, из которых девять объясняли около 80% дисперсии. По данным двухфакторного дисперсионного анализа было показано значимое взаимодействие между факторами DSS и фукозы для PC1 ( $p < 0,05$ ), а влияние DSS было значимым для PC3 и PC5 ( $p < 0,01$  для обеих компонент), тогда как влияние фукозы отмечалось для PC3 и PC8 ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно, поправка Бенджамини–Хохберга, Рисунок 30А). Совместное рассмотрение PC1, PC3 и PC5, суммарно объясняющих 42,78% вариабельности данных ЯМР, показало отчетливое смещение метаболомных профилей при добавлении DSS и модифицирующее влияние фукозы.

Для поиска метаболитов, чувствительных к взаимодействию DSS и фукозы, двухфакторный дисперсионный анализ был применен ко всем 51 идентифицированным соединениям. В результате были выделены семь метаболитов, для которых было выявлено значимое взаимодействие факторов: сукцинат, триптофан, мио-инозитол, аллантоин, fumarат, цитрат и аскорбат. Далее для оценки влияния самого DSS на уровни этих соединений в сыворотке проводили попарные сравнения между группами «Контроль» и «DSS» по  $t$ -критерию Стьюдента с поправкой. Было показано, что при хроническом колите уровни сукцината ( $p < 0,05$ ), триптофана ( $p < 0,01$ ), мио-инозитола ( $p < 0,05$ ) и fumarата ( $p < 0,05$ ) в сыворотке крови значимо снижались по сравнению с контролем (Рисунок 30Б).



**Рисунок 30.** Фукоза нормализует уровень триптофана в крови и число бактерий, способных к продукции триптофана, в кишечнике мышей. (А) Концентрации метаболитов в сыворотке крови тестируемых животных, измеренные с помощью ЯМР и проанализированные с использованием PCA, представлены для PC1, PC3 и PC5. (Б) Концентрации метаболитов в сыворотке крови, «Контроль» vs «DSS». (В) Концентрации метаболитов в сыворотке крови, «DSS» vs «DSS + Фукоза». (Г) Концентрация триптофана в сыворотке крови, измеренная с помощью ЯМР. Хронический колит приводил к потере около 30% триптофана в сыворотке крови. (Д) Представленность кишечных бактерий, измеренная в фекалиях с помощью ПЦР в реальном времени, нормированная на универсальный участок гена *16S* рРНК. На вулкан-плотах показаны значения  $p$ -критерия без поправок, после применения поправки все значимые изменения сохранились. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Чтобы выяснить, нормализует ли фукоза уровни этих метаболитов в

крови, сравнивали группы «DSS» и «DSS + фукоза». В этом анализе только триптофан демонстрировал достоверное восстановление при добавлении фукозы к DSS ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента с поправкой, Рисунок 30В). Хронический колит приводил к снижению сывороточного триптофана примерно на 30 % по сравнению с контролем, тогда как добавление фукозы восстанавливало его уровень до значений, сопоставимых с контрольной группой (Рисунок 30Г). Это позволяет рассматривать триптофан как один из потенциально значимых медиаторов влияния фукозы на системный метаболизм при DSS-индуцированном колите.

Для дальнейшего исследования возможной связи между метаболическими изменениями и сдвигами микробиоты при хроническом индуцированном DSS колите был проведен анализ бактериальных штаммов, потенциально способных к синтезу триптофана. Триптофан является незаменимой аминокислотой, которая в основном поступает с пищей, но также может синтезироваться отдельными видами бактерий. Для количественного определения таких бактерий в образцах фекалий применялась ПЦР в реальном времени с видоспецифичными праймерами к гену *trpD*, входящему в состав оперона метаболизма триптофана (*trp*). Размер выборки составлял 10 животных на группу, за исключением группы «Фукоза» ( $n = 9$ ).

По результатам расчета с помощью критерия  $\chi^2$  с поправкой было показано, что хроническое воспаление сопровождается снижением содержания *E. coli* и *Bifidobacterium*, содержащих *trpD*, по сравнению с контролем (*E. coli*:  $p < 0,001$ ; *Bifidobacterium*:  $p < 0,05$ ), тогда как уровень *Bacteroides thetaiotaomicron*, содержащего *trpD*, существенно не менялся (Рисунок 30Е). Добавление фукозы нивелировало эффект колита на содержание *E. coli*, содержащей *trpD* («DSS» vs «DSS + фукоза»:  $p < 0,001$ , критерий  $\chi^2$ ), но не оказывало значимого влияния на *Bifidobacterium*.

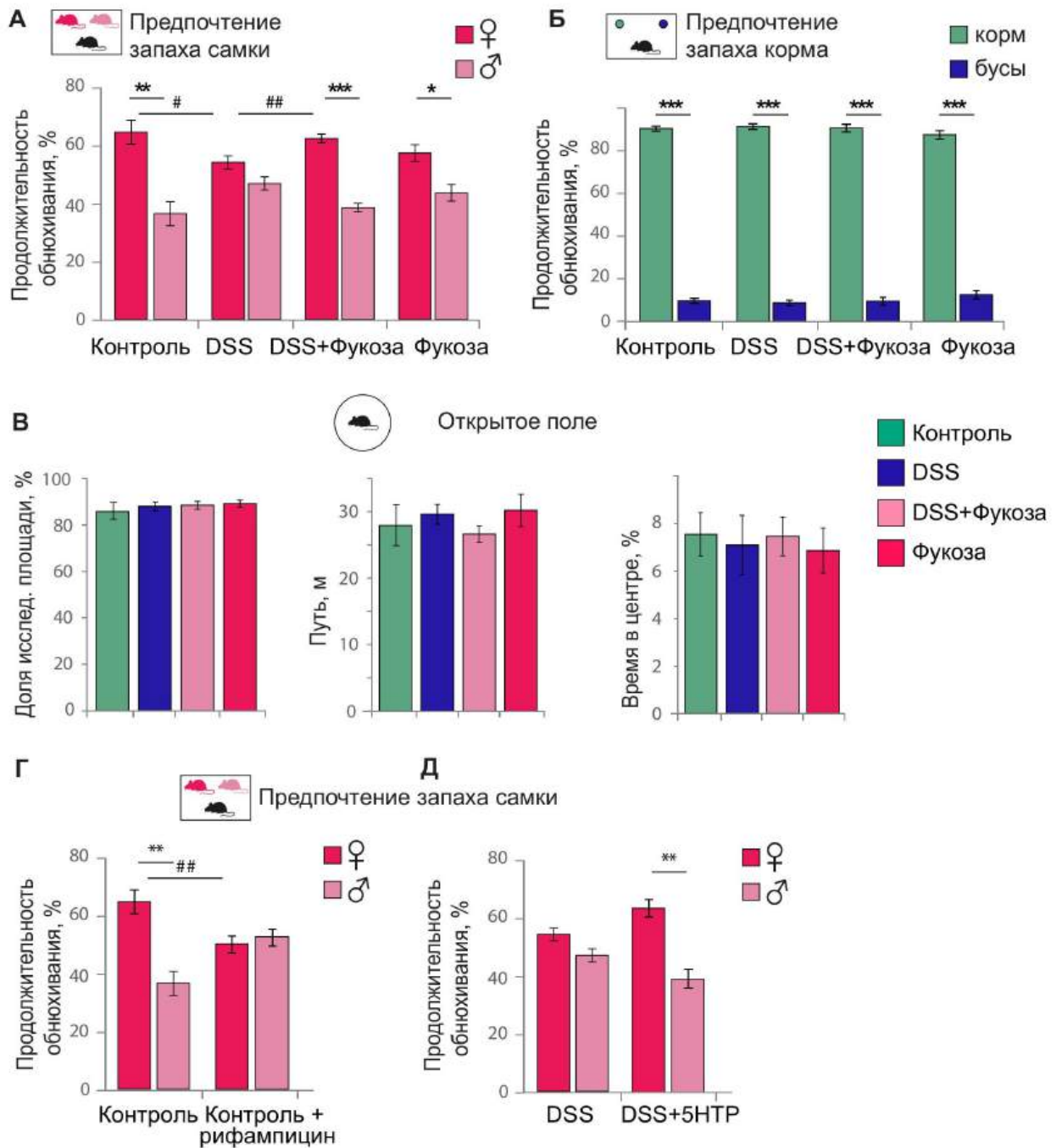
Для оценки изменений доли таксона *Enterococcus* spp., ранее описанного маркерного микроорганизма хронического DSS-индуцированного колита, было проведено количественное определение этих бактерий в фекалиях. Добавление DSS приводило к выраженной пролиферации *Enterococcus* по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ , критерий  $\chi^2$ ), тогда как добавление фукозы нивелировало этот эффект:

у большинства животных группы «DSS + фукоза» *Enterococcus* не детектировались («DSS» vs «DSS + фукоза»:  $p < 0,001$ , критерий  $\chi^2$ ). Эти результаты свидетельствуют о том, что фукоза избирательно модулирует состав отдельных бактериальных таксонов и тем самым может опосредованно влиять на метаболизм хозяина через изменение микробиоты.

### 6.2.3 Роль микробиоты в регуляции предпочтения запаха самки

Хронический колит, индуцированный DSS, приводил к значительному снижению уровня триптофана в крови. Триптофан является незаменимой аминокислотой и предшественником биосинтеза серотонина и триптамина, поэтому было важно оценить возможное влияние этого снижения на поведение мышей. Для анализа серотонин-зависимого поведения использовался тест на предпочтение запаха самки, в котором тестируемому самцу предъявлялись образцы запаха самца и самки на выбор. В дополнение к этому применяли тест на распознавание несоциального запаха для оценки общей обонятельной способности и тест «Открытое поле» для измерения общей двигательной активности (для всех поведенческих тестов  $n = 13-15$ ).

В тесте на предпочтение запаха самки самцы мышей контрольной группы, как и ожидалось, предпочитали запах самки запаху самца. Хроническое воспаление нарушало это предпочтение, тогда как добавление фукозы к DSS восстанавливало предпочтение запаха самки. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил значимое взаимодействие между факторами «DSS» и «фукоза» в отношении предпочтения запаха самки ( $p < 0,05$ ). При попарных сравнениях времени обнюхивания запаха самки по  $t$ -критерию Стьюдента с поправкой было показано, что самцы после воздействия DSS проводили меньше времени, обнюхивая образец самки, по сравнению с контрольными животными ( $p < 0,05$ ; Рисунок 31А), тогда как добавление фукозы к DSS увеличивало время обнюхивания запаха самки по сравнению с группой «DSS» («DSS» vs «DSS + фукоза»:  $p < 0,05$ ). Самцы группы «Фукоза» по времени обнюхивания запаха самки не отличались от контроля.



**Рисунок 31. Хронический колит влияет на предпочтение запаха самки самцами мышей в тесте на предпочтение запаха.** (А) Общее время, которое животное провело, обнюхивая запах подстилка самки или самца в тесте на предпочтение запаха ( $n = 13-15$ ). (Б) Общее время, которое животное провело, обнюхивая пищу или шарики во время теста на распознавание запахов ( $n = 13-15$ ). (В) Исследовательская активность (% исследованной площади), двигательная активность (пройденный путь), время, проведенное в центре арены, в тесте «Открытое поле» ( $n = 13-15$ ). (Г) Общее время, которое животное провело, обнюхивая запах подстилка самки или самца в тесте на предпочтение запаха самки после инъекции 5-гидрокситриптофана (5-НТП) ( $n = 7-8$ ). (Д) Общее время, которое животное провело, обнюхивая запах подстилка самки или самца в тесте на предпочтение запаха самки после воздействия рифампицина ( $n = 8-10$ ). \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , внутригрупповые различия. # =  $p < 0,05$ , ## =  $p < 0,001$ , межгрупповые различия.

Добавление DSS в питье мышам не влияло на общее распознавание запахов: во всех группах мыши отличали запах корма от пластиковых

бусин ( $p < 0,001$  для всех групп;  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 31Б). В тесте «Открытое поле» статистически значимых различий между группами не выявлено, и все животные показали сопоставимую двигательную и исследовательскую активность (Рисунок 31В).

Для дополнительной проверки вклада ранее описанных бактерий, содержащих оперон *trp*, использовали рифампицин как специфический к описанному штамму *E. coli* антибиотик у интактных самцов C57BL/6. Введение рифампицина в питьевую воду приводило к снижению времени обнюхивания самки по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ,  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 31Г) и к утрате предпочтения запаха самки в соответствующем тесте. Это свидетельствует об ассоциации изменений микробиоты с формированием поведенческого фенотипа, наблюдаемого в тесте на предпочтение запаха самки при хроническом колите

Для проверки роли триптофана в описанном поведенческом фенотипе тест на предпочтение запаха самки проводился у животных с воспалением после внутрибрюшинного введения предшественника серотонина 5-гидрокситриптофана (5-Hydroxytryptophan, 5-НТП). Введение 5-НТП приводило к восстановлению предпочтения запаха самки у самцов, получавших DSS ( $p < 0,01$ ,  $t$ -критерий Стьюдента, Рисунок 31Д), что указывает на зависимость наблюдаемого фенотипа от серотониновой нейромедиаторной системы. Время обнюхивания подстилки от самок после введения 5-НТП было больше, чем у самцов группы DSS ( $p < 0,01$ ,  $t$ -критерий Стьюдента).

В совокупности полученные данные показывают, что модуляция кишечной микробиоты моносахаридом фукозой ассоциирована с метаболическими и поведенческими аспектами хронического колита, включая серотонин-зависимое социальное поведение, независимо от выраженности локального воспаления.

## Глава 7. Пропионат-продуцирующие бактерии в норме, при воспалении и колоректальном раке.

Колоректальный рак (КРР) занимает третье место по распространенности среди онкологических заболеваний и является второй ведущей причиной смертности от рака (Bray *et al.*, 2024). Согласно ряду исследований, изменения в составе и разнообразии кишечного микробиома связаны с КРР (Sánchez-Alcoholado *et al.*, 2020; Artemev *et al.*, 2022; Wong & Yu, 2019). Интересная модель, объясняющая сложную роль микробиоты в развитии КРР, была предложена Tjalsma и коллегами, а именно, теория «бактериальных драйверов-пассажиров» (Tjalsma *et al.*, 2012). Эта модель предполагает, что опухолеобразование запускается «драйверными» бактериями с проканцерогенными характеристиками, такими как генотоксичность и индукция выраженного воспалительного ответа. Возникновение и становление микроокружения опухоли приводят к значительным физиологическим и метаболическим изменениям. Бактерии-«пассажиры», которые обычно плохо колонизируют здоровый кишечник, используют преимущества этих изменений и вытесняют «драйверов». Этот процесс приводит к дисбиозу и, вероятно, способствует опухолеобразованию (Tjalsma *et al.*, 2012). Однако большинство исследований микробиома у пациентов ограничиваются стадией развившихся опухолей и не включают данные об исходной микробиоте в здоровом состоянии. Следовательно, выявление роли исходной микробиоты наряду с ее динамическими изменениями в ходе развития КРР остается нерешенной задачей.

## 7.1 Моделирование колоректального рака на мышах с различным составом микробиоты кишечника

Было показано, что мыши с идентичным генетическим фоном, содержащиеся в разных комнатах одного вивария или полученные из разных вивариев, демонстрировали различную восприимчивость к ассоциированному с воспалением опухолеобразованием (модель AOM/DSS). Эта вариабельность, по крайней мере частично, обусловлена различиями в иммунной активации, вызванными особенностями микробиоты (Yu *et al.*, 2020). Более того, перенос микробиоты от пациентов с КРР повышал восприимчивость к образованию опухолей у мышей после инъекции AOM (Wong *et al.*, 2017) и усиливал спорадическое опухолеобразование в генетической модели КРР (Li *et al.*, 2019). В настоящем исследовании была изучена ассоциированная с кишечной микробиотой восприимчивость к колоректальному опухолеобразованию с использованием мышинной модели AOM/DSS.

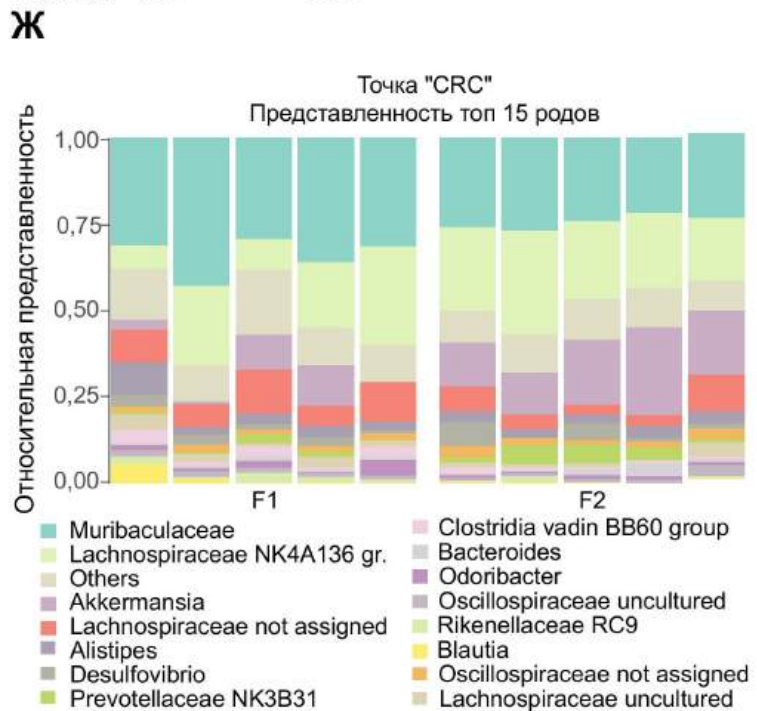
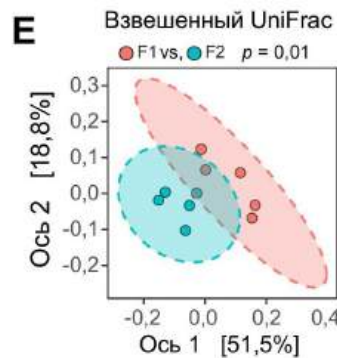
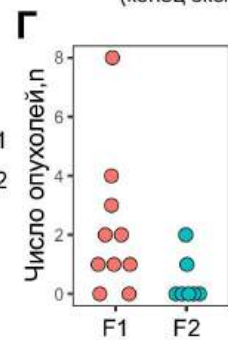
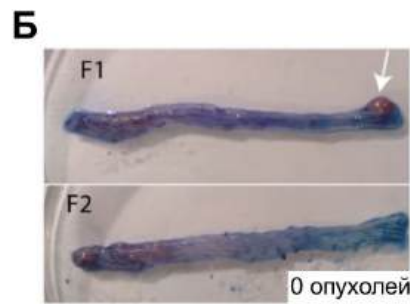
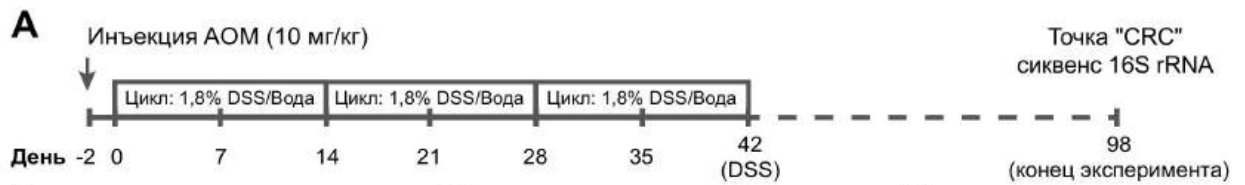
### 7.1.1 Особенности восприимчивости мышей из разных вивариев к AOM/DSS.

Восприимчивость к ассоциированному с кишечной микробиотой колоректальному опухолеобразованию оценивали в мышинной модели AOM/DSS с использованием самцов C57BL/6, полученных из двух разных вивариев. В эксперимент было включено 17 животных: 10 мышей из зоны содержания вивария 1 («F1») и 7 мышей из зоны содержания вивария 2 («F2») с идентичным генетическим фоном (различия между животными составили не более двух-трех поколений). Через два дня после однократной инъекции AOM (10 мг/кг массы тела) проводили три цикла поения 1,8 % DSS (экспериментальная схема представлена на Рисунок 32А). На 98-й день после первого введения DSS животных подвергали эвтаназии и оценивали наличие и количество опухолей в толстой кишке. Репрезентативные фотографии опухолей и гистологические изображения дистального отдела толстой кишки приведены на Рисунок 32Б (Achasova *et al.*, 2025, Achasoav *et al.*, 2025a). Видимые опухоли в дистальном отделе толстой кишки обнаруживались у 8 из 10 мышей группы «F1» и у 2 из 7 мышей группы «F2». Различия в

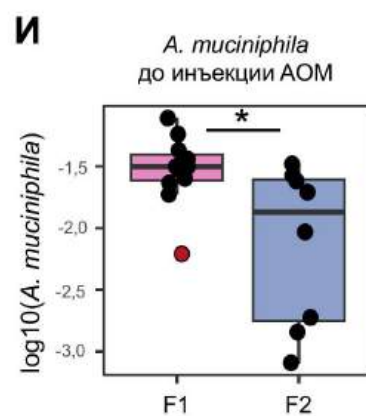
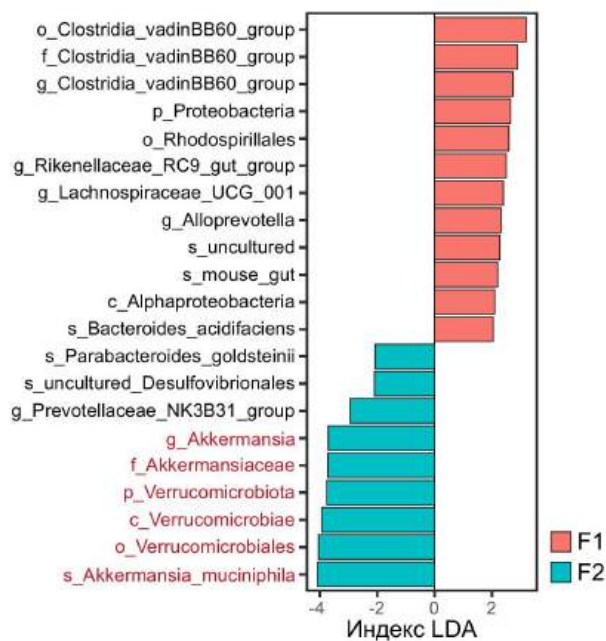
частоте возникновения опухолей между группами оценивали с помощью точного критерия Фишера ( $n = 7-10$ ,  $p = 0,058$ ). При сравнении количества опухолей на животное по критерию Вилкоксона было показано, что у мышей «F1» развивалось больше опухолей, чем у мышей «F2» ( $W = 55,5$ ,  $p = 0,041$ ,  $n = 7-10$ , Рисунок 32В- Г).

Поскольку литературные данные указывают на роль микробиоты в вариабельности ответа на АОМ/DSS у мышей одной линии, полученный результат может быть следствием различий в составе кишечного микробиома у животных из разных вивариев. Для проверки этой гипотезы был проведен анализ микробиоты содержимого кишечника животных на момент образования опухолей (точка «КРР») с помощью секвенирования гипервариабельного района V4-V4 гена *16S* рРНК. Для секвенирования было отобрано по 5 образцов на группу: мыши с 2–8 опухолями из группы «F1» и мыши без опухолей из группы «F2». Альфа-разнообразие по индексу Шеннона достоверно не различалось между группами ( $n = 5$  на группу, критерий Вилкоксона,  $W = 21$ ,  $p = 0,095$ , Рисунок 32Д). В то же время бета-разнообразие, оцененное по взвешенному расстоянию UniFrac (филогенетическая метрика бета-разнообразия), существенно отличалось между группами «F1» и «F2» (анализ главных координат (PCoA), пермутационный дисперсионный анализ (permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA) с 1000 перестановками,  $n = 5$  на группу,  $p = 0,01$ ; Рисунок 32Е), что указывает на различия в составе микробиома после воздействия АОМ/DSS.

Таксономический анализ относительного разнообразия показал различия по нескольким бактериальным таксонам, включая род *Akkermansia*, семейство *Lachnospiraceae* и род *Prevotellaceae* (Рисунок 32Ж). Для идентификации специфических признаков микробиоты, ассоциированных с каждой группой, был применен линейный дискриминантный анализ размера эффекта (Linear Discriminant Analysis (LDA) Effect Size, LEfSE). Аннотации, относящиеся к *A. muciniphila* и ее более широким таксонам, преимущественно ассоциировались с группой «F2», менее восприимчивой к АОМ/DSS-индуцированному опухолеобразованию (показатель LDA  $\geq 2,0$  и FDR  $< 0,05$ ) (Рисунок 32З), что согласуется с описанной противовоспалительной ролью этой бактерии.



**З** Точка "CRC", анализ LefSE



**Рисунок 32.** Две колонии мышей одной линии C57BL/6 после разведения в разных вивариях показывают различное содержание *A. muciniphila* и разную восприимчивость в модели колоректального рака. (А) Схема эксперимента. (Б) Опухоли в толстой кишке мышей на 98-й день эксперимента. F1 и F2 обозначают два разных вивария. Белая стрелка указывает на опухоль. (В) Процент мышей с опухолями в толстой кишке для каждой группы ( $n = 7-10$ ). (Г) Количество опухолей у мышей в конце эксперимента,  $n = 7-10$ . (Д) Альфа-разнообразие кишечной микробиоты, оцененное по индексу Шеннона ( $n = 5$  на группу). (Е) Первые две оси анализа главных координат (РСоА) взвешенных расстояний UniFrac ( $n = 5$  на группу). (Ж) Относительное обилие таксонов кишечной микробиоты у мышей в конце эксперимента, оцененное с помощью секвенирования гена *16S* рРНК ( $n = 5$  на группу). (З) Анализ LEfSe таксонов, идентифицированных в микробиоме кишечного содержимого в точке «КРР» ( $n = 5$  на группу). Красным шрифтом обозначены таксоны *Akkermansia* на разных таксономических уровнях. (И) Исходный (до инъекции АОМ) уровень ДНК гена *16S* рРНК *A. muciniphila* в кишечном содержимом (нормированный на универсальный фрагмент ДНК гена *16S* рРНК). Точки, показанные красным, обозначают выбросы. F1 и F2 - различные виварии содержания животных.

Различия в обогащении *A. muciniphila* между группами в точке «КРР» могут отражать исходный уровень этого бактериального таксона в экспериментальных группах. Чтобы проверить эту гипотезу, долю *A. muciniphila* оценивали методом количественной ПЦР со специфичными праймерами в образцах фекалий, собранных до инъекции АОМ. Было показано, что исходный уровень *A. muciniphila* был выше в более восприимчивой к АОМ/DSS группе «F1» ( $n = 8-11$ ), критерий Вилкоксона,  $W = 71$ ,  $p = 0,028$ ; Рисунок 32И). Это говорит о том, что распределение этой бактерии по группам на начальной стадии (точка «До») было противоположно таковому в точке «КРР». Это наблюдение указывает на динамический характер изменений отдельных бактериальных видов в ходе развития опухолевого процесса. Несмотря на такую динамику, *A. muciniphila* рассматривалась как ключевой кандидат среди бактерий, ассоциированных с развитием КРР, учитывая показатель LDA в анализе LEfSe (Рисунок 32З) и данные литературы, связывающие этот вид с колоректальным раком.

### 7.1.2 Исходный уровень *A. muciniphila* определяет восприимчивость к колоректальному раку

Далее были использованы для анализа мыши линии C57BL/6, содержащихся в отдельных комнатах одного вивария, чтобы идентифицировать группы животных с естественными различиями в содержании *A. muciniphila*. Количественная ПЦР с видоспецифичными праймерами выявила две группы животных («R1» и «R2»), значимо различавшиеся по доле *A. muciniphila* в микробиоме фекалий до индукции

модели (критерий Вилкоксона:  $W = 81$ ,  $p = 0,037$ ,  $n = 8-13$ , Рисунок 33А). После этого обе группы подвергали воздействию АОМ и DSS по той же схеме, что и в первом эксперименте (схема эксперимента показана на Рисунок 33Б). В соответствии с предыдущими результатами, мыши с более высоким содержанием *A. muciniphila* (группа «R1») развивали значимо больше опухолей в толстой кишке, чем мыши из группы «R2». Репрезентативные изображения показаны на Рисунке 33В (точный критерий Фишера:  $p = 0,056$ ,  $n = 8-13$ , Рисунок 33Г). Количество опухолей также было выше у мышей из группы «R1»: у 11 из 13 животных этой группы выявляли по 2–6 опухолей, тогда как у трех из восьми мышей из группы «R2» регистрировали лишь по 1–2 опухоли (критерий Вилкоксона:  $W = 79,5$ ,  $p = 0,0068$ ,  $n = 8-13$ , Рисунок 33Д). Площадь опухолевых поражений слизистой оболочки толстой кишки была значимо больше у мышей из группы «R1», чем у животных из группы «R2» (критерий Вилкоксона:  $W = 93$ ,  $p = 0,0028$ ,  $n = 8-13$ , Рисунок 33Е).

Для оценки микробиоты в момент развития колоректального рака («КРР», 98-й день эксперимента) были взяты для анализа образцы ДНК содержимого кишечника мышей. На этой временной точке различий в альфа-разнообразии между группами «R1» и «R2» не обнаружено (критерий Вилкоксона:  $W = 35$ ,  $p = 0,238$ ,  $n = 8-13$ , Рисунок 33Ж). Анализ главных координат на основе взвешенных расстояний UniFrac также не выявил различий в бета-разнообразии микробиоты между группами (PERMANOVA с 1000 перестановками, Рисунок 33З), а относительная доля основных родов бактерий была сопоставимой (Рисунок 33И). Изменение массы тела оценивали в ходе трех циклов введения DSS. Двухфакторный дисперсионный анализ показал значимое взаимодействие факторов «группа» и «день» для динамики массы тела ( $F(63, 1197) = 2,06$ ,  $p < 0,001$ ). При этом клинически значимых различий в выраженности потери массы тела между группами в большинстве временных точек не выявлено. Статистически значимое отличие наблюдалось лишь на 9-й день, когда мыши из группы «R1» потеряли в весе больше, чем мыши из группы «R2» ( $t$ -критерий Стьюдента с поправкой:  $Z = -2,9$ ,  $p = 0,017$ ,  $n = 8-13$ , Рисунок 33К). Полученные результаты подтверждают гипотезу о связи между исходным содержанием *A. muciniphila* в составе микробиоты кишечника в здоровом

состоянии и опухолеобразованием в модели AOM/DSS.

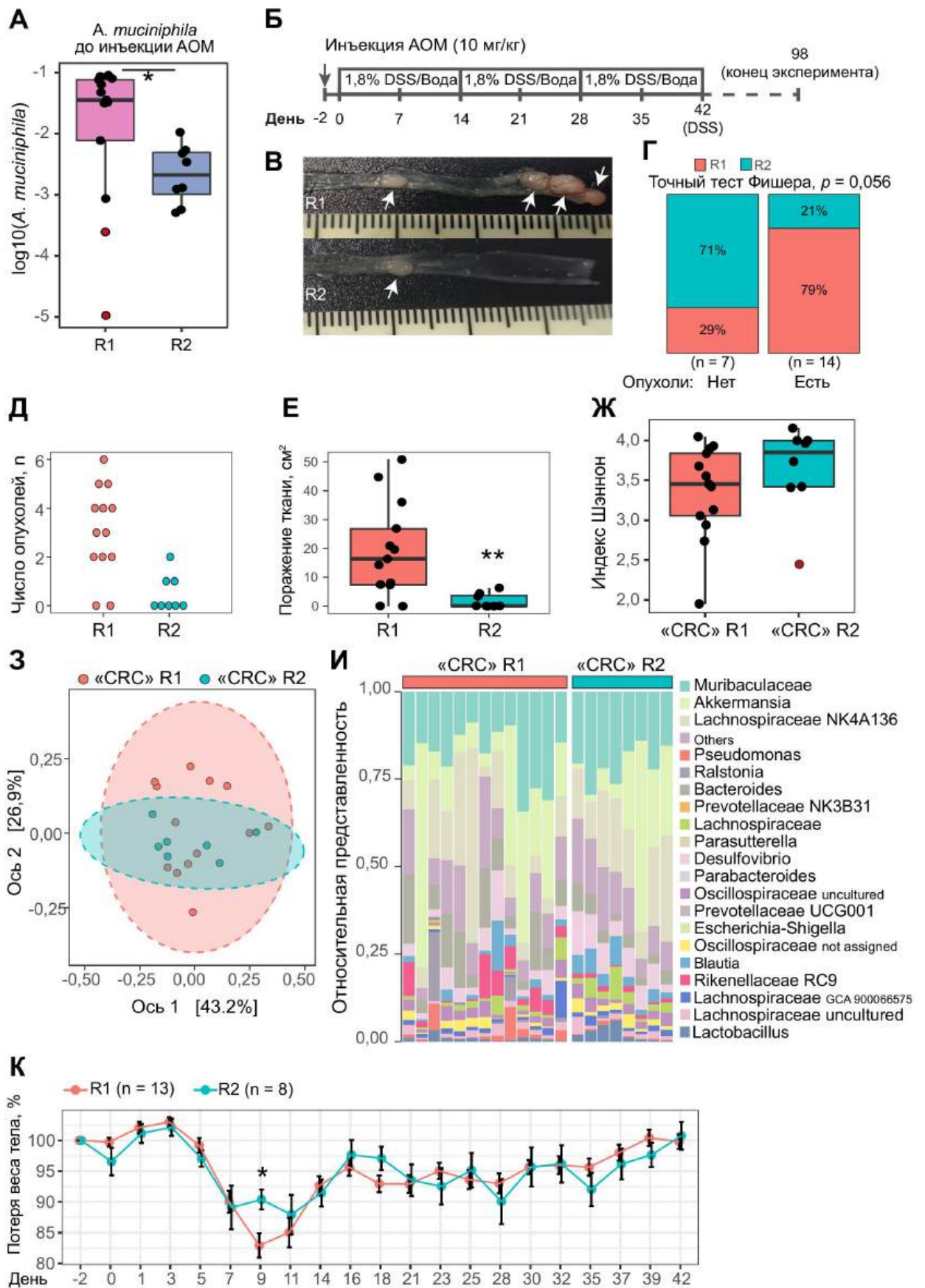


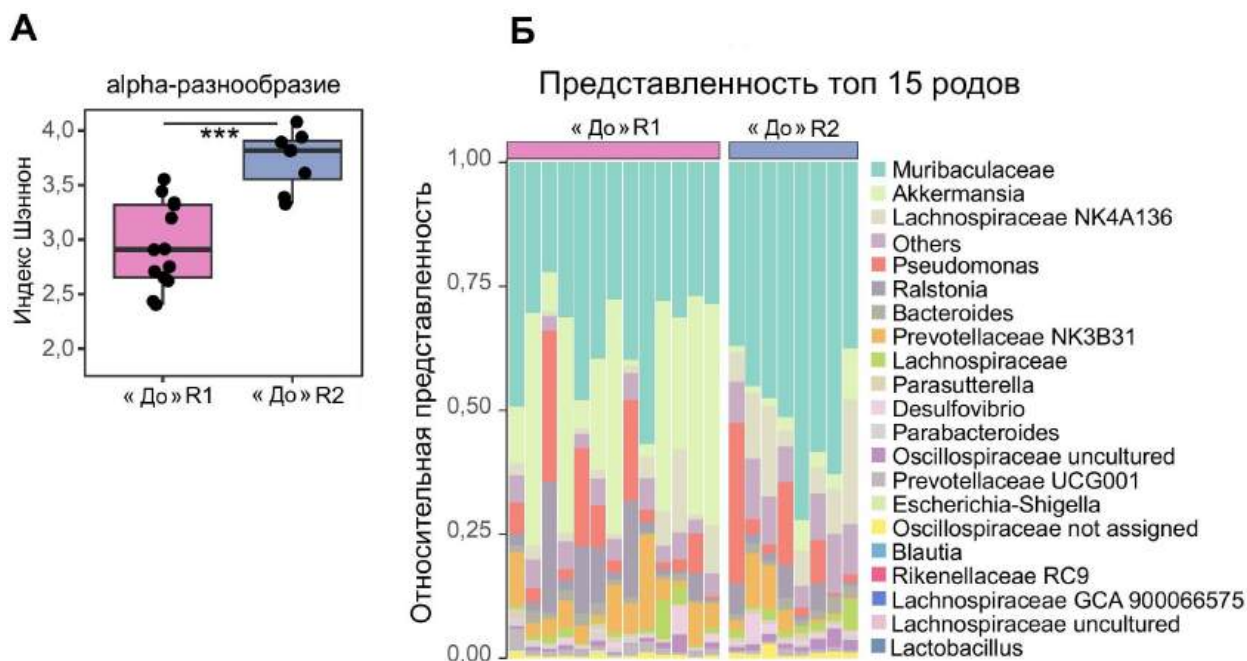
Рисунок 33. Две когорты мышей из разных комнат одного вивария различались по составу

**кишечной микробиоты и показали различия в восприимчивости к колоректальному раку.** (А) Уровень представленности ДНК гена *16S* рРНК *A. muciniphila* в фекалиях мышей из двух отдельных комнат одного вивария до индукции КРР (нормированный на универсальный участок ДНК гена *16S* рРНК). Точки, показанные красным, обозначают выбросы. (Б) Схема эксперимента. (В) Опухоли в толстой кишке мышей на 98-й день эксперимента. R1 и R2 обозначают животных из разных комнат. (Г) Процент мышей с опухолями в толстой кишке для каждой группы. (Д) Количество опухолей в толстой кишке мышей для каждой группы. (Е) Площадь ткани толстой кишки (мм<sup>2</sup>), пораженная опухолями. (Ж) Альфа-разнообразие на 98-й день эксперимента (в момент «КРР»),  $n = 8-13$ . Точки, показанные красным, обозначают выбросы. (З) Первые две оси анализа главных координат (PCoA) взвешенных расстояний UniFrac в момент «КРР» ( $n = 8-13$ ). (И) Относительный уровень 15 основных родов бактерий в составе микробиома мышей в точке «КРР» ( $n = 8-13$ ). (К) Потеря массы тела в течение трех циклов DSS, выраженная в процентах от исходной массы тела (до инъекции АОМ). «CRC» - точка формирования опухолей (день 98 эксперимента). R1 и R2 - различные комнаты содержания животных.

### 7.1.3 Различия в исходном разнообразии микробиоты

Затем был произведен анализ динамических изменений кишечной микробиоты в ходе формирования модели АОМ/DSS с целью выявления дополнительных бактериальных характеристик, ассоциированных с развитием колоректального рака. Для этого оценивали состав микробиоты кишечника до инъекции АОМ («До»). В исходной временной точке «До» между колониями «R1» и «R2» наблюдались наиболее выраженные различия как в альфа-, так и в бета-разнообразии. В частности, микробиота колонии «R2» характеризовалась более высоким разнообразием по индексу Шеннона по сравнению с «R1» (критерий Вилкоксона:  $W = 5$ ,  $p = 0,00075$ ,  $n = 8-13$ , Рисунок 34А).

Эти результаты указывают на то, что ключевые особенности микробиоты, потенциально влияющие на КРР, формируются на этапе до индукции АОМ/DSS и на ранней стадии патологического процесса. Одним из возможных объяснений этих корреляций является то, что и *A. muciniphila*, и *B. acidifaciens* относятся к муцин-деградирующим бактериям (Derrien *et al.*, 2004; Martens *et al.*, 2008; Crouch *et al.*, 2020). Их высокая численность в условиях колита может усугублять воспаление за счет деградации слизистого барьера. Важно отметить, что в нашем исследовании, хотя численность *A. muciniphila* возростала после трех циклов DSS, ее уровень на стадии хронического воспаления не коррелировал с опухолевой нагрузкой. Это дополнительно подчеркивает важность исходных представлений отдельных таксонов бактерий.



**Рисунок 34.** Состав микробиома до опухолеобразования, индуцированного АОМ/DSS в двух колониях мышей. **(А)** Альфа-разнообразие до инъекции АОМ и после инъекции АОМ с последующими тремя циклами добавления DSS,  $n = 8-13$ . **(Б)** Относительная представленность 15 основных бактериальных таксонов на родовом уровне у мышей до инъекции АОМ ( $n = 8-13$ ). «До» - точка до начала эксперимента (до инъекции АОМ). R1 и R2 - различные комнаты содержания животных.

## 7.2 Бактериальные маркеры образования опухолей толстой кишки

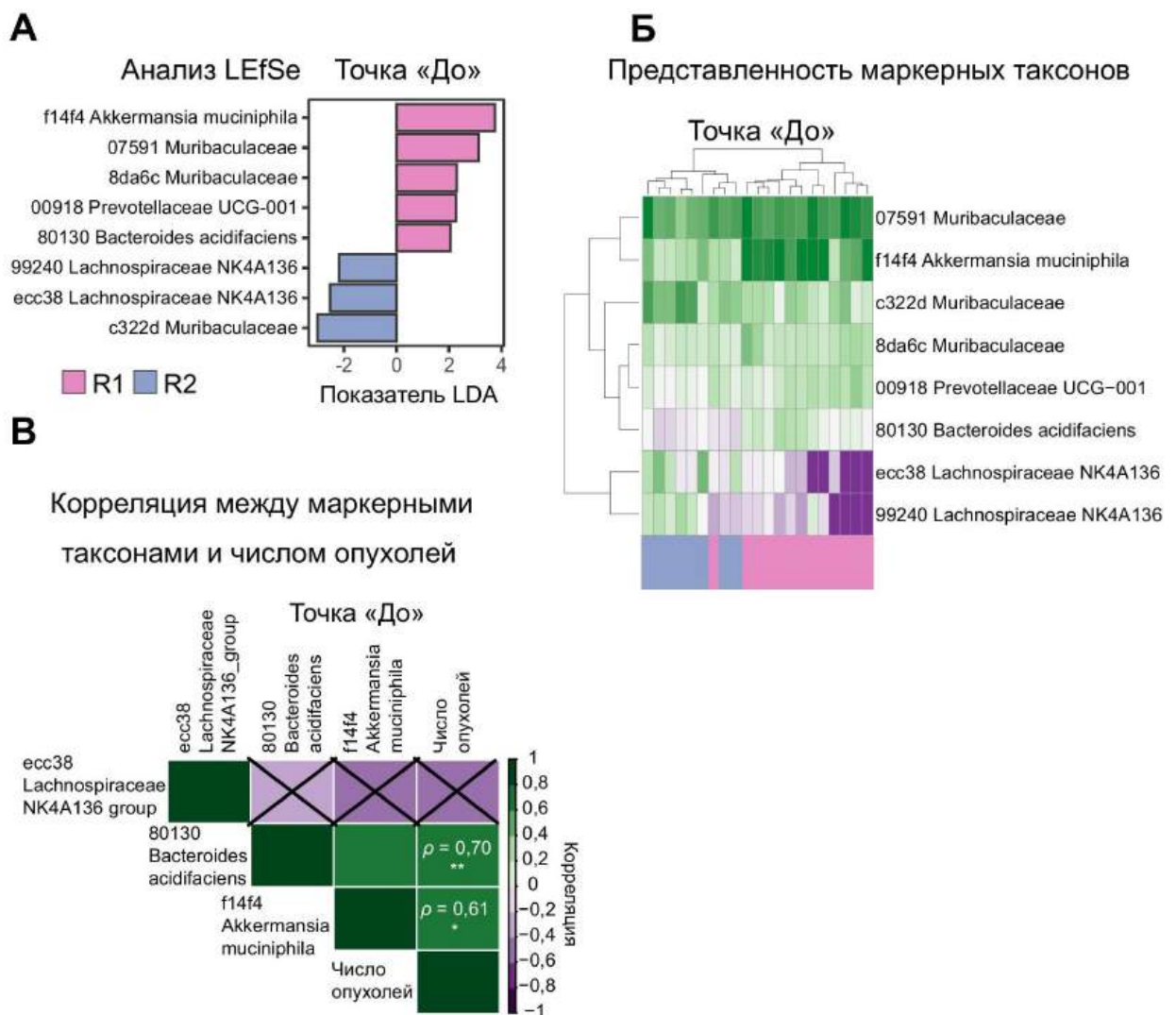
### 7.2.1 Бактериальные маркеры КРР в исходной микробиоте

Как было показано выше и в опубликованных автором данных, таксономические профили микробиоты существенно различались между колониями как до инъекции АОМ, так и после трех циклов DSS (Рисунок 35В, Achasova *et al.*, 2025). Поэтому был выполнен анализ LEfSe для идентификации таксонов, ассоциированных с высокой и низкой восприимчивостью к АОМ/DSS-индуцированному опухолеобразованию. Для дальнейшего анализа отбирали признаки с показателем LDA  $\geq 2$  и  $p$ -значением  $< 0,05$ .

В исходной микробиоте (точка «До») специфичными маркерами колонии были *A. muciniphila*, *B. acidifaciens* и несколько таксонов, аннотированных как представители семейств *Muribaculaceae*, *Prevotellaceae* и *Lachnospiraceae* (Рисунок 35А). *A. muciniphila*, *B. acidifaciens* и два таксона *Muribaculaceae* преобладали в колонии «R1», тогда как представители

*Lachnospiraceae* и другие таксоны из *Muribaculaceae* были более характерны для «R2» (Рисунок 35А, Б).

Для поиска ассоциаций между выделенными таксонами и опухолевой нагрузкой были рассчитаны корреляции Спирмена между нормированной представленностью отдельных таксонов и числом опухолей. В последующий анализ включали признаки с умеренными и сильными корреляциями ( $|\rho| > 0,5$ ) и FDR-скорректированными  $p$ -значениями  $< 0,05$ . Значимые связи выявляли как для признаков исходной микробиоты, так и для таксонов, характеризующих микробиоту в условиях хронического колита.



**Рисунок 35. Идентификация «маркерных» таксонов, специфичных для микробиомов двух колоний мышей до инъекции АОМ (точка «До»).** (А) Анализ LEfSe маркерных таксонов в точке «До» ( $n = 8 - 13$ ). (Б) Тепловая карта, показывающая представленность маркерных таксонов в точке «До» ( $n = 8 - 13$ ) (В) Тепловая карта, представляющая корреляцию Спирмена между представленностью идентифицированных маркеров в точке «До» с количеством опухолей, наблюдаемым в точке «КРР». Незначимые корреляции перечеркнуты. «До» - точка до начала эксперимента (до инъекции АОМ). R1 и R2 - различные комнаты содержания животных.

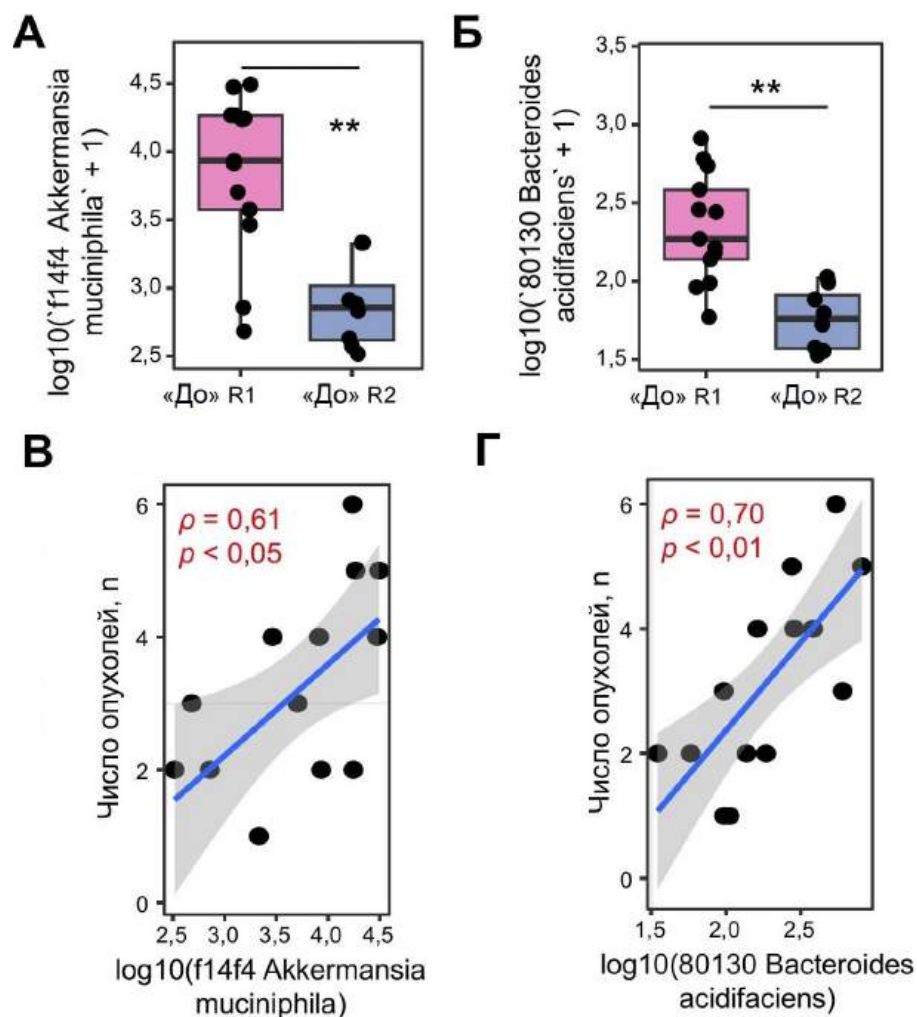
В точке «До» *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* показали положительную корреляцию с количеством опухолей (критерий Спирмена:  $\rho = 0,53$ ,  $p < 0,01$  и  $\rho = 0,76$ ,  $p < 0,001$  соответственно, Рисунок 35В). В итоге среди более чем 600 рассмотренных бактериальных признаков было выделено несколько таксонов, устойчиво ассоциированных с опухолевой нагрузкой в модели АОМ/DSS.

### 7.2.2 Роль бактериальных маркеров до индукции колита

Поскольку микробиота претерпевает изменения на всех этапах развития колоректального рака, представляло интерес проследить динамику отобранных маркеров на разных стадиях процесса и оценить взаимосвязи между ключевыми бактериальными признаками. Для этого были взяты в анализ нормированные количества ключевых таксонов в точках «До» и «сDSS» с использованием корреляционного анализа Спирмена.

В исходной микробиоте значимая положительная корреляция обнаруживалась только между представленностью *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* ( $\rho = 0,79$ ,  $p < 0,001$ ). Исходные нормированные количества *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* были значительно ниже в колонии «R2» по сравнению с «R1» (критерий Вилкоксона с поправкой Бенджамини–Хохберга: *A. muciniphila*, «До R1» vs «До R2»:  $W = 95$ ,  $p = 0,002$ ; *B. acidifaciens*, «До R1» vs «До R2»:  $W = 96$ ,  $p = 0,003$ ;  $n = 8-13$ ; Рисунок 36А, Б). По итогам этой работы были отобраны два бактериальных таксона, представленные в исходной микробиоте, которые коррелировали с количеством опухолей (Рисунок 36).

Положительная корреляция исходного количества *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* (Рисунок 36 В, Г) с числом опухолей согласуется с данными Baxter и соавт., показавших связь между частотой возникновения АОМ/DSS-индуцированных опухолей и количеством *A. muciniphila* и *Bacteroides* spp. (Baxter *et al.*, 2014). Секвенирование микробиома содержимого кишечника и фекалий выявило маркерные таксоны исходной микробиоты (до введения АОМ/DSS), ассоциированные с высокой восприимчивостью к образованию опухолей.



**Рисунок 36.** Корреляция между идентифицированными «маркерными» бактериями в микробиоте двух колоний мышей до инъекции АОМ (точка «До»). (А–Б) Представленность отобранных маркерных бактерий в точках «До» и «сDSS» ( $n = 8 - 13$ ). Точки, показанные красным, обозначают выбросы. (В–Г) Корреляция Спирмена между бактериальными маркерами и количеством опухолей у мышей. «До» - точка до начала эксперимента (до инъекции АОМ). «R1 и R2 - различные комнаты содержания животных.

Эти маркерные микроорганизмы были аннотированы как широко распространенные представители комменсальной микрофлоры *A. muciniphila* и *B. acidifaciens*. Более того, исходное количество этих бактерий было тесно связано с уровнем маркерного таксона, характерного для стадии хронического колита — *D. fairfieldensis* (Achasova *et al.*, 2025). Представленность указанных таксонов коррелировала не только с количеством опухолей, но и с экспрессией генов провоспалительных цитокинов на стадии индукции воспаления (Achasova *et al.*, 2025). В совокупности полученные данные указывают на взаимосвязь между исходным составом микробиоты, дисбиозом, формирующимся в ходе воспаления, и развитием КРР.

## Глава 8. Обсуждение результатов

Современные эпидемиологические данные указывают на неуклонный рост ВЗК, что связывают с изменением образа жизни и преобладанием «западной» диеты, которые оказывают влияние на состав микробиоты и реактивность иммунной системы (Kaplan, 2015; Ng *et al.*, 2017). В классическом понимании нарушение барьерной функции трактуется либо как вторичное следствие иммунной активации (Baumgart и Sandborn, 2007; Neurath, 2017), либо как результат первичных генетических дефектов структурных белков и молекул адгезии (Mirkov *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015).

Действительно, дисфункция кишечного барьера признана ключевым событием, приводящим к транслокации микробных антигенов в подслизистый слой кишечника (Turner, 2009; Michielan и D'Incà, 2015). Несмотря на успехи антицитокиновой терапии, значительная часть пациентов не достигает полного заживления слизистой оболочки кишечника, а субклиническое воспаление и нарушение проницаемости эпителиального барьера часто сохраняются даже в фазе клинической ремиссии (Chang *et al.*, 2017; Vivinus-Nébot *et al.*, 2014). Ряд авторов рассматривает белки плотных контактов как важную потенциальную мишень в терапии ВЗК (Capaldo, 2023; Edelblum и Turner, 2009).

Результаты диссертационной работы позволяют рассматривать метаболические нарушения эпителиального барьера как фундаментальный компонент развития ВЗК и связанных с ними системных расстройств. Кишечный эпителий характеризуется высокой интенсивностью метаболических процессов и требует высокой скорости биосинтеза АТФ для поддержания клеточной поляризации и барьерной функции (Roediger, 1980; Lanis *et al.*, 2017). В этом и других исследованиях было показано, что структурные дефекты кишечного эпителия, такие как нарушение организации микроворсинок, изменения цитоскелета и нарушение межклеточных контактов, связаны с существенными сдвигами

метаболизма митохондрий (Novak и Mollen, 2015; Boyapati *et al.*, 2018; Borisova *et al.*, 2020) и нарушением обмена мембранных фосфо- и сфинголипидов (Bock *et al.*, 2007; Suh и Saba, 2015).

Такой подход позволяет обсуждать не только локальные повреждения кишечника, но и системные сопутствующие расстройства, часто наблюдаемые при ВЗК, такие как тревожность и депрессия. Существующие данные о связи воспаления с изменениями поведения (Bercik *et al.*, 2011; Cryan и Dinan, 2012) в данном исследовании дополняются результатами, указывающими на роль нарушения метаболизма нейроактивных аминокислот, регулируемого микробиотой. Кроме того, метаболическая активность бактерий (в частности, продукция сероводорода и деградация муцинов) формирует условия для воспалительного канцерогенеза (Cai *et al.*, 2010; Nie *et al.*, 2023).

### **8.1 Энергетический метаболизм как основа целостности эпителиального барьера**

Обобщение экспериментальных данных, представленных в главах 3 и 4, позволяет уточнить последовательность клеточных событий при хроническом колите. Считается, что провоспалительные цитокины (TNF, IFN- $\gamma$ ) через внутриклеточные сигнальные пути приводят к изменению состава и локализации белков плотных контактов, что сопровождается повышением проницаемости эпителия. В приведенных в данной работе экспериментальных моделях хронического колита и в материале от пациентов с ВЗК в стадии клинической ремиссии нарушение барьерной функции сохранялось и на этапе, когда количество провоспалительных цитокинов снижается и активируются противовоспалительные механизмы, что указывает на вклад иных факторов в поддержание повреждения барьера. Автор работы связывает эти наблюдения с существенным нарушением клеточного и системного метаболизма.

В частности, полученные данные поддерживают гипотезу о том, что митохондриальная дисфункция и связанный с ней дефицит АТФ являются важными факторами в формировании структурных дефектов актинового цитоскелета. Такой метаболический сдвиг, наряду с прямым действием цитокинов, препятствует формированию межклеточных контактов и

приводит к потере барьерной функции эпителия. Эта схема позволяет объяснить существенные ультраструктурные нарушения эпителиальных клеток, которые наблюдаются у пациентов в фазе клинической ремиссии.

### 8.1.1 Митохондриальный метаболизм и его роль в формировании эпителиального барьера

В литературе митохондриальная дисфункция при ВЗК часто рассматривается как вторичное событие, возникающее на фоне окислительного стресса при активном воспалении. В модели генетически обусловленного дефицита белка муцина-2 (*Muc2<sup>-/-</sup>*), использованной в этой работе, признаки митохондриального повреждения выявлялись на фоне уже сформировавшегося хронического воспаления. Ультраструктурный анализ показал потерю крист и обеднение матрикса митохондрий, что морфологически соответствует нарушению окислительного фосфорилирования.

Эти наблюдения согласуются с концепцией энергетического дефицита колоноцитов при язвенном колите, первоначально сформулированной Roediger (1980) и далее развитой в работах, показавших нарушение окисления бутирата и сдвиг метаболизма колоноцитов в сторону гликолиза (Jørgensen *et al.*, 2010; Preter *et al.*, 2012). Отмеченное в этой работе снижение уровня АТФ и скорости потребления кислорода согласуется с результатами Sifroni и соавторов (2010) и Novak и Mollen (2015), показавших снижение активности комплексов дыхательной цепи в биоптатах пациентов.

В модели *Muc2<sup>-/-</sup>* наблюдались нарушения практически всех мембранных структур эпителия: изменение плотных и адгезионных контактов, дегградация микроворсинок, а также увеличение количества десмосом при нарушении их структуры (Borisova *et al.*, 2020). Эти изменения сочетались с признаками митохондриального повреждения. С учетом полученных в этой работе данных липидного анализа крипт толстой кишки более вероятно связывать митохондриальную дисфункцию не только с окислительным стрессом, но и с изменением метаболизма мембранных липидов, прежде всего фосфолипидов и церамидов. Нарушение состава и структуры липидного бислоя может одновременно затрагивать плазматическую мембрану, внутриклеточные мембраны и митохондрии,

что согласуется с выявленным снижением уровня АТФ и перестройкой клеточных контактов.

Дополнительный аргумент в пользу значимости метаболизма митохондрий для поддержания барьерной функции дает эксперимент с разобщителем цепи передачи электронов в митохондриях, 2,4-динитрофенолом (DNP). Ранее влияние дефицита АТФ на барьерную функцию изучали преимущественно на клеточных линиях (Caco-2, T84), где метаболическое ингибирование вызывало быструю потерю трансэпителиального сопротивления (Bacallao *et al.*, 1994; Mandel *et al.*, 1993). В нашем исследовании аналогичный подход был применен *in vivo* у интактных животных. Химическое разобщение дыхательной цепи сопровождалось интернализацией клаудина-3 в эпителии толстой кишки при отсутствии выраженного воспаления и приводило к повышению проницаемости кишки для макромолекул. Это наблюдение указывает на то, что функциональное состояние митохондрий определяет структурную целостность эпителиальных клеток.

### **8.1.2 Актиновый цитоскелет как потенциальная мишень при нарушении энергетического метаболизма**

Еще один важный аспект хронического воспаления, который был выявлен в данной работе, - это нарушение актинового цитоскелета, которое было подтверждено на трех моделях хронического колита *in vivo* и в биоптатах, полученных от пациентов с язвенным колитом. В большинстве работ дефекты цитоскелета при ВЗК рассматриваются как вторичные по отношению к воспалению. Наши данные позволяют рассматривать дезорганизацию F-актина как одно из ключевых звеньев, опосредующих нарушение барьера.

Апикальный актиновый пояс и микроворсинки поддерживаются за счет непрерывной АТФ-зависимой полимеризации актина (Pollard *et al.*, 2003). В условиях дефицита АТФ описанное динамическое равновесие смещается в сторону деполимеризации. Наблюдаемый в модели генетически обусловленного колита фенотип — укорочение микроворсинок и удлинение их корешков — близок к ультраструктурным изменениям при целиакии и болезни Крона, описанным VanDussen и соавторами (2018), что

позволяет рассматривать такие изменения как типичный ответ эпителия на метаболический стресс.

Особое значение имеет механизм интернализации белков плотных контактов. Считается, что цитокины инициируют эндоцитоз клаудинов через активацию киназ (например, MLCK). Результаты, приведенные в этой работе, указывают на перераспределение белков клаудин-3 и клаудин-7 в цитоплазму на фоне структурных дефектов полимерного актина. Они согласуются с моделью Shen и Turner (2005), согласно которой целостность актинового кольца необходима для стабилизации клаудинов на мембране. Данная работа дополняет эту модель, указывая на роль полимеризации актина, которая зависит от митохондриальной функции и энергетического статуса клетки.

Также в представленной работе наблюдается парадоксальный эффект разнонаправленного изменения локализации клаудина-7 и  $\beta$ -катенина при нарушении динамики F-актина. Стабилизация F-актина джасплакинолидом приводит к снижению пула этих белков в области межклеточных контактов, возможно, за счет их перемещения в цитоплазму в результате неструктурированной агрегации актина. Напротив, деполимеризация актина латрункулином А вызывает их избыточное накопление на мембране, что может отражать нарушение процесса эндоцитоза и рециркуляции белков при разрушении актомиозинового кольца. Примечательно, что в обоих случаях наблюдается падение уровня F-актина и закономерный рост проницаемости эпителиального барьера. Это доказывает, что для поддержания функции апикального соединительного комплекса в эпителии критическую роль играет динамический баланс полимерного и мономерного актина.

Кроме того, в данной работе было показано, что белковый комплекс клаудина-3 в основном состоит из актин-связывающих белков и регуляторов актина, что указывает на тесную связь плотных контактов с актиновым белковым комплексом. Это подтверждает данные, полученные ранее в клеточной модели эндотелия сосудов (Bakkouri *et al.*, 2024). Еще более важным результатом, представленным в данной работе, является то, что в генетически обусловленной модели хронического воспаления белковые взаимодействия между клаудином-3 и актином и его белками-партнерами утрачены. Это указывает на ключевую роль актина в формировании

барьерной дисфункции при ВЗК.

## 8.2 Роль актина в формировании эпителиального барьера в норме и при воспалении

### 8.2.1 Динамика актина и его взаимодействие с белками клеточных контактов

Многочисленные исследования, посвященные изучению экспрессии и локализации белков ПК и АК, были сосредоточены на острой фазе воспаления как на модельных животных, так и у пациентов с ВЗК. Как правило, в этих работах сообщается о снижении уровней JAM-A, ZO-1, клаудина-7, E-кадгерина и  $\beta$ -катенина (Mehta *et al.*, 2015; Lechuga Ivanov, 2017; Vetrano *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2021; Oshima *et al.*, 2008; Luettig *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2021; Robinson *et al.*, 2019; Ohta *et al.*, 2014; Ivanov *et al.*, 2004). Существуют также сообщения о стабильном или даже повышенном уровне белков ПК и АК при воспалении, что подчеркивает сложную природу ВЗК (Luettig *et al.*, 2015; Ohta *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2020; Fredericks *et al.*, 2018). Здесь описана делокализация клаудина-3, клаудина-7,  $\beta$ -катенина и E-кадгерина с латеральной плазматической мембраны без изменения общего уровня этих белков. Эти нарушения сопровождаются существенным снижением F-актина в трех различных моделях колита *in vivo* и у пациентов с ЯК. Опираясь на литературные данные, можно предположить, что такая делокализация белков ПК и АК обусловлена эндоцитозом (Bruewer *et al.*, 2005). Например, провоспалительные цитокины, такие как TNF и IFN $\gamma$ , повышают эпителиальную проницаемость (Ivanov *et al.*, 2004; Bruewer *et al.*, 2003). Исследования показывают, что этот эффект опосредован интернализацией белков контактов, поскольку блокада эндоцитоза сохраняет барьерную функцию (Bruewer *et al.*, 2005; Ivanov *et al.*, 2004; Bruewer *et al.*, 2003).

Хотя физическая ассоциация между F-актином и комплексами ПК и АК хорошо установлена в здоровых эпителиальных тканях, судьба этого взаимодействия при развитии воспаления остается не до конца ясной. Литературные данные указывают на то, что медиаторы воспаления нарушают актиновый цитоскелет в монослоях эпителия кишечника *in*

*vitro*. Однако данные о реорганизации F-актина при воспалении *in vivo* противоречивы (Ivanov *et al.*, 2010; Musch *et al.*, 2006; Oshitani *et al.*, 2005). В этом исследовании показано, что актиновая сеть составляет большую часть интерактома клаудина-3, что указывает на прямое физическое взаимодействие. В то же время воздействие на баланс мономерного и полимерного актина с помощью латрункулина А или джасплакинолида не только разрушает F-актин в энтероцитах, но и одновременно нарушает локализацию и функцию ПК и АК. Эти результаты согласуются с приведенными в этой работе данными на моделях *in vivo* и у пациентов с ЯК, а также с предыдущими исследованиями, которые связывают динамику актина с барьерной функцией в клеточных культурах (Trojanovsky *et al.*, 2025; Song *et al.*, 2019; van Goor *et al.*, 2012). Таким образом, изучение архитектуры актина на расширенной когорте пациентов с ЯК и БК с помощью высокоточной микроскопии является перспективной стратегией. Кроме того, тестирование лекарственных препаратов, модифицирующих F-актин, в качестве потенциальной терапии, направленной на восстановление барьера, представляет собой еще одно многообещающее направление для будущих исследований.

### **8.2.2 Транскрипционная регуляция и потенциальная роль гена *PREX1***

Сравнительный ультраструктурный анализ образцов кишки, полученных от модельных животных и от пациентов с ВЗК выявил идентичные морфологические особенности клеточных нарушений. В частности, в главах 3 и 4 этой работы показаны деградация цитоскелета, расхождение плотных и адгезивных контактов, изменение структуры микроворсинок с практически полной потерей их структуры на фоне колита. Учитывая данные по снижению уровня филаментного актина в моделях ВЗК и у пациентов с язвенным колитом, следует искать сходные регуляторные события как у пациентов, так и на лабораторных моделях. На уровне регуляции генов в этой работе с помощью методов биоинформатического анализа предсказано нарушение регуляции оси *PREX1–Rac1* как возможный механизм структурной дестабилизации актинового цитоскелета. Байесовский сетевой анализ позволил выделить

ген *PREX1* как один из потенциальных регуляторов актина при воспалении, что ранее не обсуждалось в контексте ВЗК. Гены *PREX1* и *Rac1* активно изучались в контексте канцерогенеза, в том числе в связи с эпителиально-мезенхимальным переходом и метастазированием (Hernández-Negrete *et al.*, 2007), но их роль в поддержании структурной целостности эпителия при кишечном воспалении практически не рассматривалась.

В литературе описаны как защитные, так и потенциально повреждающие эффекты белка Rac1. С одной стороны, его активность необходима для миграции клеток и заживления ран, с другой — гиперактивация может приводить к утрате полярности эпителия. В приведенном здесь транскриптомном анализе был проведен поиск регуляторов цитоскелета у мышей с хроническим колитом на основе предварительно отобранных с помощью байесовской сети генов из открытых данных, полученных от пациентов с ВЗК. В толстой кишке мышей с нокаутом гена *Muc2* выявлялось снижение экспрессии *Prex1*, что совпадает с данными Martínez-Sánchez и соавт. (2023) о важной роли эпителиального Rac1 в поддержании барьера. Дополнительное внимание привлекает ген *ACTN1*, кодирующий  $\alpha$ -актинин-1, ключевой компонент актинового цитоскелета на апикальной поверхности энтероцитов. В экспериментальной модели наблюдалось изменение экспрессии гена *Actn1*, а при анализе транскриптомных данных пациентов с ВЗК — разнонаправленные сдвиги экспрессии этого гена, что может отражать различия между стадиями заболевания или формирование компенсаторных механизмов, отсутствующих в модельных системах.

Сопоставление полученных в этой работе данных с транскриптомными базами на основании анализа образцов от пациентов с ВЗК показывает, что изменение экспрессии регуляторов цитоскелета (*PREX1*, *EHD2*, *ANXA5*) является устойчивым признаком заболевания. В частности, изменение уровня аннексина А5, участвующего в репарации мембран (Gerke *et al.*, 2005), может свидетельствовать о нарушении механизмов восстановления эпителиальных клеток. Тем не менее, каждый из теоретически предсказанных генов необходимо проверить в функциональных тестах экспериментально, чтобы однозначно установить их роль в регуляции

актина. Дальнейшие исследования гена *PREX1* будут включать экспериментальные работы по его сверхэкспрессии в клеточных системах и использование специфических ингибиторов для выявления его функциональной роли в регуляции эпителиального барьера *in vivo*.

В контексте патогенеза ВЗК остается открытым вопрос, является ли повышение экспрессии гена *PREX1* причиной или следствием воспаления. Отсутствие этого гена среди классических локусов риска развития ВЗК указывает на то, что повышение его экспрессии, вероятно, вторично и индуцировано воспалительным ответом. Однако хроническая гиперактивация оси *PREX1/Rac1* может превращаться в самостоятельный патологический драйвер, усиливая хемотаксис лейкоцитов и нарушая межклеточные контакты эпителиоцитов.

В целом, приведенные выше результаты указывают на то, что терапевтические стратегии, ориентированные исключительно на подавление иммунного ответа, могут быть недостаточными для восстановления барьерной функции кишечника при ВЗК.

### **8.3 Липидный метаболизм как регулятор проницаемости и воспаления**

Полученные данные о липидном профиле при хроническом колите необходимо рассматривать в контексте описанных выше изменений энергетического метаболизма и структуры эпителия. Липиды в кишечнике выполняют несколько ключевых функций: участвуют в формировании физического барьера, влияют на энергетический обмен (в том числе через бета-окисление жирных кислот) и задействованы в работе сигнальных каскадов. В настоящем исследовании были выявлены изменения состава сфинголипидов и глицерофосфолипидов при колите на модельных животных, что согласуется с данными на пациентах с ВЗК. На основании наших результатов и данных литературы можно предположить, что такие метаболические сдвиги могут одновременно затрагивать митохондриальную функцию и биосинтез АТФ, структуру мембранных комплексов межклеточных контактов и сигнальные пути, связанные с цитоскелетом. Ниже эти потенциальные механизмы обсуждаются более детально.

### 8.3.1 Дисбаланс сфинголипидов и роль C16- и C24-церамидов

Накопление широкого спектра церамидов при дефиците белка MUC2 в сочетании с повышенной экспрессией генов *CerS3* и *CerS6* указывает на то, что при хроническом колите происходит специфическая регуляция биосинтеза сфинголипидов. С учетом литературных данных о функциональной специфичности церамидов разной длины цепи (Hannun и Obeid, 2008; Helke *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2017) можно предположить, что изменение соотношения длинно- и очень длинноцепочечных церамидов влияет на физические свойства мембран эпителия и их устойчивость к воспалительному стрессу. Сверхэкспрессия *CerS6*, продуцирующего церамиды C14-C16, усиливает апоптоз в клетках аденокарциномы толстой кишки (Levy Futerman, 2010). Повышение уровня церамидов C16 в результате нокаута гена *CerS2* усиливает химически индуцированный колит (Kim *et al.*, 2017). В то же время *CerS3* в покровных тканях участвует в образовании очень длинноцепочечных церамидов (Levy Futerman, 2010), важных для поддержания барьерных свойств (Radner *et al.*, 2013; Levy Futerman, 2010). В кишечнике изменение активности этих синтаз может одновременно способствовать накоплению потенциально повреждающих видов и запуску компенсаторных механизмов, направленных на укрепление мембран, что требует дальнейших функциональных исследований.

Накопление C16-церамидов приводит как к изменению физических свойств мембран, так и к активации сигнальных путей. Согласно модели «липидных рафтов» (Simons и Toomre, 2000), церамиды с насыщенными остатками жирных кислот способны к формированию упорядоченных микродоменов, что изменяет организацию рафтов, с которыми связаны белки семейства эзрин–радиксин–моезин, обеспечивающие связь межклеточных контактов с актиновым цитоскелетом (Goni и Alonso, 2002; Bollinger *et al.*, 2005). Это может приводить к изменению структуры цитоскелета и перераспределению белков межклеточных контактов. Кроме того, церамиды участвуют в активации каскада NF- $\kappa$ B и продукции цитокинов, а также могут запускать митохондриальный путь апоптоза (Müller *et al.*, 2019; Sakata *et al.*, 2007; Siskind, 2005).

Эксперименты с фумонизином B1 (ингибитором синтеза церамидов *de novo*) показали, что подавление биосинтеза церамидов сопровождается

частичным восстановлением барьерной функции. Это согласуется с данными Вауер и соавт. (2009), показавших участие церамидов в индукции матриксных металлопротеиназ. На этом основании церамидсинтазы 3 и 6 могут рассматриваться как перспективные объекты для дальнейшего изучения в контексте поиска новых мишеней для создания средств лечения ВЗК. Наши данные о связи церамидного сдвига с выраженными морфологическими изменениями эпителия позволяют рассматривать этот путь как один из компонентов комплексного нарушения барьерной функции.

### 8.3.2 Церамиды и барьерная функция

Кишечное воспаление в других моделях ВЗК также ассоциировано с повышенным уровнем церамидов (Sakata *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2011; Suh Saba, 2015). Содержание церамидов возрастает на 71% в модели хронического колита, индуцированного DSS, и до 160% в модели АТС (Bauer *et al.*, 2009). Как следует из данной работы, модель колита с нокаутом гена *Muc2* также характеризуется повышенным уровнем кишечных сфинголипидов, включая церамиды.

В настоящем исследовании рассмотрена гипотеза, что накопление церамидов в эпителии толстой кишки нарушает актиновый цитоскелет, приводя к делокализации белков ПК и АК и последующему увеличению парацеллюлярной проницаемости. Будучи вторичными посредниками, церамиды активируют свои эффекторы — протеинфосфатазу и атипичную РКСζ — которые, в свою очередь, модулируют сигнальный каскад MAPK, способствуя воспалительным и апоптотическим реакциям (Spiegel *et al.*, 1996). Ассоциированная с церамидами РКСζ регулирует сборку актина и клеточную адгезию, обеспечивая связь с динамикой цитоскелета (Liu *et al.*, 2016; Bieberich, 2008; Krishnamurthy *et al.*, 2007). Приведенные данные подтверждают результаты Bock *et al.*, которые обнаружили, что индуцированное сфингомиелиназой накопление церамидов в мембранных фракциях, содержащих окклюдин и клаудин-4, увеличивает проницаемость монослоя культивируемых клеток. Авторы позиционируют церамиды как первичный индуктор барьерной дисфункции (Bock *et al.*, 2007). Кроме того, Kim *et al.* показали, что нокаут гена *CerS2* влияет на фосфорилирование легких цепей миозина, тем самым дестабилизируя актиновые филаменты и

увеличивая проницаемость эпителия (Kim *et al.*, 2017).

Фармакологическое ингибирование биосинтеза церамидов с помощью фумонизина В1 частично восстанавливало барьерную функцию у мышей с нокаутом гена *Muc2*, вероятно, за счет снижения уровня патогенных видов церамидов. Церамиды могут изменять организацию плазматической мембраны, накапливаясь в липидных рафтах и вытесняя холестерин, что связано с дислокацией белков ПК и повышенной проницаемостью эпителия (Bock *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; McGuinn Mahoney, 2014). Взаимодействие между липидными рафтами и актиновым цитоскелетом является двунаправленным: состав рафтов может запускать Rho-зависимое ремоделирование актина (Saslowsky *et al.*, 2016; Kwik *et al.*, 2003), в то время как стабильность самих рафтов зависит от F-актина (Danielsen Hansen, 2003). Дестабилизация актина нарушает рафты, перераспределяет ассоциированные с рафтами белки и усиливает эндоцитоз (Oliferenko *et al.*, 1999). Данные, полученные в этой работе, позволяют предположить, что накопление церамидов влияет на реорганизацию цитоскелета и последующие дефекты межклеточных контактов, возможно, через ремоделирование липидных рафтов. Этот потенциальный механизм согласуется с исследованием, показывающим нарушение рафтов в воспалительных условиях после воздействия цитокинов (Bowie *et al.*, 2012).

Другой возможный механизм включает метаболизм сфингозина. Сфингозин способствует мембранной ассоциации  $\beta$ -катенина в раковых моделях и клеточных культурах (Schmelz *et al.*, 2001). Церамидсинтазы используют сфингозин в качестве субстрата, что, возможно, способствует делокализации белка  $\beta$ -катенина (Li *et al.*, 2022). Однако, несмотря на значительное восстановление барьера у мышей с нокаутом гена *Muc2*, изменений в локализации клаудина-7 не наблюдалось. Точная роль клаудина-7 остается неясной, поскольку сообщалось, что он функционирует как в качестве запирающего, так и порообразующего белка (Günzel Yu, 2013; Krause *et al.*, 2008). Учитывая контекст-зависимые функциональные свойства клаудина-7 (Capaldo, 2023), полученный результат может указывать на возможную роль других белков семейства клаудинов.

Стоит отметить, что фумонизин В1 является мощным микотоксином, непригодным для клинического применения (Chen *et al.*, 2021), и

его эффекты зависят от пути введения в организм. В то время как использованное в данной работе локальное ректальное введение достигло таргетного эффекта, другие исследования сообщали о повышении эпителиальной проницаемости после перорального введения фумонизина В1, вероятно, из-за длительного воздействия на весь желудочно-кишечный тракт (Li *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2020; Bouhet *et al.*, 2004). Тем не менее, эта работа служит доказательством концепции, что ингибирование биосинтеза церамидов является жизнеспособной стратегией для восстановления эпителиального барьера при ВЗК. Учитывая токсичность фумонизина В1, будущие усилия следует направить на разработку новых низкотоксичных прецизионных ингибиторов, которые могут безопасно воздействовать на этот путь.

### 8.3.3 Фосфолипидный профиль и ремоделирование жирных кислот

Параллельно с изменениями сфинголипидов при колите наблюдались сдвиги в составе глицерофосфолипидов. Изменение содержания фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и других классов фосфолипидов согласуется с данными о снижении соотношения фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин при ВЗК и указывает на возможное нарушение биофизических свойств мембран (Li *et al.*, 2006; Van der Veen *et al.*, 2017). Учитывая, что фосфолипидный слой участвует как в формировании мембранных доменов плотных контактов, так и во внутренней организации органелл, эти сдвиги потенциально могут вносить вклад и в дестабилизацию межклеточных соединений, и в митохондриальную дисфункцию, обсуждаемую выше.

Отдельное значение имеет состав жирнокислотных остатков. Ранее было показано, что при колите происходит замещение линолевой кислоты арахидоновой в составе мембранных фосфолипидов (Trebble *et al.*, 2003; Boldyreva *et al.*, 2021), что повышает возможность образования провоспалительных эйкозаноидов и накопления лизофосфолипидов. На фоне выявленных в этой работе изменений экспрессии генов, кодирующих фосфолипазы А и С (*Pla2g2e*, *Plcb1*, *Plcb4*) можно предположить, что ремоделирование фосфолипидов и повышенное

высвобождение арахидоновой кислоты и лизоформ участвует в поддержании воспалительной реакции и изменении свойств мембран эпителия.

### 8.3.4 Метаболизм липидов как регулятор функции митохондрий

Полученные в ходе выполнения этой работы экспериментальные данные также указывают на связь между экзогенными липидами и функцией митохондрий. Препараты фосфатидилхолина и лецитина рассматриваются как потенциальные средства терапии язвенного колита (Stremmel *et al.*, 2007; Karner *et al.*, 2014), однако при активном воспалении высокие дозы экзогенных фосфолипидов сопровождались нарушением митохондриальной функции и накоплением липидов в митохондриальной фракции.

Одним из возможных механизмов является вовлечение кардиолипина — специфического фосфолипида внутренней митохондриальной мембраны, необходимого для формирования комплексов дыхательной цепи (Paradies *et al.*, 2014; Dudek, 2017). Кардиолипин чувствителен к окислительному стрессу и подвержен ремоделированию. В условиях воспаления окисление кардиолипина активными формами кислорода и его аномальное ремоделирование могут приводить к дестабилизации внутренней мембраны и запуску апоптоза (Choi *et al.*, 2007; Tyurina *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2014; Orrenius & Zhivotovsky, 2005). В совокупности эти наблюдения указывают на то, что подходы к липидной терапии при ВЗК должны учитывать не только количественное восполнение фосфолипидов, но и их качественный состав и состояние митохондрий.

Интеграция метаболомных и транскриптомных данных позволяет рассматривать выявленные изменения сфинго- и фосфолипидов как часть более широкого механизма нарушения барьера, включающего митохондриальную дисфункцию и дестабилизацию актинового цитоскелета. Накопление церамидов различных классов и изменение фосфолипидного состава создают условия для изменения фазового состояния мембран, перераспределения белков межклеточных контактов и активации воспалительных сигнальных путей. Хотя данные, полученные в данной работе, не позволяют однозначно связать эти события, полученные результаты поддерживают представление о том, что нарушение липидного

метаболизма является одним из ключевых компонентов повреждения эпителиального барьера при хроническом колите.

#### **8.4 Метаболизм и микробиота в формировании расстройств поведения**

Нарушения метаболизма при ВЗК не ограничиваются локальными изменениями в кишечнике и могут затрагивать центральную нервную систему. Высокая коморбидность ВЗК с тревожно-депрессивными расстройствами объясняется либо реакцией на хроническую боль и снижение качества жизни, либо прямым воздействием провоспалительных цитокинов на мозг (Dantzer *et al.*, 2008; Graff *et al.*, 2009).

Полученные в данной работе результаты указывают на значимый вклад микробных метаболитов в формирование поведенческих фенотипов при воспалении. В ряде моделей наблюдались специфические изменения поведения (снижение тревожности, нарушение социальных предпочтений), сопоставимые по выраженности с изменениями профиля нейроактивных аминокислот и не всегда напрямую соответствующие степени тяжести кишечного воспаления.

##### **8.4.1 Глицин как регулятор тревожноподобного и социального поведения в модели колита *Muc2<sup>-/-</sup>***

Мыши с генетически обусловленным дефицитом муцина-2 (*Muc2<sup>-/-</sup>*) воспроизводят ключевые признаки хронического воспаления кишечника и демонстрируют высокие клинические и гистологические показатели колита (Van der Sluis *et al.*, 2006; Velcich *et al.*, 2002; Bergstrom *et al.*, 2010; Borisova *et al.*, 2020a). При этом поведенческое тестирование не выявило выраженных тревожно- или депрессивноподобных фенотипов, которые ранее неоднократно описывались для других моделей воспаления кишечника и у пациентов с ВЗК (Bercik *et al.*, 2011; Neuendorf *et al.*, 2016; Moulton *et al.*, 2019). Такое несоответствие между тяжестью воспаления и поведенческим профилем указывает на возможную роль микробиоты в формировании расстройств настроения при ВЗК.

Пересадка микробиоты от мышей линии *Muc2<sup>-/-</sup>* реципиентам через

совместное содержание и изменение микробиоты с помощью антибиотиков приводила к появлению характерных поведенческих фенотипов и сдвигов метаболического профиля, что подтверждает определяющее значение микробиоты в регуляции поведения (Borisova *et al.*, 2020b). Анализ микробного состава показал увеличение доли бактерии *Akkermansia muciniphila* в составе кишечного микробиома мутантных мышей. Этот вид, являясь основным представителем рода *Akkermansia* в кишечнике, специализируется на деградации муцинов и в ряде работ ассоциируется с благоприятными метаболическими эффектами и состоянием «здоровой» микробиоты (Derrien *et al.*, 2004; Everard *et al.*, 2013; Cani и de Vos, 2017). Его повышение при отсутствии муцина-2 может быть связано со снижением числа других симбионтов (таких как *Escherichia*, *Blautia*) или использованием трансмембранных муцинов в качестве субстрата (Johansson *et al.*, 2008; Borisova *et al.*, 2020b).

Метаболомный анализ крови методом ЯМР показал сдвиг метаболического профиля в результате переноса микробиоты, что согласуется с представлениями о значительном влиянии микробиоты на системный метаболизм хозяина (Romano *et al.*, 2017; Fan и Pedersen, 2021). Профилирование метаболитов мозга показало меньшую зависимость метаболизма ЦНС от микробиоты кишечника, но выявило глицин в качестве кандидата на роль медиатора, связанного с поведенческими изменениями в модели *Muc2<sup>-/-</sup>* (Morozova *et al.*, 2022). Фармакологическая блокада глицин-связывающих сайтов GlyR- и NMDA-рецепторов приводила к нормализации поведения *Muc2<sup>-/-</sup>*-мышей. Ранее было показано, что глицин способен снижать тревожность и влиять на обсессивно-компульсивное поведение и сенсомоторную фильтрацию (Betz и Laube, 2006; Strandwitz, 2018; Huang и Wu, 2021), что согласуется с наблюдаемыми поведенческими изменениями. Важно отметить, что ранее не была известна роль глицина и стрихнин-чувствительных рецепторов GlyR в регуляции межполового взаимодействия, которая описана в данной работе.

Дополнительный интерес представляет связь глицина с метаболизмом холина и бетаина. Метаболомный анализ крови выявил повышение уровней холина и бетаина как у *Muc2<sup>-/-</sup>*, так и у *Muc2<sup>+/+</sup>*-мышей, что важно с учетом их роли как предшественников в метаболизме глицина

(Romano *et al.*, 2017). Холин способен пересекать гематоэнцефалический барьер и модифицировать поведение, включая снижение тревожности и стереотипного поведения в ряде моделей (Romano *et al.*, 2017). В рассматриваемой модели отсутствие повышения холина в мозге на фоне увеличения его концентрации в крови, а также сопутствующее повышение бетаина скорее указывают на его активный периферический метаболизм (Vorisoa *et al.*, 2020b). С учетом того, что свободный холин способен высвободиться из фосфатидилхолина под действием фосфолипаз, увеличение ФЛ в кишке мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* может объяснять накопление холина и, соответственно, бетаина в крови. Таким образом, данная работа демонстрирует связь кишечного метаболизма фосфолипидов и биосинтеза глицина в мозге. В пользу этой гипотезы говорят данные, полученные соискателем и соавторами о том, что добавление экзогенных ФЛ в корм мышей вызывает поведенческие нарушения, сходные с таковыми, описанными для животных линии *Muc2<sup>-/-</sup>* (Morozova *et al.*, 2024, Boldyreva *et al.*, 2024).

На ключевую роль *Akkermansia muciniphila* в регуляции полового и агрессивного поведения указывают результаты, подготовленные и обнародованные автором и коллегами. В указанной работе внутрижелудочное введение чистого штамма этого микроорганизма приводило к нарушению распознавания социально-значимых запахов и межполовых взаимодействий (Morozova *et al.*, 2025, препринт). Вероятнее всего, этот микроорганизм не является единственным таксоном, который способен регулировать межполовые взаимодействия. Предположительно, компоненты микробиоты кишечника, вовлеченные в продукцию летучих жирных кислот, в первую очередь, ацетата, пропионата и бутирата, также вносят вклад в формирование подобных нарушений социального поведения (Morozova *et al.*, 2025, препринт).

В целом приведенные данные указывают на то, что микробиота и связанные с ней изменения метаболизма ФЛ в кишке, холина и бетаина в крови и глицина в мозге могут существенно модифицировать поведенческий ответ на хроническое воспаление кишечника. Следует подчеркнуть, что все приведенные выводы относятся к экспериментальным моделям на мышах, а их перенос на пациентов с ВЗК требует осторожности и прямых

исследований.

#### 8.4.2 Метаболизм триптофана и распознавание социальных запахов в модели химически индуцированного колита

Эксперименты с использованием линии мышей *Muc2<sup>-/-</sup>* позволили показать, что состав микробиоты кишечника и ассоциированный с ним метаболизм в физиологических условиях регулируют жизненно важные поведенческие характеристики, включая половое и социальное поведение.

В следующей части исследования для анализа взаимосвязи хронического воспаления, микробиоты, метаболизма и поведения использована модель хронического колита, индуцированного DSS. В этой модели воспаление сопровождалось системным метаболическим сдвигом, что было показано методом ЯМР-спектроскопического анализа метаболомного профиля сыворотки крови мышей. Полученные профили метаболитов крови существенно отличались от контроля, подтверждая системный характер хронического воспаления (Borisova *et al.*, 2020a). Один из наиболее устойчивых эффектов затрагивал метаболизм триптофана: в сыворотке наблюдалось примерно 30-процентное снижение его концентрации при отсутствии сопоставимых изменений других незаменимых аминокислот. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами у пациентов с ВЗК и в моделях острого колита, где также описано снижение уровня триптофана в плазме крови (Nikolaus *et al.*, 2017; Alexeev *et al.*, 2018).

Снижение триптофана связывают с активацией кинуренинового пути под влиянием провоспалительных цитокинов и повышением активности фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (O'Connor *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 2017). В нашей модели хронического DSS-индуцированного колита экспрессия этого гена была повышена, что согласуется с описываемым в литературе механизмом (Borisova *et al.*, 2020b). Однако добавление L-фукозы на фоне хронического воспаления нормализовало концентрацию триптофана в сыворотке, не изменяя при этом экспрессию гена, кодирующего индоламин-2,3-диоксигеназу, и экспрессию провоспалительных цитокинов. Это позволяет предположить, что помимо активации кинуренинового пути в регуляции уровня триптофана участвуют дополнительные механизмы,

связанные с микробиотой кишечника.

Представители симбиотической микробиоты кишечника способны синтезировать триптофан *de novo* и вносить вклад в его системный пул (Dodd *et al.*, 2017). В данной работе хронический индуцированный DSS колит сопровождался снижением численности *Escherichia coli* и *Bifidobacterium*, относящихся к потенциальным триптофан-продуцирующим таксонам, тогда как добавление L-фукозы нормализовало уровни *E. coli* и одновременно восстанавливало концентрацию триптофана в сыворотке крови (Borisova *et al.*, 2020b). Это согласуется с предположением, что снижение количества триптофан-продуцирующих бактерий при хроническом воспалении вносит вклад в снижение системного уровня триптофана. В то же время, свободная L-фукоза создает более благоприятные условия для поддержания высокого уровня таких бактерий. При этом прямое введение культуры *E. coli* без изменения углеводной среды не приводило к ее устойчивой колонизации, что подчеркивает роль субстратной ниши, формируемой L-фукозой.

Также следует упомянуть потенциальную роль бактерий, катаболизирующих триптофан, в формировании метаболомного профиля хозяина. Несмотря на то, что исследование представленности этих микроорганизмов выходит за рамки приведенного исследования, они также способны вносить вклад в системный метаболизм триптофана. Ряд кишечных бактерий активно катаболизирует триптофан, превращая его в индол и другие индольные производные, такие как индол-3-пропионовая, индол-3-уксусная и индол-3-молочная кислоты (Roager *et al.*, 2018; Konopelski *et al.*, 2022). *Escherichia coli*, *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. и некоторые представители *Lactobacillus* и *Ruminococcus* экспрессируют фермент триптофаназу и другие ферменты путей катаболизма триптофана и, соответственно, могут не только влиять на его локальную концентрацию в просвете кишечника, но и формировать профиль циркулирующих индольных метаболитов (Roager *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2023; Konopelski *et al.*, 2022). Использованный в этой работе метод ЯМР-спектроскопического анализа метаболитов сыворотки крови не позволяет детектировать индольные производные триптофана, поэтому о таком пути его метаболизма в использованной модели DSS-индуцированного колита сделать однозначный вывод нельзя.

Интересно отметить эффект L-фукозы на метаболизм триптофана. В норме этот моносахарид входит в состав гликокаликса эпителиальных клеток кишки и секретируемых гликопротеинов муцинов. С одной стороны, на фоне колита истончается и разрыхляется слой мукуса, продуцируемого бокаловидными клетками. С другой стороны, нарушение функции гена *FUT2* (кодирует фукозилтрансферазу-2), ассоциировано с ВЗК и ведет к нарушению состава микробиоты кишечника и снижению защитных свойств мукуса (McGovern *et al.*, 2010; Rausch *et al.*, 2011). Вероятно, свободная L-фукоза выступает в роли фактора вирулентности и источника углеводов для ряда микроорганизмов, меняя состав микробиоты и модулируя метаболические пути, включая метаболизм триптофана.

На фенотипическом уровне химически индуцированный хронический колит приводил к специфическим нарушениям социального поведения. Самцы мышей утрачивали естественное предпочтение запаха самок перед запахом самцов, при этом общая двигательная активность и ответ на пищевые стимулы оставались интактными (Borisova *et al.*, 2020b). Подобный поведенческий профиль детально описан для мышей с дефицитом развития центральных серотонинергических нейронов. Для таких животных описана потеря предпочтения запаха самки при сохранении других аспектов поведения (Liu *et al.*, 2011). Поскольку триптофан является предшественником серотонина и триптамина, участвующих в регуляции социального поведения, снижение его уровня при хроническом колите представляет собой один из возможных механизмов нарушения социального предпочтения. В пользу этой интерпретации свидетельствует тот факт, что введение 5-гидрокситриптофана, предшественника серотонина, восстанавливало нормальное социальное поведение у мышей с хроническим DSS-индуцированным колитом (Borisova *et al.*, 2020b).

Для уточнения роли *E. coli* в формировании поведенческого фенотипа было использовано воздействие рифампицином, приводящее к избирательному снижению численности этого таксона. В этом эксперименте воспроизводились нарушения социальных предпочтений, аналогичные таковым у мышей с химически-индуцированным хроническим колитом. Это поддерживает гипотезу о зависимости поведенческих изменений от доступности триптофан-продуцирующих бактерий и связанной с ними

серотонинергической нейротрансмиттерной передачи (Borisova *et al.*, 2020b). На этом фоне добавление L-фукозы восстановило как уровни *E. coli*, так и социальное поведение, при сохранении признаков воспаления в кишечнике, что указывает на относительную независимость этих эффектов от степени воспалительного ответа.

Важно отметить, что свободная L-фукоза сама по себе способна модулировать синаптическую передачу независимо от фукозилирования. В работе Di Lucente и соавторов (2025) показано, что L-фукоза усиливает возбуждающую нейротрансмиссию и долговременную потенцию в гиппокампе мышей через регуляцию пресинаптического высвобождения глутамата (Di Lucente *et al.*, 2025). Эти данные говорят о возможной прямой роли фукозы в модуляции поведения, затрагивающего межполовые взаимодействия, в обход ее эффектов на модуляцию микробиоты. Однако на данный момент литературные данные все-таки указывают на микробиоту как посредника в регуляции центрального метаболизма серотонина с помощью фукозы.

### **8.5 Пропионат-продуцирующие бактерии в канцерогенезе, ассоциированном с воспалением**

Пропионовая кислота - одна из основных короткоцепочечных жирных кислот, продуцируемых кишечной микробиотой в ходе ферментации пищевых волокон. Она играет важную роль в патогенезе ВЗК и колоректального рака. При ВЗК наблюдается снижение уровня пропионат-продуцирующих бактерий, а сам пропионат оказывает противовоспалительное действие через активацию рецепторов FFAR2/FFAR3 и ингибирование гистондеацетилаз, что способствует укреплению эпителиального барьера и подавлению воспаления (Czarnowska *et al.*, 2026; Calcaterra Verlengia, 2025). В контексте колоректального рака пропионат демонстрирует противоопухолевые свойства. Эпидемиологические исследования показывают, что более высокий уровень пропионата в плазме ассоциирован с меньшим риском послеоперационных осложнений у пациентов с КРР (Klaassen-Dekker *et al.*, 2025). На экспериментальных моделях показано, что пропионат подавляет рост опухолей через активацию апоптоза в раковых клетках (Chen *et al.*,

2025). Молекулярные механизмы действия пропионата включают также прямое эпигенетическое воздействие: пропионат служит субстратом для пропионирования гистонов (H3K18pr, H4K12pr), что изменяет ландшафт хроматина и подавляет экспрессию генов, связанных с клеточным циклом и пролиферацией (Nshanian *et al.*, 2025). Эти данные подчеркивают двойную роль пропионата как иммуномодулятора при воспалении и супрессора опухолевого роста, что делает его перспективной мишенью для разработки терапевтических стратегий.

*A. muciniphila* и *B. acidifaciens* являются представителями муцинолитических и гликан-деградирующих бактерий. В ряде моделей метаболического синдрома на животных *A. muciniphila* рассматривается как потенциально благоприятный компонент микробиоты (Everard *et al.*, 2013; Cani & de Vos, 2017). Однако в условиях хронического воспаления и химического повреждения слизистой усиленная деградация муцинового слоя может приводить к уменьшению толщины защитного барьера и облегчать доступ канцерогенов и микробных компонентов к эпителию. Наши данные показывают положительную корреляцию исходного содержания *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* в составе кишечной микробиоты с большим числом опухолей в результате экспериментальной индукции канцерогенеза. Этот результат согласуется с концепцией потенциального контекст-зависимого негативного эффекта муколитических бактерий и с наблюдениями об усилении воспаления на фоне введения *A. muciniphila* в некоторых моделях инфекции кишечника (Ganesh *et al.*, 2013).

### **8.5.1 Пропионат-продуцирующие бактерии как прогностические маркеры канцерогенеза**

Микробиота кишечника представляет собой сложную динамичную экосистему, которая регулируется организмом хозяина через различные факторы, включая репертуар муциновых гликанов, состав диеты и мукозальную иммунную систему (Crouch *et al.*, 2024). В то же время, это в определенной степени саморегулирующееся сообщество. Состав микробиоты формируется под влиянием различных межмикробных взаимодействий, включая конкуренцию за источники энергии и перекрестное питание, когда метаболиты одних бактерий потребляются другими (Culp Goodman, 2023).

Многочисленные исследования, сравнивающие микробиоту кишечника пациентов с колоректальным раком и здоровых лиц, выявили дисбиоз при КРР (Wang *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2013; Mira-Pascual *et al.*, 2015; Kostic *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013). Хотя определенные бактериальные виды были идентифицированы как ассоциированные с КРР (*Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* spp., *Enterococcaceae* spp. и другие), результаты различных исследований не всегда согласуются между собой, что указывает на значительную вариабельность состава микробиоты у разных индивидуумов. Одним из возможных объяснений таких противоречий является то, что состав микробиоты претерпевает глубокие изменения в процессе опухолеобразования (Saffarian *et al.*, 2019). Это также может создавать препятствия для идентификации конкретных бактерий, вовлеченных в патогенез КРР. Например, согласно модели «бактериальных драйверов и пассажиров» (bacterial driver-passenger model), бактерии, которые «запускают» патологию, впоследствии вытесняются более адаптированными «пассажирами», получающими преимущества в условиях воспалительного и опухолевого микроокружения (Avril и DePaolo, 2021; Tjalsma *et al.*, 2012). Наши результаты подтверждают концепцию подобных динамических изменений: наиболее выраженные различия между микробиотой двух колоний мышей с разной восприимчивостью к опухолеобразованию наблюдались в исходном здоровом состоянии и в период хронического воспаления, тогда как на финальной стадии (образование опухолей) состав микробиоты значимо не различался.

### 8.5.2 *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* в воспалении

Анализ экспрессии генов в ткани толстой кишки при остром колите выявил умеренную положительную корреляцию между исходной численностью как *A. muciniphila*, так и *B. acidifaciens* и экспрессией *Ifng* и *Nos2*, что позволяет предположить связь между исходным составом микробиоты и воспалительным ответом (Achasoav *et al.*, 2022).

Механистическая основа иммуномодуляции, которую осуществляют *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* в контексте колоректального рака, требует дальнейшего изучения. Предыдущие исследования показали влияние *A. muciniphila* и ее отдельных компонентов на различные типы иммунных

клеток. Например, Вае и соавторы (2022) представили убедительные доказательства того, что *A. muciniphila*, в частности компонент ее фосфолипидной клеточной мембраны, активирует гетеродимер TLR2-TLR1 в дендритных клетках мыши, полученных из костного мозга, тем самым запуская воспалительный ответ (Вае *et al.*, 2022). В другом исследовании изучалось влияние как живых, так и пастеризованных *A. muciniphila* на макрофаги мыши и моноциты человека, что выявило сложные иммунологические эффекты. В частности, *A. muciniphila* индуцировала сильный провоспалительный иммунный ответ при остром воздействии, но запускала противовоспалительную реакцию в клетках, которые предварительно имели контакт с этой бактерией (Peña-Cearra *et al.*, 2024).

Несколько исследований изучали влияние *A. muciniphila in vivo*, особенно на моделях воспаления и рака. Показано, что колонизация *A. muciniphila* способствует ослаблению симптомов колита на мышинных моделях ВЗК (Wang *et al.*, 2023; Wade *et al.*, 2023). Однако влияние *A. muciniphila* на воспаление может варьировать в зависимости от контекста, о чем свидетельствует работа Ganesh и соавторов. Кроме того, эффекты *A. muciniphila* зависят от используемого штамма (Liu *et al.*, 2021). Таким образом, хотя механизмы действия *A. muciniphila* в отношении иммуномодуляции были изучены разными авторами, они дали противоречивые результаты. Однозначных выводов нельзя сделать и о противовоспалительной роли *B. acidifaciens*, хотя данных относительно этого бактериального вида значительно меньше, чем в отношении *Akkermansia* (Wu *et al.*, 2024; Zheng *et al.*, 2023; Mitchell *et al.*, 2024). Принимая во внимание литературные данные, можно заключить, что оба вида бактерий проявляют разные свойства в отношении иммунитета в различных микробных и иммунологических контекстах. По этим причинам возможно, что любой из этих видов бактерий может служить провоспалительным стимулом. В то же время, нельзя исключать, что и *A. muciniphila*, и *B. acidifaciens* могут быть пассивно ассоциированы с другими, еще неизвестными факторами, которые и являются истинной причиной воспаления и КРР в описанной модели.

Модификации гистонов вовлечены в патогенез как ВЗК, так и колоректального рака. Воспаление индуцирует изменения в конфигурации

гистонов, которые модулируют доступность хроматина и транскрипционную активность ключевых онкогенных и опухолево-супрессорных путей. Ранее было исследовано распределение репрессивной метки H3K27me3 (триметилирование лизина 27 гистона H3) в толстой кишке мышей при хроническом колите (Nickelwart *et al.*, 2025). Показано, что воспаление приводит к изменению уровня H3K27me3 в эпителиоцитах, что может влиять на экспрессию генов, связанных с поддержанием барьерной функции и супрессией опухолевого роста. Поскольку гистоновые модификации чувствительны к метаболитам микробиоты (в частности, короткоцепочечным жирным кислотам), эти результаты открывают возможность того, что пропионат и ацетат, продуцируемые *A. muciniphila* и *B. acidifaciens*, способны модулировать эпигенетический ландшафт клеток эпителия. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что пропионат служит субстратом для пропионирования гистонов (Nshanian *et al.*, 2025). Ингибиторы гистон-модифицирующих ферментов исследуются в клинических испытаниях как потенциальный терапевтический подход при ВЗК и колоректальном раке. Однако прямое влияние бактериальных метаболитов на H3K27me3 требует отдельного изучения.

### 8.5.3 Связь продуцентов пропионата с сульфатредуцирующими бактериями

Исходная представленность *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* коррелировала с увеличением численности *D. fairfieldensis* в ходе хронического колита (Achasova *et al.*, 2025). *D. fairfieldensis* представляют вид сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), ассоциированный с ВЗК и колоректальным раком (Carbonero *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2023). Эти бактерии продуцируют сероводород (H<sub>2</sub>S), который имеет комплексный эффект на физиологию колоноцитов (Blachier *et al.*, 2021). Интересно отметить, что увеличение численности H<sub>2</sub>S-продуцирующих бактерий наблюдается у пациентов с аденомами и КРР (Feng *et al.*, 2015; Hale *et al.*, 2017; Hale *et al.*, 2018; Wolf *et al.*, 2022). H<sub>2</sub>S способствует опухолеобразованию, стимулируя гликолиз, усиливая пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток (Szabo *et al.*, 2013). Показано, что экзогенный H<sub>2</sub>S стимулирует пролиферацию клеток рака толстой

кишки (Cai *et al.*, 2010) и усиливает функцию митохондрий (Untereiner *et al.*, 2017). Следовательно, увеличение численности *D. fairfieldensis* может повышать уровень  $H_2S$  в толстой кишке, способствуя воспалению и опухолеобразованию. Кроме того, везикулы наружной мембраны *D. fairfieldensis* могут повреждать эпителиальный барьер и активировать макрофаги, способствуя развитию кишечного воспаления (Nie *et al.*, 2023). С механистической точки зрения, наблюдаемая корреляция численности СРБ *D. fairfieldensis* в ходе развития воспаления с исходной численностью *A. muciniphila* и *B. acidifaciens* представляет большой интерес. Обе бактерии-кандидата, выявленные в здоровом состоянии, известны как продуценты ацетата и пропионата (Miyamoto и Itoh, 2000; Reichardt *et al.*, 2014; Ghotaslou *et al.*, 2023), бактериальная продукция которых потенциально может служить источником водорода как побочного продукта в просвете кишечника.

Однако в данной работе экспериментально не проверялась причинно-следственная связь между наличием *A. muciniphila*, *B. acidifaciens* и возрастанием *D. fairfieldensis*. Таким образом, теория перекрестного питания является лишь одним из возможных объяснений наблюдаемой ассоциации между *A. muciniphila*, *B. acidifaciens*, *D. fairfieldensis* и количеством опухолей, которое требует дальнейшего изучения. Не исключено, что одна или обе потенциальные бактерии-«драйвера» могут вносить вклад в воспаление и рост опухоли, тогда как *D. fairfieldensis* просто ассоциируется с тяжестью патологического процесса.

Существенным ограничением данного исследования является то, что в него были включены только самцы мышей, но не самки. Было показано, что у самок мышей наблюдается иная частота возникновения и более медленное развитие опухолей в моделях колоректального рака, что связано с продукцией эстрадиола (Lee *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2022). Продукция эстрадиола у самок мышей может маскировать вклад микробиоты в патогенез КРР. Следовательно, приведенные результаты следует интерпретировать, принимая во внимание это ограничение. Тем не менее, наше исследование подчеркивает необходимость более глубокого изучения сложных взаимодействий между комменсальной микробиотой и организмом хозяина на протяжении всего развития КРР и даже ранее.

## Заключение

Обобщение результатов, представленных в данной диссертационной работе, позволяет предложить расширенную интегративную модель, в которой метаболическая регуляция рассматривается как центральное звено поддержания равновесия внутренней среды кишечника, связывающее в единую функциональную систему генетические особенности организма, состояние эпителиального барьера, динамику микробного сообщества и системные адаптивные реакции. Традиционные подходы, с фокусом преимущественно на иммунологических механизмах, не в полной мере объясняют фундаментальные молекулярные и клеточные процессы, определяющие хронизацию воспаления, сохранение повышенной проницаемости кишечника в фазу клинической ремиссии и высокую частоту внекишечных проявлений. Представленные в работе данные позволяют рассматривать метаболическую дисрегуляцию как ключевое звено, через которое реализуется нарушение физиологического равновесия на различных уровнях — от ультраструктурной организации энтероцита до системной регуляции поведения и канцерогенеза.

На клеточном уровне одним из ключевых событий является нарушение метаболизма фосфолипидов и изменение структуры мембранных органелл. Накопление сигнальных и проапоптотических церамидов и снижение уровня АТФ равнозначно могут определять динамику полимеризации актина, что ведет к дезорганизации апикального цитоскелета и дестабилизации белков плотных и адгезивных контактов.

Постоянное нарушение эпителиального барьера, поддерживаемое метаболическими механизмами, создает условия для транслокации бактериальных антигенов и поддержания вялотекущего воспаления даже в периоды ремиссии. Нарушение митохондриального метаболизма и, как следствие, повышение концентрации кислорода в просвете кишечника, а также истончение муцинового слоя приводят к изменению состава кишечной

микробиоты. На системном уровне микробиота кишечника выступает в роли метаболического органа, синтезируя нейроактивные соединения и их предшественники (глицин, триптофан, КЦЖК), модулируя функцию центральной нервной системы и поведение.

На уровне долгосрочных последствий исходный состав микробиоты и связанный с ним профиль метаболитов определяют восприимчивость к канцерогенезу, ассоциированному с воспалением. Метаболические взаимодействия между пропионат-продуцентами и сульфатредуцирующими бактериями могут создавать проканцерогенный метаболический фон, который реализуется в условиях хронического воспаления и генотоксического стресса.

Предложенная интегративная модель имеет ряд важных следствий, которые могут быть учтены при создании терапевтических подходов к лечению ВЗК. Во-первых, она обосновывает необходимость включения метаболических мишеней в комплексную терапию ВЗК. Помимо традиционной иммуносупрессивной терапии, перспективными направлениями являются коррекция митохондриальной дисфункции, стабилизация актинового цитоскелета (в частности, могут быть рассмотрены потенциальные регуляторы PREX1 и ACTN1) и нормализация липидного состава мембран.

Во-вторых, модель подчеркивает важность персонализированного подхода к коррекции микробиоты. Универсальные пробиотики могут быть не только неэффективными, но и потенциально вредными в зависимости от микробного контекста. Необходим переход к стратегиям, основанным на анализе исходного состава микробиоты и метаболомного профиля, с последующей таргетной модуляцией конкретных таксонов и метаболических путей (например, использование L-фукозы для поддержания триптофан-продуцирующих *E. coli*). Анализ исходной численности пропионат-продуцирующих бактерий может служить предиктором риска КРР на фоне ВЗК, а выявление специфических метаболических сдвигов (содержание холина и триптофана в крови) — прогнозировать поведенческие нарушения.

В заключение можно добавить, что результаты диссертационной работы позволяют расширить существующие представления о развитии

воспалительных заболеваний кишечника. Показано, что метаболические нарушения — митохондриальная дисфункция, дезорганизация актинового цитоскелета и дисбаланс мембранных липидов — являются не просто следствием воспаления, а самостоятельными патогенетическими факторами, определяющими хронизацию процесса, резистентность к терапии и развитие коморбидных расстройств. Микробиота кишечника, в свою очередь, выступает в роли метаболического органа, продукция нейроактивных соединений которым модулирует функцию центральной нервной системы и поведение. Метаболические взаимодействия внутри микробного сообщества создают фон, определяющий восприимчивость к канцерогенезу. Интеграция метаболической парадигмы в общую концепцию патогенеза ВЗК открывает новые перспективы для разработки терапевтических стратегий, направленных не только на подавление воспаления, но и на восстановление метаболического и микробного баланса, что в конечном итоге должно улучшить качество жизни пациентов и снизить риск долгосрочных осложнений.

## Выводы

- 1) Нарушение эпителиального барьера при хроническом воспалении кишечника сопровождается нарушением структуры актинового цитоскелета, что впервые показано на трех моделях колита *in vivo*. Ген *PREX1* был предсказан в качестве одного из потенциальных регуляторов динамики полимеризации актина при воспалении кишечника.
- 2) Впервые показано, что фармакологическое нарушение баланса полимерного и мономерного актина приводит к дефектам локализации белков плотных и адгезивных контактов на плазматической мембране *in vivo* и увеличению проницаемости эпителия в модели органоидов кишечника *in vitro*.
- 3) Впервые обнаружено, что при моделировании хронического генетически обусловленного воспаления нарушается характерное для физиологической нормы молекулярное взаимодействие белка плотных контактов клаудин-3 с актином и актин-связывающими белками в ткани кишечника *in vivo*.
- 4) Накопление церамидов в кишечном эпителии ассоциировано со снижением количества полимерного актина в модели генетически обусловленного воспаления кишечника. Впервые показано, что подавление синтеза церамидов частично восстанавливает барьерную функцию кишечника *in vivo*.
- 5) Впервые установлено, что количество бактерий *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides acidifaciens* в составе исходной кишечной микробиоты положительно коррелирует с восприимчивостью к воспалительному канцерогенезу в модели колоректального рака на мышах.
- 6) Показаны новые механизмы регуляции социального и тревожноподобного поведения микробиотой кишечника и ассоциированным с ней метаболизмом триптофана и глицина на экспериментальных моделях хронического воспаления кишечника.

## Список сокращений

<b>5-АСК</b>	5-аминосалициловая кислота
<b>5-НТР</b>	5-гидрокситриптофан (предшественник серотонина)
<b>АК, АЈ</b>	адгезивные контакты, adherens junctions
<b>АМС</b>	амоксициллин в комбинации с клавулановой кислотой
<b>АОМ</b>	азоксиметан
<b>АТФ</b>	аденозинтрифосфат
<b>АФК</b>	активные формы кислорода
<b>БК</b>	болезнь Крона
<b>БС</b>	байесовская сеть
<b>ВЖХ–МС/МС</b>	высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
<b>ВЗК</b>	воспалительные заболевания кишечника
<b>ВР</b>	комбинация ванкомицина и рифампицина
<b>ГЭБ</b>	гематоэнцефалический барьер
<b>ДЭГ</b>	дифференциально экспрессируемые гены
<b>ИЛ (IL)</b>	интерлейкин
<b>ИФН-<math>\gamma</math> (IFN-<math>\gamma</math>)</b>	интерферон-гамма
<b>КРР</b>	колоректальный рак
<b>КЦЖК</b>	короткоцепочечные жирные кислоты
<b>ЛПС (LPS)</b>	липополисахарид
<b>ЛФХ</b>	лизофосфатидилхолин
<b>мРНК</b>	матричная рибонуклеиновая кислота
<b>ОТ-ПЦР</b>	реакция обратной транскрипции с последующей полимеразной

	цепной реакцией
<b>ПК, TJ</b>	плотные контакты, tight junctions
<b>ПЦР</b>	полимеразная цепная реакция
<b>РНК</b>	рибонуклеиновая кислота
<b>СРБ (CRP)</b>	С-реактивный белок
<b>СРБ*</b>	сульфатредуцирующие бактерии
<b>ТФМ</b>	трансплантация микробиоты фекалий
<b>ФК</b>	фосфатидная кислота
<b>ФЛ</b>	фосфолипиды
<b>ФС</b>	фосфатидилсерин
<b>ФХ</b>	фосфатидилхолин
<b>ФЭ</b>	фосфатидилэтаноламин
<b>ЦНС</b>	центральная нервная система
<b>ЯК</b>	язвенный колит
<b>ЯМР</b>	ядерный магнитный резонанс
<b>АНР</b>	арил-углеводородный рецептор
<b>АМРК</b>	АМФ-активируемая протеинкиназа
<b>ANOVA</b>	дисперсионный анализ
<b>ASCA</b>	антитела к <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>CAR-T</b>	T-клетки с химерным антигенным рецептором
<b>CerS</b>	церамидсинтаза
<b>DNP</b>	2,4-динитрофенол
<b>DSS</b>	натриевая соль сульфата декстрана (dextran sulfate sodium salt)
<b>FDR</b>	уровень ложных открытий (Benjamini–Hochberg)
<b>FITC</b>	флуоресцеина изотиоцианат
<b>FXR</b>	ядерный рецептор фарнезоида X
<b>GALT</b>	ассоциированная с кишечником лимфоидная ткань

<b>GM-CSF</b>	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
<b>GO</b>	онтология генов
<b>GPR</b>	G-белок-связанный рецептор
<b>HDAC</b>	гистоновая деацетилаза
<b>HNF4A</b>	ядерный фактор гепатоцитов 4-альфа
<b>iBAQ</b>	количественная оценка на основе интенсивности (для протеомики)
<b>IDO1</b>	индоламин-2,3-диоксигеназа 1
<b>JAK-STAT</b>	путь Янус-киназы и сигнального трансдуктора и активатора транскрипции
<b>JP</b>	джасплакинолид
<b>LatA</b>	латрункулин
<b>LDA</b>	линейный дискриминантный анализ
<b>LEfSe</b>	анализ размера эффекта линейного дискриминанта
<b>LSD</b>	наименьшая значимая разница (тест Фишера)
<b>MAPK</b>	митоген-активируемая протеинкиназа
<b>MLCK</b>	киназа легких цепей миозина
<b>mTOR</b>	мишень рапамицина у млекопитающих
<b>NAD<sup>+</sup></b>	никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	ядерный фактор каппа-B
<b>NKT-клетки</b>	натуральные киллеры T
<b>NMDAR</b>	рецептор N-метил-D-аспартата
<b>NOD2</b>	нуклеотид-связывающий домен олигомеризации 2
<b>NOS</b>	синтаза оксида азота (iNOS – индуцибельная NOS)
<b>OCR</b>	скорость потребления кислорода
<b>pANCA</b>	перинуклеарные антинейтрофильные цитоплазматические антитела
<b>PCA</b>	анализ главных компонент

<b>PCoA</b>	анализ главных координат
<b>PERMANOVA</b>	пермутационный дисперсионный анализ
<b>PKC-<math>\zeta</math></b>	протеинкиназа C- $\zeta$
<b>PPI</b>	преимпульсное ингибирование
<b>qPCR</b>	количественная ПЦР в реальном времени
<b>Rac1</b>	субстрат токсина ботулизма С3 для Rac1
<b>RIPA-буфер</b>	буфер для радиоиммунопреципитации
<b>ROCK</b>	Rho-ассоциированная протеинкиназа
<b>ROS</b>	активные формы кислорода
<b>RT-qPCR</b>	количественная ПЦР с обратной транскрипцией
<b>S1P</b>	сфингозин-1-фосфат
<b>SGPL1</b>	S1P-лиаза 1
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	трансформирующий фактор роста бета
<b>Th (клетки)</b>	T-хелперы (например, Th1, Th2, Th17)
<b>TNF</b>	фактор некроза опухоли
<b>TLR</b>	Toll-подобный рецептор
<b>TNBS</b>	2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота
<b>Treg</b>	регуляторные T-клетки
<b>UniFrac</b>	уникальный филогенетический коэффициент расстояния (для микробиоты)
<b>WGCNA</b>	анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов
<b>ZO-1</b>	белок плотных контактов Zonula Occludens-1

\*Примечание: СРБ — сульфатредуцирующие бактерии (в контексте микробиоты).

### Список использованной литературы

1. Бец, В.Д. Роль гликопротеина муцин и L-фукозы во взаимодействии иммунитета и микрофлоры на примере экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника / В.Д. Бец и др. // Биохимия. — 2022. — Т. 87. — С. 356–375.
2. Куклина, Е.М. Механизмы устойчивости к глюкокортикоидам неклассических Т-хелперных популяций Th17.1/ex-Th17 / Е.М. Куклина // Биохимия. — 2025. — Т. 90, № 2. — С. 207–220.
3. Куприянов, С.В. Сложные регуляторные сети: взаимосвязи метаболизма, внутриклеточных сигнальных путей и эпигенетических регуляторов в контроле функций Th1 / С.В. Куприянов, А.И. Сеницкий, И.И. Долгушин // Иммунология. — 2021. — Т. 42, № 5. — С. 562–573.
4. Кожевникова Е.Н. Индуцируемая система DamID для определения взаимодействий белка ядерной ламина Lam1B1 с хромосомами в клетках мыши / Е.Н. Кожевникова и др. // Биохимия. — 2018. — Т. 83. — С. 763–773.
5. Кожевникова Е.Н. Роль генов *Mucin-2* и *Kaiso* в социальном поведении мышей / Е.Н. Кожевникова и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2015. — Т. 19. — С. 410–412.
6. Литвинова Е.А. Вклад кишечного муцина-2 в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter* spp. у лабораторных мышей / Е.А. Литвинова и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2015. — Т. 19. — С. 494–498.
7. Литвинова Е.А. Роль гена *Kaiso* в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2 / Е.А. Литвинова и др. // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2018. — Т. 22. — С. 1078–1083.
8. Маев, И.В. Воспалительные заболевания кишечника: трансформация представлений / И.В. Маев, И.Г. Бакулин, М.И. Скалинская, Е.В. Сказываева // Терапевт. арх. — 2023. — Т. 95, № 2. — С. 165–170.

9. Попова Ю.В. Адаптация метода получения трансгенных мышей на основе *in utero* электропорации / Попова Ю.В., Бец В.Д., Омелина Е.С., Болдырева Л.В., Кожевникова Е.Н. // Молекулярная биология. – 2024. – Т. 58 – № 6. – С. 1041–1051.
10. Успенский, Ю.П. Эпидемиология язвенного колита и болезни Крона: аналитические данные первого регионального регистра воспалительных заболеваний кишечника Санкт-Петербурга на базе государственной информационной системы / Ю.П. Успенский, А.М. Сарана, С.В. Иванов, Ю.А. Фоминых // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. – 2025. – № 2 (234). – С. 15–24.
11. Abe, K. Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells / K. Abe, K.P. Nguyen, S.D. Fine *et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – V. 104, No. 43. – P. 17022–17027.
12. Achasova, K.M. Baseline abundance of *Akkermansia muciniphila* and *Bacteroides acidifaciens* in a healthy state predicts inflammation associated tumorigenesis in the AOM/DSS mouse model / K.M. Achasova *et al.* // Scientific Reports. – 2025. – V. 15. – P. 12241.
13. Achasova, K.M. A cohort effect on AOM/DSS colorectal cancer model performance in C57BL/6 mice / K.M. Achasova *et al.* // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2025. – V. 61. – P. 438–449.
14. Achasova, K.M. Fucose Ameliorates *Tritrichomonas* sp.-Associated Illness in Antibiotic-Treated Muc2-/- Mice / K.M. Achasova *et al.* // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – P. 10699.
15. Adolph, T.E. Multiple hits for intestinal inflammation: immunological and metabolic drivers of inflammatory bowel disease / T.E. Adolph, H. Tilg // Dig. Dis. – 2016. – V. 34. – P. 4–8.
16. Agrahari, R. Applications of Bayesian network models in predicting types of hematological malignancies / R. Agrahari, A. Foroushani, T.R. Docking *et al.* // Sci. Rep. – 2018. – V. 8, No. 1. – P. 6951.
17. Agrawal, R. Colibactin Exerts Androgen-dependent and -independent Effects on Prostate Cancer / R. Agrawal, S. Kim, J. Chen *et al.* // Eur. Urol. Oncol. – 2025. – V. 8, No. 3. – P. 716–730.
18. Agus, A. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease / A. Agus, J. Planchais, H. Sokol // Cell Host Microbe. – 2018. –

- V. 23. — P. 716–724.
19. Agus, A. Gut Microbiota-Derived Metabolites as Central Regulators in Metabolic Disorders / A. Agus, J. Clément, L. Sokol // *Gut*. — 2021. — V. 70. — P. 1174–1182.
  20. Ahn, J. Human gut Microbiome and risk for colorectal cancer / J. Ahn, R. Sinha, Z. Pei *et al.* // *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* — 2013. — V. 105, No. 24. — P. 1907–1911.
  21. Alexeev, E.E. Microbiota-derived indole metabolites promote human and murine intestinal homeostasis through regulation of interleukin-10 receptor / E.E. Alexeev, J.M. Lanis, D.J. Kao *et al.* // *Am. J. Pathol.* — 2018. — V. 188. — P. 1183–1194.
  22. Al-Sadi, R. Mechanism of IL1 $\beta$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability / R. Al-Sadi, S. Guo, D. Ye *et al.* // *J. Immunol.* — 2009. — V. 182. — P. 6015–6022.
  23. Andrejeva, E.A. Evaluation of social odor preference and social communication with the same- and opposite-sex conspecifics in male mice / E.A. Andrejeva *et al.* // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. — 2024. — V. 60. — P. 2517–2527.
  24. Ang, Z. Human and mouse monocytes display distinct signalling and cytokine profiles upon stimulation with FFAR2/FFAR3 short-chain fatty acid receptor agonists / Z. Ang, J.Z. Er, N.S. Tan *et al.* // *Sci. Rep.* — 2016. — V. 6. — P. 34145.
  25. Antoniou, E. The TNBS-induced colitis animal model: An overview / E. Antoniou, G.A. Margonis, A. Angelou *et al.* // *Ann. Med. Surg. (Lond)*. — 2016. — V. 11. — P. 9–15.
  26. Armstrong, H. Mouse mammary tumor virus is implicated in severity of colitis and dysbiosis in the IL10 $^{-/-}$  mouse model of inflammatory bowel disease / H. Armstrong, M. Rahbari, H. Park *et al.* // *Microbiome*. — 2023. — V. 11, No. 1. — P. 56. [Erratum in: *Microbiome*. 2024;12(1):112]
  27. Arpaia, N. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation / N. Arpaia, C. Campbell, X. Fan *et al.* // *Nature*. — 2013. — V. 504. — P. 451–455.
  28. Artemev, A. The association of Microbiome dysbiosis with colorectal cancer / A. Artemev, S. Naik, A. Pougno, P. Honnavar, N.M. Shanbhag // *Cureus*.

- 2022. — V. 14. — P. e22156.
29. Arthur, J.C. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota / J.C. Arthur, E. Perez-Chanona, M. Mühlbauer *et al.* // *Science*. — 2012. — V. 338, No. 6103. — P. 120–123.
  30. Atarashi, K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota / K. Atarashi, T. Tanoue, T. Shima *et al.* // *Nature*. — 2013. — V. 500. — P. 232–236.
  31. Attene-Ramos, M.S. Hydrogen sulfide induces direct DNA damage at physiological concentrations / M.S. Attene-Ramos, E.D. Wagner, M.J. Plewa, H.R. Gaskins // *Mol. Cancer Res.* — 2006. — V. 4, No. 1. — P. 9–14.
  32. Avril, M. Driver-passenger bacteria and their metabolites in the pathogenesis of colorectal cancer / M. Avril, R.W. DePaolo // *Gut Microbes*. — 2021. — V. 13, No. 1. — P. 1941710.
  33. Bacallao, R. ATP depletion: a novel method to study junctional properties in epithelial tissues. I. Rearrangement of the actin cytoskeleton / R. Bacallao, A. Garfinkel, S. Monke *et al.* // *J. Cell Sci.* — 1994. — V. 107. — P. 3301–3313.
  34. Bae, M. Akkermansia muciniphila phospholipid induces homeostatic immune responses / M. Bae, C.D. Cassilly, X. Liu *et al.* // *Nature*. — 2022. — V. 608, No. 7921. — P. 168–173.
  35. Bain, C.C. The monocyte-macrophage axis in the intestine / C.C. Bain, A.M. Mowat // *Cell. Immunol.* — 2014. — V. 291. — P. 41–48.
  36. El Bakkouri Y., Chidiac R., Delisle C., *et al.* ZO-1 interacts with YB-1 in endothelial cells to regulate stress granule formation during angiogenesis // *Nature Communications*. — 2024. — V. 15. — P. 4405.
  37. Balla, T. Phosphoinositides: Tiny lipids with giant impact on cell regulation / T. Balla // *Physiol. Rev.* — 2013. — V. 93. — P. 1019–1137.
  38. Bao, L.L. Epithelial OPA1 links mitochondrial fusion to inflammatory bowel disease / L.L. Bao, Y.Q. Yu, M. González-Acera *et al.* // *Sci. Transl. Med.* — 2025. — V. 17, No. 781. — P. eadn8699.
  39. Barrett, J.C. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease / J.C. Barrett, S. Hansoul, S.P. Nicolae *et al.* // *Nat. Genet.* — 2008. — V. 40. — P. 955–962.
  40. Barrows, D. PREX1 protein function is negatively regulated downstream of receptor tyrosine kinase activation by p21-activated Kinases (PAKs) /

- D. Barrows, J.Z. He, R. Parsons // *J. Biol. Chem.* — 2016. — V. 291. — P. 20042–20054.
41. Battaglia, M. Tr1 cells: from discovery to their clinical application / M. Battaglia, S. Gregori, R. Bacchetta, M.G. Roncarolo // *Semin. Immunol.* — 2006. — V. 18, No. 2. — P. 120–127.
  42. Bauer, J. Lipid alterations in experimental murine colitis: role of ceramide and imipramine for matrix metalloproteinase-1 expression / J. Bauer, G. Liebisch, C. Hofmann *et al.* // *PLoS One.* — 2009. — V. 4, No. 9. — P. e7197.
  43. Baumgart, D.C. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies / D.C. Baumgart, W.J. Sandborn // *Lancet.* — 2007. — V. 369. — P. 1641–1657.
  44. Baxter, N.T. Structure of the gut microbiome following colonization with human feces determines colonic tumor burden / N.T. Baxter, J.P. Zackular, G.Y. Chen, P.D. Schloss // *Microbiome.* — 2014. — V. 2. — P. 20.
  45. Beaugerie, L. Cancers complicating inflammatory bowel disease / L. Beaugerie, S.H. Itzkowitz // *N. Engl. J. Med.* — 2015. — V. 372, No. 15. — P. 1441–1452.
  46. Beaumont, M. Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: the adaptive response / M. Beaumont, M. Andriamihaja, A. Lan *et al.* // *Free Radic. Biol. Med.* — 2016. — V. 93. — P. 155–164.
  47. Beurivage, C. Development of a human primary gut-on-a-chip to model inflammatory processes / C. Beurivage, A. Kanapeckaite, C. Loeffler *et al.* // *Sci. Rep.* — 2021. — V. 11, No. 1. — P. 1351.
  48. Beer, A.J. The actin nucleator Cobl organises the terminal web of enterocytes / A.J. Beer, J. González Delgado, F. Steiniger, B. Qualmann, M.M. Kessels // *Sci. Rep.* — 2020. — V. 10. — P. 11156.
  49. Benjamin, J.L. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease / J.L. Benjamin, C.R. Hedin, A. Koutsoumpas *et al.* // *Gut.* — 2011. — V. 60. — P. 923–929.
  50. Bercik, P. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication / P. Bercik, A.J. Park, D. Sinclair *et al.* // *Neurogastroenterol. Motil.* — 2011. — V. 23. — P. 1132–1139.
  51. Bergstrom, K.S.B. Muc2 protects against lethal infectious colitis by

- disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa / K.S.B. Bergstrom, V. Kisoorn-Singh, D.L. Gibson *et al.* // *PLoS Pathog.* — 2010. — V. 6. — P. e1000902.
52. Berry, P. Effectiveness and Safety of Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection in Immunocompromised Patients / P. Berry, R. Tariq, D. Pardi, S. Khanna // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* — 2025. — Online ahead of print. — DOI: 10.1016/j.cgh.2025.06.043.
  53. Bettelli, E. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells / E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao *et al.* // *Nature.* — 2006. — V. 441. — P. 235–238.
  54. Betz, H. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity / H. Betz, B. Laube // *J. Neurochem.* — 2006. — V. 97. — P. 1600–1610.
  55. Beutel, O. Phase separation of Zonula Occludens proteins drives formation of tight junctions / O. Beutel, R. Maraschini, K. Pombo-García *et al.* // *Cell.* — 2019. — V. 179. — P. 923–936.
  56. Bevins, C.L. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis / C.L. Bevins, N.H. Salzman // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2011. — V. 9. — P. 356–368.
  57. Bilate, A.M. Induced CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in immune tolerance / A.M. Bilate, J.J. Lafaille // *Annu. Rev. Immunol.* — 2012. — V. 30. — P. 733–758.
  58. Bisgaard, T.H. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: epidemiology, mechanisms and treatment / T.H. Bisgaard, K.H. Allin, L. Keefer *et al.* // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2022. — V. 19, No. 11. — P. 717–726.
  59. Bisgaard, T.H. The bidirectional risk of inflammatory bowel disease and anxiety or depression: A systematic review and meta-analysis / T.H. Bisgaard, K.H. Allin, R. Elmahdi, T. Jess // *Gen. Hosp. Psychiatry.* — 2023. — V. 83. — P. 109–116.
  60. Bock, J. Exogenous sphingomyelinase causes impaired intestinal epithelial barrier function / J. Bock, G. Liebisch, J. Schweimer *et al.* // *World J. Gastroenterol.* — 2007. — V. 13, No. 39. — P. 5217–5225.
  61. Boldyreva, L.V. Fat of the Gut: Epithelial Phospholipids in Inflammatory

- Bowel Diseases / L.V. Boldyreva, M.V. Morozova, S.S. Saydakova, E.N. Kozhevnikova // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — V. 22. — P. 11682.
62. Boldyreva, L.V. Effect of Dietary Phospholipid on the Behavior in C57BL/6J Mice / L.V. Boldyreva *et al.* // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* — 2024. — V. 60. — P. 409–419.
63. Bollinger, C.R. The cell biology of sphingolipids / C.R. Bollinger, A.H. Teichgräber, E. Gulbins // *Cell. Physiol. Biochem.* — 2005. — V. 16. — P. 167–180.
64. Bonaz, B. The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis / B. Bonaz, T. Bazin, S. Pellissier // *Front. Neurosci.* — 2018. — V. 12. — P. 49.
65. Borisova, M.A. Fucose Ameliorates Tryptophan Metabolism and Behavioral Abnormalities in a Mouse Model of Chronic Colitis / M.A. Borisova, O.A. Snytnikova, E.A. Litvinova *et al.* // *Nutrients.* — 2020. — V. 12. — P. 445.
66. Borisova, M.A. Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium / M.A. Borisova, K.M. Achasova, K.N. Morozova *et al.* // *Sci. Rep.* — 2020. — V. 10, No. 1. — P. 21135.
67. Borisova, M.A. Colitis-associated intestinal microbiota regulates brain glycine and host behavior in mice / M.A. Borisova, O.A. Snytnikova, E.A. Litvinova *et al.* // *Sci. Rep.* — 2022. — V. 12. — P. 16345.
68. Boros, F. The kynurenine pathway and the role of gut-brain axis in inflammatory bowel disease / F. Boros, Z. Szabo, P. Vecsei // *Int. J. Mol. Sci.* — 2024. — V. 25, No. 5. — P. 2670.
69. Borowitz, S.M. The epidemiology of inflammatory bowel disease: Clues to pathogenesis? / S.M. Borowitz // *Front. Pediatr.* — 2023. — V. 10. — Art. № 1103713.
70. Bos, A. The role of retinoic acid in the production of immunoglobulin A / A. Bos, M. van Egmond, R. Mebius // *Mucosal Immunol.* — 2022. — V. 15. — P. 562–572.
71. Braniste, V. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice / V. Braniste, M. Al-Asmakh, C. Kowal *et al.* // *Sci. Transl. Med.* — 2014. — V. 6. — P. 263ra158.
72. Braun, A. Alterations of phospholipid concentration and species composition

- of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis / A. Braun, I. Treede, D. Gotthardt *et al.* // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2009. — V. 15, No. 11. — P. 1705–1720.
73. Braun, T. Diet-omics in the Study of Urban and Rural Crohn disease Evolution (SOURCE) cohort / T. Braun, R. Feng, A. Amir *et al.* // *Nat. Commun.* — 2024. — V. 15, No. 1. — P. 3764.
  74. Bray, F. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, M. Laversanne, H. Sung *et al.* // *CA Cancer J. Clin.* — 2024. — V. 74. — P. 229–263.
  75. Bretscher, A. Localization of actin and microfilament-associated proteins in the microvilli and terminal web of the intestinal brush border by immunofluorescence microscopy / A. Bretscher, K. Weber // *J. Cell Biol.* — 1978. — V. 79. — P. 839–845.
  76. Brown, A.J. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids / A.J. Brown, S.M. Goldsworthy, A.A. Barnes *et al.* // *J. Biol. Chem.* — 2003. — V. 278. — P. 11312–11319.
  77. Bruewer, M. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms / M. Bruewer, A. Luegering, T. Kucharzik *et al.* // *J. Immunol.* — 2003. — V. 171. — P. 3216–3223.
  78. Bruins, M.J. The Role of Nutrients in Reducing the Risk for Noncommunicable Diseases during Aging / M.J. Bruins, P. Van Dael, M. Eggersdorfer // *Nutrients.* — 2019. — V. 11. — P. 85.
  79. Buckley, C.D. Cellular metabolism and immunometabolism: a new frontier for immunology and rheumatology / C.D. Buckley // *Rheumatology (Oxford).* — 2013. — V. 52. — P. 1339–1340.
  80. Byeon, J.S. The role of endoscopy in inflammatory bowel disease / J.S. Byeon // *Adv. Dig. Med.* — 2025. — V. 12. — P. e13436.
  81. Cadwell, K. A key role for autophagy and the autophagy gene ATG16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells / K. Cadwell, J.Y. Liu, S.L. Brown *et al.* // *Nature.* — 2008. — V. 456. — P. 259–263.
  82. Cai, W. Hydrogen sulfide induces human colon cancer cell proliferation: role of Akt, ERK and p21 / W. Cai, M. Wang, L. Ju *et al.* // *Cell Biol. Int.* —

2010. — V. 34. — P. 565–572.
83. Calcaterra, V. Rethinking Short-Chain Fatty Acids: A Closer Look at Propionate in Inflammation, Metabolism, and Mucosal Homeostasis / V. Calcaterra, G. Verlengia // *Cells*. — 2025. — V. 14, No. 15. — P. 1130.
84. Cani, P.D. Akkermansia muciniphila: paradigm for next-generation beneficial microorganisms / P.D. Cani, W.M. de Vos // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2017. — V. 14. — P. 621–638.
85. Cao, Q. Metabolic interactions: how gut microbial metabolites influence colorectal cancer / Q. Cao, L. Zhang, Y. Liu *et al.* // *Front. Microbiol.* — 2025. — V. 16. — P. 1611698.
86. Capaldo, C.T. Claudin Barriers on the Brink: How Conflicting Tissue and Cellular Priorities Drive IBD Pathogenesis / C.T. Capaldo // *Int. J. Mol. Sci.* — 2023. — V. 24. — P. 8562.
87. Carbonero, F. Contribution of the microbial hydrogen economy to colonic homeostasis / F. Carbonero, A.C. Benefiel, A.H. Alizadeh-Ghamsari, H.R. Gaskins // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2012. — V. 9. — P. 504–518.
88. Carbonero, F. Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease / F. Carbonero, A.C. Benefiel, A.H. Alizadeh-Ghamsari, H.R. Gaskins // *Front. Physiol.* — 2012. — V. 3. — P. 448.
89. Cario, E. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease / E. Cario, D.K. Podolsky // *Infect. Immun.* — 2000. — V. 68. — P. 7010–7017.
90. Carman, G.M. Fat-regulating phosphatidic acid phosphatase: A review of its roles and regulation in lipid homeostasis / G.M. Carman, G.S. Han // *J. Lipid Res.* — 2019. — V. 60. — P. 2–6.
91. Cebula, A. Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota / A. Cebula, M. Seweryn, G.A. Rempala *et al.* // *Nature*. — 2013. — V. 497. — P. 258–262.
92. Cellano, T. Human-derived microRNA 21 regulates indole and L-tryptophan biosynthesis transcripts in the gut commensal Bacteroides thetaiotaomicron / T. Cellano, R.M. Stilling, P. Dhariwal *et al.* // *mBio*. — 2025. — V. 16, No. 3. — P. e03928-24.
93. Cerf-Bensussan, N. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? / N. Cerf-Bensussan, V. Gaboriau-Routhiau // *Nat. Rev. Immunol.* —

2010. — V. 10. — P. 735–744.
94. Cerutti, A. The biology of intestinal immunoglobulin A responses / A. Cerutti, M. Rescigno // *Immunity*. — 2008. — V. 28. — P. 740–750.
95. Chang, J. Impaired Intestinal Permeability Contributes to Ongoing Bowel Symptoms in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Mucosal Healing / J. Chang, R.W. Leong, V.C. Wasinger *et al.* // *Gastroenterology*. — 2017. — V. 153. — P. 723–731.
96. Chassaing, B. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases / B. Chassaing, A. Darfeuille-michaud // *Gastroenterology*. — 2011. — V. 140. — P. 1720-1728.e3.
97. Chen, S. Exploring the differential host responses to DSS and UC-derived microbiota in a mouse model of colitis / S. Chen, L. Yang, P. Zhang *et al.* // *Sci. Rep.* — 2024. — V. 14. — P. 21567.
98. Chen, Y. The comparative anti-oxidant and anti-inflammatory efficacy of postbiotics and probiotics through Nrf-2 and NF-kB pathways in DSS-induced colitis model / Y. Chen, L. Wang, S. Zhang *et al.* // *Sci. Rep.* — 2024. — V. 14. — P. 11560.
99. Chen, Y. Propionate suppresses colitis-associated colorectal cancer in mice by Or51e2 / Y. Chen, L. Wang, X. Zhang *et al.* // *Biomed. Pharmacother.* — 2025. — V. 176. — P. 116928.
100. Choi, S.Y. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and autoimmunity / S.Y. Choi, S.J. Koh, C.W. Lee // *J. Lifestyle Med.* — 2007. — V. 7. — P. 45–56.
101. Chojnacki, A.K. Tissue imaging reveals disruption of epithelial mitochondrial networks and loss of mitochondria-associated cytochrome-C in inflamed human and murine colon / A.K. Chojnacki, S. Navaneetha Krishnan, H. Jijon *et al.* // *Mitochondrion*. — 2023. — V. 68. — P. 44–59.
102. Chulenbayeva, L. Quantitative Alterations in Short-Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis / L. Chulenbayeva, A. Kozhakhmetov, M. Sailybayeva *et al.* // *Biomolecules*. — 2025. — V. 15, No. 7. — P. 1017.
103. Chung, L. *Bacteroides fragilis* toxin coordinates a pro-carcinogenic inflammatory cascade via targeting of colonic epithelial cells / L. Chung, E. Thiele, P. Oberg *et al.* // *Cell Host Microbe*. — 2018. — V. 23, No. 2. — P.

- 203–214.
104. Cione, E. Caco2/HT-29 In Vitro Cell Co-Culture: Barrier Integrity, Permeability, and Tight Junctions' Composition During Progressive Passages of Parental Cells / E. Cione, A. Caroleo, L. Gallelli *et al.* // *Biology*. — 2025. — V. 14, No. 3. — P. 267.
  105. Citi, S. The mechanobiology of tight junctions / S. Citi // *Biophys. Rev.* — 2018. — V. 10. — P. 1641–1651.
  106. Citi, S. Cell Biology: Tight Junctions as Biomolecular Condensates / S. Citi // *Curr. Biol.* — 2020. — V. 30. — P. R83–R86.
  107. Clarke, C.J. The role of ceramide in the pathogenesis of inflammatory bowel disease / C.J. Clarke, B.M. Forman, Y.A. Hannun // *J. Lipid Res.* — 2011. — V. 52, No. 4. — P. 615–628.
  108. Coates, M.D. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome / M.D. Coates, C.R. Mahoney, D.R. Linden *et al.* // *Gastroenterology*. — 2004. — V. 126. — P. 1657–1664.
  109. Coombes, J.L. Dendritic cells in intestinal immune regulation / J.L. Coombes, F. Powrie // *Nat. Rev. Immunol.* — 2008. — V. 8. — P. 435–446.
  110. Cooney, R. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation / R. Cooney, J. Baker, O. Brain *et al.* // *Nat. Med.* — 2010. — V. 16. — P. 90–97.
  111. Corbett, M.P. A Preclinical Model to Assess Intestinal Barrier Integrity Using Canine Enteroids and Colonoids / M.P. Corbett, V. Gabriel, V. Livania *et al.* // *Biology*. — 2025. — V. 14, No. 3. — P. 270–285.
  112. Costello, S.P. Effect of fecal microbiota transplantation on 8-week remission in patients with ulcerative colitis: a randomized clinical trial / S.P. Costello, P.A. Hughes, O. Waters *et al.* // *JAMA*. — 2019. — V. 321. — P. 156–164.
  113. Craig, D.H.  $\alpha$ -Actinin-1 phosphorylation modulates pressure-induced colon cancer cell adhesion through regulation of focal adhesion kinase-Src interaction / D.H. Craig, B. Haimovich, M.D. Basson // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2007. — V. 293. — P. C1862–C1874.
  114. Craig, C. Neuroinflammation as an etiological trigger for depression comorbid with inflammatory bowel disease / C. Craig, R. Filippone, R. Stavely *et al.* // *J. Neuroinflammation*. — 2022. — V. 19, No. 1. — Art. 4.

115. Crouch, L.I. Prominent members of the human gut microbiota express endo-acting O-glycanases to initiate mucin breakdown / L.I. Crouch, M. Liberato, P.A. Urbanowicz *et al.* // *Nat. Commun.* — 2020. — V. 11, No. 1. — P. 4017.
116. Crouch, L.I. The role of glycans in health and disease: Regulators of the interaction between gut microbiota and host immune system / L.I. Crouch, R. Liberto, P. Brescia *et al.* // *Semin. Immunol.* — 2024. — V. 73. — P. 101891.
117. Cryan, J.F. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour / J.F. Cryan, T.G. Dinan // *Nat. Rev. Neurosci.* — 2012. — V. 13. — P. 701–712.
118. Cryan, J.F. The microbiota-gut-brain axis / J.F. Cryan, K.J. O’Riordan, C.S. Cowan *et al.* // *Physiol. Rev.* — 2019. — V. 99. — P. 1877–2013.
119. Cui, L. Two Types of Contact Between Lipid Droplets and Mitochondria / L. Cui, P. Liu // *Front. Cell. Dev. Biol.* — 2020. — V. 8. — P. 618322.
120. Culp, E.J. Cross-feeding in the gut microbiome: ecology and mechanisms / E.J. Culp, A.L. Goodman // *Cell Host Microbe.* — 2023. — V. 31, No. 4. — P. 485–499.
121. Cummings, J.H. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood / J.H. Cummings, E.W. Pomare, W.J. Branch *et al.* // *Gut.* — 1987. — V. 28. — P. 1221–1227.
122. Cunningham, K.E. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function / K.E. Cunningham, J.R. Turner // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2012. — V. 1258. — P. 34–42.
123. Czarnowska, M. The role of short-chain fatty acids in immune regulation and intestinal homeostasis in inflammatory bowel disease / M. Czarnowska, K. Kowalczyk, A. Lewandowski *et al.* // *Int. J. Innov. Technol. Soc. Sci.* — 2026. — V. 1, No. 49. — DOI: 10.31435/ijitss.1(49).2026.4847.
124. Dan, W. Gut microbiota as a mediator of cancer development and management: From colitis to colitis-associated dysplasia and carcinoma / W. Dan, Y. Zhang, L. Wang *et al.* // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* — 2025. — V. 1880, No. 4. — P. 189381.
125. Dantzer, R. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain / R. Dantzer, J.C. O’Connor, G.G. Freund *et al.* // *Nat. Rev. Neurosci.* — 2008. — V. 9, No. 1. — P. 46–56.

126. Daperno, M. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD / M. Daperno, G. D'Haens, G. Van Assche *et al.* // *Gastrointest. Endosc.* — 2004. — V. 60. — P. 505–512.
127. Darfeuille-Michaud, A. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease / A. Darfeuille-Michaud, J. Boudeau, P. Bulois *et al.* // *Gastroenterology.* — 2004. — V. 127. — P. 412–421.
128. Davie, J.R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate / J.R. Davie // *J. Nutr.* — 2003. — V. 133, No. 7 Suppl. — P. 2485S–2493S.
129. De Kanter, R. A new technique for preparing precision-cut slices from small intestine and colon for drug biotransformation studies / R. De Kanter, J.R. Monshouwer, D.K. Meijer, G.M. Groothuis // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* — 2005. — V. 51. — P. 65–72.
130. Delacour, D. Plasticity of the brush border—the yin and yang of intestinal homeostasis / D. Delacour, J. Salomon, S. Robine, D. Louvard // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2016. — V. 13. — P. 161–174.
131. Dennis, E.A. Eicosanoid storm in infection and inflammation / E.A. Dennis, P.C. Norris // *Nat. Rev. Immunol.* — 2015. — V. 15, No. 8. — P. 511–523.
132. Derrien, M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium / M. Derrien, E.E. Vaughan, C.M. Plugge, W.M. de Vos // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* — 2004. — V. 54. — P. 1469–1476.
133. Di Lucente, J. L-Fucose is a candidate monosaccharide neuromodulator and mitigates Alzheimer's synaptic deficits / J. Di Lucente, I. Maezawa, L. Jin *et al.* // *Sci. Adv.* — 2025. — V. 11, No. 45. — P. eadt4123.
134. Diab, J. Lipidomics in Ulcerative Colitis Reveal Alteration in Mucosal Lipid Composition Associated with the Disease State / J. Diab, T. Hansen, R. Goll *et al.* // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2019. — V. 25, No. 11. — P. 1780–1787.
135. Dicks, L.M.T. Inflammatory bowel disease and neuropsychiatric disorders: Mechanisms and emerging therapeutics targeting the microbiota-gut-brain axis / L.M.T. Dicks, A.C. de Souza, E.L. de Oliveira *et al.* // *Pharmacol. Ther.* — 2025. — V. 268. — P. 108823.
136. Dinan, T.G. The microbiome-gut-brain axis in health and disease / T.G. Dinan, J.F. Cryan // *Gastroenterol. Clin. North Am.* — 2017. — V. 46. — P. 77–89.

137. Ding, S. *Lactobacillus brevis* Alleviates DSS-Induced Colitis by Reprogramming Intestinal Microbiota and Influencing Serum Metabolome in Murine Model / S. Ding, Y. Ma, G. Liu *et al.* // *Front. Physiol.* — 2019. — V. 10. — P. 1152.
138. Ding, X. Long-term safety and efficacy of fecal microbiota transplant in active ulcerative colitis / X. Ding, Q. Li, P. Li *et al.* // *Drug Saf.* — 2019. — V. 42. — P. 869–880.
139. Dinu, I. SNP-SNP Interactions Discovered by Logic Regression Explain Crohn's Disease Genetics / I. Dinu, S. Mahasirimongkol, Q. Liu *et al.* // *PLoS One.* — 2012. — V. 7. — P. e43035.
140. Dodd, D. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites / D. Dodd, J.L. Spitzer, M.A. Van Treuren *et al.* // *Nature.* — 2017. — V. 551. — P. 648–652.
141. Dolinger, M. Crohn's disease / M. Dolinger, J. Torres, S. Vermeire // *Lancet.* — 2024. — V. 403. — P. 1177–1191.
142. Donohoe, D.R. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon / D.R. Donohoe, N. Garge, X. Zhang *et al.* // *Cell Metab.* — 2011. — V. 13. — P. 517–526.
143. Donohoe, D.R. The Warburg effect dictates the mechanism of butyrate-mediated histone acetylation and cell proliferation / D.R. Donohoe, L.B. Collins, A. Wali *et al.* // *Mol. Cell.* — 2012. — V. 48, No. 4. — P. 612–626.
144. Drenckhahn, D. Organization of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study / D. Drenckhahn, R. Dermietzel // *J. Cell Biol.* — 1988. — V. 107. — P. 1037–1048.
145. Duboc, H. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases / H. Duboc, S. Rainteau, S. Rajca *et al.* // *Gut.* — 2013. — V. 62. — P. 531–539.
146. Dudek, J. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways / J. Dudek // *Front. Cell Dev. Biol.* — 2017. — V. 5. — P. 90.
147. Eckburg, P.B. Diversity of the human intestinal microbial flora / P.B. Eckburg, E.M. Bik, C.N. Bernstein *et al.* // *Science.* — 2005. — V. 308. — P. 1635–1638.
148. Edelblum, K.L. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium / K.L. Edelblum, C. Yanover, T. Hickey *et al.* //

- Inflamm. Bowel Dis. — 2006. — V. 12. — P. 413–424.
149. Edelblum, K.L. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown / K.L. Edelblum, J.R. Turner // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2009. — V. 9. — P. 715–720.
  150. Eisenbarth, S.C. CD4<sup>+</sup> T cells that help B cells – A proposal for uniform nomenclature / S.C. Eisenbarth, D. Baumjohann, J. Craft, A. Lanzavecchia, S. Crotty, C.G. Vinuesa // *Trends Immunol.* — 2021. — V. 42, No. 8. — P. 658–669.
  151. Emge, J.R. Modulation of the microbiota-gut-brain axis by probiotics in a murine model of inflammatory bowel disease / J.R. Emge, K. Huynh, E.N. Miller *et al.* // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* — 2016. — V. 310. — P. G989–G998.
  152. Erkelens, M.N. Retinoic Acid and Immune Homeostasis: A Balancing Act / M.N. Erkelens, R.E. Mebius // *Trends Immunol.* — 2017. — V. 38. — P. 168–180.
  153. Espinoza, K.S. Loss of Acid Ceramidase in Myeloid Cells Protects from Chronic Colitis in IL10-Deficient Mice / K.S. Espinoza, M.G. Siskind, L.J. Siskind *et al.* // *bioRxiv.* — 2026. — Preprint. — DOI: 10.64898/2026.01.05.697503.
  154. Esposito, G. Targeting ceramide metabolism in inflammatory bowel disease: A new therapeutic frontier / G. Esposito, E. Capoccia, C. Cirillo *et al.* // *Biochem. Pharmacol.* — 2024. — V. 220. — P. 116015.
  155. Everard, A. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity / A. Everard, C. Belzer, L. Geurts *et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2013. — V. 110. — P. 9066–9071.
  156. Fan, Y. Gut microbiota in human metabolic health and disease / Y. Fan, O. Pedersen // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2021. — V. 19. — P. 55–71.
  157. Fanizza, F. A gut–brain axis on-a-chip platform for drug testing challenged with donepezil / F. Fanizza, S. Perotoni, L. Boeri *et al.* // *Lab Chip.* — 2025. — Advance Article. — DOI: 10.1039/D4LC01042B.
  158. Fanning, A.S. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton / A.S. Fanning, B.J. Jameson, L.A. Jesaitis, J.M. Anderson // *J. Biol. Chem.* — 1998. — V. 273. — P. 29745–29753.

159. Fantini, M.C. Common immunologic mechanisms in inflammatory bowel disease and spondylarthropathies / M.C. Fantini, F. Pallone, G. Monteleone // *World J. Gastroenterol.* — 2009. — V. 15, No. 20. — P. 2472–2478.
160. Feng, Q. Disruption of Rab8a and Rab11a causes formation of basolateral microvilli in neonatal enteropathy / Q. Feng, E.M. Bonder, A.C. Engevik *et al.* // *J. Cell Sci.* — 2017. — V. 130. — P. 2491–2505.
161. Feng, T. Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of colitis / T. Feng, L. Wang, T.R. Schoeb *et al.* // *J. Immunol.* — 2010. — V. 184, No. 8. — P. 4301–4308.
162. Feuerstein, J.D. AGA Clinical Practice Guidelines on the Management of Moderate to Severe Ulcerative Colitis / J.D. Feuerstein, K.L. Isaacs, Y. Schneider *et al.* // *Gastroenterology.* — 2020. — V. 158, No. 5. — P. 1450–1461.
163. Foster, D.A. Phosphatidic acid and lipid-sensing by mTOR / D.A. Foster // *Trends Endocrinol. Metab.* — 2013. — V. 24. — P. 272–278.
164. Foster, J.A. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression / J.A. Foster, K.A. McVey Neufeld // *Trends Neurosci.* — 2013. — V. 36. — P. 305–312.
165. Fox, T.E. Ceramide recruits and activates protein kinase C (PKC) within structured membrane microdomains / T.E. Fox, K.L. Houck, S.M. O'Neill *et al.* // *J. Biol. Chem.* — 2007. — V. 282, No. 17. — P. 12450–12457.
166. Frank, D.N. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases / D.N. Frank, A.L. St Amand, R.A. Feldman *et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104. — P. 13780–13785.
167. Franzosa, E.A. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease / E.A. Franzosa, A. Sirota-Madi, J. Avila *et al.* // *Nat. Microbiol.* — 2018. — V. 4, No. 2. — P. 293–305.
168. Furrie, E. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial / E. Furrie, S. Macfarlane, A. Kennedy *et al.* // *Gut.* — 2005. — V. 54. — P. 242–249.
169. Furusawa, Y. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells / Y. Furusawa, Y. Obata, S. Fukuda *et al.* // *Nature.* — 2013. — V. 504. — P. 446–450.

170. Fuss, I.J. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis / I.J. Fuss, F. Heller, M. Boirivant, F. Leon, M. Yoshida, S. Fichtner-Feigl, Z. Yang, M. Exley, A. Kitani, R.S. Blumberg, P. Mannon, W. Strober // *J. Clin. Invest.* — 2004. — V. 113, No. 10. — P. 1490–1497.
171. Fuss, I.J. IL13R $\alpha$ 2-bearing, type II NKT cells reactive to sulfatide self-antigen populate the mucosa of ulcerative colitis / I.J. Fuss, B. Joshi, Z. Yang, H. Degheidy, S. Fichtner-Feigl, H. de Souza, F. Rieder, F. Scaldaferrri, A. Schirbel, G. West, C. Yi, L. Xu, P. Leland, M. Yao, P. Mannon, R. K. Puri, C. Fiocchi, W. Strober // *Gut.* — 2014. — V. 63, No. 11. — P. 1728–1736.
172. Gadaleta, R.M. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease / R.M. Gadaleta, K.J. van Erpecum, B. Oldenburger *et al.* // *Gut.* — 2011. — V. 60. — P. 463–472.
173. Ganesh, B.P. Commensal *Akkermansia muciniphila* exacerbates gut inflammation in *Salmonella Typhimurium* infected gnotobiotic mice / B. P. Ganesh, R. Klopffleisch, G. Loh, M. Blaut // *PLoS One.* — 2013. — V. 8, No. 9. — P. e74963.
174. Gao, K. Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Health / K. Gao, C.L. Mu, A. Farzi, W.Y. Zhu // *Adv. Nutr.* — 2020. — V. 11. — P. 709 – 723.
175. Garrett, W.S. Cancer and the microbiota / W.S. Garrett // *Science.* — 2015. — V. 348. — P. 80–86.
176. Gecse, K.B. Differential diagnosis of inflammatory bowel disease: imitations and complications / K.B. Gecse, S. Vermeire // *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* — 2018. — V. 3. — P. 644–653.
177. Geirnaert, A. Clostridium sporogenes-derived metabolites protect mice against colonic inflammation / A. Geirnaert, J. Wang, M. Zimmermann *et al.* // *Gut Microbes.* — 2024. — V. 16, No. 1. — P. 2412669.
178. Gerke, V. Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics / V. Gerke, S.E. Creutz, S.E. Moss // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2005. — V. 6. — P. 449–461.
179. Gerke, V. Annexins—a family of proteins with distinctive tastes for cell signaling and membrane dynamics / V. Gerke, F.N.E. Gavins, M. Geisow *et al.* // *Nat. Commun.* — 2024. — V. 15. — P. 1574.

180. Gerlach, K. Th9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL9 and IL21 / K. Gerlach, Y. Hwang, A. Nikolaev *et al.* // *J. Immunol.* — 2014. — V. 192. — P. 2759–2767.
181. Gershon, M.D. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders / M.D. Gershon, J. Tack // *Gastroenterology.* — 2007. — V. 132. — P. 397–414.
182. Gevers, D. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease / D. Gevers, S. Kugathasan, L.A. Denson *et al.* // *Cell Host Microbe.* — 2014. — V. 15. — P. 382–392.
183. Gibson, G.R. Sulphate-reducing bacteria and hydrogen metabolism in the human large intestine / G.R. Gibson, J.H. Cummings, G.T. Macfarlane // *Gut.* — 1991. — V. 32. — P. 1423–1427.
184. Glade, M.J. Phosphatidylserine and the human brain / M.J. Glade, K. Smith // *Nutrition.* — 2015. — V. 31. — P. 781–786.
185. Goni, F.M. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity / F.M. Goni, A. Alonso // *FEBS Lett.* — 2002. — V. 531. — P. 38–46.
186. Gordon, S. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions / S. Gordon, F.O. Martinez // *Immunity.* — 2010. — V. 32, No. 5. — P. 593–604.
187. Graff, L.A. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: a review of comorbidity and management / L.A. Graff, J.R. Walker, C.N. Bernstein // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2009. — V. 15. — P. 1105–1118.
188. Grega-Larson, N.E. Cordon bleu promotes the assembly of brush border microvilli / N.E. Grega-Larson, S.W. Crawley, A.L. Erwin, M.J. Tyska // *Mol. Biol. Cell.* — 2015. — V. 26. — P. 3803–3815.
189. Grivennikov, S.I. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia / S.I. Grivennikov // *Semin. Immunopathol.* — 2013. — V. 35. — P. 229–244.
190. Haines, T.H. Cardiolipin: A proton trap for oxidative phosphorylation / T.H. Haines, N.A. Dencher // *FEBS Lett.* — 2002. — V. 528. — P. 35–39.
191. Han, T. From pathogenic mechanisms to therapeutic perspectives: a review of gut microbiota and intestinal mucosal immunity in inflammatory bowel disease / T. Han, Y. Zhang, G. Zheng, Y. Guo // *Front. Immunol.* — 2025. — V. 16. — P. 1704651.

192. Hannun, Y.A. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids / Y.A. Hannun, L.M. Obeid // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2008. — V. 9. — P. 139–150.
193. Harayama, T. Understanding the diversity of membrane lipid composition / T. Harayama, H. Riezman // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2018. — V. 19. — P. 281–296.
194. Harbour, S.N. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis / S.N. Harbour, D. DiToro, S.J. Browne *et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2015. — V. 112. — P. 7061–7066.
195. Hardie, D.G. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis / D.G. Hardie, F.A. Ross, S.A. Hawley // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2012. — V. 13. — P. 251–262.
196. Hartmann, D. The role of ceramide synthases in the regulation of apoptosis / D. Hartmann, J. Lucks, S. Fuchs *et al.* // *Prog. Lipid Res.* — 2012. — V. 51, No. 3. — P. 252–267.
197. Hartsock, A. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton / A. Hartsock, W.J. Nelson // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2008. — V. 1778. — P. 660–669.
198. Hassan, A.M. Repeated predictable stress causes resilience against colitis-induced behavioral changes in mice / A.M. Hassan, P. Jain, F. Reichmann *et al.* // *Front. Behav. Neurosci.* — 2014. — V. 8. — P. 386.
199. He, R. L-Fucose ameliorates DSS-induced acute colitis via inhibiting macrophage M1 polarization and inhibiting NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B activation / R. He, Y. Li, C. Han *et al.* // *Int. Immunopharmacol.* — 2019. — V. 73. — P. 379–388.
200. Hedl, M. NOD2 regulates TLR2-mediated T helper 1 and T helper 17 responses / M. Hedl, C. Abraham // *J. Immunol.* — 2011. — V. 186. — P. 6313–6321.
201. Helke, K. Ceramide Synthase 6 Deficiency Enhances Inflammation in the DSS model of Colitis / K. Helke, P. Angel, P. Lu *et al.* // *Sci. Rep.* — 2018. — V. 8, No. 1. — P. 1627.
202. Heller, F. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL13-producing NK-T cells / F. Heller, I.J. Fuss, E.E. Nieuwenhuis, R.S. Blumberg, W. Strober // *Immunity.* — 2002. — V.

- 17, No. 5. — P. 629–638.
203. Heller, F. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution / F. Heller, P. Florian, C. Bojarski *et al.* // *Gastroenterology*. — 2005. — V. 129. — P. 550–564.
204. Holic, R. Metabolism of phospholipids in the yeast *Schizosaccharomyces pombe* / R. Holic, L. Pokorna, P. Griac // *Yeast*. — 2020. — V. 37. — P. 73–92.
205. Hossein-Khannazer, N. Features and roles of T helper 22 cells in immunological diseases and malignancies / N. Hossein-Khannazer, B. Zian, F. Bakkach, M. Mansoori, M.H. Kaabi, M. Hosseinzadeh // *Scand. J. Immunol.* — 2021. — V. 93, No. 5. — P. e13030.
206. Hotamisligil, G.S. Foundations of immunometabolism and implications for metabolic health and disease / G.S. Hotamisligil // *Immunity*. — 2017. — V. 47. — P. 406–420.
207. Hou, K. The gut microbiota and its metabolites: novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease / K. Hou, Z.X. Wu, X.Y. Chen *et al.* // *Front. Immunol.* — 2025. — V. 16. — P. 1690279.
208. Hou, Y. Tryptophan metabolism and gut microbiota: a novel target for health maintenance and disease prevention / Y. Hou, X. Zhang, L. Wang *et al.* // *Int. J. Biol. Sci.* — 2023. — V. 19. — P. 4374–4392.
209. Hracs, L. Global evolution of inflammatory bowel disease across epidemiologic stages / L. Hracs, J.W. Windsor, J. Gorospe *et al.* // *Nature*. — 2025. — V. 642. — P. 458–466.
210. Hua, X. Tryptophan metabolism and the intestinal microbiota: Implications for inflammatory bowel disease / X. Hua, Y. Chen, L. Zhang *et al.* // *Microbiol. Res.* — 2025. — V. 300. — P. 128280.
211. Huang, F. Brain neurotransmitter modulation by gut microbiota in anxiety and depression / F. Huang, X. Wu // *Front. Cell Dev. Biol.* — 2021. — V. 9. — P. 472.
212. Huda-Faujan, N. The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects / N. Huda-Faujan, A.S. Abdulmir, A.B. Fatimah *et al.* // *Open Biochem. J.* — 2010. — V. 4. — P. 53–58.

213. Hugot, J.P. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease / J.P. Hugot, M. Chamaillard, H. Zouali *et al.* // *Nature*. — 2001. — V. 411. — P. 599–603.
214. Huycke, M.M. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA / M.M. Huycke, V. Abrams, D.R. Moore // *Carcinogenesis*. — 2002. — V. 23. — P. 529–536.
215. Huycke, M.M. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models / M.M. Huycke, H.R. Gaskins // *Exp. Biol. Med.* — 2004. — V. 229. — P. 586–597.
216. Hwang, S. Caffeic Acid Phenethyl Ester Administration Reduces Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-Induced Colitis and Tumorigenesis / S. Hwang, J. Park, H. Lee *et al.* // *Toxins (Basel)*. — 2024. — V. 16, No. 9. — P. 389.
217. Iancu, T.C. Ultrastructural aspects of enterocyte defects in infancy and childhood / T.C. Iancu, I. Manov // *Ultrastruct. Pathol.* — 2010. — V. 34. — P. 117–125.
218. Inagaki, T. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor / T. Inagaki, A. Moschetta, Y.K. Lee *et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2006. — V. 103. — P. 3920–3925.
219. Ishihara, S. Rap1 prevents colitogenic Th17 cell expansion and facilitates Treg cell differentiation and distal TCR signaling / S. Ishihara, M. Sato, H. Miyazaki *et al.* // *Commun. Biol.* — 2022. — V. 5, No. 1. — P. 212.
220. Ivanov, A.I. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation / A.I. Ivanov, C.A. Parkos, A. Nusrat // *Am. J. Pathol.* — 2010. — V. 177. — P. 512–524.
221. JanssenDuijghuijsen, L.M. Mitochondrial ATP Depletion Disrupts Caco-2 Monolayer Integrity and Internalizes Claudin 7 / L.M. JanssenDuijghuijsen, S. Grefte, V.C.J. de Boer *et al.* // *Front. Physiol.* — 2017. — V. 8. — P. 794.
222. Jobin, C. Colorectal cancer: looking for the causative agent / C. Jobin // *Cancer Discov.* — 2013. — V. 3. — P. 384–387.
223. Johansson, M.E. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria / M.E. Johansson, M. Phillipson, J. Petersson *et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2008. — V. 105, No. 39. — P. 15064–15069.
224. Johnston, R.J. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators

- of T follicular helper cell differentiation / R.J. Johnston, A.C. Poholek, D. DiToro, I. Yusuf, D. Eto, B. Barnett, A.L. Dent, J. Craft, S. Crotty // *Science*. — 2009. — V. 325, No. 5943. — P. 1006–1010.
225. Jones, E.J. An in vitro multi-organ microphysiological system (MPS) to investigate the gut-to-brain translocation of neurotoxins / E.J. Jones, B.M. Skinner, A. Parker *et al.* // *Biomechanics*. — 2024. — V. 18, No. 5. — P. 054105.
226. Jostins, L. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease / L. Jostins, S. Ripke, R.K. Weersma *et al.* // *Nature*. — 2012. — V. 491. — P. 119–124.
227. Kaiser, F. Sphingolipids controlling ciliary and microvillar function / F. Kaiser, M. Huebecker, D. Wachten // *FEBS Lett.* — 2020. — V. 594. — P. 3652–3667.
228. Kakodkar, S. Diet as a therapeutic option for adult inflammatory bowel disease / S. Kakodkar, E.A. Mutlu // *Gastroenterol. Clin. North Am.* — 2017. — V. 46. — P. 745–767.
229. Kanai, T. TH1/TH2-mediated colitis induced by adoptive transfer of CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T lymphocytes into nude mice / T. Kanai, T. Kawamura, T. Dohi, S. Makita, Y. Nemoto, T. Totsuka, M. Watanabe // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2006. — V. 12. — P. 89–99.
230. Kaplan, G.G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025 / G.G. Kaplan // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2015. — V. 12. — P. 720–727.
231. Kaplan, G.G. The global burden of inflammatory bowel disease: from 2025 to 2045 / G.G. Kaplan // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2025. — V. 22, № 9. — P. 708–720.
232. Karin, M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer / M. Karin // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2009. — V. 1. — P. a000141.
233. Karner, M. First multicenter study of modified release phosphatidylcholine »LT-02« in ulcerative colitis: A randomized, placebo-controlled trial in mesalazine-refractory courses / M. Karner, A. Kocjan, J. Stein *et al.* // *Am. J. Gastroenterol.* — 2014. — V. 109, No. 7. — P. 1041–1051.
234. Kaur, H. Tryptophan metabolism by gut microbiome and gut–brain axis / H. Kaur, A. Bose, A. Mande // *Front. Neurosci.* — 2019. — V. 13. — P. 1365.
235. Kennedy, P.J. Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain

- axis / P.J. Kennedy, J.F. Cryan, T.G. Dinan, G. Clarke // *Neuropharmacology*. — 2017. — V. 112. — P. 399–412.
236. Kessels, M.M. Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis / M.M. Kessels, B. Qualmann // *EMBO J.* — 2002. — V. 21. — P. 6083–6094.
237. Kim, H.Y. Phosphatidylserine in the brain: Metabolism and function / H.Y. Kim, B.X. Huang, A.A. Spector // *Prog. Lipid Res.* — 2014. — V. 56. — P. 1–18.
238. Kim, J. Human organoids and microphysiological systems for modeling intestinal inflammation and inflammatory bowel disease / J. Kim, B.K. Koo, K.J. Yoon *et al.* // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2022. — V. 19, No. 8. — P. 497–511.
239. Kim, Y.R. Ablation of ceramide synthase 2 exacerbates dextran sodium sulphate-induced colitis in mice due to increased intestinal permeability / Y.R. Kim, G. Volpert, K.O. Shin *et al.* // *J. Cell. Mol. Med.* — 2017. — V. 21, No. 12. — P. 3565–3578.
240. Kingsley, M. Effects of Phosphatidylserine Supplementation on Exercising Humans / M. Kingsley // *Sport. Med.* — 2006. — V. 36. — P. 657–669.
241. Klaassen-Dekker, N. Preoperative plasma short-chain fatty acids and postoperative outcomes in patients with colorectal cancer / N. Klaassen-Dekker, D.E.G. Kok, F.J.B. van Duijnhoven *et al.* // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2025. — V. 122, No. 6. — P. 1456–1468.
242. Knights, D. Complex host-genetics-microbiome interactions in inflammatory bowel diseases / D. Knights, J. Silverberg, J.C. Weersma *et al.* // *Genome Med.* — 2013. — V. 5. — P. 96–105.
243. Ko, C.-W. Regulation of intestinal lipid metabolism: Current concepts and relevance to disease / C.-W. Ko, J. Qu, D.D. Black, P. Tso // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2020. — V. 17. — P. 169–183.
244. Kolesnick, R. Radiation and ceramide-induced apoptosis / R. Kolesnick, Z. Fuks // *Oncogene*. — 2003. — V. 22. — P. 5897–5906.
245. Kolios, G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle / G. Kolios, V. Valatas, S.G. Ward // *Immunology*. — 2004. — V. 113. — P. 427–437.
246. Konopelski, P. Biological effects of indole-3-propionic acid, a gut microbiota-derived metabolite of tryptophan / P. Konopelski, M. Ufnal

- // Int. J. Mol. Sci. — 2022. — V. 23. — P. 1222.
247. Kopp, W. How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases / W. Kopp // Diabetes Metab. Syndr. Obes. — 2019. — V. 12. — P. 2221–2236.
248. Kostic, A.D. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma / A.D. Kostic, C. Chun, L. Robertson *et al.* // Genome Res. — 2012. — V. 22. — P. 292–298.
249. Kostic, A.D. The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead / A.D. Kostic, R.J. Xavier, D. Gevers // Gastroenterology. — 2014. — V. 146. — P. 1489–1499.
250. Kotelevets, L. Rac1 signaling: From intestinal homeostasis to colorectal cancer metastasis / L. Kotelevets, E. Chastre // Cancers (Basel). — 2020. — V. 12. — P. 665.
251. Kovac, B. Increased  $\alpha$ -actinin-1 destabilizes e-cadherin-based adhesions and associates with poor prognosis in basal-like breast cancer / B. Kovac, T.P. Mäkela, T. Vallenius // PLoS One. — 2018. — V. 13. — P. e0196986.
252. Lai, Y. Serum Metabolomics Identifies Altered Bioenergetics, Signaling Cascades in Parallel with Exposome Markers in Crohn's Disease / Y. Lai, J. Xue, C.-W. Liu *et al.* // Molecules. — 2019. — V. 24, No. 3. — P. 449.
253. Lamas, B. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands / B. Lamas, M.L. Richard, V. Leducq *et al.* // Nat. Med. — 2016. — V. 22. — P. 598–605.
254. Langfelder, P. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis / P. Langfelder, S. Horvath // BMC Bioinformatics. — 2008. — V. 9. — P. 559.
255. Lanis, J.M. Tissue metabolism and the inflammatory bowel diseases / J.M. Lanis, D.J. Kao, E.E. Alexeev *et al.* // J. Mol. Med. — 2017. — V. 95. — P. 905–913.
256. Leonel, A.J. Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis / A.J. Leonel, L.G. Teixeira, R.P. Oliveira *et al.* // Br. J. Nutr. — 2013. — V. 109. — P. 1396–1407.
257. Lesage, S. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease / S. Lesage, H. Zouali, J.P. Cézard *et al.* // Am. J. Hum. Genet. — 2002. — V. 70. — P.

- 845–857.
258. Li, C. Mucin O-glycans facilitate symbiosynthesis to maintain gut immune homeostasis / C. Li, Z. Zhu, Y. Du *et al.* // *mBio*. — 2022. — V. 13, No. 5. — P. e0247822.
259. Li, L. Ionic protein-lipid interaction at the plasma membrane: What can the charge do? / L. Li, X. Shi, X. Guo, H. Xu, C. Xu // *Trends Biochem. Sci.* — 2014. — V. 39. — P. 130–140.
260. Li, L. Gut microbiota from colorectal cancer patients enhances the progression of intestinal adenoma in *Apc(min/+)* mice / L. Li, X. Li, W. Zhong *et al.* // *EBioMedicine*. — 2019. — V. 48. — P. 301–315.
261. Li, R. Micro-nano microbial fuel cell-driven bioelectrochemical tumor therapy / R. Li, H. Zhang, T. Chen *et al.* // *Nat. Commun.* — 2025. — V. 16. — P. 10523.
262. Li, Z. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis / Z. Li, L.B. Agellon, T.M. Allen *et al.* // *Cell Metab.* — 2006. — V. 3. — P. 321–331.
263. Liang, J. Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer / J. Liang, M. Nagahashi, E.Y. Kim *et al.* // *Cancer Cell*. — 2013. — V. 23, No. 1. — P. 107–120.
264. Limon, J.J. *Malassezia* is associated with Crohn's disease and exacerbates colitis in mouse models / J.J. Limon, J. Tang, D. Li *et al.* // *Cell Host Microbe*. — 2019. — V. 25. — P. 377–388.
265. Lin, M.H. Inhibiting Rac1 signaling alleviates DSS-induced colitis by improving inflammatory response and intestinal permeability / M.H. Lin, C.H. Luo, M.M. Ma *et al.* // *Gastroenterol. Rep. (Oxf)*. — 2025. — V. 13. — P. goaf001.
266. Linden, D.R. Hydrogen sulfide signaling in the gastrointestinal tract / D.R. Linden // *Antioxid. Redox Signal.* — 2014. — V. 20. — P. 818–830.
267. Litvak, Y. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota / Y. Litvak, M.X. Byndloss, A.J. Bäumlér // *Science*. — 2018. — V. 362. — P. eaat9076.
268. Litvinova, E.A. Dietary Fucose Affects Macrophage Polarization and Reproductive Performance in Mice / E.A. Litvinova *et al.* // *Nutrients*. — 2021. — V. 13. — P. 855.

269. Litvinova, E.A. Eradication of *Helicobacter* spp. in Mucin-2 deficient mice / E.A. Litvinova *et al.* // *Laboratory Animals*. — 2016. — V. —. — DOI: 10.1177/0023677216670687.
270. Liu, J.Z. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations / J.Z. Liu, S. van Sommeren, H. Huang *et al.* // *Nat. Genet.* — 2015. — V. 47. — P. 979–986.
271. Liu, Y. Molecular regulation of sexual preference revealed by genetic studies of 5-HT in the brains of male mice / Y. Liu, Y.A. Jiang, Y. Si, J.Y. Kim, Z.F. Chen, Y. Rao // *Nature*. — 2011. — V. 472. — P. 95–99.
272. Liu, Y. MiR-155 contributes to intestinal barrier dysfunction in DSS-induced mice colitis via targeting HIF-1 $\alpha$ /TFF-3 axis / Y. Liu, F. Zhu, H. Li *et al.* // *Aging*. — 2020. — V. 12. — P. 14966–14977.
273. Liu, Y. Akkermansia muciniphila exerts strain-specific effects on DSS-induced ulcerative colitis in mice / Y. Liu, M. Yang, L. Tang *et al.* // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* — 2021. — V. 11. — P. 698914.
274. Liu, Y. Orchestration of MUC2 - The key regulatory target of gut barrier and homeostasis: A review / Y. Liu, Z. Yu, L. Zhu *et al.* // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2023. — V. 236. — P. 123862.
275. Lobo, G.P. Genetics and diet regulate vitamin A production via the homeobox transcription factor ISX / G.P. Lobo, J. Amengual, D. Baus *et al.* // *J. Biol. Chem.* — 2013. — V. 288. — P. 9017–9027.
276. Longo, V.D. Nutrition, longevity and disease: From molecular mechanisms to interventions / V.D. Longo, R.M. Anderson // *Cell*. — 2022. — V. 185. — P. 1455–1470.
277. Lordan, R. Phospholipids of Animal and Marine Origin: Structure, Function, and Anti-Inflammatory Properties / R. Lordan, A. Tsoupras, I. Zabetakis // *Molecules*. — 2017. — V. 22. — P. 1964.
278. Louis, P. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine / P. Louis, H.J. Flint // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2009. — V. 294. — P. 1–8.
279. Louten, J. Development and function of TH17 cells in health and disease / J. Louten, K. Boniface, R. de Waal Malefyt // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2009. — V. 123, No. 5. — P. 1004–1011.

280. Lynch, J.W. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles / J.W. Lynch // *Neuropharmacology*. — 2009. — V. 56. — P. 303–309.
281. Ma, R. Chronic exposure to low-dose deltamethrin can lead to colon tissue injury through PRDX1 inactivation-induced mitochondrial oxidative stress injury and gut microbial dysbiosis / R. Ma, T. Sun, X. Wang *et al.* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2023. — V. 264. — P. 115475.
282. Machiels, K. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis / K. Machiels, M. Joossens, J. Sabino *et al.* // *Gut*. — 2014. — V. 63. — P. 1275–1283.
283. Macia, L. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome / L. Macia, J. Tan, A.T. Vieira *et al.* // *Nat. Commun.* — 2015. — V. 6. — P. 6734.
284. Mackay, F. Cracking the BAFF code / F. Mackay, S.G. Tangye, P.D. Hodgkin // *Nat. Rev. Immunol.* — 2009. — V. 9. — P. 491–502.
285. Mandel, L.J. ATP depletion: a novel method to study junctional properties in epithelial tissues. II. Internalization of Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase and E-cadherin / L.J. Mandel, R. Bacallao, I. Zampighi // *J. Cell Sci.* — 1993. — V. 104. — P. 1217–1235.
286. Mannion, J.M. Tissue-Resident Th2 Cells in Type 2 Immunity and Allergic Diseases / J.M. Mannion, R.A. Rahimi // *Immunol. Rev.* — 2025. — 21 Feb.
287. Marchiando, A.M. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation / A.M. Marchiando, L. Shen, W.V. Graham *et al.* // *J. Cell Biol.* — 2010. — V. 189. — P. 111–126.
288. Marchiando, A.M. A deficiency in the autophagy gene *Atg16L1* enhances resistance to enteric bacterial infection / A.M. Marchiando, P. Ramanan, Y. Ding *et al.* // *Cell Host Microbe*. — 2013. — V. 14, No. 2. — P. 216–224.
289. Marrie, R.A. Rising incidence of psychiatric disorders before diagnosis of immune-mediated inflammatory disease / R.A. Marrie, J.D. Fisk, B.N. Yu *et al.* // *Epidemiol. Psychiatr. Sci.* — 2019. — V. 28, No. 3. — P. 333–342.
290. Martens, E.C. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont / E.C. Martens, H.C. Chiang, J.I. Gordon // *Cell Host Microbe*. — 2008. — V. 4, No. 5. — P. 447–457.

291. Mathis, D. Immunometabolism: an emerging frontier / D. Mathis, S.E. Shoelson // *Nat. Rev. Immunol.* — 2011. — V. 11. — P. 81.
292. Matsumoto, M. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome / M. Matsumoto, R. Kibe, T. Ooga *et al.* // *Sci. Rep.* — 2011. — V. 2. — P. 233.
293. Matsuoka, K. The gut microbiota and inflammatory bowel disease / K. Matsuoka, T. Kanai // *Semin. Immunopathol.* — 2015. — V. 37. — P. 47–55.
294. Matsuzaki, M. Mucin-dependent transcriptional dynamics of *Akkermansia muciniphila* in co-culture with human colonic organoids / M. Matsuzaki, E. Miyauchi, T. Suzuki *et al.* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2025. — Online ahead of print. — DOI: 10.1093/bbb/zbaf121.
295. Mazmanian, S.K. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease / S.K. Mazmanian, J.L. Round, D.L. Kasper // *Nature.* — 2008. — V. 453. — P. 620–625.
296. McGovern, D.P. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci / D.P. McGovern, J.Z. Liu, C.A. Anderson *et al.* // *Nat. Genet.* — 2010. — V. 42. — P. 332–337.
297. Medvedeva, S. The application of explants, crypts, and organoids as models in intestinal barrier research / S. Medvedeva *et al.* // *Tissue Barriers.* — 2025. — V. 13. — P. e2423137.
298. Meyer, M.C. Reduced intestinal mucin and altered mucin physico-chemical properties in dextran sulfate sodium-induced colitis / M.C. Meyer, A.J. Kotra, P.A. Dawson // *FASEB J.* — 2005. — V. 19, No. 4. — A727.
299. Mi, Y. Relationship between smoking status and ulcerative colitis: a meta-analysis based on a case-control study / Y. Mi, Y. Tan, Y. Yu *et al.* // *Sci. Rep.* — 2025. — V. 15. — Art. № 13329.
300. Michalek, R.D. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cell subsets / R.D. Michalek, V.A. Gerriets, S.R. Jacobs *et al.* // *J. Immunol.* — 2011. — V. 186. — P. 3299–3303.
301. Michielan, A. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut / A. Michielan, R. D’Inca // *Mediators Inflamm.* — 2015. — V. 2015. — P. 628157.
302. Mira-Pascual, L. Microbial mucosal colonic shifts associated with the

- development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers / L. Mira-Pascual, R. Cabrera-Rubio, A. Ocon *et al.* // *J. Gastroenterol.* — 2015. — V. 50. — P. 167–179.
303. Mirkov, M.U. Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2 / M.U. Mirkov, B. Verstockt, I. Cleynen // *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* — 2017. — V. 2. — P. 224–234.
304. Mitchell, C. Regulation of *Bacteroides acidifaciens* by the Aryl hydrocarbon receptor in IL22-producing immune cells has sex-dependent consequential impact on colitis / C. Mitchell, A. Provasas, J. Lin *et al.* // *Front. Immunol.* — 2024. — V. 15. — P. 1444045.
305. Moffett, J.R. Tryptophan and the immune response / J.R. Moffett, M.A. Namboodiri // *Immunol. Cell Biol.* — 2003. — V. 81. — P. 247–265.
306. Morgan, X.C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment / X.C. Morgan, T.L. Tickle, H. Sokol *et al.* // *Genome Biol.* — 2012. — V. 13. — P. R79.
307. Morozova, M. Colitis-associated intestinal microbiota regulates brain glycine and host behavior in mice / M. Morozova *et al.* // *Scientific Reports.* — 2022. — V. 12. — P. 16345.
308. Morozova, M. Phospholipid supplementation inhibits male and female odor discrimination in mice / M. Morozova *et al.* // *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* — 2024. — V. 18. — Art. no. 1397284.
309. Morozova, M.V. Investigating social communication in mice: a Two-intruders test approach / M.V. Morozova *et al.* // *Journal of Neuroscience Research.* — 2024. — V. 102. — Art. no. e25365.
310. Mosmann, T.R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins / T.R. Mosmann, H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, R.L. Coffman // *J. Immunol.* — 1986. — V. 136, No. 7. — P. 2348–2357.
311. Moulton, C.D. Depressive symptoms in inflammatory bowel disease: An extraintestinal manifestation of inflammation? / C.D. Moulton, G. Pavlidis, K. Norton *et al.* // *Clin. Exp. Immunol.* — 2019. — V. 197. — P. 308–318.
312. Mowat, A.M. Regional specialization within the intestinal immune system / A.M. Mowat, W.W. Agace // *Nat. Rev. Immunol.* — 2014. — V. 14. — P. 667–685.

313. Muise, A.M. Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in loss of cell-cell adhesion and are associated with Crohn's disease / A.M. Muise, W. Xu, J.C. Barrett *et al.* // *Gastroenterology*. — 2009. — V. 136. — P. 2223–2231.
314. Nagahama, K. Protein kinase C theta plays a fundamental role in different types of chronic colitis / K. Nagahama, A. Ogawa, K. Shirane *et al.* // *Gastroenterology*. — 2008. — V. 134, No. 2. — P. 459–469.
315. Naito, Y. Role of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis / Y. Naito, T. Takagi, A. Nishida // *J. Clin. Biochem. Nutr.* — 2024. — V. 75, No. 3. — P. 175–177.
316. Nava, G.M. Modulating the effects of hydrogen sulfide on colonic epithelial cell metabolism / G.M. Nava, H.R. Gaskins // *Gut Microbes*. — 2012. — V. 3. — P. 267–270.
317. Negroni, A. Characterization of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease / A. Negroni, M. Costanzo, R. Vitali *et al.* // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2012. — V. 18. — P. 913–924.
318. Nelson, J.R. The eicosapentaenoic acid:arachidonic acid ratio and its clinical utility in cardiovascular disease / J.R. Nelson, S. Raskin // *Postgrad. Med.* — 2019. — V. 131. — P. 268–277.
319. Neuendorf, R. Depression and anxiety in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review / R. Neuendorf, A. Harding, N. Stello *et al.* // *J. Psychosom. Res.* — 2016. — V. 87. — P. 70–80.
320. Neurath, M. TNBS-colitis / M. Neurath, I. Fuss, W. Strober // *Int. Rev. Immunol.* — 2000. — V. 19, No. 1. — P. 51–62.
321. Neurath, M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease / M.F. Neurath // *Nat. Rev. Immunol.* — 2014. — V. 14. — P. 329–342.
322. Neurath, M.F. Current and emerging therapeutic targets for IBD / M.F. Neurath // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2017. — V. 14. — P. 269–278.
323. Neurath, M.F. Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease / M.F. Neurath // *Nat. Immunol.* — 2019. — V. 20, No. 8. — P. 970–979.
324. Newsholme, P. Glutamine and glutamate as vital metabolites / P. Newsholme, J. Procópio, M.M. Lima *et al.* // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 2003. — V. 36. — P. 153–163.

325. Newton, J. Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in ceramide-enriched membrane signaling / J. Newton, S. Lima-Ojeda, T. Levkau // *Biochimie*. — 2015. — V. 113. — P. 100–108.
326. Ng, S.C. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies / S.C. Ng, H.Y. Shi, N. Hamidi *et al.* // *Lancet*. — 2017. — V. 390. — P. 2769–2778.
327. Ni, J. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? / J. Ni, G.D. Wu, L. Albenberg, V.T. Tomov // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2017. — V. 14. — P. 573–584.
328. Nickelwart, E.A. The abundance of H3K27me3 histone modification in the mouse colon under chronic inflammation / E.A. Nickelwart *et al.* // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. — 2025. — V. 61. — P. 1189–1199.
329. Nie, Y. *Desulfovibrio fairfieldensis*-Derived Outer Membrane Vesicles Damage Epithelial Barrier and Induce Inflammation and Pyroptosis in Macrophages / Y. Nie, J. Hu, H. Yan *et al.* // *Cells*. — 2023. — V. 12. — P. 89.
330. Nijhara, R. Rac1 Mediates Collapse of Microvilli on Chemokine-Activated T Lymphocytes / R. Nijhara, P.B. van Hennik, M.L. Gignac *et al.* // *J. Immunol.* — 2004. — V. 173. — P. 4985–4993.
331. Nikolaus, S. Increased tryptophan metabolism is associated with activity of inflammatory bowel diseases / S. Nikolaus, P. Schulte, F. Al-Massad *et al.* // *Gastroenterology*. — 2017. — V. 153. — P. 1504–1516.
332. Ning, L. Cross-cohort integrative analysis of gut microbiome and metabolome in inflammatory bowel disease / L. Ning, Y. Zhou, H. Sun *et al.* // *Gut*. — 2025. — In press.
333. Nshanian, M. Propionate and butyrate induce histone propionylation and butyrylation with distinct effects on chromatin accessibility and gene expression in colorectal cancer cells / M. Nshanian, J.J. Gruber, B.S. Zhao *et al.* // *Nat. Metab.* — 2025. — V. 7. — P. 112–128.
334. Nurieva, R.I. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells / R.I. Nurieva, Y. Chung, G.J. Martinez, X.O. Yang, S. Tanaka, T.D. Matskevitch, Y.H. Wang, C. Dong // *Science*. — 2009. — V. 325, No. 5943. — P. 1001–1005.
335. Nusrat, A. Tight junctions are membrane microdomains / A. Nusrat, C.A. Parkos, P. Verkade *et al.* // *J. Cell Sci.* — 2000. — V. 113. — P. 1771–1781.
336. O'Connor, J.C. Induction of IDO by Bacille Calmette–Guerin is responsible

- for development of murine depressive-like behavior / J.C. O'Connor, A. Lawson, C. André *et al.* // *J. Immunol.* — 2009. — V. 182. — P. 3202–3212.
337. Oliphant, K. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health / K. Oliphant, E. Allen-Vercoe // *Microbiome.* — 2019. — V. 7. — P. 91.
338. Olzmann, J.A. Dynamics and functions of lipid droplets / J.A. Olzmann, P. Carvalho // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2019. — V. 20. — P. 137–155.
339. Orrenius, S. Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free / S. Orrenius, B. Zhivotovsky // *Nat. Chem. Biol.* — 2005. — V. 1. — P. 188–189.
340. Pabst, O. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific / O. Pabst, E. Slack // *Mucosal Immunol.* — 2020. — V. 13. — P. 12–21.
341. Pacheco, A.R. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization / A.R. Pacheco, M.M. Curtis, J.M. Ritchie *et al.* // *Nature.* — 2012. — V. 492. — P. 113–117.
342. Palla, A.H. Concise Commentary: An Imperfect 10-Unexpected Resolution of Spontaneous Colitis in Serially Endoscoped IL10-/- Mice / A.H. Palla // *Dig. Dis. Sci.* — 2023. — V. 68, No. 5. — P. 1863.
343. Paradies, G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics / G. Paradies, V. Paradies, V. De Benedictis *et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2014. — V. 1837. — P. 408–417.
344. Paramsothy, S. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial / S. Paramsothy, M.A. Kamm, N.O. Kaakoush *et al.* // *Lancet.* — 2017. — V. 389. — P. 1218–1228.
345. Paramsothy, S. Long-term outcomes of multidonor intensive faecal microbiota transplantation in ulcerative colitis: follow-up of a randomized controlled trial / S. Paramsothy, M.A. Kamm, N.O. Kaakoush *et al.* // *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* — 2025. — In press.
346. Park, J.W. Ceramide synthases: Reexamining longevity / J.W. Park, W.J. Park, A.H. Futerman // *Handb. Exp. Pharmacol.* — 2014. — V. 215. — P. 89–107.
347. Parkes, M. Evidence from genetics for a role of autophagy and innate immunity in IBD pathogenesis / M. Parkes // *Dig. Dis.* — 2012. — V. 30, No. 4. — P. 330–333.

348. Pearson, C.F. Update: Induction of Inflammatory Bowel Disease in Immunodeficient Mice by Injection of Naïve CD4+ T cells (T Cell Transfer Model of Colitis) / C.F. Pearson, K.J. Maloy // *Curr. Protoc.* — 2024. — V. 4, No. 7. — P. e1092.
349. Peddibhotla, S. High-Throughput Human Gut Immune Co-Culture Model for Evaluating Inflammatory Bowel Disease Anti-Inflammatory Therapies / S. Peddibhotla, L.A. Boone, E. Taylor *et al.* // *bioRxiv.* — 2025. — Preprint. — DOI: 10.1101/2025.05.14.654072.
350. Pelaseyed, T. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system / T. Pelaseyed, J.H. Bergström, J.K. Gustafsson *et al.* // *Immunol. Rev.* — 2014. — V. 260. — P. 8–20.
351. Peng, L. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers / L. Peng, Z.R. Li, R.S. Green *et al.* // *J. Nutr.* — 2009. — V. 139. — P. 1619–1625.
352. Peng, Q. In vivo systematic analysis of microbiota-prebiotic crosstalk reveals a synbiotic that effectively ameliorates DSS-induced colitis in mice / Q. Peng, L. Zhang, Y. Liu *et al.* // *Gut Microbes.* — 2025. — V. 17, No. 1. — P. 2457890.
353. Peña-Cearra, A. Akkermansia muciniphila-induced trained immune phenotype increases bacterial intracellular survival and attenuates inflammation / A. Peña-Cearra, J. Anguita, L. Castelo *et al.* // *Commun. Biol.* — 2024. — V. 7, No. 1. — P. 192.
354. Perkins, D.N. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data / D.N. Perkins, D.J. Pappin, D.M. Creasy, J.S. Cottrell // *Electrophoresis.* — 1999. — V. 20. — P. 3551–3567.
355. Peterson, L.W. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis / L.W. Peterson, D. Artis // *Nat. Rev. Immunol.* — 2014. — V. 14. — P. 141–153.
356. Pickard, J.M. Intestinal fucose as a mediator of host-microbe symbiosis / J.M. Pickard, A.V. Chervonsky // *J. Immunol.* — 2015. — V. 194. — P. 5588–5593.
357. Pindyurin, A.V. Inducible DamID systems for genomic mapping of chromatin proteins in *Drosophila* / A.V. Pindyurin *et al.* // *Nucleic Acids Research.* —

2016. — V. 44. — Art. no. e67.
358. Pollard, T.D. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments / T.D. Pollard, G.G. Borisy // *Cell*. — 2003. — V. 112. — P. 453–465.
359. Popova, J. Perspectives in Genome-Editing Techniques for Livestock / J. Popova *et al.* // *Animals*. — 2023. — V. 13. — P. 2580.
360. Postema, M.M. PACSIN2-dependent apical endocytosis regulates the morphology of epithelial microvilli / M.M. Postema, N.E. Grega-Larson, L.M. Meenderink, M.J. Tyska // *Mol. Biol. Cell*. — 2019. — V. 30. — P. 2515–2526.
361. Powrie, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology / F. Powrie, K.J. Maloy // *Nat. Immunol.* — 2003. — V. 4, No. 5. — P. 442–448.
362. Preidis, G.A. AGA clinical practice guideline on the role of probiotics in the management of gastrointestinal disorders / G.A. Preidis, S.V. Kane, B.J. Lacy *et al.* // *Gastroenterology*. — 2024. — V. 167, No. 3. — P. 518–536.
363. Puga, J.L. Bayesian networks / J.L. Puga, M. Krzywinski, N. Altman // *Nat. Methods*. — 2015. — V. 12, No. 9. — P. 799–800.
364. Puschhof, J. Intestinal organoid cocultures with microbes / J. Puschhof, C. Pleguezuelos-Manzano, A. Martinez-Silgado *et al.* // *Nat. Protoc.* — 2021. — V. 16, No. 10. — P. 4633–4649.
365. Puschhof, J. Organoids and organs-on-chips: Insights into human gut-microbe interactions / J. Puschhof, S.E. Pleguezuelos-Manzano, A. Martinez-Silgado *et al.* // *Cell Host Microbe*. — 2021. — V. 29, No. 6. — P. 867–878.
366. Saydakova, S. The Effect of Dietary Phospholipids on the Ultrastructure and Function of Intestinal Epithelial Cells / S. Saydakova *et al.* // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — V. 24. — P. 1788.
367. Qin, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin, R. Li, J. Raes *et al.* // *Nature*. — 2010. — V. 464. — P. 59–65.
368. Rajan, S. Actin Bundles Dynamics and Architecture / S. Rajan, D.S. Kudryashov, E. Reisler // *Biomolecules*. — 2023. — V. 13. — P. 450.
369. Randhawa, P.K. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents / P.K. Randhawa, K. Singh, N. Singh, A.S. Jaggi // *Korean J. Physiol. Pharmacol.* — 2014. — V. 18, No. 4. — P. 279–288.

370. Rausch, P. Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn's disease and FUT2 (Secretor) genotype / P. Rausch, S.J. Rehman, S. Künzel *et al.* // PNAS. — 2011. — V. 108. — P. 19030–19035.
371. Ray, R. Efficacy of Fecal Microbiota Transplantation (FMT) Versus Standard Antibiotic Therapy in Recurrent *Clostridioides difficile* (CDI/rCDI) Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis / R. Ray, S. Ahmed, A. Saha *et al.* // Cureus. — 2025. — V. 17, No. 8. — P. e90614.
372. Read, S. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation / S. Read, V. Malmström, F. Powrie // J. Exp. Med. — 2000. — V. 192, No. 2. — P. 295–302.
373. Ren, J. Intestinal organoids in inflammatory bowel disease: advances, applications, and future directions / J. Ren, S. Huang // Front. Cell Dev. Biol. — 2025. — V. 13. — P. 1517121.
374. Ren, M. Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity / M. Ren, C.K. Phoon, M. Schlame *et al.* // Cell Metab. — 2014. — V. 19. — P. 488–500.
375. Ridlon, J.M. Bile acids and the gut microbiome / J.M. Ridlon, D.J. Kang, P.B. Hylemon // Curr. Opin. Gastroenterol. — 2016. — V. 32. — P. 116–122.
376. Rieder, F. Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review / F. Rieder, E.M. Zimmer, C. Fiocchi *et al.* // Gut. — 2017. — V. 62. — P. 1072–1084.
377. Roager, H.M. Microbial tryptophan catabolites in health and disease / H.M. Roager, T.R. Licht // Nat. Commun. — 2018. — V. 9. — P. 3294.
378. Robles, A.I. Whole-exome sequencing analyses of inflammatory bowel disease-associated colorectal cancers / A.I. Robles, G. Traverso, M. Zhang *et al.* // Gastroenterology. — 2016. — V. 150, No. 4. — P. 931–943.
379. Roediger, W.E. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? / W.E. Roediger // Lancet. — 1980. — V. 2. — P. 712–715.
380. Roediger, W.E. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis / W.E. Roediger, A. Duncan, O. Kapaniris, S. Millard // Dig. Dis. Sci. — 1993. — V. 38. — P. 348–354.
381. Roediger, W.E. Sulphide impairment of substrate oxidation in rat colonocytes:

- a biochemical basis for ulcerative colitis? / W.E. Roediger, B. Moore, S.H. Babidge // *Clin. Sci.* — 1993. — V. 85. — P. 623–627.
382. Romano, K.A. Metabolic, epigenetic, and transgenerational effects of gut bacterial choline consumption / K.A. Romano, E. Martinez-Del Campo, B. Kasahara *et al.* // *Cell Host Microbe.* — 2017. — V. 22. — P. 279–290.
383. Rostami, K. Microscopic enteritis: Novel prospect in coeliac disease clinical and immuno-histogenesis. Evolution in diagnostic and treatment strategies / K. Rostami, V. Villanacci // *Dig. Liver Dis.* — 2009. — V. 41. — P. 245–252.
384. Rothhammer, V. The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Regulator of CNS Metabolism and Immunity / V. Rothhammer, F.J. Quintana // *Trends Immunol.* — 2019. — V. 40. — P. 499–513.
385. Round, J.L. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease / J.L. Round, S.K. Mazmanian // *Nat. Rev. Immunol.* — 2009. — V. 9, No. 5. — P. 313–323.
386. Round, J.L. Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota / J.L. Round, S.K. Mazmanian // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — V. 107. — P. 12204–12209.
387. Round, J.L. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota / J.L. Round, S.M. Lee, J. Li *et al.* // *Science.* — 2011. — V. 332. — P. 974–977.
388. Rubin, D.T. ACG Clinical Guideline: Ulcerative Colitis in Adults / D.T. Rubin, A.N. Ananthakrishnan, C.A. Siegel *et al.* // *Am. J. Gastroenterol.* — 2019. — V. 114, No. 3. — P. 384–413.
389. Saffarian, A. Crypt- and mucosa-associated core microbiotas in humans and their alteration in colon cancer patients / A. Saffarian, J.P. Mulet, M. Beguet-Crespel *et al.* // *MBio.* — 2019. — V. 10. — P. e01315-19.
390. Sakata, A. Acid sphingomyelinase inhibition suppresses lipopolysaccharide-mediated release of inflammatory cytokines from macrophages and protects against disease pathology in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice / A. Sakata, T. Ochiai, H. Shimeno *et al.* // *Immunology.* — 2007. — V. 122. — P. 54–64.
391. Salas, A. JAK–STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease / A. Salas, C. Hernandez-Rocha, M. Duijvestein *et al.* // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2020. — V. 17. — P. 323–337.

392. Sampson, T.R. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome / T.R. Sampson, S.K. Mazmanian // *Cell Host Microbe*. — 2015. — V. 17. — P. 565–576.
393. Sampson, T.R. The microbiome, metagenomics, and metabolic diseases / T.R. Sampson, S.K. Mazmanian // *Cell Host Microbe*. — 2015. — V. 17. — P. 569–576.
394. Sansonetti, P.J. Mitochondria, at the crossroad of danger signaling / P.J. Sansonetti // *Immunol. Cell Biol.* — 2006. — V. 84. — P. 325–326.
395. Saruta, M. Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease / M. Saruta, Q. Yu, A.V. Weersma *et al.* // *J. Immunol.* — 2007. — V. 178. — P. 3293–3300.
396. Sato, T. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche / T. Sato, R.G. Vries, H.J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D.E. Stange, J.H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P.J. Peters, H. Clevers // *Nature*. — 2009. — V. 459. — P. 262–265.
397. Schmitt, E. Th9 cells, new players in adaptive immunity / E. Schmitt, M. Klein, T. Bopp // *Trends Immunol.* — 2014. — V. 35, No. 2. — P. 61–68.
398. Schoultz, M. Assessment of causal link between psychological factors and symptom exacerbation in inflammatory bowel disease: a systematic review utilising Bradford Hill criteria and meta-analysis of prospective cohort studies / M. Schoultz, M. Beattie, T. Gorely, J. Leung // *Syst. Rev.* — 2020. — V. 9. — Art. № 169.
399. Schroeder, K.W. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis / K.W. Schroeder, W.J. Tremaine, D.M. Ilstrup // *N. Engl. J. Med.* — 1987. — V. 317. — P. 1625–1629.
400. Schwarcz, R. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology / R. Schwarcz, J.P. Bruno, P.J. Muchowski, H.Q. Wu // *Nat. Rev. Neurosci.* — 2012. — V. 13, No. 7. — P. 465–477.
401. Schwiebs, A. Nuclear Translocation of SGPP-1 and Decrease of SGPL-1 Activity Contribute to Sphingolipid Rheostat Regulation of Inflammatory Dendritic Cells / A. Schwiebs, M. Herrero San Juan, K.G. Schmidt *et al.* // *Mediators Inflamm.* — 2017. — V. 2017. — P. 5187368.
402. Sears, C.L. A dynamic partnership: the microbial community and the host defense / C.L. Sears // *Cell Host Microbe*. — 2009. — V. 6. — P. 3–4.

403. Seebach, J. The tight junction protein remodeling during inflammation / J. Seebach, H. Wegener, A.C. Luetzig *et al.* // *Mediators Inflamm.* — 2015. — V. 2015. — P. 461947.
404. Seebach, J. Cholesterol-enriched lipid rafts are required for the c-Src-mediated phosphorylation of Occludin and the maintenance of endothelial barrier function / J. Seebach, H. Donnert, R. Blasig *et al.* // *Mediators Inflamm.* — 2015. — V. 2015. — P. 593013.
405. Segal, J.P. Ulcerative colitis: an update / J.P. Segal, J.-F. LeBlanc, A.L. Hart // *Clin. Med. (Lond).* — 2021. — V. 21. — P. 135–139.
406. Selinger, C.P. Inflammatory bowel disease and anxiety: Links, risks, and challenges faced / C.P. Selinger, A. Bannaga // *Clin. Exp. Gastroenterol.* — 2015. — V. 8. — P. 111–117.
407. Sen, A. Comprehensive gene expression analysis of organoid-derived healthy human colonic epithelium and cancer cell line stimulated with live probiotic bacteria / A. Sen, T. Ota, M. Kobayashi *et al.* // *Sci. Rep.* — 2025. — V. 15, No. 1. — P. 22325.
408. Sengupta, N. The Role of Matrix Metalloproteinases in Stromal/Epithelial Interactions in the Gut / N. Sengupta, T.T. Macdonald // *Physiology.* — 2007. — V. 22. — P. 401–409.
409. Seregin, S.S. NLRP6 Protects Il10<sup>-/-</sup> Mice from Colitis by Limiting Colonization of *Akkermansia muciniphila* / S.S. Seregin, N. Golovchenko, B. Schaf *et al.* // *Cell Rep.* — 2017. — V. 19. — P. 733–745.
410. Sharon, G. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice / G. Sharon, N.J. Cruz, D.W. Kang *et al.* // *Cell.* — 2019. — V. 177. — P. 1600–1618.
411. Shen, L. Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis / L. Shen, J.R. Turner // *Mol. Biol. Cell.* — 2005. — V. 16. — P. 3919–3936.
412. Shen, L. Regulation of the epithelial tight junction barrier by membrane microdomains / L. Shen, C.R. Weber, J.R. Turner // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2012. — V. 1258. — P. 9–14.
413. Shi, J. Cytokines and Abnormal Glucose and Lipid Metabolism / J. Shi, J. Fan, Q. Su, Z. Yang // *Front. Endocrinol.* — 2019. — V. 10. — P. 703.
414. Shigetomi, K. Adherens junctions influence tight junction formation via

- changes in membrane lipid composition / K. Shigetomi, Y. Ono, T. Inai, J. Ikenouchi // *J. Cell Biol.* — 2018. — V. 217. — P. 2373–2381.
415. Sifroni, K.G. Mitochondrial respiratory chain in the colonic mucosal of patients with ulcerative colitis / K.G. Sifroni, F.H. Damiani, C. Stoffel *et al.* // *Mol. Cell. Biochem.* — 2010. — V. 342, No. 1-2. — P. 111–115.
416. Silva, I. Preclinical Study in Vivo for New Pharmacological Approaches in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of Chronic Model of TNBS-Induced Colitis / I. Silva, R. Pinto, V. Mateus // *J. Clin. Med.* — 2019. — V. 8, No. 10. — P. 1574.
417. Simons, K. Lipid rafts and signal transduction / K. Simons, D. Toomre // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2000. — V. 1. — P. 31–39.
418. Simopoulos, A.P. Omega-6 and omega-3 fatty acids: Endocannabinoids, genetics and obesity / A.P. Simopoulos // *OCL.* — 2020. — V. 27. — P. 7.
419. Singh, N. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis / N. Singh, A. Gurav, S. Sivaprakasam *et al.* // *Immunity.* — 2014. — V. 40. — P. 128–139.
420. Siskind, L.J. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis / L.J. Siskind // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2005. — V. 37, No. 3. — P. 143–153.
421. Smythies, L.E. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity / L.E. Smythies, M. Sellers, R.H. Clements *et al.* // *J. Clin. Invest.* — 2005. — V. 115. — P. 66–75.
422. Sokol, H. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients / H. Sokol, B. Pigneur, L. Watterlot *et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — V. 105. — P. 16731–16736.
423. Sokol, H. Fungal microbiota dysbiosis in IBD / H. Sokol, V. Leducq, H. Aschard *et al.* // *Gut.* — 2017. — V. 66. — P. 1039–1048.
424. Sonnenburg, J.L. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont / J.L. Sonnenburg, J. Xu, D.D. Leip *et al.* // *Science.* — 2005. — V. 307. — P. 1955–1959.
425. Spiegel, S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity / S. Spiegel, S. Milstien // *Nat. Rev. Immunol.* — 2011. — V. 11, No. 6. — P.

- 403–415.
426. Srinivasan, B. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems / B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch *et al.* // *J. Lab. Autom.* — 2015. — V. 20, No. 2. — P. 107–126.
427. Steinbach, E.C. Induction of murine intestinal inflammation by adoptive transfer of effector CD4<sup>+</sup> T cells / E.C. Steinbach, B.A. Plevy, S.E. Plevy // *J. Vis. Exp.* — 2015. — No. 103. — P. e52966.
428. Strandwitz, P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota / P. Strandwitz // *Brain Res.* — 2018. — V. 1693. — P. 128–133.
429. Stremmel, W. Retarded release phosphatidylcholine benefits patients with chronic active ulcerative colitis / W. Stremmel, U. Merle, A. Zahn *et al.* // *Gut.* — 2005. — V. 54. — P. 966–971.
430. Stremmel, W. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine / W. Stremmel, I. Treede, A. Braun *et al.* // *J. Biol. Chem.* — 2007. — V. 282. — P. 27155–27164.
431. Stremmel, W. Phosphatidylcholine for Steroid-Refractory Chronic Ulcerative Colitis / W. Stremmel, R. Ehehalt, F. Autschbach, M. Karner // *Ann. Intern. Med.* — 2007. — V. 147. — P. 603–610.
432. Stremmel, W. Lysophosphatidylcholine amplifies mucosal inflammation in ulcerative colitis / W. Stremmel, M. Vural, R. Ehehalt, G. Stremmel // *Inflamm. Intest. Dis.* — 2017. — V. 2, No. 1. — P. 53–61.
433. Stremmel, W. Delayed-Release Phosphatidylcholine Is Effective for Treatment of Ulcerative Colitis: A Meta-Analysis / W. Stremmel, H. Vural, O. Evliyaoglu, R. Weiskirchen // *Dig. Dis.* — 2021. — V. 39, No. 5. — P. 508–515.
434. Sugihara, H.Y. Intestinal organoids: The path towards clinical application / H.Y. Sugihara, R. Okamoto // *Eur. J. Cell Biol.* — 2025. — V. 104, No. 1. — P. 151474.
435. Suh, J.H. Sphingosine-1-phosphate in inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer: the fat's in the fire / J.H. Suh, J.D. Saba // *Transl. Cancer Res.* — 2015. — V. 4. — P. 469–483.
436. Sukocheva, O.A. Sphingolipids as mediators of inflammation and novel therapeutic target in inflammatory bowel disease / O.A. Sukocheva, E. Furuya, M.L. Ng *et al.* // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* — 2020. — V. 120. — P. 123–158.

437. Sun, C.M. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid / C.M. Sun, J.A. Hall, R.B. Blank *et al.* // *J. Exp. Med.* — 2007. — V. 204. — P. 1775–1785.
438. Suzuki, H. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions / H. Suzuki, T. Nishizawa, K. Tani *et al.* // *Science.* — 2014. — V. 344. — P. 304–307.
439. Szabo, C. Roles of hydrogen sulfide in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications / C. Szabo // *Antioxid. Redox Signal.* — 2012. — V. 17. — P. 68–80.
440. Szeto, H.H. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics / H.H. Szeto // *Br. J. Pharmacol.* — 2014. — V. 171. — P. 2029–2050.
441. Takeichi, M. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling / M. Takeichi // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2014. — V. 15. — P. 397–410.
442. Thaïss, C.A. The microbiome and innate immunity / C.A. Thaïss, N. Zmora, M. Levy, E. Elinav // *Nature.* — 2016. — V. 535. — P. 65–74.
443. Thallmair, M. A scoping review on reporting of methods in DSS colitis mouse models / M. Thallmair, S. Reichardt, H. Renz // *Lab. Anim.* — 2025. — V. 59, No. 5. — P. 541–555.
444. Thomas, H. IBD: Probiotics for IBD: A need for histamine? / H. Thomas // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2016. — V. 13. — P. 62.
445. Tjalsma, H. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects / H. Tjalsma, A. Boleij, J.R. Marchesi, B.E. Dutilh // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2012. — V. 10, No. 8. — P. 575–582.
446. Trebble, T.M. Essential fatty acid status in paediatric Crohn's disease: relationship with disease activity and nutritional status / T.M. Trebble, S. Wootton, A. May *et al.* // *Aliment. Pharmacol. Ther.* — 2003. — V. 18. — P. 433–442.
447. Trifari, S. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells / S. Trifari, C.D. Kaplan, E.H. Tran, N.K. Crellin, H. Spits // *Nat. Immunol.* — 2009. — V. 10. — P. 864–871.
448. Trivedi, P.J. The gut-liver axis in primary sclerosing cholangitis / P.J. Trivedi,

- D.H. Adams // Clin. Liver Dis. — 2018. — V. 22, No. 3. — P. 553–569.
449. Turner, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease / J.R. Turner // Nat. Rev. Immunol. — 2009. — V. 9. — P. 799–809.
450. Tursi, A. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study / A. Tursi, G. Brandimarte, A. Papa *et al.* // Am. J. Gastroenterol. — 2010. — V. 105. — P. 2218–2227.
451. Tyurina, Y.Y. A mitochondrial pathway for biosynthesis of lipid mediators of inflammation / Y.Y. Tyurina, S.M. Polimova, A.A. Macphee *et al.* // J. Lipid Res. — 2014. — V. 55. — P. 922–933.
452. Ueda, N. A Rheostat of Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate as a Determinant of Oxidative Stress-Mediated Kidney Injury / N. Ueda // Int. J. Mol. Sci. — 2022. — V. 23, No. 7. — P. 4010.
453. Upadhyay, K.G. Evaluating the role of kynurenine/tryptophan ratio as an indicator of disease activity in Indian patients with inflammatory bowel disease. A case-control study / K.G. Upadhyay, S. Mishra, V. Pratap Mouli *et al.* // Scand. J. Gastroenterol. — 2025. — V. 60, No. 5. — P. 454–462.
454. Vaishnava, S. The antibacterial lectin RegIII $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine / S. Vaishnava, M. Yamamoto, K.M. Severson *et al.* // Science. — 2011. — V. 334. — P. 255–258.
455. Van der Sluis, M. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection / M. Van der Sluis, B. S. B. Bergstrom, J. K. Madsen *et al.* // Gastroenterology. — 2006. — V. 131. — P. 117–129.
456. Vance, J.E. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells / J.E. Vance // Traffic. — 2015. — V. 16. — P. 1–18.
457. Velcich, A. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2 / A. Velcich, W. Yang, J. Heyer *et al.* // Science. — 2002. — V. 295. — P. 1726–1729.
458. Venkataranganna, M.V. NCB-02 (standardized Curcumin preparation) protects dinitrochlorobenzene- induced colitis through down-regulation of NFkappa-B and iNOS / M.V. Venkataranganna, M. Rafiq, S. Gopumadhavan *et al.* // World J. Gastroenterol. — 2007. — V. 13, No. 7. — P. 1103–1107.

459. Ventura, I. Therapeutic and Immunologic Effects of Short-Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review / I. Ventura, C. Russo, M. Ferraris *et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* — 2024. — V. 25, No. 20. — P. 10879.
460. Vieira, E.L. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis / E.L. Vieira, A.J. Leonel, A.P. Sad *et al.* // *J. Nutr. Biochem.* — 2012. — V. 23. — P. 430–436.
461. Vieujean, S. Understanding the therapeutic toolkit for inflammatory bowel disease / S. Vieujean, V. Jairath, L. Peyrin-Biroulet, M. Dubinsky, M. Iacucci, F. Magro, S. Danese // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2025. — V. 22. — P. 371–394.
462. Vignali, D.A. How regulatory T cells work / D.A. Vignali, L.W. Collison, C.J. Workman // *Nat. Rev. Immunol.* — 2008. — V. 8. — P. 523–532.
463. Vuong, H.E. The microbiome and host behavior / H.E. Vuong, J.M. Yano, T.C. Fung, E.Y. Hsiao // *Annu. Rev. Neurosci.* — 2017. — V. 40. — P. 21–49.
464. Wade, H. Akkermansia muciniphila and its membrane protein ameliorate intestinal inflammatory stress and promote epithelial wound healing via CREBH and miR-143/145 / H. Wade, K. Pan, W. Duan *et al.* // *J. Biomed. Sci.* — 2023. — V. 30, No. 1. — P. 38.
465. Wallace, J.L. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique signaling system / J.L. Wallace, M.R. Hellmich, A.G. Buret // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2018. — V. 58. — P. 471–496.
466. Wallace, J.L. Hydrogen sulfide: an endogenous mediator of resolution of inflammation and injury / J.L. Wallace, R. Wang // *Antioxid. Redox Signal.* — 2018. — V. 28. — P. 1463–1467.
467. Wang, B. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease / B. Wang, P. Tontonoz // *Annu. Rev. Physiol.* — 2019. — V. 81. — P. 165–188.
468. Wang, B. Stable colonization of Akkermansia muciniphila educates host intestinal microecology and immunity to battle against inflammatory intestinal diseases / B. Wang, L. Kong, H. Li *et al.* // *Exp. Mol. Med.* — 2023. — V. 55, No. 1. — P. 55–68.
469. Wang, G. Ceramide-induced apoptosis and its signaling pathway / G. Wang, C.A. Silva, J. Wu // *Curr. Mol. Med.* — 2005. — V. 5, No. 5. — P. 513–522.
470. Wang, L. iPSC-induced multilineage liver organoids, small intestinal organoids and brain organoids sustain pangenotype hepatitis E virus propagation / L.

- Wang, W. Huang, D. Wu *et al.* // *Gut*. — 2025. — Online ahead of print. — DOI: 10.1136/gutjnl-2025-336105.
471. Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? / R. Wang // *FASEB J.* — 2002. — V. 16. — P. 1792–1798.
472. Wang, T. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers / T. Wang, G. Cai, Y. Qiu *et al.* // *ISME J.* — 2012. — V. 6, No. 2. — P. 320–329.
473. Wang, Y. Microbial dysbiosis index for assessing colitis status in mouse models: A systematic review and meta-analysis / Y. Wang, L. Zhang, H. Chen *et al.* // *iScience*. — 2024. — V. 27, No. 1. — P. 108657.
474. Wang, Y. 2'-Fucosyllactose affects brain development of humanized-microbiome weanling mice through gut-brain axis / Y. Wang, L. Zhang, H. Chen *et al.* // *Gut Microbes*. — 2025. — V. 17, No. 1. — P. 2458965.
475. Wang, Y. Using gnotobiotic mice to decipher effects of gut microbiome repair in undernourished children on tuft and goblet cell function / Y. Wang, H.W. Chang, J. Cheng *et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2025. — V. 122, No. 48. — P. e2523178122.
476. Wehkamp, J. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression / J. Wehkamp, J. Harder, K. Weichenthal *et al.* // *Gut*. — 2004. — V. 53. — P. 1658–1664.
477. Welz, L. A metabolic constraint in the kynurenine pathway drives mucosal inflammation in IBD / L. Welz, D. Kovtonyuk, A. Krämer *et al.* // *medRxiv*. — 2024. — Preprint. — DOI: 10.1101/2024.08.08.24311598.
478. Wenzel, U.A. Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis / U.A. Wenzel, M.K. Magnusson, A. Rydström *et al.* // *PLoS One*. — 2014. — V. 9, No. 6. — P. e100217.
479. Wenzel, U.A. CD103+ CD11b+ Dendritic Cells Induce Th17 T Cells in Muc2-Deficient Mice with Extensively Spread Colitis / U.A. Wenzel, A. Rydström, M.K. Magnusson *et al.* // *PLoS One*. — 2015. — V. 10, No. 6. — P. e0130750.
480. Wertheimer, E. Rac1 takes center stage in pancreatic cancer and ulcerative colitis: Quantity matters / E. Wertheimer, M.G. Kazanietz //

- Gastroenterology. — 2011. — V. 141. — P. 427–430.
481. Widjaja-Adhi, M.A.K. Transcription factor ISX mediates the cross talk between diet and immunity / M.A.K. Widjaja-Adhi, G. Palczewski, K. Dale *et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2017. — V. 114. — P. 11530–11535.
482. Winter, S.E. Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut / S.E. Winter, M.G. Winter, M.N. Xavier *et al.* // Science. — 2013. — V. 339. — P. 708–711.
483. Wolf, A.J. Hexokinase is an innate immune receptor for the detection of bacterial peptidoglycan / A.J. Wolf, C.N. Reyes, W. Liang *et al.* // Cell. — 2016. — V. 166. — P. 624–636.
484. Wong, S.H. Gavage of fecal samples from patients with colorectal cancer promotes intestinal carcinogenesis in Germ-Free and conventional mice / S.H. Wong, L. Zhao, X. Zhang *et al.* // Gastroenterology. — 2017. — V. 153. — P. 1621–1633.
485. Wong, S.H. Gut microbiota in colorectal cancer: Mechanisms of action and clinical applications / S.H. Wong, J. Yu // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. — 2019. — V. 16. — P. 690–704.
486. Wu, G. Functional amino acids in nutrition and health / G. Wu // Amino Acids. — 2013. — V. 45. — P. 407–411.
487. Wu, N. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients / N. Wu, X. Yang, R. Zhang *et al.* // Microb. Ecol. — 2013. — V. 66, No. 2. — P. 462–470.
488. Wu, X. *Bacteroides vulgatus* alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis and depression-like behaviour by facilitating gut-brain axis balance / X. Wu, L. Peng, Y. Li *et al.* // Front. Microbiol. — 2023. — V. 14. — P. 1287271.
489. Wu, Y. Galactooligosaccharides and *Limosilactobacillus reuteri* synergistically alleviate gut inflammation and barrier dysfunction by enriching *Bacteroides acidifaciens* for Pentadecanoic acid biosynthesis / Y. Wu, X. Zhang, S. Liu *et al.* // Nat. Commun. — 2024. — V. 15, No. 1. — P. 9291.
490. Wu, Z. LRP11-AS1 mediates enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-related carcinogenesis in colorectal Cancer via the miR-149-3p/CDK4 pathway / Z. Wu, Y. Wang, X. Li *et al.* // Cancer Gene Ther. — 2024. — V. 31, No. 12. — P. 1823–1835.
491. Xavier, R.J. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease /

- R.J. Xavier, D.K. Podolsky // *Nature*. — 2007. — V. 448. — P. 427–434.
492. Xi, M. Development of hydroxy-based sphingosine kinase inhibitors and anti-inflammation in dextran sodium sulfate induced colitis in mice / M. Xi, J. Ge, X. Wang *et al.* // *Bioorg. Med. Chem.* — 2016. — V. 24, No. 14. — P. 3218–3230.
493. Xiang, X. Protective Effects of Shrimp Peptide on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice / X. Xiang, Q. Jiang, W. Shao *et al.* // *Front. Nutr.* — 2021. — V. 8. — P. 773064.
494. Yan, J. The *Escherichia coli* strain 301Y6A-8 as a potential pathogen induces colitis in germ-free mice through immune activation and gut barrier disruption / J. Yan, Y. Yang, R. Ren, Z. Li, L. Peng // *Gut*. — 2025. — V. 74, Suppl. 3. — P. A131.
495. Yang, C. Unveiling Colitis: A Journey through the Dextran Sodium Sulfate-induced Model / C. Yang, D. Merlin // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2024. — V. 30, No. 5. — P. 844–853.
496. Yang, Q. A high cholesterol diet aggravates experimental colitis through SREBP2-modulated endocytosis and degradation of occludin and Zo-1 proteins / Q. Yang, Y. Li, X. Wang *et al.* // *FEBS J.* — 2025. — V. 292, No. 5. — P. 1052–1069.
497. Yang, S. Surface expression of antitoxin on engineered bacteria neutralizes genotoxic colibactin in the gut / S. Yang, Z. Wang, C. Fang *et al.* // *Nat. Microbiol.* — 2026. — V. 11, No. 1. — P. 112–125.
498. Yang, W. Gut microbiota and blood biomarkers in IBD-Related arthritis: insights from mendelian randomization / W. Yang, M. Cui, P. Yang *et al.* // *Sci. Rep.* — 2025. — V. 15. — P. 514.
499. Yang, Y. Phospholipid subcellular localization and dynamics / Y. Yang, M. Lee, G.D. Fairn // *J. Biol. Chem.* — 2018. — V. 293. — P. 6230–6240.
500. Yokota, H. NOX1/NADPH Oxidase Expressed in Colonic Macrophages Contributes to the Pathogenesis of Colonic Inflammation in Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Murine Colitis / H. Yokota, A. Tsuzuki, Y. Shimada *et al.* // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2017. — V. 360, No. 1. — P. 192–200.
501. Young, S.N. The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels / S.N. Young, M. Leyton // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 2002. — V. 71. — P. 857–865.

502. Yu, A.I. Gut microbiota modulate CD8 T cell responses to influence colitis-associated tumorigenesis / A.I. Yu, L. Zhao, K.A. Eaton *et al.* // Cell Rep. — 2020. — V. 31. — P. 107471.
503. Zamani, B. The effect of Annexin A5 overexpression on invasiveness and expression of the genes involved in epithelial-mesenchymal transition of HCT 116 cell line / B. Zamani, A. Ramazani, J. Saberzadeh, P. Rostampour, M.A. Takhshid // Mol. Biol. Res. Commun. — 2023. — V. 12. — P. 77–86.
504. Zeisel, S. Choline, Other Methyl-Donors and Epigenetics / S. Zeisel // Nutrients. — 2017. — V. 9. — P. 445.
505. Zelante, T. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22 / T. Zelante, R.G. Iannitti, C. Cunha *et al.* // Immunity. — 2013. — V. 39. — P. 372–385.
506. Zhang, L. Cross-species engraftment biases and metabolic divergence in gnotobiotic mice humanized with ulcerative colitis microbiota / L. Zhang, H. Wang, X. Li *et al.* // Gut Microbes. — 2025. — V. 17, No. 1. — P. 2456789.
507. Zhang, X. Phosphatidylserine externalized on the colonic capillaries as a novel pharmacological target for IBD therapy / X. Zhang, L. Song, L. Li *et al.* // Signal Transduct. Target. Ther. — 2021. — V. 6. — P. 235.
508. Zhao, Q. Insights into Modeling Inflammatory Bowel Disease from Stem Cell Derived Intestinal Organoids / Q. Zhao, Y. Zhang, L. Wang *et al.* // Stem Cell Rev. Rep. — 2025. — V. 21, No. 5. — P. 1351–1368.
509. Zhao, S. Deficiency in class III PI3-kinase confers postnatal lethality with IBD-like features in zebrafish / S. Zhao, J. Xia, X. Wu *et al.* // Nat. Commun. — 2018. — V. 9. — P. 2639.
510. Zheng, D. Interaction between microbiota and immunity in health and disease / D. Zheng, T. Liwinski, E. Elinav // Cell Res. — 2020. — V. 30. — P. 492–506.
511. Zheng, Y. *Bacteroides acidifaciens* and its derived extracellular vesicles improve DSS-induced colitis / Y. Zheng, J. Wang, T. Zhou *et al.* // Front. Microbiol. — 2023. — V. 14. — P. 1304232.
512. Zhou, Z. Stromal Cell Subsets Show Model-Dependent Changes in Experimental Colitis and Affect Epithelial Tissue Repair and Immune Cell Activation / Z. Zhou, J. Su, B.W. van Os *et al.* // Inflamm. Bowel Dis. — 2025. — V. 31, No. 4. — P. 1051–1066.
513. Zhuang, X. Systematic Review and Meta-analysis: Short-Chain Fatty Acid

- Characterization in Patients With Inflammatory Bowel Disease / X. Zhuang, T. Li, M. Li *et al.* // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2019. — V. 25, No. 11. — P. 1751–1763.
514. Zihni, C. Tight junction-cytoskeleton interactions: functions during homeostasis and epithelial transformation / C. Zihni, C. Mills, K. Matter *et al.* // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2016. — V. 8. — P. a029330.
515. Zmora, N. Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features / N. Zmora, G. Zilberman-Schapira, J. Suez *et al.* // *Cell.* — 2019. — V. 174. — P. 1388–1405.
516. Zolotykh, M.A. The effect of social experience on olfactory preference in male mice / M.A. Zolotykh *et al.* // *Applied Animal Behaviour Science.* — 2017. — V. 189. — P. 85–90.