

*На правах рукописи*



ФАТХУЛЛИНА АЛИЯ РИНАТОВНА

**РОЛЬ ЦИТОКИНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-23 И ИНТЕРЛЕЙКИНА-22  
В РАЗВИТИИ АТЕРОСКЛЕРОЗА  
ПУТЕМ РЕГУЛЯЦИИ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА**

03.01.04 – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2019

Работа выполнена в НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний» Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» в тесном сотрудничестве с онкологическим центром Фокс Чейз, Филадельфия, США (Fox Chase Cancer Center).

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук, доцент  
**Кольцова Екатерина Константиновна**

**Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор  
**Абрамова Зинаида Ивановна**

**Официальные оппоненты:** **Купраш Дмитрий Владимирович**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник Института молекулярной биологии им. Энгельгардта (ИМБ) Российской академии наук (РАН), профессор РАН и член-корреспондент РАН по отделению биологических наук; профессор МГУ им. М.В. Ломоносова.  
**Тюрин Юрий Александрович**, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией иммунологии и разработки аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии; ассистент кафедры биохимии Казанского государственного медицинского университета.

**Ведущая организация:** Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (г. Нижний Новгород).

**Защита диссертации состоится** 29 августа 2019 года в 10:00 ч. на заседании диссертационного совета Д 212.081.36 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76, ауд. 208.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, Ул. Кремлевская, д. 35.

Автореферат разослан «\_\_\_» 2019 г.  
Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор  Абрамова З.И.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

Атеросклероз является одним из наиболее распространенных видов сердечно – сосудистых заболеваний (ССЗ), выступающих первостепенной причиной смерти во всех развитых странах. Это хроническое воспалительное заболевание стенки артериальных сосудов, инициируемое накоплением липидов и регулируемое врожденным и адаптивным иммунным ответом (Galkina and Ley, 2009). Взаимосвязь между врожденной и адаптивной иммунными реакциями в стенках аорты регулируется медиаторами воспалительного процесса – цитокинами, участвующими в патогенезе атеросклероза (Ait-Oufella et al., 2011). Повышенная концентрация специфических про-воспалительных цитокинов в плазме крови и стенках артериальных сосудов человека и грызунов связана с прогрессированием атеросклероза (Han et al., 2010).

Интерлейкин (ИЛ)-23 представляет собой цитокин суперсемейства цитокинов ИЛ-6/ИЛ-12, продуцируемый миелоидными клетками. Повышенная экспрессия ИЛ-23 вызывает развитие нескольких хронических воспалительных заболеваний (воспалительная болезнь кишечника, артрит, псориаз), в то время как генетическая инактивация или фармакологическая блокада ИЛ-23 подавляет развитие этих заболеваний. Известно, что ИЛ-23 регулирует выработку цитокинов ИЛ-17А и ИЛ-22 (Gaffen et al., 2014) Т-хелперами, врожденными лимфоидными клетками 3 типа и гамма-дельта Т-клетками в условиях развития воспалительных заболеваний. Роль ИЛ-17А в развитии атеросклероза была подробно изучена (Taleb et al., 2010), в то время как механизм действия цитокина ИЛ-22 при атеросклерозе в значительной степени не был исследован. Сообщалось, что ИЛ-22 положительно регулирует метаболические процессы, обмен липидов в печени и жировой ткани, препятствуя развитию заболеваний (Wang et al., 2014).

Повышенный уровень продукции цитокина ИЛ-23 был обнаружен в стенках артериальных сосудов у пациентов и мышей с ССЗ (Abbas et al., 2015), в то время как в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с ССЗ уровень цитокина был понижен (KhojastehFard et al., 2012). Несмотря на то, что многочисленные данные на других моделях воспалительных заболеваний позволяют предположить, что ИЛ-23 может способствовать развитию атеросклероза, точная роль этого цитокина в контексте развития атеросклероза остается неизвестной.

Микробные и вирусные компоненты комменсальной и патогенной микрофлоры кишечника, совместно именуемые как «микробиом», являются ключевыми факторами, регулирующими продукцию цитокинов и дифференцировку клеток, производящих цитокины (Khosravi and Mazmanian, 2013). Новые научные данные демонстрируют, что комменсальная микрофлора оказывает непосредственное влияние на активацию иммунной системы и воспалительных процессов, играя ключевую роль в регуляции хронических воспалительных заболеваний (Jonsson and Backhed, 2017). Изменения в балансе микрофлоры кишечника могут системно влиять

на прогрессирование воспалительного процесса посредством продуцируемых метаболитов, которые увеличивают риск развития ССЗ (Jonsson and Backhed, 2017).

На сегодняшний день механизмы, контролирующие взаимодействие между специфическими компонентами диеты, цитокинами, передачей иммунных сигналов и микробиомом при развитии атеросклероза мало изучены.

**На основании вышеизложенного была сформулирована цель и определены задачи настоящего исследования.**

**Целью** данного исследования стало определение роли цитокинов ИЛ-23/ИЛ-22 в механизме регуляции развития атеросклероза.

Для достижения поставленной цели были решены следующие основные задачи:

1. Определить размер, структуру и состав атеросклеротических бляшек у мышей с генетическим нокаутом по гену рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (*Ldlr*-/-) в условиях дефицита ИЛ-23 и ИЛ-22.
2. Оценить роль ИЛ-23 и ИЛ-22 в регуляции гомеостаза кишечника в контексте развития атеросклероза.
3. Провести метагеномный анализ микрофлоры кишечника мышей на предмет выявления таксономических групп бактерий, способствующих прогрессивному развитию атеросклероза и методом трансплантации микробиома выявить способность кишечной микрофлоры индуцировать развитие заболевания.
4. Выявить наличие и уровень продуктов метаболизма бактерий кишечника в сыворотке крови методом метаболомного анализа.
5. Изучить влияние бактериальных метаболитов в крови на активацию иммунных клеток и экспрессию про-воспалительных генов, участвующих в прогрессировании заболевания.

### **Научная новизна**

В данной научно-исследовательской работе впервые описаны механизмы регуляции развития атеросклероза посредством взаимодействия цитокинов ИЛ-23/ИЛ-22 и компонентов микрофлоры кишечника на атеросклеротической модели мышей.

Впервые выявлена защитная роль цитокинов ИЛ-23 и ИЛ-22 в развитии атеросклероза путем положительной регуляции микрофлоры и поддержания целостности защитной оболочки кишечника, что препятствует транслокации и избыточному размножению патогенной микрофлоры, участвующей в биосинтезе различных метаболитов с известными про-атерогенными свойствами.

В ходе экспериментов методом метагеномного анализа микрофлоры кишечника мышей в условиях инактивации белков ИЛ-23/ИЛ-22 идентифицированы различные таксономические группы бактерий, потенциально участвующие в прогрессивном развитии заболевания путем продукции различных про-атерогенных метаболитов, что было подтверждено метаболомным анализом сыворотки крови от тех же мышей.

Анализ результатов переноса микрофлоры кишечника от мышей-доноров с дефицитом ИЛ-23 после 16 недель диеты с высоким содержанием углеводов мышам-

реципиентам контрольной группы до диеты продемонстрировал значительное увеличение атеросклеротической бляшки в артериальных сосудах последних, что говорит о возможности передачи заболевания путем переноса бактериальных компонентов.

Впервые показан молекулярный механизм влияния продуктов метаболизма бактерий на активацию циркулирующих в крови иммунных клеток и продукцию ими про-воспалительных молекул, способствующих развитию атеросклероза и увеличению атеросклеротической бляшки в стенках аорты.

В ходе исследований уровня экспрессии различных генов в стенках аорты был обнаружен один из ключевых медиаторов активации иммунных клеток в условиях дефицита цитокинов ИЛ-23 и ИЛ-22 и повышения уровня бактериальных метаболитов в крови – остеопонтин (ОПН), продуцирующийся CD11b макрофагами в стенках сосудов артерий.

### **Научно-практическая значимость работы**

Цитокин ИЛ-23 является одним из основных про-воспалительных медиаторов развития некоторых хронических воспалительных заболеваний, как ревматоидного артрита, псориаза и воспалительных заболеваний кишечника. Более того генетическая инактивация или фармакологическая блокада ИЛ-23 подавляет развитие этих заболеваний. В настоящее время ингибиторы ИЛ-23 находятся на стадии клинических испытаний и успешно используются в лечении различных воспалительных заболеваний (псориаз, артрит и др.). Однако нередко наблюдались случаи с летальным исходом пациентов от развития серьезных побочных эффектов на сердечно – сосудистую систему в результате данной анти-цитокиновой терапии. Нами установлено, что у этих пациентов были повышенены уровни факторов риска развития ССЗ, в результате чего терапия с использованием ИЛ-23 привела к неблагоприятным последствиям.

Таким образом, полученные данные представляют практический интерес для клинических исследований и демонстрируют необходимость информативного использования ингибиторов ИЛ-23, которые следует применять с осторожностью, возможно, в сочетании с другими методами лечения у пациентов с повышенными факторами риска развития заболевания.

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

1. Недостаток цитокинов ИЛ-23 и ИЛ-22 приводит к прогрессивному развитию атеросклеротического поражения стенок аорты, что сопровождается повышенным накоплением иммунных клеток (миелоидных и Т-клеток) и чрезмерной продукцией про-воспалительных молекул (цитокинов и хемокинов).
2. В контексте развития атеросклероза цитокины ИЛ-23 и ИЛ-22 положительно регулируют экспрессию генов antimикробных пептидов (RegIII $\beta$  и RegIII $\gamma$ ) и белка (муцина), являющихся основными компонентами защитной слизистой оболочки, тем самым препятствуя избыточному росту таксономических групп бактерий (*Prevotellaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* и др.) с про-атерогенными свойствами.

3. В условиях дефицита ИЛ-23 и ИЛ-22 избыточный рост патогенной микрофлоры приводит к повышенному уровню синтеза про-атерогенных метаболитов (ЛПС, ТМАО и др.), которые, попадая в системное кровообращение, способствуют развитию и прогрессированию атеросклеротического поражения аорты.
4. Метаболиты, ЛПС и ТМАО, синтез которых осуществляется компонентами микрофлоры кишечника, попадая в кровеносную систему, способствуют активации циркулирующих моноцитов крови, что приводит к повышенному уровню экспрессии про-воспалительной молекулы остеопонтина (ОПН). ОПН участвует в активации различных иммунных клеток и способствует их притоку в очаг поражения, тем самым усугубляя развитие атеросклероза.

### **Апробация работы**

Основные результаты исследований были представлены на 21-ой, 22-ой ежегодных научных конференциях студентов и аспирантов Онкологического центра «Фокс Чейз» (Филадельфия, США, 2016-2017); 5-ом и 6-ом ежегодных симпозиумах университета Тэмпл (Филадельфия, США, 2016-2017); на 36-й и 38-й ежегодной конференции по Атеросклерозу, Тромбозу и Сосудистой биологии (Нэшвилл, США, 2016 и Сан-Франциско, США, 2018); на международной конференции Гордона по атеросклерозу (GRC) (Ньюри, США, 2017); на 72-ой всероссийской конференции молодых ученых «Биосистемы» (Нижний Новгород, Россия, 2019); на 24-й сессии молодых ученых, в ходе которой работа была отмечена дипломом 2 степени (технические, естественные, математические науки) (Нижний Новгород, Россия, 2019).

**Публикация результатов исследования.** По теме диссертационной работы было опубликовано 9 научных работ, среди которых 3 публикации в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, заключения и списка цитированной литературы. Работа изложена на 133 страницах машинописного текста, 36 рисунков. Библиография включает 183 наименования.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объекты исследования.** Эксперименты *in vivo* проводились с использованием мышей линий: C57Bl/6, *Ldlr*-/-, *Apoe*-/-, *Il23*-/- (Jackson laboratory), *Il23r*-/- были первоначально предоставлены доктором Джоржио Тринкиери из NCI/NIH (Национальный институт злокачественных новообразований/Национальный институт здравоохранения, США) и *Il22*-/- были предоставлены компанией Genentech Inc (США).

**Трансплантація костного мозга.** Мышей-реципиентов (возрастом 6-8 недель) облучали в 2-х равных дозах по 600 рад с перерывом в 3 часа. Из бедренной кости и

голени мышей-доноров выделяли костный мозг и сусpendировали в ФСБ в стерильных условиях. После второго облучения мышам-реципиентам внутривенно вводили суспензию  $5 \times 10^6$  клеток костного мозга и содержали в клетках с водой, содержащей антибиотики (неомицин и полимиксин В), в течение первых 2-х недель.

**Внутрибрюшинное введение рекомбинантного ИЛ-22 (mIL-22-Ig).** Мышам, содержащимся на высокоуглеводной диете, вводили внутрибрюшинную инъекцию рекомбинантного ИЛ-22 (mIL22-Ig, 50мг на одну инъекцию; ФСБ использовали в качестве контроля), любезно предоставленного компанией Genentech Inc., каждые 3 дня в течение 4-х недель.

**Элиминирование бактериальной флоры кишечника.** Мышам, содержащимся на высокоуглеводной диете, проводили антибактериальную терапию с использованием антибиотиков широкого спектра действия в питьевой воде: ципрофлоксацин 0,2 г/л, неомицин 1 г/л, ванкомицин 0,5 г/л, ампициллин 1 г/л, метронидазол 0,5 г/л, примаксин 0,5 г/л, в течение последних 4-х недель диеты.

**Внутрибрюшинное введение антител против остеопонтина.** Мышам вводили внутрибрюшинную инъекцию антител против остеопонтина (100мг на одну инъекцию) каждые 3 дня в течение 2,5 недель. Антитела были получены из гибридной клеточной линии (клон MRPIV10, DSHB, Университет Айовы, США), в качестве контроля были использованы ФСБ или мышиный изотипный контроль IgG1 kappa (клон MOPC-21).

**Определение площади атеросклеротических бляшек.** Корни аорты были выделены, помещены в среду для заморозки тканей и получены срезы толщиной 5 мкм, начиная с плоскости аортального клапана. Срезы окрашивались Oil Red O/гематоксилином по стандартному протоколу окрашивания. Изображения были получены с помощью микроскопа Nikon Eclipse 80i с объективом 4x0,2 NA. Для определения площади бляшки было использовано программное обеспечение FIJI, далее рассчитывалось среднее значение площади для каждой мыши.

**Анализ клеточного состава методом цитофлуорометрии.** Клеточные суспензии из тканей аорты и кишечника были получены путем ферментативного расщепления с последующей инкубацией с антителами и анализом методом цитофлуорометрии (LSRII, BD Biosciences). Для анализа внутриклеточных цитокинов, клетки стимулировали в питательной среде RPMI с ФМА (форбол миристат ацетат)/иономицином и с брефелдином А в течение 5 часов *in vitro* при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Для анализа остеопонтина (ОПН) клетки стимулировали в среде DMEM с ЛПС (100нг/мл) в течение 4 часов в присутствии брефелдина А. Для анализа ИЛ-22 клетки стимулировали в RPMI с рекомбинантными цитокинами ИЛ-23 (50нг/мл), ИЛ-2 (5нг/мл) и ИЛ-6 (5нг/мл) в течение 14 часов при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Брефелдин А был добавлен через 10 часов стимуляции. Клетки были зафиксированы, пермеабилизованы с помощью набора Cytofix/Cytoperm (BD) и инкубированы соответствующими антителами. Данные, полученные методом цитофлуорометрии, были проанализированы при помощи программного обеспечения FlowJo.

**Сканирующая электронная микроскопия.** Образцы фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида в ФСБ (рН 7,4), промывали в ФСБ и фиксировали в 1% тетраоксиде осмия (OsO<sub>4</sub>). Образцы подвергались дегидратации посредством смены возрастающих концентраций этанола с последующим напылением образцов золотом. Результаты были визуализированы с помощью сканирующего электронного микроскопа с полевой эмиссией (JEOL JSM 6335F).

**Анализ экспрессии генов.** Образцы тканей гомогенизировали с последующим этапом выделения РНК при помощи набора Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue (Bio-Rad Laboratories) в соответствии с протоколом. Первичная цепь кДНК была синтезирована с использованием супермикса для обратной транскрипции iScript 5X. Анализ экспрессии генов проводили методом ПЦР в реальном времени при использовании Sybr Green и праймеров для соответствующих генов. Полученные данные анализировали с помощью статистического программного обеспечения Prism (GraphPad).

**Анализ уровня бактериального эндотоксина.** Уровень эндотоксина в сыворотке определяли при помощи набора для количественного определения эндотоксина Pierce LAL (Thermo Scientific) в соответствии с протоколом. Результаты анализа были получены с помощью спектрофотометра.

**Анализ уровня триметиламин-N-оксида в сыворотке крови.** Уровень ТМАО количественно определяли с помощью жидкостной хроматографии со стабильным изотопным разведением с использованием масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией на тройном квадрупольном масс-спектрометре Shimadzu 8050, взаимодействующим с UHPLC, используя d9 (триметил)-ТМАО в качестве внутреннего стандарта.

**Иммунофлуоресцентный и имmunогистохимический анализ.** Срезы корня аорты и толстого кишечника фиксировали в ацетоне и в 1% растворе параформальдегида в 100мМ фосфате натрия, содержащего 60мМ лизина и 7мМ периодата натрия, рН 7,4, на льду. Образцы тканей блокировали в растворе авидина/биотина с последующей инкубацией в 5% растворе козьей сыворотки и 1% БСА (Sigma) и окрашивали первичными и вторичными антителами с добавлением ДАФИ. Анализ ИФ проводили с использованием флуоресцентной микроскопии.

Срезы толстого кишечника фиксировали в ацетоне, инкубировали в 3%-ном растворе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и блокировали в 5% козьей сыворотке. Окрашивали первичными и биотинилизованными вторичными антителами с последующей инкубацией со стрептавидином-HRP (BD, Pharmingen) и обработкой субстратом DAB (0,05% DAB и 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ФСБ). Стекла со срезами погружали в раствор гематоксилина и в 0,2% раствор аммиака (Bluing). Дегидратацию образцов проводили через серию 100%-го этанола и ксилола (Fisher Chemicals). Окрашенные образцы заключали под покровные стекла в среде Permount (Fisher).

Для окрашивания внутренней поверхности толстого кишечника фрагменты ткани фиксировали в 4% р-ре ПФА и инкубировали в р-ре, содержащем 0,5% (м/об) сапонина, 2% эмбриональной бычьей сыворотки и 0,09% (м/об) азида в ФСБ. Этот же

буфер использовали для последующих инкубаций с флуоресцентным фаллоидином (Alexa Fluor 647) для окрашивания структуры эпителиальных клеток и йодидом YoYo-1 (491/509) для окрашивания ДНК бактерий с последующей 2-х часовой инкубацией при 37°C. Образцы промывали в ФСБ и анализировали с использованием флуоресцентной микроскопии.

**Анализ влияния метаболитов на экспрессию остеопонтина.** Мышам вводили внутрибрюшинную инъекцию ЛПС (50мг) и ТМАО (250мкл 100мМ раствора) в течение 3 недель. Для эксперимента *ex vivo* выделенные аорты стимулировали в среде DMEM без бычьей эмбриональной сыворотки с ЛПС (100нг/мл), ТМАО (200нг/мл) в течение 8 часов при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Кровь собирали через 4 часа после инъекции метаболитов ЛПС (50мг) и ТМАО (250мкл 100мМ раствора на инъекцию) с последующей иммуномагнитной сепарацией Ly6C-положительных моноцитов с помощью набора Easy Sep FITC (StemCell Technologies) в соответствии с протоколом. Выделенные клетки лизировали в RLT-буфере с последующим выделением РНК и анализом ПЦР в реальном времени.

**Анализ микробиома кишечника.** ДНК была выделена из фекалий, собранных из слепой кишки мышей, с помощью набора QIAamp DNA stool Mini (Qiagen) в соответствии с протоколом. Вариабельная (V4) область гена 16S рДНК была амплифицирована с помощью двух этапов ПЦР-амплификации с использованием высокочувствительной ДНК-полимеразы Phusion (NEB). Ампликоны очищали между/после этапов реакций ПЦР с Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). Библиотеку генов определяли с KAPA (Kapa Biosystems) и размер с использованием Agilent Tapestation 4200 (Agilent). Библиотеки объединяли посредством использования автоматической машины для обработки жидкостей Epmotion 5075 tmx (Eppendorf) и секвенировали с 5% библиотекой PhiX, добавленной в пул на машине Illumina MiSeq с использованием набора v3 (600 циклов). Файлы Fastq были сгенерированы в Basespace (Illumina). Последовательности были объединены в оперативные таксономические единицы (OUT) со сходством 97% при помощи cluster\_otus в USEARCH. Программа QIIME (1.9.1) использовалась для классификации и выравнивания полученных OTU. Assign\_taxonomy.ru использовался для присвоения таксономии методом RDP по умолчанию и при помощи базы данных GreenGenes. Статистически значимые различия были определены непараметрическим критерием Манна-Уитни и р-значения были скорректированы, используя q-значения (0.05) в качестве точки отсекания данных. Результаты анализа были визуализированы посредством тепловых карт и графиков PCA (Анализ Главных Компонентов) (Partek 6,6).

**Метагеномный анализ.** Библиотеки были секвенированы на платформе Illumina NextSeq 500. Для каждого образца необработанные данные были отсортированы по качеству с помощью Trimmomatic v.0.36. Отфильтрованные данные выравнивали по геному *Mus musculus* с bowtie v.2-2.3.4. Данные секвенирования, не совпадающие с геномом мыши, относились к микробиому и использовались в качестве входных данных для сборки генома при помощи MEGAHIT v1.1.1. Полученные в процессе

сборки контиги ( $\geq 500$  п.н.) были классифицированы в таксономические единицы с kraken v.1.1 с использованием базы k-мер, содержащей все полные геномы, присутствующие в GenBank (NCBI). Контиги были интерпретированы с prokka v.1.12, а прогнозирование метапротеом было проведено посредством программы interproscan v.5.29-68.0. Отсортированные данные, используемые в качестве входных данных для сборки, были выровнены относительно контигов, используя bowtie2 с целью определения последовательности для каждого контига. Относительная численность для каждого таксона была рассчитана как относительная доля базисов, приписываемая этому таксону, полученных в результате несобранных фрагментов чтений, встроенных в контиги, от общего количества базисов, упорядоченных для этого образца. Относительная численность была выражена в частях на миллион.

**Метаболомный анализ.** Масс-спектрометрический анализ был проведен в центре протеомики и метаболомики Института Вистар, Филадельфия, США. Полярные метаболиты экстрагировали 80%-ным метанолом и количественное определение метаболитов проводили на трехквадрупольном масс-спектрометре SCIEX 5500 QTRAP, оснащенным источником ионов Turbo V и соединенным с системой UHPLC Shimadzu Nexera. Образцы вносили в колонку ZIC-pHILIC 2,1 мм с диаметром 150 мм (EMD Millipore). Буфер А – 20мM карбонат аммония, 0,1% гидроксид аммония; буфер В – ацетонитрил. Градиентное элюирование (20 мин – 80-20% В, 0,5 мин – 20-80% В, 7,5 мин – 80% В), скорость потока подвижной фазы – 0,150мл/мин. Использовали электрораспыльную ионизацию, +5500V в режиме регистрации положительных ионов и  $\sim 4500$ V – отрицательных. Площади пиков были интегрированы с помощью программного обеспечения MultiQuant v3.0.2 (SCIEX). Уровень интенсивности обнаружения метаболита был нормализован и log<sub>2</sub>-трансформирован. Статистическая значимость различий была проверена с помощью Limma (3.36.1), и результаты, превышающие порог  $p < 0,05$  определены, как статистически значимые. Анализ метаболического пути TMAO продемонстрирован в виде кратных изменений относительно контрольной группы.

**Статистическая обработка данных.** Данные были проанализированы с использованием Prism (GraphPad). Двусторонний t-критерий Стьюдента и критерий Уилкоксона были использованы для сравнения кратного изменения экспрессии генов. Тест ANOVA был использован для множественного сравнения. Состав микробиома анализировали и визуализировали с использованием пакетов Partek, Matlab и R. Стандартные статистические тесты, такие как t-критерий, ANOVA, PERMANOVA, PCA, t-SNE и другие, были выполнены и визуализированы с использованием диаграмм рассеяния и тепловых карт. Стандартные статистические тесты, такие как t-критерий, ANOVA, PERMANOVA, PCA, t-SNE и другие, были выполнены и визуализированы с использованием диаграмм рассеяния и тепловых карт. Анализ Picrust был выполнен на файле биома. Выходные данные были проанализированы с использованием Partek и R. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .  $P < 0,05$  считалось значимым.

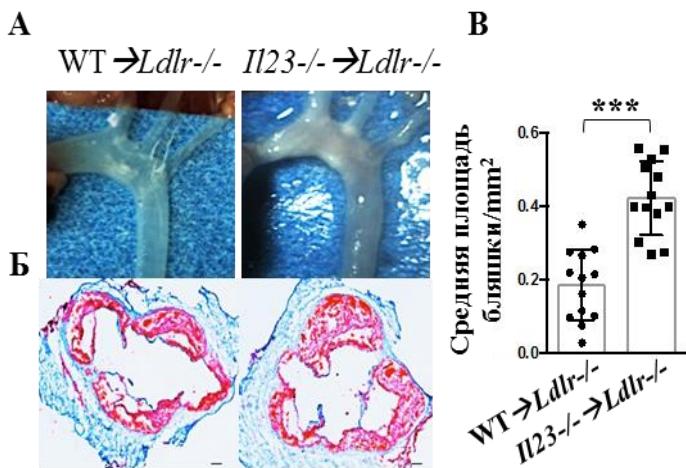
## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние дефицита интерлейкина-23 на развитие и прогрессирование атеросклеротического поражения аорты

ИЛ-23 и его когнитивный рецептор ИЛ-23R экспрессируются гемопоэтическими/иммунными клетками, которые в свою очередь берут свое начало из стволовых клеток костного мозга. Вследствие чего мы решили использовать метод трансплантации костного мозга лабораторным мышам, относящимся к одной из моделей исследования атеросклероза с генетическим нокаутом по рецептору липопротеинов низкой плотности (*Ldlr*<sup>-/-</sup>). *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышам, получившим летальную дозу облучения, был трансплантирован клеточный материал костного мозга от мышей-доноров с генетическим нокаутом ИЛ-23 или его рецептора (ИЛ-23R).

В качестве контроля *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышам был трансплантирован костный мозг от мышей дикого типа (WT). Все группы мышей содержались на высокоуглеводной диете с повышенным содержанием жира в течение 16 недель. Размеры атеросклеротических бляшек в корнях аорты были проанализированы гистохимическим методом окрашивания Oil Red O.

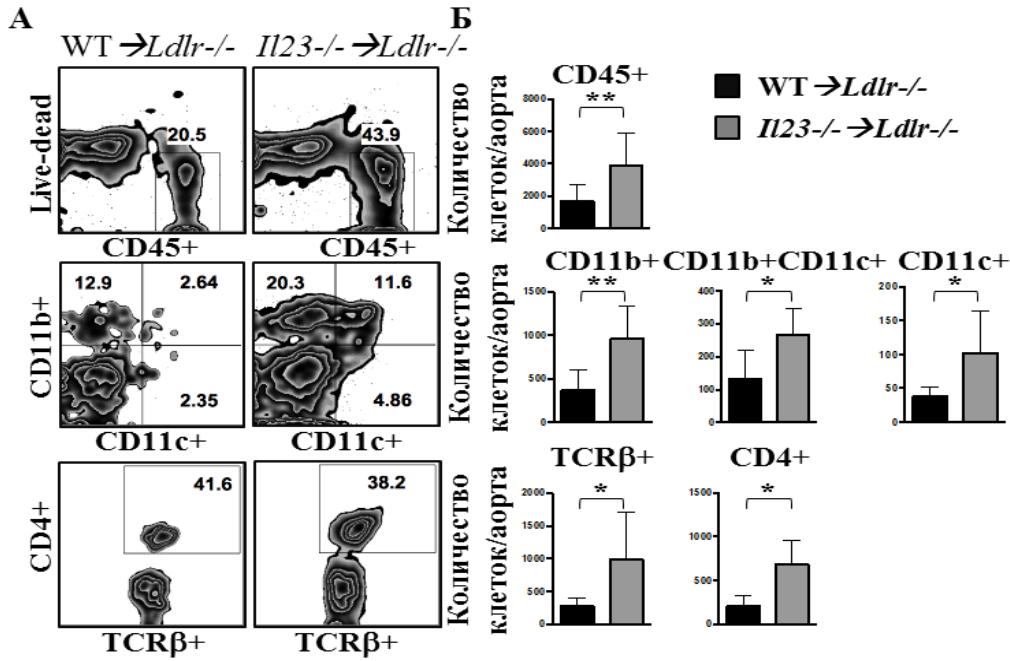
Макроскопический и гистологический анализы выявили значительное увеличение размеров атеросклеротических бляшек в стенке аорты у мышей, которым был трансплантирован костный мозг от мышей, дефицитных по гену цитокина ИЛ-23 (*Il23*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup>) по сравнению с контрольной группой с трансплантированным костным мозгом от мышей дикого типа (WT → *Ldlr*<sup>-/-</sup>) (Рис.1).



**Рис.1.** А – Изображения дуги аорты *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей с трансплантированным костным мозгом от мышей-доноров дикого типа (WT → *Ldlr*<sup>-/-</sup>) или дефицитных по гену ИЛ-23 (*Il23*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup>), которые содержались на высокоуглеводной диете с повышенным содержанием жира в течение 16 недель. Б – Репрезентативные изображения срезов корней аорты, окрашенных Oil Red O, и (В) сравнение размеров атеросклеротических бляшек у WT → *Ldlr*<sup>-/-</sup> и *Il23*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей. \*\*\*P<0,0001. Масштаб – 100мкм.

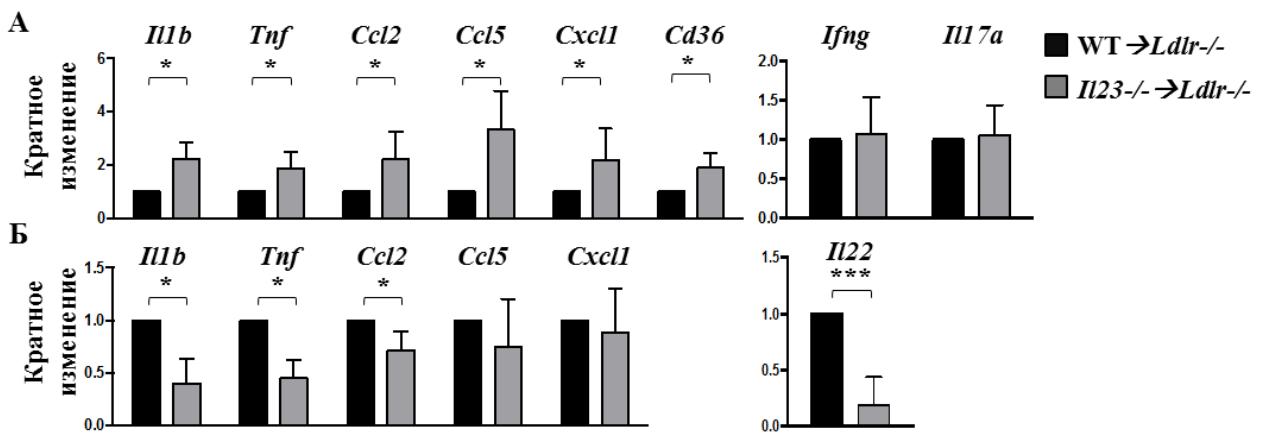
Методом проточной цитофлуорометрии и иммунофлуоресцентного анализа стенок аорты, выделенных из *Il23*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей, было обнаружено повышенное накопление различных кроветворных клеток (CD45+). Данная популяция клеток включает в себя CD4+ Т-лимфоциты (TCRβ+ CD4+) и популяции миелоидных клеток (CD11b+, CD11c+ и CD11b+CD11c+), повышенная продукция которых, согласно литературным источникам, наблюдается при развитии воспалительного процесса, что мы и наблюдали в атеросклеротических бляшках аорты мышей с дефицитом

цитокина ИЛ-23 относительно контрольной группы (Рис.2). Кроме того, анализ экспрессии генов, участвующих в процессе развития воспаления, методом ПЦР в



**Рис.2.** Анализ клеточного состава стенок аорты  $Ldlr^{-/-}$  мышей с трансплантированным костным мозгом от мышей доноров дикого типа (WT) или дефицитных по гену ИЛ-23 методом проточной цитофлуорометрии. **А** – График популяций иммунных клеток в аортах (миелоидных и Т-клеток) и их процентное соотношение. **Б** – Графики сравнения абсолютного количества клеток в аортах. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ .

реальном времени выявил значительное повышение уровня экспрессии таких генов, как: *Il1b*, *Tnf*, *Ccl2*, *Ccl5*, *Cxcl1* и *Cd36* в аорте  $Ldlr^{-/-}$  мышей с трансплантированным костным мозгом от мышей-доноров, нокаутных по гену ИЛ-23, по сравнению с контрольной группой (Рис.3А).



**Рис.3.** Относительная экспрессия генов в аорте (A) и в толстом кишечнике (Б)  $Il23^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  и  $WT \rightarrow Ldlr^{-/-}$  мышей. Уровень экспрессии мРНК нормализован по гену *RpL32*, а затем по среднему значению экспрессии генов в контрольной группе. \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,0001$ .

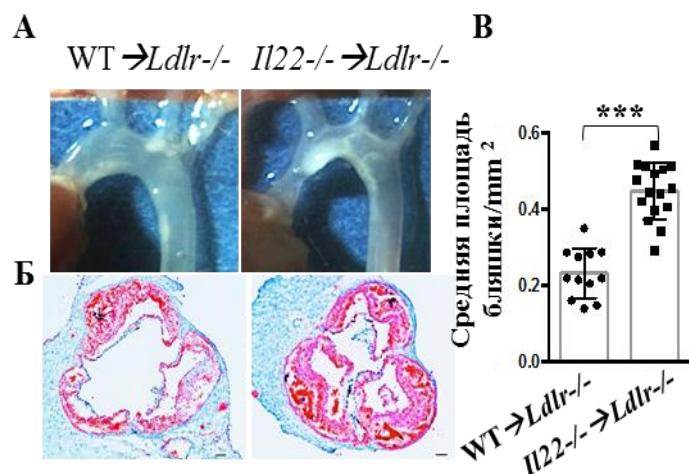
Ввиду того, что предыдущие исследования показали, что белок ИЛ-23 необходим для регуляции развития воспалительных процессов в кишечнике (Ahern et

al., 2010), мы решили исследовать экспрессию воспалительных генов в кишечнике мышей в условиях развития атеросклероза. Было установлено, что дефицит ИЛ-23 в кишечнике приводит к снижению экспрессии таких генов, как: *Il1b*, *Ccl2*, *Ccl5*, *Cxcl1*, *Ifng* и *Il22* относительно мышей контрольной группы (Рис.3Б).

Таким образом, вышеописанные результаты позволили нам предположить, что ИЛ-23 является одним из основных регуляторов развития атеросклеротического поражения аорты у мышей.

### Роль ИЛ-22 в развитии атеросклеротического поражения аорты

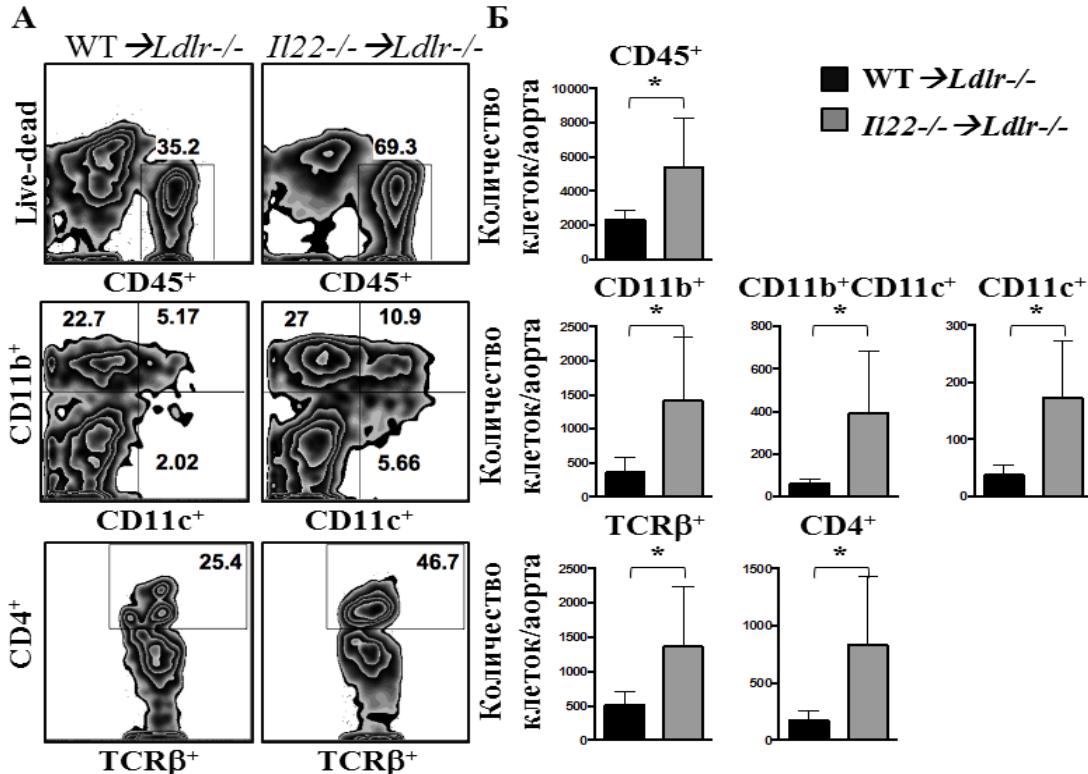
ИЛ-23 является прямым регулятором и индуктором продукции ИЛ-22 Т-хелперами и врожденными лимфоидными клетками третьего типа (ILC3) (Zheng et al., 2008). В ходе проведенных нами исследований было обнаружено статистически значимое снижение уровня экспрессии белка ИЛ-22 (Рис.3Б) в кишечнике мышей с дефицитом цитокина ИЛ-23, вследствие чего мы решили исследовать также роль ИЛ-22 в развитии атеросклероза. Мы трансплантировали костный мозг от мышей-доноров, дефицитных по гену белка ИЛ-22 мышам-реципиентам с генетическим нокаутом по рецептору липопротеинов низкой плотности (*Il22*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup>) с последующей высокоуглеводной диетой с повышенным содержанием жира в течение 16 недель. Далее, результаты анализа размеров атеросклеротических бляшек показали выраженное увеличение у *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей, получивших костный мозг, дефицитный по гену белка ИЛ-22 относительно контрольной группы мышей (Рис. 4).



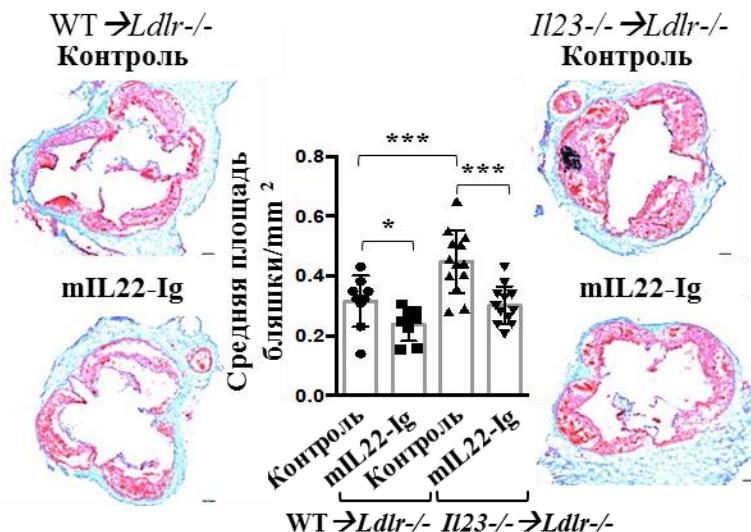
**Рис.4.** **A** — Изображения дуги аорты *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей с трансплантированным костным мозгом от мышей дикого типа (WT) или дефицитных по гену ИЛ-22, которые содержались на высокоуглеводной диете в течение 16 недель. **Б** — Репрезентативные изображения срезов корней аорты, окрашенных Oil Red O, и **(В)** сравнение размеров атеросклеротических бляшек у *WT* → *Ldlr*<sup>-/-</sup> и *Il22*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей. \*\*\*P<0,0001. Масштаб – 100мкм.

Согласно данным цитофлуорометрии и иммунофлуоресцентного анализа стенки аорты мышей с недостатком цитокина ИЛ-22 характеризовались повышенным накоплением кроветворных клеток, включая Т-клетки и различные популяции миелоидных клеток (Рис.5). Данный фенотип с точностью повторяет тот, который наблюдается у мышей с дефицитом белка ИЛ-23 (Рис.1-2), следовательно, можно предположить, что данный цитокин может контролировать развитие заболевания посредством прямой регуляции продукции ИЛ-22. Для того, чтобы подтвердить данные о защитной роли белка ИЛ-22 в развитии атеросклероза, мы решили

выяснить, будет ли введение внутрибрюшинной инъекции рекомбинантного цитокина ИЛ-22 *in vivo* компенсировать недостаток ИЛ-23 в *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышах. Для этого мы вводили рекомбинантный ИЛ-22 (mIL-22-Ig) во внутрибрюшинную полость *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей, получивших костный мозг от *Il23*<sup>-/-</sup> или мышей дикого типа, которые к тому времени уже находились на 8-ой неделе высокоглюкозной диеты (Рис.6).



**Рис.5.** Анализ клеточного состава стенок аорты *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей с трансплантированным костным мозгом от мышей доноров дикого типа (WT) или дефицитных по гену ИЛ-22 методом цитофлуорометрии. **А** – График популяций иммунных клеток в аортах (миелоидных и Т-клеток) и их процентное соотношение. **Б** – Графики сравнения абсолютного количества клеток в аортах. \*P <0,05.



**Рис.6.** Репрезентативные изображения срезов корней аорты, окрашенных Oil Red O, и сравнение размеров атеросклеротических бляшек у *WT* → *Ldlr*<sup>-/-</sup> и *Il23*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей, которым вводили инъекцию mIL22-Ig. \*P <0,05; \*\*\* P <0,0001. Масштаб – 100мкм..

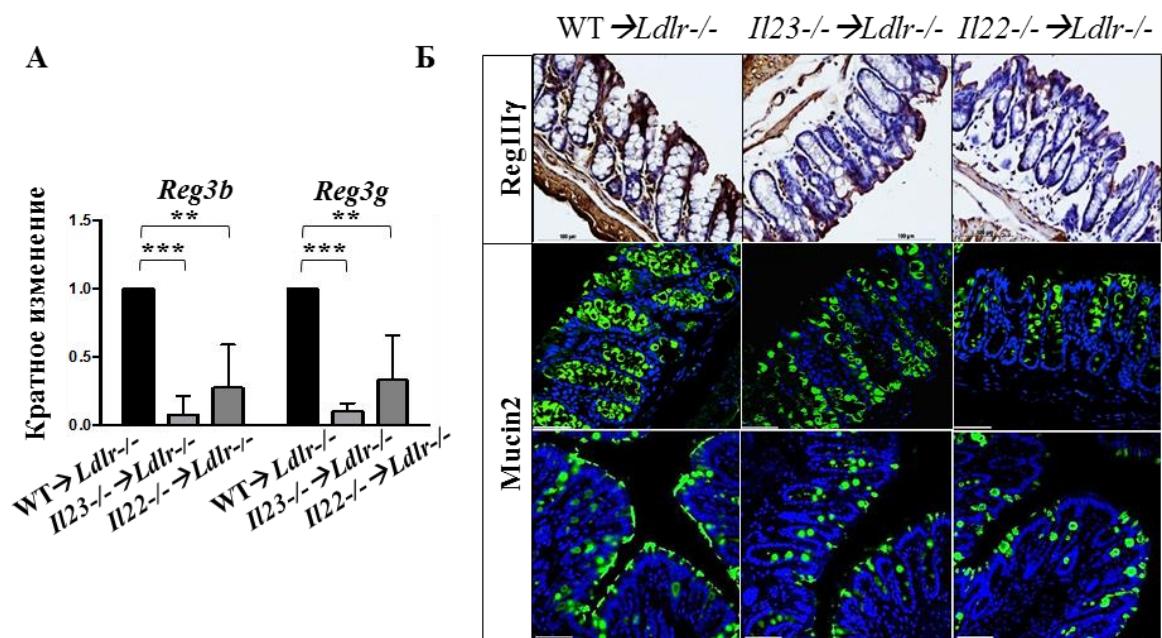
У мышей, получивших внутрибрюшинную инъекцию рекомбинантного белка ИЛ-22, площадь атеросклеротических бляшек была значительно меньше по

сравнению с контрольными группами, которые были инъецированы физиологическим раствором (ФСБ), принятым за контроль относительно рекомбинантного ИЛ-22.

В совокупности, эти данные указывают на то, что ИЛ-22 является важной молекулой регулируемой ИЛ-23 при развитии атеросклеротического поражения стенки аорты.

### Влияние дефицита ИЛ-23 и ИЛ-22 на гомеостаз кишечника и развитие пр-атерогенных изменений микрофлоры

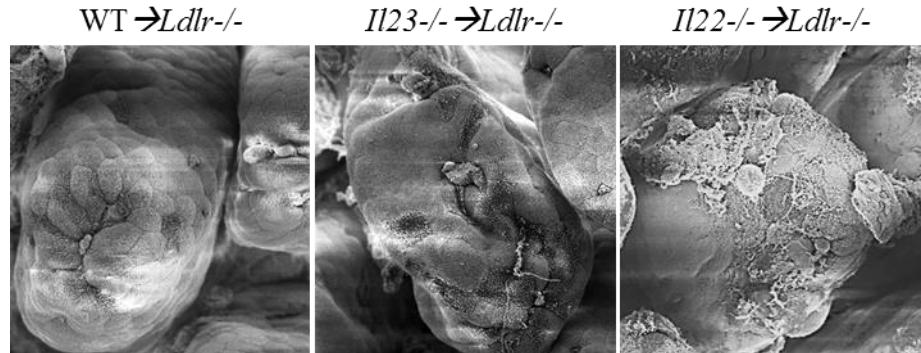
Цитокины ИЛ-23 и ИЛ-22 принимают участие в регуляции функции эпителиальных клеток кишечника, в том числе в индукции синтеза антимикробных пептидов (Zheng et al., 2008). Нами было обнаружено, что в кишечнике *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей с дефицитом цитокинов ИЛ-23 или ИЛ-22, которые содержались на высокоуглеводной диете, наблюдалось значительное снижение экспрессии генов, отвечающих за синтез антимикробных пептидов кишечника *Reg3g* и *Reg3b* по сравнению с контрольной группой мышей (Рис.7А-Б). Гистологическое окрашивание срезов кишечника выявило сильное снижение экспрессии антимикробных пептида *Reg3 $\gamma$*  и белка *Mucin2*, ключевого компонента слизистой оболочки кишечника, в отсутствие цитокинов ИЛ-23 или ИЛ-22 (Рис.7Б).



**Рис.7. А – Относительная экспрессия генов антимикробных пептидов в кишечнике мышей.** Экспрессия генов была нормализована по гену *RpL32*, а затем по среднему значению экспрессии генов в контрольной группе (*WT* → *Ldlr*<sup>-/-</sup>). **Б (верхняя панель)** – Иммуногистохимический анализ ткани толстого кишечника на наличие антимикробного пептида *Reg3 $\gamma$* . Масштаб – 100мкм. **Средняя панель** – Иммунофлуоресцентный анализ ткани толстой кишки на наличие антимикробного белка муцина (*Mucin2*). Масштаб – 100мкм. **Нижняя панель** – анализ белка муцина после *Carnoy* фиксации. Масштаб – 50мкм. *Mucin2* – зеленое окрашивание, Ядра клеток – синее окрашивание. \*\*P<0,001; \*\*\*P<0,0001.

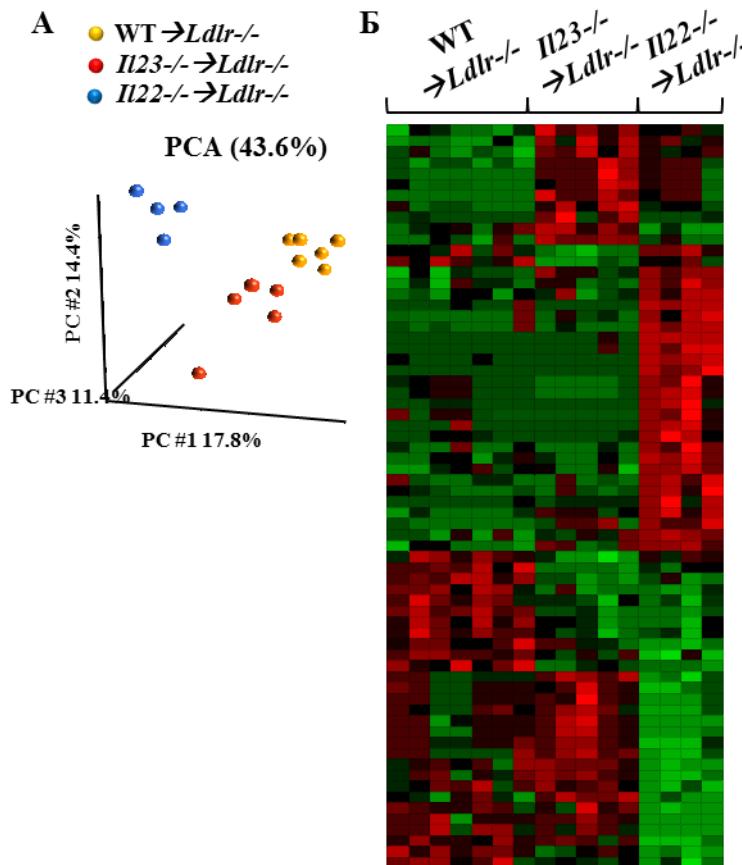
Сканирующая электронная микроскопия (SEM) показала повышенное количество бактерий, расположенных в непосредственной близости к эпителиальным

клеткам кишечника в *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышах с дефицитом белков ИЛ-23 или ИЛ-22 (Рис.8). Чтобы понять, обусловлено ли развитие атеросклероза у *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей, дефицитных по генам белков ИЛ-23 или ИЛ-22, определенными качественными и количественными изменениями в микробиоме организма, мы провели метагеномный анализ микрофлоры кишечника, собранной из слепой кишки мышей всех групп.



**Рис.8.** Сканирующая электронная микроскопия целостной внутренней поверхности ткани кишечника  $WT \rightarrow Ldlr^{-/-}$ ,  $IL23^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  и  $IL22^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  мышей.

Метагеномный анализ выявил значительные различия между микрофлорой кишечника  $WT \rightarrow Ldlr^{-/-}$  и  $IL23^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$ / $IL22^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  мышей на уровне видов, что было установлено PCA- анализом (Principal Components Analysis, англ. Анализ Главных Компонентов), который является интегральным методом оценки биоразнообразия (Рис. 9А).



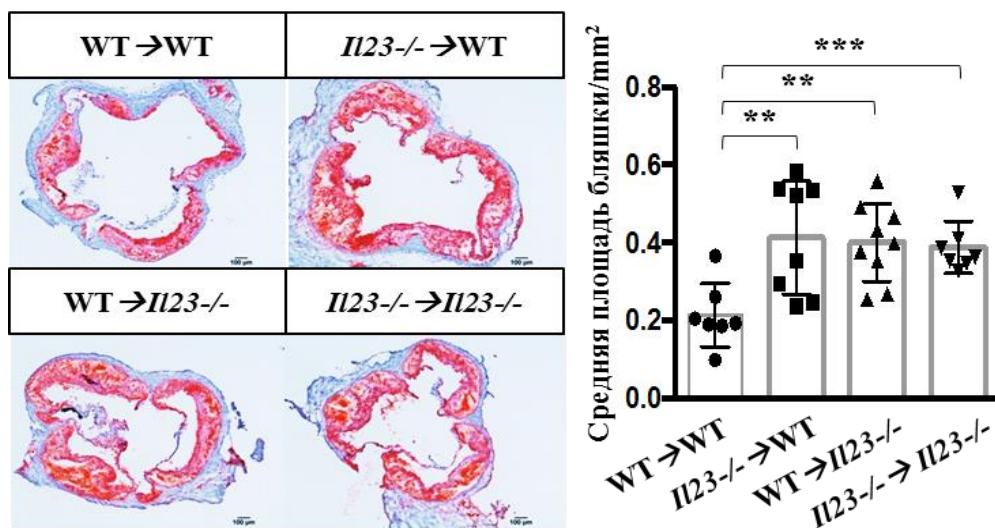
**Рис.9.** Метагеномный анализ состава микробных сообществ толстого кишечника  $WT \rightarrow Ldlr^{-/-}$ ,  $IL23^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  и  $IL22^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  мышей. **А** – PCA анализ оценки биоразнообразия микробных сообществ толстого кишечника  $WT \rightarrow Ldlr^{-/-}$ ,  $IL23^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  и  $IL22^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  мышей. **Б** – Термальная карта состава микробиома  $WT \rightarrow Ldlr^{-/-}$ ,  $IL23^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  и  $IL22^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  мышей, отображающая наличие одинаковых паттернов экспрессии в образцах. Каждая колонка отображает данные измерений изменений экспрессии генов в единичном образце. Относительная экспрессия бактериальных генов показана цветом: высокая (красный), и низкая (зеленый).

Было обнаружено, что микрофлора кишечника у  $IL23^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  и  $IL22^{-/-} \rightarrow Ldlr^{-/-}$  мышей обогащена видами бактерий семейств: *Enterobacteriaceae*, *Prevotellaceae*,

*Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* (Рис. 9Б), избыточный рост которых, согласно предыдущим исследованиям, способствует развитию воспалительных процессов в организме.

Эксперимент с трансплантацией микробиома кишечника показал, что микробное сообщество, которое было получено от мышей с дефицитом ИЛ-23 и содержащихся на высокоуглеводной диете с высоким содержанием жира, способствовало прогрессированию заболевания у мышей контрольной группы (Рис.10).

Данные результаты могут указывать на то, что микрофлора кишечника от *Ldlr*-/- мышей с дефицитом ИЛ-23 обладает способностью индуцировать развитие заболевания.



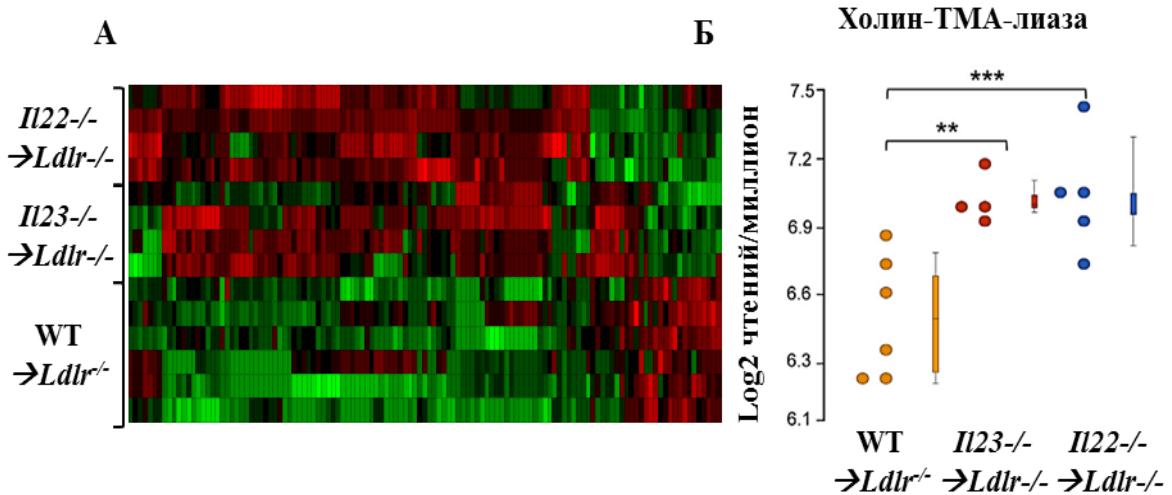
**Рис.10.** Репрезентативные изображения срезов корней аорты, окрашенных Oil Red O, и сравнение размеров бляшек аорты *WT* → *Ldlr*-/- и *Il23*-/- → *Ldlr*-/- мышей, в которых был трансплантирован микробиом от мышей-доноров *WT* → *Ldlr*-/- или *Il23*-/- → *Ldlr*-/- после 16 недель высокоуглеводной диеты. Масштаб – 100 мкм. \*\*P<0,001, \*\*\*P<0,0001.

### Взаимосвязь между дефицитом ИЛ-23 и ИЛ-22 и повышенным уровнем метаболитов с про-атерогенными свойствами

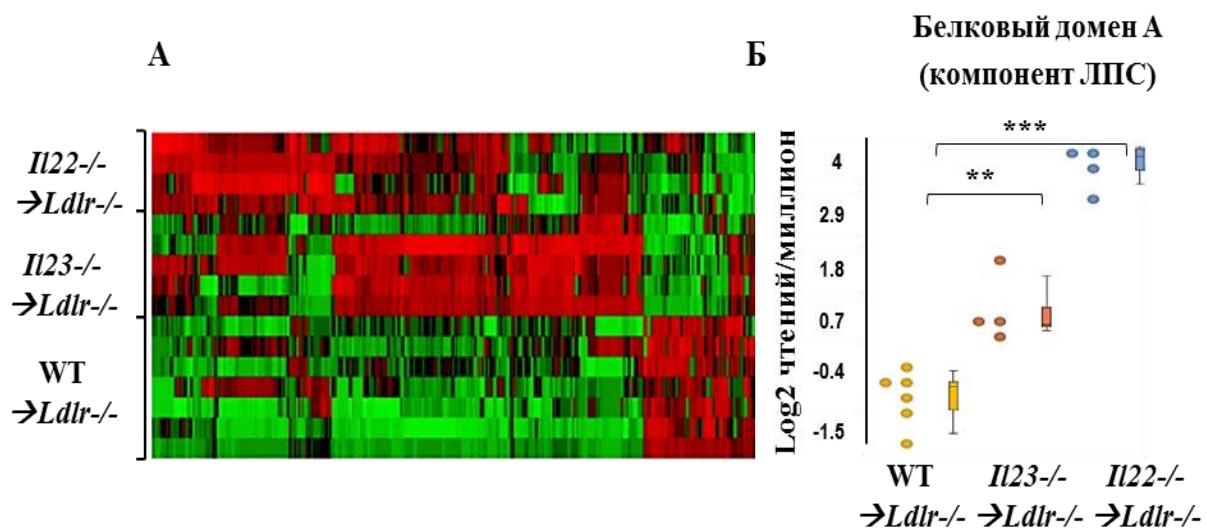
Согласно данным метагеномного анализа, таксономические единицы микроорганизмов в кишечнике не всегда были идентичны между *Il23*-/- → *Ldlr*-/- и *Il22*-/- → *Ldlr*-/- группами мышей. Однако анализ числа ферментных комиссий бактерий продемонстрировал высокий уровень сходства между *Il23*-/- → *Ldlr*-/- и *Il22*-/- → *Ldlr*-/- группами. В частности, был выявлен повышенный уровень экспрессии бактериального гена, кодирующего синтез холин-триметиламин-лиазы, ферmenta, необходимого для биосинтеза триметиламина, являющегося предшественником про-атерогенного метаболита триметиламин-N-оксида (Рис.11).

Анализ прогнозирования структуры белковых доменов, выполненный на основе метагеномного секвенирования, продемонстрировал повышенный уровень содержания белкового домена А, являющегося главным компонентом бактериального эндотоксина – липополисахарида (ЛПС) (Рис.12), предполагая, что отсутствие ИЛ-23 и ИЛ-22 приводит к избыточному росту бактерий, способных производить провоспалительные и про-атерогенные метаболиты.

В соответствии с последним, мы обнаружили повышенный уровень ЛПС (в 2-3 раза) в сыворотке крови *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей с дефицитом ИЛ-23 или ИЛ-22 по сравнению с контрольной группой мышей дикого типа (Рис. 13А).



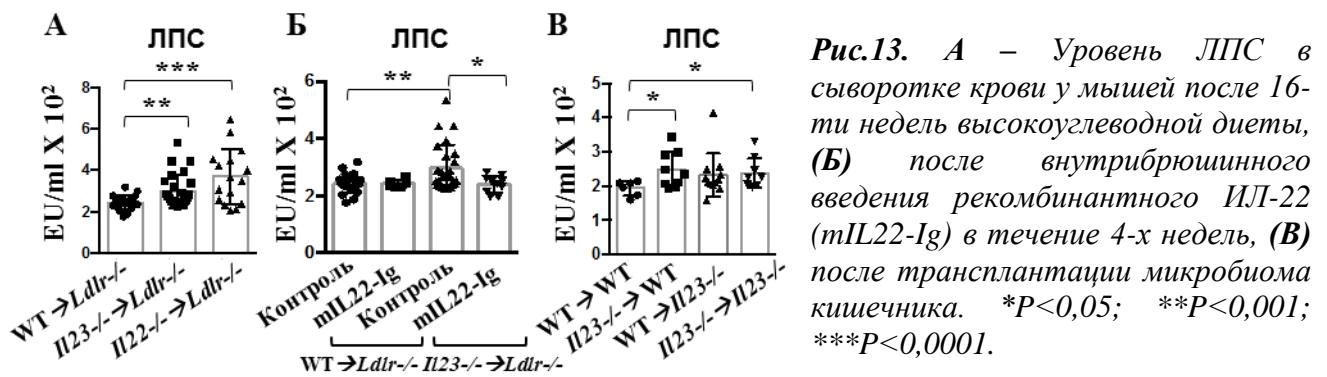
**Рис.11.** А – Тепловая карта анализа экспрессии генов ферментов (анализ ферментных комиссий) микробиома WT → Ldlr<sup>-/-</sup>, IL23<sup>-/-</sup> → Ldlr<sup>-/-</sup> и IL22<sup>-/-</sup> → Ldlr<sup>-/-</sup> мышей. Б – Уровень экспрессии бактериального гена фермента, холин-ТМА-лиазы. \*\*P<0,001, \*\*\*P<0,0001.



**Рис.12.** А – Тепловая карта присутствия белковых доменов в составе бактериальных компонентов. Относительная экспрессия бактериальных генов показана цветом: высокая (красный), и низкая (зеленый). Б – Уровень экспрессии гена белкового домена A в составе ЛПС. \*\*P<0,001; \*\*\*P<0,0001.

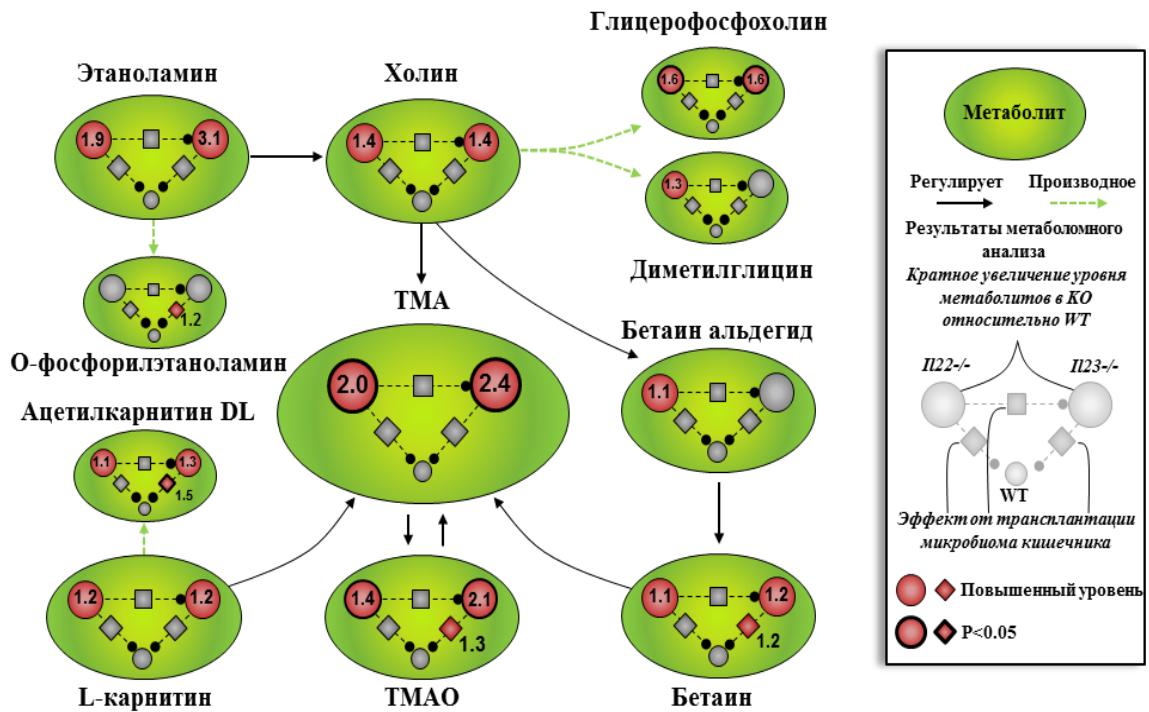
Внутрибрюшинное введение рекомбинантного белка ИЛ-22 снижало уровень ЛПС в сыворотке крови (Рис.13Б) наряду с нормализацией микрофлоры кишечника, то время как эксперимент с трансплантацией микробиома от *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей-доноров с дефицитом белка ИЛ-23 после 16 недель высокоуглеводной диеты с высоким содержанием жира, наоборот, приводил к повышению уровня ЛПС в крови (Рис.13В).

Чтобы выяснить механизм влияния микробиома кишечника на развитие



**Рис.13.** А – Уровень ЛПС в сыворотке крови у мышей после 16-ти недель высокоуглеводной диеты, (Б) после внутрибрюшинного введения рекомбинантного ИЛ-22 (*mIL22-Ig*) в течение 4-х недель, (В) после трансплантации микробиома кишечника. \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,001$ ; \*\*\* $P<0,0001$ .

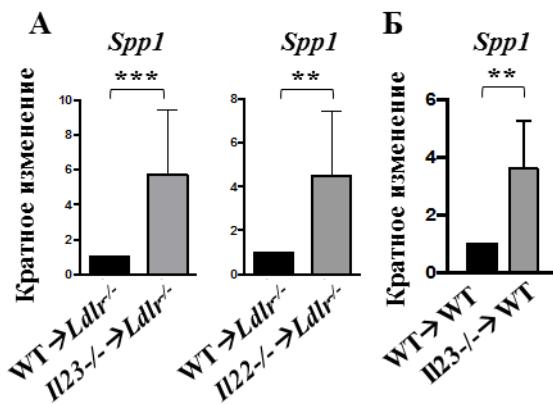
атеросклероза, мы провели метаболомный анализ сыворотки крови мышей на предмет наличия продуктов синтеза бактерий после 16-ти недель диеты. Был обнаружен повышенный уровень метаболитов, участвующих в биосинтезе проатерогенного триметиламин-N-оксида, включая фосфотидилхолин, холин, бетаин и триметиламин (TMA) и другие (Рис. 14).



**Рис.14.** Общая схема положительной регуляции метаболитов, участвующих в синтезе TMAO в сыворотке крови  $WT \rightarrow Ldlr-/-$ ,  $IL23-/- \rightarrow Ldlr-/-$  и  $IL22-/- \rightarrow Ldlr-/-$  мышей (круг) и после трансплантации микробиома кишечника (ромб).

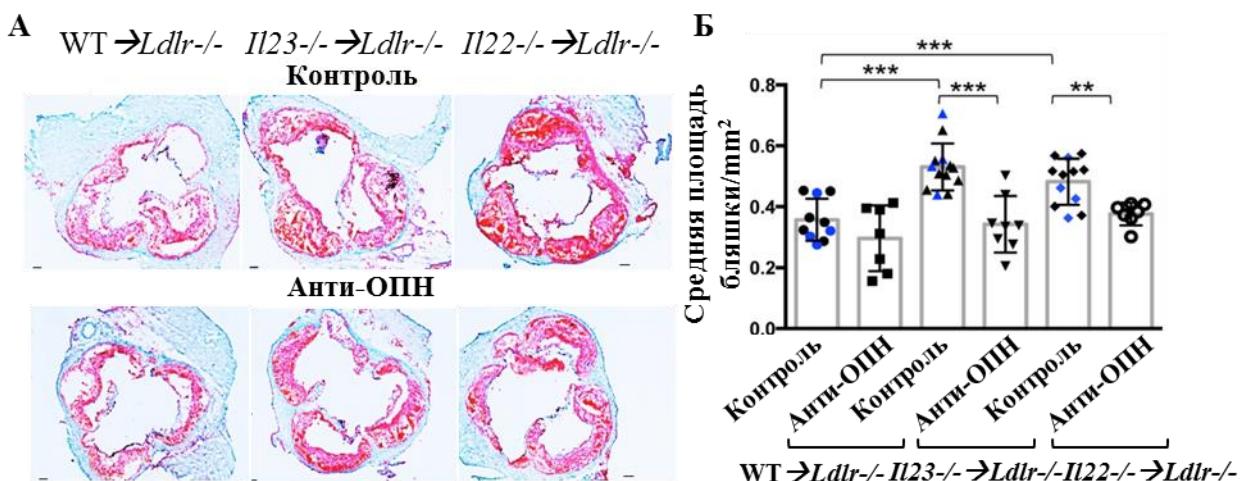
### Влияние микрофлоры кишечника на экспрессию остеопонтина макрофагами и прогрессирование атеросклероза

С целью определить, каким образом дисбактериоз кишечника в условиях дефицита цитокинов влияет на развитие воспалительных процессов, мы провели анализ экспрессии различных воспалительных генов и обнаружили в артериальных сосудах *Ldlr-/-* мышей с дефицитом белков ИЛ-23 и ИЛ-22 относительно мышей контрольной группы (Рис. 15) чрезмерно повышенный уровень экспрессии гена *Spp1*, продуктом которого является остеопонтин.



**Рис.15.** А – Относительная экспрессия гена *Spp1* в стенках аорты мышей после 16-ти недель высокоуглеводной диеты, Б – после трансплантации микробиома от мышь-доноров *WT* → *Ldlr*<sup>-/-</sup> или *IL23*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup> после 16 недель высокоуглеводной диеты с высоким содержанием жира. Экспрессия генов была нормализована по гену *RPL32*, а затем до среднего значения экспрессии гена в контрольной группе мышей. \*\**P* < 0,001; \*\*\**P* < 0,0001.

Чтобы подтвердить предположение о том, что остеопонтин (ОПН) является важным медиатором развития атеросклероза, мы провели эксперимент с внутрибрюшинным введением антител против ОПН в течение последних 2.5 недель высокоуглеводной диеты *WT* → *Ldlr*<sup>-/-</sup>, *IL23*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup> и *IL22*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышам (Рис. 16). В результате данного эксперимента было выявлено, что нейтрализация ОПН значительно снижала уровень развития заболевания у *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей с дефицитом по ИЛ-23 или ИЛ-22 относительно контрольной группы мышей, которым вводили физиологический раствор или изотипный контроль (обозначены синими точками) (Рис. 16).



**Рис.16.** А – Репрезентативные изображения срезов корней аорты, окрашенных Oil Red O, и (Б) сравнение размеров атеросклеротических бляшек у *WT* → *Ldlr*<sup>-/-</sup>, *IL23*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup> и *IL22*<sup>-/-</sup> → *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышей, получивших инъекцию анти-ОНН. \*\**P* < 0,001; \*\*\**P* < 0,0001. Масштаб – 100 мкм.

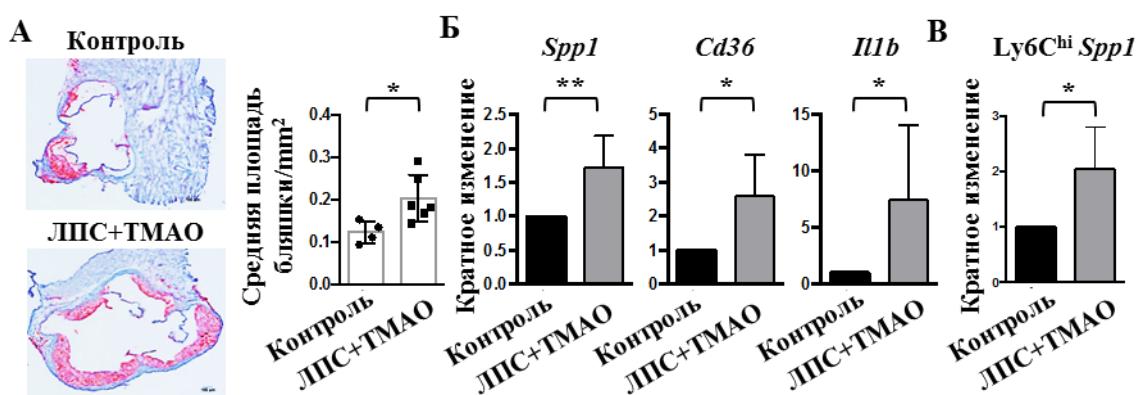
Далее, мы решили выяснить, влияет ли повышенный уровень метаболитов, выявленных в ходе метаболомного анализа и являющихся продуктами синтеза бактерий в кишечнике, на индукцию экспрессии ОПН и прогрессирование атеросклероза. Для этого, мы внутрибрюшинно вводили ЛПС и ТМАО *Ldlr*<sup>-/-</sup> мышам на высокоуглеводной диете в течение 3-х недель.

В результате было обнаружено, что совместное введение данных метаболитов ускоряет развитие атеросклероза относительно контрольной группы (Рис. 17А)

наряду с повышенной экспрессией генов про-воспалительных молекул *Spp1*, *Cd36* и *Il1b* в стенках аорты (Рис. 17Б).

В частности, введение *in vivo* ЛПС и ТМАО усиливает экспрессию *Spp1* в циркулирующих моноцитах Ly6Chi (Рис. 17В), вследствие чего можно предположить, что активированные моноциты далее рекрутируются в очаг поражения (атеросклеротические бляшки), где происходит дифференцировка в макрофаги и синтез еще более повышенного уровня ОПН.

Таким образом, вышеописанные результаты свидетельствуют о том, что остеопонтин является важным регулятором развития атеросклероза, и его экспрессия регулируется метаболитами бактерий кишечника. Уровень продукции которых в свою очередь контролируется цитокинами ИЛ-23 и ИЛ-22.



**Рис.17.** А – Репрезентативные изображения срезов корней аорты, окрашенных Oil Red O, и сравнение размеров атеросклеротических бляшек и (Б) относительная экспрессия генов *Spp1* (ОПН), *Cd36* и *Il1b* в стенках аорты у *Ldlr<sup>-/-</sup>* мышей, которым вводили внутрибрюшинную инъекцию ЛПС и ТМАО. В – Экспрессия *Spp1* в циркулирующих моноцитах Ly6C<sup>hi</sup> в ответ на совместное введение ЛПС и ТМАО. Экспрессия генов была нормализована по гену *RpL32*, а затем до среднего значения экспрессии гена в контрольной группе мышей. \*P<0,05; \*\*P<0,001. Масштаб – 100мкм.

Следовательно, ИЛ-23 и ИЛ-22 поддерживают гомеостаз кишечника и предотвращают избыточный рост про-атерогенных микроорганизмов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данной работы вносят вклад в понимание ключевых механизмов регуляции развития атеросклероза компонентами микрофлоры кишечника.

В совокупности, полученные данные свидетельствуют о том, что цитокины ИЛ-23 и ИЛ-22 контролируют качественные и количественные характеристики кишечной микрофлоры и продуцируемые ею про-атерогенные метаболиты, тем самым подавляя развитие воспалительного процесса, следовательно, и атеросклероза.

Повышенный уровень синтеза про-атерогенных метаболитов в результате питания высокоуглеводной диетой с повышенным содержанием жира и отсутствия белков ИЛ-23 и ИЛ-22 связан с активацией про-воспалительного остеопонтина.

Таким образом, мы полагаем, что данная работа раскрывает один из механизмов, лежащих в основе развития сердечно – сосудистых заболеваний и побочных эффектов от анти-цитокиновой терапии против ИЛ-23, особенно у пациентов с повышенным фактором риска развития сердечно – сосудистых заболеваний или пациентов с вредными диетическими привычками (например, пищей, содержащей большое количество холина).

И демонстрирует ранее не исследованную связь между цитокинами ИЛ-23/ИЛ-22 и взаимодействием организма с микробиомом при развитии атеросклероза.

## **ВЫВОДЫ**

1. Полученные данные свидетельствуют о том, что дефицит цитокинов ИЛ-23 и ИЛ-22 приводит к увеличению размеров атеросклеротических поражений стенок аорты наряду с повышенным накоплением в атеросклеротических бляшках таких популяций иммунных клеток, как Т-лимфоциты и миелоидные клетки и чрезмерной экспрессией генов про-воспалительных молекул.
2. Недостаток ИЛ-23 и ИЛ-22 в тканях толстого кишечника в контексте развития атеросклероза стенок аорты способствует нарушению целостности слизистой оболочки кишечника, обусловленное пониженным уровнем продукции антимикробных пептидов ( $\text{RegIII}\beta$  и  $\text{RegIII}\gamma$ ) и белков (муцина) эпителиальными клетками, что является причиной инвазии бактерий в эпителиальный слой кишечника.
3. Метагеномный анализ микрофлоры кишечника в условиях дефицита ИЛ-23 и ИЛ-22 продемонстрировал избыточный рост некоторых таксономических групп бактерий, как: *Clostridiaceae*, *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Enterobacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, обладающих про-атерогенными свойствами и способностью индуцировать заболевание при трансплантации микробиома мышам контрольной группы.
4. Избыточный рост патогенной микрофлоры в условиях недостатка ИЛ-23 и ИЛ-22 сопровождается повышенным уровнем про-атерогенных бактериальных метаболитов – trimetilamin-N-оксида и бактериального эндотоксина (ЛПС) – в сыворотке крови.
5. Повышенный уровень про-атерогенных метаболитов способствует активации циркулирующих моноцитов крови, экспрессирующих про-воспалительный белок – остеопонтин, тем самым усугубляя развитие атеросклеротических поражений аорты.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Fatkhullina, A.R. An Interleukin-23-Interleukin-22 Axis Regulates Intestinal Microbial Homeostasis to Protect from Diet-Induced Atherosclerosis / A.R. Fatkhullina, I.O. Peshkova, A. Dzutsev, T. Aghayev, J.A. McCulloch, V. Thovarai, J.H. Badger, R. Vats, P. Sundd, H.Y. Tang, A.V. Kossenkov, S.L. Hazen, G. Trinchieri, S.I. Grivennikov, E.K. Koltsova // *Immunity*. – 2018. – V. 49(5). – P. 943-957.
2. Peshkova, I.O. IL27R signaling controls myeloid cells accumulation and antigen-presentation in atherosclerosis / I.O. Peshkova, **A.R. Fatkhullina**, Z. Mikulski, K. Ley, E.K. Koltsova // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7(1). – P. 2255.
3. Фатхуллина А.Р. Роль цитокинов в развитии атеросклероза / А.Р. Фатхуллина, Ю.О. Пешкова, Е.К. Кольцова // *Биохимия*. – 2016. – Т. 81(11). – С. 1614-1627.
4. Фатхуллина А.Р. Анализ роли цитокина интерлейкина-23 в патогенезе атеросклероза / А.Р. Фатхуллина, Ю. О. Пешкова, Т. Агаев, З. И. Абрамова, С. И. Гривенников, Е. К. Кольцова // Биосистемы: организация, поведение, управление: тезисы докл. 72-й Всероссийской с международным участием школы-конф. молодых ученых.- Нижний Новгород, 2019.- С. 227.
5. Fatkhullina, A.R. An IL23-IL22 Axis Regulates Intestinal Microbial Homeostasis to Protect from Diet-induced Atherosclerosis / A.R. Fatkhullina, I.O. Peshkova, A. Dzutsev, T. Aghayev, G. Trinchieri, S.I. Grivennikov, E.K. Koltsova // *ATVB*. – 2018. – V. 38. Abstract #005. – P.3
6. Fatkhullina, A.R. An IL23-IL22 axis regulates intestinal microbial homeostasis to protect from diet-induced atherosclerosis / **A.R. Fatkhullina**, I.O. Peshkova, A. Dzutsev, T. Aghayev, G. Trinchieri, S.I. Grivennikov, E.K. Koltsova // La Jolla immunology conference. Book of abstracts. – 2017. – P. 57.
7. Fatkhullina, A.R. The Role of Interleukin-23 in the Development of Atherosclerosis / A.R. Fatkhullina, I.O. Peshkova, E.K. Koltsova // *ATVB*. – 2016. – V. 36. Abstract #P641.
8. Peshkova, I.O. Interleukin-27 Signaling Regulates Myeloid Cells Activation in Atherosclerosis / I.O. Peshkova, **A.R. Fatkhullina**, E.K. Koltsova // *ATVB*. – 2016. – V. 36. Abstract #P252.
9. Peshkova, I.O. IL-27 Receptor Signaling Potentiates Angiotensin II Induced Myelopoiesis and Promotes Abdominal Aortic Aneurysm / I.O. Peshkova, T. Aghayev, **A.R. Fatkhullina**, P.Makhov, S. Sykes, E.K. Koltsova // *ATVB*. – 2016. – V. 36. Abstract #P112.

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, Казанский федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю диссертационного совета Д 212.081.36 профессору Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru.