

# Вклад кишечного муцина-2 в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter* spp. у лабораторных мышей

Е.А. Литвинова<sup>1</sup>, М.Д. Беляев<sup>1</sup>, А.В. Прохорчук<sup>2</sup>, В.С. Коростина<sup>2</sup>, Е.Б. Прохорчук<sup>2</sup>, Е.Н. Кожевникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Нарушение синтеза основного протеогликана кишечника (муцин-2) у людей характерно как при развитии неспецифического язвенного колита, так и при болезни Крона. Такие морфологические изменения кишечного слизистого слоя могут повлиять на разнообразие кишечной микрофлоры. Использование антибиотиков для лечения бактериальных инфекций у людей и животных с нарушением синтеза муцина-2 может быть малоэффективным, а иногда и опасным из-за развития сепсиса или хронического воспаления. В работе на мышах с генетически детерминированным дефицитом муцина-2 (линия *Muc2*<sup>-/-</sup>) исследовали как применение трех антибиотиков (кларитромицин, амоксицилин и метронидазол) влияет на элиминацию патогенной инфекции у мышей. Для оценки эффективности антибиотиков измеряли количество патогенных (*Helicobacter* spp.) и симбиотических (*E. coli*) бактерий в кишечнике животных. Негативное влияние антибактериальной терапии на организм хозяина оценивали по выживаемости животных. Три антибиотика не способствовали устранению *Helicobacter* spp. у мышей с дефицитом муцина-2. Наряду с неэффективным лечением была отмечена гибель у 60 % животных данной линии. Мыши с нормальной функцией синтеза муцина-2 (C57BL/6J) имели 100 %-е выживание. Животные с нормальной функцией синтеза основного кишечного протеогликана не демонстрировали снижения массы тела. *Helicobacter* spp. был полностью устранен у этих животных. Таким образом, лечение инфекции *Helicobacter* spp. антибиотиками у животных с нарушением синтеза муцина-2 не только малоэффективно, но и вызывает гибель животного. Высокая восприимчивость к токсическому действию антибиотиков дает основание для использования мышей с дефицитом муцина-2 в качестве тест-объекта для оценки фармакологической безопасности новых средств антибактериальной терапии.

Ключевые слова: мыши; кишечное воспаление; муцин-2; антибактериальная терапия.

## Role of intestinal mucin-2 in the effectiveness of the treatment of *Helicobacter* spp. infection in laboratory mice

E.A. Litvinova<sup>1</sup>, M.D. Belyaev<sup>1</sup>, A.V. Prokhortchouk<sup>2</sup>, V.S. Korostina<sup>2</sup>, E.B. Prokhortchouk<sup>2</sup>, E.N. Kozhevnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abnormal synthesis of the main intestinal proteoglycan mucin-2 is typical of ulcerative colitis and Crohn's disease in humans. Those morphological changes of the mucus layer affect the diversity of the intestinal microflora. Antibiotics may be ineffective or even dangerous to humans or animals deficient for mucin-2 because of the risk of sepsis and chronic inflammation. In this study, we investigated the potential of antibiotics (clarithromycin, amoxicillin, and metronidazole) in elimination of pathogenic infection from *Muc2* knockout mice (*Muc2*<sup>-/-</sup>). We assayed the population sizes of pathogens (*Helicobacter* spp.) and symbiotic (*E. coli*) bacteria in the intestines of animals as a criterion of antibiotic efficacy. The damaging effect of antibacterial treatment on the host body was estimated from their survival rate. Three antibiotics were ineffective in the elimination of *Helicobacter* spp. from mucin-2-deficient mice. Moreover, the mortality of *Muc2* knockout mice during the antibacterial treatment was 60 %. The survival of wild-type mice (C57BL/6J) during the treatment was 100 %. The weight of wild-type mice showed no decrease during the treatment. The *Helicobacter* spp. pathogen was fully eradicated from wild-type mice. Thus, therapy of *Helicobacter* spp. infection in mucin-2 deficient animals is not only poorly efficient but even deadly. The high susceptibility to antibiotics allows *Muc2* knockout mice to be used as a test model to evaluate the pharmacological safety of new antibiotics.

Key words: mice; intestinal inflammation; mucin-2; antibacterial treatment.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

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;19(4):494-498. DOI 10.18699/VJ15.066

### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Litvinova E.A., Belyaev M.D., Prokhortchouk A.V., Korostina V.S., Prokhortchouk E.B., Kozhevnikova E.N. Role of intestinal mucin-2 in the effectiveness of the treatment of *Helicobacter* spp. infection in laboratory mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):494-498. DOI 10.18699/VJ15.066

DOI 10.18699/VJ15.066

УДК 57.023

Поступила в редакцию 03.07.2015 г.

Принята к публикации 21.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

✉ e-mail: litvinova@bionet.nsc.ru; kozhevnikova@bionet.nsc.ru

Экспериментальные модели воспалительных заболеваний кишечника (inflammatory bowel disease – IBD) на лабораторных животных активно используют для понимания процессов неспецифического язвенного колита и болезни Крона у людей (O'Connor, 2011). Существуют три типа экспериментальных моделей воспалительных заболеваний кишечника на животных: 1) модель химически индуцированного воспаления кишечника; 2) модель пересадки иммунных тканей животных с воспаленным кишечником иммунодефицитным животным; 3) генетические модели животных с предрасположенностью к воспалению кишечника. Признаком всех моделей воспалительных заболеваний кишечника является истончение протеогликанового слоя кишечника, образующего первый защитный барьер на пути бактерий (Hansson, Johansson, 2010). Благодаря новым молекулярно-генетическим подходам можно создавать животных с мутациями генов кишечного барьера, в частности с нокаутом гена кишечного муцина-2 (*Muc2*<sup>-/-</sup>). Муцин-2 является основным протеогликаном кишечника, и его дефицит приводит к воспалениям (Martens et al., 2009; Bergstrom et al., 2010; Morgan et al., 2012).

Воспалительные процессы в кишечнике всегда ассоциированы с бактериальными инфекциями. Одним из распространенных специфических патогенов лабораторных мышей, который вызывает воспаления в кишечнике, является *Helicobacter hepaticus* (Chin et al., 2000). Основным способом лечения бактериальных инфекций как у людей, так и у животных являются антибиотики широкого спектра действия. Их применение приводит к изменению состава симбиотической микрофлоры кишечника (дисбактериозу), развитию воспалительных процессов и уменьшению толщины слоя кишечного протеогликана (Rakoff-Nahoum, Medzhitov, 2007; Ubeda et al., 2010; Wlodarska et al., 2011). Лечение антибиотиками животных с экспериментальной моделью химически индуцированного воспаления кишечника вызывает гибель животного от сепсиса (Ayres et al., 2012).

Таким образом, развитие воспалительных процессов в кишечнике может, с одной стороны, увеличивать чувствительность к различным кишечным инфекциям, с другой – негативно влиять на эффективность их лечения. В связи с этим целью нашей работы было выяснить степень заражения *Helicobacter* spp. и эффективность лечения инфекции антибиотиками у животных с генетически детерминированным дефицитом муцина-2. Мы использовали мышей с двойным нокаутом генов *Muc2*<sup>-/-</sup> и *Kaiso*<sup>-/-</sup> (университет Эдинбурга на генетическом фоне C57BL/6). Для выявления собственных эффектов дефицита транскрипционного фактора *Kaiso* была также исследована линия мышей с нокаутом только этого гена (Prokhortchouk et al., 2006).

## Материалы и методы

Исследование выполнено в Центре генетических ресурсов ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) на мышах самцах и самках *Kaiso*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>-/-</sup>/*Kaiso*<sup>-/-</sup> на генетическом фоне C57BL/6J в возрасте 12–16 нед. Референтной группой служили мыши линии C57BL/6J. Животные, зараженные *Helicobacter hepaticus*,

поступили в наш центр в 2012 г. из питомника «Пушино». Мышей с мутациями *Kaiso*<sup>-/-</sup> и *Muc2*<sup>-/-</sup>/*Kaiso*<sup>-/-</sup> на генетическом фоне C57BL/6J создали в университете Эдинбурга и передали лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных (Институт биоинженерии, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва). Животных содержали однополыми группами по 4–5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (Optimise, США) при искусственном световом режиме 14C : 10T, температуре 20–22 °C, влажности 36 % и давлении 38 Па. В качестве подстилки использовали обеспыленную березовую стружку. Животным *ad libitum* предоставляли стерильную деионизированную воду с добавлением минералов K<sup>+</sup>Mg<sup>2+</sup> («Северянка», г. Санкт-Петербург) и корм ssniff® R/M-H autoclavable V1534-3 (Ssniff, Германия). Работу с животными проводили по биоэтическим нормам Директивы Евросоюза (ECC Directive 86/609/EEC).

Согласно международным требованиям к содержанию животных SPF-статуса, проводили мониторинг патогенов по списку, рекомендованному FELASA (Nicklas et al., 2002). У животных не было следующих видоспецифических бактериальных и вирусных инфекций: Mouse hepatitis virus, Mouse rotavirus (EDIM), Minute virus of mice, Mouse parvovirus, Pneumonia virus of mice, Sendai virus, Theiler's murine encephalomyelitis virus, Ectromelia virus, Lymphocytic choriomeningitis virus, Mouse adenovirus type 1 (FL), Mouse adenovirus type 2 (K87), Mouse cytomegalovirus, Reovirus type 3, *Citrobacter rodentium*, *Clostridium piliforme* (Tyzzer's disease), *Corynebacterium kutscheri*, *Mycoplasma* spp., *Pasteurellaceae*, *Salmonella* spp., *Streptococci b-haemolytic* (not group D), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptobacillus moniliformis* (Nicklas et al., 2010).

Оценку количества ДНК патогенной бактерии *Helicobacter* spp. и симбиотической бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*) проводили в образцах фекалий, собранных в стерильных условиях методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени во всех экспериментальных группах до и через неделю после лечения антибиотиками.

Выделение ДНК из фекалий (200–500 мкг) выполняли следующим способом: образец гомогенизировали инкубированием 10 мин при температуре 65 °C в 500 мкл буфера 50 мМ трис(гидроксиэтил)аминометана (Трис)-HCl 0,1 % Твин-20 20 мМ ЭДТА с лизоцимом 100 мкг/мл, разбивали на шейкере и центрифугировали 5 мин при 10 000 об./мин. 100 мкл супернатанта переносили в чистую пробирку и лизировали 500 мкл буфера 4 М гуанидин гидрохлорида 50 мМ Трис-HCl 20 мМ ЭДТА 1,3 % Твин-20. Образец перемешивали и инкубировали 10 мин при температуре 65 °C. К образцу добавляли 250 мкл 96 % этилового спирта и 30 мкл взвеси SiO<sub>2</sub> в 50 мМ-ном растворе Трис-HCl и перемешивали 5 мин. Образец центрифугировали (3 000 об./мин, 5 мин) и удаляли супернатант. Осадок промывали последовательно 500 мкл промывочного буфера 4 М гуанидин гидрохлорида 50 мМ Трис-HCl 25 %-го этилового спирта и 500 мкл 70 %-го этилового спирта. Осадок высушивали, ДНК растворяли в 100 мкл воды. Образец центрифугировали (10 000 об./мин, 5 мин), отбирали супернатант в чистую пробирку и определяли концентрацию ДНК в пробе при

**Таблица 1.** Последовательности олигонуклеотидных праймеров для метода количественного определения ДНК в полимеразной цепной реакции

Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5'-3'
Mus-F	CCTGGCGCTAAACCATTCTGT
Mus-R	AAAGCCCGCAGAGACAAACC
Hel.spp-F	CGGAGGGTGCAAGCGTTACT
Hel.spp-R	ATCCACCTGCCTCTCCAC
E.coli-F	GGCAGGCCTAACACATGCAAC
E.coli-R	CCCCTCTTTGGTCTTGCAGC

F – прямой праймер, R – обратный праймер.

помощи УФ-спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Количество бактерий в кишечнике оценивали по количеству бактериальной ДНК, нормированному на ДНК, которая кодирует 28S рРНК *Mus musculus* в фекалиях. Для определения *Helicobacter* spp. и *E. coli* использовали праймерные олигонуклеотиды, комплементарные участку гена 16S рРНК этой группы бактерий (табл. 1). Количество ДНК *Mus musculus* определяли с помощью олигонуклеотидных праймеров к участку гена 28S рРНК мыши (табл. 1). Все праймерные последовательности подбирали при помощи базы данных BLAST и программы Mipiro UGENE. В реакционную смесь, содержащую Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, США) и соответствующие 0,5 мкМ праймерные олигонуклеотиды, добавляли 25 нг ДНК, выделенной из фекалий (объем реакции 25 мкл). Реакцию проводили в детектирующем амплификаторе CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США). ДНК денатурировали 5 мин при 95 °С, затем проводили 45 циклов: денатурация – 95 °С 15 с, отжиг праймерных олигонуклеотидов – 62 °С 25 с, синтез – 62 °С 25 с.

Нормирование бактериальной ДНК на ДНК мыши (*M. musculus*) выполняли по формуле:  $2^{-(N \text{ цикла } M. \text{ musculus}) - (N \text{ цикла бактерии})}$ , где номер цикла (N цикла) соответствует середине экспоненциальной фазы ПЦР реакции, которую для всех проб устанавливали на 500 ед. флуоресцентной эмиссии.

Влияние антибактериальной терапии на элиминацию *Helicobacter* spp. исследовали на группах мышей всех генотипов, в состав которых входило по 5 самок и самцов. Для этого в корм добавляли 3 антибиотика: метронидазол (1 мг в 5 г корма для лабораторных животных), амоксицилин (3 мг в 5 г корма), кларитромицин (0,5 мг в 5 г корма). Ежедневно в течение 2 нед давали 5 г корма с антибиотиками, что соответствует суточной потребности одного животного. Данную схему антибактериальной терапии использовали для получения 100 %-й эффективной элиминации *Helicobacter hepaticus* у иммунодефицитных линий мышей (Kerton, Warden, 2006). В корм также добавляли антибактериальный препарат оксид висмута (Де-Нол) и вспомогательное средство, угнетающее секрецию желудочной кислоты (Омепрозол). В 5 г корма добавляли

соответственно 0,185 мг Де-Нола и 0,02 мг Омепрозола.

У всех мышей в течение курса лечения каждые два дня определяли массу тела, оценивали общее состояние по внешнему виду и отмечали состояние фекальных масс.

Статистическую обработку производили при помощи пакета программного обеспечения STATISTICA6.1. Для выборок логарифма  $2^{-(N \text{ цикла } M. \text{ musculus}) - (N \text{ цикла бактерии до лечения антибиотиками})}$  и изменения массы тела с нормальным распределением использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA), критерий наименьшей значимости разности (LSD-test) и *t*-критерий Стьюдента. Для выборок логарифма  $2^{-(N \text{ цикла } M. \text{ musculus}) - (N \text{ цикла } E. \text{ coli после отмены лечения антибиотиками})}$ , не описывающихся нормальным распределением, использовали ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса и парный критерий Вилкоксона. Взаимозависимость логарифмов  $2^{-(N \text{ цикла } M. \text{ musculus}) - (N \text{ цикла бактерии до лечения антибиотиками})}$  оценивали по коэффициентам корреляции Спирмена. Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

## Результаты и обсуждение

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что до лечения антибиотиками животные разных генотипов (C57BL/6J, *Kaiso*<sup>-/-</sup>, *Muc2*<sup>-/-</sup>/*Kaiso*<sup>-/-</sup>) и разного пола имели одинаковое количество *Helicobacter* spp. и *E. coli* (табл. 2). Индивидуальные вариации количества *Helicobacter* spp. и *E. coli* достоверно коррелировали между собой ( $r = 0,48$ ,  $n = 28$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 1). Это хорошо согласуется с представлениями о том, что заселенность толстого кишечника патогенной и симбиотической микрофлорой возрастает при развитии кишечного воспаления (Bulois et al., 1999; Pilarczyk-Zurek et al., 2013). В свою очередь, инфицирование *Helicobacter* spp. может усиливать это воспаление в моделях колита (Monceaux et al., 2013). Действительно, наиболее выраженная взаимозависимость численных значений зараженности *Helicobacter* spp. и *E. coli* была отмечена у мышей с дефицитом кишечного муцина-2 – линии *Kaiso*<sup>-/-</sup>/*Muc2*<sup>-/-</sup> ( $r = 0,92$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 10$ , корреляция Спирмена). У животных двух других генотипов, C57BL/6J и *Kaiso*<sup>-/-</sup>, коэффициенты корреляции между количеством *Helicobacter* spp. и *E. coli* составляли:  $r = -0,07$  ( $p > 0,05$ ,  $n = 8$ ) и  $r = 0,53$  ( $p > 0,05$ ,  $n = 10$ ). Кишечное воспаление при разрастании симбиотических и патогенных колоний чаще всего сопровождается различными симптоматическими характеристиками: пролапс прямой кишки, кровь в фекальных массах и диарея (Martino-Cardona et al., 2010). Известно, что энтеротоксин *E. coli* может вызывать диарею посредством воздействия на секреторные механизмы слизистой тонкой кишки (Ghai et al., 1980). Данный симптом присутствовал у всех животных с дефицитом муцина-2.

Нежелательными реакциями на острое кишечное воспаление, вызванное химическими факторами у животных, являются гиперплазия крипт, уплощение эпителиальных клеток, инфильтрация воспалительных клеток, появление поверхностных эрозий и снижение синтеза муцина-2 бокаловидными клетками (Van der Sluis et al., 2006). Оче-

**Таблица 2.** Количество *Helicobacter* spp. и *E. coli* в фекалиях у животных разных генотипов до начала лечения и через две недели приема антибиотиков

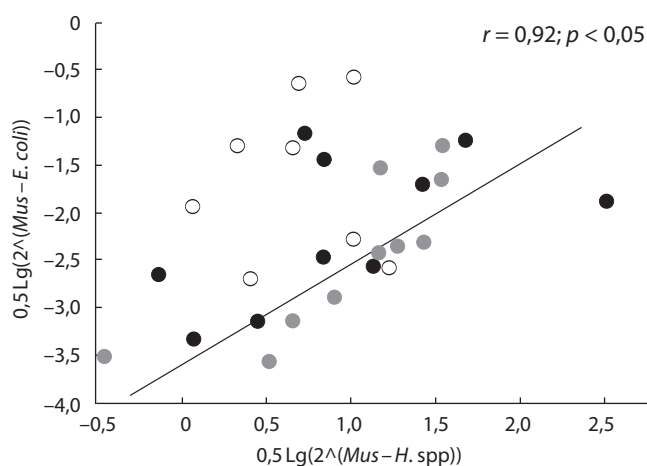
Генотип	Пол	<i>Helicobacter</i> spp.		<i>E. coli</i>	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
C57BL/6J	Самки	0,66 ± 0,20 (4)	Ниже уровня детекции	-1,81 ± 0,49 (4)	2,14 ± 0,25 (4)
	Самцы	0,69 ± 0,22 (4)	Ниже уровня детекции	-1,53 ± 0,37 (4)	2,05 ± 0,23(4)
<i>Kaiso</i> <sup>-/-</sup>	Самки	0,72 ± 0,29 (5)	Ниже уровня детекции	-1,94 ± 0,40 (5)	-0,46 ± 1,27(5)
	Самцы	1,20 ± 0,40 (5)	Ниже уровня детекции	-2,39 ± 0,28 (5)	-2,02 ± 1,10 (5)
<i>Muc2</i> <sup>-/-</sup> / <i>Kaiso</i> <sup>-/-</sup>	Самки	0,87 ± 0,38 (5)	0,0016 ± 0,0015 (5)	-2,31 ± 0,50 (5)	-3,15 ± 0,13 (5)
	Самцы	1,09 ± 0,14 (5)	0,0078 ± 0,0073 (5)	-2,62 ± 0,16 (5)	-2,92 ± 0,27 (5)
Факторный анализ	Эффект генотипа	F <sub>(2,26)</sub> = 0,56 NS	H <sub>(2,26)</sub> = 10,44 p < 0,01	F <sub>(2,26)</sub> = 2,08 NS	F <sub>(2,26)</sub> = 22,02 p < 0,001
	Эффект пола	F <sub>(1,26)</sub> = 0,98 NS	H <sub>(2,26)</sub> = 0,30 NS	F <sub>(1,26)</sub> = 0,26 NS	F <sub>(1,26)</sub> = 0,66 NS

NS – статистически недостоверно, p > 0,05. Значения представлены в виде логарифма 2<sup>Δ</sup>((N цикла *M. musculus*) – (N цикла бактерии)), среднее ± стандартная ошибка (количество случаев).

видными показателями ухудшения состояния животных считаются потеря веса, пролапс и появление кровотечений (Ayres et al., 2012). Через неделю лечения антибиотиками не было выявлено изменений массы тела относительно исходного уровня (рис. 2) у всех исследованных генотипов (F<sub>(2,26)</sub> = 0,74, p > 0,05) независимо от их половой принадлежности (F<sub>(1,26)</sub> = 0,20, p > 0,05). Однако через две недели антибактериальной терапии влияние генотипа (F<sub>(2,26)</sub> = 18,98, p < 0,001), но не пола (F<sub>(1,26)</sub> = 0,99, p > 0,05), на привесы становилось статистически значимым и выражалось в наибольших положительных значениях у мышей C57BL/6J (7,93 ± 1,20 %) и отрицательных у линии *Muc2*<sup>-/-</sup>/*Kaiso*<sup>-/-</sup> (-2,18 ± 2,05 %). Мыши линии *Kaiso*<sup>-/-</sup> показывали промежуточный прирост массы тела (2,44 ± 2,17 %) (рис. 2).

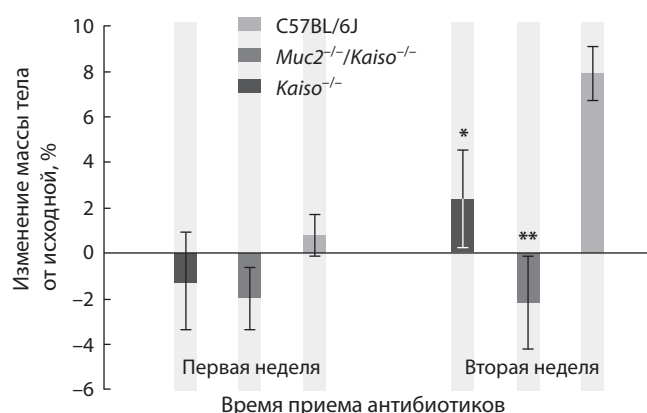
Несмотря на отсутствие изменений массы тела через одну неделю приема антибиотиков у 8 из 10 мышей линии *Muc2*<sup>-/-</sup>/*Kaiso*<sup>-/-</sup>, мы отмечали покраснение вокруг анального отверстия, а у одного животного была замечена кровь в фекальных массах. Данные признаки кишечного воспаления отсутствовали у животных других генотипов. Отличие линии *Muc2*<sup>-/-</sup>/*Kaiso*<sup>-/-</sup> от C57BL/6J и *Kaiso*<sup>-/-</sup> было статистически значимым: χ<sup>2</sup> = 13,33, p < 0,001. Через 3 дня после отмены антибиотиков в группе мышей, у которых отсутствует муцин-2 (*Muc2*<sup>-/-</sup>/*Kaiso*<sup>-/-</sup>), погибли 4 особи, среди животных двух других линий летального исхода отмечено не было (χ<sup>2</sup> = 5,0, p < 0,05). Таким образом, лечение антибиотиками инфекции *Helicobacter* spp. у животных с недостатком муцина-2 может быть причиной ухудшения самочувствия, которое впоследствии вызывает летальный исход.

Бактериальное исследование фекалий, собранных через одну неделю после курса стандартной терапии тремя антибиотиками (Kerton, Warden, 2006), показало полное освобождение от *Helicobacter* spp. мышей линий C57BL/6J и *Kaiso*<sup>-/-</sup>. Вместе с тем у мышей *Muc2*<sup>-/-</sup>/*Kaiso*<sup>-/-</sup>, выживших после курса терапии, *Helicobacter* spp. был детектирован в 50 % случаев. Зараженность мышей с дефицитом кишечного муцина статистически значимо превосходила таковую у мышей линий C57BL/6J и *Kaiso*<sup>-/-</sup> (χ<sup>2</sup> = 6,1, p < 0,05).



**Рис. 1.** Зависимость логарифма 2<sup>Δ</sup>((N цикла *M. musculus*) – (N цикла *E. coli*)) по оси ординат от логарифма 2<sup>Δ</sup>((N цикла *M. musculus*) – (N цикла *H. spp.*)) по оси абсцисс у животных разных генотипов.

C57BL/6J – белые точки; *Kaiso*<sup>-/-</sup> – черные точки; *Muc2*<sup>-/-</sup>/*Kaiso*<sup>-/-</sup> – серые точки. Сплошная линия – корреляционная зависимость у мышей линии *Muc2*<sup>-/-</sup>/*Kaiso*<sup>-/-</sup>; r – значение корреляции Спирмена для этой линии.



**Рис. 2.** Изменение массы тела (% от исходной массы) через одну и две недели приема антибиотиков у мышей разных генотипов. \* p < 0,05, t-критерий Стьюдента, \*\* p < 0,001, t-критерий Стьюдента.

Схему лечения тремя антибиотиками с добавлением их в корм успешно применяют для элиминации *Helicobacter* spp. в инфицированных колониях мышей. Преимущество этого метода заключается в отсутствии дополнительных манипуляций с животными, таких как кесарево сечение и пересадка новорожденных на выкармливание суррогатной матери (Martino-Cardona et al., 2010). Однако лечение тремя антибиотиками с добавлением их в корм не всегда эффективно, в частности при устранении *Helicobacter* spp. у животных с иммунодефицитами: Scid/*Trp53*<sup>-/-</sup>; TCR × Rag; HNT/TCR BALB/c; *Tnf*<sup>-/-</sup>; B6.129P2-IL10<sup>tm1Cgn</sup>/J. Несмотря на неэффективность элиминации *Helicobacter* spp. у таких животных, летальных исходов у них отмечено не было (Shomer et al., 1998; Kerton, Warden, 2006; Sharp et al., 2008).

Известно, что реакция организма на терапию антибиотиками зависит от состояния кишечной микрофлоры, нарушение которой может приводить к серьезным осложнениям (Ayres et al., 2012; Kamada et al., 2013). Количество симбиотических бактерий *E. coli*, которые обладают адгезивными свойствами к протеогликану кишечника, до начала приема антибиотиков у мышей всех генотипов было невысокое (табл. 2). Лечение антибиотиками привело к росту колоний *E. coli* в кишечнике, но только у генотипов с нормальной выработкой муцина-2: C57BL/6J и *Kaiso*<sup>-/-</sup> (парный критерий Вилкоксона  $Z = 2,4$ ,  $p < 0,05$  и  $Z = 2,5$ ,  $p < 0,05$  соответственно), тогда как у мышей с дефицитом муцина-2 *Muc2*<sup>-/-</sup>, *Kaiso*<sup>-/-</sup> количество *E. coli* осталось на прежнем уровне ( $Z = 0,25$ ,  $p > 0,05$ ) (табл. 2).

Таким образом, лечение антибиотиками мышей с дефицитом муцина-2 может быть не только малоэффективным для элиминации патогена, но и опасным для их жизни. А высокая восприимчивость к токсическому действию антибиотиков дает основание рекомендовать использование мышей с дефицитом муцина-2 в качестве тест-объекта для оценки фармакологической безопасности новых средств антибактериальной терапии.

## Благодарности

Задачи проведенного исследования сформулированы в рамках бюджетного проекта № VI.53.2.1. Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-07653.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

Ayres J.S., Trinidad N.J., Vance R.E. Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. *Nat. Med.* 2012;18(5):799-806. DOI: 10.1038/nm.2729  
Bergstrom K.S.B., Kisson-Singh V., Gibson D.L., Ma C., Montero M., Sham H.P., Vallance B.A. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog.* 2010;6(5):e1000902. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000902  
Bulois P., Desreumaux P., Neut C., Da A., Cortot A., Colombel J.F. Infectious agents and Crohn's disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 1999;5(10):601-604. DOI: 10.1111/j.1469-0691.1999.tb00415.x  
Chin E.Y., Dangler C.A., Fox J.G., Schauer D.B. *Helicobacter hepaticus* infection triggers inflammatory bowel disease in T cell recep-

tor *alpha* mutant mice. *Comparative Med.* 2000;50(6):586-594.  
Ghai O.P., Menon P.S.N., Bhuu M.K. Pathogenesis of diarrhea due to *Escherichia coli*. *Indian J. Pediatr.* 1980;47(4):311-316. DOI: 10.1007/BF02831325  
Hansson G.C., Johansson M.E.V. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut. Microbes.* 2010;1(1):51-54. DOI: 10.4161/gmic.1.1.10470  
Kamada N., Chen G.Y., Inohara N., Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.* 2013;14(7):685-690. DOI: 10.1038/ni.2608  
Kerton A., Warden P. Review of successful treatment for *Helicobacter* species in laboratory mice. *Lab. Anim.* 2006;40(2):115-122. DOI: 10.1258/002367706776319033  
Martens E.C., Koropatkin N.M., Smith T.J., Gordon J.I. Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: The bacteroidetes sus-like paradigm. *J. Biol. Chem.* 2009;284(37):24673-24677. DOI: 10.1074/jbc.R109.022848  
Martino-Cardona M. del C., Beck S.E., Brayton C., Watson J. Eradication of *Helicobacter* spp. by using medicated diet in mice deficient in functional natural killer cells and complement factor D. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2010;49(3):294-299.  
Monceaux C.P., Testerman T.L., Boktor M., Jordan P., Adegboyega P., Mcgee D.J., Alexander J.S. *Helicobacter* infection decreases basal colon inflammation, but increases disease activity in experimental IBD. *Open J. Gastroenterol.* 2013;3:177-189. DOI: 10.4236/ojgas.2013.33029  
Morgan X.C., Tickle T.L., Sokol H., Gevers D., Devaney K.L., Ward D.V., Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13(9):R79. DOI: 10.1186/gb-2012-13-9-r79  
Nicklas W., Baneux P., Boot R., Decelle T., Deeny A.A., Fumanelli M., Illgen-Wilcke B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 2002;36:20-42.  
Nicklas W., Deeny A., Diercks P., Gobbi A., Illgen-Wilcke B., Seidelin M. FELASA guidelines for the accreditation of health monitoring programs and testing laboratories involved in health monitoring. *Lab. Anim.* 2010;39(2):43-48. DOI: 10.1258/la.2009.009086  
O'Connor M. Ulcerative Colitis – Treatments, Special Populations and the Future. *Publ.: InTech*, 2011. DOI: 10.5772/2369  
Pilarczyk-Zurek M., Chmielarczyk A., Gosiewski T., Tomusiak A., Adamski P., Zwolinska-Wcislo M., Strus M. Possible role of *Escherichia coli* in propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol.* 2013;13(1):61. DOI: 10.1186/1471-230X-13-61  
Rakoff-Nahoum S., Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science.* 2007;317(5834):124-127. DOI: 10.1126/science.1140488  
Sharp J.M., Vanderford D.A., Chichlowski M., Myles M.H., Hale L.P. *Helicobacter* infection decreases reproductive performance of IL10-deficient mice. *Comparative Med.* 2008;58(5):447-453.  
Shomer N.H., Dangler C.A., Marini R.P., Fox J.G. *Helicobacter bilis/ Helicobacter rodentium* co-infection associated with diarrhea in a colony of SCID mice. *Lab. Anim. Sci.* 1998;48(5):455-459.  
Ubeda C., Taur Y., Jenq R.R., Equinda M.J., Son T., Samstein M., Pamer E.G. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J. Clin. Invest.* 2010;120(12):4332-4341. DOI: 10.1172/JCI43918  
Van der Sluis M., de Koning B.A.E., de Bruijn A.C.J.M., Velcich A., Meijerink J.P.P., van Goudoever J.B., Einerhand A.W.C. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology.* 2006;131(1):117-129. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.04.020  
Wlodarska M., Willing B., Keeney K.M., Menendez A., Bergstrom K.S., Gill N., Finlay B.B. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infect. Immun.* 2011;79(4):1536-1545. DOI: 10.1128/IAI.01104-10