

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-441>



Влияние *Bacillus subtilis* BS20 на физиологические и иммунные показатели мышей мутантной линии *Muc2*^{-/-}

Морозова М.В.^{1✉}, Коркина В.И.², Макарова М.А.³, Литвинова Е.А.⁴

¹Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия;

²Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий, пос. Краснообск, Россия;

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

⁴Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

Аннотация

Введение. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) — распространённая патология, которая не поддаётся полному излечению и требует пожизненной терапии. Использование пробиотиков рассматривают как один из перспективных и щадящих терапевтических подходов лечения ВЗК. В отличие от *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, представляющих основу большинства классических пробиотиков, спорообразующие *Bacillus* spp. лучше сохраняют жизнеспособность в условиях желудочно-кишечного тракта и выживаемость в период хранения пищевых продуктов, могут быть модуляторами иммунитета.

Цель работы — изучить влияние спор бактерий *B. subtilis* BS20 на физиологические и иммунные показатели мышей мутантной линии *Muc2*^{-/-}.

Материалы и методы. Самкам мышей *Muc2*^{-/-} на протяжении 2 мес добавляли в корм споры *B. subtilis* BS20 в количестве 10⁹ КОЕ. Анализ аминокислотного состава ткани бедренной мышцы выполняли методом капиллярного электрофореза. Концентрацию цитокинов в ткани толстой кишки изучали в мультиплексном анализе. Долю иммунных клеток в спленоцитах определяли методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Добавление в корм спор *B. subtilis* BS20 способствовало увеличению продолжительности жизни и снижению потери массы тела у мышей-самок *Muc2*^{-/-}. В биоптатах нисходящей ободочной кишки выявлено снижение уровня провоспалительного цитокина интерлейкина-6 и повышение уровня интерлейкина-17, в спленоцитах — увеличение количества В-клеток и Т-хелперов.

Заключение. *B. subtilis* BS20 улучшает общее состояние мышей мутантной линии *Muc2*^{-/-}, оказывает противовоспалительное и иммуностимулирующее действие, снижая уровень цитокина интерлейкина-6 и повышая процент В-клеток и Т-хелперов в селезёнке.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, мыши *Muc2*^{-/-}, *Bacillus subtilis* BS20, пробиотики, провоспалительные цитокины

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен комитетом Научно-исследовательского института нейронаук и медицины по биоэтике (протокол № 3 от 19.05.2022).

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке за счёт средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований № 122042700001-9. Анализ цитокинов и иммунных клеток был поддержан грантом РФФИ № 20-64-47020.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Морозова М.В., Коркина В.И., Макарова М.А., Литвинова Е.А. Влияние *Bacillus subtilis* BS20 на физиологические и иммунные показатели мышей мутантной линии *Muc2*^{-/-}. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(2):208–216.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-441>

EDN: <https://www.elibrary.ru/nhqzqi>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-441>

Effect of the *Bacillus subtilis* BS20 on physiological and immune parameters in mutant mice *Muc2*^{-/-}

Maryana V. Morozova^{1✉}, Valentina I. Korkina², Mariia A. Makarova³, Ekaterina A. Litvinova⁴

¹Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia;

²Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies, Krasnoobsk, Russia;

³Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

⁴Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia

Abstract

Introduction. Inflammatory bowel disease (IBD) is a common pathology that cannot be completely cured and requires lifelong therapy. One of the promising and sparing therapeutic strategies is the use of probiotics. Unlike *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which represent the basis of most classical probiotics, *Bacillus* spp. are spore-forming bacteria that contributes to their resistance to the acidic environment of the stomach. It has been shown that the bacteria *Bacillus* spp. is an effective therapeutic drug for the relief of intestinal diseases with signs of inflammation and bacterial origin. Since the main factors causing IBD are dysbiosis and inflammation, and strains of *Bacillus* spp. as probiotics can be potential modulators of immunity and influence the intestinal microbiome, it is necessary to search for new strains of probiotic bacteria, including representatives of *Bacillus* spp., which have an effect on immunity and physiological indicators in experimental models of IBD.

The aim of the scientific research — to study the effect of *Bacillus subtilis* BS20 spores on the physiological and immune parameters of the mutant mouse line *Muc2*^{-/-}.

Research objectives: Investigate survival of *Muc2*^{-/-} mice, weight, immune parameters (cytokines and immune cells) and amino acid composition of muscles.

Materials and methods. *Muc2*^{-/-} females were fed spores of *Bacillus subtilis* BS20 in the amount of 10⁹ CFU for 2 months. Analysis of the amino acid composition of the femoral muscle was performed by capillary electrophoresis. The concentration of cytokines in the supernatant was measured using the Magnetic Luminex assay kit. Determination of the number of lymphocytes was performed by flow cytometry.

Results. The addition of *Bacillus subtilis* BS20 to the diet of mice reduced mortality and body weight loss in *Muc2*^{-/-} females. We found a decrease in interleukin-6 and an increase in interleukin-17 in the descending colon and an increase in B and T helper lymphocytes in the spleen.

Conclusion. *B. subtilis* BS20 improves the general condition of *Muc2*^{-/-} mutant mice, has an anti-inflammatory and immunostimulating effect, reducing the level of the cytokine interleukin-6 and increasing the percentage of B cells and T helper cells in the spleen.

Keywords: inflammatory bowel disease, mice *Muc2*^{-/-}, *Bacillus subtilis* BS20, probiotics, pro-inflammatory cytokines

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Bioethics Committee of the Research Institute of Neurosciences and Medicine (protocol No. 3, May 19, 2022).

Funding source. The work was supported by federal budget funds for fundamental scientific research No. 122042700001-9. Analysis of cytokines and immune cells was supported by RSF grant No. 20-64-47020

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Morozova M.V., Korkina V.I., Makarova M.A., Litvinova E.A. Effect of the *Bacillus subtilis* BS20 on physiological and immune parameters in mutant mice *Muc2*^{-/-}. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(2):208–216.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-441>

EDN: <https://www.elibrary.ru/nhqzzi>

Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) в настоящее время широко распространены, их ареал и число заболевших имеют тенденцию к росту. Если ранее ВЗК считались болезнью с наибольшей распространённостью в США и Европе, то в последнее десятилетие рост заболеваемости отмечен в странах Азии, включая Китай и Индию [1]. К ВЗК относят язвенный колит и болезнь Крона, для которых характерны хроническое воспаление и повреждение слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). К причинам возникновения ВЗК относят генетическую предрасположенность, диету, экологию, курение, иммунный статус, кишеч-

ные инфекции бактериальной этиологии [2]. Эффективного лечения ВЗК, приводящего к полному излечению [3], не разработано, а существующие терапевтические подходы имеют побочные эффекты. Поскольку для купирования воспалительного процесса требуется длительный и неоднократный приём антибиотиков, то для снижения количества нежелательных последствий важно использовать поддерживающую терапию. Одним из терапевтических направлений является использование пробиотиков, пребиотиков, симбиотиков и метаболитов бактерий. Поиск препаратов для поддерживающей терапии ВЗК ведут среди классических пробиотических штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [4–7].

В то же время спорообразующие *Bacillus* spp. могут иметь преимущество, поскольку более устойчивы к кислой среде желудка и, являясь аллохтонными, легко элиминируются из организма после прекращения применения [8]. Пробиотики на основе штаммов *Bacillus* spp. эффективны при лечении ВЗК инфекционной и неинфекционной этиологии [9–13].

Мыши мутантной линии *Muc2*^{-/-} имеют делецию гена *Muc2*, кодирующего протеогликан MUC2 (у мышей *Muc2*) — основной секреторный муцин бокаловидных клеток толстой кишки млекопитающих [2]. Белок *Muc2* создаёт слизистый барьер, который защищает эпителиальный слой кишечника от бактерий. Недостаточность слизистого слоя способствует прямому контакту бактерий с энтероцитами, что приводит к их воспалению. Нарушение синтеза *Muc2* в толстой кишке усиливает пролиферацию и уменьшает дифференцировку клеток, вызывает уплощение и изъязвление слоя эпителиальных клеток с потерей их архитектуры, что приводит к удлинению крипт, увеличению количества лейкоцитов и повышению проницаемости стенки кишки («синдром дырявого кишечника»). Данное патологическое состояние способствует развитию спонтанного колита, а впоследствии — колоректального рака [2]. Уменьшение синтеза *Muc2* в кишечнике может приводить к изменению бактериального состава микробиоты [14]. Мыши *Muc2*^{-/-} — это экспериментальная модель ВЗК, у которых на ранних этапах онтогенеза развиваются воспаление, диарея, пролапс кишки и гемоколит, снижается масса тела. В результате этого мыши склонны к гибели в более раннем возрасте, чем мыши с нормальной барьерной функцией кишки [15].

B. subtilis может повышать экспрессию протеогликана (MUC2), белков плотных контактов, оклюдина и противовоспалительных факторов, в результате чего сокращается потеря массы, сохраняется длина толстой кишки [11], а также способствует уменьшению воспаления, восстановлению слизистого барьера, индуцирует пролиферацию стволовых клеток кишечника, нормализует кишечную микробиоту [12, 13]. Добавление в рацион мышам *Muc2*^{+/-} спор *B. subtilis* BS20 способствовало нормализации поведения мышей и повлияло на экспрессию цитокинов в кишечнике, концентрацию серотонина и тирозина в крови [16].

ВЗК является патологией со сложной этиологией, поэтому необходимы их разносторонние исследования. Данных о механизме действия *Bacillus* spp. как пробиотика, особенно при ВЗК, недостаточно. В связи с этим требуются дополнительные исследования штаммов *Bacillus* spp. на экспериментальных моделях ВЗК.

Целью данной работы было изучение влияния спор *B. subtilis* BS20 на физиологические и

иммунные показатели мутантной линии мышей *Muc2*^{-/-}. Для достижения цели были поставлены задачи: определить эффект добавления в корм мышам *Muc2*^{-/-} штамма *B. subtilis* BS20 на продолжительность жизни, массу тела, иммунные показатели (цитокины и иммунные клетки в селезёнке) и аминокислотный состав мышц.

Материалы и методы

Работа была выполнена в Научно-исследовательском институте нейронаук и медицины (НИИИМ). В эксперимент были отобраны 9 6-месячных самок мышей *Muc2*^{-/-} в опытную группу и 6 в контрольную [17]. В качестве контроля при изучении уровня цитокинов были взяты 3 самки мышей линии C57BL/6. Животные содержались в открытых клетках при температуре 22–24°C и инвертированном световом режиме 12:12 ч. Доступ к воде и корму был свободным. В корм опытной группы на протяжении 2 мес добавляли суспензию спор штамма *B. subtilis* BS20 из коллекции бактериальных штаммов лаборатории НИИИМ в количестве 10⁹ спор/г корма. Экспериментальные исследования проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации и стандартами Надлежащей лабораторной практики (приказ Минздрава России от 19.06.2003 № 267), руководствами комитета Научно-исследовательского института нейронаук и медицины по биоэтике (протокол № 3 от 19.05.2022), и Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Используемые в работе мыши *Muc2*^{-/-} и C57BL/6 имели SPF-статус (specific pathogen free — без видоспецифических патогенных микроорганизмов), который указан в рекомендациях Европейской федерации сотрудников, работающих с лабораторными животными, FELASA 2014 [18]. Статус здоровья мышей каждой линии подтверждали согласно рекомендациям FELASA 2014 [18].

Бактериальный штамм и условия роста

Культивирование на селективной среде с добавлением антибиотика канамицина обеспечивает рост выбранного штамма *B. subtilis* BS20 [16] и способствует точному подсчёту КОЕ в помёте мышей после прохождения через ЖКТ. Выросшие колонии пересевали на казеин-пептонный агар с дексторозой (DCPA, «Merck») и инкубировали при +37°C в течение 72–96 ч до перехода всех микробных клеток в спорую форму. Споры бактерий ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и добавляли в корм в количестве 10⁹ КОЕ [19].

Анализ количества спор *Bacillus subtilis* BS20 в корме и помёте мышей

Десять грамм корма гомогенизировали в 90 мл ФСБ, 100 мг помёта мышей — в 0,9 мл ФСБ с по-

следующим десятикратным серийным разведением для каждой пробы. Удаление вегетативных форм *B. subtilis* BS20 проводили нагреванием в течение 15 мин при 85°C. Для подсчёта количества спор использовали аликвоты каждого разведения в объёме 500 мкл. Посев производили на ДСРА, инкубировали в аэробных условиях при 36°C в течение 48 ч. Выживаемость спор в корме оценивали спустя 1 мес хранения. В помёте мышей количество спор определяли через 2 нед от начала эксперимента и через 1 мес после добавления спор в корм.

Определение уровня цитокинов

Для измерения уровня цитокинов биоптат нисходящего отдела толстой кишки гомогенизировали в жидком азоте. После добавления 100 мкл ФСБ образец центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 15 мин при 4°C. Концентрацию цитокинов измеряли при помощи набора для мультиплексного анализа «Cloud-Clone» в соответствии с рекомендациями производителя. Детекцию цитокинов проводили на приборе «Luminex 200» («Merck») с xPONENT 3.1. программным обеспечением. Концентрацию цитокинов нормализовали к общему белку, который измеряли по Бредфорду и представляли в виде пг цитокина на 1 мг общего белка.

Определение доли спленоцитов

Биоптат селезёнки гомогенизировали при помощи пестикового ручного гомогенизатора («Sovtech»). Полученную суспензию клеток пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм («BD Falcon»). Определение количества CD25⁺Foxp3⁺CD4⁺-клеток проводили методом проточной цитометрии. Для окрашивания клеток 250 мкл суспензии инкубировали с антителами с FITC-anti-CD4, PE-anti-CD3ε, PE/Cy7-anti-CD8a and PE-anti-CD3ε, Pacific blue-anti-CD45, FITC-anti-CD19 и APC anti-CD25 («BioLegend») 30 мин при +4°C. Разбавляли клетки 100 мкл буфера для перемобилизации TrueNuclear Perm («BioLegend») и инкубировали с антителами AlexaFluor488 anti-Foxp3 («BioLegend») 60 мин в темноте при комнатной температуре. После промывки клетки разбавляли буфером для окрашивания до концентрации 1500–3000 клеток/мкл и инкубировали без света при температуре 4°C до анализа (1–2 дня) на проточном цитофлуориметре «BD FACSCanto II Flow Cytometer» («BD Biosciences»). В каждом образце анализировали 50 000 лимфоцитов. В спленоцитах выделяли одиночные клетки (синглеты) и одиночные CD4⁺-лимфоциты. Для анализа вычисляли процент CD45⁺CD3⁺-Т-клеток, CD45⁺CD3⁺CD4⁺-Т-хелперов, CD45⁺CD3⁺CD8⁺-Т-киллеров, CD45⁺CD19⁺-В-клеток, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-регуляторных Т-клеток и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-эффекторных Т-клеток.

Определение содержания аминокислот в составе белка бедренной мышцы

Капиллярный электрофорез выполняли на установке «КАПЕЛЬ-105М» («Люмэкс») с ультрафиолетовым детектором. От каждой мышцы брали по два 100 мг образца бедренной мышцы. Пробы анализировали с помощью картриджа с кварцевыми капиллярами длиной 75 см и внутренним диаметром 50 мкм («Люмэкс»). Определение содержания аргинина, лизина, тирозина, фенилаланина, гистидина, суммы лейцина и изолейцина, метионина, валина, пролина, треонина, серина, аланина и глицина проводили в фенилизотиоцианате производных аминокислот. Массовую долю триптофана определяли в жидкой фракции напрямую без получения производных фенилизотиоцианата. Обнаружение проводили при длине волны 219, давлении 30 мбар, напряжении +25 кВ. Внешний стандарт — коммерческая стандартная смесь аминокислот (LAA21-1KT, «Sigma Aldrich»). Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения «Эльфоран» («Люмэкс») [20].

Статистический анализ

Данные представлены в виде средних ± SEM для количественных значений и в долях (%) — для качественных. Распределение выявляли с помощью описательной статистики в «Statistica v. 10.0» с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Данные с ненормальным распределением оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни для независимых групп. Для категориальных переменных использовали точный тест Фишера. Значение $p < 0,05$ считали значимым.

Результаты

Для определения жизнеспособности спор *B. subtilis* BS20 при прохождении через пищеварительный тракт исследовали количество жизнеспособных спор в содержимом кишечника самок *Muc2*^{-/-} и в корме через 1 мес от начала добавления в рацион животных. Количество жизнеспособных спор *B. subtilis* BS20 во всех образцах помета мышей составило 10⁷ КОЕ/г, в корме — в 10⁹ КОЕ/г.

Хроническое воспаление кишечника у мышей *Muc2*^{-/-} приводит к потере массы и гибели к возрасту 5–8 мес более 40% животных. В проведённом эксперименте к 8 мес выжили все мыши, получавшие с кормом *B. subtilis* BS20. В контрольной группе к 8 мес живыми осталось 55% (5 из 9) особей. Статистическая достоверность полученных результатов находилась на уровне тенденции ($p = 0,09$, точный тест Фишера), однако это следствие малого объёма выборки. Основными причинами падежа лабораторных животных в контрольной группе были пролапс кишки и заметная потеря массы тела.

Содержание аминокислот, %
Amino acid content, %

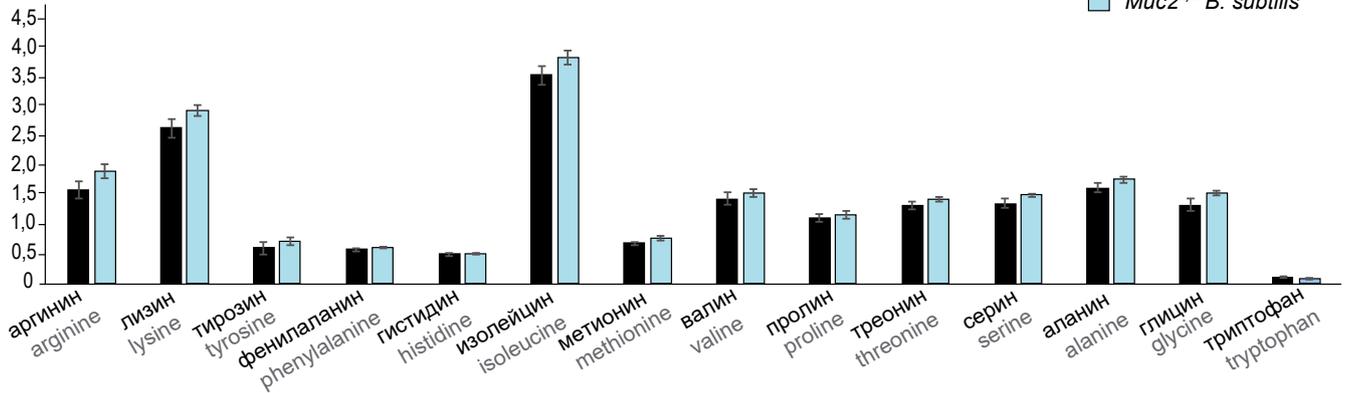
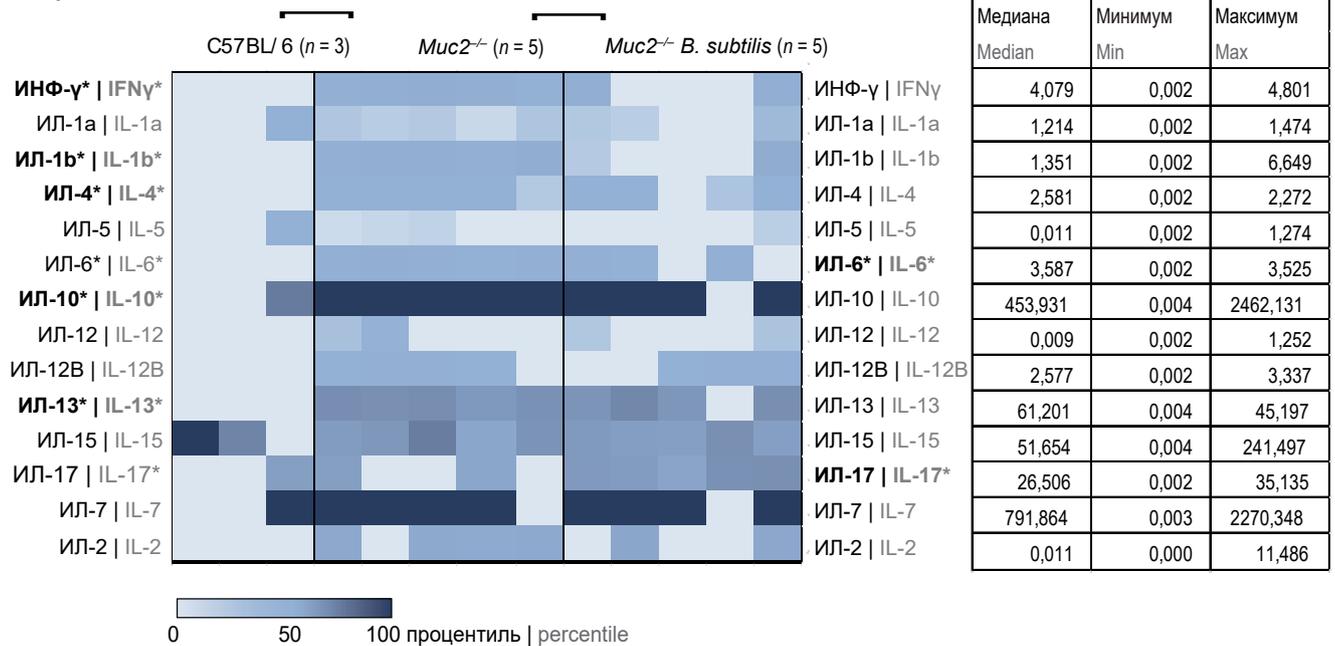


Рис. 1. Влияние добавления в корм спор *B. subtilis* BS20 на состав аминокислот в мышечной ткани бедра мышей *Muc2^{-/-}* ($n = 5$) и *Muc2^{-/-} B. subtilis* ($n = 6$).

Fig. 1. Effect of adding of *B. subtilis* BS20 spores to food on the composition of amino acids in the femoral muscle tissue of *Muc2^{-/-}* mice ($n = 5$) and *Muc2^{-/-} B. subtilis* mice ($n = 6$).

а | a



б | b

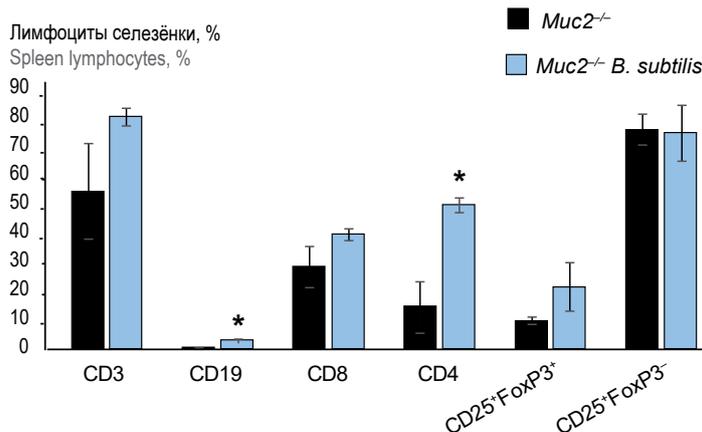


Рис. 2. Влияние спор *B. subtilis* BS20 на уровень цитокинов в толстой кишке (а) и долю иммунных клеток селезёнки (б) мышей *Muc2^{-/-}* в возрасте 8 мес.

* $p < 0,05$, U-тест Манна–Уитни.

Fig. 2. Effect of *B. subtilis* BS20 spores on the level of cytokines in colon (a) and percentage of the immune cells in spleen (b) of *Muc2^{-/-}* mice at 8 months.

* $p < 0.05$, Mann–Whitney U test.

Потеря массы тела мышей к 8 мес была значимо больше в контрольной группе ($p < 0,05$; $Z = -2,28$; $p < 0,01$, U-тест Манна–Уитни).

Достоверных различий в содержании 24 аминокислот (аргинин, лизин, тирозин, фенилаланин, гистидин, изолейцин, метионин, валин, пролин, треонин, серин, аланин, глицин, триптофан) в сравниваемых группах не выявлено (рис. 1).

У самок мышей *Muc2*^{-/-}, содержащихся на обычном корме, в нисходящей ободочной кишке наблюдалось развитие воспаления и изменения профиля и уровней цитокинов интерферона- γ (ИФН- γ), интерлейкинов (ИЛ) 1b, 4, 6, 10, 13 по сравнению с показателями мышей линии C57BL/6 ($p < 0,05$; $Z = -2,23$; рис. 2, а).

Анализ уровня ИЛ-1a, 5, 12, 12b, 15, 17, 7, 2 не выявил различий между мутантами и мышами дикого типа (рис. 2, а). В группе мышей *Muc2*^{-/-}, получавшей с кормом споры *B. subtilis* BS20, отмечено снижение уровня ИЛ-6 и повышение значений ИЛ-17 по сравнению с мышами *Muc2*^{-/-}, находящимися на корме без добавок ($p < 0,05$). Уровни ИФН- γ , ИЛ-1a, 1b, 4, 5, 10, 12, 12b, 13, 15, 7, 2 сохранялись на прежних уровнях по сравнению с мутантами, содержащимися на обычном корме ($p > 0,05$).

В результате добавления в корм спор *B. subtilis* BS20 у *Muc2*^{-/-} отмечено достоверно значимое увеличение доли В-клеток (CD45⁺CD19⁺) и Т-хелперов (CD45⁺CD3⁺CD4⁺); $p < 0,05$ (рис. 2, б). Статистически значимых различий в количестве других лимфоцитов: Т-клетки (CD45⁺CD3⁺), Т-киллеры (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), регуляторные (CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) и эффекторные (CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻) Т-клетки после кормления спорами бактерий не выявлено.

Обсуждение

Пробиотики широко используют в терапии заболеваний ЖКТ. Они рассматриваются не только как средства коррекции кишечного дисбиоза, но и как перспективные инструменты иммуномодуляции. В отличие от неспороформирующих пробиотических штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, спорообразующие *Bacillus* spp. лучше сохраняют жизнеспособность в условиях ЖКТ и выживаемость в период хранения пищевых продуктов [8].

В результате проведенного нами исследования установлено, что штамм *B. subtilis* BS20 характеризуется достаточным пробиотическим эффектом [11], т. к. при прохождении через кислую среду желудка и все отделы кишечника мышей он сохранял стабильность, жизнеспособность и выживаемость в количестве 10^7 КОЕ, а в корме при хранении при комнатной температуре в течение месяца — 10^9 КОЕ.

Эффективность пробиотиков на основе бактерий *Bacillus* spp. неоднократно изучалась на различных моделях инфекционных и неинфекцион-

ных воспалительных заболеваний ЖКТ [9, 11–13]. В данном эксперименте установлено, что добавление в течение 2 мес спор штамма *B. subtilis* BS20 в корм мышам мутантной линии *Muc2*^{-/-}, используемой в качестве экспериментальной модели ВЗК, стабилизировало массу тела (по сравнению с массой тела мутантов, не употреблявших пробиотики, которая была ниже на 10%), обеспечивало 100% выживаемость к возрасту 8 мес и увеличивало продолжительность жизни на 30%. Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния *B. subtilis* на мышах инбредной линии BALB/c, чувствительных к желудочно-кишечным инфекциям [21].

Бактерии рода *Bacillus* способны активно продуцировать ряд ферментов, расщепляющих крахмал, целлюлозу, белки, жиры [9, 20], что может облегчать пищеварение и усвоение питательных веществ. В проведенном исследовании изменений в процентном содержании аминокислот в мышце бедра опытных мышей не обнаружено. Полученные результаты позволили предположить, что добавление в корм штамма *B. subtilis* BS20 не оказывает влияния на усвоение аминокислот.

Отсутствие нормальной слизистой оболочки у мышей *Muc2*^{-/-} приводит к развитию воспаления, симптоматика которого схожа с таковой у пациентов с язвенным колитом. Основными цитокинами, увеличение которых наблюдается при ВЗК у пациентов, являются фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), ИЛ-1b и -6. В.Д. Бец и соавт. [15] показали, что в сравнении с мышами C57BL/6 у линии *Muc2*^{-/-} увеличена экспрессия цитокинов ИФН- γ , ИЛ-1b, 4, 6, 10, 13, что подтверждает наличие у них хронического воспалительного процесса. В результате использования корма с добавлением спор *B. subtilis* BS20 у мышей *Muc2*^{-/-} выявлено снижение уровня ИЛ-6 и повышение уровня ИЛ-17, что свидетельствовало о противовоспалительной активности штамма. В исследованиях D. Liu и соавт. на крысах на высокожировой диете показано, что добавление спор *B. subtilis* приводило к снижению уровня ИЛ-6, ФНО- α и ИЛ-17 [22]. В работах G. Yi и соавт. установлено, что добавление *B. subtilis* в рацион мышам с химически индуцированным колитом способствовало снижению экспрессии ФНО- α , ИЛ-6, 17 и 23 [21]. Известно, что широко используемый в качестве пробиотика штамм *B. subtilis* DE111, в отличие от штамма *B. subtilis* BS20, не влияет на маркеры кишечного воспаления (ИЛ-6, секреторный иммуноглобулин А) [23].

В последние годы большое внимание привлекает цитокин ИЛ-17, продуцируемый преимущественно Т-хелперами, стимулирующий гранулоцитопоз и способствующий усилению антителозависимой гибели опухолевых клеток. Введение ИЛ-17 мышам, чувствительным к аутоиммунному увеиту (воспаление структур сосудистой оболочки глаза),

оказывало противовоспалительное действие [24]. В то же время известно, что ИЛ-17 может усугублять развитие воспаления и способствовать уменьшению числа Т-хелперов.

Изначально экспериментальная модель *Muc2*^{-/-} была создана для изучения колоректального рака. Начиная с 6-го месяца жизни у мышей этой линии формируются аденокарциномы по всей длине кишечника, к 1 году опухоли образуются у 100% особей [2]. В результате проведённого исследования показано, что после добавления *B. subtilis* BS20 в корм мышам *Muc2*^{-/-} увеличилось количество ИЛ-17 в сочетании с экспрессией Т-хелперов, что можно рассматривать как фактор снижения риска развития рака толстой кишки.

Селезёнка, являясь крупнейшим вторичным лимфоидным органом, отражает базовое состояние периферической иммунной системы. Выявленное повышение процента В-клеток и Т-хелперов в селезёнке в сочетании с повышением уровня ИЛ-17 у мышей, получавших с кормом споры *B. subtilis* BS20, свидетельствует об улучшении адаптационной реакции иммунной системы и переключении на антителообразование [25]. Поскольку у мышей *Muc2*^{-/-} отсутствует муциновая выстилка в кишечнике, соотношение и состав микробиоты у них меняется [17], кроме того, отсутствие муцинового барьера делает слизистую кишечника беззащитной перед патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Поскольку штамм *B. subtilis* BS20 стимулирует гуморальное звено иммунитета у мышей *Muc2*^{-/-}, возможно, это способствует развитию у них устойчивости к патогенным микроорганизмам и объясняет увеличение массы тела и продолжительности жизни. В предыдущих исследованиях показано, что мыши *Muc2*^{-/-} при кормлении неавтоклавируемым кормом, содержащим несколько видов представителей рода *Bacillus*, характеризовались лучшим репродуктивным индексом, более поздним появлением пролапса прямой кишки и высоким содержанием Т-хелперов в селезёнке, по сравнению с физиологическими и иммунологическими показателями мышей, получавших автоклавируемый корм, содержащий инактивированные споры бактерий [26]. Добавление в корм штамма *B. subtilis* DE111 способствует увеличению уровня регуляторных Т-клеток и Т-хелперов, наряду со снижением содержания Т-киллеров [23].

Заключение

Штаммы *B. subtilis* и их метаболиты являются непатогенными для человека, что позволяет считать их наиболее перспективными в качестве основы пробиотиков нового поколения. Большинство известных штаммов *B. subtilis* проявили себя как средство с многогранной клинической эффективностью и в настоящее время рекомендованы в

схемах терапии при лечении пациентов с дисбиозом кишечника различного генеза, хроническими заболеваниями пищеварительного тракта, после перенесённых острых кишечных инфекций, на фоне и после приёма антибиотиков, после проведения химиотерапии, на фоне длительной гормональной терапии, в условиях хронических стрессовых состояний, при нерациональной диетотерапии. Препараты на основе *B. subtilis* снижают выраженность диспептических расстройств, улучшают пищеварение, эффективно оказывают иммуномодулирующее действие и способствуют повышению качества жизни. С учётом того, что пробиотики, содержащие *B. subtilis*, не имеют противопоказаний и не вызывают побочных эффектов, сфера их применения постоянно расширяется [27, 28].

Таким образом, в научных работах последних десятилетий было сделано значительное продвижение в изучении спектра активности *B. subtilis*, в то же время для оценки терапевтической эффективности при ВЗК необходимы более длительные эксперименты.

Выводы

Таким образом, споры *B. subtilis* BS20 оказывают не только противовоспалительное действие в кишечнике мышей *Muc2*^{-/-}, подтверждающееся снижением уровня провоспалительного цитокина ИЛ-6, но и выступают как стимулирующее гуморальное звено иммунитета, повышая в селезёнке содержание В-клеток и Т-хелперов. Добавление спор бактерий в корм без изменений усвоения белков способствует увеличению продолжительности жизни, препятствуя потере массы тела у половозрелых самок *Muc2*^{-/-} мутантной линии мышей, являющихся экспериментальной моделью ВЗК.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Mak W.Y., Zhao M., Ng S.C., Burisch J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2020;35(3):380–9. DOI: <https://doi.org/10.1111/JGH.14872>
2. Милутинович К.С., Попов В.С. *Muc2*-дефицитные мыши как модель хронического воспаления. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2023;(3):118–26. Milutinovich K.S., Popov V.S. *Muc2*-deficient mice as a model of chronic inflammation. *Laboratory Animals for Science.* 2023;(3):118–26. DOI: <https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-03-11> DOI: <https://elibrary.ru/pipxjk>
3. Маев И.В., Шельгин Ю.А., Скалинская М.И. и др. Патоморфоз воспалительных заболеваний кишечника. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2020;75(1):27–35. Maev I.V., Shelygin Yu.A., Skalinskaya M.I., et al. The pathomorphosis of inflammatory bowel diseases. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2020;75(1):27–35. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn1219> EDN: <https://elibrary.ru/fwjiao>
4. Ma X., Shin Y.J., Jang H.M., et al. *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium longum* alleviate colitis and cognitive impair-

- ment in mice by regulating IFN- γ to IL-10 and TNF- α to IL-10 expression ratios. *Sci. Rep.* 2021;11(1):20659.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00096-x>
5. Leccese G., Bibi A., Mazza S., et al. Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains counteract adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) virulence and hamper IL-23/Th17 axis in ulcerative colitis, but not in Crohn's disease. *Cells.* 2020;9(8):1824.
DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9081824>
 6. Wang T., Zhang L., Wang P., et al. *Lactobacillus coryniformis* MXJ32 administration ameliorates azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colitis-associated colorectal cancer via reshaping intestinal microenvironment and alleviating inflammatory response. *Eur. J. Nutr.* 2022;61(1):85–99.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02627-8>
 7. Hrdý J., Alard J., Couturier-Maillard A., et al. *Lactobacillus reuteri* 5454 and *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis 5764 improve colitis while differentially impacting dendritic cells maturation and antimicrobial responses. *Sci. Rep.* 2020;10(1):5345.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62161-1>
 8. Soares M.B., Martinez R.C.R., Pereira E.P.R., et al. The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. *Food Res. Int.* 2019;125:108542.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108542>
 9. Suva M.A., Sureja V.P., Khani D.B. Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: mechanism of action and clinical applications. *J. Curr. Res. Sci. Med.* 2016;2(2):65–72.
DOI: <https://doi.org/10.4103/2455-3069.198381>
 10. Червинец В.Ю., Червинец М.В., Ганзя Д.В. Применение пробиотиков в лечении дисбактериоза пищеварительного тракта. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2022;(4):94–100. Chervinets V.Yu., Chervinets M.V., Ganzya D.V. Application of probiotics in treatment of digestive tract dysbacteriosis. *Experimental and Clinical Gastroenterology Journal.* 2022;(4):94–100.
DOI: <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-200-4-94-100>
EDN: <https://elibrary.ru/oasmfj>
 11. Li Y., Zhang T., Guo C., et al. *Bacillus subtilis* RZ001 improves intestinal integrity and alleviates colitis by inhibiting the Notch signalling pathway and activating ATOH-1. *Pathog. Dis.* 2020;78(2):ftaa016.
DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa016>
 12. Luo R., Zhang J., Zhang X., et al. *Bacillus subtilis* HH2 ameliorates TNBS-induced colitis by modulating gut microbiota composition and improving intestinal barrier function in rabbit model. *J. Funct. Foods.* 2020;74:104167.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104167>
 13. Zhang X., Tong Y., Lyu X., et al. Prevention and alleviation of dextran sulfate sodium salt-induced inflammatory bowel disease in mice with *Bacillus subtilis*-fermented milk via inhibition of the inflammatory responses and regulation of the intestinal flora. *Front. Microbiol.* 2021;11:622354.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622354>
 14. Wu M., Wu Y., Li J., et al. The dynamic changes of gut microbiota in Muc2 deficient mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(9):2809.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19092809>
 15. Бец В.Д., Ачасова К.М., Борисова М.А. и др. Роль гликопротеина муцинов и L-фукозы во взаимодействии иммунитета и микрофлоры на примере экспериментальной модели воспалительных заболеваний кишечника. *Биохимия.* 2022;87(3):356–75. Bets V.D., Achasova K.M., Borisova M.A., et al. The role of glycoprotein mucin 2 and L-fucose in the interaction of immunity and microflora of experimental model of inflammatory bowel diseases. *Biochemistry (Moscow).* 2022;87(3):356–75.
DOI: <https://doi.org/10.31857/s0320972522030046>
EDN: <https://elibrary.ru/caqkhs>
 16. Morozova M., Alekseev A., Saiedi A., Litvinova E. Normalization of deviant behavior in Muc2^{+/+} mice through dietary incorporation of *Bacillus subtilis* spores. *Prog. Microbes Mol. Biol.* 2023;6(1).
DOI: <https://doi.org/10.36877/pmmb.A0000386>
 17. Morozova M.V., Borisova M.A., Snytnikova O.A., et al. Colitis-associated intestinal microbiota regulates brain glycine and host behavior in mice. *Sci. Rep.* 2022;12(1):1–18.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19219-z>
 18. Mähler C.M., Berar M., Feinstein R., et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 2014;48(3):178–92.
DOI: <https://doi.org/10.1177/0023677213516312>
 19. Samokhin A., Korel A., Blinova E., et al. Delivery of *B. subtilis* into animal intestine using chitosan-derived bioresorbable gel carrier: preliminary results. *Gels.* 2023;9(2):120.
DOI: <https://doi.org/10.3390/gels9020120>
 20. Морозова М.В., Калмыкова Г.В., Акулова Н.И., Литвинова Е.А. Определение содержания бактерий рода *Bacillus* в корме и фекалиях лабораторных мышей при содержании в стерильных и нестерильных условиях. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2021;(3):11–6. Morozova M.V., Kalmykova G.V., Akulova N.I., Litvinova E.A. Analysis of *Bacillus* spp. in the diet and feces of laboratory mice under barrier-housing and non-sterile conditions. *Laboratory Animals for Science.* 2021;(3):11–6.
DOI: <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-03-02>
EDN: <https://elibrary.ru/ybolke>
 21. Gong Y., Li H., Li Y. Effects of *Bacillus subtilis* on epithelial tight junctions of mice with inflammatory bowel disease. *J. Interferon Cytokine Res.* 2016;36(2):75–85.
DOI: <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0030>
 22. Liu D., Chen P. Binary *Bacillus subtilis* protects the intestinal mucosa barrier and alleviates nonalcoholic steatohepatitis. *Anim. Model Exp. Med.* 2023.
DOI: <https://doi.org/10.1002/ame2.12337>
 23. Freedman K.E., Hill J.L., Wei Y., et al. Examining the gastrointestinal and immunomodulatory effects of the novel probiotic *Bacillus subtilis* DE111. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(5):2453.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22052453>
 24. Ke Y., Liu K., Huang G.Q., et al. Anti-inflammatory role of IL-17 in experimental autoimmune uveitis. *J. Immunol.* 2009;182(5):3183–90.
DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802487>
 25. Ishak N.I.M., Mohamed S., Madzuki I.N., et al. Limonin modulated immune and inflammatory responses to suppress colorectal adenocarcinoma in mice model. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2021;394(9):1907–15.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02101-6>
 26. Morozova M.V., Kalmykova G.V., Akulova N.I., et al. Autoclaved diet with inactivated spores of *Bacillus* spp. decreased reproductive performance of Muc2^{-/-} and Muc2^{+/-} mice. *Animals (Basel).* 2022;12(18):2399.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ani12182399/S1>
 27. Esparza-Gonzalez S.C., Troy A.R., Izzo A.A. Comparative analysis of *Bacillus subtilis* spores and monophosphoryl lipid A as adjuvants of protein-based *Mycobacterium tuberculosis*-based vaccines: Partial requirement for interleukin-17A for induction of protective immunity. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014;21(4):501–8.
DOI: <https://doi.org/10.1128/cvi.00622-13>
 28. Lee J.E., Kye Y.C., Park S.M., et al. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants against avian influenza H9N2 induce antigen-specific antibody and T cell responses in White Leghorn chickens. *Vet. Res.* 2020;51(1):68.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00788-8>

Информация об авторах

Морозова Марьяна Владимировна[✉] — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальных моделей нейropsychиатрических нарушений НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия, morozova.maryana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3749-5214>

Коркина Валентина Игоревна — к.б.н., с.н.с. лаб. биохимии Сибирского федерального научного центра агробιοтехнологий, пос. Краснообск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9472-5787>

Макарова Мария Александровна — д.м.н., в.н.с., зав. лаб. кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Литвинова Екатерина Анатольевна — к.б.н., н.с., руководитель НОЦ «Технология биополимеров» Новосибирского государственного технического университета, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6398-7154>

Участие авторов: *Морозова М.В., Литвинова Е.А.* — проведение исследований, написание статьи; *Коркина В.И.* — анализ аминокислотного состава мышц; *Макарова М.А.* — редакторская правка. Все авторы прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 21.01.2024;
принята к публикации 28.03.2024;
опубликована 29.04.2024

Information about the authors

Maryana V. Morozova[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of experimental models of neuropsychiatric disorders, Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia, morozova.maryana@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3749-5214>

Valentina I. Korkina — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of biochemistry, Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies, Krasnoobsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9472-5787>,

Mariia A. Makarova — D. Sci. (Med.), senior researcher, Head, Laboratory of enteric infection, Saint-Peterburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3600-2377>

Ekaterina A. Litvinova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Head, Research Center "Biopolymer Technology", Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6398-7154>

Author contribution: *Morozova M.V., Litvinova E.A.* — conducting research, writing an article; *Korkina V.I.* — analysis of the amino acid composition of muscles; *Makarova M.A.* — editing. All authors read and approved the final version prior to publication.

The article was submitted 21.01.2024;
accepted for publication 26.03.2024;
published 29.04.2024