

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-239-7-162-181>

Изменения кишечного микробиома и нарушения структуры кишечника у крыс с разной тяжестью экспериментального аллергического энцефаломиелита*

Бынзарь В.В., Мацулевич А.В., Грефнер Н.М., Новикова Н.С., Абдурасулова И.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт Экспериментальной Медицины», (ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-Петербург, 197022, Россия)

Для цитирования: Бынзарь В.В., Мацулевич А.В., Грефнер Н.М., Новикова Н.С., Абдурасулова И.Н. Изменения кишечного микробиома и нарушения структуры кишечника у крыс с разной тяжестью экспериментального аллергического энцефаломиелита. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2025;(7): 162–181 doi: 10.31146/1682-8658-ecg-239-7-162-181

✉ **Для переписки:**

Бынзарь

Валерия

Виореловна

valeria200292@mail.ru

Бынзарь Валерия Виореловна, лаборант-исследователь, лаборатория нейробиологии интегративных функций мозга, физиологический отдел им. академика И.П. Павлова
Мацулевич Анна Викторовна, научный сотрудник; лаборатория нейробиологии интегративных функций мозга, физиологический отдел им. академика И.П. Павлова
Грефнер Надежда Михайловна, ведущий инженер; лаборатория нейробиологии интегративных функций мозга, физиологический отдел им. академика И.П. Павлова
Новикова Наталья Сергеевна, старший научный сотрудник; лаборатория иммунопатофизиологии, отдел общей патологии и патофизиологии
Абдурасулова Ирина Николаевна, зав. лабораторией нейробиологии интегративных функций мозга, физиологический отдел им. академика И.П. Павлова

Резюме

* **Иллюстрации**
7–9 – на цветной
вклейке в журнал
(стр. II–IV).

Рассеянный склероз (РС) – хроническое аутоиммунное заболевание ЦНС, сопровождающееся воспалительной демиелинизацией и нейродегенерацией. Одним из перспективных направлений исследований является изучение оси «микробиота – кишечник – мозг». Показано, что нарушения кишечного барьера и изменения состава микробиоты могут предшествовать клиническим проявлениям РС, однако их связь с тяжестью заболевания остаётся неясной. Модель экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) у грызунов широко применяется для изучения патогенеза РС. Она воспроизводит ключевые иммунные и морфологические изменения. Несмотря на накопленные данные, сравнительные исследования таксономического состава микробиоты и структурных изменений кишечника при различных вариантах течения ЭАЭ ограничены.

Цель исследования – сравнить таксономический состав кишечного микробиома и структурные изменения кишечного эпителия у крыс с разной степенью тяжести ЭАЭ.

Исследование проведено на 39 самках крыс Wistar (интактные, n=9; с индуцированным ЭАЭ, n=30). ЭАЭ индуцировали однократной подкожной инъекцией гомогената спинного мозга в полном адьюванте Фрейнда. Морфологические и ультраструктурные изменения кишечного эпителия оценивались с помощью электронной микроскопии и гистологических методов. Анализ таксономического состава кишечной микробиоты методом секвенирования гена *16S* рРНК на платформе Illumina с универсальными праймерами v3-v4.

При сравнении кишечного микробиома легко и тяжело болевших крыс выявлены значимые различия в представленности 4-х филумов *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Actinomycetota* и *Cyanobacteriota*. В исходном микробиоме тяжело болевших крыс было увеличено содержание класса *Epsilonproteobacteria* (*Pseudomonadota*). Клинические симптомы развивались в обеих группах на фоне снижения численности *Bacteroidota* (семейство *Prevotellaceae*). В фазу выздоровления численность *Bacteroidota* восстанавливалась только у легко болевших и выздоровевших животных. У крыс с тяжелым течением ЭАЭ в этот период возрастала численность *Actinomycetota*. На уровне рода различная динамика изменений в течение ЭАЭ между группами выявлена по 9 родам (неклассифицированным *Clostridiaceae* и *Peptoscreptococaceae*, *Allobaculum*, *Turicibacter*, *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Desulfovibrio* и *Bifidobacterium*).

На фоне более значимых изменений состава кишечного микробиома у крыс с тяжёлым течением ЭАЭ выявлены более выраженные морфологические изменения в кишечнике. На пике заболевания в кишечнике крыс выявлена лейкоцитарная инфильтрация слизистой, снижение количества бокаловидных клеток, уменьшение длины и утолщение ворсинок тонкой кишки, а также уменьшение глубины крипт толстой кишки, коррелировавшие с тяжестью заболевания. Ультраструктурный анализ показал повреждение митохондрий и микроворсинок энтероцитов и колоноцитов, более выраженное у тяжело болеющих животных.

EDN: TJXZSO



Полученные данные подтверждают участие оси «микробиота – кишечник – мозг» в развитии аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний ЦНС. Выявленная связь между морфологическими изменениями кишечника, составом микробиоты и тяжестью ЭАЭ указывает на перспективность модуляции кишечного воспаления и барьерной функции в терапии рассеянного склероза.

Ключевые слова: экспериментальный аллергический энцефаломиелит, рассеянный склероз, желудочно-кишечный тракт, кишечная микробиота, бокаловидные клетки, воспаление

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Changes in the intestinal microbiome and disturbances in intestinal structure in rats with different severity of experimental allergic encephalomyelitis*

V.V. Bynzar, A.V. Matsulevich, N.M. Grefner, N.S. Novikova, I.N. Abdurasulova
Institute of Experimental Medicine, (12, Acad. Pavlov Str, St. Petersburg, 197376, Russia)

For citation: Bynzar V.V., Matsulevich A.V., Grefner N.M., Novikova N.S., Abdurasulova I.N. Changes in the intestinal microbiome and disturbances in intestinal structure in rats with different severity of experimental allergic encephalomyelitis. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2025;(7): 162–181. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-239-7-162-181

✉ **Corresponding author:**

Valeria V. Bynzar
valeria200292@mail.ru

Valeria V. Bynzar, Research Assistant; Laboratory of Neurobiology of Integrative Functions of the Brain, I.P. Pavlov Physiological Department; ORCID: 0009-0000-4830-3068

Anna V. Matsulevich, Researcher; Laboratory of Neurobiology of Integrative Functions of the Brain, I.P. Pavlov Physiological Department; ORCID: 0000-0002-0030-9548

Nadezhda M. Grefner, Lead Engineer; Laboratory of Neurobiology of Integrative Functions of the Brain, I.P. Pavlov Physiological Department; ORCID: 0009-0005-9795-1180

Natalia S. Novikova, Senior Researcher; Laboratory of Immunopathophysiology, Department of General Pathology and Pathophysiology; ORCID: 0000-0001-6093-8744

Irina N. Abdurasulova, Head of the Laboratory of Neurobiology of Integrative Functions of the Brain, I.P. Pavlov Physiological Department; ORCID: 0000-0003-1010-67683

Summary

* Illustrations 7–9 are on the colored inset of the Journal (p. II–IV).

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disorder of the central nervous system, characterized by inflammatory demyelination and neurodegeneration. Increasing attention has been directed to the “microbiota–gut–brain” axis, as intestinal barrier dysfunction and alterations in gut microbiota composition have been reported to precede the clinical onset of MS, although their association with disease severity remains uncertain. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in rodents is a well-established model that reproduces the key immunological and morphological features of MS. However, comparative investigations addressing both the taxonomic structure of the microbiota and intestinal morphological changes across different severities of EAE remain scarce.

To compare the taxonomic composition of the gut microbiota and structural alterations of the intestinal epithelium in rats with different severities of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

The study was conducted on 39 female Wistar rats (intact, n=9; EAE-induced, n=30). EAE was induced by a single subcutaneous injection of spinal cord homogenate in complete Freund’s adjuvant. Morphological and ultrastructural changes in the intestinal epithelium were assessed using histological techniques and electron microscopy. The taxonomic composition of the gut microbiota was analyzed by 16S rRNA gene sequencing.

When comparing the intestinal microbiome of mildly and severely ill rats, significant differences were observed in the representation of 4 phyla: *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Actinomycetota* and *Cyanobacteriota*. In the baseline microbiome of severely affected rats, the abundance of the class *Epsilonproteobacteria* (*Pseudomonadota*) was increased. Clinical symptoms developed in both groups against the background of a decreased number of *Bacteroidota* (family *Prevotellaceae*). During the recovery phase, the abundance of *Bacteroidota* was restored only in mildly affected and recovered animals, whereas in rats with severe EAE the proportion of *Actinomycetota* increased. At the genus level, distinct group-specific dynamics during EAE were identified for 9 genera (unclassified *Clostridiaceae* and *Peptoscryptococaceae*, *Allobaculum*, *Turcibacter*, *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Desulfovibrio* and *Bifidobacterium*).

Alongside more pronounced alterations in the gut microbiome, rats with severe EAE displayed significant morphological changes in the intestine. At the peak of the disease, leukocyte infiltration of the mucosa, reduction in goblet cells numbers, shortened and thickened small intestinal villi and decreased crypt depth in the colon were observed, all correlating with

the severity of the disease. Ultrastructural analysis further revealed mitochondrial and microvilli damage in enterocytes and colonocytes, which was more pronounced in severely affected animals.

These findings support the involvement of the “microbiota–gut–brain” axis in the development of autoimmune demyelinating CNS disorders. The observed association between intestinal morphological alterations, gut microbiota composition, and EAE severity highlights the potential of targeting intestinal inflammation and barrier function for therapeutic strategies in multiple sclerosis.

Keywords: experimental allergic encephalomyelitis, multiple sclerosis, gastrointestinal tract, intestinal microbiota, goblet cells, inflammation

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Принятые сокращения:

РС = рассеянный склероз
ЭАЭ = экспериментальный аллергический энцефаломиелит
ВЗК = воспалительное заболевание кишечника
СРК = синдром раздраженного кишечника
ЖКТ = желудочно-кишечный тракт

Abbreviations:

MS = multiple sclerosis;
EAE = experimental allergic encephalomyelitis;
IBD = inflammatory bowel disease;
IBS = irritable bowel syndrome;
GT = gastrointestinal tract

Введение

Рассеянный склероз (РС) – хроническое аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся воспалительной демиелинизацией и нейродегенерацией [1]. Этиопатогенез РС включает сложные взаимодействия между генетической предрасположенностью и факторами окружающей среды, ведущие к активации аутореактивных лимфоцитов, их проникновению через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), что запускает воспалительные и аутоиммунные реакции в ЦНС, приводящие к разрушению миелина и повреждению нейронов в головном и спинном мозге [1, 2]. Несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов запуска и развития заболевания, многие аспекты все еще остаются не изученными до конца. В последние годы, в свете сформировавшихся представлений об оси «микробиота – кишечник – мозг», обсуждается роль кишечной микробиоты и кишечного тракта в инициации и развитии нейровоспаления, а также аутоиммунных и нейродегенеративных процессов при РС [3, 4, 5].

Кишечник является местом обитания разнообразного бактериального сообщества – кишечной микробиоты, которая в состоянии эубиоза выполняет в организме хозяина дополнительные функции, важные для его здоровья, в частности, участвует в колонизационной резистентности, поддержании целостности кишечного барьера [6–10]. Нарушение целостности кишечного барьера (“leaky gut”) наблюдается при многих заболеваниях – синдроме раздраженного кишечника (СРК), воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), ожирении, метаболическом синдроме, некротическом энтероколите [11, 12, 13]. Появились данные, что при РС также нарушается барьерная функция кишечника, причем это происходит задолго до поражения ЦНС и появления клинической

симптоматики [14]. Кроме того известно, что у пациентов, страдающих от рассеянного склероза, параллельно имеются нарушения деятельности желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в частности, замедление моторики кишечника, запоры, диарея [15, 16, 17]. Показана высокая коморбидность рассеянного склероза и воспалительных заболеваний ЖКТ – болезни Крона и язвенного колита [18, 19, 20].

Ряд работ демонстрирует наличие изменений таксономического состава кишечного микробиома при РС [21, 22, 23], показана также взаимосвязь состава микробиома с типами течения РС [24, 25] и с возрастом манифестации заболевания [26], но не известно, влияет ли состав микробиоты на течение РС.

Для изучения патогенеза РС широкое распространение получила модель экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ), воспроизводимая у грызунов путем инокуляции гомогената нервной ткани, богатой миелином, очищенными белками миелина, энцефалитогенными пептидами или адоптивным переносом энцефалитогенных Т-лимфоцитов [27]. Для моделирования разных типов течения ЭАЭ используются животные определенных генетических линий, например, мыши линий SJL/J, C57BL/6 и NOD [28, 29, 30] или нелинейные животные. Воспроизведение патологических процессов, характерных для РС, на последних лучше отражает генетическую разнородность человеческой популяции и дает большую вариативность клинических симптомов.

Типичное течение ЭАЭ у грызунов характеризуется восходящим парезом / параличом, начинающимся с хвоста, за которым последовательно развивается парез / паралич задних и передних лап [31]. Это делает модель ценным инструментом для изучения как центральных, так и периферических компонентов патогенеза заболевания.

В ряде работ на модели ЭАЭ показано, что изменения в кишечнике предшествуют клиническим проявлениям заболевания. В частности, наблюдается инфильтрация слизистой оболочки Т-лимфоцитами, макрофагами, дендритными клетками и нейтрофилами, деструкция плотных контактов и повышение уровня провоспалительных цитокинов [32–37]. У животных с ЭАЭ в кишечнике также отмечается гиперплазия бокаловидных клеток, которая описана при многих инфекциях, вызванных бактериями и вирусами. В ряде случаев, напротив, наблюдается уменьшение количества бокаловидных клеток [34].

Материалы и методы

Животные

Исследование выполнено на 39 самках крыс Wistar (питомник Рапполово, Ленинградская обл., Россия). Согласно литературным данным, самки крыс более подвержены заболеванию, чем самцы, и имеют более выраженные неврологические проявления [38]. Согласно статистическим данным, РС чаще встречается у женщин, чем у мужчин, и диагностируется на несколько лет раньше [39], поэтому данное исследование проводилось на самках крыс.

Количество животных было определено, исходя из минимально необходимого для получения

Индукция и оценка тяжести ЭАЭ

ЭАЭ индуцировали путем однократного подкожного введения гомогената гомологического спинного мозга в полном адьюванте Фрейнда по стандартному протоколу [40]. Данный способ иммунизации вызывает у крыс развитие выраженных парезов и параличей, появление воспалительных инфильтратов в спинном мозге и гибель нейронов, что моделирует характерные для рассеянного склероза симптомы заболевания и морфологические изменения [41]. Приготовление энцефалитогенной смеси (ЭГС) осуществляли *ex tempore*, исходя из количества необходимых компонентов на 1 животное: 100 мг гомогената спинного мозга крыс + 0.2 мл 0.9% NaCl + 0.2 мл полного адьюванта Фрейнда (Sigma). Энцефалитогенная смесь вводилась в основание хвоста в объеме 0.4 мл под легким эфирным наркозом.

Определение состава кишечного микробиома методом секвенирования гена 16S рРНК

Определение состава микробиома проводили в фекальных пробах. Образцы фекалий крыс для определения состава микробиоты собирали непосредственно перед индукцией ЭАЭ, а также на пике заболевания (15 день) и в фазу выздоровления (30 день) (рис. 1). После сбора образцы немедленно замораживались при -80°C и хранились до исследования. Анализировали образцы фекалий одних и тех же крыс (с легким течением ЭАЭ: $n = 4$ и тяжелым течением ЭАЭ: $n = 6$), контролем для каждой крысы служил образец, взятый до индукции ЭАЭ.

Выделение ДНК из образцов фекалий проводили с помощью набора «ДНК-сорб В» (Next-Bio,

Несмотря на повышенный интерес к кишечной микробиоте при РС и ЭАЭ, сравнительно небольшое количество исследований посвящено изучению влияния кишечной микробиоты на течение заболевания, а также морфологическим изменениям в слизистой оболочке кишечника – гистологической структуре, ультраструктурным изменениям эпителия, воспалительной инфильтрации.

В связи с этим, цель исследования – сравнить вариацию таксономического состава кишечного микробиома и структурные изменения в кишечном эпителии в процессе развития ЭАЭ у крыс с разной тяжестью заболевания.

статистически значимых различий с добавлением дополнительного числа для морфологических исследований. Животные были разделены на 2 группы: интактные ($n = 9$) и с индуцированным ЭАЭ ($n = 30$).

Крысы содержались в стандартных условиях вивария при температуре воздуха $+20-22^{\circ}\text{C}$ с чередованием светового режима-12 часов день/12 часов ночь, со свободным доступом к еде и воде. Использовался корм ПК-120-1 (ООО «Лабораторкорм», Россия), изготовленный по ГОСТ Р 50258-92 с энергетической ценностью 295 ккал/кг.

Тяжесть ЭАЭ оценивали по наличию и выраженности парезов и параличей конечностей и хвоста по шкале: 0.5 балла – незначительное снижение мышечной силы, 1 балл – перманентный парез, 1.5 балла – паралич. Расчет клинического индекса (КИ) включал суммирование полученных баллов за каждую конечность, как описано ранее [40]. Если у животного не наблюдалось видимых признаков патологии, то принимали $\text{КИ} = 0$, в случае же летального исхода $\text{КИ} = 6$.

На основании тяжести заболевания крысы с ЭАЭ были разделены на 2 подгруппы – легко (MD) и тяжело (SD) болеющих крыс. Легко болеющими считали крыс с КИ макс < 3.5 баллов, КИ кум < 50 баллов, тяжело болеющими считали крыс с КИ макс > 4 баллов, КИ кум > 70 баллов. Дальнейший анализ проводился в этих подгруппах отдельно.

Санкт-Петербург, Российская Федерация), согласно инструкции производителя. ДНК элюировали в 50 мкл TE-буфера.

Для приготовления ампликонных библиотек методом ПЦР в каждой пробе проводили амплификацию с универсальными праймерами на переменный участок v3-v4 гена 16S рРНК, специфичными для широкого круга микроорганизмов, включая бактерии и археи (F515; GTGCCAGCMGCCGCGGTAA и R806; GGACTACVSGGGTATCTAAT; [42] с добавлением служебных последовательностей по технологии Illumina, содержащих линкеры и баркоды. ПЦР

Рисунок 1.

Схема эксперимента

Обозначения:

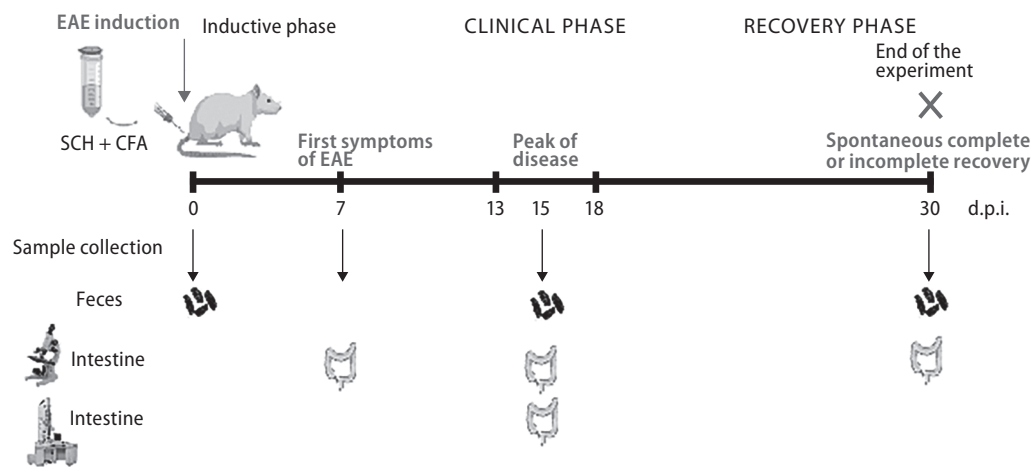
d.p.i. – день после индукции ЭАЭ;
SCH – гомогенат спинного мозга;
CFA – полный адъювант Фрейнда

Figure 1.

Experimental design

Abbreviations:

d.p.i. – day after EAE induction;
SCH – spinal cord homogenate;
CFA – complete Freund's adjuvant



была проведена в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5–1.0 единицу активности полимеразы Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 10 нг ДНК-матрицы и 2нМ каждого dNTP (LifeTechnologies). Смесь денатурировали при 94 °С 1 мин., после чего следовало 35 циклов: 94 °С – 30 с, 50 °С – 30 с, 72 °С – 30 с. Финальная элонгация проводилась при 72 °С 3 мин. ПЦР продукты очищали по рекомендованной Illumina методике с использованием AMPureXP (BeckmanCoulter, США). Дальнейшую подготовку библиотек проводили в соответствии с инструкцией производителя MiSeq Reagent Kit Preparation Guide (Illumina). Библиотеки секвенировали в соответствии с инструкцией изготовителя на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США), используя набор реактивов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2*300 н). Двусторонние прочтения проверяли по качеству секвенирования, удаляли служебные последовательности, сортировали

по баркодам, сливали в единую последовательность с использованием оригинального ПО Illumina.

Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывали с помощью пакетов ПО “Trimmomatic” [43] и “QIIME” [44]. Сначала был произведен первичный анализ качества прочтения, отбор последовательностей на основе качества чтения отдельных оснований (base pair quality), объединение парно-концевых последовательностей с участком перекрытия не менее 35 оснований, а также удаление последовательностей, длина которых составляет менее 180 пар нуклеотидов. На втором этапе обработки осуществлялось удаление из библиотек всех служебных участков (праймеров), а также последовательностей, содержащих протяженные гомополимерные повторы. При анализе бактериальных сообществ использовался *de novo* ОТЕ-пикинг. Таксономическая идентификация ОТЕ проводилась с помощью базы данных Ribosomal Database Project (RDP).

Исследование морфологической структуры кишечника

Образцы тонкой и толстой кишки для исследования структуры ткани кишечника отбирали на 7-й (конец латентной фазы, n=5), 15-й (n=3 и n=3, соответственно с легким течением ЭАЭ и тяжелым течением ЭАЭ) и 30-й (n=3 и n=3, соответственно с легким и тяжелым течением ЭАЭ) дни после индукции ЭАЭ.

Изъятие материала осуществлялось после декапитации крыс, далее животное фиксировали в положении на спине и производили вскрытие с забором одинаковых участков среднего отдела тонкой кишки и поперечно-ободочной части толстой кишки. Фиксация материала производилась методом погружения в забуференный раствор 4% формалина (1:20). Фиксацию проводили в течение 1 суток при комнатной температуре, с последующей сменой фиксатора и хранении при температуре +4° С.

Оценка морфологических изменений в слизистой оболочке тонкой и толстой кишки крыс

В качестве исследуемых параметров в слизистой тонкой кишки измеряли длину и ширину ворсинок, количество бокаловидных клеток на 500 эпителиоцитов, а также количество лейкоцитов в собственной пластинке слизистой ворсинки в пересчете на единицу площади (на 1000 мкм²

После фиксации материал подготавливали к заливке в парафин путем проведения его по возрастающей концентрации спиртов и хлороформа, подготовленные парафиновые блоки нарезали на микротоме (Thermo Fisher Scientific HM 430) толщиной 6 мкм. Полученные поперечные срезы толстого и тонкого отделов кишки окрашивали гематоксилином Майера и водно-спиртовым раствором эозина, альциановым синим для визуализации морфологических структур и последующего анализа [45].

Окрашенные гистологические препараты тонкого и толстого отделов кишечника крыс рассматривали под оптическим микроскопом Leica DM2500 и обрабатывали с помощью программного обеспечения ВидеоТесТ-Морфология 5.2.

площади), в слизистой толстой кишки изучали глубину и ширину крипт, рассчитывали количество бокаловидных клеток на крипту, а также вели подсчет лейкоцитов в соединительной ткани складок слизистой между криптами (на 1 мм² площади). На каждом срезе просматривали 15–20 полей зрения.

Электронная микроскопия

Забор материала для исследования ультраструктуры кишечника осуществляли на 15-й ($n = 3$) и 30-й день ($n = 3$). В качестве контроля служили крысы без индукции ЭАЭ ($n = 3$). Подготовку образцов тонкой и толстой кишки для электронной микроскопии готовили по общепринятой методике [46]. Фрагменты тонкой и толстой кишки размером 3 x 3 мм фиксировали в 2% растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (PBS) в течение 2 часов, промывали в PBS 3 раза по 10 мин, постфиксировали в 1% растворе OsO_4 на PBS в течение 1 часа и вновь промывали. Затем образцы обезвоживали в растворе спиртов в возрастающих концентрациях,

смеси спирта с ацетоном и ацетоне. Далее образцы ткани заключали в смесь смол эпона с аралдитом (Sigma – Aldrich, США). В заключение смолу полимеризовали в течение 2х суток, повышая температуру от 35° до 60° С. Из блоков с образцами кишечника на ультратоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия) изготавливали ультратонкие срезы, снимали их на сетки с коллоидной пленкой и контрастировали их по 10 мин в растворе уранилацетата и в растворе цитрата свинца. Подготовленные таким образом срезы изучали под электронным микроскопом Jeol JEM-2100 и Jeol JEM-1400 (JEOL Ltd, Япония).

Статистическая обработка

Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 10.0, для построения графиков использовалась программа GraphPad Prism 9.0. Для проверки нормальности распределения применяли критерий Колмогорова-Смирнова, далее

для сравнения различий между группами использовали t-тест и 2-х факторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты исследования

Течение экспериментального аллергического энцефаломиелимита

Введение энцефалитогенной смеси индуцировало развитие ЭАЭ у 100% крыс. Первые клинические симптомы у животных появлялись на 7–8-й день после индукции ЭАЭ. Как правило, своего пика клинические проявления достигали в интервале 13–18 день, затем следовало снижение тяжести симптомов и спонтанное частичное или полное выздоровление крыс. Так как на 15-й и 30-й день крысы с индуцированным ЭАЭ были разнородны по показателям КИ, были выделены две подгруппы: легко болеющих (MD, $n = 10$) и тяжело болеющих (SD, $n = 20$).

Как видно из рис. 2a, 2d, в группе SD симптомы заболевания проявлялись раньше, после чего наступало стремительное нарастание клинических проявлений до почти полного паралича тела животного, что отражается в больших

значениях кумулятивного КИ (50 баллов vs 80 в группе MD и SD, соответственно). У 14% крыс заболевание закончилось летально (КИ=6 баллов). Выздоровление в группе SD происходило медленно, и к концу исследования, когда легко болеющие животные практически полностью поправились, у этих крыс все еще сохранялись значительные неврологические нарушения (мышечная слабость, параличи/парезы конечностей и/или хвоста), КИ реконвалесценции в этой подгруппе составил 2.5–3.0 балла.

В фазу пика заболевания в группе MD КИ был на 1.5 балла ниже, чем в группе SD (КИ=3.5 vs 5, соответственно), и на 30-й день после индукции ЭАЭ крысы этой группы полностью выздоравливали или имели остаточные симптомы ЭАЭ в виде незначительного ослабления мышечной силы.

Оценка изменений состава кишечного микробиома

В составе кишечного микробиома крыс перед индукцией ЭАЭ определялись представители 13 филумов, среди которых доминировали *Bacillota* (ранее *Firmicutes*) и *Bacteroidota* (ранее *Bacteroidetes*), при этом отмечалась высокая межиндивидуальная вариабельность представленности минорных филумов, как перед индукцией ЭАЭ (Рис. 3a), так и на пике заболевания (рис. 3b) и в фазу выздоровления (рис. 3c). Прослеживались определенные закономерности в составе кишечного микробиома у MD и SD крыс.

Достоверные различия между группами выявлены по 4-м филумам: *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Actinomycetota* и *Суанобактериота* (рис. 3 d-g), все они относились к фазе выздоровления, при этом перед индукцией ЭАЭ и на пике заболевания на уровне филумов достоверных различий не наблюдалось. Хотя на пике заболевания у крыс MD доля филума *Bacillota* была выше (рис. 3g), чем у крыс SD, эти различия были лишь на уровне тенденции ($p=0.08$).

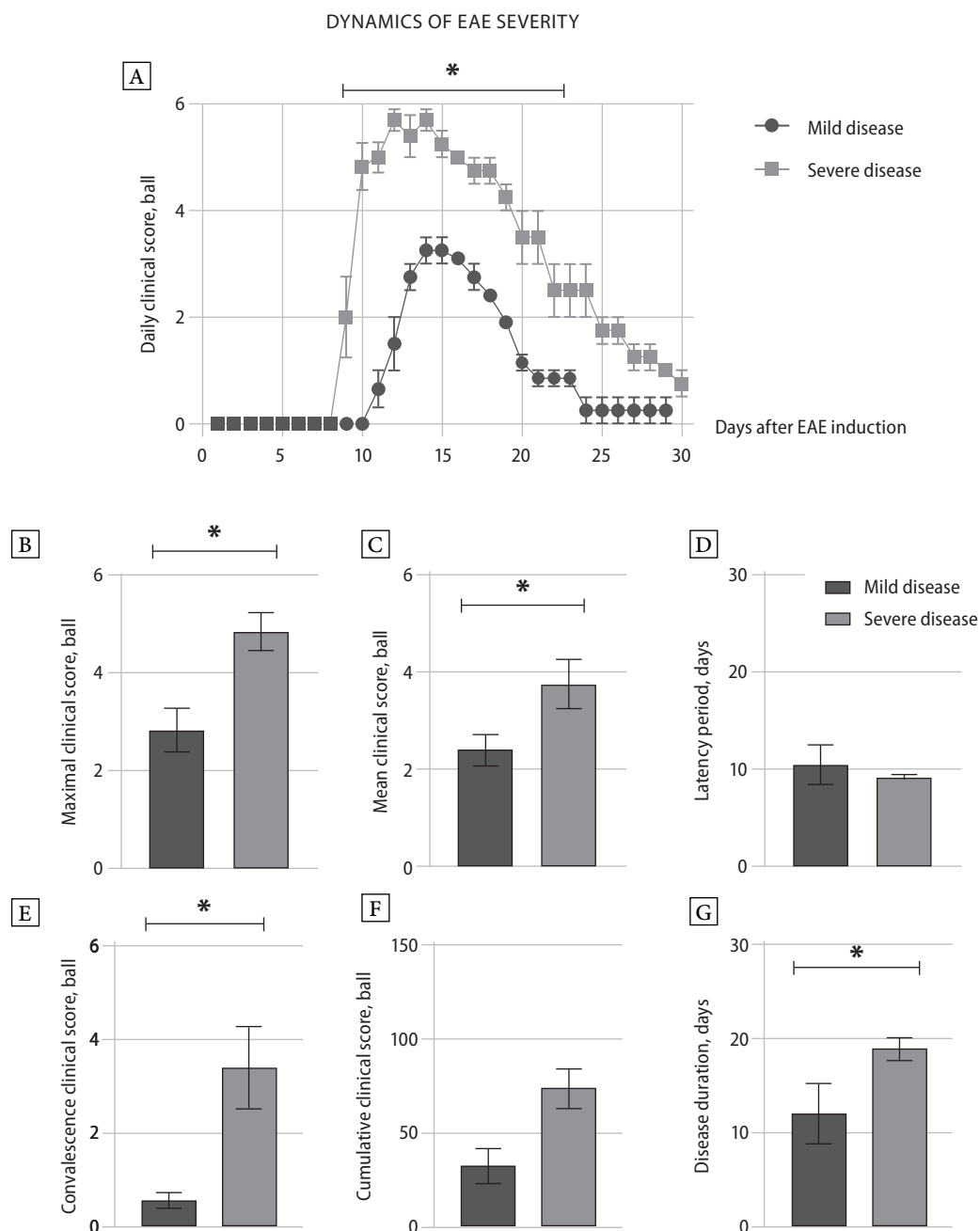
Колебания численности *Bacillota* отмечалось только в группе MD, значимые различия выявлены между 15 и 30 днем. У крыс SD *Bacillota* оставались на одном уровне на всех фазах заболевания.

Доля филума *Bacteroidota* на пике ЭАЭ уменьшалась по сравнению с исходной в обеих группах, независимо от тяжести заболевания (рис. 3e), хотя эти различия не достигали статистической значимости. В группе MD в фазу выздоровления представленность *Bacteroidota* возвращалась к исходному уровню, при этом в группе SD – продолжала уменьшаться. В результате, на 30-й день в группе SD численность представителей этого филума была в 5 раз меньше, чем в группе MD.

Зато в группе SD, как видно на рисунке 3f, на 30-й день резко возросла представленность минорного филума *Actinomycetota*, тогда как в группе MD численность этих микроорганизмов не изменялась в процессе развития ЭАЭ.

Рисунок 2.
Характеристика течения ЭАЭ у животных с разной тяжестью ЭАЭ

Figure 2.
Characteristics of EAE progression in animals with different disease severity.



Примечания:

SD – Severe disease – тяжело болеющая группа (n=18); MD – Mild disease – легко болеющая группа (n=12)

Представлены данные о динамике развития ЭАЭ (а), максимальном клиническом индексе (б), среднем клиническом индексе (с), продолжительности латентного периода (д), индексе реконвалесценции (е), кумулятивном клиническом индексе (ф), длительности заболевания (г). Данные представлены в виде гистограммы (среднее ± ошибка среднего). Статистически значимые различия между группами: * – p<0.05, t-критерий

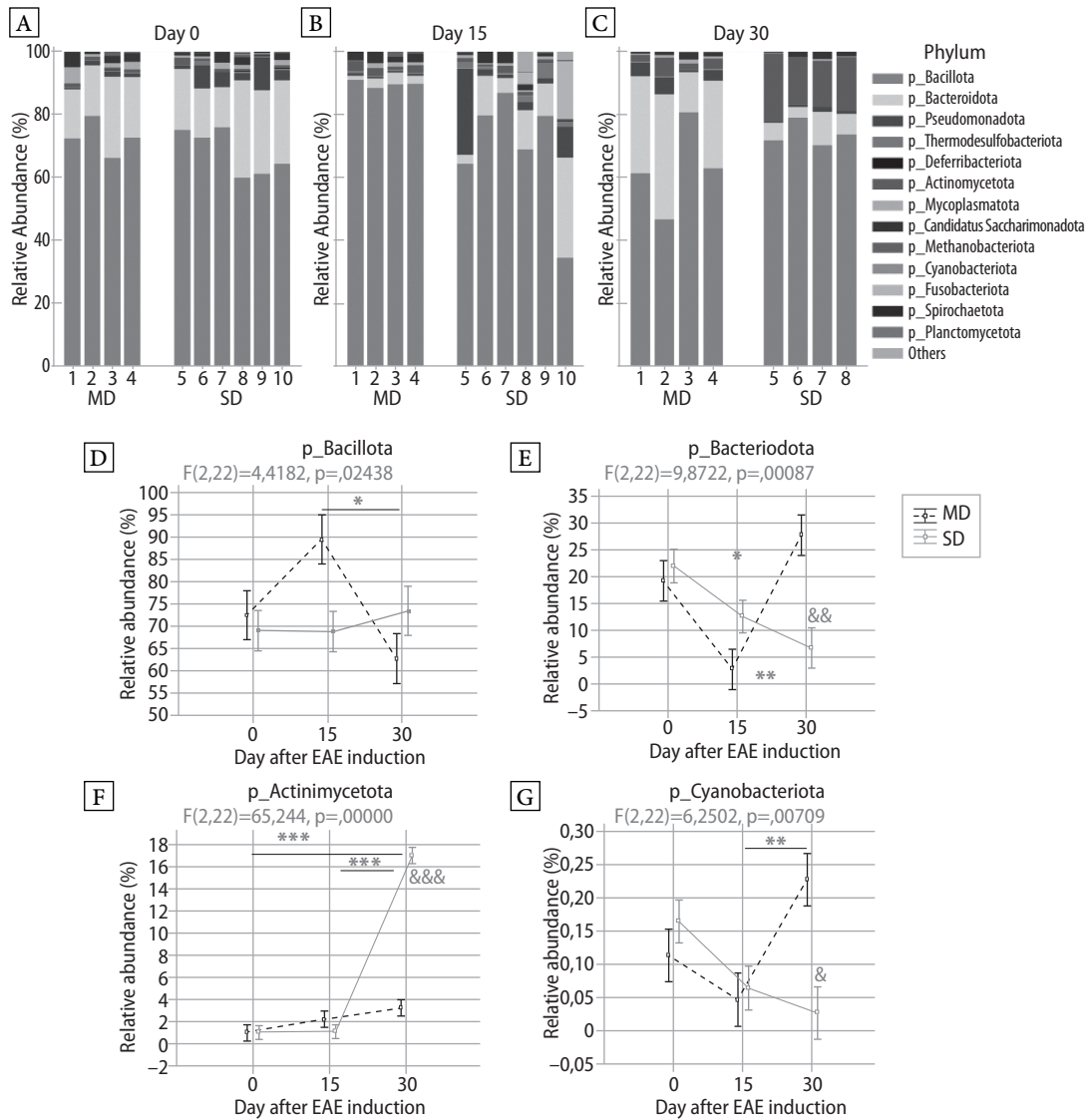
Abbreviations:

SD – Severe disease group (n=18); MD – Mild disease group (n=12). Dynamics of EAE development (a), maximal clinical score (b), mean clinical score (c), latency period duration (d), convalescence clinical score (e), cumulative clinical score (f), disease duration (g) are presented. The data are shown as a histogram (mean ± standard error of the mean). Statistically significant differences between groups: * – p<0.05, t-test.

В группе MD в фазу выздоровления была выше представленность *Cyanobacteriota* (рис. 3г), хотя в целом эти микроорганизмы составляют незначительную часть микробного сообщества.

Анализ состава микробиома на уровне классов также показал высокую межиндивидуальную вариабельность (рис. 4 а-с), при этом крысы внутри групп имели более сходный состав микробиома, чем между группами.

Рисунок 3. Сравнение состава кишечного микробиома легко и тяжело болеющих крыс с ЭАЭ на уровне филумов
Figure 3. Comparison of the gut microbiome composition at the phylum level in rats with mild and severe EAE.



Примечания:

a-c – изменения соотношений различных бактериальных филумов в составе кишечного микробиома у отдельных крыс: а – перед индукцией ЭАЭ (Day 0); b – на пике заболевания (Day 15); c – в фазу выздоровления (Day 30); d-g – изменение содержания отдельных филумов в группах с легким (MD - mild disease) и тяжелым (SD - severe disease) течением ЭАЭ; цифрами 1–10 – обозначены номера животных, меньшее количество животных на 30-й день из-за летального исхода ЭАЭ у крыс 9 и 10; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – достоверные различия между различными днями внутри групп, & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$, &&& – $p < 0.001$ – достоверные различия между группами в соответствующий день; 2-х факторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки.

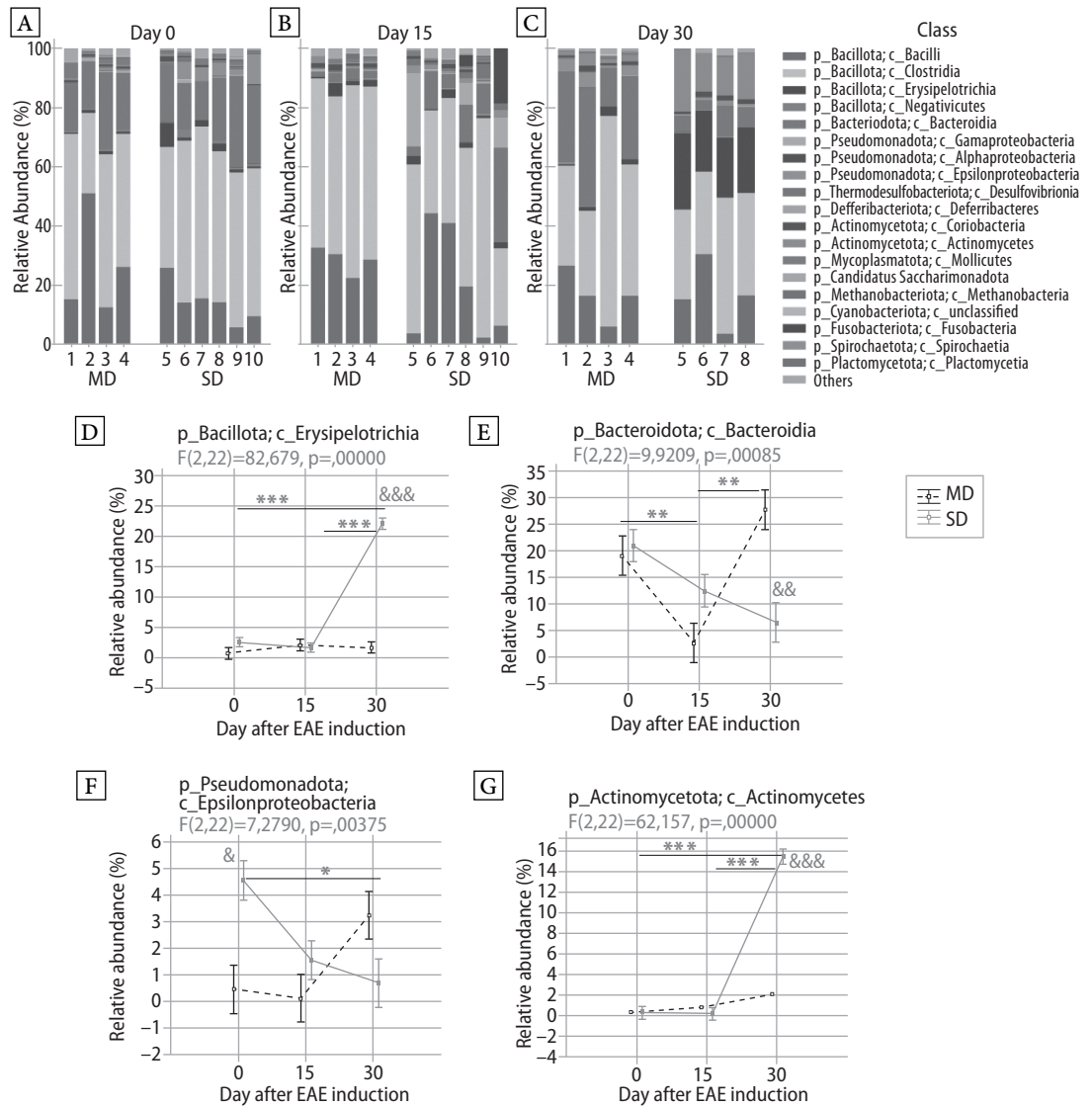
(a-c) Changes in the ratios of different bacterial phyla in the gut microbiome of individual rats: (a) – before EAE induction (Day 0); (b) – at the peak of the disease (Day 15); (c) – in the recovery phase (Day 30). Numbers 1–10 indicate individual animal IDs. Fewer animals are present on Day 30 due to the lethal outcome of EAE in rats 9 and 10. (d-g) Changes in the abundance of individual phyla in the Mild Disease (MD) and Severe Disease (SD) groups. Statistical significance: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, respectively, indicate significant differences between different days within the same group; & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$, &&& – $p < 0.001$, respectively, indicate significant differences between the MD and SD groups on the corresponding day. Analysis was performed using two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

Хотя содержание филума *Pseudomonadota* в целом не различалось между группами, его представители из класса *Epsilonproteobacteria* составляли большую долю в микробиоме крыс SD, чем у MD перед индукцией ЭАЭ (рис. 4g). Это единственные микроорганизмы, различавшиеся по численности исходно ($p=0.023$).

Примечательно, что в филуме *Bacillota*, представленность которого в группе SD значимо не изменялась, на 30-й день у крыс этой группы отмечалось

возрастание представителей класса *Erysipelotrichi*, относящихся к *Bacillota* (рис. 4d). Аналогичная динамика отмечалась у *Actinimycetes* – представителей филума *Actinimycetota* (рис. 4f). На более высоком уровне у крыс MD, подъем был связан с возрастанием (рис. 4b), а увеличение численности *p_Actinimycetota* – с классом *Actinimycetes* (рис. 4d). Колебания численности филума *Bacteroidota* в группе MD обусловлены классом *Bacteroidia* (рис. 4c).

Рисунок 4. Сравнение состава кишечного микробиома на уровне классов у крыс с легким и тяжелым течением ЭАЭ
Figure 4. Comparison of the gut microbiome composition at the class level in rats with mild and severe EAE.



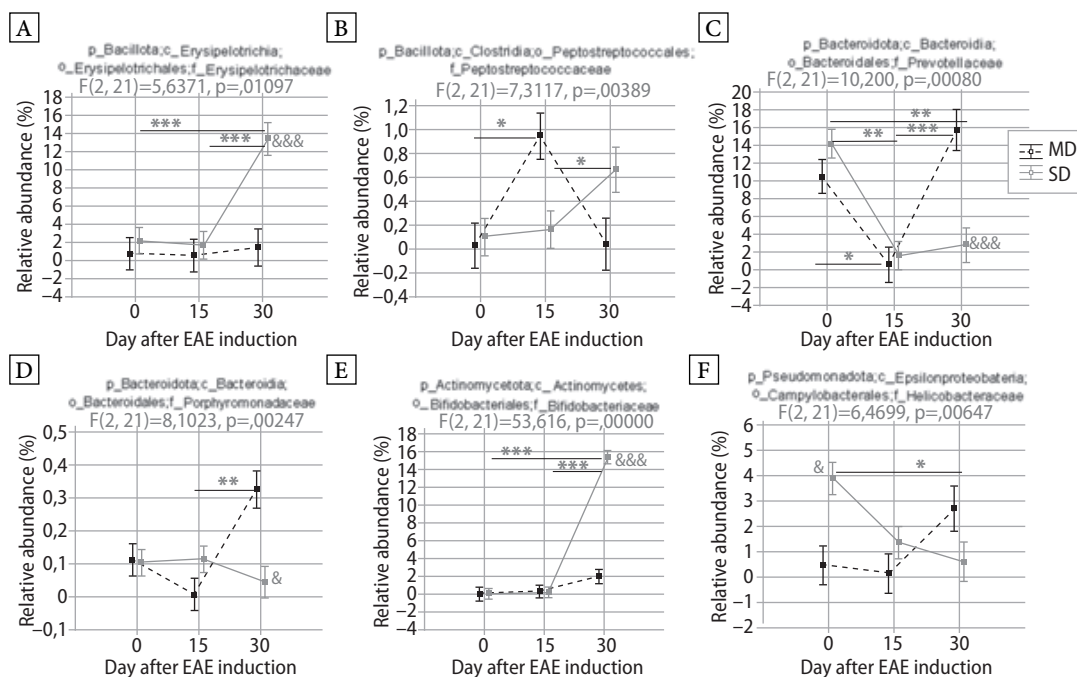
Примечания:

a-c – изменения соотношений различных бактериальных классов в составе кишечного микробиома у отдельных крыс: a – перед индукцией ЭАЭ (Day 0); b – на пике заболевания (Day 15); c – в фазу выздоровления (Day 30); d-g – изменение содержания отдельных классов в группах с легким (MD - mild disease) и тяжелым (SD - severe disease) течением ЭАЭ у крыс 1–10 – обозначены номера животных, меньшее количество животных на 30-й день из-за летального исхода ЭАЭ у крыс 9 и 10, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – достоверные различия между различными днями внутри групп, & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$, &&& – $p < 0.001$ – достоверные различия между группами в соответствующий день; 2-x факторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки.
 (a-c) Changes in the ratios of different bacterial classes in the gut microbiome of individual rats: (a) – before EAE induction (Day 0); (b) – at the peak of the disease (Day 15); (c) – in the recovery phase (Day 30). Numbers 1–10 indicate individual animal IDs. Fewer animals are present on Day 30 due to the lethal outcome of EAE in rats 9 and 10. (d-g) Changes in the abundance of individual classes in the Mild Disease (MD) and Severe Disease (SD) groups. Statistical significance: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, respectively, indicate significant differences between different days within the same group; & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$, &&& – $p < 0.001$, respectively, indicate significant differences between the MD and SD groups on the corresponding day. Analysis was performed using two-way ANOVA with Tukey’s post-hoc test.

Отмечались также изменения представленности бактериальных классов в течение ЭАЭ, не связанные с тяжестью заболевания. Так, на пике ЭАЭ наблюдалось возрастание с 0.42% до 1.2% ($F = 4.381$; $p = 0.025$) численности класса *Desulfovibrionia* (*p_Thermodesulfobactriota*) и уменьшение с 1.8% до 0.8% ($F = 4.971$; $p = 0.017$) класса *Mollicutes* (*p_Mycoplasmata*, ранее *Tenericutes*). В стадию выздоровления с 0.6% до 1.3% возрастала численность класса *Coriobacteriia* (*p_Actinomycetota*) ($F = 3.996$; $p = 0.033$).

Чтобы выяснить семейства, потенциально связанные с тяжестью заболевания, был проанализирован состав микробиома на этом таксономическом уровне. Среди *Bacillota* с помощью дисперсионного анализа различия между тяжело и легко болевшими крысами были выявлены в содержании 4-х семейств – *Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae* и *Peptococcaceae*, однако апостериорный тест подтвердил значимые различия только двух последних, численность обоих

Рисунок 5.
Сравнение состава кишечного микробиома на уровне семейств у крыс с легким и тяжелым течением ЭАЭ
Figure 5.
Comparison of the gut microbiome composition at the family level in rats with mild and severe EAE.



Примечания:

MD – легкое (mild disease) и SD – тяжелое (severe disease) течение ЭАЭ; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – достоверные различия между различными днями внутри групп, & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$, &&& – $p < 0.001$ – достоверные различия между группами в соответствующий день; 2-х факторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки.

Abbreviations:

MD – mild disease; SD – severe disease. Statistical significance: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, respectively, indicate significant differences between different days within the same group; & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$, &&& – $p < 0.001$, respectively, indicate significant differences between the MD and SD groups on the corresponding day. Analysis was performed using two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

возрастала в группе SD в фазу выздоровления (рис 5a, b).

На пике заболевания в обеих группах значимо истощалась численность *Prevotellaceae* (рис. 5c). Из всех представителей *Bacteroidota* это – самое многочисленное семейство популяции исследованных крыс и различия на уровне филумов обусловлены этим семейством. Представленность семейства *Bacteroidaceae* не изменялась в группе SD, но возрастала в фазу выздоровления в группе MD (рис. 5d).

Как видно из рис. 5e, семейство *Bifidobacteriaceae*, повторяет динамику изменений, наблюдаемых на более высоких таксономических уровнях – филума *Actinomycetota* и класса *Actinomycetes*, аналогичным образом, семейство *Helicobacteriaceae* – динамику класса *Epsilonproteobacteria* (рис. 5f).

Таким образом, выявлено 6 потенциальных семейств, относящихся к 4-м филумам, которые могут влиять на тяжесть заболевания.

Наконец, анализ изменений микробиома на уровне родов, показал 7 бактериальных родов и 2 недифференцированных рода из семейств *Clostridiaceae* и *Peptostreptococcaceae*, численность которых варьировала в течение ЭАЭ. Хотя не выявлено достоверных изменений недифференцированного рода семейства *Clostridiaceae* отдельно в каждой группе, на 30-й день их численность различалась между группами ($p=0.05$) (рис. 6a).

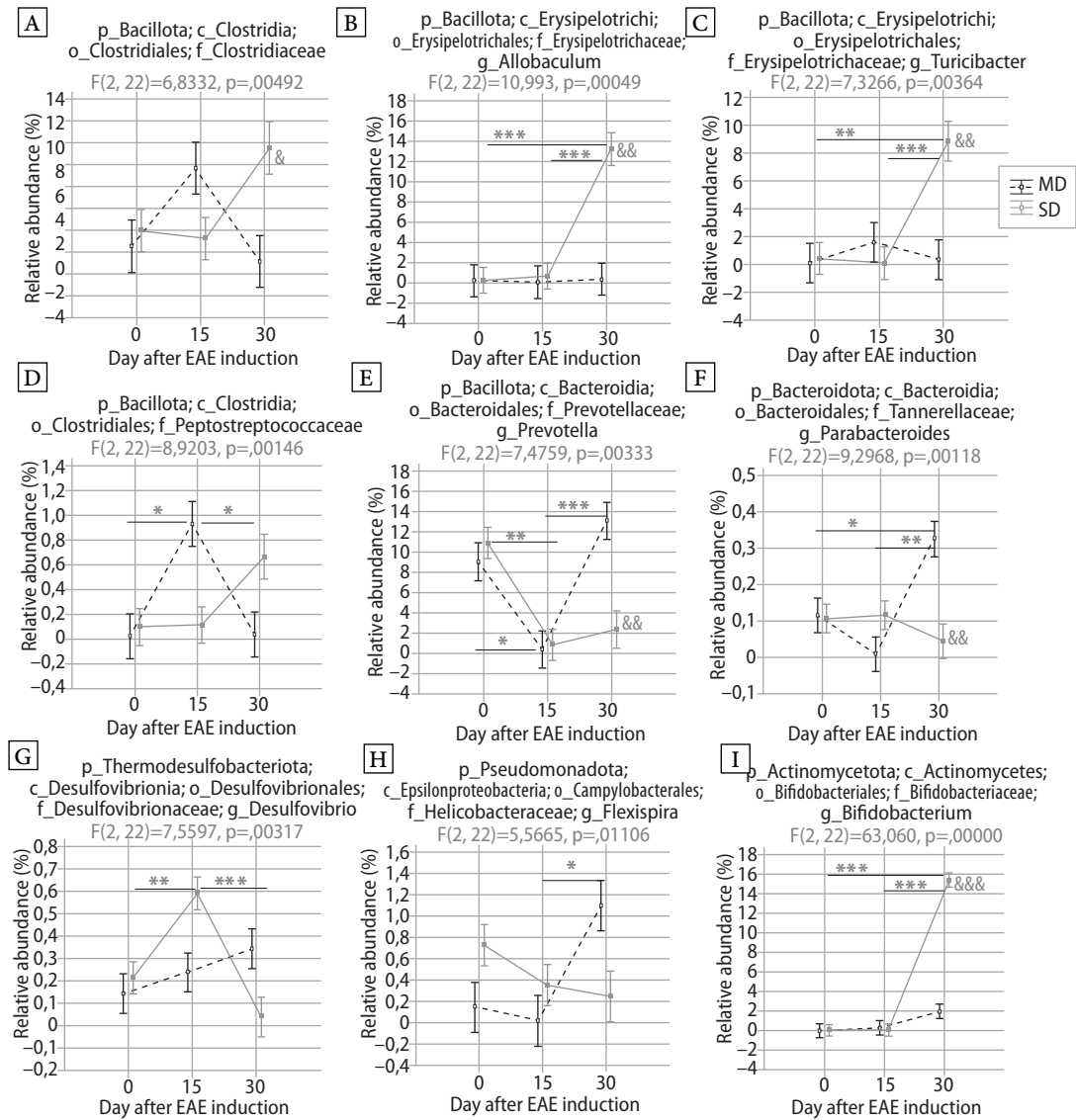
Представленность недифференцированного рода семейства *Peptostreptococcaceae* возрастала на пике ЭАЭ в группе MD, подразумевая их негативное влияние. Однако это увеличение было кратковременным, к 30-му дню их уровень возвращался к исходному, и различий между группами не наблюдалось (рис. 6c). Такая же динамика наблюдалась для *Desulfovibrio*, только увеличение численности этих микроорганизмов отмечалось в группе SD (рис. 6g).

Сходная динамика с возрастанием на 30-й день в группе SD отмечена у трех родов – *Allobaculum*, *Turicibacter* и *Bifidobacterium* (рис. 6b, c, i). Эти бактериальные рода могут способствовать поддержанию патологических процессов, препятствуя выздоровлению животных и переводя заболевание в хроническое.

Изменения *Prevotella* повторяли закономерности, выявленные для семейства в целом (рис. 6e), их численность сокращалась на пике заболевания, но возвращалась до исходных значений к 30-му дню только в группе MD, т.е. у выздоровевших крыс. Другой род филума *Bacteroidota* хотя и представленный в существенно меньшем количестве в составе микробиома крыс, в фазу выздоровления также численно увеличивался только в группе MD (рис. 6f).

Примечательно, что только в группе MD на 30-й день увеличивалась численность *Flexispira*, относящихся к классу *Epsilonproteobacteria*, именно численность этого класса была увеличена перед индукцией ЭАЭ в микробиоме крыс, которые

Рисунок 6. Сравнение состава кишечного микробиома на уровне родов у крыс с легким и тяжелым течением ЭАЭ
Figure 6. Comparison of the gut microbiome composition at the genus level in rats with mild and severe EAE.



Примечания:

MD – легкое (mild disease) и SD – тяжелое (severe disease) течение ЭАЭ; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – достоверные различия между различными днями внутри групп, & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$, &&& – $p < 0.001$ – достоверные различия между группами в соответствующий день; 2-х факторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки.

Abbreviations:

MD – mild disease; SD – severe disease. Statistical significance: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, respectively, indicate significant differences between different days within the same group; & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$, &&& – $p < 0.001$, respectively, indicate significant differences between the MD and SD groups on the corresponding day. Analysis was performed using two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

в дальнейшем имели более выраженные изменения состава микробиома и болели более тяжело.

Были также выявлены бактерии, которые различались между группами без привязки к фазе заболевания и могли влиять на тяжесть заболевания:

1. Выше в группе MD: g_Clostridium (p_Bacillota; c_Clostridia); g_Coprobacillus (p_Bacillota; c_Erysipelotrichi), а также неклассифицированный род f_Micrococcaceae (p_Actinomycetota; c_Actinobacteria).
2. Выше в группе SD: g_Mucispirillum (p_Deferribacterota; c_Deferribacteres; o_Deferribacteriales).

В целом, к 30-му дню не происходило полного восстановления состава кишечного микробиома не только у крыс SD, но и у крыс MD, хотя у последних состав микробиоты был ближе к исходному, чем у крыс, еще имевших симптомы ЭАЭ.

Таким образом, в течение ЭАЭ происходят комплексные перестройки состава кишечного микробиома, которые могут влиять на тяжесть заболевания, при этом исходный микробный фон, на котором индуцируются патологические процессы, может определять тип этих перестроек и как будет протекать заболевание.

Сравнение морфологических изменений в собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки крыс с разной тяжестью ЭАЭ

На пике заболевания вплоть до периода реконвалесценции в слизистой оболочке среднего отдела тонкой кишки у тяжело болеющих животных можно было обнаружить ряд существенных изменений, которые характеризовали начало воспалительных процессов (рис. 7 на цветной вклейке).

Для этих животных была характерна апикальная деструкция ткани, а также измененная морфология – нередко можно было наблюдать разбухшие ворсинки (рис. 7f), что напрямую свидетельствует о лейкоцитарных инфильтрациях эпителия. Из рис. 7m видно, что на 7-й день показатели, отражающие количество лейкоцитов в собственной пластинке кишечника двух групп, находились в одном диапазоне. Однако на 15-й день и далее было заметно увеличение лейкоцитов у тяжело болеющих животных, что говорит о прогрессировании воспалительных процессов (рис. 7n, o). Изменение количества лейкоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки было связано с изменением таких показателей, как длина и ширина ворсинок. Как правило, при увеличении миграции в эпителий различных иммунных

клеток ворсинка разбухает, тем самым уменьшаясь в длину и увеличиваясь в ширине. В результате анализа данных было показано, что действительно у тяжело болеющих крыс на пике заболевания длина ворсинок заметно сокращается (рис. 7c, g-i). Этот показатель практически вдвое уменьшился на 15-й день в сравнении с 7-м днем, при этом у легко болеющих животных данный параметр не претерпевал сильных колебаний.

Наряду с уменьшением длины ворсинок, у тяжело болеющих крыс было выявлено увеличение ширины ворсинок (рис. 7f, j-l), в 1.5 раза от начальных значений, что предположительно было обусловлено повышенным скоплением лейкоцитарных клеток в собственной пластинке слизистой и подтверждало наличие протекающего воспалительного процесса. Анализируемые показатели легко болеющих животных были сопоставимыми с соответствующими показателями интактных крыс. Таким образом, значимые морфологические изменения были выявлены только у тяжело болеющих крыс и напрямую коррелировали с клиническим индексом на данный период.

Сравнение морфологических изменений в собственной пластинке слизистой оболочки толстой кишки крыс с разной тяжестью ЭАЭ

Аналогично с анализом количества лейкоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки был проведен анализ данного параметра в поперечной ободочной части толстой кишки.

Общий внешний вид кишечника у всех групп был удовлетворительным, выраженная деструкция ткани встречалась крайне редко. Однако, в толстой кишке тяжело болеющих животных визуализировались диффузно расположенные клеточные инфильтраты (рис. 8c). Это можно объяснить сохранением повышенного числа лейкоцитарных клеток в собственной пластинке слизистой у животных с тяжелой формой ЭАЭ на 30-е сутки в сравнении с интактными крысами (рис. 8g-i).

Сохранение высокого числа лейкоцитов в период реконвалесценции у тяжело болеющих крыс может

свидетельствовать о хроническом воспалении. Как и в тонкой кишке, это обусловлено миграцией нейтрофилов, лимфоцитов и эозинофилов в зону текущего воспаления. Кроме того, морфометрический анализ показал существенное сокращение глубины крипт толстой кишки у тяжело болеющих животных, практически в 2 раза в сравнении с показателями той же группы на 7-й день (рис. 8d-f, j-l). Уменьшение глубины крипты может косвенно свидетельствовать о снижении пролиферативных процессов, протекающих в ямочной зоне крипты, где находятся стволовые клетки, а также об общем уменьшении числа эпителиоцитов по всей длине крипты. Достоверных изменений ширины крипты в разные периоды заболевания между группами не было найдено.

Оценка количества бокаловидных клеток в тонкой и толстой кишке крыс с ЭАЭ разной тяжести

Оценка числа бокаловидных клеток является показателем, отражающим состояние слизистого барьера кишечника, а значит и его иммунной системы. Бокаловидные клетки, синтезируя и выделяя на поверхность эпителиальных клеток слизь, формируют защитный барьер, препятствующий адгезии патогенов из полости кишки.

В результате морфометрического анализа числа бокаловидных клеток было выявлено истощение их количества на 15 день у тяжело болеющих животных (рис. 9c, h), что может служить фактом нарушения продукции слизи бокаловидными клетками, а также измененной структуры слизистого барьера. Однако, показатели нормализовались к 30-му дню (рис. 9i). Это можно объяснить тем, что используемая модель ЭАЭ является однофазной со спонтанным полным или частичным выздоровлением животных в этот период. Соответственно, при ослаблении тяжести

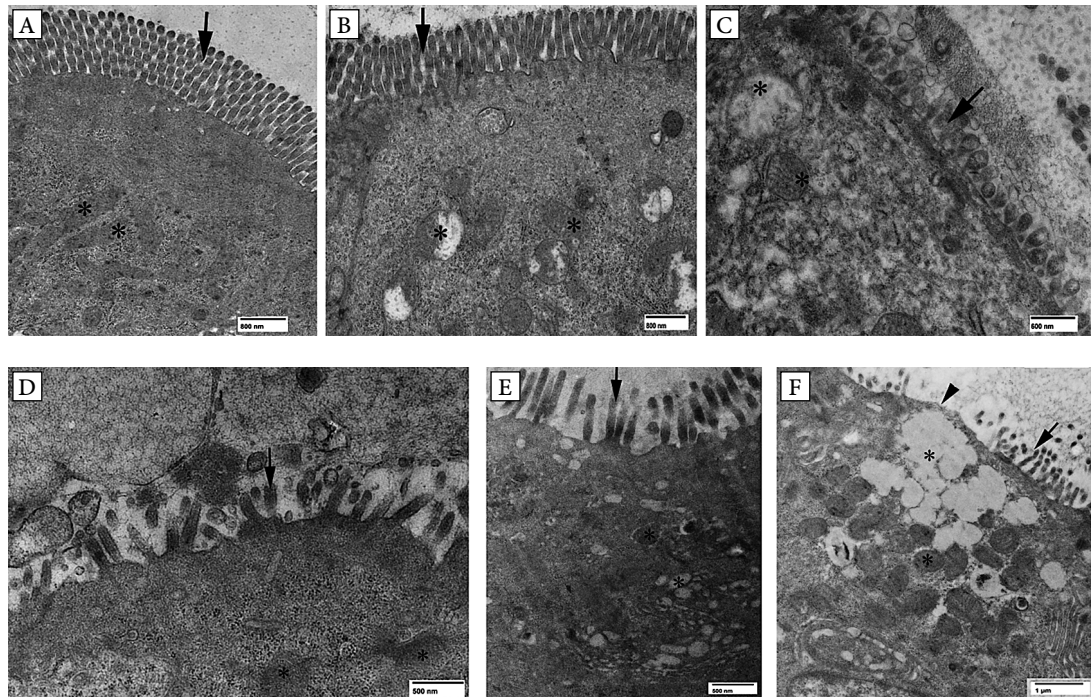
клинических симптомов наблюдается восстановление данного параметра.

Морфологически бокаловидные клетки легко болеющих животных отличались большим объемом и наполненностью в сравнении с тяжело больными крысами (рис. 9b, c). В то же время мы не столкнулись с гиперплазией бокаловидных клеток, которая также могла быть негативной составляющей, отражающей наличие воспалительных процессов в кишечнике.

Аналогично с анализом числа бокаловидных клеток в тонкой кишке была проведена оценка их количества в поперечной ободочной части толстой кишки. Ожидаемо было выявлено уменьшение числа бокаловидных клеток в группе с тяжелой и легкой формой ЭАЭ на пике заболевания (рис. 9d-f, j-l), тем не менее, в период реконвалесценции показатели стремились к изначальным значениям. Сокращение числа бокаловидных клеток у животных с высоким КИ может объясняться уменьшением глубины крипты.

Рисунок 10.
Ультраструктурные изменения в клетках тонкой (a-c) и толстой (d-f) кишки на пике ЭАЭ у крыс с разной тяжестью ЭАЭ

Figure 10.
Ultrastructural changes in small intestine (a-c) and colon (d-f) cells at the peak of EAE in rats with different disease severity.



Обозначения:

стрелка (→) – микроворсинки, звездочка (*) – митохондрии, наконечник стрелы (▶) – участок с разрушенными микроворсинками

Примечания:

a – энтероцит контрольной крысы: микроворсинки щеточной каймы плотно упакованы, митохондрии без признаков разрушения, масштабная линейка – 800 нм; b – поврежденный энтероцит легко болеющей крысы: микроворсинки без изменений, часть митохондрий набухает, их кристы разрушаются, масштабная линейка – 800 нм, c – изменения структуры энтероцита у тяжело болеющих крыс: микроворсинки набухают и укорачиваются, митохондрии набухают, их кристы разрушаются, цитоплазма клетки также набухает, масштабная линейка – 600 нм; d – колоноцит контрольной крысы: микроворсинки и митохондрии без признаков разрушения, масштабная линейка – 500 нм; e – колоноцит легко болеющей крысы: микроворсинки не разрушены, митохондрии набухают, их кристы разрушаются, масштабная линейка – 500 нм; f – колоноцит тяжело болеющей крысы: микроворсинки на некоторых участках полностью исчезают, митохондрии набухают и сливаются, их кристы исчезают, но часть митохондрий сохранна, масштабная линейка – 1 мкм.

Designations:

arrow (→) – microvilli, asterisk (*) – mitochondria, arrowhead (▶) – area with destroyed microvilli. Abbreviations: MD – mild disease; SD – severe disease. a: enterocyte of an intact rat: brush border microvilli are tightly packed, mitochondria show no signs of damage; scale bar – 800 nm. b: damaged enterocyte of a MD rat: microvilli remain intact, some mitochondria are swollen with disrupted cristae; scale bar – 800 nm. c: structural changes in enterocyte of SD rats: microvilli are swollen and shortened, mitochondria are swollen with disrupted cristae, cytoplasm shows swelling; scale bar – 600 nm. d: colonocyte of intact rat: microvilli and mitochondria show no signs of damage; scale bar – 500 nm. e: colonocyte of a MD rat: microvilli remain intact, mitochondria are swollen with disrupted cristae; scale bar – 500 nm. f: colonocyte of a SD rat: microvilli are completely absent in some areas, mitochondria are swollen and fused with disappeared cristae (though some mitochondria remain preserved); scale bar – 1 μm.

Ультраструктурные изменения в кишечнике

При электронномикроскопическом исследовании ткани кишечника контрольных животных клетки имели типичную структуру, как энтероциты в тонкой кишке (рис. 10 a), так и колоноциты в толстой кишке (рис. 10 d). В эпителиальных клетках на разных уровнях кишечного тракта наблюдалась хорошо развитая щеточная кайма из ровных микроворсинок. В цитоплазме клеток визуализировались нормальные митохондрии с плотно упакованными кристами.

У больных крыс на пике ЭАЭ (15 день) наблюдались изменения ультраструктуры энтероцитов и колоноцитов. У легко болеющих крыс, как в клетках тонкой (рис. 10 b), так и толстой кишки (рис. 10 e), микроворсинки имели нормальную структуру, однако наряду с сохранными митохондриями в цитоплазме наблюдалась большая часть поврежденных митохондрий с разрушенными или полностью исчезнувшими кристами.

У тяжело болеющих крыс повреждение митохондрий было более сильное, особенно в колоноцитах толстой кишки (рис. 10 f), где они даже сливались, образуя полости в цитоплазме. Кроме того, у тяжело болеющих крыс происходило разрушение микроворсинок апикальной части колоноцитов, на некоторых участках они полностью разрушались и исчезали. В энтероцитах тяжело болеющих крыс (рис. 10 c) также наблюдалось набухание цитоплазмы.

Таким образом, развитие неврологических симптомов у крыс сопровождалось структурными изменениями в пищеварительном тракте и повреждением ультраструктуры эпителиальных клеток, более выраженными при тяжелом течении ЭАЭ. Тяжесть заболевания была также связана со специфическим микробным паттерном в кишечнике.

Обсуждение

В данном исследовании, используя нелинейных животных, демонстрируется различный тип течения ЭАЭ и показывается возможное влияние кишечной микробиоты и тех структурных и ультраструктурных изменений, которые происходят в кишечнике. Мы предполагаем, что различия исходного состава кишечной микробиоты обусловлены генетически, поскольку все животные получали стандартную пищу с момента поступления животных в виварий и до окончания исследования. Представленные индивидуальные значения наглядно демонстрируют эти индивидуальные различия состава микробиома и как он изменялся у каждого животного на пике заболевания и в фазу реконвалесценции на фоне полного или частичного выздоровления.

Хотя существует большое количество работ, посвященных анализу состава кишечного микробиома (КМ) при РС и ЭАЭ, вопрос о причинно-следственных взаимоотношениях выявленных изменений остается открытым. Проведенный в данном исследовании анализ по изменению состава кишечного микробиома, выполненный на хорошо охарактеризованной валидной модели ЭАЭ [41, 47–50], на одних и тех же животных в динамике от момента индукции до выздоровления продемонстрировал ряд закономерностей:

1. состав КМ в момент инициации патологических процессов имеет значение для тяжести заболевания;
2. на тяжесть заболевания влияют дальнейшие колебания состава КМ;
3. изменения КМ в процессе развития заболевания имеют динамичный характер;
4. состав КМ не восстанавливается полностью при выздоровлении;
5. животные с легким течением ЭАЭ имеют более сходную структуру КМ, чем животные с тяжелым течением, вплоть до летального исхода.

То есть, заболевание развивается индивидуально при разных соотношениях различных бактериальных таксонов. Мы не характеризуем все изменения микробиома, а показываем изменения тех таксонов, которые могут быть связаны с тяжестью заболевания, чтобы выявить некоторые общие свойства. В целом показано, что развитие патологических процессов, характерных для РС, сопровождается существенной перестройкой кишечного микробиома, с перераспределением долей доминантных филумов *Bacteroidota* и *Bacillota* в пользу последнего, а также вытеснением представителей *Bacteroidota* представителями минорных филумов.

Выявленное уменьшение представленности филума *Bacteroidota* и относящегося к нему семейства *Prevotellaceae*, и родов *Prevotella* и *Parabacteroides* на пике ЭАЭ, хорошо согласуется с данными других исследований [21, 51, 52] и предполагает протективную роль данного таксона. Вероятно, именно с уменьшением численности семейства *Prevotellaceae* связано развитие заболевания, а с его восстановлением – выздоровление.

Причины таких колебаний численности таксона не ясны. Поддержание нормального количества

этих бактерий, вероятно, может стать стратегией лечения РС. Мыши, получавшие *Prevotella histicola*, выделенные из кишечника человека, были резистентны к развитию ЕАЕ, что подтверждает защитную роль *Prevotella* при данной патологии [53, 54]. Аналогичным образом, введение лизатов *Parabacteroides distasonis*, ослабляло тяжесть ЭАЭ у мышей, стимулируя дифференцировку регуляторных популяций Т-клеток и ослабление воспалительных реакций [55].

Высокий (9–11%) исходный уровень *Prevotella* у животных в момент индукции ЭАЭ позволяет предположить, что сходным образом будет изменять микробиом у людей с РС со 2-м энтеротипом, основу которого составляют *Prevotella* и *Desulphovibrio* [56, 57] и использование пробиотических *Prevotella* может оказаться полезным именно для 2-го энтеротипа. Примечательно, что *Desulphovibrio* увеличивался, когда *Prevotella* уменьшались в группе SD. Возрастание численности этих бактерий отмечается при РС и предполагается их негативное влияние на течение заболевания [58, 59].

Erysipelotrichaceae (*Bacillota*) связано с индукцией дифференцировки Th17 клеток – ключевой популяцией энцефалитогенных клеток, а также провоспалительных цитокинов, таких как TNFα [60, 61]. Увеличение численности *Erysipelotrichaceae* с одновременным уменьшением членов семейства *Lachnospiraceae* отмечалось у мышей с дефицитом Nlrp12, восприимчивых к дисбиозу и колиту [62], а при ЭАЭ дефицит Nlrp12 усугублял течение заболевания [63, 64]. У безмикробных мышей при моноколонизации *Erysipelotrichaceae* повышена восприимчивость к ЭАЭ [60].

Однако роль этого семейства неоднозначна при РС и ЭАЭ, так как другие авторы отмечали сниженное количество *Erysipelotrichaceae* у пациентов с РС по сравнению со здоровыми людьми и более высокое содержание *Erysipelotrichaceae* у мышей без симптомов по сравнению с мышами с тяжелым течением ЭАЭ [21, 25, 65]. Возрастание представителей этого семейства в фазу выздоровления, вероятно, больше согласуется с этими данными, однако их провоспалительные свойства не способствуют выздоровлению животных. Возможно, что разные представители этого семейства могут обладать противоположными свойствами, поэтому проявляются разные свойства.

Одним из представителей семейства *Erysipelotrichaceae* является *Allobaculum*, который и определял динамику изменений этого семейства в микробиоме крыс в данном исследовании. При РС показано уменьшение этих микроорганизмов [25], увеличение численности *Allobaculum* отмечалось при подавлении ЭАЭ, вызванном норфлоксацином [66]. Вероятно, что их возрастание все же способствует выздоровлению, хоть и неполному. Тем не менее, нельзя исключить и их повреждающее действие. Недавно было показано, что в модели язвенного колита отмечалось нарушение кишечного барьера на фоне повышенного уровня *Allobaculum* [67].

Другой представитель *Erysipelotrichales* семейства *Turicibacteriaceae* – *Turicibacter* также увеличивался

у неполностью выздоровевших животных на 30-й день. Видимо, эти два рода имеют синергичные свойства. По изменениям этого рода также имеются противоречивые данные. Сообщалось о повышенном уровне *Turicibacter sanguinis* при РС [25], и этот род встречался на более высоком уровне при хронически прогрессирующем ЭАЭ [68]. Напротив, наблюдалась отрицательная корреляция между тяжестью ЭАЭ и обилием *Turicibacter sanguinis*, и этот вид считается потенциальным биомаркером кишечной микробиоты, демонстрирующей устойчивость к индукции ЭАЭ у крыс [69].

Сходная с этими двумя видами динамика отмечалась для рода *Bifidobacterium*, его увеличение неоднократно отмечалось при РС [24], причем более высокий уровень отмечается при тяжелом течении РС [70]. Показано, что в воспалительной среде эти микроорганизмы способствуют дифференцировке Th17 клеток, поэтому неудивительно, что у этих трех родов – сходная динамика.

Clostridiaceae – семейство включающее разнообразные по свойствам микроорганизмы, как полезные, так и патогенные и разные рода и виды по-разному изменяются при РС [24, 71, 72, 73]. Нам не удалось определить родовую их принадлежность, поэтому сложно говорить об их влиянии при ЭАЭ. Однако их транзитное увеличение совпадает с пиком заболевания у легко болеющих животных и отсроченным подъемом в стадию выздоровления у тяжело болеющих животных, что предполагает скорее протективную роль. То же самое можно сказать и о семействе *Peptostreptococcaceae*. При РС популяция этих бактерий сокращается [58].

Исходный повышенный уровень *Helicobacteraceae* и развившееся на этом фоне более тяжелое заболевание у крыс, как уже было отмечено, может быть генетически обусловленным. Так, повышенное представительство этого семейства имели мыши с нокаутом гена *Cyp27B1*, кодирующим фермент, превращающий 25-гидроксивитамин D в активный 1,25-дигидроксивитамин D, в результате чего мыши имели повышенную восприимчивость к индуцированному колиту [74], а у мышей с генетически-обусловленным дефицитом IL-10 при заселении *Helicobacter hepaticus* развивалось воспаление в кишечнике, тогда как у нормальных мышей этого не происходило [75].

С другой стороны, не совсем логично – возрастание уровня *Flexispira* у крыс легко переболевших и выздоровевших. Поскольку этот род – представитель в большей степени слизистой микробиоты, а не просветной, вероятно, сформировавшаяся к 30-му дню после воспаления среда в этом компартменте ЖКТ стала благоприятной для роста этого вида бактерий. Данных о роли *Flexispira* при РС мы не обнаружили.

Мы предполагаем также, что в конечном счете, эффект влияния любого микроорганизма будет определяться присутствием других микроорганизмов, которые создают среду обитания, соотношением различных микроорганизмов и наличием доступных для их жизнедеятельности метаболитов.

Одним из последствий изменений состава кишечного микробиома может быть нарушение его барьерной функции и развитие воспаления

в кишечнике, а также функциональные и структурные изменения в самом пищеварительном тракте.

Проведенное исследование выявило значительные морфологические изменения в тонком и толстом отделах кишечника крыс на фоне тяжелого течения экспериментального аллергического энцефаломиелита. В тонкой кишке наблюдалось укорочение ворсинок, сопровождавшееся увеличением их ширины за счет лейкоцитарной инфильтрации, а также снижение количества бокаловидных клеток, особенно выраженное у животных с тяжелой формой заболевания. В толстой кишке отмечалось уменьшение глубины крипт, инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки иммунокомпетентными клетками и сокращение популяции бокаловидных клеток. Несмотря на растущий интерес к оси «кишечник-мозг», прямых исследований структурных изменений кишечника при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите крайне мало. В исследовании Nougi и соавт. при индукции ЭАЭ была обнаружена тенденция к увеличению длины ворсинок на пике заболевания, что не соотносится с полученными нами данными. Кроме того, было показано увеличение глубины крипт на протяжении всей тонкой кишки, с утолщением подслизистого слоя двенадцатиперстной и тощей кишки у больных животных за счет инфильтрации иммунными клетками [76]. Однако такие исследования носят единичный характер. Следует подчеркнуть, что выявленное нами утолщение ворсинок вследствие клеточной инфильтрации ранее не описывалось в контексте ЭАЭ, а изменения в толстом кишечнике остаются практически неизученными.

Обнаруженные патологические изменения имеют важное функциональное значение. Инфильтрации иммунными клетками, включая нейтрофилы, CD4+ Т-лимфоциты, макрофаги M2 и CD8+ Т-лимфоциты, часто встречаются при воспалительных заболеваниях ЖКТ и связаны с прогрессированием заболевания [77, 78, 79]. Укорочение кишечных ворсинок, вероятно, отражает уменьшение количества эпителиоцитов, что приводит к ослаблению абсорбционной функции кишечника или регенераторных процессов в кишечном эпителии [14, 80], как это показано при воспалительных заболеваниях кишечника [81].

В случае индуцированных воспалительных процессов также происходит уменьшение количества продуцирующих слизь бокаловидных клеток, что напрямую связано с ослаблением защитных свойств кишечного барьера [82, 83]. Сокращение численности бокаловидных клеток, в свою очередь, может приводить к дефициту муцинов и повышению проницаемости кишечного барьера, что способствует транслокации микробных продуктов и усугублению системного воспаления. Муцины, особенно MUC2, играют важную роль в поддержании целостности кишечного барьера. Дефицит муцина может опосредоваться дисфункцией бокаловидных клеток, что приводит к истончению слоя слизи и увеличению бактериальной инфильтрации [84]. Аналогичным образом, нарушение паттернов гликозилирования коррелирует с повышенной проницаемостью кишечника [85]. Показано,

что уменьшенное количество бокаловидных клеток в толстой кишке связано с трудностями дефекации и частыми запорами, которые наблюдаются у людей, страдающих рассеянным склерозом [86, 87]. В нашем случае снижение числа клеток, продуцирующих слизь, может быть прямым следствием снижения общей длины ворсинок и глубины крипт.

Полученные данные подтверждают гипотезу о роли кишечника и населяющего его микробного сообщества в патогенезе ЭАЭ через механизмы нарушения барьерной функции, хронического воспаления и дисрегуляции локального иммунного ответа. Связь между выраженностью морфологических

изменений в тонкой и толстой кишке крыс и тяжестью заболевания доказывает вовлеченность периферических механизмов, в частности воспаления в кишечнике в развитии аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний ЦНС, таких как рассеянный склероз и его экспериментальная модель – ЭАЭ.

Учитывая многообещающие данные о роли кишечника в модуляции нейровоспаления, дальнейшее исследование морфологических изменений в стенке кишечника при ЭАЭ является необходимым шагом для более глубокого понимания механизмов оси «кишечник-мозг» в контексте аутоиммунных заболеваний ЦНС.

Заключение

Результаты исследования согласуются с современной концепцией оси «микробиота – кишечник – мозг». Связь между выраженностью морфологических изменений в тонкой и толстой кишке крыс и тяжестью заболевания доказывает вовлеченность периферических механизмов, в частности, изменений таксономического состава кишечного микробиома и воспаления в кишечнике в развитие аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний ЦНС, таких как рассеянный

склероз и его экспериментальная модель – ЭАЭ. Полученные данные вносят вклад в понимание механизмов взаимодействия кишечника и мозга и демонстрируют, что кишечник и населяющая его микробиота являются перспективной мишенью для разработки новых подходов к лечению этих тяжелых заболеваний на основе модуляции состава кишечной микробиоты и регуляции кишечного воспаления и проницаемости кишечного барьера.

Соблюдение этических стандартов

Работу с животными выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.), Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2000 г. и с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986). Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ ИЭМ» (протокол № 2/22 от 06.04.2022).

Compliance with ethical standards

Work with animals was performed in accordance with the «Rules for Conducting Work Using Experimental Animals» (Appendix to Order No. 755 of the USSR Ministry of Health dated August 12, 1977), the 1975 Helsinki Declaration and its 2000 revision, and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, March 18, 1986). The study was approved by the Local Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (Protocol No. 2/22 dated April 6, 2022).

Источники финансирования

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФГБНУ «ИЭМ» по теме фундаментальных научных исследований: FGWG-2025–0018 (регистрационный номер 1024040400018–0.3.1.4) при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Funding sources

This study was conducted within the framework of the state assignment of the Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Experimental Microbiology and Microbiology» on the topic of fundamental scientific research: FGWG-2025–0018 (registration number 1024040400018–0.3.1.4) with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Научно-ресурсному центру «Центр молекулярно-клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета (РНЦ МКТ СПбГУ), предоставившему оборудование для проведения электронно-микроскопических исследований и Центра «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург), где проводилось исследование кишечного микробиома методом секвенирования гена 16S рНК.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Scientific Resource Center «Center for Molecular and Cellular Technologies» of St. Petersburg State University (RRC MKT SPbU), which provided equipment for electron microscopy studies, and to the Center

for Genome Technologies, Proteomics, and Cell Biology of the All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology (St. Petersburg), where the study of the intestinal microbiome was conducted using 16S rRNA gene sequencing.

Вклад авторов

Идея работы и планирование исследования (И.Н.А.), сбор данных (А.В.М., В.В.Б., Н.М.Г., Н.Н.М., Н.С.Н.), исследование микробиоты (Н.Н.М., И.Н.А.), морфологические исследования (В.В.Б., Н.С.Н.), электронно-микроскопические исследования (Н.М.Г.) анализ и интерпретация данных (В.В.Б., Н.С.Н., Н.М.Г., И.Н.А.), статистическая обработка комплекса данных (В.В.Б., И.Н.А.), написание и редактирование манускрипта (В.В.Б., И.Н.А.).

Authors' contributions

Idea of work and research planning (I.N.A.), data collection (A.V.M., V.V.B., N.M.G., N.N.M., N.S.N.), microbiota research (N.N.M., I.N.A.), morphological studies (V.V.B., N.S.N.), electron microscopic studies (N.M.G.), analysis and interpretation of data (V.V.B., N.S.N., N.M.G., I.N.A.), statistical processing of the data complex (V.V.B., I.N.A.), writing and editing the manuscript (V.V.B., I.N.A.)

1. Общие сокращения и термины

- a) ЭАЭ – *experimental autoimmune (allergic) encephalomyelitis (EAE)*
- b) РС – *multiple sclerosis (MS)*
- c) ЖКТ – *gastrointestinal tract (GIT)*
- d) ось «микробиота–кишечник–мозг» – *microbiota–gut–brain axis*
- e) КОЕ/мл – *colony forming units per milliliter (CFU/mL)*
- f) д.п.и. – *days post induction (dpi)*
- g) ВЗК – *inflammatory bowel disease (IBD)*
- h) СРК – *irritable bowel syndrome (IBS)*
- i) ЦНС – *central nervous system (CNS)*
- j) КМ – *gut microbiome (GM)*
- k) ТБ – *severe disease (SD)*
- l) ЛБ – *mild disease (MD)*

2. Животные

- a) Крысы линии Вистар – *Wistar rats*
- b) Питомник «Рапполово» – *Rappolovo breeding facility (Russia)*

3. Препараты и штаммы

- a) Гомогенат спинного мозга – *spinal cord homogenate*
- b) ПАФ – *complete Freund's adjuvant (CFA)*
- c) ФР – *physiological saline (vehicle)*

4. Методы

- a) Световая микроскопия – *light microscopy*
- b) Электронная микроскопия – *electron microscopy*
- c) ПЦР – *transcription polymerase chain reaction (PCR)*
- d) Секвенирование гена 16S рРНК – *16S rRNA gene sequencing*

e) Illumina MiSeq – *Illumina MiSeq sequencing platform*

f) QIIME – *QIIME software package*

g) Trimmomatic – *Trimmomatic software package*

5. Клеточные популяции (иммунология)

- a) Th17 – *T helper 17 cells*
- b) Treg – *regulatory T cells (Treg)*
- c) CD4 – *CD4⁺ T helper cells*
- d) CD8 – *CD8⁺ cytotoxic T cells*
- e) CD161 – *CD161⁺ NK/T cells*
- f) CD45RA – *CD45RA⁺ B cells*
- g) TNK-клетки – *T natural killer (TNK) cells*
- h) NK-клетки – *natural killer (NK) cells*

6. Цитокины и факторы

- a) IL-10 – *interleukin-10*
- b) TNF – *tumor necrosis factor (TNF)*

7. Таксономические обозначения

- 1) p_ – *phylum* (тип/филум)
- 2) c_ – *class* (класс)
- 3) o_ – *order* (порядок)
- 4) f_ – *family* (семейство)
- 5) g_ – *genus* (род)

8. Программы и статистика

- a) GraphPad Prism – *GraphPad Prism software*
- b) Statistica 10.0 – *Statistica software (v.10.0)*
- c) two-way ANOVA – *two-way analysis of variance*
- d) Тест Тьюки HSD – *Tukey's HSD post hoc test*
- e) Тест Колмогорова-Смирнова – *Kolmogorov-Smirnov nonparametric statistical test*
- f) t-test – *Student's t-test*
- g) SEM – *standard error of the mean (SEM)*

Литература | References

1. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Mar 1;8(3): a028936. doi: 10.1101/cshperspect.a028936.
2. Abdurasulova I.N., Klimenko V.M. The role of immune and glial cells in neurodegenerative processes. *Medical Academic Journal.* 2011;11(1):12–29. (In Russ.) doi: 10.17816/MAJ11112–29.

Абдурасулова И.Н., Клименко В.М. Роль иммунных и глиальных клеток в процессах нейродегенерации.

Медицинский академический журнал. 2011;11(1):12–29. doi: 10.17816/MAJ11112–29.

3. Berer K., Krishnamoorthy G. Microbial view of central nervous system autoimmunity. *FEBS Lett.* 2014 Nov 17;588(22):4207–13. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.007.
4. Parodi B, Kerlero de Rosbo N. The Gut-Brain Axis in Multiple Sclerosis. Is Its Dysfunction a Pathological Trigger or a Consequence of the Disease? *Front Immunol.* 2021 Sep 21;12:718220. doi: 10.3389/fimmu.2021.718220.

5. Abdurasulova IN (2024). Role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of multiple sclerosis. Part 3. Gut microbiota as a potential trigger for multiple sclerosis. *Medical Academic Journal*. 2024;24(3):5–44. (In Russ.) doi: 10.17816/MAJ633511.
Абдурасулова И.Н. Роль микробиоты кишечника в патогенезе рассеянного склероза. Часть 3. Кишечная микробиота как триггер и фактор прогрессирования рассеянного склероза. *Медицинский академический журнал*. 2024;24(3):5–44. doi: 10.17816/MAJ633511.
6. Hooper L.V., Wong M.H., Thelin A., Hansson L., Falk P.G., Gordon J.I. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 2001;291(5505):881–884. doi: 10.1126/science.291.5505.881.
7. Neish A.S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):65–80. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.080.
8. Backhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915–1920. doi: 10.1126/science.1104816.
9. Lloyd-Price J., Abu-Ali G., Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Medicine*. 2016;8(1):51. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y.
10. Xavier R.J., Podolsky D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427–434. doi: 10.1038/nature06005.nature06005.
11. Morgan X.C., Tickle T.L., Sokol H. et al. 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.
12. Hall A.B., Tolonen A.C., Xavier R.J. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nature Reviews Genetics*. 2017;18(11):690–699. doi: 10.1038/nrg.2017.63.
13. Farkas A.E., Nusrat A. Pharmacological targeting of the inflamed intestinal barrier. *Current Pharmaceutical Design*. 2016;22(35):5400–5414. doi: 10.2174/1381612822666160726123857.
14. Buscarinu M.C., Cerasoli B., Annibali V. et al. Altered intestinal permeability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: A pilot study. *Multiple sclerosis*. 2017;23(3):442–446. doi: 10.1177/1352458516652498.
15. Spear E.T., Holt E.A., Joyce E.J. et al. Altered gastrointestinal motility involving autoantibodies in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Neurogastroenterology and Motility*. 2018;30(9): Article e13349. doi: 10.1111/nmo.13349.
16. Levinthal D.J., Rahman A., Nusrat S., O'Leary M., Heyman R., Bielefeldt K. Adding to the burden: gastrointestinal symptoms and syndromes in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis international*. 2013;319201. doi: 10.1155/2013/319201.
17. Abdurasulova, I.N., Tarasova E.A., Ermolenko E.I. et al. Multiple sclerosis is associated with altered quantitative and qualitative composition of intestinal microbiota. *Medical academic journal*. 2015;15(3):55–67. (In Russ.) doi: 10.17816/MAJ15355–67.
Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Ермоленко Е.И. и др. При рассеянном склерозе изменяется качественный и количественный состав микробиоты кишечника. *Медицинский академический журнал*. 2015;15(3):55–67.
18. Marrie R.A., Cohen J., Stuve O. et al. A systematic review of the incidence and prevalence of comorbidity in multiple sclerosis: overview. *Multiple sclerosis*. 2015;21(3):263–281. doi: 10.1177/1352458514564491
19. Yaqubi K., Kostev K., Klein I. et al. Inflammatory bowel disease is associated with an increase in the incidence of multiple sclerosis: a retrospective cohort study of 24,934 patients. *European journal of medical research*. 2024;29(1):186. doi: 10.1186/s40001-024-01776-w.
20. Kosmidou M., Katsanos A.H., Katsanos K.H. et al. Multiple sclerosis and inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *Journal of neurology*. 2017;264(2):254–259. doi: 10.1007/s00415-016-8340-8.
21. Chen J., Chia N., Kalari K.R. et al. (2016) Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific Reports*. 2016;6:28484. doi: 10.1038/srep28484.
22. Shah S., Locca A., Dorsett Y. et al. Alterations of the gut microbiome in patients with MS. *EBioMedicine*. 2021;71:103557. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103557.
23. Blanco N., Huang A., Lim D., Fortier A.T., Yong C. The disease course of multiple sclerosis may be modulated by the gut microbiome. *Undergraduate Journal of Experimental Microbiology and Immunology*. 2015;30:1–14.
24. Reynders T., Devolder L., Valles-Colomer M. et al. Gut microbiome variation is associated to Multiple Sclerosis phenotypic subtypes. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2020;(4):406–419. doi: 10.1002/acn3.51004.
25. Cox L.M., Maghzi A.H., Liu S. et al. Gut microbiome in progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2021;89(6):1195–1211. doi: 10.1002/ana.26084.
26. Abdurasulova I.N., Chernyavskaya E.A., Ivanov A.B. et al. Changes in gut microbiome taxonomic composition and their relationship to biosynthetic and metabolic pathways of B vitamins in children with multiple sclerosis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2024;60(1):114–135. doi: 10.1134/S0022093024010095.
27. Stromnes I.M., Goverman J.M. (2006) Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols*. 2006;1(4):1810–1819. doi: 10.1038/nprot.2006.285.
28. Ben-Nun A., Kaushansky N., Kawakami N. et al. From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: impact on understanding pathogenesis and drug development. *Journal of autoimmunity*. 2014;54:33–50. doi: 10.1016/j.jaut.2014.06.004.
29. Gold R., Lington C., Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain: a journal of neurology*. 2006;129(Pt 8):1953–1971. doi: 10.1093/brain/awl075.
30. Procaccini C., De Rosa V., Pucino V., Formisano L., Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *European journal of pharmacology*. 2015;759:182–191. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.042.
31. Constantinescu C.S., Farooqi N., O'Brien K., Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1079–1106. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x.
32. Vainchtein I.D., Vinet J., Brouwer N. et al. In acute experimental autoimmune encephalomyelitis, infiltrating macrophages are immune activated, whereas microglia remain immune suppressed. *Glia*. 2014;62(10):1724–1735. doi: 10.1002/glia.22711.
33. Nouri M., Weström B., Lavasani S. Elevated fecal calprotectin accompanied by intestinal neutrophil infiltration and goblet cell hyperplasia in a murine model of multiple sclerosis. *International journal of molecular sciences*. 2023;24(20):15367. doi: 10.3390/ijms242015367.
34. Davidson M.G., Alonso M.N., Yuan R. et al. Th17 cells induce Th1-polarizing monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology*. 2013;191(3):1175–1187. doi: 10.4049/jimmunol.1203201.

35. Secher T., Kassem S., Benamar M. et al. Oral Administration of the Probiotic Strain *Escherichia coli* Nissle 1917 Reduces susceptibility to neuroinflammation and repairs experimental autoimmune encephalomyelitis-induced intestinal barrier dysfunction. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1096. doi: 10.3389/fimmu.2017.01096.
36. Lin C.C., Edelson B.T. New insights into the role of IL-1 β in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Journal of immunology*. 2017;198(12):4553–4560. doi: 10.4049/jimmunol.1700263.
37. Jang D.I., Lee A.H., Shin H.Y. et al. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(5)2719. doi: 10.3390/ijms22052719.
38. Alonso A., Hernán M.A. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 2008;71(2):129–135. doi: 10.1212/01.wnl.0000316802.35974.34.
39. Zeydan B., Atkinson E.J., Weis D.M. et al. Reproductive history and progressive multiple sclerosis risk in women. *Brain communications*. 2020;2(2): fcaa185. doi: 10.1093/braincomms/fcaa185.
40. Abdurasulova I.N., Ermolenko E.I., Matsulevich A.V. et al. Effects of probiotic Enterococci and Glatiramer Acetate on the severity of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Journal of Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2017;47(7):866–876. doi: 10.1007/s11055-017-0484-1.
41. Gilerovich E.G., Fedorova E.A., Abdurasulova I.N. et al. Analysis of the morphological signs of an inflammatory reaction in the spinal cord of Wistar rats in an experimental model. *Journal of Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2012;42(1):43–47. doi: 10.1007/s11055-011-9530-6.
42. Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME Journal*. 2011;5(5):908–917. doi: 10.1038/ismej.2010.171.
43. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
44. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010;7(5):335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
45. Korzhhevsky D.E., Gilerovich E.G., Kirik O.V., Sukhorukova E.G., Grigoriev I.P. Morphological diagnostics: preparation of material for morphological study and electron microscopy. SPb.: Publishing house "SPETSILIT". 2013. (In Russ.)
Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Григорьев И.П. Морфологическая диагностика: подготовка материала для морфологического исследования и электронной микроскопии. СПб.: Издательство «СПЕЦИЛИТ». 2013.
46. Hajibagheri M.A. Preparation of double/single-stranded DNA and RNA molecules for electron microscopy. *Methods Mol Biol*. 1999;117: 209–227. doi: 10.1385/1-59259-201-5:209.
47. Abdurasulova I.N., Zhitnukhin Y.L., Tarasova E.A., Klimenko V.M. Expression of cytokine mRNA in the spleen and spinal cord of rats with different severity of EAE. *Journal of Medical Immunology*. 2004;6(1–2):37–46. (In Russ.)
Абдурасулова И.Н., Житнухин Ю.Л., Тарасова Е.А., Клименко В.М. Экспрессия мРНК цитокинов в селезенке и спинном мозге крыс с различной тяжестью ЭАЭ. *Журнал Медицинская Иммунология*. 2004;6(1–2):37–46.
48. Zhitnukhin Yu.L., Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Sokolov D.I., Novikova T.A. Dynamics of circulating and expressed cytokines upon induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Medical Immunology*. 2008;10(2–3):193–202. (in Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2008-2-3-193-202.
Житнухин Ю.Л., Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Соколов Д.И., Новикова Т.А. Особенности динамики циркулирующих и экспрессируемых цитокинов при индукции экспериментального аллергического энцефаломиелимита. *Журнал Медицинская иммунология*. 2008;2–3:193–202. doi: 10.15789/1563-0625-2008-2-3-193-202.
49. Pozdnyakov A.V., Abdurasulova I.N., Prakhova L.N. Proton magnetic resonance spectroscopy in the study of metabolic mechanisms of the demyelinating process in experimental allergic encephalitis. *Journal of Radiation Diagnostics and Therapy*. 2010;2(1):30–36. (In Russ.)
Поздняков А.В., Абдурасулова И.Н., Прахова Л.Н. Протонная магнитно-резонансная спектроскопия в изучении метаболических механизмов демиелинирующего процесса при экспериментальном аллергическом энцефалите. *Журнал Лучевая диагностика и терапия* 2(1):30–36.
50. Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Matsulevich A.V. et al. Changes in the qualitative and quantitative composition of the intestinal microflora in rats in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2017;47(3): 328–336. doi: 10.1007/s11055-017-0401-7.
51. Altieri C., Speranza B., Corbo M.R., Sinigaglia M., Bevilacqua A. Gut-microbiota, and multiple sclerosis: background, evidence, and perspectives. *Nutrients*. 2023;15(4):942. doi: 10.3390/nu15040942.
52. Saresella M., Marventano I., Barone M. et al. Alterations in circulating fatty acid are associated with gut microbiota dysbiosis and inflammation in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1390. doi: 10.3389/fimmu.2020.01390.
53. Shahi S.K., Freedman S.N., Murra A.C. et al. Prevotella histicola, a human gut commensal, is as potent as COPAXONE in an animal model of multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:462. doi: 10.3389/fimmu.2019.00462.
54. Mangalam A., Shahi S.K., Luckey D. et al. Human gut-derived commensal bacteria suppress CNS inflammatory and demyelinating disease. *Cell Reports*. 2017;20(6):1269–1277. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.031.
55. Jiraskova Zakostelska Z., Kraus M., Coufal S. et al. Lysate of Parabacteroides distansoni prevents severe forms of experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating the priming of T cell response. *Frontiers in Immunology*. 2024;15:1475126. doi: 10.3389/fimmu.2024.1475126
56. Arumugam M., Raes J., Pelletier E. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174–180. doi: 10.1038/nature09944.
57. Wright D.P., Rosendale D.I., Robertson A.M. Prevotella enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin. *FEMS Microbiology Letters*. 2000;190(1):73–79. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09265.x.
58. Tremlett H., Zhu F., Arnold D. et al. The gut microbiota in pediatric multiple sclerosis and demyelinating syndromes. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2021;8(12):2252–2269. doi: 10.1002/acn3.51476.
59. Elgendy S.G., Abd-Elhameed R., Daef E. et al. Gut microbiota in forty cases of Egyptian relapsing remitting multiple sclerosis. *Iranian Journal of Microbiology*. 2021;(5):632–641. doi: 10.18502/ijm.v13i5.7428.

60. Miyauchi E., Kim S.W., Suda W. et al. Gut microorganisms act together to exacerbate inflammation in spinal cords. *Nature*. 2020 Sep;585(7823):102–106. doi: 10.1038/s41586-020-2634-9.
61. Dinh D.M., Volpe G.E., Duffalo C., Bhalchandra S., Tai A.K., Kane A.V., Wanke C.A., Ward H.D. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2015;211:19–27. doi: 10.1093/infdis/jiu409.
62. Chen L., Wilson J.E., Koenigsnecht M.J. et al. NLRP12 attenuates colon inflammation by maintaining colonic microbial diversity and promoting protective commensal bacterial growth. *Nature immunology*. 2017;18:541–551. doi: 10.1038/ni.3690.
63. Gharagozloo M., Mahvelati T.M., Imbeault E. et al. The nod-like receptor, Nlrp12, plays an anti-inflammatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12:198. doi: 10.1186/s12974-015-0414-5.
64. Lukens J.R., Gurung P., Shaw P.J. et al. The NLRP12 sensor negatively regulates autoinflammatory disease by modulating interleukin-4 production in T Cells. *Immunity*. 2015;42:654–664. doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.006.
65. Moles L., Egimendia A., Osorio-Querejeta I. et al. (2021) Gut microbiota changes in experimental autoimmune encephalomyelitis and cuprizone mice models. *ACS Chemical Neuroscience*. 2021;12(5): 893–905. doi: 10.1021/acscemneuro.0c00695.
66. Chen H., Ma X., Liu Y. et al. Gut microbiota interventions with Clostridium butyricum and norfloxacin modulate immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Frontiers in Immunology*. 2019;10: 1662. doi: 10.3389/fimmu.2019.01662.
67. Yu J., Lyu J., Zhu T., Li Y., Xia H., Liu Q., Li L., Chen B. Oral-gut axis in inflammation: periodontitis exacerbates ulcerative colitis via microbial dysbiosis and barrier disruption. *BMC Oral Health*. 2025;25:894. doi: 10.1186/s12903-025-06269-8.
68. Gandy K.A.O., Zhang J., Nagarkatti P., Nagarkatti M. The role of gut microbiota in shaping the relapse-remitting and chronic-progressive forms of multiple sclerosis in mouse models. *Scientific Reports*. 2019;9(1):6923. doi: 10.1038/s41598-019-43356-7.
69. Stanisavljević S., Lukić J., Soković S. et al. Correlation of gut microbiota composition with resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Frontier in Microbiology*. 2016;7:2005. doi: 10.3389/fmicb.2016.02005.
70. Abdurasulova I.N., Matsulevich A.V., Grefner N.M., Negoreeva I.G., Bisaga G.N. Elevated Bifidobacterium levels in the gut microbiota are a marker of adverse clinical course of multiple sclerosis. *Journal of Neuropathology and Psychiatry named after S.S. Korsakov*. 2023;123(7–2): 136–137. (In Russ.)
Абдурасулова И.Н., Мацулевич А.В., Грефнер Н.М., Негореева И.Г., Бисага Г.Н. Повышенный уровень Bifidobacterium в составе кишечной микробиоты – маркер неблагоприятного течения рассеянного склероза. *Журнал Неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2023;123(7–2): 136–137.
71. Miyake S., Kim S., Suda W. et al. Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to Clostridia XIVa and IV clusters. *PLoS ONE*. 2015;10(9): e0137429. doi: 10.1371/journal.pone.0137429.
72. Forbes J.D., Chen C.Y., Knox N.C. et al. A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases-does a common dysbiosis exist? *Microbiome*. 2018;6(1):221. doi: 10.1186/s40168-018-0603-4.
73. Swidsinski A., Dörffel Y., Loening-Baucke V. et al. Reduced Mass and Diversity of the Colonic Microbiome in Patients with Multiple Sclerosis and Their Improvement with Ketogenic Diet. *Frontier in Microbiology*. 2017;8:1141. doi: 10.3389/fmicb.2017.01141.
74. Ooi J.H., Li Y., Rogers C.J. Vitamin D regulates the gut microbiome and protects mice from dextran sodium sulfate-induced colitis. *Journal of Nutrition*. 2013;143(10):1679–1686. doi: 10.3945/jn.113.180794.
75. Matharu K.S., Mizoguchi E., Cotoner C.A. et al. Toll-like receptor 4-mediated regulation of spontaneous Helicobacter-dependent colitis in IL-10-deficient mice. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1380–1390.e1–3. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.004.
76. Nouri M., Bredberg A., Weström B., Lavasani S. Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells. *PLoS one*. 2014;9(9): e106335. doi: 10.1371/journal.pone.0106335.
77. Calderon-Martinez E., Zevallos Delgado C., Ng W.L., Sharma Gautam S., Joseph M. Assessment of the immune cell landscape in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2023;29(1): S39–S40. doi: 10.1093/ibd/izac247.072.
78. Wiese J.J., Manna S., Kühl A.A. et al. Myenteric plexus immune cell infiltrations and neurotransmitter expression in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Crohn's & Colitis*. 2024;18(1):121–133. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjad122.
79. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98(3):694–702. doi: 10.1016/0016-5085(90)90290-h.
80. Rijke R.P., van der Meer-Fiegggen W., Galjaard H. (1974) Effect of villus length on cell proliferation and migration in small intestinal epithelium. *Cell and tissue kinetics*. 1974;7(6):577–586. doi: 10.1111/j.1365-2184.1974.tb00441.x.
81. Vyhldal C.A., Chapron B.D., Ahmed A., Singh V., Casini R., Shakhnovich V. Effect of Crohn's disease on villous length and CYP3A4 expression in the pediatric small intestine. *Clinical and translational science*. 2021;14(2):729–736. doi: 10.1111/cts.12938.
82. Yamamoto-Furusho J.K., Mendivil E.J., Fonseca-Camarillo G. Reduced expression of mucin 9 (MUC9) in patients with ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2012;18(3): E601. doi: 10.1002/ibd.21920.
83. Wang Z., Shen J. The role of goblet cells in Crohn's disease. *Cell & Bioscience*. 2024;14(1):43. doi: 10.1186/s13578-024-01220-w.
84. Pothuraju R., Pai P., Chaudhary S. et al. Depletion of transmembrane mucin 4 (Muc4) alters intestinal homeostasis in a genetically engineered mouse model of colorectal cancer. *Aging*. 2022;14(5):2025–2046. doi: 10.18632/aging.203935.
85. Coletto E., Savva G.M., Latousakis D. et al. (2023) Role of mucin glycosylation in the gut microbiota-brain axis of core 3 O-glycan deficient mice. *Scientific reports*. 2023;13(1):3982. doi: 10.1038/s41598-023-40497-8.
86. Hinds J.P., Eidelman B.H., Wald A. Prevalence of bowel dysfunction in multiple sclerosis. A population survey. *Gastroenterology*. 1990;98(6):538–1542. doi: 10.1016/0016-5085(90)91087-m.
87. Camilleri M., Ford A.C., Mawe G.M. et al. Chronic constipation. *Nature reviews. Disease primers*. 2017;3:17095. doi: 10.1038/nrdp.2017.95.

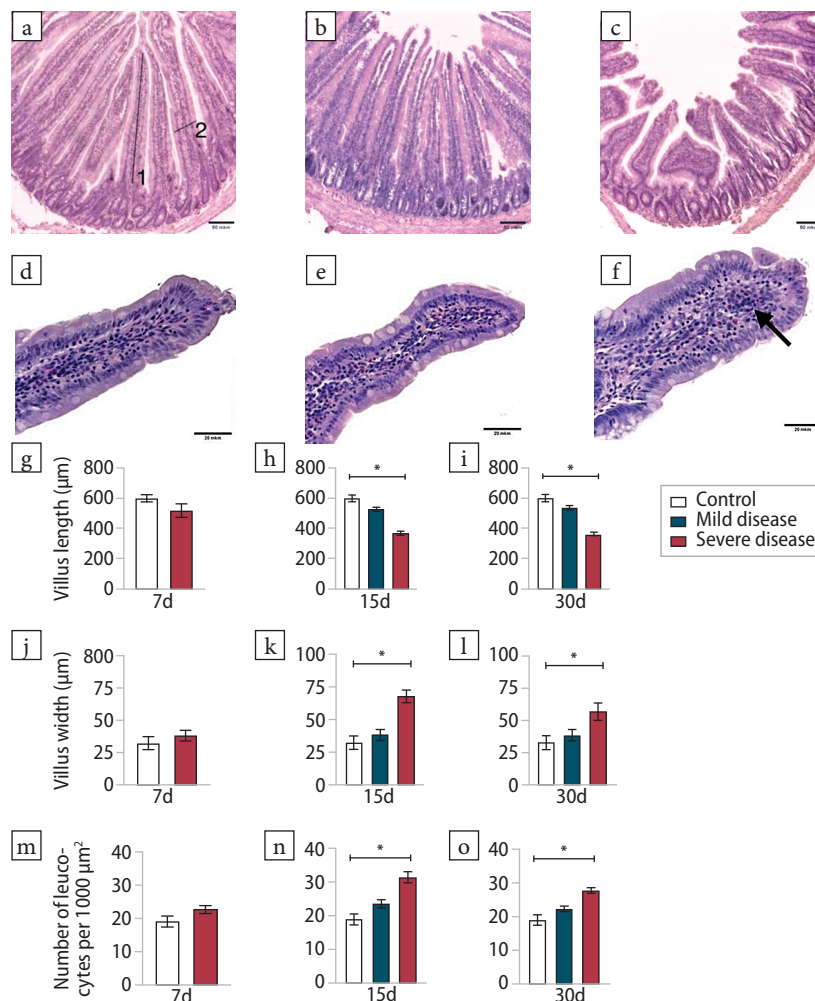
К статье

Изменения кишечного микробиома и нарушения структуры кишечника у крыс с разной тяжестью экспериментального аллергического энцефаломиелита (стр. 162–181)

To article

Changes in the intestinal microbiome and disturbances in intestinal structure in rats with different severity of experimental allergic encephalomyelitis (p. 162–181)

Рисунок 7.
Изменения в тонкой кишке в процессе развития ЭАЭ у крыс с разной тяжестью заболевания
Figure 7.
Changes in the small intestine during EAE development in rats with different disease severity.



Примечания:

Severe disease – тяжело болеющая группа-ТБ (n=3); mild disease – легко болеющая группа-ЛБ (n=3).

a, b, c – микрофотографии ворсинок тонкой кишки интактных животных (a), группы ЛБ (b) и ТБ (c) на 15 день; окраска: гематоксилин-эозин. Обозначения измеряемых параметров: 1 – длина ворсинки, 2 – ширина ворсинки. Увеличение: x100.

d, e, f – микрофотографии участка собственной пластинки слизистой ворсинок тонкой кишки интактных животных (d), группы ЛБ (e) и ТБ (f) на 15 день; окраска: гематоксилин-эозин. Стрелкой обозначено скопление лейкоцитов в собственной пластинке ворсинки. Увеличение: x400

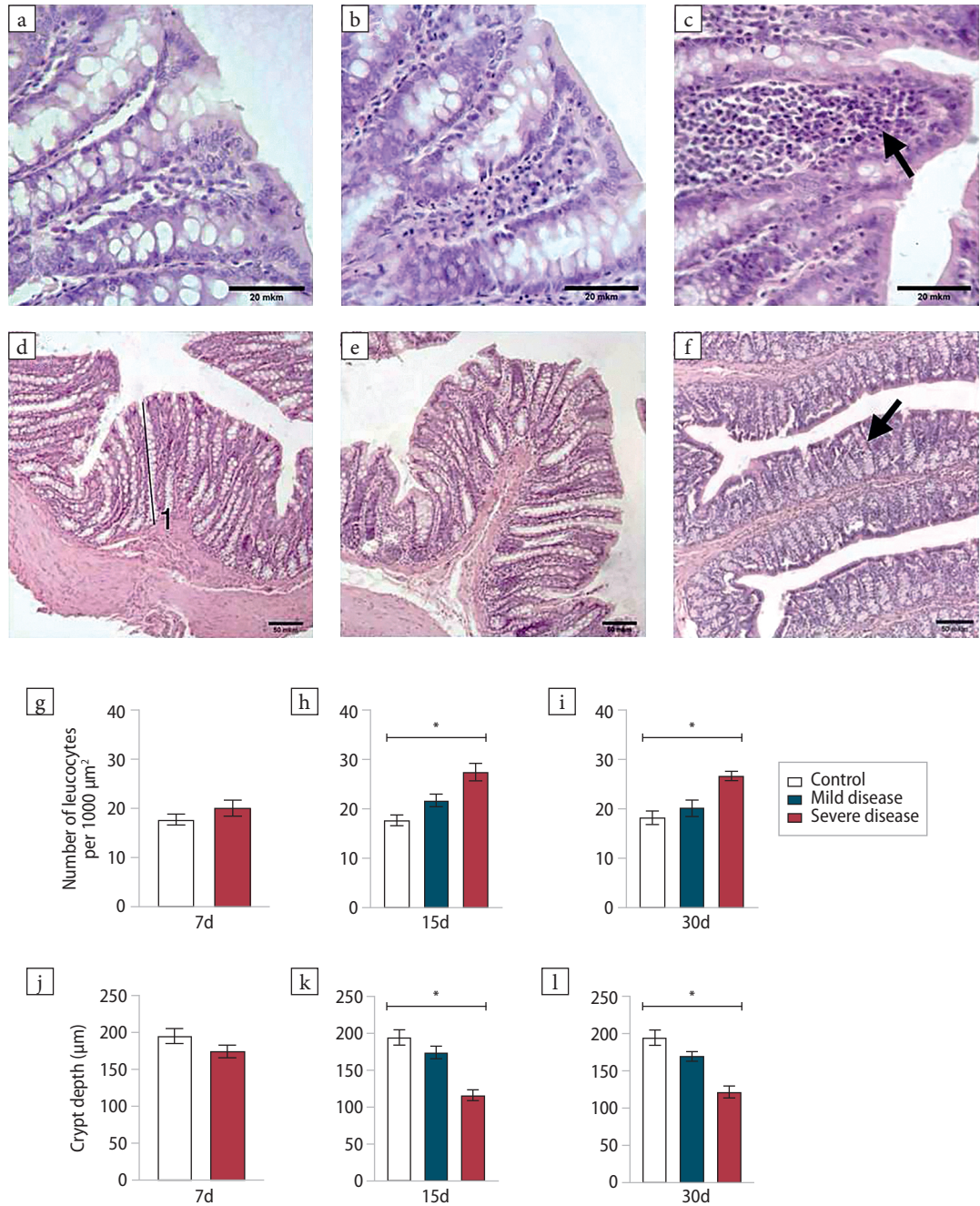
g-o – морфометрический анализ. g-i – сравнение изменения длины ворсинки в тонкой кишке разных групп с 7-го по 30-й день; j-l – сравнение изменения ширины ворсинки в тонкой кишке разных групп с 7-го по 30-й день; m-o – сравнение изменения количества лейкоцитов в собственной пластинке слизистой в тонкой кишке разных групп с 7-го по 30-й день. Данные представлены в виде гистограммы (среднее ± ошибка среднего). Статистически значимые различия между группами: *p < 0.05, ANOVA с post-hoc тест Тьюки.

Abbreviations:

MD – mild disease (n = 3); SD – severe disease (n = 3). a-c: microphotographs of small intestine villi in intact animals (a), MD group (b), and SD group (c) on day 15; staining: hematoxylin and eosin. Measured parameters: 1 – villus length, 2 – villus width. Magnification: x100. d-f: microphotographs of the lamina propria of the small intestine villi in intact animals (d), MD group (e), and SD group (f) on day 15; staining: hematoxylin and eosin. Arrows indicate leukocyte infiltrates in the lamina propria. Magnification: x400. g-o: morphometric analysis. g-i: comparison of villus length changes in the small intestine between groups from day 7 to day 30; j-l: comparison of villus width changes in the small intestine between groups from day 7 to day 30; m-o: comparison of leukocyte number changes in the lamina propria of the small intestine between groups from day 7 to day 30. Data are presented as histograms (mean ± standard error of the mean). Statistically significant differences between groups: * p < 0.05, ANOVA with Tukey's post-hoc test.

Рисунок 8.
Изменения
в толстой кишке
в процессе раз-
вития ЭАЭ у крыс
с разной тяжестью
заболевания

Figure 8.
Changes in the
large intestine
during EAE devel-
opment in rats with
different disease
severity.



Примечания:

Severe disease – тяжело болеющая группа-ТБ (n=3); mild disease – легко болеющая группа-ЛБ (n=3).

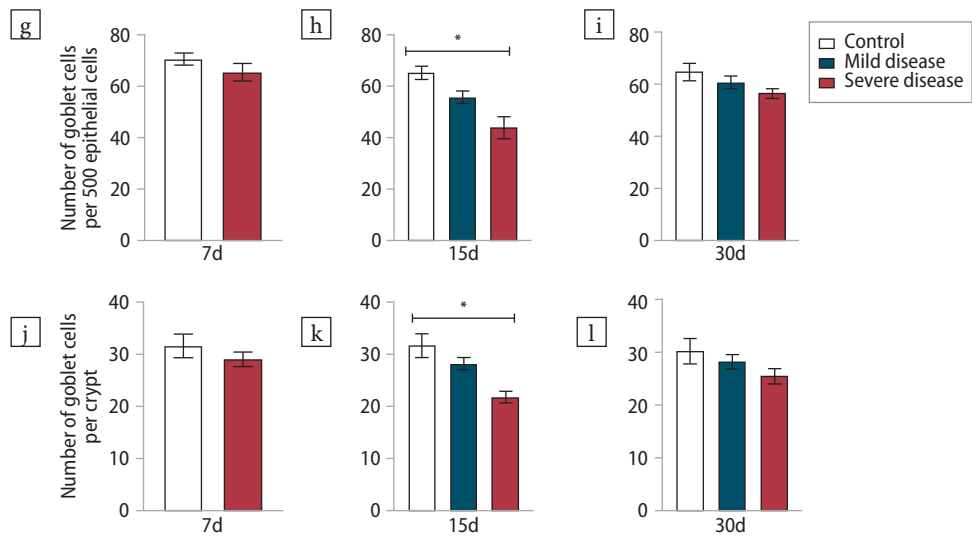
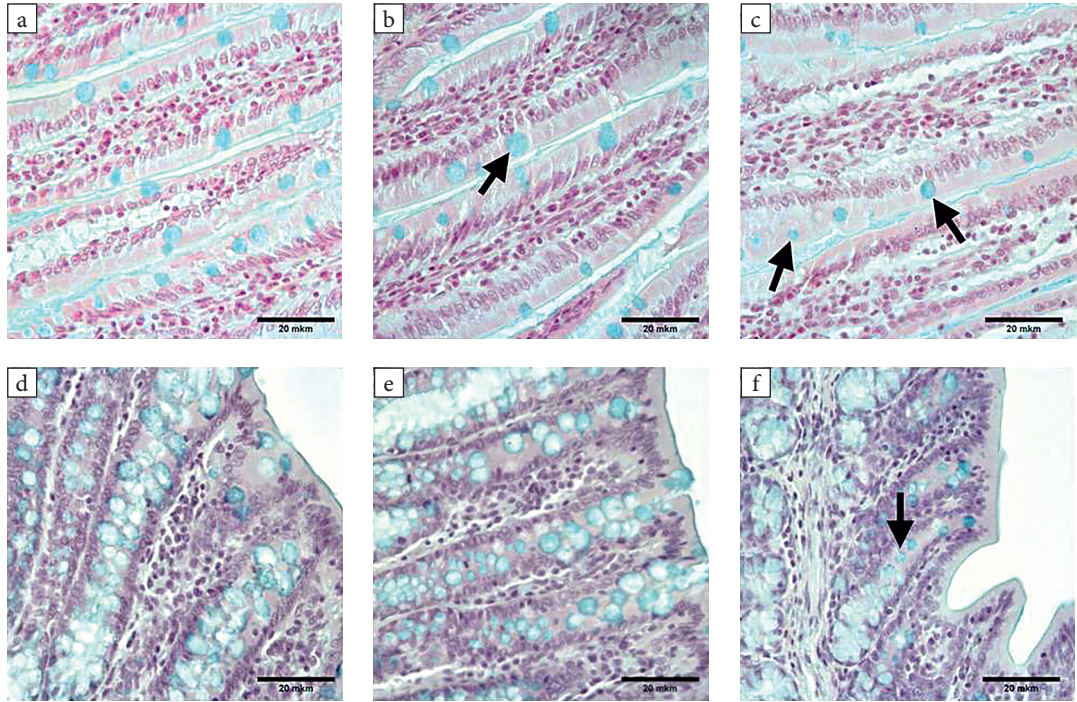
a, b, c – микрофотографии участков собственной пластинки слизистой толстой кишки интактных животных (a), группы ЛБ (b) и ТБ (c) на 15 день; окраска: гематоксилин-эозин. Стрелкой отмечен лейкоцитарный инфильтрат в собственной пластинке слизистой. Увеличение: ×400. d, e, f – микрофотографии участков толстой кишки интактных животных (d), группы ЛБ (e) и ТБ (f) на 15 день; окраска: гематоксилин-эозин. Обозначение измеряемых параметров: 1 – глубина крипты. Стрелкой показана крипта ТБ животного, характеризующаяся меньшей глубиной, в сравнении с другими группами. Увеличение: ×100. g-i – морфометрический анализ. g-i – сравнение изменения количества лейкоцитов в собственной пластинке слизистой толстой кишки разных групп с 7-го по 30-й день; j-l – сравнение изменения глубины крипт в толстой кишке разных групп с 7-го по 30-й день. Данные представлены в виде гистограммы (среднее ± ошибка среднего). Статистически значимые различия между группами: * - p < 0.05, ANOVA с post-hoc тест Тьюки.

Abbreviations:

MD – mild disease (n = 3); SD – severe disease (n = 3). a-c: microphotographs of areas of the lamina propria in the large intestine of intact animals (a), MD group (b), and SD group (c) on day 15; staining: hematoxylin and eosin. Arrows indicate leukocyte infiltrates in the lamina propria. Magnification: ×400. d-f: microphotographs of areas of the large intestine in intact animals (d), MD group (e), and SD group (f) on day 15; staining: hematoxylin and eosin. Measured parameter: 1 – crypt depth. The arrow in panel f shows a crypt in the SD group animal characterized by reduced depth compared to other groups. Magnification: ×100. g-l: morphometric analysis. g-i – comparison of leukocyte number changes in the lamina propria of the large intestine between groups from day 7 to day 30; j-l – comparison of crypt depth changes in the large intestine between groups from day 7 to day 30. Data are presented as histograms (mean ± standard error of the mean). Statistically significant differences between groups: * p < 0.05, ANOVA with Tukey's post-hoc test.

Рисунок 9.
Изменение числа бокаловидных в тонкой и толстой кишке в процессе развития ЭАЭ у крыс с разной тяжестью заболевания

Figure 9.
Changes in goblet cell number in the small and large intestine during EAE development in rats with different disease severity.



Примечания:

Severe disease – тяжело болеющая группа-ТБ (n=3); mild disease – легко болеющая группа-ЛБ (n=3).

a, b, c – микрофотографии бокаловидных клеток тонкой кишки интактных животных (a), группы ЛБ (b) и ТБ (c) на 15 день; окраска: гематоксилин-альциановый синий. Стрелками обозначены более крупные бокаловидные клетки у ЛБ животного (b), в сравнении с ТБ животным (c). Увеличение: $\times 400$. d, e, f – микрофотографии бокаловидных клеток толстой кишки интактных животных (d), группы ЛБ (e) и ТБ (f) на 15 день; окраска: гематоксилин-альциановый синий. Стрелкой обозначены более мелкие бокаловидные клетки у ТБ животного. Увеличение: $\times 400$. g-l – морфометрический анализ. g-i – значения бокаловидных клеток в тонкой кишке разных групп с 7-го по 30-й день; j-l – значения бокаловидных клеток в толстой кишке разных групп с 7-го по 30-й день. Данные представлены в виде гистограммы (среднее \pm ошибка среднего). Статистически значимые различия между группами: * – $p < 0.05$, ANOVA с post-hoc тест Тьюки.

Abbreviations:

MD – mild disease (n = 3); SD – severe disease (n = 3). a-c: microphotographs of goblet cells in the small intestine of intact animals (a), MD group (b), and SD group (c) on day 15; staining: hematoxylin and alcian blue. Arrows indicate larger goblet cells in MD animals (b) compared to SD animals (c). Magnification: $\times 400$. d-f: microphotographs of goblet cells in the large intestine of intact animals (d), MD group (e), and SD group (f) on day 15; staining: hematoxylin and alcian blue. Arrows indicate smaller goblet cells in SD animals. Magnification: $\times 400$. g-l: Morphometric analysis. g-i: goblet cell number in the small intestine of different groups from day 7 to day 30; j-l: goblet cell counts in the large intestine of different groups from day 7 to day 30. Data are presented as histograms (mean \pm standard error of the mean). Statistically significant differences between groups: * $p < 0.05$, ANOVA with Tukey's post-hoc test.