

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Научно-исследовательский институт
физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Немецкий ревматологический научный центр

На правах рукописи

Бондарева Марина Александровна

**АНТИГЕННАЯ МИМИКРИЯ КАК МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ
ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА МИКРОБИОТОЙ**

Специальность 3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
АНДРЕЙ АЛЕКСЕЕВИЧ КРУГЛОВ

Москва – 2024 г

Содержание

Список используемых сокращений	- 5 -
Введение	- 8 -
Актуальность и степень разработанности темы исследования	- 8 -
Цель	- 9 -
Задачи	- 9 -
Научная новизна работы.....	- 9 -
Теоретическая и практическая значимость работы	- 10 -
Объекты исследования	- 11 -
Методология и предмет исследования.....	- 11 -
Основные положения, выносимые на защиту	- 12 -
Степень достоверности результатов	- 12 -
Личный вклад автора	- 12 -
Апробация результатов и публикации	- 12 -
Обзор литературы	- 14 -
Микробиота и ее значение для организма	- 14 -
SARS-CoV-2 и микробиота	- 20 -
Роль <i>Akkermansia muciniphila</i> в функционировании иммунной системы и регуляции заболеваний.....	- 22 -
Механизмы контроля состава микробиоты	- 23 -
Функции IgA	- 34 -
Гетерогенность IgA-продуцирующих клеток.....	- 36 -
Диета и ее значение в развитии заболеваний	- 37 -
Материалы и методы	- 40 -
Таблица 1. Составы рабочих растворов	- 40 -
Таблица 2. Использованные реагенты и ресурсы	- 40 -
Доноры	- 44 -
Клиническое исследование с пробиотиком <i>Streptococcus salivarius K12</i>	- 45 -
Подготовка образцов слюны доноров.....	- 45 -
Подготовка образцов фекалий от людей, вакцинированных мРНК вакциной BNT162b2	- 45 -
Подготовка образцов фекалий здоровых доноров для выделения бактерий	- 45 -
Окрашивание микробиоты	- 46 -
Проточная цитометрия микробиоты	- 46 -
Культивирование бактерий	- 46 -
Секвенирование бактериальных колоний.....	- 47 -
Определение состава микробиоты при помощи <i>16s rRNA</i> секвенирования	- 47 -

Лабораторные животные	- 48 -
Оральная иммунизация мышей бактериями <i>S. salivarius</i> и <i>B. pseudocatenulatum</i>	- 48 -
Иммунизация мышей белком RSSL-01370 и транспортером олигопептидов OppA1	- 48 -
Иммунизация мышей бактериями <i>S. salivarius</i> и <i>B. pseudocatenulatum</i> с последующей инфекцией B.1.1 SARS-CoV-2.....	- 49 -
Диета с повышенным содержанием глюкозы (HGD)	- 49 -
Глюкозотолерантный тест	- 49 -
Выделение клеток <i>lamina propria</i> из тонкого кишечника	- 50 -
Выделение клеток из пейеровых бляшек, селезенки, костного мозга	- 50 -
Выделение лимфоцитов из печени	- 50 -
Цитометрический анализ реактивности антител против белка Spike	- 51 -
Цитофлуориметрический анализ клеток мышей	- 51 -
Измерение количества антител у мышей.....	- 52 -
Измерение количества С-пептида у мышей после HGD	- 52 -
Анализ титра антител против S1/RBD-белка в сыворотке после иммунизации мышей белком RSSL-01370 или белком-транспортером олигопептидов OppA1	- 53 -
Анализ титра антител против S1-белка в сыворотке и слюне после вакцинации доноров мРНК вакциной	- 53 -
<i>In vitro</i> анализ способности ингибирования RBD-ACE2 взаимодействия антителами в фекалиях у мышей после оральной иммунизации бактериями <i>S. salivarius</i> / <i>B. pseudocatenulatum</i>	- 53 -
Определение бактериальных антигенов и антигенов тканей мышцы	- 54 -
Анализ соотношения димеров и мономеров IgA-антител в сыворотке мышей.....	- 55 -
Масс-спектрометрический анализ	- 56 -
Прокариотическая экспрессия белков.....	- 56 -
Очистка His-tag меченных белков	- 57 -
Гистологический анализ	- 57 -
Культивирование IgA ⁺ плазматических клеток <i>in vitro</i>	- 58 -
Статистический анализ данных	- 58 -
Результаты	- 60 -
Кросс-регуляция иммунного ответа против Spike-белка SARS-CoV-2 и комменсальной микробиоты путем молекулярной мимикрии	- 60 -
<i>Изменение состава микробиоты оральной полости при вакцинации мРНК-вакциной против SARS-CoV-2 ассоциировано с индукцией антител против Spike в слюне</i>	- 61 -
<i>Антитела против Spike-белка распознают различные компоненты микробиоты путем молекулярной мимикрии</i>	- 67 -
<i>Индукция кросс-реактивных анти-Spike антител штаммами комменсальной микробиоты</i>	- 68 -
Кросс-регуляция микробиоты и мукозальной иммунной системы посредством антител в контексте диеты с повышенным содержанием глюкозы	- 75 -

<i>Повышенное содержание глюкозы в диете приводит к развитию нетолерантности к глюкозе и к повышению продукции IgA</i>	- 75 -
<i>TLR4 регулирует увеличение продукции IgA в сыворотке при диете с повышенным содержанием глюкозы</i>	- 81 -
<i>Диета с высоким содержанием глюкозы приводит к дисбалансу микробиоты кишечника и изменяет распознавание микробиоты IgA-антителами</i>	- 84 -
<i>IgA-антитела, индуцируемые HGD-диетой, кросс-реагируют с антигенами Akkermansia muciniphila и поджелудочной железы</i>	- 88 -
Обсуждение результатов	- 92 -
Кросс-регуляция иммунного ответа против Spike-белка SARS-CoV-2 и комменсальной микробиоты путем молекулярной мимикрии	- 92 -
Кросс-регуляция микробиоты и мукозальной иммунной системы посредством антител в контексте диеты с повышенным содержанием глюкозы	- 96 -
Заключение	- 100 -
Выводы	- 101 -
Приложение	- 102 -
Приложение 1.	- 102 -
Приложение 2.	- 102 -
Приложение 3.	- 102 -
Таблица 3. Характеристика доноров в исследовании влияния вакцинации на состав микробиоты.....	- 103 -
Таблица 4. Характеристика доноров в исследовании связывания компонентов кишечной микробиоты антителами против RBD-домена белка Spike вируса SARS-CoV- 2.....	- 103 -
Таблица 5. Характеристика доноров в исследовании роли <i>S. salivarius BLIS K12</i> в индукции анти-Spike-антител у вакцицированных доноров.	- 103 -
Таблица 7. Список кандидатных белков поджелудочной железы, которые были выделены при помощи иммунопреципитации и дальнейшего масс-спектрометрического анализа- 104 -	- 104 -
Таблица 8. Список кандидатных белков <i>Akkermansia muciniphila</i> , которые были выделены при помощи вестерн-блота и дальнейшего масс-спектрометрического анализа.	- 105 -
Благодарности	- 107 -
Список литературы	- 108 -

Список используемых сокращений

- ACE2 - Angiotensin-converting enzyme 2 // ангиотензин-конвертирующий фермент 2
- ACK – Ammonium Chloride Potassium // буфер хлорида аммония для лизиса эритроцитов
- AID – activation induced deaminase // дезаминаза, индуцируемая при активации
- AMP – antimicrobial peptides // антимикробные пептиды
- AP – alkaline phosphatase // щелочная фосфатаза
- APRIL – a proliferation inducing ligand // лиганд, активирующий пролиферацию
- AUC – area under curve // площадь под кривой
- BAFF – B cell activating factor // фактор, активирующий В клетки
- BSA – bovine serum albumin // бычий сывороточный альбумин
- CARD – Caspase activation and recruitment domains // домен активации каспазы
- CCL, CXCL – CC, CXC chemokine // CC, CXC хемокин
- CCR, CXCR – CC, CXC chemokine receptor // CC, CXC хемокиновый рецептор
- COVID19 - Coronavirus disease 2019 // короновирусное заболевание 2019
- DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole // 4',6-диамино-2-фенолиндол
- DC – dendritic cell // дендритная клетка
- DSS – dextran sodium sulphate // декстран сульфат натрия
- EC50 – Half maximal effective concentration // полуэффективная концентрация
- FAE – follicle associated epithelium // фолликуло ассоциированный эпителий
- FBS – fetal bovine serum // фетальная бычья сыворотка
- FDC – follicular dendritic cell // фолликулярная дендритная клетка
- FFA – free fatty acids // свободные жирные кислоты
- FSC – forward scatter // прямое рассеивание
- GALT – gut associated lymphoid tissue // лимфоидная ткань, ассоциированная с кишечником
- GC – germinal center // герминальный центр
- GLUT – glucose transporter // транспортер глюкозы
- GPR – G protein-coupled receptor // рецептор, ассоциированный с G белком
- GTT – glucose tolerance test // глюкозотолерантный тест
- HGD – high glucose diet // высоко-глюкозная диета
- IBD – inflammatory bowel disease // воспалительные заболевания кишечника
- Ig – immunoglobulin // иммуноглобулин
- IgA – immunoglobulin A // иммуноглобулин А
- IL – interleukin // интерлейкин
- ILC – innate lymphoid cells // врожденные лимфоидные клетки

ILF – isolated lymphoid follicle // изолированные лимфоидные фолликулы
LN – lymph node // лимфоузел
LPS – lipopolysaccharide // липополисахарид
LT – lymphotoxin // лимфотоксин
mIgA – monoclonal IgA // моноклональное IgA антитело
ME – β -mercaptoethanol // β -меркаптоэтанол
MHC-II – major histocompatibility complex II // главный комплекс гистосовместимости
mLN – mesenteric lymph nodes // мезентериальные лимфоузлы
mTOR – mammalian target of rapamycin // мишень рапамицина млекопитающих
MyD88 - Myeloid differentiation primary response 88 // фактор миелоидной дифференцировки 88
NAFLD – nonalcoholic fatty liver disease // неалкогольная жировая болезнь печени
NFkB – nuclear factor kappa B // ядерный фактор каппа В
NLR – Nod-like receptor // Nod-подобный рецептор
NOD – Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein // белок с доменом, узнающим нуклеотиды
OxLDL – oxidized low density lipoproteins // окисленные липопротеины низкой плотности
PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis // полиакриламидный гель-электрофорез
PBS – phosphate buffered saline // фосфатно-солевой буфер
PBS-T – PBS/Tween 20 // PBS, содержащий Твин 20
PCR – polymerase chain reaction // полимеразная цепная реакция
PD-1 – program death 1 // рецептор программируемой клеточной смерти 1
pIgR – poly Ig receptor // рецептор полимерного иммуноглобулина
pNPP – para-nitrophenyl phosphate // пара-нитрофенил фосфат
PP – Peyer's patches // пейеровы бляшки
PRR – pattern recognition receptor // рецептор, распознающий паттерны
RA – retinoic acid // ретиноевая кислота
RANKL – Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand // лиганд для рецептора, активирующего NFkB
RBD – receptor binding domain // рецептор-связывающий домен
RORgt – RAR-related orphan receptor gamma // транскрипционный фактор RORgt
ROS – reactive oxygen species // активные формы кислорода
SARS-CoV-2 - Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 // острое респираторное заболевание коронавирусом - 2
SCFA – short chain fatty acids // коротко-цепочечные жирные кислоты

SD – standard deviation // стандартное отклонение
SFB – segmented filamentous bacteria // сегментированные филаментные бактерии
SHM – somatic hypermutation // соматические гипермутации
SSC – side scatter // боковое рассеивание
TBS – Tris buffered saline // Трис-буфер
TBS-T – TBS-Tween 20 // TBS, содержащий Твин 20
TCR – T cell receptor // Т клеточный рецептор
Tfh – T follicular helper // Т фолликулярный хелпер
TGF- β 1 – tumor growth factor b // фактор роста опухоли
Th – T helper // Т хелпер
TLR – Toll-like receptor // толл-подобный рецептор
TMB – 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine // 3,3',5,5'-тетраметилбензидин
TNF – tumor necrosis factor // фактор некроза опухоли
TSLP – thymic stromal lymphopoietin // тимусный стромальный лимфопоэтин
VD – viability dye // краситель на жизнеспособность

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Организм млекопитающих находится в тесном взаимодействии с микроорганизмами, населяющими слизистые оболочки организма. Совокупность микроорганизмов, взаимодействующих с организмом, называется микробиотой, где преобладают комменсальные, не патогенные виды. В состав микробного сообщества входят бактериальная микрофлора, вирусы, микобиота, простейшие, где бактериальная микробиота является наиболее изученным компартментом. Функциональная значимость микробиоты касается разных аспектов физиологии организма-хозяина, включая пищеварение и метаболизм, развитие и регуляцию иммунной системы, а также контроль развития различных заболеваний, таких как ожирение, злокачественные опухоли, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания кишечника и т. д. Поэтому для организма важным представляется контроль состава микробиоты, поскольку ее дисбаланс ассоциирован с развитием различных заболеваний.

Детальный состав микробиоты индивидуален для каждого организма, тогда как принципиальная ее регуляция иммунной системой одинакова, среди которых можно выделить механический барьер из эпителиальных клеток, антимикробные пептиды, муцин и компоненты врожденного и адаптивного иммунитета. На слизистых иммуноглобулины Ig (в кишечнике – IgA и IgM, в ротоносоглотке – IgA, IgM, IgG) наиболее специфически взаимодействуют с поверхностными антигенами бактерий, тем самым участвуют в контроле состава микробиоты. Продукция иммуноглобулинов, в свою очередь, индуцируется компонентами комменсальной микробиоты или патогенами.

Стоит отметить, что микробиота является самым большим резервуаром разнообразных антигенов, которые потенциально могут индуцировать иммунный ответ на слизистых оболочках. Таким образом, микробиоту стоит рассматривать как индуктор огромного репертуара антител. Учитывая факт, что количество генов микробиоты – порядка нескольких миллионов, что суммарно на несколько порядков выше, чем количество генов человека, некоторые из антигенов микробиоты могут мимикрировать под белки организма-хозяина, а также под белки других микроорганизмов. Далее это может приводить к кросс-реактивному иммунному ответу, где антитела, индуцированные микробиотой, могут распознавать как ткани хозяина, так и антигены других микроорганизмов. Кроме этого, кросс-регуляция микробиоты и иммунной системы может быть изменена за счет влияния различных внешних факторов, таких как диета, экология, вакцинация, токсины, а также в контексте различных заболеваний.

В настоящее время предложен ряд функций IgA-антител в контексте взаимодействия с микробиотой и ее регуляции, среди которых нейтрализация бактерий, регуляция их роста и

другие. Известно также, что IgA играет протективную роль при ожирении и вырабатывается в избыточном количестве у пациентов с диабетом первого и второго типа. Помимо этого, у пациентов с нарушенной толерантностью к инсулину, а также в мышинных моделях ожирения было снижено количество бактерии *Akkermansia muciniphila* при нарушенном метаболизме, что свидетельствует о протективной роли данной бактерии. Тем не менее, существуют и противоречивые данные, указывающие на патогенную роль бактерии *Akkermansia muciniphila*. Таким образом, вклад *Akkermansia muciniphila* и ее связь с IgA-антителами в развитие заболевания до конца не установлен.

Наконец, в контексте острого респираторного заболевания COVID-19, индуцируемого вирусом SARS-CoV-2, наблюдается различный состав микробиоты у тяжелобольных пациентов. С другой стороны, у людей, не контактирующих с данным вирусом, встречаются антитела IgA на слизистых, специфичные к SARS-CoV-2. Однако, механизм появления таких антител и роль микробиоты непонятны.

Целью настоящей исследовательской работы являлось изучение кросс-регуляции иммунного ответа в кишечнике и микробиоты при нарушенной толерантности к глюкозе, развивающейся вследствие диеты с повышенным содержанием сахара и при иммунном ответе на вирус SARS-CoV-2.

В соответствии с поставленной целью нами был составлен ряд **задач**, а именно:

1. Исследовать состав микробиоты слизистых оболочек ротоносоглотки и кишечника и развитие антительного иммунного ответа на слизистых и в крови при вакцинации против SARS-CoV-2.
2. Оценить реактивность антител, индуцированных SARS-CoV-2, к компонентам микробиоты.
3. Определить вклад различных бактерий в развитие анти-Spike-антительного ответа и изучить их роль в защите против вируса SARS-CoV-2.
4. Оценить вклад диеты HGD в нарушение толерантности к глюкозе, в продукцию антител в сыворотке и просвете кишечника, а также оценить влияние на состав микробиоты.
5. Исследовать реактивность IgA-антител, индуцируемых диетой HGD.

Научная новизна работы

В настоящей работе получены оригинальные результаты, свидетельствующие о кросс-регуляции компонентов микробиоты и антител против SARS-CoV-2. А именно, был изучен вклад антител против SARS-CoV-2, индуцируемых вакцинацией, в изменение состава микробиоты слизистой кишечника и ротоносоглотки. В частности, были определены бактерии, распознающиеся антителами против Spike-белка. Наконец, впервые был предложен механизм

индукции антител против SARS-CoV-2 бактерией вида *Streptococcus salivarius* по типу молекулярной мимикрии, и было показано, что использование пробиотического штамма *Streptococcus salivarius K12* способствует выработке IgG-антител в ротовой полости против Spike-белка у вакцинированных доноров.

Во второй части работы получены оригинальные результаты, описывающие механизм индукции IgA-антител при нарушении толерантности к глюкозе. С использованием мышиной модели было показано, что IgA-антитела индуцируются компонентами микробиоты, в частности бактерией *Akkermansia muciniphila*, и данный процесс зависит от TLR4-сигнального пути и от TNF. Впервые было показано, что при нарушенной глюкозотолерантности антитела IgA, индуцируемые *Akkermansia muciniphila*, кросс-реагируют к тканям организма, в частности к антигенам поджелудочной железы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные в настоящем исследовании результаты имеют как фундаментальную значимость в иммунологии слизистых оболочек, так и клиническую. В опубликованных работах уже упоминалась роль конкретных видов микробиоты в различных заболеваниях, для некоторых из них были предложены молекулярные мимики, опосредующие вклад бактерий в заболевания. Результаты, полученные в первой части работы, демонстрируют, какие бактерии представляют значимость для заболевания COVID-19 и по какому механизму это происходит. Кроме этого, принципиально важным является понимание о позитивной кросс-регуляции между бактерией *Streptococcus salivarius* и иммунной системой слизистой ротовой полости. Наконец, данные по использованию пробиотического штамма *Streptococcus salivarius K12* указывают на возможность применения данного препарата как альтернативного бустерным дозам вакцинации против SARS-CoV-2-инфекции. Во второй части работы получены фундаментальные данные о роли *Akkermansia muciniphila* в индукции IgA по TLR4-TNF-зависимому механизму при нарушенной толерантности к глюкозе. Кроме этого, обнаруженные аутореактивные свойства IgA-антител, вырабатываемых в условиях нарушения метаболизма, открывают новые возможности для изучения вклада таких антител в патогенез заболевания. С другой стороны, понимание того, как изменяется состав микробиоты, и какие бактерии становятся высокопокрытыми IgA-антителами, например, *Akkermansia muciniphila*, открывает потенциальные возможности таргетной манипуляции бактерий, что представляет клиническую значимость. Наконец, данная работа показывает важнейшую роль микробиоты в индукции гуморального иммунного ответа по механизму молекулярной мимикрии как для поддержания гомеостаза организма, так и для защиты организма от патогенов.

Объектом исследования в первой части работы были доноры, вакцинированные против SARS-CoV-2, а также наивные доноры. Для механистического объяснения природы кросс-реактивных антител против Spike использовались мыши дикого типа на генетической основе C57BL/6 или трансгенные мыши, экспрессирующие человеческий рецептор ACE-2 под контролем K18-промотора. В рамках изучения механизмов взаимодействия *Akkermansia muciniphila* с иммунной системой слизистой оболочки кишечника и выяснения ее роли в индукции IgA при высокоглюкозной диете использовались мыши дикого типа C57BL/6 и с полным нокаутом *Tlr4* на генетической основе C57BL/6.

Методология и предмет исследования

Для изучения взаимной регуляции компонентов микробиоты и антител против SARS-CoV-2 был исследован иммунный ответ в ротовой полости и на системном уровне против Spike-SARS-CoV-2 при вакцинации в динамике. Данное исследование проводили методом иммуноферментного анализа или при помощи цитофлуориметрического анализа. Также с помощью секвенирования по гену *16s rRNA* был изучен состав микробиоты и выделен ряд бактерий, распознаваемых антителами против Spike-SARS-CoV-2. Механизм молекулярной мимикрии установлен при использовании методик молекулярной биологии, включая вестерн-блот, масс-спектрометрический анализ, клонирование и др. Определение способности бактерий *Streptococcus salivarius* к индукции антител против Spike-SARS-CoV-2 проводилось при помощи *in vivo* экспериментов по иммунизации мышей выделенными белками или бактериями с последующей инфекцией вирусом SARS-CoV-2, а также с помощью клинического исследования с пробиотическим штаммом *Streptococcus salivarius* K12.

Взаимодействие *Akkermansia muciniphila* с иммунной системой слизистой оболочки кишечника и определение ее роли в индукции IgA при нарушенной толерантности к глюкозе, проводилось с использованием модели диеты с повышенным содержанием глюкозы в питьевой воде (20 %) на мышах дикого типа или *Tlr4*^{-/-}. Уровень IgA-антител оценивался при помощи иммуноферментного анализа. Состав микробиоты оценивался путем глубокого секвенирования по гену *16s rRNA*. Аутореактивные антитела определялись с использованием иммунофлуоресцентного анализа тканей, анализа вестерн-блотом и иммуноферментного анализа. Антигены, распознаваемые аутореактивными IgA-антителами, определялись при использовании методов молекулярной биологии, таких как вестерн-блот, масс-спектрометрический анализ, клонирование и др.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Изменение состава микробиоты людей при вакцинации против SARS-CoV-2 выражается в обогащении *S. salivarius*, что также ассоциировано с индукцией антител против белка Spike вируса SARS-CoV-2 в слюне.
2. Отдельные компоненты микробиоты экспрессируют на поверхности молекулярные мимики RBD-домена белка Spike вируса SARS-CoV-2.
3. Применение бактерий, экспрессирующих белки, молекулярно схожие с белком Spike, выполняет защитную роль в мышинной модели заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2, а также способствует индукции антител против Spike-белка вируса SARS-CoV-2 у вакцинированных людей.
4. Изменения микробиоты, происходящие при нарушенной толерантности к глюкозе у мышей, ассоциированы с индукцией IgA-антител, которые перекрестно реагируют с антигенами поджелудочной железы и с компонентами микробиоты.

Степень достоверности результатов

Полученные научные результаты воспроизводимы и достоверны. Экспериментальная работа проводилась на современном сертифицированном оборудовании с использованием химических реактивов известных и надежных производителей (Sigma, Thermo Scientific, Plurima, Bio-Rad и др.). Экспериментальные модели заболеваний, а также статистическая обработка данных, приведенные в работе, соответствуют общепризнанным международным стандартам.

Личный вклад автора

В настоящей работе автором были выполнены эксперименты, связанные с изучением кросс-регуляции компонентов микробиоты и антител против SARS-CoV-2, а также механизмов индукции IgA при нарушенной толерантности к глюкозе. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в планировании и выполнении экспериментов, обработке и анализе результатов, подготовке публикаций и текста диссертации. В работе №1 из списка публикаций, соискателем была выполнена значительная часть экспериментов, анализ данных и подготовка текста публикации.

Апробация результатов и публикации

Результаты работы были представлены и обсуждены на международных и отечественных конференциях и научных школах: European Congress of Immunology, 1–4 сентября 2024 г., Дублин, Ирландия; Cell Symposia Mucosal Immunology: Immunity at the barriers, 15-17 мая 2024 г., Пекин, Китай; 18th Spring School on Immunology, Этталь, Германия, 10-15 марта 2023 г.; В Cell-T Cell Collaboration: Regulation and Dysregulation (T4), Keystone

Symposia, апрель 2022 г., Ганновер, Германия; Немецко-российский форум, 30 ноября–3 декабря 2019 г., Сириус, Сочи, Россия; Первый студенческий биохимический форум, 17 декабря 2018 г., Москва, Россия; Международная научная конференция «Ломоносов» 14-16 апреля 2017 г., Москва, Россия.

По теме диссертации опубликовано **3** статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:

1. **M. Bondareva***, L. Budzinski*, P. Durek*, M. Witkowski*, S. Angermair*, J. Ninnemann*, J. Kreue, P. Letz, M. Ferreira-Gomes, I. Semin, G. Guerra, S. Momsen Reincke, E. Sánchez-Sendin, S. Yilmaz, T. Sempert, G. Heinz, C. Tizian, M. Raftery, G. Schönrich, D. Matyushkina, I. Smirnov, V. Govorun, E. Schrezenmeier, A. Stefanski, T. Dörner, S. Zocche, E. Viviano, N. Klement, K. Sehmsdorf, A. Lunin, H. Chang, M. Drutskaya, L. Kozlovskaya, S. Treskatsch, A. Radbruch, A. Diefenbach, H. Prüss, P. Enghard, M. Mashreghi, A. Kruglov. Cross-regulation of antibody responses against the SARS-CoV-2 Spike protein and commensal microbiota via molecular mimicry. // *Cell Host and Microbe*. – 2023. – V. 31, No. 11. – P. 1866-1881.
2. **M. Bondareva**, P. Letz, K. Karberg, E. Schrezenmeier, I. Semin, H. Rincon-Arevalo, T. Dörner, M. Mashreghi, A. Stefanski, A. Kruglov. Induction of cross-reactive, mucosal anti-SARS-CoV-2 antibody responses in rheumatoid arthritis patients after 3rd dose of COVID-19 vaccination. // *Journal of Autoimmunity*. – 2022. – V. 133, No. Dec. – P. 102918.
3. Н. Шаранова, J. Ninnemann, **M. Bondareva**, Я. Семин, А. Номоконова, А. Круглов. Анализ специфичности IgA-антител, продуцируемых в тонком кишечнике мышей. // *Молекулярная биология*. – 2017. – Т. 51, № 6. – С. 938-944.

N. Sharanova, **M. Bondareva**, Y. Semin, A. Nomokonova, A. Kruglov, J. Ninnemann. Analysis of specificity of IgA antibodies produced in murine small intestine. // *Molecular Biology*. – 2017. – V. 51, No. 6. – P. 813-818.
4. I. Semin, J. Ninnemann, **M. Bondareva**, I. Gimaev, A. Kruglov. Interplay between microbiota, Toll-Like Receptors and cytokines for the maintenance of epithelial barrier Integrity. // *Frontiers in Medicine*. – 2021, – V. 8, No. Feb. – P. 644333.

* Равноценный вклад в работу

Обзор литературы

Микробиота и ее значение для организма

Организм млекопитающих взаимодействует с колоссальным количеством микроорганизмов, находящихся на слизистых оболочках самого организма (Clemente et al., 2012). Рождение и раннее постнатальное развитие подвергают организм взаимодействию с огромным количеством окружающих микроорганизмов, что способствует незамедлительному заселению организма микробиотой. Таким образом, микробиота – это совокупность микроорганизмов, включая бактерии, вирусы, грибы, простейших, которые заселяют слизистые организма-хозяина (Clemente, et al., 2012). Одним из значимых факторов в колонизации новорожденного организма являются способ рождения – естественный или кесарево сечение, а также питание – грудное вскармливание или искусственное (Backhed et al., 2015). Так, были показаны различия в видовом составе микробиоты между младенцами, рожденными разными путями. Начальная микробиота кожи, кишечника, ротовой полости естественно рожденных характеризуется видами, которые преобладают внутри родовых путей, например, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia spp.* (Honda et al., 2012, Tamburini et al., 2016). Младенцы, рожденные кесаревым сечением, приобретают бактерии, населяющие кожу матери, а также бактерии окружающей среды, среди которых *Staphylococcus* и *Streptococcus* (Backhed, et al., 2015). Более того, была выявлена задержка в заселении бактериями *Bacteroidetes* – основного филума нормальной микрофлоры кишечника – у искусственно-рожденных, что влияет на формирование иммунной системы (Jakobsson et al., 2014). В недавнем исследовании было показано, что заселение младенцев вагинальной микрофлорой, несмотря на кесарево сечение, может быть компенсировано за счет усиленной колонизации из других компартментов (грудное молоко, ротовая полость, кожа) (Bogaert et al., 2023). Другое исследование также предлагает метод трансфера вагинальной микробиоты (VMT), который предполагает заселение младенца микробиотой родовых путей в первый месяц жизни. Такой способ положительно влиял на нейромоторное развитие (Zhou et al., 2023). Тем не менее, такой VMT должен сопровождаться тщательным скринингом матери на наличие различных патогенов, что доступно не во всем мире.

Важную роль в установлении ранней постнатальной композиции микробиоты и ее регуляции играют антитела, попадающие в желудочно-кишечный тракт новорожденного через молоко матери. Это прежде всего антитела класса IgA и IgG (Bunker et al., 2018). Причем было показано, что IgA⁺ плазматические клетки мигрируют в молочную железу, где производят IgA (Wilson et al., 2004). Эти антитела нужны для связывания начальной микробиоты и предотвращения их транслокации в организм и гиперактивации несформированной иммунной

системы новорожденного. Также стоит отметить, что переход к твердой пище вызывает не менее драматичные изменения в композиции микробиоты, способствуя ее развитию в сторону

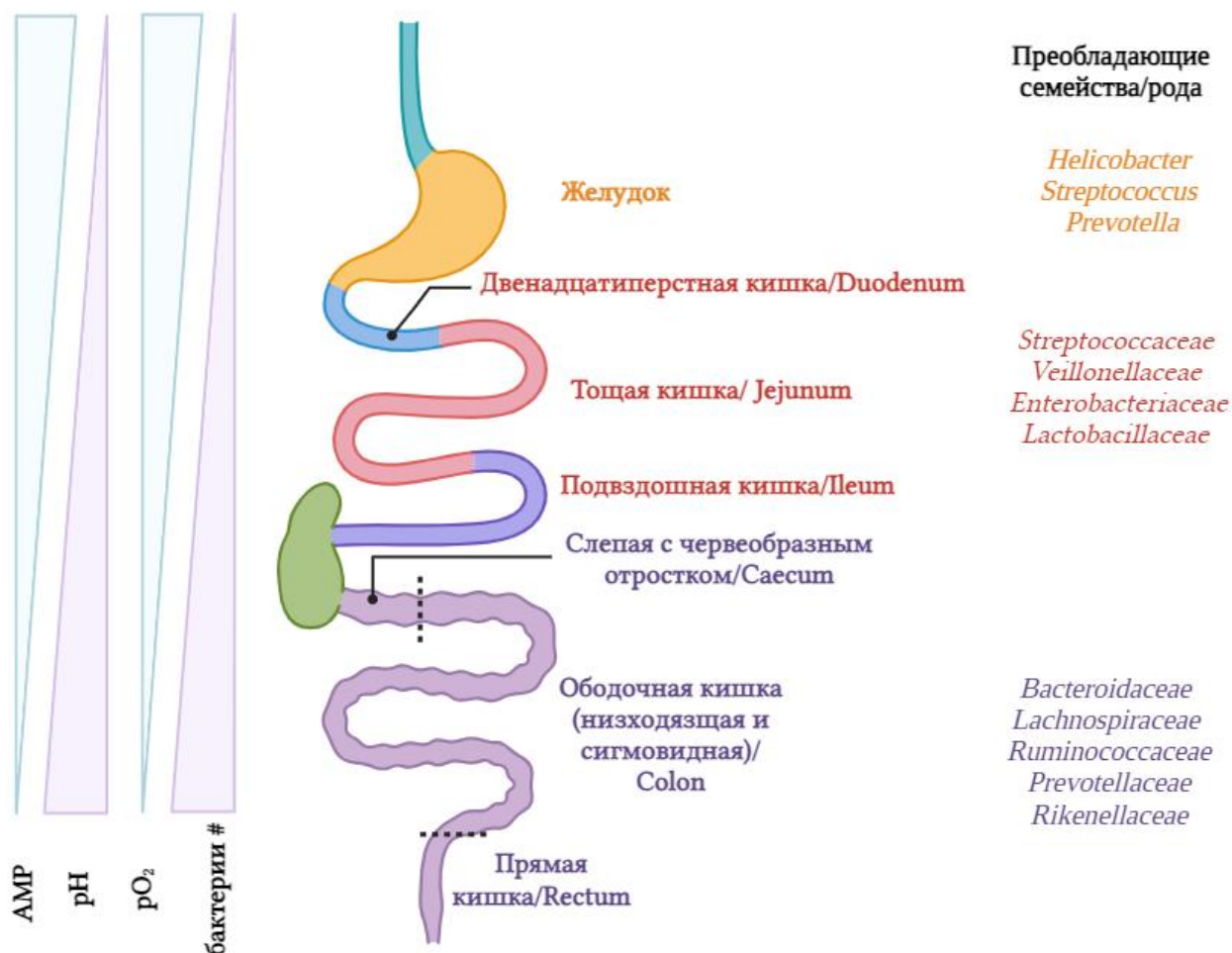


Рисунок 1. Компартиментализация основных компонентов микробиоты и связь с пространственной организацией кишечника. Основные представители для каждого отдела представлены справа на рисунке. Увеличенное содержание антимикробных пептидов (antimicrobial peptides, AMP) и обогащенность кислородом, а также кислый pH в тонком кишечнике лимитируют бактериальную нагрузку (Donaldson et al., 2016, McCallum et al., 2024) с изменениями.

микробиоты взрослого организма. В частности, в кишечнике начинают преобладать облигатные анаэробы (Honda, et al., 2012, Martino et al., 2022). Во взрослом организме большая часть состава микробиоты приходится на типы бактерий *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, а также *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Микробиота заселяет все слизистые оболочки на пути желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), подразделяясь на микробиоту ротоносоглотки и кишечную микробиоту. Ротовая полость плотно населена микроорганизмами, она открыта для внешнего воздействия, таким образом, внося большой вклад в гомеостаз организма-хозяина. Микробиом полости рта также подвергается воздействию различных частиц пищи и влиянию окружающей среды. Различные заболевания полости рта, такие как пародонтит, кариес или рак полости рта, связаны с изменениями в микробиоме (Lin et al., 2023). *Scardovia*, *Selenomonas*, and *Campylobacter*, например, ассоциированы с кариесом. Курение табака также является одним из

факторов изменений в составе оральной микробиоты (Zambon et al., 1996). Кроме того, полость рта служит воротами для микробной колонизации, формируя состав последующих микробных сообществ для дыхательной и пищеварительной систем (Baker et al., 2024). Ротовая полость представляет собой вторую по разнообразию среду обитания микроорганизмов после кишечника, где бактерии локализуются в различных местах, обычно объединенных в 3 группы: (1) буккальная слизистая оболочка, кератинизированная десна и твердое небо; (2) слюна и язык; и (3) поддесневые и наддесневые зоны (Mark Welch et al., 2020). Основными таксонами полости рта у здоровых людей являются рода *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Veillonella*, *Gemella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas* и *Fusobacterium*, присутствующие в разных пропорциях в различных местах полости рта (Kunath et al., 2024, Wells et al., 2022b). В свою очередь, кишечная микробиота отличается друг от друга по мере продвижения по ЖКТ (Рис. 1), это связано с изменением в доступности кислорода, увеличением рН, разным составом слизи и особенностями иммунного ответа в том или ином компартменте.

Значимость микробиоты кишечника в гомеостазе организма-хозяина в настоящее время также не поддается сомнению. Использование современных технологий секвенирования позволило более детально изучать наличие отдельных представителей микробиоты, а также оценивать их вклад в физиологию организма (Hou et al., 2022). В частности, метагеномный подход подтвердил, что существуют различные энтеротипы в популяции людей (Arumugam et al., 2011). Самым важным является то, что было показано, что баланс между основными филумами важен в контроле над ожирением, другими метаболическими заболеваниями и т.д (Rinninella et al., 2019). В связи с этим в данный момент большое количество исследований посвящено пониманию механизмов того, как микробиота может регулировать то или иное заболевание. Принципиально вклад микробитных антигенов в развитие заболеваний можно разделить на протективный и патогенный, однако, механизмы, опосредующие тот или иной вклад, также подразделяются на несколько типов. **Первый** – молекулярная антигенная мимикрия и индукция кросс-специфичного гуморального или Т-клеточного ответа. Микробиота, представляя сообщество комменсальных микроорганизмов на слизистых, является источником множества антигенов для иммунной системы организма-хозяина. Количество генов, кодируемых в этих бактериях, превышает 40 млн, а геном человека насчитывает порядка 22 тыс. генов (Tierney et al., 2019). По этой причине антигены микробиоты могут частично воспроизводить последовательности антигенов других микроорганизмов или белков организма-хозяина, приводя, таким образом, к индукции кросс-реактивного иммунного ответа посредством молекулярной мимикрии (Рис. 2). В случае схожести антигенов

микробиоты и белков организма-хозяина потенциально может возникнуть аутоиммунная реакция. Например, бактерия *Parabacteroides distasonis* экспрессирует белок гипоксантинфосфорибозилтрансферазу (*hprt*), молекулярно схожий с инсулином, и отвечает за индукцию Т-клеток, специфичных к инсулину, а также за индукцию аутореактивных антител. Интересно, что пациенты с диабетом первого типа имеют в крови антитела против *hprt-Parabacteroides distasonis* (Girdhar et al., 2022). Помимо этого, *Leptotrichia goodfellowii* – представитель филума *Fusobacteria*, также способна индуцировать инсулин-реактивные CD8⁺ Т-клетки и способствовать развитию симптомов диабета первого типа у мышей (Tai et al., 2016). В контексте другого аутоиммунного заболевания, связанного с воспалением миокарда, патогенную роль играют бактерии рода *Bacteroides* (*B. thetaiotaomicron*, *B. faecis*), экспрессирующие β-галактозидазу (β-gal), которые мимикрируют под тяжелую цепь миозина 6 (МУН6). Развитие тяжелой формы заболевания у людей ассоциировано с HLA-DQB1*-полиморфизмом, при этом детектируются антитела IgG и IFNγ⁺ Т-клетки, специфичные как к β-gal, так и к МУН6 (Gil-Cruz et al., 2019). Другая бактерия - *Lactobacillus reuteri* – мимикрирует под миелинолигодендроцитный гликопротеин и способствует индукции аутореактивных Т-клеток, кросс-специфичных к данному белку. В свою очередь, это связано с развитием симптомов рассеянного склероза в мышинной модели (Miyachi et al., 2020). Молекулярная мимикрия между микробиотой и другими микроорганизмами может обеспечивать и кросс-реактивный протективный иммунитет. Было показано, что антитела против LPS-О-антигена нейтрализуют различные клинически-релевантные серотипы *Klebsiella pneumoniae* и другие бактерии, что говорит о кросс-специфической природе таких антител (Rollenske et al., 2018). Некоторые белки кишечной микробиоты, например, РНК-полимераза *E.coli*, мимикрируя под gp41 HIV-1, способствуют развитию специфического антительного ответа. Можно предположить, что комменсальные бактерии играют критическую роль в формировании преинфекционного ответа на HIV-1, участвуя в формировании пула В-клеток памяти (Trama et al., 2014). Роль кросс-реактивных IgА-антител кишечного происхождения была показана также в контроле развития пневмонии, индуцированной оппортунистической бактерией *Pseudomonas aeruginosa* после курса антибиотиков (Robak et al., 2018).

Вторым механизмом является *регуляция микробиотой продукции цитокинов или клеточного иммунного ответа*. Например, в неонатальном периоде компоненты микробиоты регулируют рекрутирование лимфоидных клеток врожденного иммунитета третьего типа (innate lymphoid cells, ILC3) в легкие и продукцию ими IL-22, который контролирует иммунный ответ на *S. pneumoniae* и защищает от пневмонии (Gray et al., 2017).

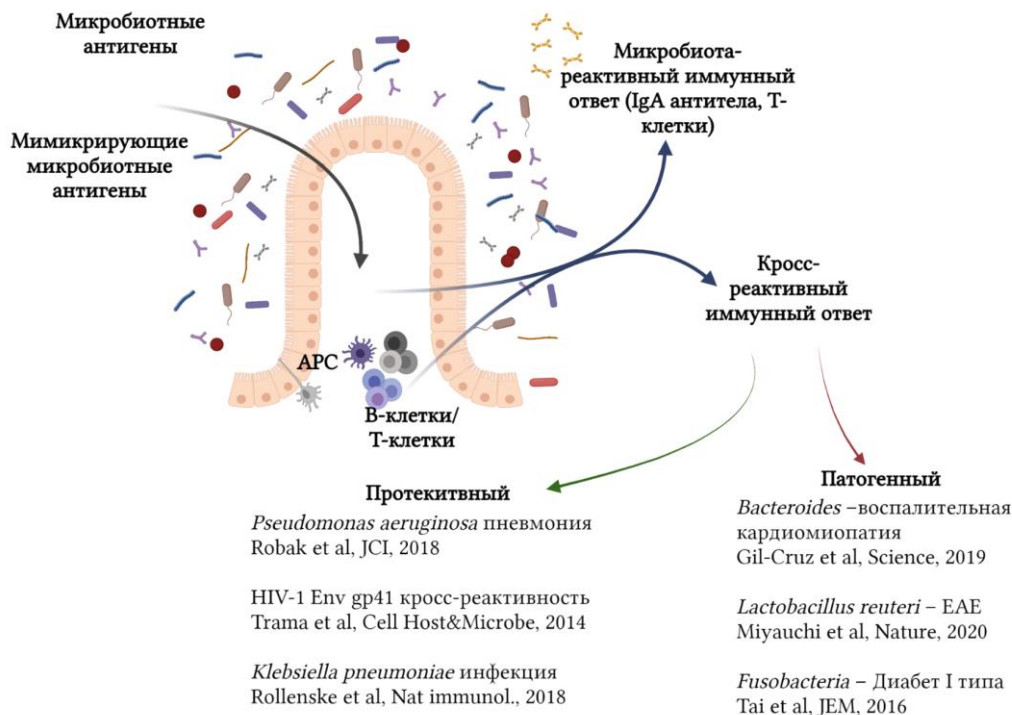


Рисунок 2. Схема, отображающая индукцию иммунного ответа против микробиоты и кросс-реактивного иммунного ответа против других антигенов. Микробиота предоставляет локальной иммунной системе слизистых большое количество антигенов, которые могут мимикрировать под антигены других микроорганизмов или антигены организма-хозяина. Это может приводить к кросс-реактивному иммунному ответу.

Другим примером является регуляция микробиотой тонической продукции IFN I типа плазмацитоидными дендритными клетками, что важно для дальнейшего прайминга наивных Т-клеток при иммунном ответе на патогены (Schaupp et al., 2020). Неомицин-чувствительная микробиота также обеспечивает иммунный ответ на вирус гриппа А, регулируя количество CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток, а также синтез неактивных форм IL-1β и IL-18 при гомеостазе и продукцию IL-1β и IL-18 при инфекции вирусом (Ichinohe et al., 2011). Недавние исследования также продемонстрировали, что отдельные бактериальные виды могут влиять на исход иммунотерапии некоторых видов рака. Так, для модели саркомы (МСА-205) было выяснено, что эффективность анти-PD-1 терапии зависит от состава микробиоты, а именно от присутствия бактерии рода *Akkermasia*, которая положительно влияет на исход лечения, что по всей видимости связано с индукцией инфильтрации в опухоль клеток Т хелперов 1 типа (Т helper 1, Th1) в интерлейкин-12 (interleukin-12, IL-12) зависимой манере (Routy et al., 2018). В другом исследовании трансфер фекальной микробиоты (fecal microbiota transfer, FMT) от доноров, которые положительно отвечали на анти-PD-1-терапию, к донорам, которые изначально не отвечали на нее, положительно влиял на исход терапии (Kim et al., 2024). Интересно, что в данном случае *Prevotella merdae*, но не *Akkermansia muciniphila* стимулировала Т-клетки к убийству опухолевых клеток. Это может быть также связано с разными энтеротипами в первом

и во втором исследовании. К **третьему** типу механизмов, обеспечивающих вовлеченность микробиоты в развитие заболеваний, можно отнести *продукцию микробиотой метаболитов*, которые далее могут влиять на исход заболеваний или на работу иммунной системы при гомеостазе. Например, коротко-цепочечные жирные кислоты (ацетат, пропионат, бутират) производятся большим количеством кишечных бактерий и обеспечивают работу иммунной системы на многих этапах, включая продукцию IgA-антител (Wu et al., 2017) и их специфичность (Takeuchi et al., 2021), продукцию IL-22 в кишечнике и защиту от *Citrobacter rodentium* (Yang et al., 2020) и др.

Недавно был показан механизм индукции Т-клеток, специфических к микробиоте, в тимусе в раннем возрасте. Колонизация кишечника в раннем возрасте приводит к переносу антигенов микробиоты из кишечника в тимус дендритными клетками, которые затем индуцируют экспансию таких Т-клеток. Таким образом, развивающаяся микробиота формирует и расширяет репертуар тимических и периферических Т-клеток, обеспечивая усиленное распознавание и дифференцирование микробиоты и патогенов (Zegarra-Ruiz et al., 2021). Таким образом, различные бактерии могут направлять иммунный ответ на подавление опухолевого роста посредством стимуляции Т клеточного иммунного ответа.

Согласно исследованиям, состав микробиоты важен в контроле кишечного воспаления. Воспалительные заболевания кишечника (inflammatory bowel disease, IBD) ассоциированы с дисбиозом, а именно со снижением уровня комменсалов, таких как бифидобактерии и лактобактерии, тогда как уровень условно патогенных микроорганизмов возрастает (Honda, et al., 2012). IBD, к которым относятся, например, болезнь Крона и язвенный колит, являются типичными воспалительными заболеваниями толстого кишечника, отличающимися по патоморфологии, где происходит нарушение целостности эпителиального барьера и рост патогенных компонентов микробиоты, которые являются триггерами воспалительных реакций. В результате данные патологии сопровождаются также изменением цитокинового спектра в кишечнике с иммуносупрессорного на провоспалительный (Caruso et al., 2020, Semin et al., 2021). Так, изучение состава микробиоты пациентов с IBD выявило, что у них нарушается баланс преобладающих типов флоры, а именно *Firmicutes* обычно снижены, тогда как *Proteobacteria* разрастаются (Ni et al., 2017). Среди *Proteobacteria* можно отметить семейство *Enterobacteriaceae* и типичного его представителя *E. coli* и инвазивный тип *E. coli* (adherent invasive *E. coli*, АИЕС). Поскольку микробиом пациентов с болезнью Крона часто обогащен этой бактерией по сравнению со здоровыми людьми, это также может быть причиной такой патологии (Martinez-Medina et al., 2014).

Несмотря на то, что микробиота глобально консервативна и одинакова у различных млекопитающих, существует множество факторов, которые могут модулировать ее состав. Среди таких факторов важным является диета организма-хозяина. В современной науке большое внимание уделено диетам с повышенным содержанием жиров и простых сахаров («диета западного типа»). Так, было показано, что такая диета приводит к дисбалансу бактериальных типов *Firmicutes* и *Bacteroidetes* (Tseng et al., 2019). Используемая диета во многом определяет энтеротип кишечной микробиоты индивидуума. Диета с повышенным содержанием животного белка и жира ассоциирована с энтеротипом, в котором преобладают *Bacteroides*, тогда как преимущественно углеводные диеты ассоциированы с *Prevotella*-богатым энтеротипом, а также с присутствием *Streptococcus* и *Veillonella* (Korpela et al., 2018, Wu et al., 2011). Причина развития некоторых заболеваний заключается в потреблении малого количества полисахаридов, важных для бактерий, при этом простые сахара не могут достигать основной части компонентов микробиоты в толстом кишечнике из-за абсорбции в тонком кишечнике. В результате бактерии кишечника в качестве источника питания используют гликаны слизистого слоя. Простой моносахарид фруктоза имеет лимит всасывания в тонком кишечнике, а избыток достигает микробиоты. Неожиданным обнаружением было то, что фруктоза таким образом напрямую влияет на колонизацию комменсальной бактерии *Bacteroides thetaiotaomicron*, выступая в роли сайленсера экспрессии гена *BT3172* (regulator of colonization, Roc), важного для колонизации, поскольку у мышей, получавших с диетой повышенное количество простых сахаров, наблюдали снижение уровня комменсала *B. thetaiotaomicron* (Townsend et al., 2019).

Таким образом, микробиота контролирует развитие различных патологий как через молекулярную мимикрию, так и посредством регуляции производства цитокинов иммунной системой или через продукцию метаболитов.

SARS-CoV-2 и микробиота

SARS-CoV-2 инфицирует клетки посредством взаимодействия белка Spike с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), который экспрессируется различными типами клеток (Wang et al., 2020). Белок Spike вируса SARS-CoV-2 содержит рецептор-связывающий домен (receptor binding domain, RBD), который опосредует его взаимодействие с рецептором ACE2 и способствует проникновению вируса в организм (Jackson et al., 2022). Хотя основным местом заражения SARS-CoV-2 являются респираторные пути, есть основания предполагать, что в процесс вовлечен и желудочно-кишечный тракт (Lamers et al., 2020). К ним относятся способность SARS-CoV-2 инфицировать и реплицироваться в энтероцитах кишечника (Lamers, et al., 2020), повышенная экспрессия ACE2 в кишечных эпителиальных

клетках, а присутствие РНК SARS-CoV-2 было отмечено в образцах слизистой оболочки и фекалий от людей с инфекцией SARS-CoV-2 (Natarajan et al., 2022, Zuo et al., 2021). Кроме того, у пациентов с COVID-19 часто встречаются такие желудочно-кишечные симптомы, как диарея, тошнота и рвота (Cheung et al., 2020). Появившиеся данные свидетельствуют о том, что микробиота дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта у пациентов с COVID-19 значительно изменена (Zhang et al., 2023a). Дисбиоз микробиоты кишечника может быть связан с обострением воспалительных реакций в COVID-19. На данный момент проведено большое количество исследований в данном направлении, где, в основном, можно заключить, что у пациентов с COVID-19 значительные по сравнению с контрольной группой изменения в фекальном микробиоме характеризуются обогащением условно-патогенными микроорганизмами и истощением полезных микроорганизмов (Hernandez-Teran et al., 2021, Liu et al., 2022b, Zuo et al., 2020). А именно, в микробиоте пациентов с COVID-19 наблюдалось низкое содержание SCFA-производящих противовоспалительных бактерий *Lachnospiraceae*, *Roseburia*, *Eubacterium* и *Faecalibacterium prausnitzii*. Фекалии пациентов с COVID-19 были обогащены условно-патогенными микроорганизмами, известными как возбудители бактериемии, такими как *Clostridium hathewayi*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Actinomyces viscosus* и *Bacteroides nordii*. В исследовании, включавшем 62 пациента с COVID-19, 33 пациента с сезонным гриппом и 40 здоровых людей в качестве контроля, у пациентов с COVID-19 было значительно снижено бактериальное разнообразие с обогащением оппортунистическими патогенами, такими как *Streptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium* и *Escherichia*, а также более высокая фекальная концентрация провоспалительного цитокина IL-18 по сравнению с пациентами с сезонным гриппом (Tao et al., 2020). В другом исследовании изучали стабильность оральной микробиоты у 831 донора в течение полугода, где 81 участник со временем инфицировался вирусом SARS-CoV-2. У людей, не подвергшихся воздействию инфекции, и с легкой и средней степенью инфицирования SARS-CoV-2, микробиом слюны оставался стабильным в течение шестимесячного периода исследования. Однако среди SARS-CoV-2-зараженных участников с тяжелыми симптомами в ранние сроки после заражения наблюдалось значительное сокращение разнообразия микробиома (Armstrong et al., 2023).

Вышеперечисленные исследования предоставляют колоссальный срез данных по составу микробиоты у SARS-CoV-2-зараженных людей. Тем не менее, следует выделить некоторые недостатки. Большинство исследований были перекрестными, а не длительными, и в большинстве исследований образцы фекалий до заражения не собирались. Кроме этого, доступно мало информации о режимах лечения заболевания, где применение антибиотиков может влиять на видимые различия в составе микробиоты. Учитывая тесную взаимосвязь

между микробиотой кишечника и патологией COVID-19, манипуляции с микробиотой кишечника могут представлять собой альтернативную стратегию лечения и предотвращения COVID-19.

Известно, что индивидуумы, которые были заражены SARS-CoV-2, развивают нейтрализующие IgG/IgA антитела против RBD (Isho et al., 2020). Говоря о взаимосвязи микробиоты и SARS-CoV-2, нельзя не упомянуть, что в некоторых индивидуумах, которые не были ранее инфицированы SARS-CoV-2, детектируются антитела IgA против RBD (Majdoubi et al., 2021, Ng et al., 2020). Было предположено, что это вызвано инфицированием другим вирусом SARS. Тем не менее, источник антигена для индукции таких антител до сих пор остается не выясненным. Можно предположить, что микробиота может быть вовлечена в индукцию таких антител у неинфицированных индивидуумов. Данное предположение стало одной из отправных гипотез в настоящей работе.

Роль *Akkermansia muciniphila* в функционировании иммунной системы и регуляции заболеваний

Akkermansia muciniphila – грамотрицательная муцин-деградирующая бактерия, выделенная из кишечной микробиоты человека (Collado et al., 2007), представляет особый интерес. Было опубликовано множество работ, где была показана положительная роль в предотвращении различных заболеваний, а также в улучшении действия иммунотерапии (Routy, et al., 2018). Помимо этого, была установлена роль данной бактерии в гомеостатических условиях: *Akkermansia* индуцирует выработку IgG₁-антител В-клетками при участии CD4⁺ Т-клеток (Ansaldo et al., 2019). В гнотобиотических условиях, когда все компоненты микробиома были определены, экспансия специфичных *A. muciniphila*-Т-клеток наблюдалась только при наличии *A. muciniphila* (Ansaldo, et al., 2019).

Ранний состав микробиоты играет важную роль в формировании здоровой иммунной системы и в снижении риска развития заболеваний (Gensollen et al., 2016). Своевременное развитие микробиоты в раннем постнатальном периоде важно для индукции периферических ROR γ ⁺Foxp3⁺ Т регуляторных клеток (Treg) (Lubin et al., 2023), которые во взрослом возрасте будут контролировать микробиоту и обеспечивать гомеостаз кишечника (Liu et al., 2022d).

Сниженные количества *A. muciniphila* обнаружены при ожирении и других метаболических заболеваниях, тогда как введение ее, например, в модели высокожировой диеты улучшало чувствительность к инсулину (Choi et al., 2021, Depommier et al., 2020). Представленность *A. muciniphila* снижается также у мышей с ожирением и у пациентов с сахарным диабетом второго типа (Dao et al., 2016, Everard et al., 2013). Пероральное применение *A. muciniphila* снижает уровень гликогена в печени, повышает уровень инсулина в сыворотке

крови и толерантность к глюкозе (Derommier, et al., 2020). Недавно был определен белок внешней мембраны *Amuc1100*, который обуславливает положительные эффекты (Plovier et al., 2017). В другой работе авторы обнаружили еще один белок *P9*, эффекты которого сильнее, чем у *Amuc1100*. Более того, *P9* способствует выработке эпителием глюкагоноподобного пептида-1, который стимулирует выработку инсулина, тем самым снижая уровень сахара в крови (Yoon et al., 2021).

Однако результаты, полученные Qin и коллегами, противоречат вышеприведенным результатам, касающимся изменения численности *A. muciniphila* при сахарном диабете второго типа. Результаты показали, что при диабете второго типа значительно повышается содержание *A. muciniphila*. Обогащение *A. muciniphila* связано с деградацией муцина, однако регуляция *A. muciniphila* при сахарном диабете второго типа в данном исследовании не оценивалась (Qin et al., 2012). Khan и соавторы обнаружили, что короткий курс высокоглюкозной диеты (high glucose diet, HGD) на мышах не вызывал воспаления, но изменял состав кишечной микробиоты, приводя к значительному росту муциндеградирующих бактерий *Akkermansia muciniphila* и *Bacteroides fragilis*. Затем это утяжеляло течение экспериментального колита, поскольку слой муцина был значительно уменьшен после HGD (Khan et al., 2020). Рост *Akkermansia*, по всей видимости, был обусловлен тем, что эта бактерия может использовать для роста глюкозу помимо муцина (Derrien et al., 2004).

Также недавно были выявлены и другие иммуномодуляторные функции *Akkermansia muciniphila*. Было показано, что *Akkermansia muciniphila* может выживать внутри макрофагов, при этом модулируя их иммунный ответ, направляя его в сторону противовоспалительного (Pena-Searra et al., 2024). Кроме этого, был найден липид с орнитинным остатком, который производится в кишечнике бактерией *Akkermansia muciniphila*, и что он также обладает противовоспалительным эффектом при стимуляции макрофагов *in vitro* в сравнении с LPS (Zhang et al., 2023b). С другой стороны, ранее был выделен другой липид диацил фосфатидилэтаноламин из клеточной мембраны *Akkermansia muciniphila*, который обуславливает иммуномодулирующую активность при стимуляции макрофагов, приводя к образованию TNF и IL-6 через TLR1/2 (Bae et al., 2022). Таким образом, *Akkermansia muciniphila* представляет собой значимую комменсальную бактерию с разнообразными функциями, роль которых продолжает изучаться.

Механизмы контроля состава микробиоты

Микробиота, населяя кишечник, вовлечена во многие физиологические процессы организма-хозяина, такие как синтез витаминов, участие в метаболизме, гомеостаз кишечной иммунной системы и другие (Clemente, et al., 2012). Дисбаланс в композиции микробиоты

может быть ассоциирован с нарушением тех или иных процессов в организме, а также с развитием различных заболеваний, таких как IBD, аутоиммунные реакции, метаболический синдром, злокачественные опухоли и т. д. Поэтому наиважнейшим является контроль состава микробиоты организмом-хозяином, который осуществляется врожденным и адаптивным иммунитетом, а также неиммунными механизмами.

Эпителиальные клетки являются пограничными между организмом и окружающей его средой. В контексте взаимодействия организма и населяющих его бактерий границей являются эпителиальные клетки кишечника (intestinal epithelial cells, IECs), которые незаменимы в поддержании гомеостаза организма-микробиота (Peterson et al., 2014). Особенность IECs состоит в том, что они не наделены специфическими иммунными функциями, но служат эффекторным звеном в регуляции комменсалов, производя AMP и некоторые цитокины, а также служат физическим барьером, синтезируя муцин – основной гликопротеин слизистого слоя.

IECs выполняют также роль сенсоров микробного содержимого кишечника, экспрессируя на себе рецепторы, распознающие патогенные паттерны. Такие паттерн-распознающие рецепторы (pattern recognition receptors, PRRs) распознают различные бактериальные структуры, включая липополисахарид (lipopolysaccharide, LPS), пептидогликан, флагеллин, а также нуклеиновые кислоты. В контексте распознавания консервативных антигенов бактерий важно отметить TLRs и NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors, NLRs). Интересно, что экспрессия различных поверхностных TLRs (TLR1, 2, 4, 5, 6) эпителиальными клетками сосредоточена на их базальной и латеральной сторонах (Peterson, et al., 2014). Это связано с контролем иммунного ответа и защитой от чрезмерной активации провоспалительных каскадов. Недавно была показана также важность TLR5 в установлении композиции микробиоты и, что интересно, экспрессия TLR5 лимитирована по времени (Fulde et al., 2018). Авторы данной работы показали, что TLR5, экспрессируясь на эпителиальных клетках кишечника в неонатальном периоде, участвует в контроле заселения флагеллированных бактерий путем продукции Reg3 γ и, как следствие, влияет на состав микробиоты в постнатальном периоде. Экспрессия TLR5 во взрослом организме уже не выполняет таких функций. Связывание TLRs с лигандами приводит к активации сигнальных путей, которые важны для запуска синтеза провоспалительных цитокинов. Фактор миелоидной дифференцировки 88 (Myeloid differentiation primary response 88, MyD88) – адапторная молекула, важная в проведении сигналов от активированного TLR, где дальнейший сигналинг приводит к транслокации NF- κ B в ядро и активации транскрипции генов таких провоспалительных цитокинов, как IL-1 β , IL-6, TNF (Lawrence 2009). Более того, было

показано, что мыши, нокаутные по гену *MyD88*, характеризуются пониженной продукцией антимикробных пептидов (antimicrobial peptides, AMP) (Muniz et al., 2012), которые важны для элиминации патогенной флоры.

IECs также участвуют в регуляции продукции IgA. Бактериальные поверхностные антигены индуцируют TLR-сигнальный путь, что приводит к активации эпителиальных клеток. Так, было показано, что LPS, флагеллин и в меньшей степени пептидогликан стимулировали продукцию APRIL эпителием, что в конечном счете способствовало T независимой продукции IgA (He et al., 2007).

NLRs, в отличие от TLRs, локализуются в цитоплазме. Структурно в NLR можно выделить нуклеотид-связывающий домен (NOD), лейциновые повторы и вариабельный N-конец, который отвечает за белок-белковые взаимодействия. Среди NLRs, содержащих домен активации и рекрутирования каспазы (caspase activation and recruitment domain, CARD) на N-конец, можно выделить NOD1 и NOD2, которые являются сенсорами бактериальных пептидогликанов. NOD1 отвечает за распознавание диаминопимелиновой кислоты в составе клеточной стенки бактерий, в то время как NOD2 распознает мурамилдипептид (Girardin et al., 2003). Также NOD1 и NOD2 различаются по тому, в каких клетках они экспрессируются. Так, NOD1 можно считать убиквитарным. NOD2 имеет повышенную экспрессию в дендритных клетках, макрофагах и клетках Панета тонкого кишечника (Oviedo-Boyso et al., 2014). Была показана роль NOD-рецепторов в поддержании кишечного гомеостаза. Так, *Nod2*^{-/-} мыши характеризуются развитием увеличенных пейеровых бляшек в большем количестве и с повышенным количеством М-клеток (Barreau et al., 2007). При активации NLR-рецептора, в составе которого имеется пуриновый домен, (NLRP3), образуется инфламмосома, которая участвует в активации каспазы-1 и, следовательно, приводит к выработке IL-1 β и IL-18. Совместно два типа сигнальных путей обуславливают поддержание кишечного гомеостаза в отношении комменсалов (Parlato et al., 2014).

В организме хозяина баланс микробиоты достигается благодаря взаимной регуляции состава микрофлоры организмом и чрезмерного иммунного ответа микрофлорой. Иммунный ответ в кишечнике подвергается контролю, поскольку может инициировать провоспалительный каскад реакций. Следовательно, для снижения вероятности развития патологий важно ограничить контакт с бактериями, населяющими кишечник. Частично это достигается механически путем стратификации (предотвращения контакта бактерий с клетками кишечного эпителия) и компартментализации (ограничения проникновения бактерий за пределы эпителия и представления их иммунным клеткам) (Hooper et al., 2012). Кроме того, в толстом и тонком отделах кишечника, где сосредоточена большая часть компонентов

микробиоты, создается дополнительный физический барьер между эпителиальными клетками и бактериями, который представлен слизью, главным белком которой является сильно гликозилированный муцин-2 (MUC-2), что сильно ограничивает контакт бактерий с эпителиальными клетками (Johansson et al., 2008). В тонком кишечнике защита эпителиальных клеток от активации бактериями обусловлена не только слоем слизи. В составе эпителия тонкого кишечника есть клетки Панета, которые служат основными продуцентами АМР (Hooper, et al., 2012, Ouellette 2005). Это важно для контроля проникновения патогенных форм близко к эпителию через рыхлый слой слизи. В отличие от тонкого кишечника эпителий толстого включает в себя гораздо больше бокаловидных клеток, производящих гликозилированный муцин.

Стоит также отметить еще один принцип, который влияет на жизнеспособность микроорганизмов кишечника. Это физико-химические свойства просвета кишечника – кислотность и обогащенность кислородом (Рис. 1). Кислотность тонкого кишечника выше, чем толстого за счет выхода в него желчного протока. Таким образом, желчные кислоты создают низкий рН, ограничивая рост бактерий филума *Bacteroides* и способствуя процветанию *Firmicutes* (Donaldson, et al., 2016). Это создает разные ниши в тонком и толстом кишечнике, пригодные для тех или иных компонентов микробиоты. Уровень кислорода в просвете кишечника уменьшается с продвижением от проксимального к дистальному отделу, что создает условия для компартментализации факультативных анаэробов и облигатных анаэробов (Рис. 1) (Tropini et al., 2017).

Ряд механизмов иммунной системы участвует в поддержании гомеостатического барьера между кишечником, пищевыми антигенами и микрофлорой. Наряду с АМР и продукцией муцина IgA служит первой линией защиты и является одним из механизмов контроля микробиоты (Pabst et al., 2020). IgA-продуцирующие плазматические клетки преимущественно индуцируются в кишечнике, где производят секреторный IgA (secretory IgA, SIgA). Интересно, что IgA⁺ плазматические В-клетки индуцируются перманентно, в отсутствие воспаления или иммунизации, в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани (gut associated lymphoid tissue, GALT). Она включает пейеровы бляшки (Peyer's patches, PP), брызжеечные лимфоузлы (mesenteric lymph nodes, mLN), а также изолированные лимфоидные фолликулы (isolated lymphoid follicles, ILF). Однако места нахождения IgA⁺ плазматических клеток не ограничены слизистыми кишечника. Так, в костном мозге, селезенке, печени, а также в легких может быть также обнаружена малая субпопуляция IgA⁺ клеток (Moro-Sibilot et al., 2016, Robak, et al., 2018, Wilmore et al., 2018). Однако, то, как IgA⁺ клетки индуцируются в сайтах, отличных

от GALT, или при каких условиях они туда мигрируют, остается не выясненным вопросом мукозальной иммунологии.

Основными драйверами продукции IgA в кишечнике являются компоненты микробиоты, поскольку мыши в отсутствии микробиоты (*germ free*) характеризуются очень малым количеством IgA⁺ плазматических клеток (Bunker et al., 2017).

Подавляющее число IgA⁺ плазматических клеток располагаются в тонком кишечнике, тогда как в толстом кишечнике их гораздо меньше (Bunker et al., 2015). Возможно, это связано с различием состава микробиоты в каждом из компартментов. Основным индукторным сайтом IgA⁺ клеток является GALT. Более того, IgA может индуцироваться и *in situ* в собственной пластинке кишечника (*lamina propria*) – основном месте нахождения IgA-клеток в кишечнике (Fagarasan et al., 2001).

Индукция плазматических клеток может происходить по двум принципам – по Т-клеточно-зависимому и независимо от Т-клеток. В PP и mLN индукция IgA может происходить по Т-зависимому и Т-независимому пути (Рис. 3, 4). В ILF и *lamina propria* IgA индуцируется независимо от Т-клеток, но обуславливается цитокиновым спектром, который способствует переключению изотипа на IgA. Это, прежде всего, фактор роста опухоли (tumor growth factor β 1, TGF- β 1), ретиноевая кислота (retinoic acid, RA), фактор, активирующий В-клетки (B cell activation factor, BAFF), и APRIL (Fagarasan et al., 2010). Кроме этого, была выяснена роль IL-21 в продукции IgA (Cao et al., 2015). IL-21-дефицитные мыши характеризуются сниженным уровнем люминального IgA, а применение IL-21 в совокупности с TGF- β 1 и RA индуцирует повышенный IgA *in vitro*. Известен также вклад фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) и других молекул суперсемейства TNF в IgA-ответ. TNF продуцируется различными типами клеток, в том числе Т-, В-клетками (Grivennikov et al., 2005). Полный нокаут по гену *Tnf* приводит к общему ослаблению иммунного ответа у мышей, а также к патологиям развития вторичных иммунных органов, таких как формирование герминальных центров, (germinal centers, GCs) (Pasparakis et al., 1996). Используя технологию кондиционного нокаута, была определена роль TNF, производимого Т- и В-клетками, в развитии микроархитектуры PP. Так, были получены данные о том, что за организацию PP отвечает TNF, продуцируемый В-клетками, поскольку мыши с делецией *Tnf* в В-клетках характеризуются отсутствием организованных В-клеточных фолликулов (Gommerman et al., 2014, Kuprash et al., 2005, Tumanov et al., 2010).

Т-клеточно-зависимое формирование IgA⁺ плазматических клеток требует формирования GC и участия Т-фолликулярных хелперных (T follicular helper, Tfh) клеток. Глобальный принцип данного механизма схож с индукцией любого иммунного ответа, вовлекающего специфический антительный ответ. Он включает в себя стадии детекции и транспорта, например, бактериального продукта антиген-представляющими клетками, представление его в Т-зоне LN или PP Т-клеткам через МНС-II-пептид-TCR-взаимодействие, активацию Т-клеток по пути Tfh, активацию и отбор В-клеток, и, наконец, дифференцировку В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти. То, каким будет класс синтезируемых антител, определяется цитокиновым спектром. Так, для IgA критичным цитокином является TGF-β1 (Sonoda et al., 1989).

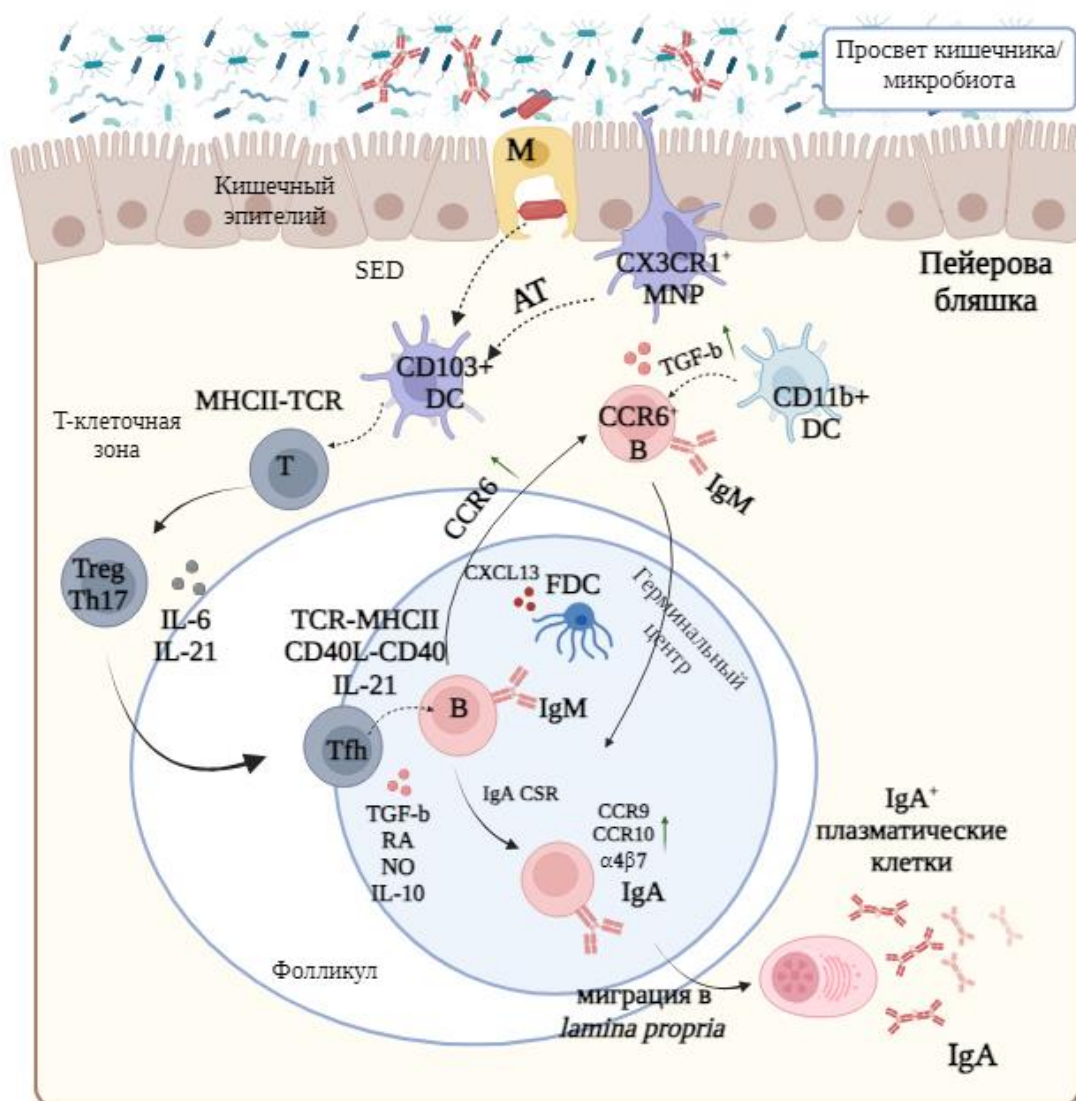


Рисунок 3. Упрощенная схема событий, происходящих при Т-зависимой индукции IgA в GALT, например в пейеровых бляшках. М – М-клетка, АТ – антиген, FDC – фолликулярная ДК, В – В-клетка, Т – Т-клетка, SED – субэпителиальный купол, MNP – мононуклеарный фагоцит. Пунктирными линиями отражены взаимодействия между клетками, сплошными линиями показаны перемещения клеток.

Суммарно, индукция IgA-ответа по Т-зависимому пути начинается с транспорта бактериальных продуктов через М-клетки. Далее дендритные клетки (dendritic cells, DCs) субэпителиальной зоны процессируют их и представляют в составе МНС-II (Рис. 3). Помимо презентации антигена Th-клеткам, DC получают сигналы от ИЕСs, такие как тимусный стромальный лимфопоэтин (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) и RA, что предотвращает в дальнейшем развитие ответа по Th1-пути (Chorny et al., 2010). DCs представляют антиген Т-клетке через МНС-II-пептид-TCR-комплекс, а также дают Т клетке костимуляторные сигналы через CD28-CD80/86-взаимодействие. Далее, чтобы направить дифференцировку CD4⁺ Т-клеток по Tfh-пути развития, что в дальнейшем важно для индукции плазматических клеток, DCs создают цитокиновый спектр из IL-6 и IL-21, необходимых для формирования Tfh-клеток (Jogdand et al., 2016). Параллельно наивные В-клетки улавливают свободные антигены через В-клеточный рецептор (B cell receptor, BCR), интернализуют его и представляют Tfh-клеткам через МНС-II-пептид-TCR-взаимодействие. После этого В-клетки приобретают фенотип CCR6⁺, что опосредует их CCL20-зависимую миграцию в субэпителиальный дом (SED) (Reboldi et al., 2016). Далее В-клетки образуют контакт с CD11b⁺ DCs и получают от них сигнал на активацию выработки TGFb, который является первостепенным в переключении изотипа на IgA (Cazac et al., 2000). Далее В-клетки мигрируют обратно в фолликул и участвуют в реакции герминального центра.

В норме дифференцировка Т-клеток по Th1-пути в кишечнике строго регулируется и понижена для формирования толерогенного, невоспалительного микроокружения, тогда как для поддержания воспаления при колите Th1-клетки играют важную роль (Neurath et al., 2002). Было показано, что при остром воспалении толстого кишечника происходит накопление Tfh-клеток и DCs в изолированных лимфоидных фолликулах и криптотатчах, которые формируют Tfh-DC кластеры. Это зависит от LTβ-LTβR-взаимодействия. При помощи *Vclb*^{Cre-ERT2/Rosa-tdTomato} мышей было показано, что Tfh-клетки далее мигрируют в *lamina propria* толстого кишечника, теряют экспрессию *Vclb* и дифференцируются в патогенные Th1-клетки, которые промотируют воспаление (Bai et al., 2024).

Контроль IgA-ответа на патогены происходит при образовании высокоспецифичных IgA-антител против антигенов, где Tfh-клетки и активированные В-клетки мигрируют вглубь фолликула в GC за счет градиента хемокина CXCL13, создаваемого фолликулярными дендритными клетками (follicular dendritic cell, FDC). Так формируется светлая зона GC. В темной зоне GC В-клетки активно пролиферируют и проходят процесс соматического гипермутационеза (somatic hypermutations, SHM) при помощи дезаминазы AID для повышения аффинности рецептора, и потом проверяют свою аффинность при взаимодействии с FDC (Pabst

2012). Выбранные IgA⁺ В-клетки в результате взаимодействия с FDC и получившие сигнал на выживание от Tfh-клеток, на стадии плазмабласта покидают PP, приобретая «кишечный импринтинг» - повышают экспрессию интегрина $\alpha_4\beta_7$ и хемокиновых рецепторов CCR9 и CCR10, которые обуславливают миграцию в кишечник через общую циркуляцию в ответ на хемокин CCL25, производимый IECs (Рис. 3) (Gutzeit et al., 2014).

В случае Т-независимой индукции IgA В-клетки получают сигналы на активацию через BCR, улавливая свободные антигены, или через TLRs, которые распознают некоторые патогенные паттерны (см. выше). Сигналы на переключение изотипа на IgA также формируются фоном TGF- β 1, а также молекулами суперсемейства TNF – APRIL и BAFF (Рис. 4). При Т-независимой продукции IgA в захвате антигенов из просвета кишечника участвуют CX3CR1⁺ и CD103⁺ DCs, осуществляя этот процесс путем трансэпителиального переноса отростками DCs или путем транзитного переноса через «канал», формирующийся бокаловидными клетками, соответственно. IECs также участвуют в создании локального микроокружения для IgA, включая продукцию RA и TGF- β 1 в изолированных лимфоидных фолликулах или в *lamina propria*. Так, в присутствии TGF- β 1, секретируемого стромальными клетками, цитокины BAFF и APRIL индуцируют в В-клетках процесс переключения класса IgM на IgA. TLR5⁺ дендритные клетки экспрессируют IL-6 и RA (Uematsu et al., 2008), которые стимулируют В-клетки к переключению класса антител на IgA. BAFF и APRIL вместе с IL-6 способствуют выживанию IgA-плазмабластов и плазматических клеток (Pabst 2012).

Лимфотоксин (lymphotoxin, LT) принадлежит к членам суперсемейства TNF и может быть представлен в двух формах – растворимый LT α 3 в виде гомотримера и мембранно-связанный LT α 1 β 2. Ранее была показана роль LT α 1 β 2 в развитии вторичных лимфоидных органов, таких как PP, ILF, все лимфоузлы (lymph nodes, LN) за исключением брызжеечных, что в дальнейшем обуславливало пониженную продукцию IgA в кишечнике (Kang et al., 2002). С использованием кондиционного нокаута, были созданы мыши, дефицитные по гену *Ltb* в ROR γ t⁺ клетках, и было показано, что именно LT α 1 β 2, производимый ROR γ t⁺ ILC3, отвечает, как за развитие PP, ILF и LN, так и за Т-независимую продукцию IgA (Kruglov et al., 2013). Кроме этого, была выяснена роль LT α 3, производимого ROR γ t⁺ ILC3 как в Т-зависимой продукции IgA, так и в контроле состава микробиоты.

PP покрыты эпителием, содержащим М-клетки, которые транспортируют антигены из просвета кишечника в субэпителиальную зону PP (Neutra et al., 2001), где локализуются DCs.

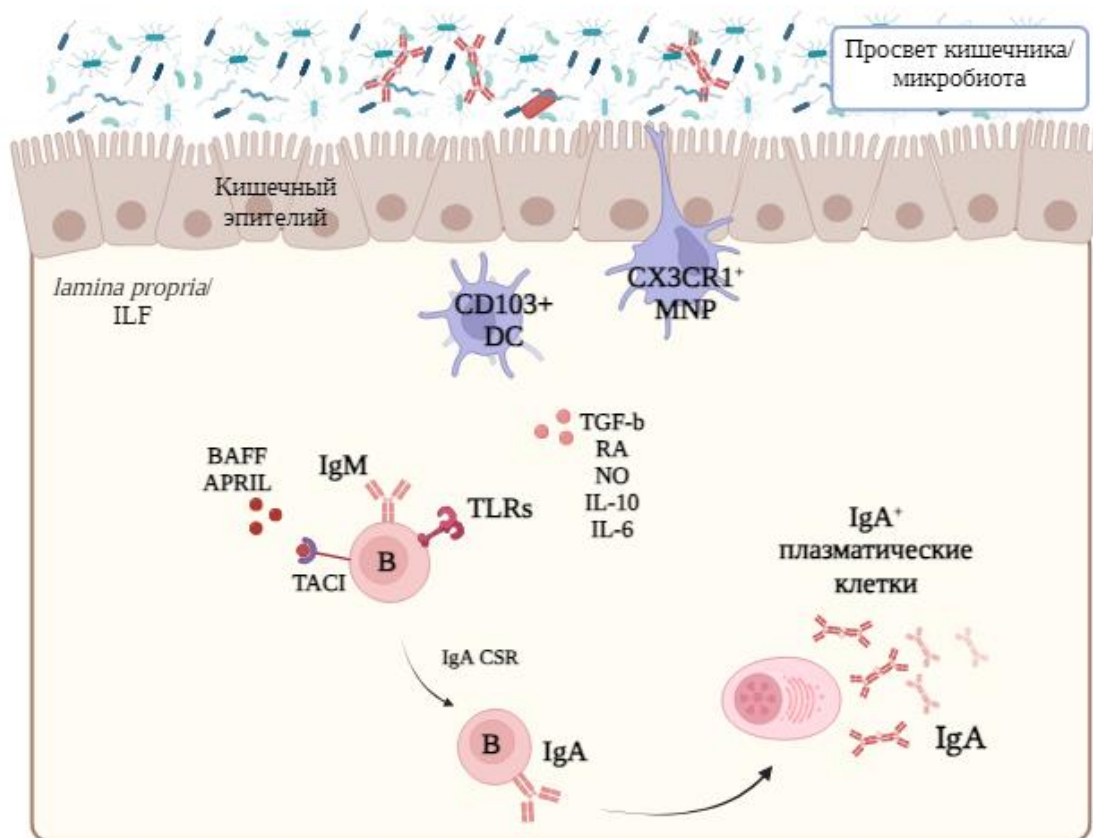


Рисунок 4. Упрощенная схема событий, происходящих при Т-независимой индукции IgA в *lamina propria* или ILF.

В недавнем исследовании была показана роль стромальных клеток субэпителиальной зоны в дифференцировке и поддержании М-клеток. Стромальные клетки PP экспрессируют на поверхности молекулу суперсемейства TNF – лиганд для рецептора, активирующего NFκB (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL) (Nagashima et al., 2017). Так, *Tnfsf11*^{-/-} мыши, а также мыши с кондиционным нокаутом по *Tnfsf11* в мезенхимальных клетках характеризуются дефектами в развитии М-клеток. Более того, была обнаружена пониженная экспрессия хемокина CCL20, экспрессируемого клетками фолликул-ассоциированного эпителия (follicle associated epithelium, FAE), важного для взаимодействия дендритных и В-клеток в субэпителиальной зоне (Reboldi, et al., 2016), вследствие чего наблюдается сниженная продукция SIgA, ровно как и количество IgA⁺ плазматических клеток (Nagashima, et al., 2017). Также были отмечены особенности и уменьшенное разнообразие микробиоты у мышей с кондиционным нокаутом по *Tnfsf11* в мезенхимальных клетках, что указывает на роль RANKL-RANK-опосредованного взаимодействия между стромальными клетками и эпителием PP в контроле микробиоты путем регуляции продукции IgA.

Kimura с коллегами в своем недавнем исследовании показали важность транскрипционного фактора Sox8 в созревании М-клеток, следовательно в антигенном

сэмплинге и в индукции IgA (Kimura et al., 2019). Зрелый фенотип М клеток выражается в высокой экспрессии ими гликопротеина GP-2. Sox8-дефектные мыши характеризовались пониженной экспрессией GP-2, что было подтверждено транскриптомным анализом. Более того, у Sox8^{-/-} мышей в возрасте 4 недель, но не во взрослых мышах, наблюдалось сниженное количество В-клеток в GC, и, как следствие, сниженная продукция IgA и IgA-покрытие бактерий. Последнее может свидетельствовать о возможном вкладе Sox8-опосредованного IgA в контроль над микробиотой. Однако авторы этого исследования не приводят таких данных. Относительно роли GP-2 в контроле микробиоты было опубликовано исследование о том, что основным источником GP-2 в просвете кишечника являются ацинарные клетки поджелудочной железы, и это зависит от TNF, поскольку при ткане-специфическом удалении GP-2 мыши в большей степени развивают воспаление, индуцированное DSS. Кроме этого, пациенты с болезнью Крона характеризуются повышенной концентрацией GP-2 в просвете кишечника (Kurashima et al., 2021).

В индукции IgA⁺ плазматических клеток принимают участие различные субпопуляции DCs. Так, макрофаг-подобные CX3CR1⁺ DCs формируют дендритные отростки в ответ на стимуляцию хемокином CX3CL1, вырабатываемым эпителиальными клетками. Далее неподвижные CX3CR1⁺ DCs передают антиген подвижным CD103⁺ DCs (Mazzini et al., 2014, Niess et al., 2005). Активированные CD103⁺ DCs перемещаются к Т-клеточной зоне, где устанавливают связь с Т-клетками и детерминируют их развитие в Tfh-клетки (Fagarasan, et al., 2010). Последние взаимодействуют с антиген-специфическими В-клетками на границе фолликула с межфолликулярной зоной. Недавно был показан еще один механизм Т-независимой индукции IgA. CX3CR1⁺ макрофаги были способны напрямую индуцировать IgA в кишечнике через продукцию BAFF, APRIL, TNF (Kim et al., 2018b). Интересно, что CX3CR1⁺ макрофаги способствовали IgA-ответу независимо от микробиоты, в отличие от CX3CR1⁻ DCs, где ко-культивирование В-клеток и CX3CR1⁻ DCs из мышей с деплецированной микробиотой ослабляло продукцию IgA. В присутствии нормальной микробиоты антигенпрезентирующие клетки кишечника, экспрессирующие хемокиновый рецептор CX3CR1, также снижают экспансию кишечных микробиота-специфических Th1-клеток и способствуют образованию регуляторных Т-клеток, специфичных к пищевым антигенам и микробиоте. При этом нарушение состава микробиоты антибиотиками приводило к воспалительному Th1-клеточному ответу с усилением патологии после инфекции с *Salmonella* (Kim et al., 2018a).

В работе (Reboldi, et al., 2016) Reboldi и соавторы показали данные о том, что В-клетки, экспрессируя хемокиновый рецептор CCR6 для лиганда CCL20, вырабатываемого клетками кишечного эпителия, способны мигрировать в субэпителиальную зону, где начинается процесс

дифференцировки В-клеток в плазмобласты и индуцируется переключение изотипа с IgM на IgA. Это происходит благодаря повышенной концентрации локального TGF- β 1. После инициации TGF- β 1-опосредуемого переключения изотипа В-клетка мигрирует в фолликул PP, где может продолжить дифференцировку по Т-зависимому или независимому пути (Рис. 3).

Продуцируемые в *lamina propria* IgA-антитела в форме димера транспортируются в просвет кишечника. Для формирования димерных IgA требуется участие короткого гликопротеина (15 кДа) – J-цепь (Brandtzaeg et al., 1984). Она необходима для связывания с секреторным компонентом pIgR. Было показано, что мыши, дефицитные по гену J-цепи, характеризуются сниженным содержанием IgA в просвете кишечника в ответ на иммунизацию холерным токсином (Lyske et al., 1999), при этом индукция IgA⁺ клеток происходит так же, как в мышях дикого типа. Транспорт IgA происходит путем направленного транцитоза через рецептор pIgR, где секреторный компонент отщепляется и составляет часть SIgA. pIgR-зависимый транспорт является наиважнейшим для транспорта IgA наружу, а следовательно, для реализации его функций, хотя описывается возможность pIgR-независимого транспорта (Bunker, et al., 2018). Известно, что мыши, нокаутные по гену *Pigr*, характеризуются значительно уменьшенной продукцией SIgA (Johansen et al., 1999). pIgR является критичным в гомеостазе IgA-системы кишечника, поэтому для организма важно регулировать его экспрессию. Th17-клетки и IL-17A положительно влияют на экспрессию pIgR и на IgA-продукцию, что было показано с использованием *Il17ra*^{-/-} и *Tcrbd*^{-/-} мышей. Кроме того, TNF тоже участвует в регуляции экспрессии pIgR, как и лиганды для TLR3, TLR4 (Bruno et al., 2011, Cao et al., 2012)

Ранее считалось, что Th-клетки при активации развиваются однонаправленно по той или иной программе. Однако было показано, что Th17 могут конвертироваться в Tfh и способствовать IgA-ответу (Hirota et al., 2013). Гомеостаз в кишечнике поддерживается также балансом между Treg- и Th17-клетками. Недавно было установлено как популяция Th17 T-клеток могут регулировать развитие IgA-клеток. А именно, ROR γ ⁺ Treg-клетки производят супрессорный IL-10, регулятором которого является транскрипционный фактор c-Maf. Кроме того, авторы исследования показали, что c-Maf важен для контроля продукции цитокинов Th17-клетками и для контроля IgA. c-Maf ^{Δ Treg} мыши характеризовались сниженным IL-10, но повышенными IL-22 и IL-17A, производимыми Th17 клетками, а также повышенным IgA. Также на фоне таких изменений в механизмах контроля микробиоты наблюдался ее дисбаланс – снижение *Verrucocomprobiaceae* и *Erysipelotrichaceae*, в то время как семейства *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae* и *Porphyromonadaceae* были в избытке по сравнению с контрольными мышами. Это и повышенные уровни протективных цитокинов IL-

22 и IL-17 защищали c-Maf^{ΔTreg} мышей от кишечного воспаления, вызванного DSS (Neumann et al., 2019).

В недавнем исследовании была показана роль MyD88 в Tfh-клетках кишечника, которые взаимодействуют с В-клетками в GCs в В-клеточных фолликулах, и тем самым обеспечивают образование высокоспецифичных и высокоаффинных В-клеток. Так, у мышей, дефицитных по гену *MyD88* в Т-клетках, значительно уменьшено количество Tfh- и В-клеток GCs в PPs и, как следствие, количество IgA⁺ плазматических клеток в *lamina propria* (Kubinak et al., 2015). Интересно также, что при отсутствии MyD88-сигнального пути в Т-клетках происходит изменение покрытия микробиоты IgA-антителами наряду с изменением состава микробиоты, причем изменения в покрытии бактерий наблюдаются в зоне, ближайшей к эпителиальным клеткам (Kubinak, et al., 2015). Однако то, что именно является триггером в запуске MyD88-каскада, остается не выясненным, поскольку данная молекула является адаптерной не только от различных TLRs, но и от рецепторов цитокинов семейства IL-1.

Функции IgA

Так как часть кишечных бактерий покрыта IgA-антителами, производимыми плазматическими клетками кишечника (van der Waaij et al., 1996), то для анализа микробиоты, взаимодействующей с IgA, применяется секвенирование бактерий на основе разделения IgA-покрытых и непокрытых фракций микробиоты (IgA-Seq) (Palm et al., 2014, Shapiro et al., 2021). Так было показано, что при колонизации IgA-покрытые бактерии заселяют преимущественно тонкий кишечник (Bunker, et al., 2015). Среди IgA-покрытых бактерий часто встречаются представители филума *Proteobacteria* (Wilmore, et al., 2018), которые населяют тонкий кишечник. При этом *Proteobacteria* – доминирующий тип бактерий, присутствующий у новорожденных мышей, – подавляется в нормальной микробиоте взрослых. Переход от неонатальной к зрелой микробиоте, а именно подавление роста представителей *Proteobacteria*, отчасти регулируется индукцией специфического IgA-ответа на представителей данного филума (Miguri et al., 2014). Недавнее исследование нашей лаборатории, в котором изучали специфичность IgA-антител к микробиоте у мышей, показало, что IgA-антитела в основном реагируют с Грамположительными бактериями (Sharanova et al., 2017).

Известно, что *germ-free* мыши характеризуются низким уровнем IgA, который может быть восполнен при колонизации бактериями (Cerutti et al., 2008). Некоторые представители микробиоты индуцируют Т-зависимый ответ. Среди таких – сегментированные филаментные бактерии (segmented filamentous bacteria, SFB) (Goto et al., 2014, Lecuyer et al., 2014), взаимодействующие с эпителием. Было выяснено, что SFB вызывают индукцию IgA⁺ клеток, а также дифференцировку Th17-клеток. Более того, технология IgA-Seq определила их как

бактерии, высоко покрытые IgA-антителами (Palm, et al., 2014), что говорит о том, что эти бактерии нуждаются в контроле их взаимодействия с эпителием. Также среди IgA-покрытых бактерий, вызывающих Т-зависимый ответ, были обнаружены *Mucispirillum spp*, *Prevotella spp*, *Helicobacter flexispira* и *Anaeroplasma* (Beller et al., 2020, Palm, et al., 2014). Несмотря на то, что некоторые компоненты микробиоты покрыты IgA-антителами, до сих пор остается до конца невыясненным значение данного механизма контроля микробиоты. Дефицит по IgA является одним из самых часто встречаемых иммунодефицитов в человеческой популяции (1:400-1:3000) (Bunker, et al., 2018, Cunningham-Rundles 2001). Данная патология в основном не проявляется фенотипически. Возможно, это связано с компенсаторным механизмом, который вовлекает продукцию секреторных IgM (Magri et al., 2017). Тем не менее, механизм компенсации и его эффективность остаются невыясненными в полной мере, поскольку люди с дефицитом IgA характеризуются умеренным дисбиозом и больше склонны к развитию некоторых заболеваний (Cunningham-Rundles 2001, Fadlallah et al., 2018). Кроме этого, в недавней работе был сравнен состав микробиоты здоровых людей и пациентов с селективным дефицитом по IgA (Fadlallah, et al., 2018). А именно, авторы работы показали, что в целом разнообразие не меняется при IgA-дефиците, но соотношение между некоторыми семействами внутри преобладающих филумов микробиоты уменьшается или увеличивается в отсутствие связывания бактерий с IgA. Более того, не всегда эти бактерии также хорошо связываются с компенсаторными IgM-антителами. Этот факт и факт того, что IgA-антитела продуцируются плазматическими клетками кишечника в количестве до 30-60 mg/kg ежедневно (Breedveld et al., 2019), дают право предполагать что функции IgA в гомеостазе организма незаменимы.

Возможная роль IgA-антител в гомеостазе состоит в нейтрализации антигенов или целых бактерий. Тем самым снижается вероятность контакта бактерий с эпителием кишечника (Bunker, et al., 2018). Также есть предположение о функции IgA в изменении подвижности бактерий. Было показано, что IgA может вызывать своего рода агглютинацию бактерий, а также лимитировать расхождение дочерних клеток при делении, что называется “enchained growth” (Moog et al., 2017). Данные механизмы могут способствовать ускоренному удалению патогенных или условно патогенных форм.

До сих пор остается не выясненным вклад в ассоциацию IgA-покрытых бактерий и развитие IBD. Несомненно, что состав микробиоты может определенным образом влиять на развитие IBD (Nakanishi et al., 2015, Palm, et al., 2014). В одной из работ с применением технологии IgA-Seq авторы также показали, что высокий уровень IgA-покрытых бактерий коррелирует с развитием IBD, поскольку трансфер IgA-покрытой микрофлоры пациентов с IBD делал мышей более чувствительными к развитию колита (Palm, et al., 2014). Также известно,

что высокое содержание в кишечнике бактерий *Erysipelotrichaceae sp.* и *Faecalibacterium prausnitzii* ровно как и высокое покрытие *Oscillospira* IgA-антителами ассоциированы с менее тяжелым течением IBD и отсутствием необходимости резекции кишечника (Shapiro, et al., 2021).

Гетерогенность IgA-продуцирующих клеток

Кишечные плазматические клетки характеризуются способностью продуцировать большое количество IgA-антител, 30-60 мг/кг в день (Conley et al., 1987, Fagarasan et al., 2003), которые транспортируются через слой эпителиальных клеток и способствуют регуляции состава микробиоты. Более того, они представляют собой гетерогенную популяцию. Например, научной группой Gommerman было обнаружено, что IgA⁺ плазматические клетки производят, помимо антител, еще iNOS и TNF, что важно как для образования IgA-продуцирующих клеток, так и для антимикробной защиты (Fritz et al., 2011). Помимо этого, IgA⁺ плазматические клетки коэкспрессируют маркеры миелоидного ряда, такие как CD11b, Ly6C, Ly6G (Fritz, et al., 2011, Kunisawa et al., 2013, Wrammert et al., 2002). При этом CD11b⁺IgA⁺ плазматические клетки продуцируют больше IgA, чем CD11b⁻IgA⁺ плазматические клетки, активно пролиферируют, требуют микробной стимуляции и IL-10 для своего поддержания (Fu et al., 2021). Большая продукция IgA может свидетельствовать о более дифференцированном состоянии плазматических клеток. Дефицит *Itgam* в В-клетках приводил к снижению продукции IgA, в результате чего они утрачивали способность к лечению колита. Механистически, CD11b⁺ В-клетки экспрессируют большое количество TGF-β1 и TGF-β рецептора II, а также активируют фосфорилированный Smad2/3-сигнальный путь, способствуя, таким образом, переключению класса на IgA (Fu, et al., 2021). Кроме этого, CD11b⁺IgA⁺ В-клетки накапливаются в кишечнике у пациентов с язвенным колитом (Fu, et al., 2021). CD11b⁺IgA⁺ плазмабласты обладают высокой пролиферативной активностью в *lamina propria* и могут быть индуцированы в отсутствие PP и ILF и при фармакологическом ингибировании mLN у мышей LTβ^{fl/fl} × RORγt-Cre, что указывает на их возможную индукцию в *lamina propria* (Winsauer et al., 2015). В недавней работе Ceglia и соавторы показали, что IgA⁺ плазматические клетки, экспрессируя GRP183, улавливают метаболит холестерина, тем самым регулируя продукцию IgA. При удалении данного рецептора на плазматических клетках апрегулируется CD98, который отвечает за транспорт нейтральных аминокислот для большего синтеза IgA антител (Ceglia et al., 2023). Более того, CD98⁺IgA⁺ клетки коэкспрессируют интегрин CD103, который обеспечивает контакт с эпителием (Guzman et al., 2021). Таким образом, IgA⁺CD98⁺CD103⁺ плазматические клетки представляют собой по всей видимости популяцию зрелых плазматических клеток. Кроме этого, зрелые IgA⁺ плазматические клетки экспрессируют Ly6C и Ly6A (Fritz, et al., 2011, Liu et

al., 2022c, Wrammert, et al., 2002), что маркирует терминально дифференцированные клетки (неопубликованные данные лаборатории). Кроме этого, есть предположение о том, что IgA антитела из плазматических клеток, экспрессирующих LybC и LybA, распознают разные бактерии, что важно для формирования взрослой микробиоты (неопубликованные данные лаборатории).

Диета и ее значение в развитии заболеваний

Применение диеты западного типа ассоциировано с повышенным потреблением жиров и простых сахаров. Такие диеты могут быть причинами развития различных заболеваний, таких как неалкогольные жировые заболевания печени (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), атеросклероз, сахарный диабет второго типа и др. Было также показано, что высоко-глюкозная диета (high glucose diet, HGD) приводит к инсулинорезистентности и нарушению толерантности к глюкозе (Do et al., 2018), что сопровождается развитием заболеваний, таких как диабет второго типа, жировая болезнь печени, метаболический синдром. Инсулин является ключевым пептидным гормоном и опосредует системный метаболизм глюкозы в различных тканях. Секреция инсулина β -клетками поджелудочной железы происходит в ответ на поступающую через глюкозный транспортер 2 (GLUT2) глюкозу (Sun et al., 2023). В нормальных физиологических условиях повышение уровня глюкозы в плазме крови приводит к увеличению секреции инсулина и повышению уровня циркулирующего инсулина, стимулируя тем самым транспорт глюкозы в периферические ткани и подавляя глюконеогенез (Petersen et al., 2018). Состояние, при котором нарушено стимулированное инсулином поглощение глюкозы в инсулин-чувствительные клетки-мишени, такие как клетки скелетных мышц, жировой ткани, печени и поджелудочной железы, в дополнение к нарушению подавления инсулином печеночной продукции глюкозы, называется инсулинорезистентностью (Dunseath et al., 2022, Nonka et al., 2018, Meyer et al., 2006).

При этом диета, богатая простыми сахарами, приводит также к изменениям в составе микробиоты (Do, et al., 2018, Satokari 2020). Однако остается до конца невыясненным, какой механизм стоит за этим. Более того, долгосрочное применение HGD приводит к формированию так называемого „low-grade” воспаления печени, сопровождающегося повышенным уровнем провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF, IL-6), а также факторов липидного обмена. Также был показан вклад повышенного потребления глюкозы и, как следствие, гипергликемии в увеличение проницаемости кишечника (Do, et al., 2018, Samuel et al., 2012, Thaiss et al., 2018), что приводило к повышенному риску инфекций. Кроме этого, в одном исследовании было показано накопление ROS при HGD и корреляция с повышенным уровнем сахара в крови (Giacco et al., 2010). Интересно, что одним из маркеров диабета второго типа является

накопление в крови окисленных липопротеинов низкой плотности (oxidized low density lipoprotein, OxLDL) (Ganjifrockwala et al., 2016), которые, возможно, могут образовываться на фоне повышенного уровня ROS. Несмотря на большое количество исследований на мышах и людях, проведенных в области развития метаболических заболеваний, остаются до конца непонятными вклад иммунной системы в это, а также роль микробиоты.

Были проведены также клинические исследования о полиморфизмах гена *Tlr4*, связанные с пониженным риском возникновения диабета второго типа, или наоборот, ассоциированные с осложнениями (Buraczynska et al., 2009, Manolakis et al., 2011). Кроме этого, у пациентов с диабетом второго типа наблюдаются повышенные концентрации LPS в виду нарушенной целостности эпителиального барьера (Thaiss, et al., 2018), где далее LPS может способствовать созданию „low-grade“ воспаления (Jayashree et al., 2014). Высокожировая диета в мышцах индуцирует воспаление, повышая уровень LPS в просвете кишечника, а также в плазме крови за счет изменения состава микробиоты кишечника и увеличения его кишечной проницаемости через индукцию TLR4, тем самым способствуя развитию ожирения (Kim et al., 2012). Это свидетельствует о важной роли TLR4 в развитии нетолерантности к глюкозе и инсулинорезистентности. Сигнальные пути, индуцируемые от рецепторов TLRs и активирующие транскрипционный фактор NFκB, отвечают за активацию транскрипции генов провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF, IL-6, IL-8). В случае метаболических нарушений этот цитокиновый спектр участвует в создании хронического воспаления. Как следствие создания провоспалительного микроокружения, вышеперечисленные цитокины индуцируют сигнальные каскады, сопровождающиеся активацией киназ IKKβ и JNK1, которые являются нормальной реакцией на стимуляцию цитокинами TNF, IL-1β. Как следствие, IKKβ и JNK1 интерферируют с сигнальным путем от инсулинового рецептора через ингибирование субстрата рецептора инсулина (insulin receptor substrate, IRS) – ключевого компонента сигнального пути от инсулина (Solinas et al., 2017). Далее это приводит к нарушению чувствительности клеток к инсулину (Stephens et al., 1997).

Метаболические заболевания, такие как ожирение и сопутствующий сахарный диабет второго типа, ассоциированы с повышенным уровнем сахара в крови и резистентностью к инсулину. А именно, в крови у пациентов накапливаются свободные жирные кислоты (free fatty acids, FFA), которые негативно влияют на эффекты инсулина в печени, что выражается в постоянном притоке глюкозы из печени в кровь и в то же время, нарушен захват глюкозы мышцами (Shi et al., 2006). Суммарно это приводит к инсулинорезистентности и повышенному уровню глюкозы в крови. FFA могут являться лигандом для TLR4, активируя данный сигнальный каскад (Shi, et al., 2006).

Высокожировая диета изменяет пропорции IgA⁺ плазматических клеток кишечника. У мышей с ожирением меньше IgA⁺ В-клеток, секреторного IgA и IgA-промотирующих иммунных медиаторов. Это указывает на то, что IgA является критическим иммунным регулятором гомеостаза глюкозы. У мышей с дефицитом IgA, получавших высококалорийную пищу, был нарушен метаболизм глюкозы в большей степени, чем у мышей дикого типа, и этот фенотип можно воспроизвести с помощью адоптивного переноса В-клеток (Luck et al., 2019). При высокожировой диете наблюдается дисбаланс микробиоты, и интересно, что несмотря на снижение количества IgA⁺ плазматических клеток в кишечнике, покрытие бактерий IgA-антителами возрастало при диете с высоким содержанием жира. По всей видимости, данный механизм может отражать компенсацию контроля нарушенного состава микробиоты, учитывая, что IgA играет протективную роль в диете с высоким содержанием жира (Luck, et al., 2019).

Ранее была показана взаимосвязь между наличием сахарного диабета второго типа и уровнем IgA в сыворотке (Gonzalez-Quintela et al., 2008, Rodriguez-Segade et al., 1996). Более того, известно, что пациенты с сахарным диабетом второго типа характеризуются нарушенным метаболизмом, окислительным стрессом, и как следствие, накоплением в крови Ox-LDL (Holvoet et al., 2008). В одной из работ было показано, что у людей, страдающих сахарным диабетом II типа, отмечается повышенный IgA в сыворотке к Ox-LDL (Vavuli et al., 2016). Однако механизм индукции такого IgA не был предложен. Как уже было упомянуто ранее, IgA индуцируется компонентами микробиоты. Поэтому можно предположить, что микробиота участвует в регуляции развития диабета второго типа через IgA-антитела. Это стало предшествующим вопросом в нашем исследовании.

Материалы и методы

Таблица 1. Составы рабочих растворов

1x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBS/BSA	1xPBS, pH 7,4; 0,5% (w/v) BSA
PBS-T	1x PBS, pH 7,4; 0,5% (v/v) Tween-20
АСК	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM EDTA, pH 7,2
Буфер Лэмбли для нанесения на гель, 2x (нативный гель)	1 M Tris-HCl pH 6,8, 25% глицерол, 0,1% (w/v) бромфеноловый синий
Буфер Лэмбли для нанесения на гель, 4x (SDS-PAGE)	1 M Tris-HCl pH 6,8, 25% глицерол, 8% SDS, 0,1% (w/v) бромфеноловый синий
30% акриламид-бис-акриламид	29,22 г и 0,78 г акриламида и бис-акриламида соответственно на 100 мл раствора
1x TGB (буфер для PAGE)	25 mM Tris, 192 mM глицин, pH 8,3
1x TGB (буфер для SDS-PAGE)	25 mM Tris, 192 mM глицин, 0,1% SDS, pH 8,3
Концентрирующий буфер	1 M Tris-HCl pH 6,8
Буфер для разделения	1 M Tris-HCl pH 8,8
Культуральная среда для эукариотических клеток	RPMI-1640 с глутамином (Gibco), 10% (v/v) FBS, 1% пенициллин/стрептомицин, 0,05 M ME DMEM с глутамином (Gibco), 10% FBS, 1% пенициллин/стрептомицин, 0,05 M ME
1x TBS	20 mM Tris, 150 mM NaCl
TBS-T	1x TBS, 0,1% (v/v) Tween-20
Towbin трансфер буфер	25 mM Tris, 192 mM глицин, 20% (v/v) этанол, 0,04% (w/v) SDS
PYG среда для бактерий	dsmz.de
2x HBS буфер	280 mM NaCl; 10 mM KCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 12 mM глюкоза; 50 mM HEPES, pH 7.05
Буфер для Ca ²⁺ трансфекции	1x HBS; 125 mM CaCl ₂ ; 10 мкг DNA
Лизирующий буфер для выделения ДНК, содержащий SDS	10 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8; 0,5% SDS; 400 мкг Протеиназы К
RIPA буфер	150mM NaCl, 50mM Tris-Cl, 1.0% NP-40 , 0.5% деоксихолат натрия , 0.1% SDS, pH 7,5

Таблица 2. Использованные реагенты и ресурсы

Реагент/Ресурс	Производитель	Каталожный номер
Антитела		
Анти-человеческое IgA ₁ -антитело Alexa Fluor 647 (clone: B3506B4)	Southern Biotech	Кат. № 9130-31
Анти-человеческое IgA ₂ -антитело Alexa Fluor 488 (clone: A9604D2)	Southern Biotech	Кат. №. 9140-30

Кроличье SARS-CoV-2 Spike-нейтрализующее антитело (clone: HA14JL2302)	Sino Biological Inc.	Кат. № 40592-R001
Нейтрализующие антитела из пациентов с COVID-19	Kreye et al., 2020	PMID: 33058755
Анти-кроличье IgG-антитело Alexa647	Jackson ImmunoResearch	Кат. № 111-606-144
PE/Dazzle™ 594 анти-человеческое IgG-антитело	BioLegend	Кат. № 366920
Анти-человеческое Ig- (H+L chain) антитело	Southern Biotech	Кат. № 2010-01
Анти-человеческое IgA Fab-антитело	Southern Biotech	Кат. № 2050-01
Биотинилированное анти-человеческое IgA-антитело	Southern Biotech	Кат. № 2050-08
Анти-человеческое IgG-AP-антитело	ICN/Cappel	Кат. № 59289
Анти-человеческое IgA-AP-антитело	Sigma-Aldrich	Кат. № A2043
Анти-SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1-антитело (clone: CR3022)	Abcam	Кат. № ab273073
Анти-человеческое IgA-FITC-антитело	Sothern Biotech	Кат. № 2052-02
Анти-кроличье Alexa 647-антитело	Jackson ImmunoResearch	Кат. № 111-606-144
Анти-мышинное IgA-антитело DyLight® 650	Bethyl Laboratories	Кат. № A90-103D5
Кроличье нейтрализующее анти-RBD антитело	Sino Biological Inc.	Кат. № 40592-R001
Анти-кроличье IgG-HRP-антитело	Cell signaling	Кат. № 7074S
Анти-человеческое IgG-HRP-антитело	Southern Biotech	Кат. № 2040-05
Анти-мышинное CD45-антитело FITC (клон: 30F11)	eBioscience	Кат. № 14-0451-82
Анти-мышинное B220-антитело Pacific Blue (клон: RA3.6B2)	DRFZ	N/A
Анти-мышинное CD138-антитело PE (клон: 281-2)	BD Bioscience	Кат. № 561070
Анти-мышинное карра-цепь-антитело FITC (клон: 187.1)	DRFZ	N/A
Анти мышинное GL-7 антитело биотинилированное (клон: GL-7)	DRFZ	N/A
Антитело против инсулина, меченное Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Кат. № 701265
Бактериальные и вирусные штаммы		
Rosetta DE3	Sigma-Aldrich	Кат. № 70954-3
Химически компетентные <i>E.coli</i> TOP10	PMID: 2265755	N/A
<i>Streptococcus salivarius</i> K12	Novozin immun, Bluestone pharma	Кат. № 18170211
<i>Streptococcus salivarius</i>	This paper	N/A
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	This paper	N/A
<i>Bifidobacterium longum</i>	This paper	N/A
<i>Akkermansia muciniphila</i> BAA-835	DSMZ	Кат. № DSM 22959
Цельновирсионная инактивированная SARS-CoV-2 вакцина	Kozlovskaya et. al., 2021	PMID: 34427172

Химические реагенты, пептиды и рекомбинантные белки		
DNase I	Sigma Aldrich	Кат. № 10104159001
КАРА HiFi HotStart готовый набор	Roche	Кат. № 07958935001
Тақ-полимераза	Rapidozym GmbH	Кат. № GEN-003-1000
dNTP микс	Thermo Fisher Scientific	Кат. № R0192
AmPure XP магнитные частицы	Beckman Coulter Life Science	Кат. № A63881
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific	Кат. № 62249
DAPI	Thermo Fisher Scientific	Кат. № D1306
Sphero™ частицы	BD Biosciences	Кат. № 559123
Accudrop частицы BD	Biosciences	Кат. № 345249
DEPC вода	Invitrogen	Кат. № 46-2224
LB среда	MP Biomedicals	Кат. № 113002032
2xTY среда	MP Biomedicals	Кат. № 113012031
Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Invitrogen	Кат. № 15529019
Рестриктаза <i>NdeI</i>	New England BioLabs	Кат. № R0111S
Рестриктаза <i>XhoI</i>	New England BioLabs	Кат. № R0146S
Рестриктаза <i>XbaI</i>	New England BioLabs	Кат. № R0145S
HisPur™ Co2+ колонка	Thermo Fisher Scientific	Кат. № 89964
Человеческое рекомбинантное IgA антитело	Genway	Кат. № E04696
Человеческое рекомбинантное IgG антитело	Jackson ImmunoResearch	Кат. № 111-606-144
pNPP	Sigma-Aldrich	Кат. № N2770
Стрептавидин-HRP	Invitrogen	Кат. № 88-7324-88
Тетраметилбензидин (ТМБ) субстрат	Invitrogen	Кат. № 88-7324-88
Серная кислота 25%	Sigma-Aldrich	Кат. № 1007161000
Гидроксид натрия	Roth	Кат. № 6771.1
S1 субъединица Spike-белка SARS-CoV-2, His-таг меченный	R&D	Кат. № 10522-CV
SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike-белок (RBD, His Tag)	Sino biological	Кат. № 40592-V08B-100
SARS-CoV-2 Нуклеокапсидный белок, His-tag меченный	R&D	Кат. № 10474-CV
SARS-CoV-2 Spike-RBD-белок (flag-his) (Omicron/B.1.1.529)	SanyouBio	Кат. № PNA055
RBD пептид (RBD ₄₈₀₋₄₉₆ : CNGVEGFNCYFPLQSYG)	Eurogentek	Кат. № AS-65619
Рекомбинатный SARS-CoV-2 S-белок RBD-Fc Chimera	BioLegend	Кат. № 793106
Фиксируемый краситель жизнеспособности eFluor 450	Invitrogen	Кат. № 50-112-8817
ACE2-белок	R&D	Кат. № 10544-ZN
Биотинилированный RBD	Miltenyi Biotec	Кат. № 130-127-457

25x Коктейль ингибиторов протеаз (апротинин, бестатин, кальпаин I, кальпаин II, химостатин, E-64, леупептин, альфа-маркоглобулин, пефаблок SC, пепстатин, Тозил-L-лизил-хлорметан гидрохлорид, ингибитор трипсина) с/без EDTA	Roche	Кат. № 11 836 145 001
Стекланные частицы	MP Biomedicals	Кат. № 6911100
Обезжиренное сухое молоко	Roth	Кат. № 68514-61-4
Субстрат для вестерн-блота SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity	Thermo Fisher scientific	Кат. № 34095
Трипсин (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade)	Promega	Кат. № V5280
2,5-дигидроксибензойная кислота	Sigma-Aldrich	Кат. № 149357
Ампициллин	Thermo Fisher scientific	Кат. № 11593027
Полиэтиленгликоль	Sigma-Aldrich	Кат. № P7181
НАТ добавка к среде (50x) Hybri-Max	Sigma-Aldrich	Кат. № H0262-10VL
Alum	Thermo Fisher Scientific	Кат. № 77161
Липофектамин 2000	Thermo Fisher Scientific	Кат. № 11668019
Протеиназа К	Biozym	Кат. № 351101001
BCA набор анализа концентрации белков в растворе	Invitrogen	Кат. № A65453
Сыворотка козы	Jackson ImmunoResearch	Кат. № JIM-005-000-121
Сыворотка кролика	Jackson ImmunoResearch	Кат. № 011-000-120
Муцин	Sigma-Aldrich	Кат. № M2378-100G
Глюкоза	Sigma-Aldrich	Кат. № G8270-5KG
Перколл	Sigma-Aldrich	Кат. № P1644-25ML
BAFF	BioLegend	Кат. № 591202
IL-6	BioLegend	Кат. № 575702
Наборы реагентов		
NGS набор для анализа длины ампликонов	Agilent	Кат. № DF-473-1000
Nextera XT Index Kit v2 Set C/D набор	Illumina	Кат. № FC-131-2003
MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) набор	Illumina	Кат. № MS1023003
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up набор	Macherey-Nagel	Кат. № 740609.50
Quick-DNA™ набор для выделения ДНК	Zymo Research	Кат. № D6010
Easy Stool Extraction Device	ALPCO	Кат. № 30-EZEX-100
Набор для измерения концентрации С-пептида у мышей	Invitrogen	Кат. № EMINS
Набор для фиксации и пермеабиллизации	Thermo Fisher Scientific	Кат. № GAS003
Клеточные линии		
HEK293T клетки	Ferreira-Gomes et al., Nat. Commun., 2021	PMID: 33785765

Vero-клетки	Kozlovskaya et. al., 2021	PMID: 34427172
P3X63Ag8.653 клетки	ATCC	Кат. № CRL-1580
Рекомбинантная DNA		
pET-21b экспрессионный вектор	Addgene	Кат. № 69741-3
pCG1-SARS-CoV-2-S	M. Hoffmann et al., 2020	PMID: 32142651
Приложения		
MiSeq Reporter Software	Illumina	www.illumina.com
PANDAseq 2.11	GitHub	www.github.com
Graphpad Prism 9.3.1	Prism	https://www.graphpad.com
FlowJo v10	Tree Star Inc.	www.flowjo.com
Mascot MS/MS ion search	Matrix Science	www.matrixscience.com
Biotoools software	Bruker Daltonik	www.bruker.com
ZEN 2.0	Carl Zeiss AG	N/A
Другое		
Необработанные данные секвенирования	NCBI Sequence Read Archive (SRA)	PRJNA738291
Agilent Fragment Analyzer 5200	Roche	Кат. № M5310AA
Illumina MySeq 2500	Illumina	www.illumina.com
Spectramax plus 384	Molecular devices	Кат. № 5510-236-04
COY анаэробная камера	COY Lab products	www.coylab.com
BD Influx®	BD Biosciences	www.bdbiosciences.com
FACSCanto II	BD Biosciences	www.bdbiosciences.com
MACS Quant 16	Miltenyi Biotec	www.miltenyibiotec.com
Microarray scanner Innoscan 710.	Innopsys	www.innopsys.com
Chemi Doc XRS+ imaging system	Bio-Rad	Кат. № 1708265
Ultraflex II MALDI-ToF-ToF mass spectrometer	Bruker Daltonik	www.bruker.com
Cryotome MH560	Thermo Fisher Scientific	www.assets.thermofisher.com
LSM 880	Carl Zeiss AG	N/A

Доноры

Здоровые люди, участвующие в исследовании вакцинации BNT162b2, дали согласие в рамках исследования BNT162-01 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04380701), и формы информированного согласия хранятся в архиве в соответствии с процедурами 162-01. Другие здоровые лица и пациенты с ревматоидным артритом, участвующие в данном исследовании, дали письменное информированное согласие в соответствии с одобрением комитета по этике Берлинской университетской больницы «Шарите» (EA2/010/21, EA4/188/20 и EA 2/200/21) и в соответствии с Хельсинкской декларацией. Участники дали согласие на участие в исследовании до его проведения. Характеристики доноров приведены в Таблицах 3 и 6.

Клиническое исследование с пробиотиком *Streptococcus salivarius K12*

Были набраны здоровые добровольцы. Участники дали согласие на участие в исследовании до его проведения. Критерии включения: полный курс вакцинации против SARS-CoV-2, время после последней вакцинации – более 3 месяцев. Участники получали 50 мг (10^7 КОЕ) *Streptococcus salivarius K12* один раз в день перед сном в течение 2 недель. Участники контрольной группы не получали никаких добавок. Сыворотку и слюну собирали и анализировали на присутствие антител против Spike в день 0 и день 14 приема пробиотика. Титры антинуклеокапсидных IgG измерялись в день 0 и день 14 исследования, чтобы исключить контакт участников с SARS-CoV-2 во время исследования. Характеристики доноров приведены в Таблице 5.

Подготовка образцов слюны доноров

Цельную слюну собирали в пробирки и центрифугировали при 2 000g в течение 15 минут при +4 °C. Супернатант хранили при -80 °C для дальнейшего анализа. Осадок, содержащий бактерии, фильтровали через фильтр с размером пор 30 мкм и использовали для выделения ДНК по адаптированному протоколу набора Quick-DNA™. 2,5 мкл каждого из подготовленных образцов использовали для амплификации V3-V4 регионов гена *16s rRNA*.

Подготовка образцов фекалий от людей, вакцинированных мРНК вакциной BNT162b2

Образцы фекалий участников были собраны с помощью устройства ALPCO Easy Stool Extraction Device в соответствии с инструкциями производителя и хранились при -80 °C до обработки. Размороженную суспензию кала фильтровали через фильтры с размером пор 70 мкм и 30 мкм и центрифугировали при 4 000g. Супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и хранили при температуре -80 °C до дальнейшего использования. Осадок бактерий ресуспендировали в 1 мл смеси 40 %-го глицерина в среде LB и хранили при -80 °C для дальнейшего анализа.

Подготовка образцов фекалий здоровых доноров для выделения бактерий

Образцы фекалий от здоровых людей хранились при +4 °C до обработки. Далее их разводили в автоклавированном PBS в соответствии с весом в соотношении 10 мкл на 1 мкг фекалий и гомогенизировали с помощью вортекса. Затем раствор фекалий фильтровали через фильтры с размером пор 70 мкм и 30 мкм и центрифугировали при 4 000g для осаждения бактериальных клеток. Супернатант фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм и хранили при -80 °C для дальнейшего использования. Образцы микробиоты хранили в 1 мл смеси 40 %-го глицерина в среде LB при -80 °C. Характеристики доноров приведены в Таблице 4.

Окрашивание микробиоты

К замороженным аликвотам образцов микробиоты добавляли 1 мл автоклавированного PBS. Образцы дважды центрифугировали при 13 000g в течение 10 мин, удаляли супернатант, осадок повторно суспендировали в PBS. Перед окрашиванием образцы всегда блокировали при помощи 10 %-й сыворотки хозяина вторичного антитела (сыворотка козы, кролика) в PBS. Окрашивание на покрытие бактерий иммуноглобулинами проводили в 100 мкл с использованием 1:400 (v/v) детектирующих антител: анти-человеческого IgG Alexa Fluor 647 и античеловеческого IgA Alexa Fluor 488. Образцы инкубировали в течение 30 минут при +4 °C и сразу добавляли 1 мл 5 мкМ раствора Hoechst 33342 еще на 30 минут при +4 °C. Для выявления связывания анти-Spike антител с микробиотой, образцы сначала инкубировали в 50 мкл, содержащих 0,5 мкг кроличьих SARS-CoV-2 Spike-нейтрализующих антител (клон: HA14JL2302) или нейтрализующих антител, выделенных из пациентов COVID-19 (Kreye et al., 2020), в течение 30 мин при +4 °C, затем отмывали PBS и окрашивали в 50 мкл анти-кроличьих IgG Alexa647 или анти-человеческих IgG PE/ Dazzle™ 594, к которым затем добавляли 5 мкМ раствора Hoechst 33342 на 30 минут при +4 °C. После окрашивания Hoechst 33342 образцы промывали PBS и центрифугировали при 13 000g в течение 5 мин. Для выявления фракции микробиоты мышей, связанной IgA-антителами, аликвоты образцов были окрашены антителами против мышинового IgA, мечеными DyLight 650. Образцы инкубировали в течение 30 минут при +4 °C и сразу добавляли 1 мл 5 мкМ раствора Hoechst 33342 еще на 30 минут при +4 °C. После окрашивания Hoechst 33342 образцы промывали PBS и центрифугировали при 13 000g в течение 5 мин. Все образцы перед измерением ресуспендировали в PBS и анализировали на приборе Influx BD.

Проточная цитометрия микробиоты

Для всех цитометрических исследований образцов микробиоты был использован клеточный сортер BD Influx®. Буфер PBS для прибора был автоклавирован и стерильно фильтрован перед каждым запуском прибора. Качество анализа обеспечивалось выравниванием лазеров с помощью Sphero™ частиц. Для калибровки сортировки использовали Accudrop частицы. Для секвенирования отсортированные образцы хранились в объеме около 10 мкл остаточного PBS при температуре -20 °C. Для последующего культивирования бактерий сортировка проводилась непосредственно в среду PYG для дальнейшего распределения по чашкам Петри со средой.

Культивирование бактерий

Бактерии, связанные антителами против S1/RBD-белка, были отсортированы в культуральную среду PYG и далее перенесены на чашки Петри с данной средой, после чего

была выделена ДНК и проведено секвенирование по Сэнгеру с целью идентификации. *Streptococcus salivarius*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* и *Bifidobacterium longum* культивировали 24 часа в анаэробных условиях в среде PYG (DSMZ) для последующего анализа.

Akkermansia muciniphila (DSMZ) культивировали 72 часа в анаэробных условиях в среде PYG, содержащей 0,1 % муцина.

Секвенирование бактериальных колоний

Для идентификации штаммов бактерий, связанных нейтрализующими анти-RBD-антителами, выделяли ДНК с помощью лизирующего буфера, содержащего SDS. Выделенную ДНК затем амплифицировали с помощью специфичных для *16s RNA* праймеров LPW57 и LPW58 (Woo et al., 2000). Бактериальную ДНК амплифицировали в присутствии 2x КАРА HiFi микса. ДНК-продукт проверяли с помощью гель-электрофореза и очищали с помощью набора NucleoSpin Gel and PCR Clean-up. Концентрацию очищенного продукта ПЦР доводили до 5 нг/мкл в 15 мкл и отправляли на секвенирование по методу Сэнгера (Eurofins Genomics). Идентичность последовательностей определяли с помощью инструмента базового локального поиска выравнивания нуклеотидов (BLAST), предоставленного NCBI.

Определение состава микробиоты при помощи *16s rRNA* секвенирования

Для секвенирования гена *16s rRNA* амплифицировали область V3/V4 непосредственно из образцов микробиоты и из отсортированных образцов (последовательности праймеров: 5'-TCgTCggCAgCgTCAgATgTgTATAAgAgACAgCCTACgggNggCWgCAg-3' и 5'-gTCTCgTggCTCggAgATgTgTATAAgAgACAgACTACHVgggTATCTAATCC-3') с длительным начальным нагревом. Далее ПЦР-продукты проверяли на 1,5 %-м агарозном геле, очищали с помощью AmPure XP магнитных частиц при соотношении 1:1,25 (v/v). 5 мкл очищенных продуктов первого ПЦР использовали в качестве матрицы для второго ПЦР для индексирования каждого образца с использованием набора Nextera XT Index Kit v2 Set C. После проведения индексной ПЦР образцы повторно очищали с помощью AmPure XP магнитных частиц. Затем образцы анализировали методом капиллярного гель-электрофореза (Agilent Fragment Analyzer 5200) на предмет правильного размера и чистоты с помощью набора для анализа фрагментов стандартной чувствительности NGS. Из всех образцов был сформирован пул 2 нМ, который был загружен в систему Illumina MySeq 2500.

Анализ данных *16S RNA* секвенирования был проведен биоинформатиком Pawel Durek из Немецкого ревматологического научного центра в Берлине, Германия. Необработанные данные процессировали с помощью программного обеспечения MiSeq Reporter. Прямые и обратные чтения были объединены с помощью PANDAseq 2.11 с минимальным перекрытием

25 оснований и классифицированы с помощью «classifier.jar» 2.13 с доверительным интервалом 50 %. Прочтения с поправкой на число копий агрегировали до бактериальных родов с помощью phyloSeq 1.34. Анализ главных координат (principal component analysis, PCA) проводили с использованием статистики несходства Брея-Кертиса с помощью программы vegan 2.5-7.

Линейный дискриминантный анализ (Linear discriminant analysis, LDA) проводили с помощью LefSe (LDA Effect size), основываясь на количестве копий, нормированном на 1М чтений. Необработанные данные последовательностей были выложены в NCBI Sequence Read Archive (SRA) под номером доступа PRJNA738291.

Лабораторные животные

Эксперименты с использованием лабораторных животных проводили на мышах C57BL/6 дикого типа (WT) и *Tlr4*^{-/-} (на генетическом бэкграунде C57BL/6), выращенных в виварии ФИБХ РАН им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова категории «specific pathogen free» г. Пущино. K18-hACE2 Tg мыши (B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J) на генетическом бэкграунде C57Bl/6 были приобретены в Jackson laboratories (JAX #034860, RRID:IMSR_JAX:034860). Животные содержались в условиях SPF в Центре коллективного пользования Института физиологически активных соединений РАН (договор № ФСН-2021-0005). Во всех экспериментах по умолчанию участвовали мыши обоих полов в возрасте 5–9 недель, если не указано иное. Животные получали стандартный виварный рацион «ЧАРА», а также питьевую воду *ad libitum*. Все манипуляции с мышами выполняли согласно правилам работы с лабораторными животными, утвержденным в Федерации Европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA).

Оральная иммунизация мышей бактериями *S. salivarius* и *B. pseudocatenuatum*

Культивированные бактерии собирали, трижды промывали PBS и ресуспендировали в PBS с конечной OD₆₀₀=1,0. Мышам C57Bl/6 вводили 200 мкл бактерий орально каждый день в течение 21 дня, после чего проводился сбор фекалий и крови для анализа титров антител к Spike-белку SARS-CoV-2.

Иммунизация мышей белком RSSL-01370 и транспортером олигопептидов OppA1

Для иммунизации белком RSSL-01370/OppA1 рекомбинантные белки RSSL-01370/OppA1 были получены в *E. coli* и очищены (см. соответствующий раздел в «Материалы и методы»). 20 мкг/мышь вводили внутрибрюшинно в смеси с Alum, 1:1, (v/v). Повторную иммунизацию проводили на 14-й день после первичной инъекции. Через 7 дней после второй иммунизации проводился сбор крови для анализа титров антител к Spike-белку вируса SARS-CoV-2.

Иммунизация мышей бактериями *S. salivarius* и *B. pseudocatenuatum* с последующей инфекцией B.1.1 SARS-CoV-2

Данная часть работы проводилась совместно с лабораторией Л.И. Козловской (Федеральный научный центр им. И.П. Чумакова).

Цельновирионная инактивированная вакцина SARS-CoV-2 (CoviVac) была получена из прототипного штамма B.1.1 SARS-CoV-2 (GISAID ID EPI_ISL_428851) в клетках Vero (Kozlovskaya et al., 2021). Мышей K18-hACE2 Tg вакцинировали внутримышечно вакциной CoviVac и/или внутрибрюшинно Alum со смесью бактерий в день 0 и день 14 (Kozlovskaya, et al., 2021). На 21-й день мышей K18-hACE2 Tg заражали интраназально в дозе 10^4 TCID₅₀ (25 мкл в каждую ноздрю) вирусом B.1.1 SARS-CoV-2 через неделю после второй иммунизации. В качестве контрольной группы заражали мышей, иммунизированных только Alum в PBS. Животных ежедневно клинически осматривали и взвешивали. На седьмой день после заражения мышей анализировали. На протяжении эксперимента проводился сбор крови для анализа титров антител к Spike-белку SARS-CoV-2. По окончании эксперимента собирали легкие и фиксировали их в 10 %-м формальдегиде.

Диета с повышенным содержанием глюкозы (HGD)

В данной модели использовались самцы 5-недельного возраста. Животные контрольной группы получали стандартный виварный рацион «ЧАРА», а также питьевую воду *ad libitum*, группы HGD – стандартный виварный рацион «ЧАРА» и 20 %-й водный раствор глюкозы *ad libitum*. На протяжении всех экспериментов раствор глюкозы изготавливали в стерильной питьевой воде и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 μ m. Длительность эксперимента составляла примерно 30 дней. Для оценки кинетики продукции IgA в зависимости от диеты у мышей собирали кровь и фекалии каждые 7 дней. По окончании экспериментов животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. При необходимости перфузии тканей мышей усыпляли с использованием CO₂, перфузию производили 0,9 %-м физиологическим раствором. В эксперименте HGD с применением блокирующих TNF антител (клон MP6-XT22) или IL-6-блокирующих антител (клон MP5-20F3) антитела вводили внутрибрюшинно через день в количестве 200 μ g/мышь на протяжении всего эксперимента.

Глюкозотолерантный тест

После диеты с повышенным содержанием глюкозы мыши были подвергнуты 16-часовому голоданию в течение ночи (20 %-й раствор глюкозы был заменен на воду), после чего у них был измерен базовый уровень глюкозы в крови при помощи глюкометра Contour TC (Bayer). Далее мышам вводили внутрибрюшинно 2 g/kg глюкозу и измеряли уровень глюкозы

в крови каждые 15 минут в течение 2 часов. Кровь на протяжении эксперимента забиралась у мышей из хвостовой вены.

Выделение клеток *lamina propria* из тонкого кишечника

Выделенную часть кишечника от желудка до слепой кишки помещали в раствор PBS/BSA на льду. Кишечник очищали от жира и пейеровых бляшек, а затем от содержимого, промывая раствором PBS/BSA. Измельченный кишечник дважды инкубировали на водяной бане при +37 °С в течение 15 минут в среде RPMI-1640 с 10 mM EDTA pH 8.0. Тщательно гомогенизировали ткань кишечника ножницами и скальпелем и помещали в среду RPMI-1640 с ферментами коллагеназой D и диспазой II в конечной концентрации 1 мг/мл. Инкубировали на шейкере при 220 rpm при +37 °С в течение 20 минут. Интенсивно перемешивали в течение 20-30 сек. Суспензию клеток фильтровали через фильтр с размером пор 70 мкм. Непереваренные фрагменты ткани повторно инкубировали с ферментами в течение 20 минут при +37 °С. Полученную суспензию клеток фильтровали через фильтр с размером пор 70 мкм. Суспензии клеток объединяли и фильтровали через фильтр с размером пор 30 мкм, после чего проводили осаждение на центрифуге в течение 5 мин 400g при +4 °С. Клетки ресуспендировали в 1 мл лизирующего буфера АСК, после чего инкубировали 1 минуту на льду, а затем отмывали раствором PBS/BSA. Полученные клетки были окрашены на специфические поверхностные маркеры (Таблица 2) и использовались в цитофлуориметрическом анализе.

Выделение клеток из пейеровых бляшек, селезенки, костного мозга

Клетки пейеровых бляшек и селезенки получали механически через фильтр с размером пор 70 мкм в раствор PBS/BSA с последующим центрифугированием при 400g в течение 5 мин при 4 °С. Клетки костного мозга были получены путем вымывания шприцем костного мозга из бедренной кости холодным раствором PBS. Клетки селезенки и костного мозга инкубировали в 1 мл лизирующего буфера АСК на льду, после чего отмывали раствором PBS/BSA. Полученные суспензии клеток были окрашены на специфические поверхностные и внутриклеточные маркеры (Таблица 2) и использовались в цитофлуориметрическом анализе.

Выделение лимфоцитов из печени

Измельченную ножницами печень продавливали через фильтр с размером пор 70 мкм, после чего осаждали суспензию клеток центрифугированием при 400g в течение 10 мин. Далее осадок клеток печени был ресуспендирован в культуральной среде RPMI-1640 и наложен на 30 %-й Percoll (в RPMI-1640, 10 % FBS, P/S, ME). Градиентное осаждение проводили при комнатной температуре в течение 30 мин, 500g без торможения. Полученную фракцию клеток ресуспендировали в АСК для лизиса эритроцитов, после чего отмывали раствором PBS/BSA.

Полученные суспензии клеток были окрашены на специфические поверхностные и внутриклеточные маркеры (Таблица 2) и использовались в цитофлуориметрическом анализе.

Цитометрический анализ реактивности антител против белка Spike

Для выявления Spike-специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови НЕК293Т клетки трансфицировали плазмидой, экспрессирующей вариант В.1.1 SARS-CoV-2 Spike-белка дикого типа. На следующий день долю трансфицированных клеток определяли путем окрашивания антителом анти-SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 (клон CR3022) в течение 30 мин, однократного промывания клеток PBS/BSA и последующего окрашивания козым анти-человеческим IgG-Alexa-647 в течение 15 мин при +4 °С в присутствии фиксируемого красителя жизнеспособности eFluor 450. Далее трансфицированные клетки инкубировали с сыворотками в различных разведениях в течение 30 мин, дважды промывали PBS/BSA и окрашивали козым анти-человеческим IgG Alexa647 и анти-человеческим IgA FITC в течение 15 мин при +4 °С в присутствии фиксируемого красителя жизнеспособности eFluor 450. Клетки промывали PBS/BSA и либо измеряли непосредственно, либо фиксировали в 2-%-м растворе параформальдегида в течение 20 мин при +4 °С, после чего образцы отмывали и ресуспендировали в PBS/BSA. Образцы записывали на FACSCanto II или MACS Quant 16 и анализировали с помощью аналитического программного обеспечения FlowJo v10. В соответствующих флуоресцентных каналах определяли среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (MFI) Spike экспрессирующих и неэкспрессирующих клеток и определяли $\Delta MFI = MFI(S+) - MFI(S-)$ для IgG и IgA. Значения ΔMFI далее строились против соответствующих разведений сыворотки, и AUC определялась количественно с использованием Graph Pad Prism.

Цитофлуориметрический анализ клеток мышей

Подсчет жизнеспособных клеток проводили с использованием камеры Горяева или на приборе MACS Quant 16. Полученные суспензии клеток инкубировали с анти-Fc γ R (2.4G2)-антителами в течение 15 мин при +4 °С для предотвращения неспецифического связывания антител. Далее окрашивали на специфические маркеры (Таблица 2) в 50 мкл PBS/BSA в течение 15 мин при +4 °С. Фиксировали клетки 2 %-м раствором параформальдегида 20 мин при комнатной температуре, после чего клетки отмывали раствором PBS/BSA.

Для внутриклеточного окрашивания клетки пермеабелизировали с использованием коммерческого реагента в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее отмывали раствором пермеабелизационного буфера. Внутриклеточное окрашивание проводили в течение 1 ч при +4 °С.

Анализ популяций клеток методом проточной цитофлуориметрии производился на приборе BD FACS Canto II. Дальнейший анализ популяций клеток был проведен с помощью программы «FlowJo» и статистически обработан в программе «Graph Pad Prizm 9».

Для некоторых экспериментов была произведена сортировка живых B220⁺IgA⁺ плазматических клеток при использовании клеточного сортера BD Aria II.

Измерение количества антител у мышей

Количественный анализ содержания IgA, IgM и IgG в сыворотке, IgA в фекалиях и супернатантах проводился методом ИФА с использованием 96-луночных планшетов с высокоаффинным полистироловым покрытием. Связывающие антитела анти-IgA или анти-IgG разведенные в буфере PBS, наносили на плашку и инкубировали в течение ночи при +4 °С. Отмывали планшет дважды раствором PBS-T. Инкубировали два часа при комнатной температуре с раствором 5 %-го BSA в PBS с целью предотвращения неспецифического связывания с высокоаффинным дном лунки. Отмывали планшет дважды раствором PBS-T. Внесение стандартов (мышинные IgA) осуществлялось по принципу последовательного разведения для построения стандартной кривой. Полученную сыворотку хранили при температуре -20 °С. Фекалии были ресуспендированы в растворе PBS (10 мкл PBS на 1 мг фекалий), после чего центрифугированы в течение 10 минут при 13 000g; собранный супернатант хранился при -20 °С. Предварительно разведенные образцы вносили из расчета 100 мкл/лунка. Инкубировали в течение 2 часов при +37 °С или в течение ночи при +4 °С. Отмывали планшет 4 раза раствором PBS-T. Вносили детектирующие анти-мышинные IgA-антитела, конъюгированные с HRP, или анти-мышинные IgM, -мышинные IgG, конъюгированные с AP, и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Отмывали планшет 5 раз. Инкубировали приблизительно 10 минут с раствором ТМВ для HRP и с раствором PNPP для AP при комнатной температуре до появления окрашивания. Останавливали реакцию путем добавления 50 мкл/лунка 2N H₂SO₄ раствора в случае HRP или 2M NaOH в случае AP. Регистрировали значения оптического поглощения при 450/405 нм (HRP/AP) на приборе Multiscan FC. Анализ данных был произведен с использованием Graph Pad.

Измерение количества С-пептида у мышей после HGD

Измерение концентрации инсулина в сыворотке крови у мышей после HGD проводили путем анализа концентрации С-пептида в соответствии с протоколом производителя (Таблица 2). Сыворотка была предварительно разведена в 5 раз в растворителе из набора.

Анализ титра антител против S1/RBD-белка в сыворотке после иммунизации мышей белком RSSL-01370 или белком-транспортером олигопептидов OppA1

Для определения титра специфических антител к SARS-CoV-2 96-луночные планшеты покрывали на ночь 0,5 мкг/мл рекомбинантного белка SARS-CoV-2 Spike S1 Subunit His-tag. Планшеты промывали с помощью раствора PBS-T, блокировали 5 %-м BSA в PBS и добавляли предварительно разведенные сыворотки. Для определения титра S1-специфических IgA, IgG наносили антитела против мышинового IgG, конъюгированные с HRP, после чего инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После пятикратной промывки в PBS-T добавляли субстрат тетраметилбензидина (ТМБ). Реакцию останавливали добавлением 2N H₂SO₄. Анализ данных был произведен с использованием Graph Pad, где была посчитана площадь под кривой (AUC) для каждого образца и проведен соответствующий статистический анализ.

Анализ титра антител против S1-белка в сыворотке и слюне после вакцинации доноров мРНК вакциной

Для определения титра специфических антител к SARS-CoV-2 96-луночные планшеты покрывали на ночь 0,5 мкг/мл рекомбинантного белка SARS-CoV-2 Spike S1 Subunit His-tag. Планшеты промывали с помощью PBS-T, блокировали 5 %-м BSA в PBS и добавляли предварительно разведенные сыворотки/слюну. Для определения титра S1-специфических IgA, IgG наносили антитела против человеческого IgG или IgA, конъюгированные с HRP, после чего инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После пятикратной промывки в PBST добавляли субстрат тетраметилбензидина (ТМБ). Реакцию останавливали добавлением 2N H₂SO₄. Анализ данных был произведен с использованием Graph Pad, где была посчитана площадь под кривой (AUC) для каждого образца и проведен соответствующий статистический анализ.

In vitro* анализ способности ингибирования RBD-ACE2 взаимодействия антителами в фекалиях у мышей после оральной иммунизации бактериями *S. salivarius*/*B. pseudocatenuatum

96-луночные планшеты были покрыты 100 нг/мл человеческого белка ACE2. После промывки в PBS-T планшеты блокировали 200 мкл 5 %-м BSA в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 2 раза по 200 мкл PBS-T. Супернатанты фекалий и сыворотка пациентов с COVID-19 (Kreye, et al., 2020) в качестве положительного контроля были разведены в PBS и добавлены по 100 мкл в планшет. Планшеты инкубировали при +37 °C в течение 1 часа. После этого планшеты промывали 5 раз 200 мкл 1x PBS-T и наносили 100 нг/мл биотинилированного RBD и инкубировали 1 часа при +37 °C. После 5-кратной промывки в PBS-T добавляли стрептавидин-HRP, затем через 30 мин инкубации при

RT и 5-кратной промывки в PBS-T добавляли субстрат тетраметилбензидин (ТМБ). Реакцию останавливали добавлением 2N H₂SO₄. Оптическую плотность при 450 нм измеряли на спектрометре Spectramax. Процент ингибирования определяли количественно, используя следующие значения: 100 % ингибирования соответствовало значениям OD лунок без RBD, 0 % ингибирования соответствовало лункам, в которые был добавлен только биотинилированный RBD.

Определение бактериальных антигенов и антигенов тканей мыши

Для детекции антигенов поджелудочной железы ткань была быстро заморожена в жидком азоте, после чего была измельчена в буфере RIPA, содержащем коктейль ингибиторов протеаз. После 20 мин инкубации на льду образцы подвергали соникации при 50 %-м напряжении в течение 2 циклов 10-секундных импульсов с последующим 30-секундным отдыхом на льду. Лизаты центрифугировали в течение 10 мин при 20 000 g и собирали супернатант. Далее образцы разгоняли на 12 %-м SDS-PAGE и переносили на PVDF-мембрану. Мембрану блокировали инкубацией в 5 %-м обезжиренном молоке в буфере TBS-T в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Затем мембрану гибридизировали с HGD-сывороткой, содержащей IgA-антитела, в блокирующем буфере в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Затем мембраны промывали в TBST и инкубировали со вторичными антителами против IgA, конъюгированными с HRP, в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Для детекции сигнала использовали набор SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity. Сигнал получали с помощью системы визуализации Chemi Doc.

Для детекции антигенов бактерий бактериальные штаммы (*Streptococcus salivarius*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*) культивировали в течение 48 часов, отмывали в PBS и ресуспендировали в RIPA-буфере, содержащем коктейль ингибиторов протеаз. Образцы подвергали соникации при 50 %-м напряжении в течение 5 циклов 10-секундных импульсов с последующим 30-секундным отдыхом на льду. После соникации к бактериальному экстракту добавляли стеклянные частицы в количестве 1/3 от общего объема. Образцы подвергались перемешиванию в течение 30 сек с последующим охлаждением на льду в течение 30 сек (всего 5 циклов). Лизаты центрифугировали в течение 10 мин при 20 000g и собирали супернатант. Для вестерн-блот-анализа образцы разгоняли на 12 %-м SDS-PAGE и переносили на PVDF-мембрану. В качестве положительного контроля использовали рекомбинантный белок SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike RBD-His. Мембрану блокировали инкубацией в 5%-ном обезжиренном молоке в буфере TBS-T в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Затем мембрану гибридизировали с анти-RBD антителами

кролика или анти-RBD антителами человека в блокирующем растворе в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном встряхивании. Затем мембраны промывали в TBST и инкубировали с анти-кроличьим IgG-HRP или анти-человеческим IgG-HRP в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Для детекции сигнала использовали набор SuperSignal West Fempto Maximum Sensitivity. Сигнал получали с помощью системы визуализации Chemi Doc.

Для определения антигенов на *Akkermansia muciniphila* (DSMZ, штамм BAA-835), распознающихся HGD-IgA антителами, культура *Akkermansia muciniphila* была отмыта в PBS и ресуспендирована в лизирующем буфере, содержащем 50 mM DTT, 1 % SDS и коктейль ингибиторов протеаз. Образцы подвергали соникации при 50 %-м напряжении в течение 5 циклов 10-секундных импульсов с последующим 30-секундным отдыхом на льду. Лизаты центрифугировали в течение 10 мин при 20 000g и собирали супернатант. Далее анализировали лизаты с помощью белкового электрофореза и вестерн-блота как описано выше. В качестве первичных антител была использована HGD-сыворотка, содержащая IgA. Далее мембрану отмывали трижды раствором TBS-T и инкубировали со вторичными антителами против мышинных IgA, конъюгированных с HRP, в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Для детекции сигнала использовали набор SuperSignal West Fempto Maximum Sensitivity. Сигнал получали с помощью системы визуализации Chemi Doc.

Анализ соотношения димеров и мономеров IgA-антител в сыворотке мышей

Пробы, предварительно разведенные в PBS и содержащие 10 нг тотального IgA, были разделены при помощи нативного электрофореза в 10 %-м полиакриламидном геле при 30 мА при +4 °С. Проводили трансфер разделенной смеси белков на нитроцеллюлозную мембрану (0,22 мкм поры) в течение 16 часов при 40 В при +4 °С. Неспецифическое связывание антител с мембраной предотвращали при помощи 5 %-го сухого молока в растворе 1x TBS в течение ночи при +4 °С или 1,5 часа при комнатной температуре. Инкубировали с первичными антителами против IgA (rabbit IgG) в блокирующем растворе в концентрации 0,2 µg/ml в течение 1 часа при комнатной температуре при перемешивании. Отмывали при помощи TBS-T буфера 3x15 мин. Инкубировали со вторичными антителами (анти-кроличье IgG антитело, конъюгированное с HRP) в течение 1 часа при комнатной температуре при перемешивании. Проявляли мембрану на приборе Chemi Doc, используя субстрат «SuperSignal West Fempto Maximum Sensitivity» для HRP-конъюгированных антител. Денсиметрически оценивали соотношение димерного и мономерного IgA в программе ImageJ.

В качестве положительного контроля, содержащего только димерный IgA, было использовано моноклональное антитело IgA клона Gr1B6C6, полученное ранее в лаборатории из IgA⁺ плазматических клеток кишечника мыши с применением гибридомной технологии.

Масс-спектрометрический анализ

Данная часть работы проводилась совместно с лабораторией химии протеолитических ферментов, возглавляемой И.В. Смирновым (ИБХ РАН им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова).

Белковые полосы после 1D-PAGE вырезали и дважды промывали 100 мл смеси 0,1 М NH₄HCO₃ (pH 7,5) и 50 % ацетонитрила при +50 °С до тех пор, пока кусочек геля не становился прозрачным. Цистеиновые связи белков восстанавливали 10 мМ ДТТ в 50 мМ NH₄HCO₃ в течение 30 мин при +56 °С и алкилировали 15 мМ йодоацетамида в темноте при RT в течение 30 мин. Этап с добавлением ДТТ повторяли. Затем кусочки геля обезвоживали 100 мкл ацетонитрила (ACN), высушивали на воздухе и обрабатывали 10 мкл 12 мг/мл раствора трипсина в 50 мМ бикарбонате аммония в течение 15 ч при 37 °С. Пептиды экстрагировали 20 мкл 0,5 %-го водного раствора трифторуксусной кислоты (TFA) в течение 30 мин с помощью соникации, высушивали и ресуспендировали в 3 % ACN, 0,1 % TFA. Аликвоты (2 мкл) образца смешивали с 0,3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (30 мг в 400 мкл 30 % ACN/0,5 % TFA) и оставляли высыхать при комнатной температуре. Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Ultraflex II MALDI-ToF-ToF, оснащённом Nd-лазером. Измерение молекулярных ионов [МН]⁺ проводилось в режиме отражателя, точность измерения масс-пика составляла 0,007 %. Спектры фрагментных ионов генерировались методом лазерно-индуцированной диссоциации, слегка ускоренной низкоэнергетической столкновительно-индуцированной диссоциацией, с использованием гелия в качестве столкновительного газа. Точность измерения масс-пиков фрагментных ионов составляла 1 Да. Соответствие найденных МС/МС фрагментов белкам осуществлялось с помощью программного обеспечения Biotools (Bruker Daltonik) и ионного поиска Mascot MS/MS.

Прокариотическая экспрессия белков

Ген *RSSL-01370* амплифицировали из геномной ДНК *Streptococcus salivarius K12* с использованием следующих праймеров: 5'-
СТССАТАТГААТТТАССААГТСАССАТАСААГГГ -3' и 5'-
GTGGTCGACATTCACCTTTTTCAGTTTGCTACACC -3'. Ген *OppA1* амплифицировали из геномной ДНК *Streptococcus salivarius K12* с использованием следующих праймеров: 5'-
СТССАТАТГААГААГАААГСАСТГГГС-3' и 5'-
GTGCTCGAGCTTGCCGGACTTGGTCATGT -3'. На концах каждого прямого и обратного

праймера были добавлены сайты рестрикции *NdeI* и *XhoI* соответственно. Затем производили клонирование в экспрессионный вектор pET-21b(+), содержащий сайты рестрикции *NdeI* и *XhoI* в химически компетентных клетках *Rosetta DE3*. Скрининг эффективности клонирования производили с помощью ПЦР с теми же праймерами. Ночную культуру выбранного клона инокулировали в бактериальную среду 2xTY, содержащую 100 мкг/мл ампициллина, и выращивали при +30 °С при постоянном перемешивании до достижения OD₆₀₀=0,8. Экспрессию белка индуцировали 0,6 mM изопропил-β- d-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) в течение следующих 4 часов при +30 °С. Далее производили очистку белка с использованием агарозных сфер, несущих Co²⁺.

Ген *Sell-repeat family protein (SLR1)* амплифицировали из геномной ДНК *Akkermansia muciniphila* с использованием следующих праймеров: 5'-CACTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGAGCCCGTCTTTTGCT-'3 и 5'-CACCTCGAGTTTCTTCTTCGTGTTGAGTTTTTCCCT-'3. На концах прямого и обратного праймера были добавлены сайты рестрикции *XbaI* и *XhoI* соответственно. Далее следовали вышеописанному протоколу.

Очистка His-tag меченных белков

Белки RSSL-01370/OppA1/SLR1, содержащие His-tag, экспрессировали в клетках *Rosetta DE3*, суспензии бактериальных клеток центрифугировали при 4 000g в течение 20 мин и ресуспендировали в Co²⁺ промывочном растворе, содержащем 300 mM хлорида натрия, 50 mM фосфата натрия, 10 mM имидазола и коктейль ингибиторов протеаз без EDTA, pH7,4. Образцы подвергали соникации при 50 %-м напряжении в течение 5 циклов по 20 сек с последующим 30-секундным отдыхом на льду. Лизаты центрифугировали в течение 10 мин при 20 000g и собирали супернатант, содержащий оверэкспрессированный белок. Супернатанты фильтровали через 0,22 мкм фильтры, наносили на агарозу HisPur™ Cobalt и очищали в соответствии с инструкцией производителя. После нанесения белкового лизата на колонку промывали 10 mM имидазольным промывочным буфером и элюировали с помощью 150 mM имидазольного элюирующего буфера. Для контроля собирали все фракции в ходе отмывки. Для дальнейшего применения белка проводили диализ против буфера, содержащего 300 mM хлорида натрия и 50 mM фосфата натрия (pH 7,5). Далее измеряли концентрацию при помощи ВСА-набора. Полученные рекомбинатные белки фильтровали через 0,22 мкм фильтра и хранили при -80 °С.

Гистологический анализ

Легкие для гистологического исследования фиксировали в 10 %-м нейтральном забуференном формалине в течение 48 часов при комнатной температуре, промывали PBS и

замораживали в OCT. Срезы легких (7 мкм) приготавливали с помощью криотома MN560 (Thermo Fisher Scientific), обводили гидрофобным маркером для предотвращения высыхания среза в время окрашивания. Далее срезы блокировали в растворе PBS, содержащем 10 % кроличьей сыворотки в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего окрашивали анти-NCP-антителами в течение 1 часа при комнатной температуре. Срезы отмывали последовательно 3 раза в растворе PBS, затем инкубировали со вторичными анти-кроличьими IgG-антителами, конъюгированными с APC, в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. После трехкратной отмывки срезы инкубировали с DAPI в течение 15 минут, отмывали и покрывали покровным стеклом. Далее фиксировали изображения с помощью конфокального микроскопа LSM880 и обрабатывали с помощью программного обеспечения ZEN2. Для оценки интенсивности NCP-APC сумму событий в канале APC делили на площадь слайда (мм^2) и нормировали на негативный контроль (только вторичные антитела). Для каждого биологического образца анализировали 3-5 последовательных слайдов.

Ткани поджелудочной железы замораживали в OCT. Срезы толщиной 7 мкм, получали с помощью криотома MN560. Далее срезы обводили гидрофобным маркером для предотвращения высыхания среза в время окрашивания и блокировали в растворе PBS, содержащем 10 % козьей сыворотки в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого инкубировали с сывороткой мышей после HGD в течение 1 часа при комнатной температуре и отмывали 3 раза по 5 минут в PBS. Затем следовало 30-минутное окрашивание вторичными антителами против мышинового IgA, конъюгированного с DyLight 650, и трехкратная отмывка в PBS. Для детекции инсулина использовали антитела против инсулина, меченные с Alexa Fluor 488. После трехкратной отмывки срезы инкубировали с DAPI в течение 15 минут, отмывали и покрывали покровным стеклом. Срезы анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM880. Микрофотографии получали на LSM880 при 10-кратном увеличении и обрабатывали с помощью программного обеспечения ZEN2. Для оценки интенсивности инсулин-Alexa488 сумму событий в канале FITC делили на площадь слайда (мм^2). Для каждого биологического образца анализировали 3-5 последовательных слайдов.

Культивирование IgA⁺ плазматических клеток *in vitro*

B220-IgA⁺ плазматические клетки были отсортированы при помощи клеточного сортера Aria II (см. выше). 10 000 отсортированных клеток культивировались в присутствии BAFF и IL-6 в течение 24 часов, после чего оценивалось количество IgA, производимого на клетку.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием GraphPad Prism 10. Выборки проверяли на нормальность распределения по критерию Д'Агостина-Пирсона. При

нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента для сравнения двух групп или однофакторный дисперсионный анализ one-way ANOVA и тест Тьюки для сравнения нескольких групп. В противном случае использовали непараметрические тесты Манна-Уитни или Крускала-Уоллиса. При анализе кривых титрования проводили обсчет площади под кривой (Area under curve, AUC) или полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Данная работа посвящена изучению взаимодействия микробиоты и иммунной системы слизистых оболочек в контексте измененной диеты с преобладанием сахара, а также в контексте иммунного ответа против коронавируса SARS-CoV-2, в связи с чем была разделена на две основные части. На первом этапе работы была исследована кросс-регуляция компонентов микробиоты и иммунного ответа против белка Spike SARS-CoV-2 путем молекулярной мимикрии. В данной части определяли различные бактерии и их антигены, которые распознаются антителами против Spike-SARS-CoV-2 и способны индуцировать противовирусный иммунный ответ, а также исследовали изменение состава микробиоты при вакцинации против SARS-CoV-2. В ходе второго этапа работы изучали изменение состава микробиоты при диете с повышенным содержанием глюкозы, определяли механизмы индукции и специфичность IgA-антител при такой диете.

Кросс-регуляция иммунного ответа против Spike-белка SARS-CoV-2 и комменсальной микробиоты путем молекулярной мимикрии

Вирус SARS-CoV-2 попадает в клетки путем взаимодействия Spike-белка вируса с рецептором ACE-2, который экспрессирован на различных клетках, включая эпителий (Wang, et al., 2020). В основном поражаются эпителиальные клетки легочных путей, но вирус также обнаруживается в эпителии клеток кишечника (Lamers, et al., 2020). Spike-белок содержит рецептор-связывающий домен RBD, который обуславливает взаимодействие с ACE-2. Блокирование взаимодействия RBD с ACE-2 моноклональными антителами против RBD-Spike предотвращает инфекцию клеток (Wu et al., 2020). При этом системные антитела в крови (IgG, IgM, IgA₁) играют важную роль в элиминации вируса после успешной инфекции, тогда как секретируемые антитела на слизистых оболочках (IgA₂, IgM, IgG) важны для предотвращения инфекции (Renegar et al., 2004). Применение различных вакцин, в том числе на основе мРНК, кодирующей Spike-белок SARS-CoV-2, индуцирует иммунный ответ против вируса (Sano et al., 2022), в том числе и выработку анти-Spike-антител на слизистых ротовой и носовой полостей, однако механизмы поддержания уровня таких антител остаются невыяснены.

Помимо этого, существуют данные, что в некоторых индивидуумах, которые не были ранее инфицированы SARS-CoV-2, детектируются секретируемые антитела IgA-изотипа против RBD домена SARS-CoV-2 (Majdoubi, et al., 2021). Тем не менее, источник антигена для индукции таких антител до сих пор остается не выясненным.

Имуноглобулины секретируются путем активного транспорта через слой эпителиальных клеток. На базальной стороне эпителиальных клеток расположены специфические для антител рецепторы: неонатальный Fc-рецептор (FcRn) и рецептор для

полимерных иммуноглобулинов pIgR (Spiekermann et al., 2002). Рецептор pIgR экспрессируется на эпителии как желудочно-кишечного тракта, так и носоротолотки, и обеспечивает транспорт IgA и IgM. В свою очередь, во взрослом организме FcRn экспрессируется только эпителиальными клетками оральной полости и принимает участие в транспорте IgG в данном компартменте. В связи с этим в слюне здоровых индивидуумов содержатся иммуноглобулины A, M G, тогда как в просвете кишечника содержится только IgA и IgM (Рис. 5 А, Б). Исходя из этого, нами было предположено, что при вакцинации против SARS-CoV-2 индуцируемые антитела могут транспортироваться по описанным выше механизмам на слизистые оболочки и взаимодействовать с компонентами микробиоты, модулируя их биологию.

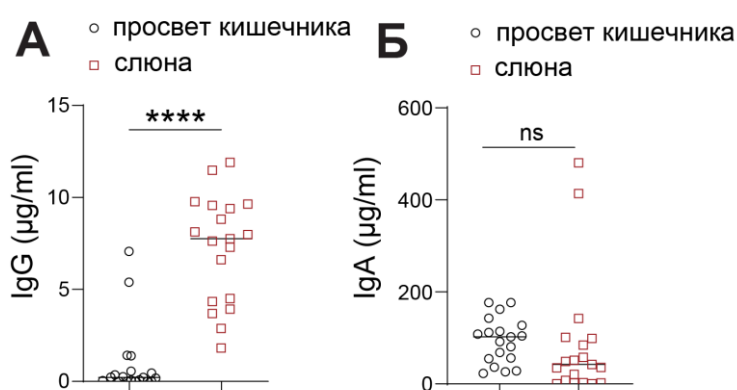


Рисунок 5. В оральной полости у людей содержатся антитела классов IgA и IgG. А и Б. Концентрации IgG и IgA соответственно в слюне и в просвете кишечника у здоровых доноров. Каждая точка представляет одного участника. Горизонтальные линии отображают медиану. В (А) и (Б) использовался тест Манна-Уитни. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. **** - $p < 0,0001$; ns - не значимо, $n=19$.

Изменение состава микробиоты оральной полости при вакцинации мРНК-вакциной против SARS-CoV-2 ассоциировано с индукцией антител против Spike в слюне

Для изучения взаимодействия антител, индуцируемых при вакцинации против SARS-CoV-2, с микробиотой в течение первого месяца после иммунизации, нами была набрана когорта из 19 доноров (18 из них не были прежде инфицированы вирусом SARS-CoV-2 на основе отсутствия антител против нуклеокапсидного белка NCP SARS-CoV-2) (Таблица 3 и Рис. 6). Нами были оценены титры антител IgA и IgG против Spike-белка коронавируса в ротовой полости в течение первого месяца после первой иммунизации мРНК-вакциной BNT162b2 (Рис. 7 А). В качестве антигена для иммуноферментного анализа была использована рекомбинантная S1 субъединица Spike-тримера. Через 21 день после первой вакцинации титры IgG-антител к S1 детектировались у 53 % (10 из 19) доноров, тогда как через 7 дней после бустерной вакцинации титры IgG-антител к S1 определялись у всей когорты (Рис. 7 А).

Продукция IgG антител специфических к S1 субъединице Spike белка в ротовой полости коррелировала с индукцией анти-Spike IgG-антител в сыворотке (Рис. 7 Б).

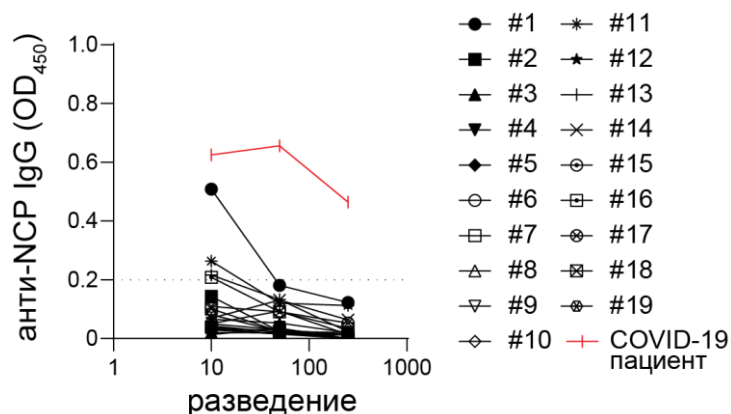


Рисунок 6. Для исследования были отобраны здоровые доноры на основе отсутствия антител IgG против нуклеокапсидного белка NCP SARS-CoV-2. Связывание сывороточных IgG-антител с белком NCP SARS-CoV-2 на 0-й день исследования вакцинации BNT162b2. Данные представлены в виде кривых титрования для каждого донора. Красным выделен положительный контроль (пациент с COVID-19). Горизонтальная пунктирная линия отображает cut-off, n=19.

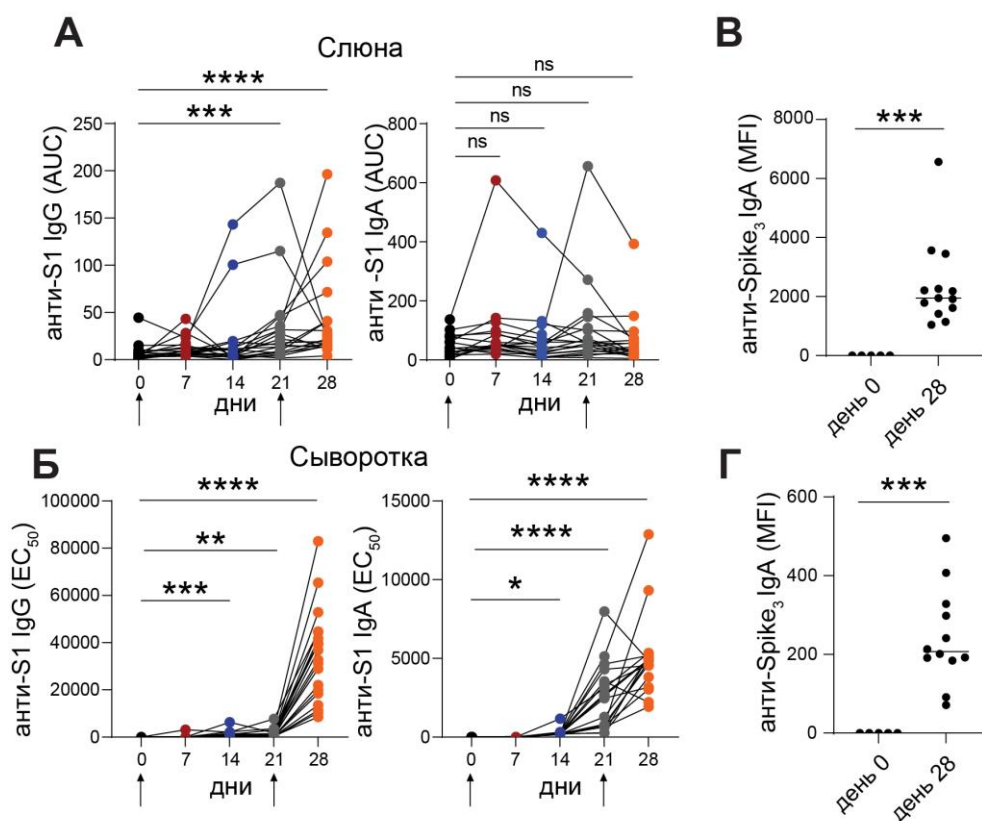


Рисунок 7. Антительный иммунный ответ в течение первого месяца после вакцинации BNT162b2. А. Уровни анти-S1 IgG (слева) и IgA (справа) в слюне здоровых людей, привитых вакциной BNT162b2. Б. Уровни анти-S1 IgG (слева) и IgA (справа) в сыворотке крови во время курса вакцинации BNT162b2. Данные на А и Б представлены в виде отдельных точек до и в разные дни после вакцинации; вертикальными стрелками отображены дни иммунизаций (дни 0 и 21). Точки на (А) представляют значения AUC; точки на (Б) представляют значения EC₅₀. Уровни IgG (В) и IgA (Г) в слюне против тримера Spike₃ до и после вакцинации. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) для 293Т-клеток, экспрессирующих Spike, по отношению к нетрансфицированным 293Т-клеткам. На графике горизонтальная линия показывает медиану. В (А и Б) использовался непараметрический one-way ANOVA тест Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$; ns – не значимо, n=12-19.

Несмотря на увеличение титров антител IgA, реактивных к S1-SARS-CoV-2 в сыворотке после вакцинации, увеличение продукции анти-S1 IgA в ротовой полости обнаружено не было (Рис. 7 А, Б). Мы предположили, что спектр реактивности IgA-антител может не ограничиваться S1-субъединицей, поэтому далее нами была проверена реактивность IgA до и после вакцинации к полноразмерному Spike₃-белку с использованием транзientной трансфекции клеточной линии 293Т, плазмидой, кодирующей Spike₃. Нами была обнаружена реактивность IgA-антител к тримеру Spike₃ после вакцинации, но не у наивных доноров, что следует из цитофлуориметрического анализа Spike₃-293Т-клеток (Рис. 7 В, Г). Таким образом, вакцинация мРНК-вакциной BNT162b2 индуцировала анти-Spike IgG и IgA в ротовой полости, что также соответствует ранее опубликованным данным (Sheikh-Mohamed et al., 2022).

Поскольку вакцинация приводит к появлению антител против белка Spike вируса SARS-CoV-2 в полости рта, мы провели анализ профиля связывания бактерий оральной полости секретируемыми антителами во время вакцинации. Мы обнаружили высокий уровень связывания оральной микробиоты антителами IgA и IgG (Рис. 8). При этом большинство бактерий были связаны как с антителами IgA, так и с IgG (Рис. 8 Б). Далее анализ на различных временных точках после вакцинации показал увеличение доли IgG⁺IgA⁺-покрытых бактерий в слюне на 21-й день после вакцинации, когда индуцировалась значительная часть антител против Spike-SARS-CoV-2 (Рис. 7). Исходя из данных на Рис. 8 и литературных данных о функциональной значимости связывания микробиоты антителами, нами было предположено, что антитела против Spike, индуцируемые вакцинацией, могут способствовать изменению микробиоты.

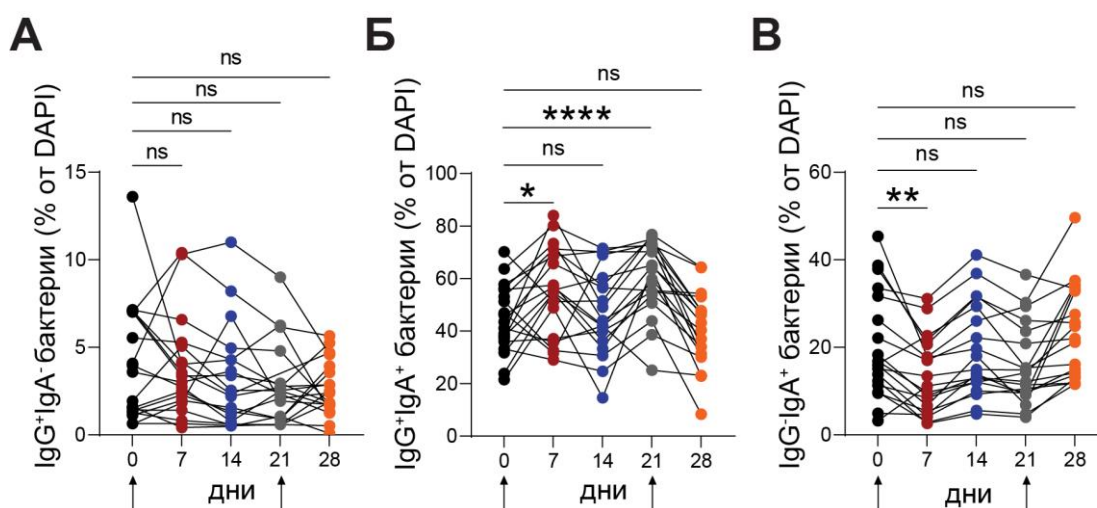
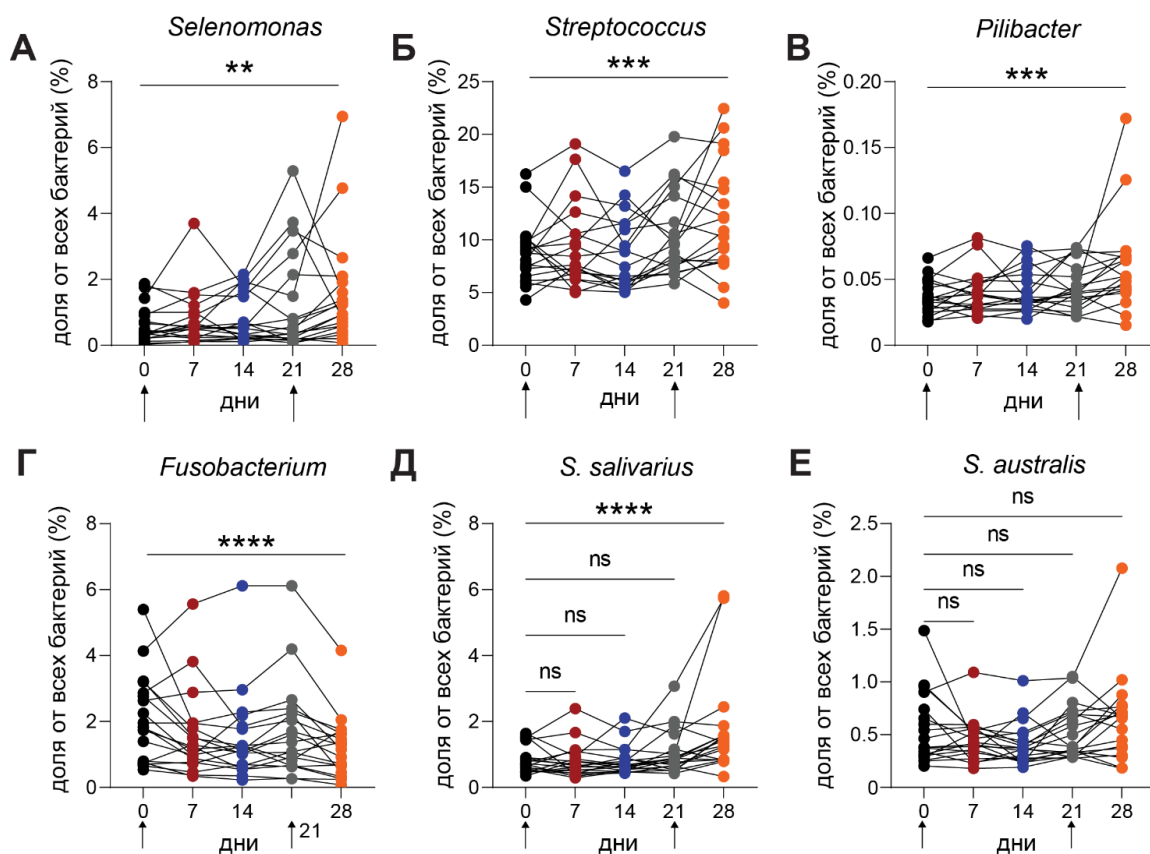
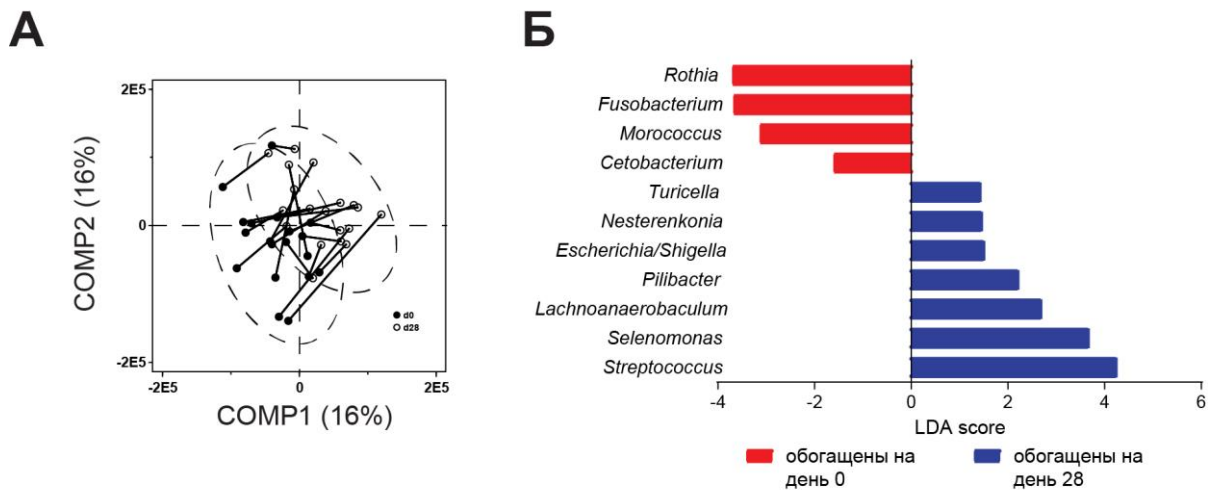


Рисунок 8. Доли IgG⁺IgA⁻, IgG-IgA⁺ и IgG⁺IgA⁺ - покрытых бактерий в слюне в ходе вакцинации BNT162b2. А, Б, В Доли IgG⁺IgA⁻, IgG-IgA⁺ и IgG⁺IgA⁺ - покрытых бактерий в слюне при вакцинации BNT162b2 на день 0, 7, 14, 21, 28 после первой дозы. Данные на (А, Б, В) представлены в виде отдельных точек до и после вакцинации; вертикальными стрелками отображены дни иммунизаций (день 0 и 21). Для (А, Б, В) использовался непараметрический one-way ANOVA тест Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. $P < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$; ns – не значимо, $n=19$.



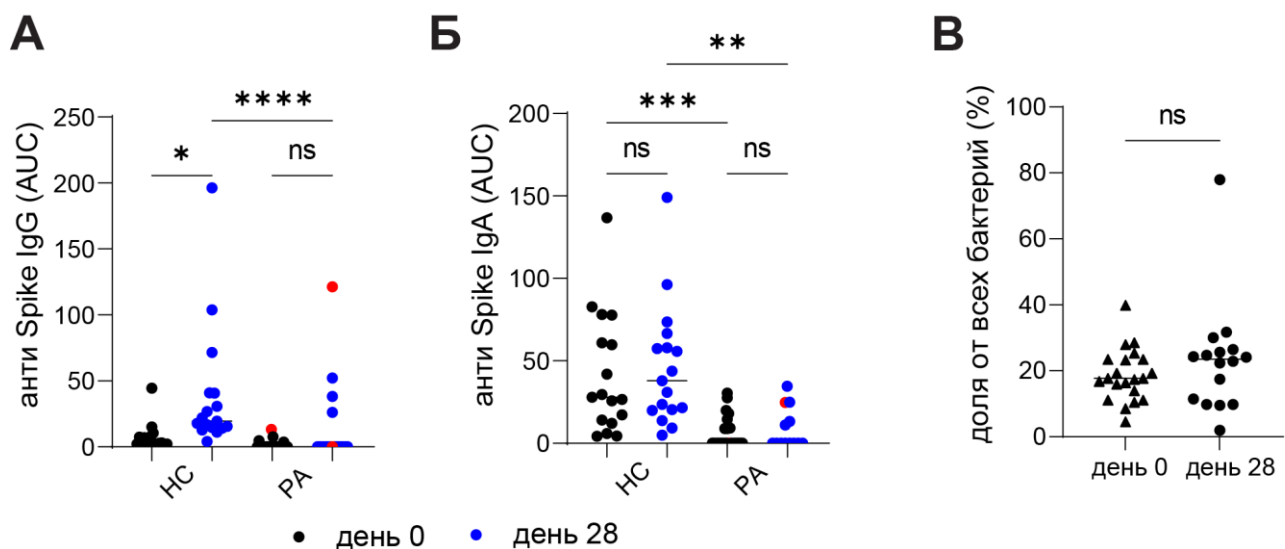


Рисунок 11. Пациенты с ревматоидным артритом (РА) не развивают антительного ответа в ротовой полости против белка Spike в течение первого месяца после вакцинации. А и Б. Анти-Spike S1 IgG и IgA соответственно в слюне до вакцинации и через 7 дней после второй вакцинации (день 28) у здоровых доноров (НС) и пациентов с РА. Ранее инфицированные SARS-CoV-2 индивидуумы показаны красным цветом. AUC – площадь под кривой. **В.** Относительная численность бактерий рода *Streptococcus* у пациентов с РА во время вакцинации COVID-19. В (А и Б) данные были проанализированы с помощью непараметрического one-way ANOVA теста Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. Для (В) использовался непарный t-тест использовался для * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$; ns – не значимо, $n=19-23$.

Чтобы проанализировать влияние анти-Spike IgG-антител, вызванных вакцинацией, на бактериальный состав, мы сравнили микробиоту слюны до и после вакцинации у нашей когорты. Состав микробиоты в день 0 и в день 28 после первичной вакцинации кластеризовался отдельно, как показал анализ главных компонент (PCA) (Рис. 9 А). Последующее сравнение состава микробиоты полости рта с помощью линейного дискриминантного анализа (LDA) в сочетании с измерением размера эффекта (LEfSe) в день 0 и в день 28 на уровне родов показало, что на 28-й день микробиота полости рта была обогащена родами *Turicella*, *Nesterenkonia*, *Escherichia/Shigella*, *Pillibacter*, *Lachnoanaerobaculum*, *Selemonas* и *Streptococcus*, а *Rothia*, *Fusobacterium*, *Morococcus* и *Cetobacterium* были снижены (Рис. 9 Б). Дополнительный анализ относительного содержания бактериальных родов также показал, что на день 28 после вакцинации микробиота была обогащена родами *Pillibacter*, *Selemonas* и *Streptococcus*, в то время как доля рода *Fusobacterium* уменьшалась (Рис. 10 А-Г). Дополнительная классификация родов *Streptococcus* показала, что частота *Streptococcus salivarius*, но не *Streptococcus australis*, значительно увеличилась в полости рта на день 28 после вакцинации у 14 из 19 участников (Рис. 10 Д, Е). Интересно, что пациенты с ревматоидным артритом (РА) не развивают антитела в ротовой полости против белка Spike в течение первого месяца после вакцинации (Рис. 11 А, Б). Кроме этого, анализ микробиоты оральной полости у пациентов с РА во время вакцинации показал также отсутствие прироста бактерий рода *Streptococcus* (Рис. 11 В). Таким образом, в ходе первого месяца вакцинации против SARS-CoV-2 наблюдается изменение микробиоты,

выражающееся в росте бактерий *Streptococcus*, что связано с индукцией антител против Spike-белка SARS-CoV-2.

Слизистая оболочка кишечника также густо заселена микробиотой, компоненты которой регулируются антителами преимущественно IgA-изотипа. Поскольку нами наблюдалась индукция Spike-специфических IgA-антител в ходе вакцинации против SARS-CoV-2, было предположено, что они могут при секреции связываться с антигенами микробиоты и модулировать ее состав. Поэтому было проанализировано, как вакцинация может влиять на состав фекальной микробиоты в течение первого месяца после вакцинации. Во-первых, индукция анти-SARS-CoV-2 IgA-антител в просвете кишечника течение 28 дней после первичной вакцинации не наблюдалась (Рис. 12 А). Последующий анализ показал, что три семейства бактерий *Leptotrichiaceae*, *Xanthomonadaceae* и *Succinivibrionaceae* изменились в фекальной микробиоте между днем 0 и днем 28 после первичной дозы вакцины (Рис. 12 Б). Примечательно, что эти семейства бактерий представляют собой минорные (относительная численность менее 0,1 %) компоненты микробного сообщества кишечника. Таким образом, в ходе первого месяца после вакцинации против SARS-CoV-2, наблюдается изменение в составе оральной, но не фекальной микробиоты, что коррелирует с продукцией Spike-специфических антител в ротовую полость.

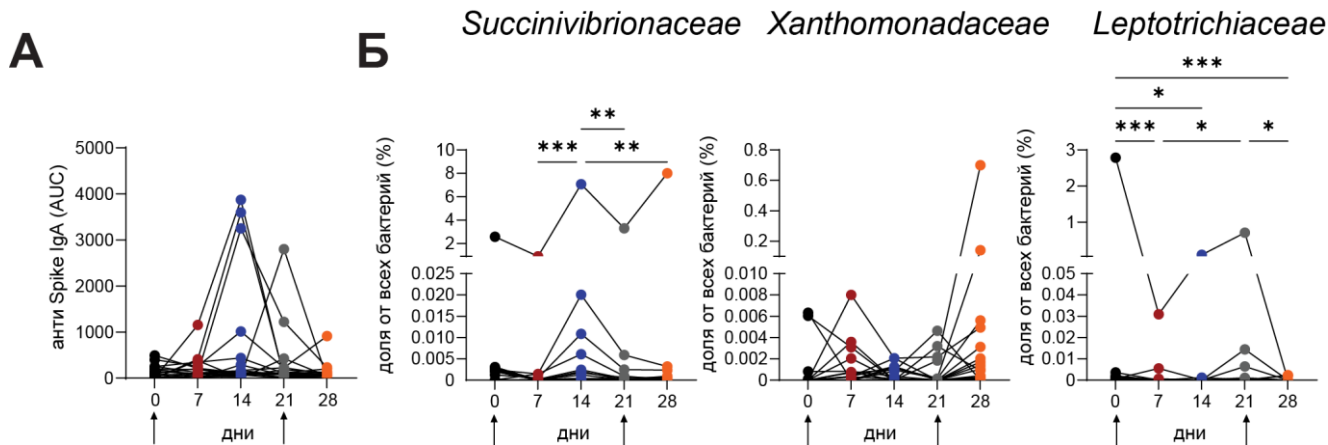


Рисунок 12. Индукции IgA-антител против Spike-белка и изменения состава микробиоты кишечника в течение первого месяца после вакцинации BNT162b2 не происходит. А. Титры IgA-антител, специфичных к Spike белку, в различные временные точки. Б. Относительная численность семейств бактерий *Leptotrichiaceae*, *Xanthomonadaceae* и *Succinivibrionaceae* во время вакцинации BNT162b2. Данные представлены в виде отдельных точек до и после вакцинации; вертикальными стрелками отображены дни иммунизаций (день 0 и 21). Для анализа использовался непараметрический one-way ANOVA тест Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$; ns – не значимо, $n=19$.

Антитела против Spike-белка распознают различные компоненты микробиоты путем молекулярной мимикрии

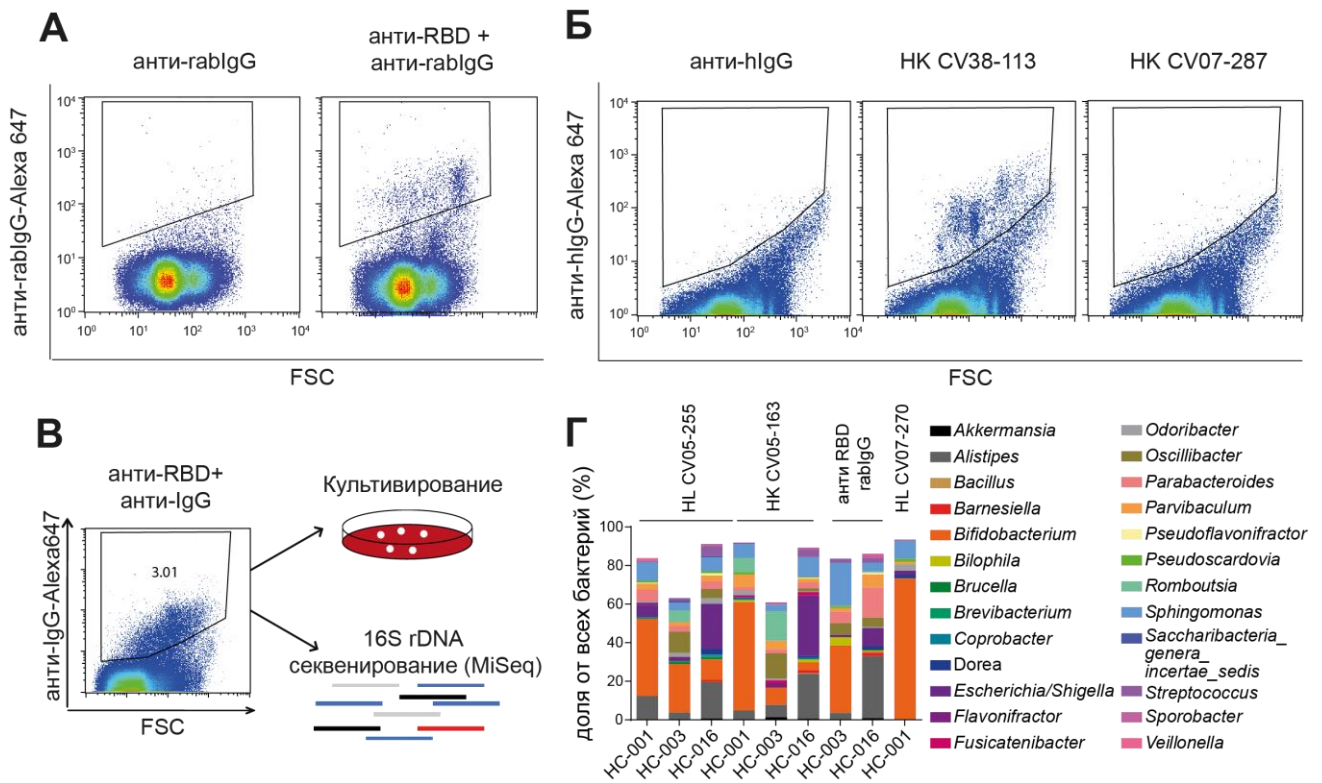


Рисунок 13. Нейтрализующие анти-RBD-антитела распознают различные комменсальные бактерии. **А.** Репрезентативные дот-плот графики микробиоты кишечника человека, окрашенной нейтрализующим кроличьим анти-RBD-антителом. Слева показано связывание вторичного анти-кроличьего IgG-Alexa 647-антитела к тому же образцу. **Б.** Репрезентативные дот-плот графики микробиоты кишечника человека, окрашенной моноклональными нейтрализующими человеческими анти-RBD-антителами, полученными от пациентов с COVID-19 (клоны НК CV38-113 и НК CV07-287). Слева график показывает связывание вторичного анти-человеческого IgG-Alexa 647 антитела к тому же образцу. **В.** Стратегия идентификации бактерий, которые связываются различными анти-RBD антителами. **Г.** Относительная численность отсортированных бактерий здоровых людей (healthy controls, HC), связанных с соответствующими анти-RBD-антителами. Регион 16S rRNA V3-V4 отсортированных бактерий был секвенирован и аннотирован к соответствующим бактериям. Долю каждого рода рассчитывали по отношению к количеству общих прочтений. Роды, численность которых превышала 0,1 %, были отобраны для анализа, n=12.

Так как изменения в составе слюнной микробиоты после вакцинации коррелировали с индукцией антител против Spike-SARS-CoV-2, то на следующем этапе мы предположили, что специфические антитела против Spike могут связываться с отдельными бактериями и влиять на их представленность. Для проверки этой гипотезы мы проанализировали реактивность нейтрализующих антителами, специфичными к домену RBD Spike-белка SARS-CoV-2 (Рис. 13 А, Б) к кишечной микробиоте здоровых, не вакцинированных людей (Kreye, et al., 2020). Используя цитофлуориметрический анализ, мы обнаружили ряд антител против RBD, которые окрашивали специфические популяции бактерий, что указывает на то, что связанные бактерии могут экспрессировать поверхностные антигены, имитирующие домен RBD SARS-CoV-2-вируса. Чтобы определить бактерии, связывающиеся с антителами против RBD, мы выделили

эти бактерии методом сортировки клеток с помощью FACS и определили их видовую принадлежность по *16s RNA* (Рис. 13 В). Бактерии, распознаваемые вторичными антителами (анти-hIgG, анти-rabIgG), были исключены из анализа. Нами были определены несколько бактериальных штаммов, которые распознавались одним или несколькими антителами против RBD (Рис. 13 Г). Моноклональные человеческие антитела против RBD демонстрировали специфичность к родам *Streptococcus*, *Escherichia*, *Bifidobacteria* и другим (Рис. 13 Г). Параллельно с секвенированием, отсортированная фракция бактерий культивировалась с использованием разнообразных культуральных микробиологических сред, и были выделены штаммы бактерий, распознаваемые данными антителами (Рис. 13 В). Далее полученные клоны бактерий были идентифицированы секвенированием по Сэнгеру по гену *16s rRNA*, среди которых были обнаружены также бактерии рода *Streptococcus*, *Bifidobacteria* и другие. Интересно, что *Streptococcus salivarius*, который был обнаружен в повышенном количестве в полости рта вакцинированных людей, распознавался тремя человеческими моноклональными антителами против Spike и антителами против RBD, полученными из кроликов (Рис. 10 Д, 13 Г). Таким образом, антитела против RBD-домена Spike-белка SARS-CoV-2 специфично распознают поверхностные антигены на бактериях *Streptococcus*, *Bifidobacteria* и других.

Индукция кросс-реактивных анти-Spike антител штаммами комменсальной микробиоты

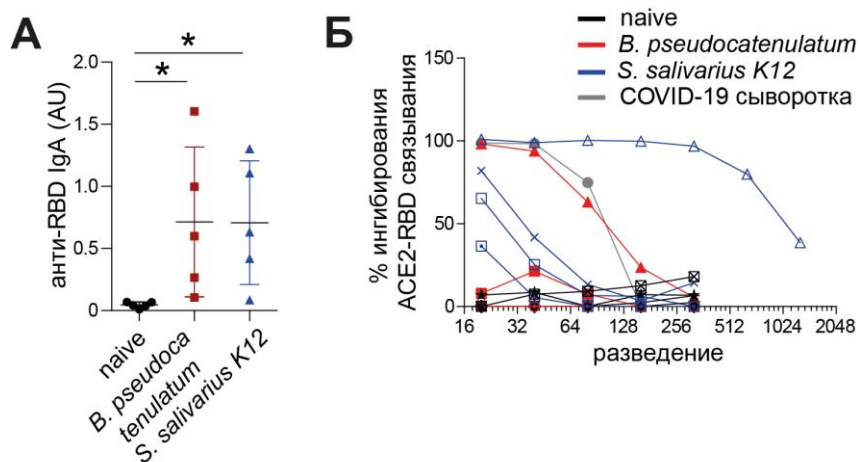


Рисунок 14. Индукция кросс-реактивного ответа против RBD SARS-CoV-2 комменсальными бактериями у мышей дикого типа. **А.** Индукция IgA-ответа в кишечнике против RBD путем перорального введения живых бактерий. Мышам перорально вводили суспензию бактерий в буфере PBS каждый второй день, как описано в гл. 2 «Материалы и методы». **Б.** *In vitro* ингибирование связывания ACE2-RBD супернатантами фекалий мышей из (А). В качестве положительного контроля была использована сыворотка пациента с COVID-19. Данные в (А) представлены как среднее \pm SD. Каждая линия на рисунке (Б) представляет одно животное. Для анализа (А) использовался непараметрический one-way ANOVA тест Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; ns – не значимо, $n=5$, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

Выявив различные бактерии, распознающиеся антителами против RBD, мы предположили, что эти бактерии могут также вызывать кросс-реактивные антитела к RBD-домену Spike-белка

SARS-CoV-2 *in vivo*. Среди выделенных бактерий (Рис. 13) далее мы сосредоточились на *S. salivarius* и *B. pseudocatenulatum*, принимая во внимание, что количество *S. salivarius* увеличивается у людей после первого месяца после вакцинации (рис. 10 Д), а количество *B. pseudocatenulatum* обратно коррелирует с развитием острого пост-COVID-19 синдрома (Liu et al., 2022a). Для проверки данной гипотезы мыши дикого типа C57Bl/6 получали перорально пробиотический штамм *S. salivarius* K12 или *B. pseudocatenulatum*. Через 21 день в фекалиях мышей, которых кормили как *S. salivarius* K12, так и *B. pseudocatenulatum*, были обнаружены IgA-антитела, реагирующие к RBD (рис. 14 А), которые также ингибировали связывание RBD с ACE2, что свидетельствует о нейтрализующей способности этих RBD-связывающих антител (рис. 14 Б).

Полученные данные свидетельствуют о том, что эти бактерии могут экспрессировать на поверхности антиген, мимикрирующий под RBD, тем самым индуцируя кросс-реактивные антитела против самого поверхностного антигена каждой из определенных бактерий, так и против RBD. Для определения молекулярных паттернов бактерий, мимикрирующих под RBD, нами были проанализированы лизаты выделенных бактерий на связывание анти-RBD-антителами, выделенными из кролика, и пациентов с SARS-CoV-2 методом вестерн-блот (Рис. 15 А, В). Для *Streptococcus salivarius* выяснилось, что антитела к RBD-SARS-CoV-2 связываются к белку с молекулярной массой около 75 кДа (Рис. 15 А), тогда как для *Bifidobacterium pseudocatenulatum* к белку с молекулярной массой приблизительно 70 кДа (Рис. 15 В). Дальнейший масс-спектрометрический анализ установил, что данные белки представляют собой белок RSSL_01370, который по природе является декстрансуказой и белок-транспортёр олигопептидов OppA1 соответственно. Последующая оверэкспрессия данных антигенов в *E. coli* также подтвердила, что именно белки RSSL_01370 и OppA1 распознаются антителами против RBD Spike-белка SARS-CoV-2 (Рис. 15 Б, Г). Более того, иммунизация рекомбинантными бактериальными белками RSSL_01370 и OppA1 мышей дикого типа приводила к индукции системного IgG-ответа против S1-домена Spike-белка SARS-CoV-2 (Рис. 16 А, Б). Все это свидетельствует о том, что данные бактериальные белки могут индуцировать кросс-реактивные антитела против Spike-SARS-CoV-2 *in vivo*. Структурный анализ последовательности RSSL_01370 с использованием программы AlphaFold выявил предполагаемую структуру белка, а также при помощи сравнения последовательностей RSSL_01370 и RBD нами был выявлен участок в RSSL_01370, который частично перекрывается с RBD₄₈₀₋₄₉₆, представляющим рецептор-связывающий мотив (receptor binding motif, RBM) (Рис. 17 А, Б). Таким образом, данные подтверждают, что различные

симбиотические микроорганизмы могут экспрессировать белки, которые мимикрируют под RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2.

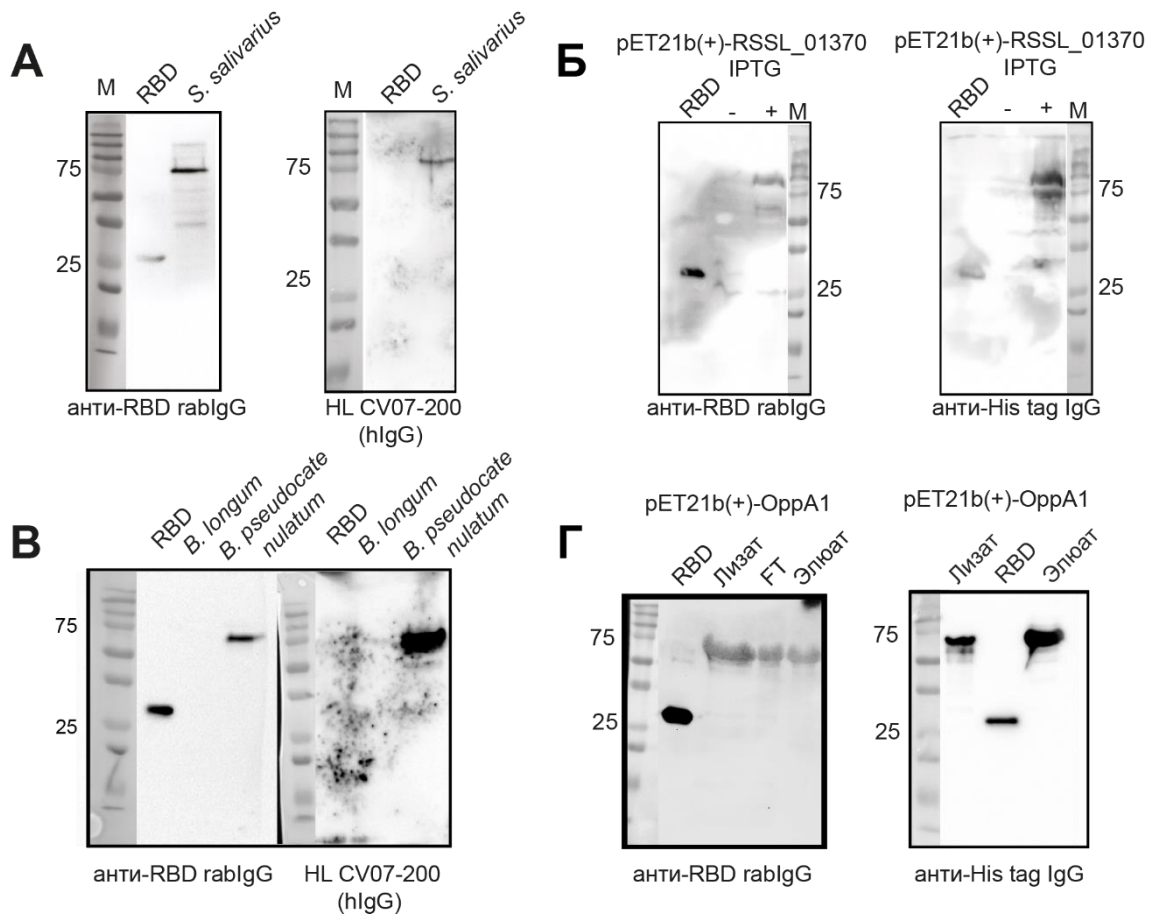


Рисунок 15. Комменсальные бактерии экспрессируют на поверхности антигены, мимикрирующие под RBD, которые распознаются различными нейтрализующими антителами против SARS-CoV-2. А. Вестерн-блот анализ связывания кроличьих анти-RBD и человеческого HL CV07-200 с лизатом *S. salivarius*, полученным из микробиоты человека. Б. Вестерн-блот анализ связывания кроличьего анти-RBD с белком RSSL-01370 бактерии *S. salivarius*, сверхэкспрессированным в *E. coli*. В. Вестерн-блот анализ связывания кроличьих анти-RBD и человеческого HL CV07-200 с лизатами *B. longum* и *B. Pseudocatenulatum*, полученными из микробиоты человека. Г. Вестерн-блот анализ связывания кроличьего анти-RBD с белком OppA1 бактерии *B. pseudocatenulatum*, сверхэкспрессированному в *E. coli*. Оверхэкспрессию заклонированных в вектор pET21b(+) белков оценивали по окрашиванию мембраны антителами против His-tag (рисунки справа на Б, Г). Во всех экспериментах использовали рекомбинантный SARS-CoV-2 RBD-His-Tag в качестве положительного контроля, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

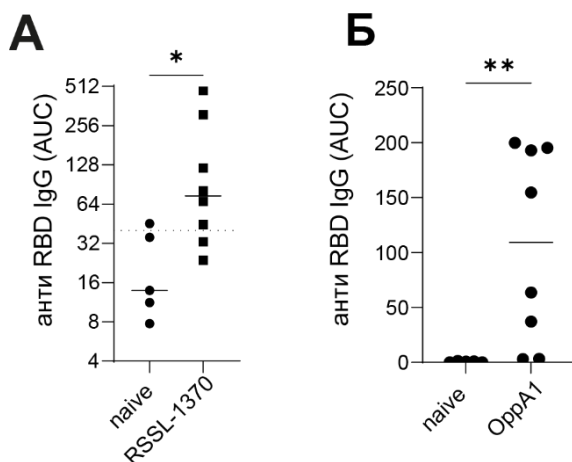


Рисунок 16. Иммунизация бактериальными белками приводит к индукции анти-RBD-антител в сыворотке у мышей дикого типа. Уровни анти-RBD в сыворотке крови мышей, иммунизированных очищенными белками RSSL-01370 (А) и OppA1 (Б). Данные отображены как отдельные значения AUC и медиана. Для анализа использовался тест Манна-Уитни. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$. AUC – площадь под кривой, $n=5-8$, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

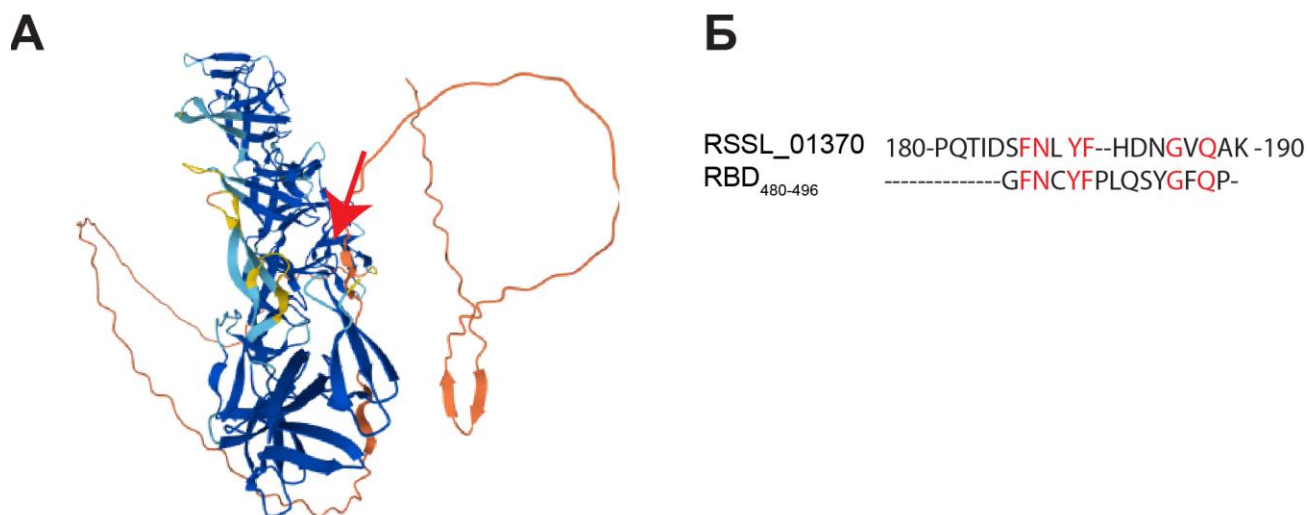


Рисунок 17. Белки RSSL_01370 и Spike имеют схожие мотивы. А. Структура декстрансукразы RSSL_01370 *S. Salivarius*; красной стрелкой показан предполагаемый эпитоп, распознающийся анти-RBD антителами. Б. Сравнительный анализ последовательностей RSSL_01370 и RBD. Красным отображены перекрывающиеся аминокислоты, представляющие предполагаемый эпитоп.

На следующем этапе мы проанализировали способность кросс-реактивного иммунитета, вызванного иммунизацией бактериями *S. salivarius K12* и *B. Pseudocatenulatum*, к снижению тяжести симптомов, вызванных инфекцией вирусом SARS-CoV-2. Для этого мыши K18-hACE2 Tg были дважды проиммунизованы данной бактериальной смесью, и через 7 дней после повторной иммунизации подвергались инфекции вирусом SARS-CoV-2 B1.1 с TCID₅₀ 10⁴.

В качестве положительного контроля была использована группа мышей, которая до инфекции была проиммунизована вакциной CoviVac (Рис. 18). Интересно, что нами был отмечен ускоренный процесс элиминации вируса из легких (Рис. 19 А, Б), хотя общее течение заболевания не показало значительного улучшения (данные не показаны), подтверждая, что кросс-реактивные антитела играют важную роль в контроле вирусной нагрузки в организме. Важно отметить, что мыши, иммунизированные CoviVac, также демонстрировали

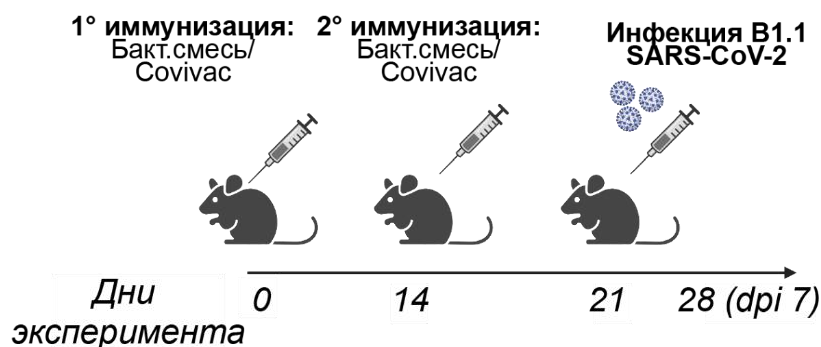


Рисунок 18. Схема эксперимента иммунизации мышей *S. salivarius K12* и *B. pseudocatenulatum* с последующей инфекцией вирусом B1.1 SARS-CoV-2. Мыши K18-hACE2 Tg были дважды проиммунизованы данной бактериальной смесью и через 7 дней после повторной иммунизации подвергались инфекции вирусом SARS-CoV-2 B1.1 с TCID₅₀ 10⁴. На протяжении всего эксперимента собиралась кровь для анализа титров антител к Spike. По окончании эксперимента выделяли легкие для анализа содержания вируса SARS-CoV-2. n=10-13.

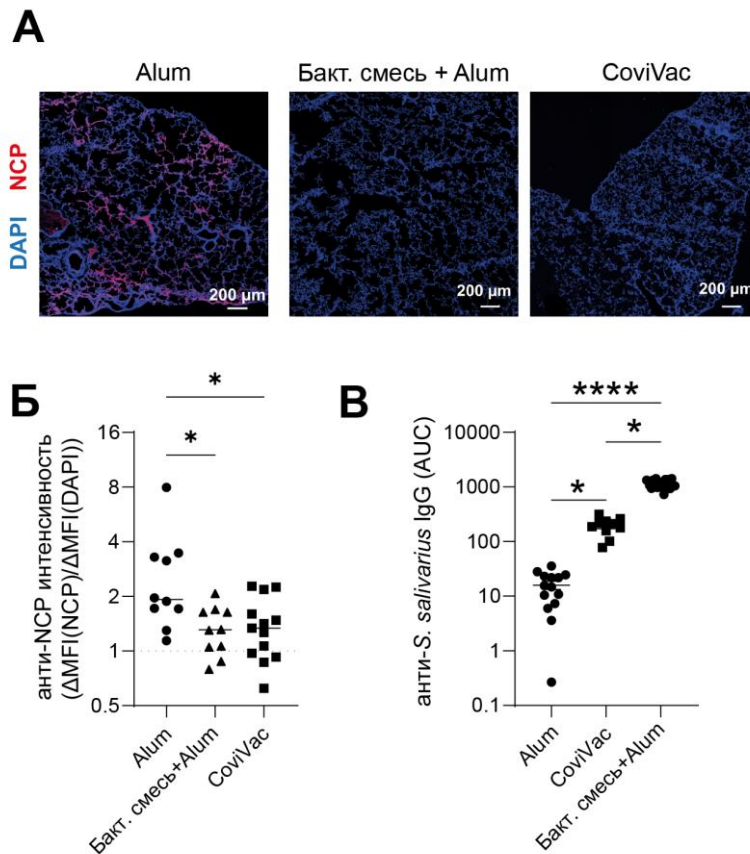


Рисунок 19. Иммунизация мышей *S. salivarius* K12 и *B. pseudocatenulatum* с последующей инфекцией вирусом B1.1 SARS-CoV-2 способствует ускоренной очистке легких от вируса. А. Иммунофлуоресцентный анализ на белок NCP в легких мышей K18-hACE2 Tg, инфицированных B1.1 SARS-CoV-2, на 7-й день после заражения. **Б.** Статистический анализ интенсивностей окрашивания белка NCP в легких мышей B1.1 SARS-CoV-2, инфицированных K18-hACE2 Tg, на 7-й день после заражения. **В.** Реактивность сыворотки мышей, K18-hACE2 Tg, инфицированных B1.1 SARS-CoV-2, иммунизированных бактериальной смесью или CoviVac. Для анализа использовался непараметрический one-way ANOVA Крускала-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; **** - $p < 0,0001$; ns - не значимо, $n=10-13$.

производство IgG-антител, реагирующих к *S. salivarius* (Рис. 19 В), подчеркивая дополнительное взаимодействие между иммунным ответом на вирус и определенными бактериальными штаммами.

Учитывая данные об индукции антител против Spike при оральной иммунизации мышей бактерией *S. salivarius*, а также то, что данная бактерия является одним из доминирующих видов среди компонентов микробиоты оральной полости, содержание которой специфически амплифицируется при вакцинации против SARS-CoV-2, мы проанализировали, влияет ли пероральный прием пробиотика *S. salivarius* BLIS K12 на уровень специфических антител к Spike-белку у вакцинированных ранее доноров. Для этого вакцинированные доноры, у которых последняя вакцинация была проведена не менее, чем за три месяца до включения в исследование, получали перорально 10^7 КОЕ *S. salivarius* K12 ежедневно в течение двух недель (Таблица 4). Уровни антител к Spike в слюне и сыворотке крови сравнивали до приема добавки

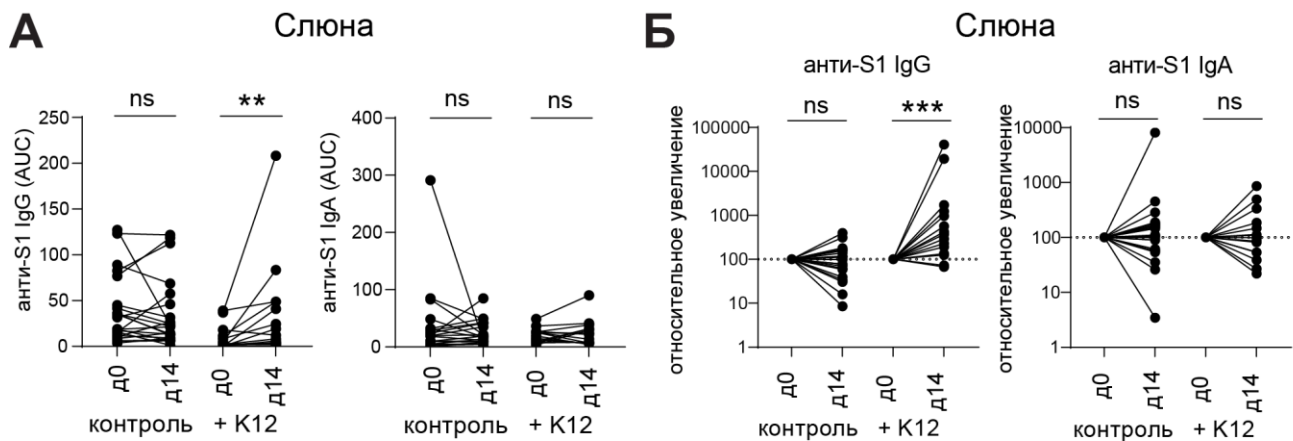


Рисунок 20. Пероральный прием *S. salivarius BLIS K12* может стабилизировать и увеличивать в течение 2 недель концентрацию специфических IgG-антител в ротовой полости вакцинированных против SARS-CoV-2 людей. Абсолютные значения (А) и относительное увеличение (Б) анти-S1 B1.1 SARS-CoV-2 IgG (слева) и IgA (справа) в слюне при пероральном приеме *S. salivarius K12* в течение 2 недель. Связывание оценивали методом ИФА с использованием серийных разведений слюны. Площадь под кривой (AUC) рассчитывалась для каждого образца. Относительное увеличение рассчитывали по следующей формуле: относительное увеличение = $AUC(d14)/AUC(d0) \cdot 100$. Для анализа использовался тест Манна-Уитни. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; ns – не значимо. AUC – площадь под кривой, $n=15-21$.

и через 2 недели. В течение двух недель добавка *S. salivarius BLIS K12* вызвала значительное повышение уровня анти-S1 IgG в слюне 11 из 17 испытуемых, чего не наблюдалось в контрольной группе (Рис. 20). Важно отметить, что мы также наблюдали повышенную реактивность к RBD варианта Omicron/B1.1.29 SARS-CoV-2 (Рис. 21 А). В соответствии с гомологией между RSSL-01370 и пептидом RBM₄₈₀₋₄₉₆ (Рис. 17 Б), добавление *S. salivarius BLIS K12* также увеличивало титры слюнных IgG-антител против RBM₄₈₀₋₄₉₆ (рис. 21 Б). У пяти из 18 участников, получавших K12, также наблюдалось повышение уровня слюнных S1-специфических IgA, но разница не была статистически значимой (рис. 20 А, Б).

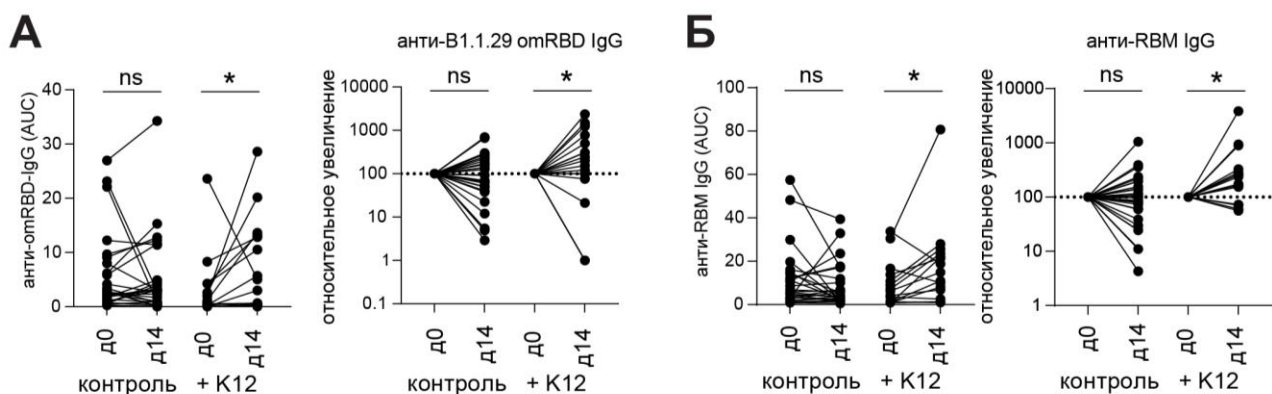


Рисунок 21. Пероральный прием *S. salivarius BLIS K12* может стабилизировать и увеличивать в течение 2 недель концентрацию специфических IgG-антител в ротовой полости вакцинированных против SARS-CoV-2 людей. Абсолютные значения (слева) и относительное увеличение (справа) анти-B1.1.29 RBD IgG (А) в слюне и анти-RBM₄₈₀₋₄₉₆ IgG (Б) при пероральном приеме *S. salivarius K12* в течение 2 недель. Связывание оценивали методом ИФА с использованием серийных разведений слюны. Площадь под кривой (AUC) рассчитывалась для каждого образца. Относительное увеличение рассчитывали по следующей формуле: относительное увеличение = $AUC(d14)/AUC(d0) \cdot 100$. Для анализа использовался тест Манна-Уитни. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; ns - не значимо, $n=15-21$.

Аналогично, сывороточные анти-Spike IgG и IgA титры оставались неизменными после применения *S. salivarius BLIS K12*. Эти данные свидетельствуют о том, что пероральный прием *S. salivarius BLIS K12* может стабилизировать и увеличить в течение 2 недель концентрацию специфических IgG-антител в ротовой полости вакцинированных против SARS-CoV-2 людей.

Таким образом, в данной части работы нами было показано, что отдельные бактерии микробиоты оральной полости участвуют в регуляции мукозального иммунитета против SARS-CoV-2 посредством молекулярной мимикрии RBD-домена Spike-белка SARS-CoV-2, и что они поддерживают локальную продукцию Spike-специфичных IgG-антител.

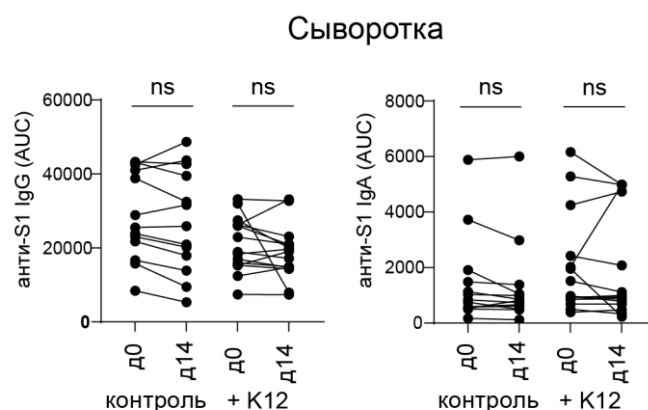


Рисунок 22. Уровни сывороточных анти-S1 IgG и IgA после перорального приема *S. salivarius K12* в течение 2 недель. Связывание оценивали методом ИФА с использованием серийных разведений слюны. Площадь под кривой (AUC) рассчитывалась для каждого образца. Для анализа использовался тест Манна-Уитни. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. ns – не значимо, n=15-21.

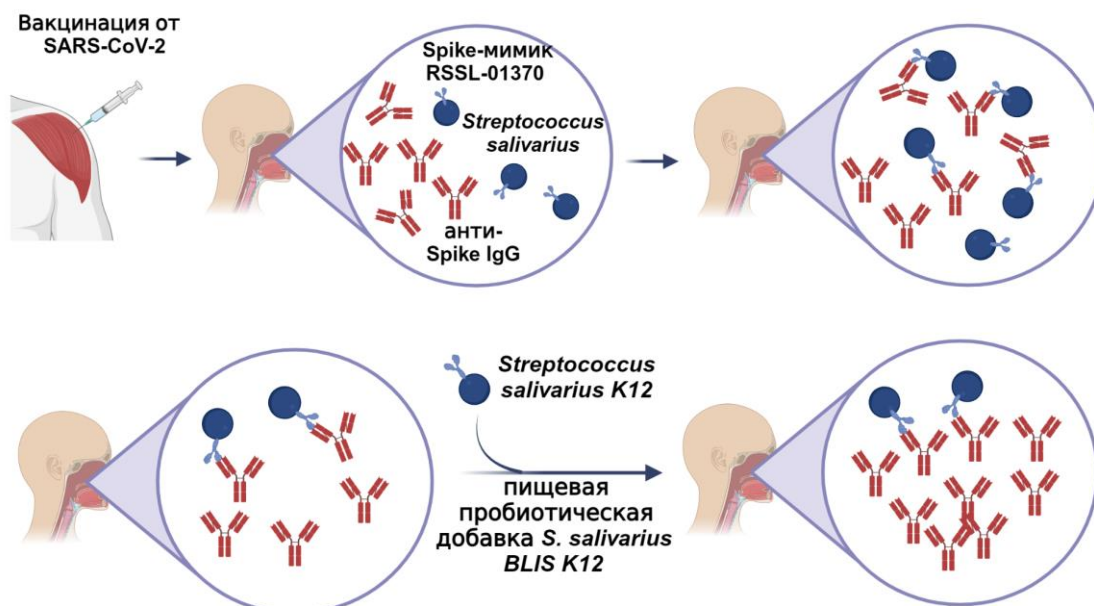


Рисунок 23. Предполагаемый механизм взаимодействия между *Streptococcus salivarius* и иммунной системой через Spike-специфичные антитела. Верхняя линия: при вакцинации против SARS-Cov-2 происходит индукция Spike-специфичных антител, что ассоциировано с изменением роста отдельных компонентов микробиоты в полости рта. А именно происходит рост бактерии *Streptococcus salivarius*, на поверхности которой присутствует молекулярный мимик RBD – RSSL-01370, который распознается антителами против RBD. Нижняя линия: доноры, ранее вакцинированные против SARS-Cov-2, при получении пищевой пробиотической добавки *Streptococcus salivarius BLIS K12* амплифицируют IgG-антитела против Spike SARS-CoV-2.

Кросс-регуляция микробиоты и мукозальной иммунной системы посредством антител в контексте диеты с повышенным содержанием глюкозы

Как уже было сказано, данная исследовательская работа была посвящена изучению взаиморегуляции микробиоты и иммунной системы кишечника в контексте влияния различных внешних факторов. В данной части работы нами было проведено исследование роли диеты с повышенным содержанием глюкозы во взаимодействии между иммунной системой кишечника и населяющей его микробиотой.

Повышенное содержание глюкозы в диете приводит к развитию нетолерантности к глюкозе и к повышению продукции IgA

Диета участвует в физиологических процессах организма, влияя как на метаболизм, так и на его иммунную систему (Marcos et al., 2003). Микробиота кишечника обеспечивает функциональное пищеварение, а также работу иммунной системы, и ее состав определяется диетой. С другой стороны, состав микробиоты регулируется иммунной системой. В то же время то, как диеты различного типа интерферируют во взаимоконтроле между микробиотой и иммунной системой, остается не до конца изученным.

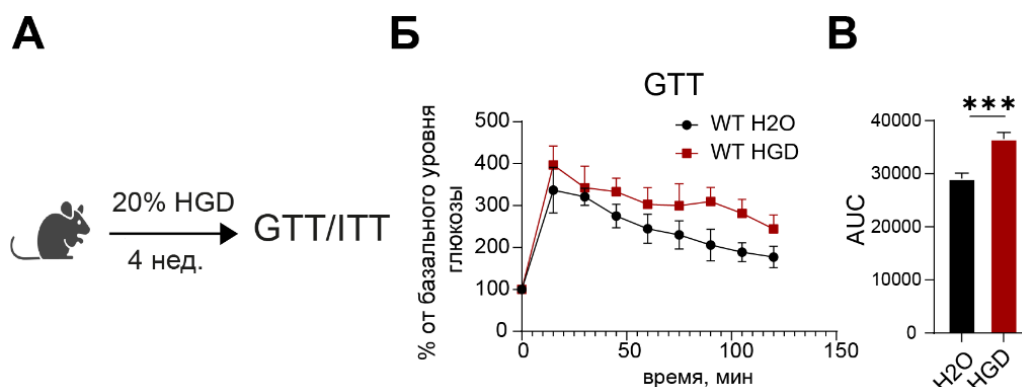


Рисунок 24. Повышенное содержание глюкозы в диете приводит к развитию нетолерантности к глюкозе. А. Схема модели HGD. Б. Глюкозотолерантный тест (GTT) у мышей после HGD по сравнению с мышами контрольной группы (H2O). В. Анализ площади под кривой (AUC) результатов на (Б). Для анализа (В) использовался непарный t-тест. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. *** - $p < 0,001$, $n=5-8$, графики являются репрезентативными трех независимых экспериментов.

Различные питательные вещества нужны не только для выживания организма, но и служат источником роста различного рода комменсальных бактерий. В то же время, увеличенное потребление того или иного продукта способно вести к патологическим изменениям в организме. Так диета с высоким содержанием жиров и сахара приводит к развитию ожирения, хронического воспаления, метаболического синдрома и увеличивает риск развития диабета и сердечно-сосудистых заболеваний. Все перечисленные изменения сопровождаются изменением состава микробиоты. Изменение состава микробиоты может быть направлено как на амплификацию негативных последствий диеты, так и на снижение побочных эффектов

потребляемых продуктов. В случае диеты с повышенным содержанием жиров было показано, что изменения в микробиоте, вызванные таким типом питания, приводят к микробиоте, которая промотирует ожирение также в контексте нормального питания, т.е. обладает патологическими свойствами. В то время как для диеты с высоким содержанием глюкозы это остается до конца невыясненным. Поэтому вторая часть данного исследования была посвящена изучению влияния диеты с высоким содержанием глюкозы на взаиморегуляцию микробиоты и иммунной системы и развитие метаболических изменений в организме. Для этого мыши в течение 30 дней потребляли вместе со стандартным кормом (см. раздел «Материалы и методы») 20 %-й водный раствор глюкозы (high glucose diet, HGD) (Рис. 24 А). Выяснилось, что такая модификация диеты приводила к нарушению толерантности к глюкозе (рис. 24 Б, В). Известно, что повышенный уровень глюкозы в крови ассоциирован с развитием сахарного диабета или, по крайней мере, преддиабетного состояния (Schinner et al., 2005). Повышенная концентрация глюкозы в крови может быть вызвана ухудшенной чувствительностью клеток к глюкозе при нормальной продукции инсулина β -клетками поджелудочной железы или нарушенной продукцией инсулина/гибелью β -клеток островков Лангерганса. Чтобы это выяснить, было проведено гистологическое окрашивание ткани поджелудочной железы на инсулин. Окрашивание срезов поджелудочной железы антителами против инсулина выявило, что при HGD продукция инсулина была слабее по сравнению со стандартной диетой (Рис. 25 А, Б). Это было также подтверждено иммуноферментным анализом на С-пептид в сыворотке крови мышей после HGD (Рис. 25 В). Таким образом, HGD приводит к нарушению продукции инсулина в поджелудочной железе и, тем самым, к снижению толерантности к глюкозе.

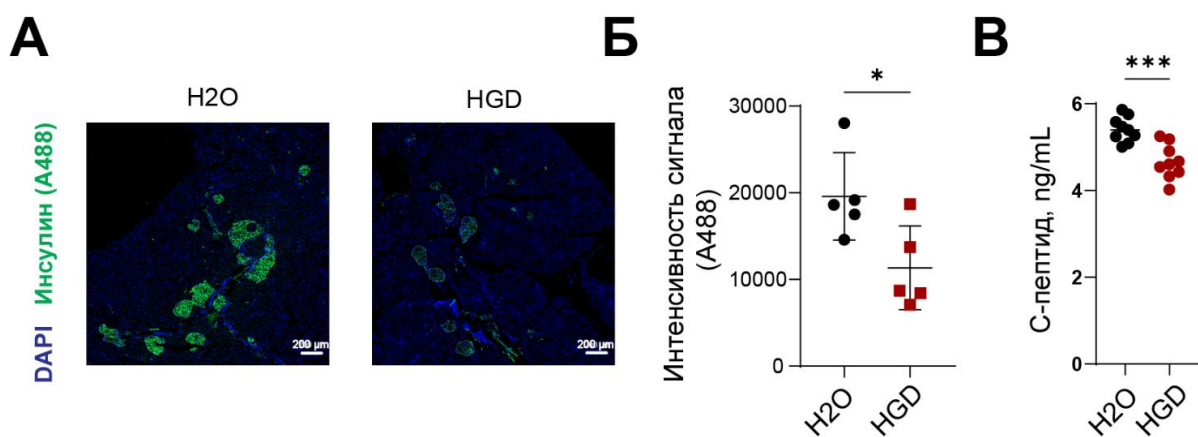


Рисунок 25. Повышенное содержание глюкозы в диете приводит к ухудшению продукции инсулина.

А. Иммунофлуоресцентный анализ ткани поджелудочной железы антителами против инсулина (зеленый); DAPI (синий) у мышей после HGD. **Б.** Анализ интенсивности сигнала на (А). **В.** Иммуноферментный анализ содержания С-пептида в сыворотке у мышей после HGD в сравнении с мышами контрольной группы. Для анализа использовался непарный t-тест, $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$; ns - не значимо, $n=5-8$, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

Известно, что диета, богатая простыми сахарами, приводит к нарушению целостности барьера кишечника, таким образом вызывая дополнительную антигенную нагрузку локальной иммунной системы и, соответственно, воспаление (Arnone et al., 2021). Так, высокоглюкозная диета ухудшает течение колита (Khan, et al., 2020). Более того, диета может участвовать в создании композиции микробиоты кишечника (Donaldson, et al., 2016), способствуя росту одних видов и подавляя рост других. В свою очередь, IgA, продуцируемый плазматическими клетками, является одним из механизмов, контролирующих компоненты микробиоты (Pabst 2012). Более ранние исследования на людях показали положительную взаимосвязь между наличием сахарного диабета второго типа и уровнем IgA в сыворотке (Gonzalez-Quintela, et al., 2008, Rodriguez-Segade, et al., 1996). Более того, известно, что пациенты с сахарным диабетом второго типа характеризуются нарушенным метаболизмом, окислительным стрессом, и как следствие, накоплением в крови Ox-LDL (Holvoet, et al., 2008). В одной из работ было показано, что у людей, страдающих сахарным диабетом второго типа, отмечается повышенный IgA в сыворотке к Ox-LDL (Vavuli, et al., 2016). Однако механизм индукции такого IgA не был предложен.

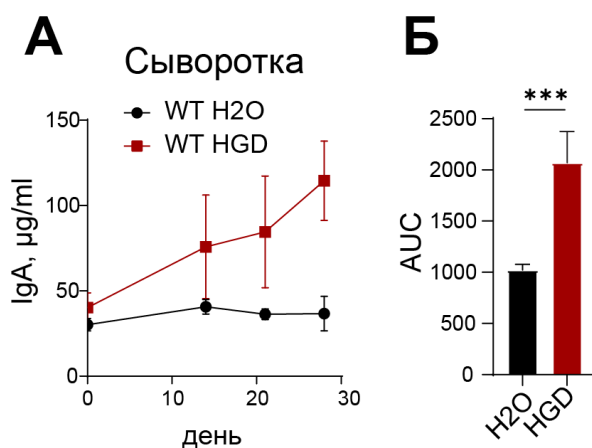


Рисунок 26. Уровень IgA-антител в сыворотке после HGD. А. ИФА уровня IgA в сыворотке в течение HGD. Б. Анализ динамики роста IgA в сыворотке методом подсчета площади под кривой (AUC). Для анализа использовался непарный t-тест, $p < 0,05$ считались статистически значимыми. *** - $p < 0,001$, $n=5-8$, графики являются репрезентативными трех независимых экспериментов.

Исходя из этого, на следующем этапе нашей работы был выяснен вклад высокого содержания углеводного макрокомпонента в продукции IgA. У мышей, 4 недели потреблявших HGD, был измерен уровень иммуноглобулинов классов А, М, G (IgA, IgM, IgG) в сыворотке и свободный IgA в просвете кишечника методом иммуноферментного анализа. Выяснилось, что такая диета приводила к усиленной продукции IgA в сыворотке (Рис. 26 А, Б), при этом содержание IgM и IgG не изменялось при потреблении HGD (Рис. 27 А). Интересно, у группы HGD уровень свободного IgA в кишечнике не возрастал, как в сыворотке (Рис. 27 Б).

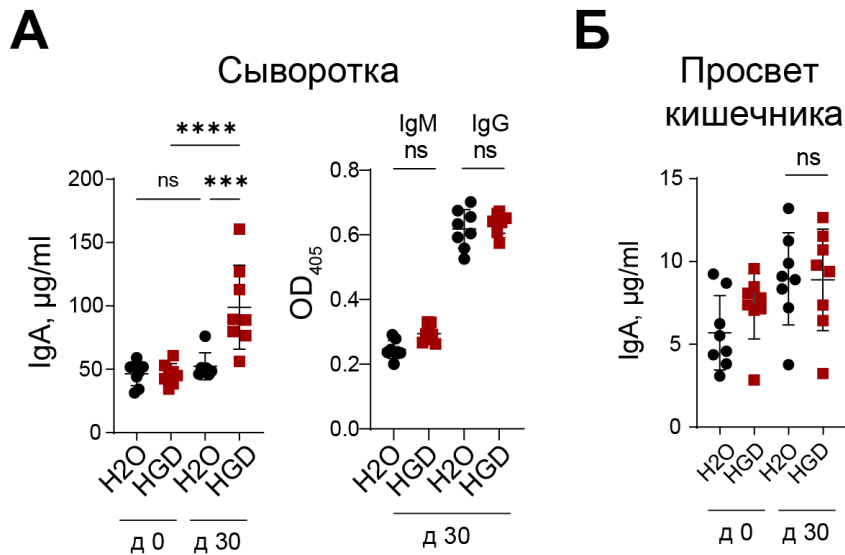


Рисунок 27. Уровень IgG- и IgM-антител в сыворотке после HGD не меняется. А. ИФА уровня IgA, IgM и IgG в сыворотке до и после HGD (д0 и д30). Б. ИФА уровня свободного IgA в просвете кишечника после HGD (д30). Для анализа использовался непараметрический one-way ANOVA тест Крускалла-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. $p < 0,05$ считались статистически значимыми. *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$; ns - не значимо, $n=5-8$, графики являются репрезентативными трех независимых экспериментов.

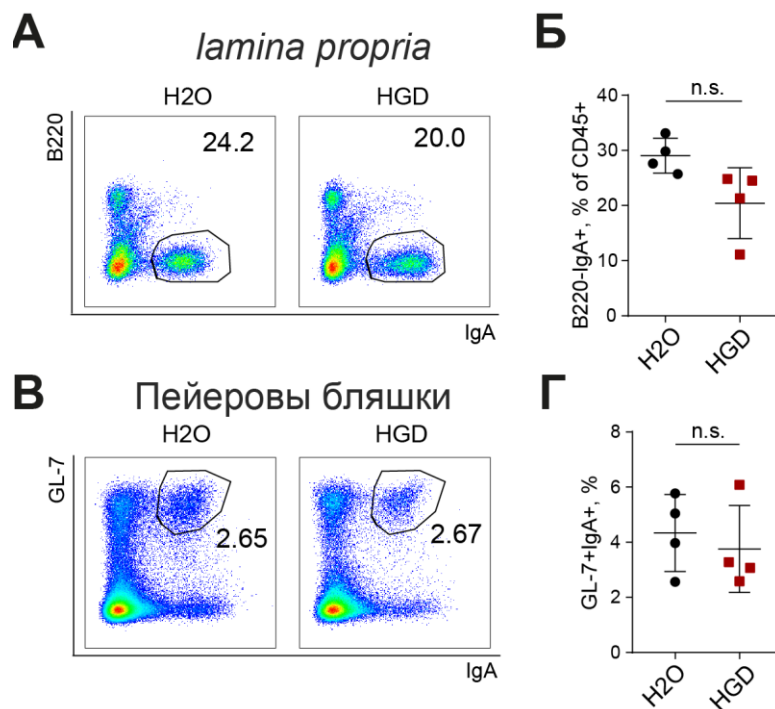


Рисунок 28. Повышенный уровень IgA при HGD не связан с индукцией IgA⁺ плазматических клеток. А. Репрезентативные дот-плоты плазматических клеток B220-IgA⁺ в тонком кишечнике (*lamina propria*). Б. Статистический анализ относительного содержания B220-IgA⁺ клеток в *lamina propria*. В. Репрезентативные дот-плоты В клеток герминального центра GL-7-IgA⁺ в пейеровых бляшках (PPs). Г. Статистический анализ относительного содержания GL-7-IgA⁺ клеток в пейеровых бляшках. Статистический анализ относительного содержания GL-7-IgA⁺ клеток в пейеровых бляшках. Для анализа использовался непарный t-тест, ns – не значимо. $n=4$, графики являются репрезентативными трех независимых экспериментов.

Индукция гуморального иммунного ответа сопровождается пролиферацией и дифференцировкой В-клеток в плазматические клетки, что приводит к повышению титра

антител против антигена. Исходя из увеличенной продукции IgA-антител в сыворотке при HGD,

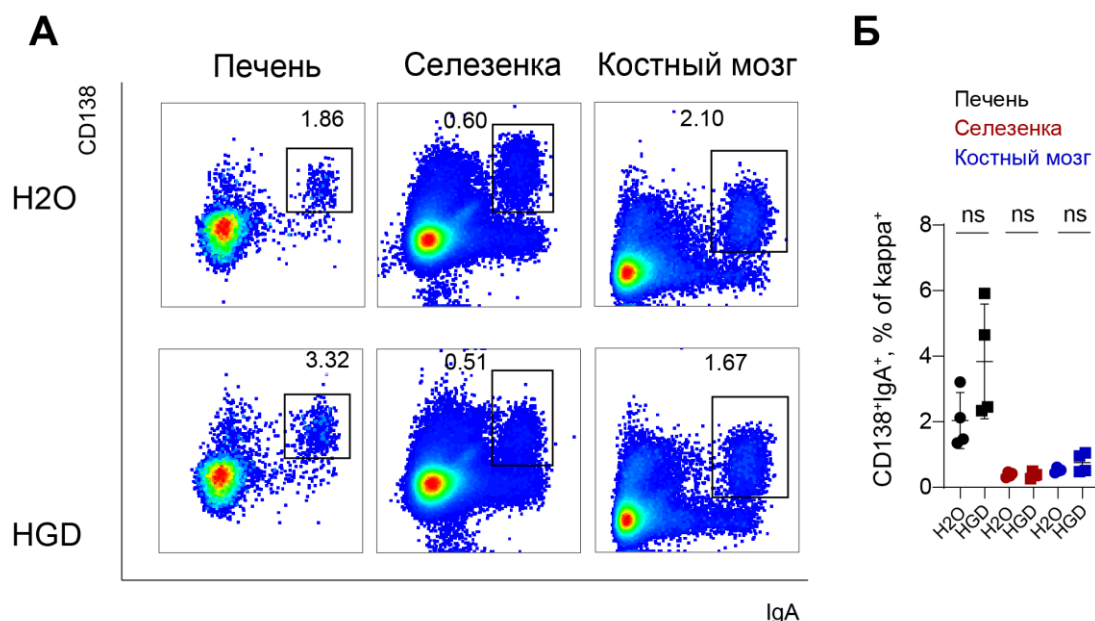


Рисунок 29. Диета с повышенным содержанием глюкозы не влияет на содержание IgA⁺ плазматических клеток в разных компартментах. **А.** Репрезентативные дот-плоты, представляющие CD138⁺IgA⁺ плазматические клетки в печени, селезенке и костном мозге. **Б.** Статистический анализ относительного содержания CD138⁺IgA⁺ клеток в печени, селезенке и костном мозге. Для анализа использовался непарный t-тест, ns – не значимо. n=4, графики являются репрезентативными трех независимых экспериментов.

на следующем этапе мы проанализировали количество IgA-продуцирующих клеток в разных компартментах при HGD. Цитофлуориметрический анализ IgA⁺ клеток в *lamina propria* и в PPs мышей, потреблявших HGD, не выявил отличий в проценте IgA-продуцирующих клеток от контрольной группы (Рис. 28 А-Г). Известно, что небольшие количества IgA плазматических клеток могут быть и в других компартментах, таких как печень, селезенка, костный мозг (Mogo-Sibilot, et al., 2016, Wilmore, et al., 2018). Однако процент IgA-плазматических клеток в этих органах также не отличался между контрольной и экспериментальной группами (Рис. 29). Полученные на данном этапе исследования данные позволяют заключить, что повышенная продукция IgA в сыворотке при HGD не связана с индукцией IgA-продуцирующих клеток в разных компартментах, и диета не влияет на содержание IgA⁺ плазматических клеток в различных компартментах и на индукцию IgA⁺ В клеток GC в PPs. Поэтому можно предположить, что глюкоза, возможно, влияет на синтетический аппарат каждой IgA плазматической клетки, индуцируя повышенную продукцию IgA. Действительно, анализ продукции IgA *in vitro* показал, что количество IgA на плазматическую клетку было выше для мышей после HGD по сравнению с контрольной группой (Рис. 30). Эти данные позволяют

предположить, что при диете HGD плазматические клетки производят больше IgA по сравнению со стандартной диетой.

IgA бывает в мономерной и димерной формах, которые представлены в крови и в просвете кишечника, при этом в крови присутствуют как димеры так и мономеры, тогда как в просвете кишечника только димеры и полимеры более высокого порядка (Mantis et al., 2011). Более того, димер IgA посредством взаимодействия с pIgR, экспрессируемым эпителиальными клетками, транспортируется в просвет полостей.

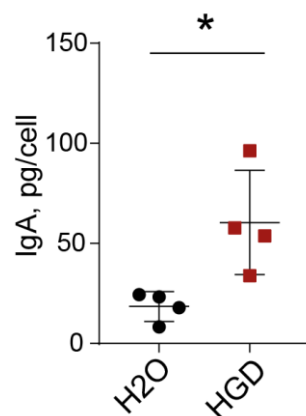


Рисунок 30. IgA⁺ плазматические клетки тонкого кишечника производят больше IgA при диете HGD. Были отсортированы IgA⁺ плазматические клетки тонкого кишечника (*lamina propria*), далее они культивировались в течение 24 часов в культуральной среде RPMI-1640 в количестве 10 000 клеток/лунка. Для анализа использовался непарный t-тест, $p < 0,05$ считались статистически значимыми. * - $p < 0,05$. $n=4$, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

Таким образом, димерный IgA может быть как в крови, так и в просвете кишечника и на других слизистых, тогда как мономерный IgA – только в крови. Поэтому на следующем этапе мы изучили индукцию димеров и мономеров IgA антител при HGD. Для этого полученная сыворотка мышей после 30 дней HGD была проанализирована с помощью нативного полиакриламидного гель-электрофореза с последующим вестерн-блоттингом. Интересно, что нами было выяснено, что при регулярной диете у мышей дикого типа соотношение (димер

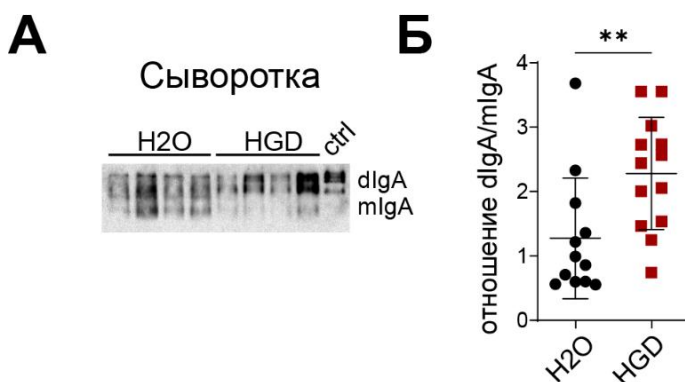


Рисунок 31. HGD приводит к увеличенному содержанию IgA в сыворотке. А. 10 ng IgA каждого образца были разделены с помощью нативного полиакриламидного геля и проанализированы методом вестерн-блот с использованием антител против мышинного IgA. Б. Денситометрический анализ был проведен в программе ImageJ. В качестве положительного контроля использовали моноклональное мышинное IgA-антитело. Для анализа использовался непарный тест Манна-Уитни, $p < 0,05$ считались статистически значимыми. ** - $p < 0,01$. $n=12-13$, представлены суммирующие графики трех независимых экспериментов.

IgA):(мономер IgA) равняется 1:1, тогда как при повышенном содержании глюкозы это соотношение изменяется в сторону большего образования димеров IgA (Рис. 31). Таким образом, HGD приводит к увеличенному содержанию димерного IgA в сыворотке.

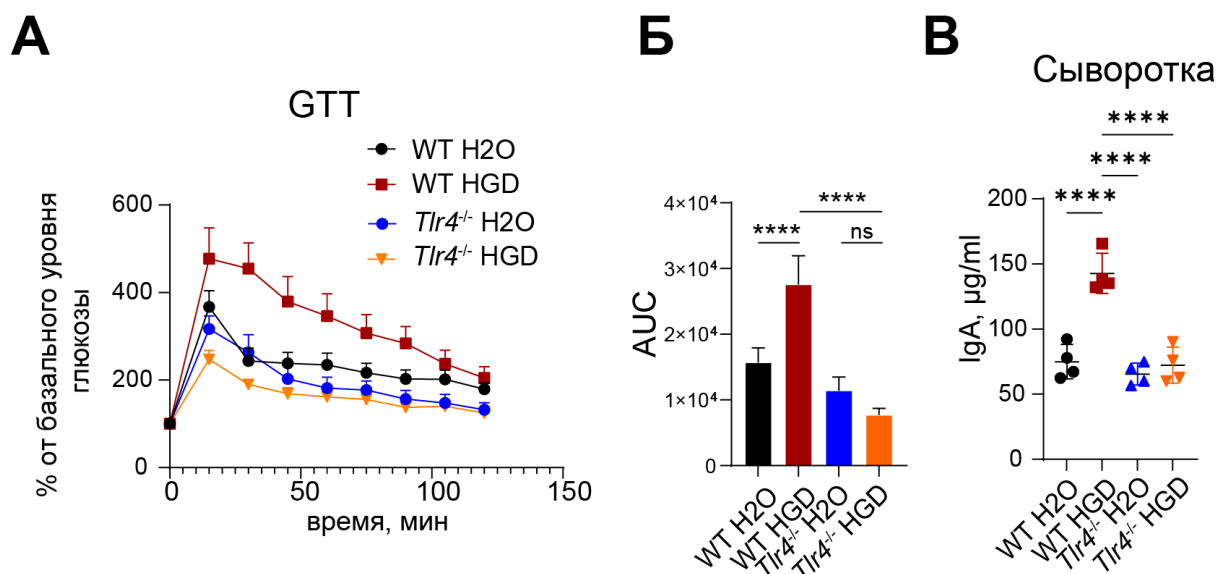


Рисунок 32. Мыши с делецией гена *Tlr4* не развивают нарушения толерантности к глюкозе и повышенного IgA при HGD. А. Глюкозотолерантный тест (GTT) у мышей дикого типа (WT) и *Tlr4*^{-/-} после HGD по сравнению с мышами контрольной группы (H2O). Б. Анализ кривых GTT методом подсчета площади под кривой (AUC). В. ИФА уровня IgA в сыворотке после HGD у мышей дикого типа (WT) и *Tlr4*^{-/-} после HGD по сравнению с мышами контрольной группы (H2O). Для анализа использовался непараметрический one-way тест ANOVA Крускалла-Уоллиса с множественными сравнениями Данна. **** - $p < 0,0001$; ns - не значимо, $n=4$, графики являются репрезентативными трех независимых экспериментов.

***TLR4* регулирует увеличение продукции IgA в сыворотке при диете с повышенным содержанием глюкозы**

TLR4-сигнальный путь промотирует развитие метаболического синдрома (Jia et al., 2014), поэтому на следующем этапе был проанализирован его вклад в развитие нарушения толерантности к глюкозе и продукции IgA при диете с высоким содержанием глюкозы. Для этого мыши с делецией гена *Tlr4*, были подвергнуты 4-недельной диете с повышенным содержанием глюкозы. После этого нами была измерена способность к выведению глюкозы из крови. *Tlr4*^{-/-} мыши оказались устойчивы к развитию нарушения толерантности к глюкозе, что следует из данных глюкозотолерантного теста (Рис. 32 А, Б). Таким образом, нами было выяснено, что TLR4 важен для развития нарушения метаболизма глюкозы. Далее, иммуноферментный анализ сыворотки мышей дикого типа и *Tlr4*^{-/-} выявил, что *Tlr4*^{-/-} группа мышей, потреблявших HGD, не развивала фенотип, который появляется у мышей дикого типа (Рис. 32 В). Из этого следует, что TLR4 регулирует повышение IgA в сыворотке и также контролирует нарушение толерантности к глюкозе при HGD.

Поскольку метаболический синдром характеризуется субклиническим воспалением, что может быть выражено в повышенном фоне провоспалительных цитокинов, таких TNF/IL-6. Для понимания роли TNF в индукции нетолерантности к глюкозе была проведена *in vivo* блокировка TNF на протяжении всего курса HGD, после чего оценивались толерантность к глюкозе и содержание IgA в крови (Рис. 33 А). Применение анти-TNF терапии улучшало чувствительность к глюкозе, нарушенную диетой HGD (Рис. 33 Б, В). Это свидетельствует о том, что TNF, по всей видимости, важен для контроля чувствительности к глюкозе. Применение

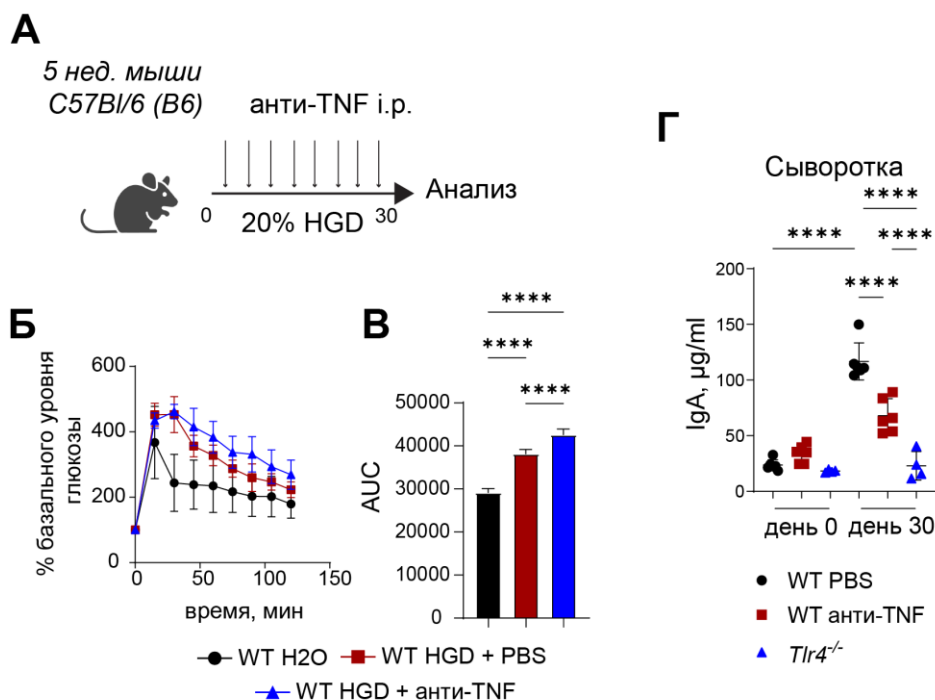


Рисунок 33. Блокировка TNF при HGD ухудшает чувствительность мышей к глюкозе, при этом понижая уровень IgA в крови. А. Схема эксперимента HGD с применением TNF-блокирующих антител (200 мкг/мышь). Б. Глюкозотолерантный тест (GTT) у мышей, получавших антитела против TNF во время HGD по сравнению с мышами, получавшими PBS, и мышами контрольной группы (H2O). В. Анализ кривых GTT методом подсчета площади под кривой (AUC). Г. Иммуноферментный анализ уровня IgA в сыворотке после HGD у мышей с блокировкой TNF в сравнении с мышами, получавшими PBS, и мышами, нокаутными по *Tlr4*. Для анализа (В, Г) использовался непараметрический one-way тест ANOVA Крускалла-Уоллиса с множественными сравнениями Данна *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$; ns – не значимо, $n=4-6$, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

анти-TNF-терапии также приводило к снижению уровня IgA в сыворотке по сравнению с мышами, получавшими только HGD (Рис. 33 Г). Однако уровень IgA не достигал тех значений, что у группы *Tlr4*^{-/-} HGD. По всей видимости, TNF является одним из, но не единственным индуктором повышенной продукции IgA при диете, и это зависит от TLR4-сигнального пути. Другим цитокином, экспрессия которого индуцируется TLR4-сигнальным путем, является IL-6, и известна его связь с нарушенным метаболизмом, поэтому нами было решено проверить, как меняется фенотип у мышей при фармакологической блокировке IL-6 на системном уровне. Мыши вместе с диетой получали антитела против IL-6 внутрибрюшинно каждый второй день

в течение 30 дней, после чего оценивалось развитие нетолерантности к глюкозе и содержание IgA в крови. Выяснилось, что блокада IL-6 не изменяла уровень IgA в крови при HGD, однако способствовала улучшению нетолерантности к глюкозе, хотя показания все еще не достигали таких, как у контрольной группы (Рис. 34 А-В). Из полученных данных на этом этапе работы можно заключить, что продукция IgA и нарушенная толерантность к глюкозе хоть и могут коррелировать друг с другом, однако имеют различные механизмы регуляции, где TNF контролирует продукцию IgA и снижает развитие нетолерантности к глюкозе, в то время как IL-6 является патогенным в развитии нетолерантности к глюкозе, но не важен для индукции IgA.

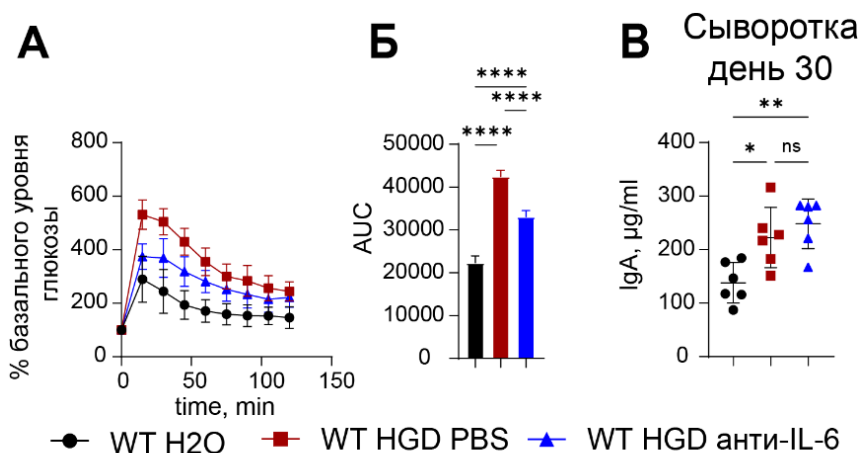


Рисунок 34. Блокировка IL-6 при HGD улучшает чувствительность мышей к глюкозе, но не влияет на уровень IgA в крови. А. Глюкозотолерантный тест (GTT) у мышей, получавших антитела против IL-6 во время HGD по сравнению с мышами, получавшими PBS, и мышами контрольной группы (H2O). Б. Анализ кривых GTT методом подсчета площади под кривой (AUC). В. Иммуноферментный анализ уровня IgA в сыворотке после HGD у мышей с блокировкой IL-6 в сравнении с мышами, получавшими PBS. Для анализа использовался непараметрический one-way тест ANOVA Крускалла-Уоллиса с множественными сравнениями Данна ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$; ns – не значимо, $n=6$, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

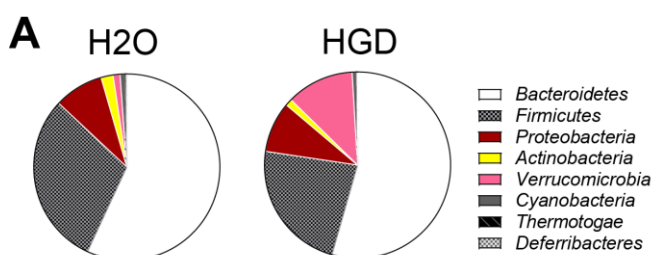
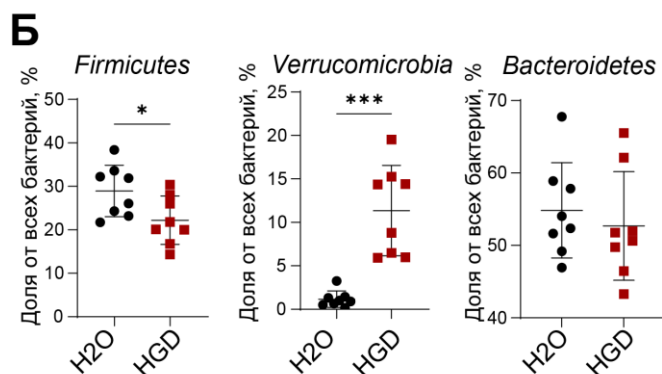


Рисунок 35. HGD изменяет состав микробиоты. А. На диаграммах отображена представленность различных филумов *Bacteria* среди кишечной микробиоты у мышей после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O) на основе 16S rRNA секвенирования. Б. Относительное содержание филумов *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* у мышей после HGD в сравнении с контрольной группой. $n=8$, графики являются суммирующими двух независимых экспериментов.



Диета с высоким содержанием глюкозы приводит к дисбалансу микробиоты кишечника и изменяет распознавание микробиоты IgA-антителами

Из литературы известно, что диета модулирует состав микробиоты. В частности, ранее было выяснено, что повышенное потребление сахара мышами приводит к разрастанию *Akkermansia muciniphila* в течение недели после начала употребления повышенных доз сахара, а кроме этого, мыши становятся более чувствительными к развитию DSS-индуцируемого колита (Khan, et al., 2020). В другой работе было показано, что HGD приводит не только к ухудшению колита, но и ухудшает течение экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита в мышинной модели рассеяного склероза (Zhang et al., 2019).

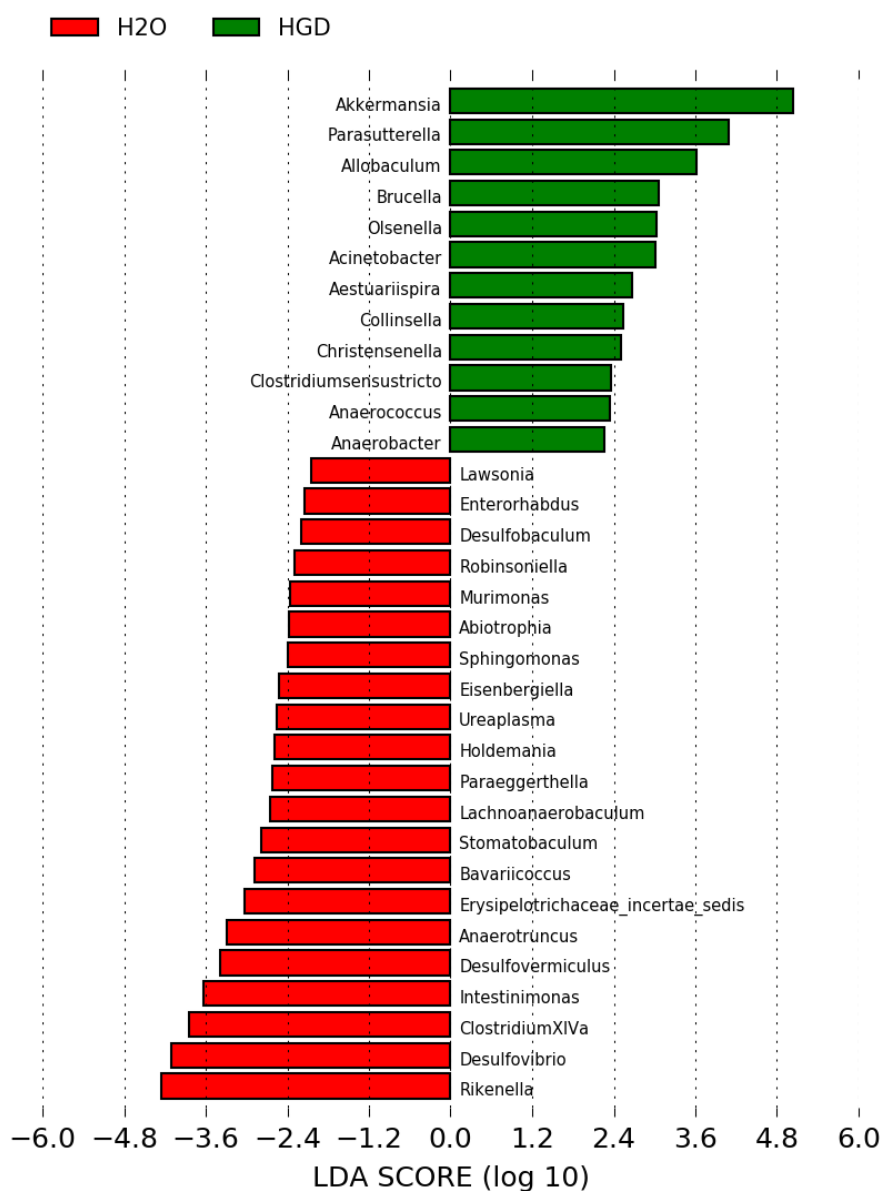


Рисунок 36. HGD изменяет состав микробиоты. Оценки LDA представителей микробиоты кишечника на уровне родов у мышей после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O). Был проведен линейный дискриминантный анализ (LDA) в сочетании с измерением размера эффекта (LEfSe) для данных *16S rRNA*. n=8, график является суммирующим двух независимых экспериментов.

Поэтому нами был проведен анализ фекальной микробиоты мышей дикого типа после HGD. Выяснилось, что HGD приводила к дисбалансу между основными филумами микробиоты, а именно к процветанию семейства *Verrucomicrobia* и к понижению доли *Firmicutes* (Рис. 36). Дальнейший анализ LEfSe показал, что на уровне родов являются обогащенными *Akkermansia*, *Parasutterella*, *Allobaculum*, *Brucella* и другие, тогда как доля таких родов как *Rikinella*, *Desulfovibrio*, *Clostridium XIVa* и других снижена (Рис. 37). На основании наших и литературных данных можно предположить, что представленность каждого из семейств/родов бактерий микробиоты может отвечать как за развитие метаболического синдрома, так и за изменение продукции IgA.

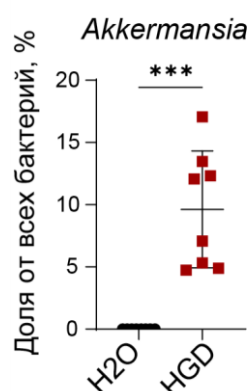


Рисунок 37. HGD изменяет состав микробиоты, приводя к разрастанию *Akkermansia*. Относительное содержание рода *Akkermansia* после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H₂O). Для анализа использовался непарный t-тест *** - $p < 0,001$; ns – не значимо. $n=8$, график является суммирующим двух независимых экспериментов.

Мы сконцентрировались на бактерии рода *Akkermansia*, которая, по литературным данным, вовлечена в контроль метаболизма, а также, по нашим данным *16s rRNA* секвенирования, обогащена больше других бактерий микробиоты кишечника после HGD в сравнении с контрольной группой, что следует из анализа LefSe (Рис. 37) и данных относительного содержания рода *Akkermansia* (Рис. 38).

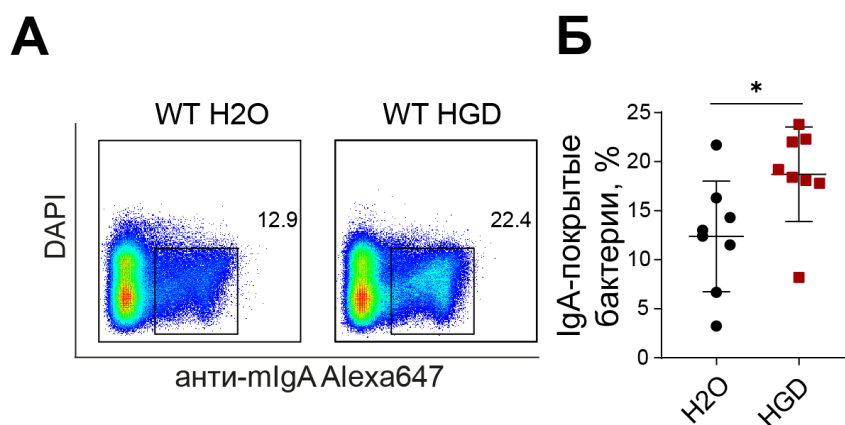


Рисунок 38. HGD приводит к увеличению покрытия микробиоты IgA-антителами. А. Цитофлуориметрический анализ покрытия бактерий кишечной микробиоты IgA антителами после HGD в сравнении с мышами контрольной группы. Б. Статистический анализ покрытия бактерий кишечной микробиоты IgA-антителами после HGD. В. Схема обогащения IgA-покрытых бактерий кишечной микробиоты после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H₂O) при помощи сортера для дальнейшего *16s rRNA* секвенирования. Для анализа использовался непарный t-тест * - $p < 0,05$. $n=8$, графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

Известно, что часть бактерий микробиоты покрыты IgA-антителами, которые могут регулировать их нахождение в просвете кишечника и ограничивать контакт с эпителием (Bunker, et al., 2018, Sharanova, et al., 2017). Кроме этого, существуют данные о корреляции обогащенности определенными филумами микробиоты и типом используемой диеты, что может отражаться и на покрытии компонентов микробиоты IgA-антителами (Wu, et al., 2011). Исходя из этого, нами было предположено, что диета с повышенным содержанием глюкозы может изменять состав микробиоты, тем самым модулировать паттерн покрытия бактерий эндогенными IgA-антителами. Для проверки данной гипотезы покрытие фекальных бактерий IgA-антителами было проанализировано с помощью проточного цитофлуориметра. HGD приводила к увеличению общего уровня IgA-покрытых бактерий (Рис. 38). При этом общий свободный IgA в просвете кишечника не изменялся (Рис. 27 Б), что может означать, что при HGD индуцируется специфический IgA, который, секретирясь, связывается с антигенами микробиоты. Таким образом, полученные на данном этапе результаты о покрытии микробиоты IgA-антителами свидетельствуют о повышении покрытия бактерий IgA при диете с высоким содержанием сахара, что может свидетельствовать об изменении репертуара IgA-антител ввиду изменения состава микробиоты. Для более детального изучения реактивности IgA-антител к микробиоте в контексте HGD нами были отсортированы IgA-покрытые бактерии из фекалий мышей после HGD (Рис. 39), и проанализирован состав микробиоты методом *16s rRNA* секвенирования. Выяснилось, что при HGD *Akkermansia* не только повышена в своем содержании среди компонентов

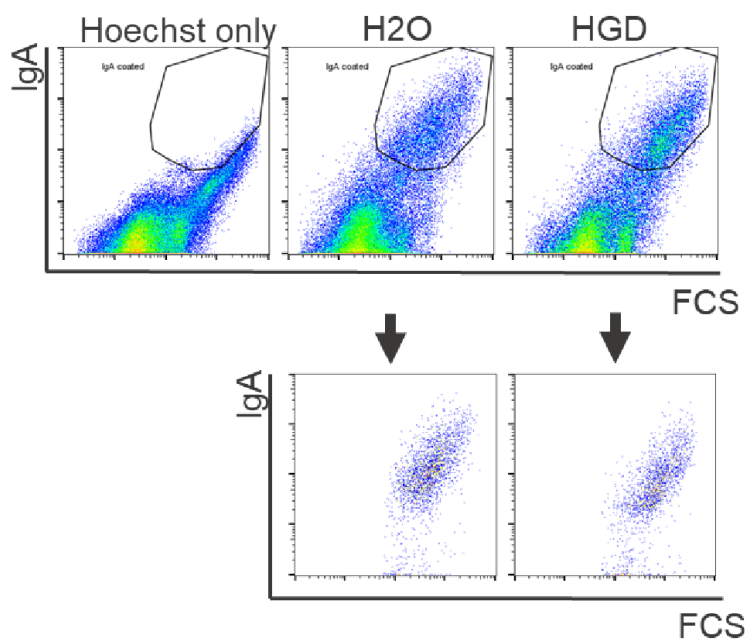


Рисунок 39. HGD приводит к увеличению покрытия микробиоты IgA-антителами. Схема обогащения IgA-покрытых бактерий кишечной микробиоты после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O) при помощи сортера для дальнейшего *16s rRNA* секвенирования. Графики являются репрезентативными для всех образцов, n=8.

микробиоты, но и еще является одной из наиболее обогащенных среди IgA-покрытых бактерий, что следует из анализа LefSe (Рис. 40) и относительного содержания данной бактерии (Рис. 41) в IgA-покрытой фракции. Из этого можно предположить, что *Akkermansia* индуцирует продукцию IgA при HGD.

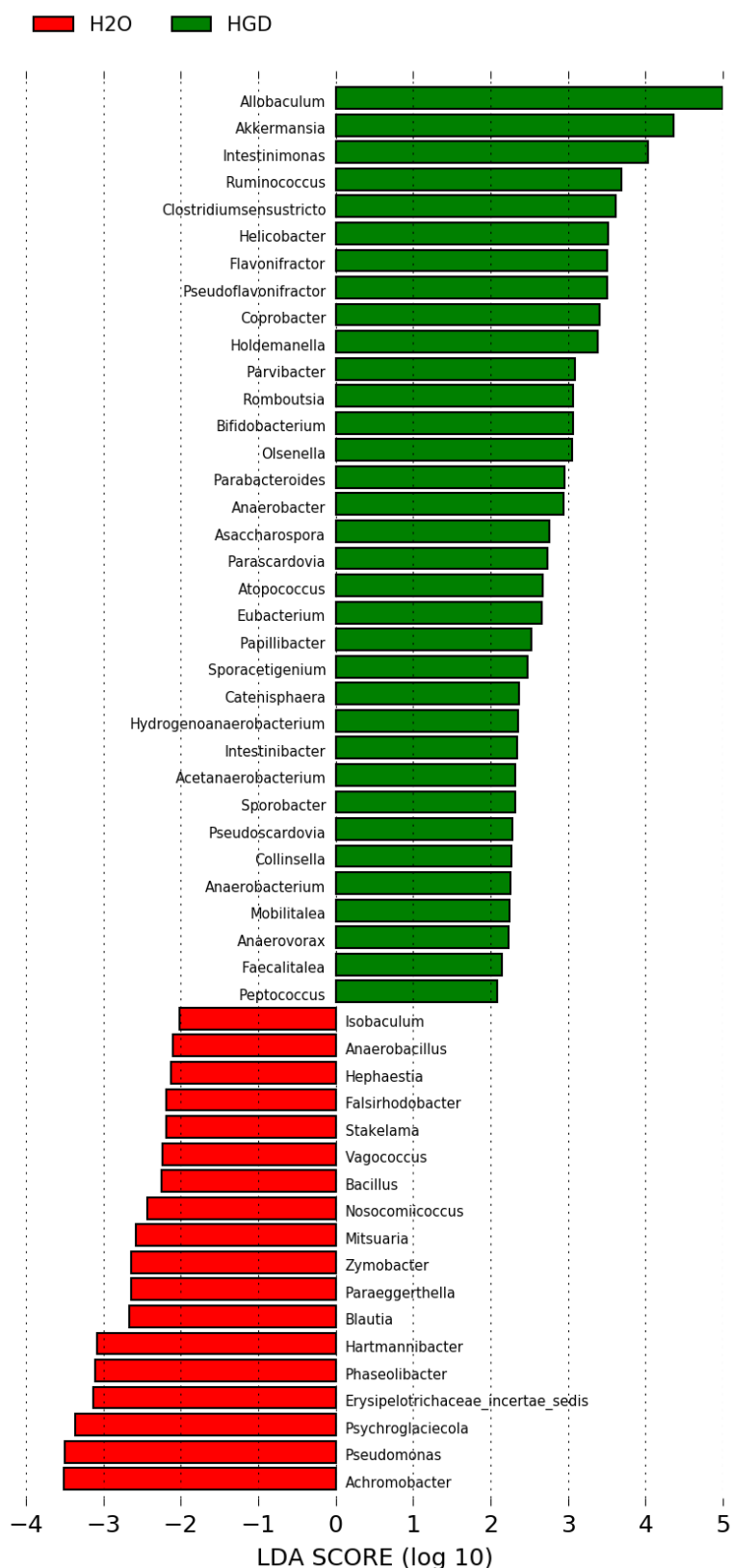


Рисунок 40. HGD изменяет распознавание микробиоты кишечника IgA-антителами. Оценки LDA представителей микробиоты кишечника на уровне родов у мышей после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O). Был проведен линейный дискриминантный анализ (LDA) в сочетании с измерением размера эффекта (LEfSe) для данных *16S rRNA*. n=8, график является суммирующим двух независимых экспериментов.

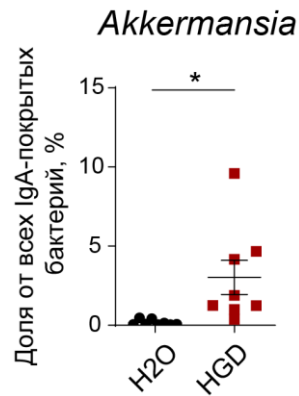


Рисунок 41. IgA-антитела против *Akkermansia muciniphila* индуцируются во время HGD. IgA-покрытые бактерии были отсортированы из фекальной микробиоты мышей, потреблявших контрольную диету и HGD, после чего было проведено секвенирование по *16s rRNA*. Данные представлены в виде отдельных точек со средним \pm SD. Для статистического анализа использовался t-тест, * - $p < 0,05$. $n=8$, график является суммирующим двух независимых экспериментов.

IgA-антитела, индуцируемые HGD-диетой, кросс-реагируют с антигенами *Akkermansia muciniphila* и поджелудочной железы

IgA антитела, таргетируемые бактерию рода *Akkermansia* и индуцированные во время HGD диеты (HGD-IgA), представлены в организме в крови и могут реагировать с различными антигенами организма-хозяина. На данный момент в литературе уже опубликован ряд работ, где было выяснено, что иммунный ответ, индуцируемый против конкретных микроорганизмов, может таргетировать собственные ткани или другие микроорганизмы (см. обзор литературы). Мы предположили, что IgA антитела в нашей модели могут кросс-реагировать с антигенами организма-хозяина, поскольку они представлены на системном уровне в увеличенном количестве. Сперва нами было отмечено, что HGD-IgA из сыворотки мышей после HGD, но не H₂O-IgA из сыворотки мышей контрольной группы, реагируют с *A. muciniphila*, что следует из окрашивания лизата бактерии сывороткой (Рис. 42 А). Интересно, что окрашивание лизата поджелудочной железы мыши дикого типа также выявило, что IgA, индуцируемые HGD диетой, реагируют с антигенами поджелудочной железы (Рис. 42 А, Б). Более того, аутореактивность IgA антител регулировалась TLR4-рецептором и TNF, поскольку у мышей с делецией *Tlr4* и при блокировке TNF не наблюдалось окрашивания на срезах поджелудочной железы (Рис. 42 Б). Чтобы проверить, являются ли данные HGD-IgA антитела кросс-реактивными, нами была проведена предварительная блокировка сыворотки, содержащей HGD-IgA антитела, нативным лизатом *Akkermansia muciniphila* (Рис. 42 В, Г), и затем было проведено окрашивание ткани поджелудочной железы. Такая блокировка приводила к уменьшению окрашивания ткани поджелудочной железы вследствие конкурентного связывания антигенов *Akkermansia muciniphila* с антителами HGD-IgA (Рис. 42 Б).

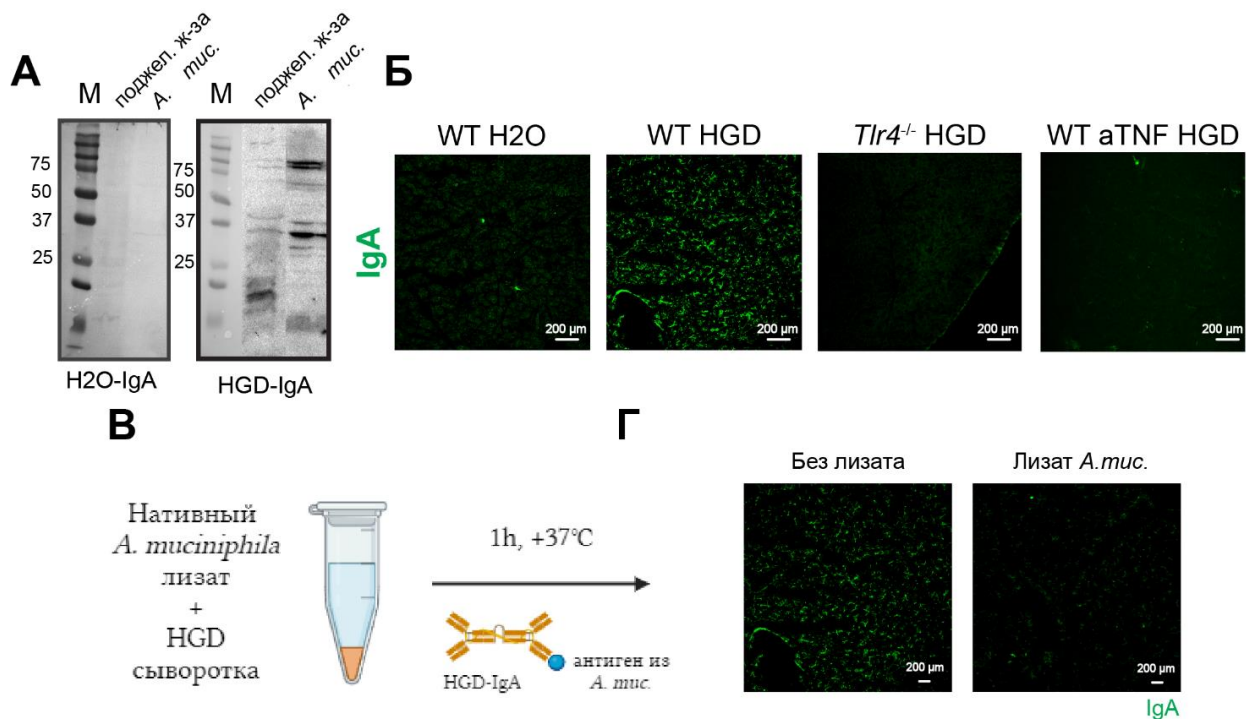


Рисунок 42. IgA антитела против *Akkermansia muciniphila*, индуцируемые во время HGD, кросс-реагируют к ткани поджелудочной железы, и это зависит от TLR4-TNF пути. А. Анализ реактивности IgA антител из сыворотки мышей после HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O) к лизату *Akkermansia muciniphila* (*A. muc.*) и к лизату поджелудочной железы (панкреас) мыши дикого типа при помощи вестерн-блоттинга. **Б.** Анализ реактивности IgA антител из сыворотки мышей дикого типа (WT), мышей с делецией *Tlr4* (*Tlr4*^{-/-}) и мышей дикого типа с блокировкой TNF (WT aTNF) после 30 дней HGD в сравнении с мышами контрольной группы (H2O). **В.** Схема предварительной блокировки IgA антител из сыворотки мышей дикого типа после HGD с предварительной блокировкой нативным лизатом *A. muciniphila*. **Г.** Анализ реактивности IgA-антител из сыворотки мышей дикого типа после HGD с предварительной блокировкой нативным лизатом *A. muciniphila* к ткани поджелудочной железы. Графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

Дальнейший масс-спектрометрический анализ белков поджелудочной железы, распознающихся антителами HGD-IgA, выявил ряд кандидатных антигенов (Таблица 7), некоторые из которых были верифицированы путем иммуноферментного анализа реактивности HGD-IgA-антител. Так, нами было выяснено, что HGD-IgA-антитела реагируют к белку виментин, экспрессируемому клетками поджелудочной железы, как следует из антиген-специфического ИФА (Рис. 43 А) и окрашивания ткани поджелудочной железы с предварительной блокировкой сыворотки HGD рекомбинантным виментином (Рис. 43 Б).

Масс-спектрометрический анализ белков *Akkermansia muciniphila*, распознающихся антителами HGD-IgA, выявил также ряд кандидатных антигенов (Таблица 8). Некоторые из них были заклонированы в вектор pET21b(+) и проверены на связывание с HGD-IgA-антителами путем использования вестерн-блота. По крайней мере, можно сказать, что SLR1 (Sel1 like family protein) белок частично распознается HGD-IgA-антителами (Рис. 43 А, Б). Можно предположить, что слабое окрашивание оверэкспрессированного белка выглядит слабее, чем в

положительном контроле с лизатом *A. muciniphila*, поскольку оверэкспрессия была проведена в другом организме.

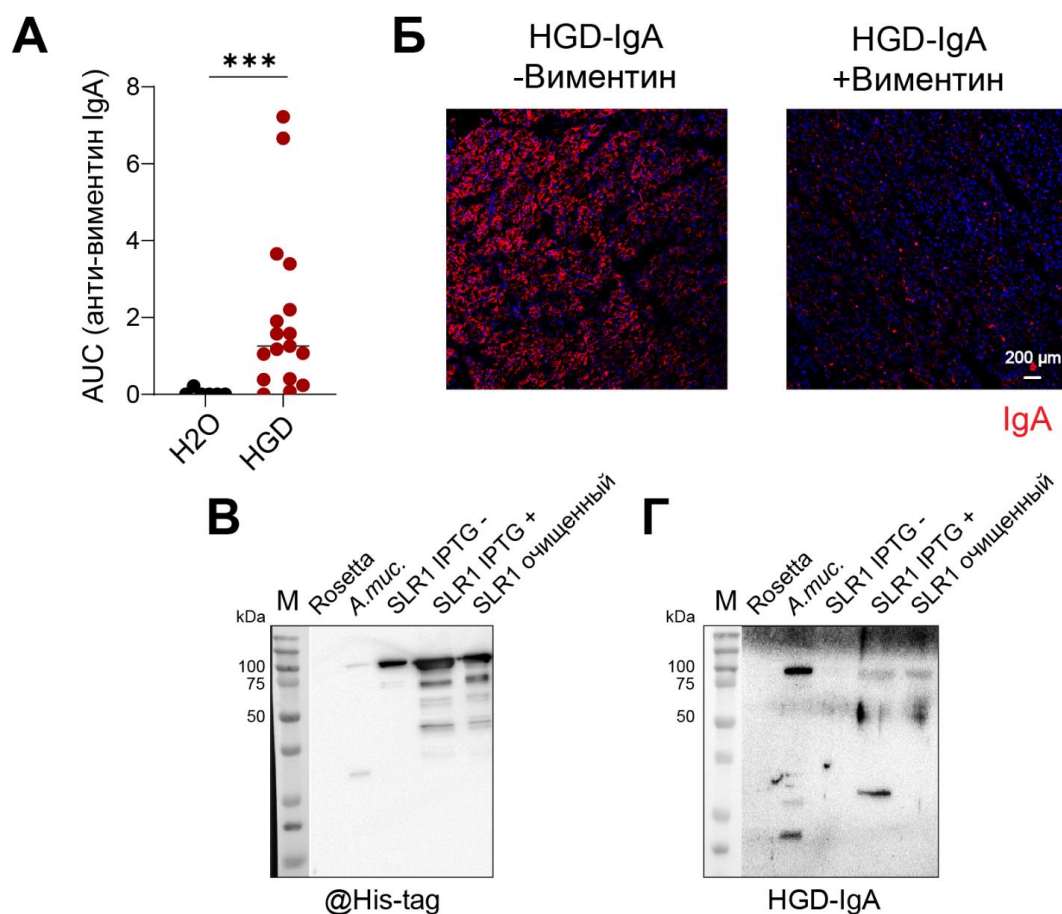


Рисунок 43. IgA-антитела, индуцируемые во время HGD, кросс-реагируют с антигенами поджелудочной железы и *A. muciniphila*. А. ИФА реактивности сыворотки после HGD к рекомбинантному белку виментин. 20 нг/лунка виментина было нанесено на планшет, и сыворотка после HGD была протестирована в различных разведениях, после чего площадь под кривой (AUC) была проанализирована. Б. Анализ реактивности IgA антител из сыворотки мышей дикого типа после HGD с предварительной блокировкой рекомбинантным виментином к ткани поджелудочной железы. В. Вестерн-блот анализ оверэкспрессии белка *A. muciniphila* SLR1, заклонированного в вектор pET21b(+) и полученного из клеток *E.coli* Rosetta, по окрашиванию мембраны антителами против His-tag. Г. Вестерн-блот анализ реактивности HGD-IgA антител к белку *A. muciniphila* SLR1. В качестве положительного контроля использовали лизат *A. muciniphila*. Данные представлены в виде отдельных точек. Для статистического анализа использовался непарный t-тест, *** - $p < 0,001$. В (А) $n=8-18$, график является суммирующими трех независимых экспериментов. В (Б-Г) графики являются репрезентативными двух независимых экспериментов.

Таким образом, HGD приводит к нарушению глюкозотолерантности и изменяет состав микробиоты кишечника, где ввиду обилия глюкозы начинает процветать *Akkermansia*. Далее *Akkermansia* вызывает кросс-реактивный антительный ответ как к антигенам на своей поверхности, так и к тканям организма-хозяина, в частности к поджелудочной железе (Рис. 44). Продукция кросс-реактивных аутореактивных IgA-антител зависит от TLR4-TNF-пути.

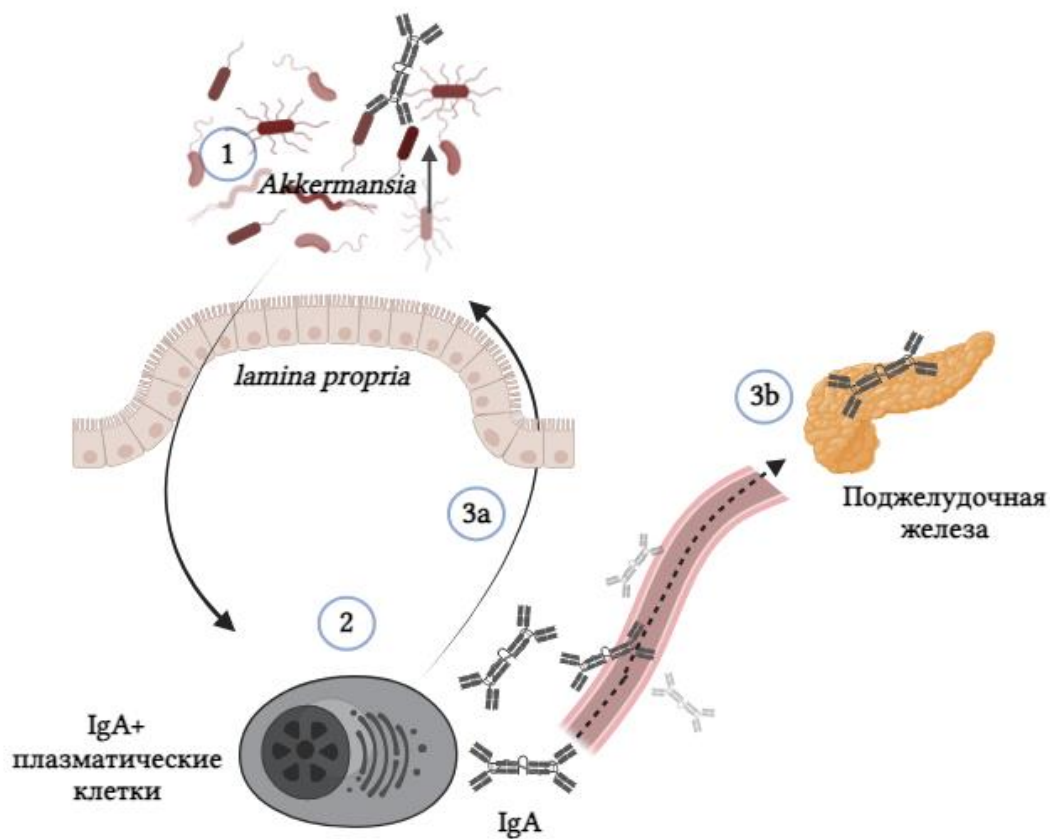


Рисунок 44. Предполагаемое взаимодействие между микробиотой и организмом-хозяином, опосредованное IgA-антителами, при нетолерантности к глюкозе, вызванной диетой с повышенным содержанием глюкозы. 1) HGD приводит к изменениям в составе микробиоты, выражающимся в процветании *Akkermansia*. 2) *Akkermansia*, представленная в большей доле, способствует индукции IgA-антител плазматическими клетками тонкого кишечника. 3) IgA-антитела, индуцируемые диетой HGD, являются кросс-специфичными, поскольку реагируют к самой *Akkermansia* и другим бактериям (3a), а также к ткани поджелудочной железы (3b).

Обсуждение результатов

Кросс-регуляция иммунного ответа против Spike-белка SARS-CoV-2 и комменсальной микробиоты путем молекулярной мимикрии

Микробиота кишечника поддерживает эффективное пищеварение и функционирование иммунной системы, контроль над различными заболеваниями, и её состав зависит от внешних факторов (диета, вирусные заболевания, медикаменты и т. д.). С другой стороны, иммунная система регулирует состав микробиоты (Belkaid et al., 2017). На данный момент остается не до конца понятным, как происходит кросс-регуляция между микробиотой и иммунной системой в контексте влияния различных факторов. В данном исследовании нами была изучена взаиморегуляция микробиоты и антител, реактивных к ней, в контексте протективного иммунитета против SARS-CoV-2, а также при нарушенной толерантности к глюкозе в модели высокоглюкозной диеты. Работа была разделена на две части: первая была направлена на изучение взаимосвязи между компонентами микробиоты и иммунным ответом против Spike SARS-CoV-2 через молекулярную мимикрию, а также на выявление бактерий и белков, индуцирующих противовирусный иммунный ответ. Вторая часть исследования фокусируется на изменениях в составе микробиоты при диете с повышенным содержанием глюкозы, анализе механизмов индукции и специфичности IgA-антител при данной диете.

В ряде исследований были опубликованы данные о наличии RBD-реактивных антител к SARS-CoV-2 у здоровых людей, не подвергавшихся воздействию вируса (Majdoubi, et al., 2021, Ng, et al., 2020, Selva et al., 2021). Было также предположено, что индукция таких антител происходит при предшествующих инфекциях коронавирусами простуды, но это не было доказано. Предыдущие исследования показали наличие уже существующего иммунного ответа на SARS-CoV-2 у людей, не подвергавшихся воздействию вируса, также в отношении T-клеточного ответа (Braun et al., 2020, Wells et al., 2022a). Мы предположили, что изначальным антигенным ресурсом такого иммунного ответа может быть микробиота, поскольку суммарный антигенный репертуар микробиоты колоссален (Forster et al., 2019), и у здоровых людей, не подвергавшихся воздействию вируса, антитела к SARS-CoV-2 детектировались на слизистых, что указывает на потенциальную связь с микробиотой (Majdoubi, et al., 2021).

Взаимодействие антител с микробиотой на поверхности слизистых оболочек может либо приводить к ограничению роста бактерий, либо способствовать их росту (Donaldson et al., 2018, Moor, et al., 2017). В первой части данного исследования мы показали, что вакцина против SARS-CoV-2 индуцирует продукцию слюнных антител против Spike-белка, коррелирующую с экспансией некоторых штаммов бактерий, включая *S. salivarius*. При этом индуцируемые вакцинацией антитела в слюне не вызывали значительных изменений в составе микробиоты

полости рта, а, по всей видимости, таргетно модулировали рост комменсальных бактерий. Ранее в работах, в которых изучалось взаимодействие между антителами и микробиотой, было показано, что кросс-реактивные антитела, индуцируемые компонентами микробиоты, могут вызывать как протективный иммунный ответ, так и патогенный (Gil-Cruz, et al., 2019, Robak, et al., 2018, Rollenske, et al., 2018). А, например, в исследовании, где изучали эффективность вакцины против HIV-1, выяснили, что при вакцинации индуцировались в основном микробиота-специфические антитела, которые не обладали нейтрализующей способностью, в связи с чем, вакцина не была достаточно эффективной, чтобы защищать от вируса (Trama, et al., 2014, Williams et al., 2015). В нашей работе мы также видим протективный эффект от индукции кросс-реактивных антител компонентами микробиоты. Эти антитела обладают нейтрализующей способностью, но не такой высокой, как антитела из пациентов с SARS-CoV-2. Таким образом, исход кросс-реактивного иммунного ответа представляется на данный момент сложным в предсказании.

Нами были определены бактерии среди компонентов микробиоты, которые несут на поверхности антигены, молекулярно схожие со Spike-белком SARS-CoV-2, среди которых *S. salivarius*, *B. pseudocatenulatum* и другие (Рис. 13). Кроме этого, нами были предложены, по крайней мере, два из антигенов (декстрансукраза RSSL-01370 *S. salivarius* и олигопептид-связывающий белок OppA1 *B. pseudocatenulatum*), которые распознавались нейтрализующими антителами против Spike-белка SARS-CoV-2. Интересно, что в одном из исследований, где изучали различия в составе микробиоты верхнего респираторного тракта и метаболические пути микробиоты у пациентов с легким и тяжелым течением COVID-19, было показано, что декстрансукраза ассоциирована с более легким течением болезни (Galeeva et al., 2024). Далее, эти белки индуцировали системный анти-Spike IgG-ответ у мышей при иммунизации (Рис. 16). Из этого следует, что, по крайней мере, декстрансукраза RSSL-01370 *S. salivarius* и олигопептид-связывающий белок OppA1 *B. pseudocatenulatum* молекулярно схожи с RBD-Spike SARS-CoV-2 и могут вызывать кросс-реактивный иммунный ответ. Однако стоит учитывать, что потенциально таких мимикрирующих белков под Spike может быть больше, и они могут вызывать более высокие титры против Spike-белка. Кроме этого, антитела, индуцируемые иммунизацией *S. salivarius/B. pseudocatenulatum*, обладают нейтрализующей способностью, но, тем не менее, отличимой от таковой у антител, выделенных из пациентов с COVID-19. Иммунизация мышей бактериальной смесью, состоящей из *S. salivarius* и *B. pseudocatenulatum*, с последующим заражением вирусом SARS-CoV-2 не предотвращала заражение мышей, но значительно влияла на более низкую вирусную нагрузку в легких. Известно, что вирусная нагрузка влияет на тяжесть и исход заболевания (Soria et al., 2021).

Таким образом, выше приведенные данные служат доказательством того, что отдельные компоненты микробиоты способны индуцировать кросс-реактивные антитела против Spike, которые важны в процессе элиминации вируса из легких. Кроме этого, данный механизм взаимодействия компонентов микробиоты и иммунной системы в контексте развития антител против SARS-CoV-2 впервые предложен и может служить объяснением наличия анти-Spike-антител у людей, не подвергавшихся воздействию вируса. По всей видимости, эти антитела важны на первом этапе нейтрализации вируса при заражении, но они не защищают от самого инфицирования, как это следует из Рис. 19. Однако это еще предстоит исследовать на более больших выборках доноров. Стоит отметить, что факт наличия анти-Spike-антител на слизистых у невакцинированных и незараженных ранее доноров (Ng, et al., 2020) может дополнительно свидетельствовать о локальной индукции иммунного ответа на слизистых, в том числе и плазматических клеток, откуда далее и происходит местная секреция антител. Тем не менее, это все еще не доказано, и может служить дальнейшим аспектом данной работы. Важно отметить, что в опубликованных данных и в наших данных у невакцинированных и незараженных ранее доноров специфических антител к SARS-CoV-2 на системном уровне задетектировано не было. Это служит доказательством существования связи присутствия таких антител с микробиотой.

Нами и другими лабораториями (Darwich et al., 2022, Sano, et al., 2022, Sheikh-Mohamed, et al., 2022) было показано, что при вакцинации против SARS-CoV-2 образуются антиген-специфические IgG- и IgA-антитела в крови и слюне. При этом образование анти-Spike-IgA₂ происходило в небольших количествах только в слюне, и зависело от предшествующей инфекции вирусом SARS-CoV-2 (Darwich, et al., 2022). Таким образом, можно предположить, что продукция специфических IgA₂ связана с локальной индукцией плазматических клеток в месте контакта с вирусом SARS-CoV-2. Несмотря на это, как специфические антитела появляются в слюне при вакцинации – из кровотока специфический транспорт через эпителиальные клетки или локальная продукция и секреция – остается не выясненным вопросом. Можно предположить, что второй вариант более вероятен, поскольку, если бы IgA-антитела оказывались на слизистых путем специфического транспорта через pIgR на эпителии, то мы бы наблюдали также повышение титров анти-Spike IgA в просвете кишечника, чего в нашей когорте задетектировано не было. Однако это необходимо еще доказать.

Дополнительное пероральное применение пробиотика в течение 2 недель *S. salivarius* K12 также повышало уровень анти-Spike-антител в ротовой полости у вакцинированных людей. Ограничением настоящего исследования является короткий период анализа после применения пробиотика и небольшое количество участников. Стоит отметить, что при

аналогичном исследовании с невакцинированными неинфицированными ранее донорами повышения анти-Spike IgG задетектировано не было (данные не показаны). Вероятно, антигенный стимул от *S. salivarius K12* может служить в роли бустера иммунного ответа, но не является достаточным, чтобы индуцировать иммунный ответ у наивных доноров. Интересно, что в другом исследовании, проводимом на когорте пациентов с различной тяжестью COVID-19, было показано, что присутствие *S. salivarius* связано с более легким течением заболевания (Galeeva, et al., 2024), что дает право предполагать, что дополнительный прием пробиотического штамма *S. salivarius K12* при заражении вирусом может облегчать тяжесть симптомов заболевания. В литературе на данный момент известны случаи применения данного пробиотика, которые положительно влияли на защиту от развития тяжелой формы заболевания – (Di Pierro et al., 2022, F et al., 2021). Важно сказать, что в нашей когорте, которая принимала пробиотический штамм *S. salivarius K12* в течение двух недель, увеличения содержания данной бактерии в ротовой полости зафиксировано не было. С одной стороны, это может свидетельствовать об устойчивости состава микробиоты, а с другой стороны, дополнительный прием *S. salivarius K12* оказывается достаточным для стимуляции продукции антител против SARS-CoV-2. Тем не менее, необходимы дополнительные исследования с более длительным периодом наблюдения и большим числом участников, чтобы определить устойчивость этого кросс-взаимодействия микробиоты и антител в долгосрочной перспективе, а также оценить защитный потенциал от инфицирования вирусом SARS-CoV-2 или защиту от развития тяжелых симптомов заболевания. Появляется все больше доказательств изменения микробиоты при тяжелых случаях COVID-19. Это позволяет предположить, что состав микробиоты может быть фактором риска развития тяжелой формы заболевания. Объединяющим фактором является то, что острая инфекция SARS-CoV-2 ассоциируется с повышенной распространенностью оппортунистических бактерий и истощением иммуномодулирующих бактерий (Hoque et al., 2021).

В заключение следует отметить, что полученные нами результаты свидетельствуют о том, что отдельные бактерии ротоносоглоточной микробиоты участвуют в регуляции мукозального иммунитета к SARS-CoV-2. Это достигается за счет молекулярной мимикрии RBD-Spike-белка вируса SARS-CoV-2 различными белками бактерий *S. salivarius* и *B. pseudocatenuatum*. Антитела, в свою очередь, поддерживают присутствие полезных бактерий на слизистых, замыкая петлю положительной обратной связи.

Кросс-регуляция микробиоты и мукозальной иммунной системы посредством антител в контексте диеты с повышенным содержанием глюкозы

Известно, что повышенный уровень глюкозы в крови связан с возникновением преддиабетного состояния, впоследствии развивающегося в сахарный диабет (Zaccardi et al., 2016). Это может быть обусловлено недостаточной чувствительностью клеток к глюкозе при нормальной продукции инсулина β -клетками поджелудочной железы или недостаточным образованием инсулина/утратой β -клеток островков Лангерганса (Gluvić et al., 2017). В нашей модели HGD у мышей развивается нетолерантность к глюкозе ввиду глюкозотоксичности, а также ухудшается продукция инсулина. Однако на основании данных, полученных в результате исследований, мы не можем в полной мере охарактеризовать, на каком именно этапе образования инсулина происходит дисрегуляция в ходе HGD, и это предстоит выяснить (Liu et al., 2021). Тем не менее, концентрация С-пептида была снижена при HGD. Более ранние исследования на пациентах показали положительную взаимосвязь между наличием сахарного диабета второго типа и уровнем IgA в сыворотке (Gonzalez-Quintela, et al., 2008, Rodriguez-Segade, et al., 1996). Однако механизм того, как именно индуцируются такие антитела и какова их роль, предложен не был. В данном исследовании нами было показано, что при HGD индуцируются димерные IgA-антитела, которые транспортируясь в просвет кишечника, связываются с измененной в ходе диеты микробиотой. Интересно, что при диете состав микробиоты меняется так, что *Akkermansia* становится одним из доминирующих родов среди других представителей. С одной стороны, это противоречит литературным данным об относительном содержании *Akkermansia* в зависимости от толерантности к глюкозе, где отсутствие *Akkermansia* ассоциировано с болезнью (Zhang et al., 2021). С другой стороны, стоит обратить внимание, что в таких исследованиях анализировалась микробиота пациентов с диагнозом, поставленным ранее, а не в процессе развития нарушенной толерантности к глюкозе. Кроме этого, в исследованиях на мышах использовалась модель высокожировой диеты, а не высокоглюкозной (Schneeberger et al., 2015). Ранее была опубликована работа (Khan, et al., 2020), где авторы показали, что рост бактерии *Akkermansia* происходит уже через неделю после кормления мышей HGD, что в последствии ухудшает течение колита. Таким образом, мы предполагаем, что в первую очередь при развитии глюкозной нетолерантности происходят изменения в составе микробиоты, где, прежде всего, происходит обогащение *Akkermansia* (Рис. 37). *Akkermansia* – одна из немногих бактерий, которая значительно обогащена среди IgA-покрытых бактерий после HGD (Рис. 41), следовательно, она, по всей видимости, индуцирует IgA в кишечнике при диете. Среди IgA-покрытых бактерий при HGD были выявлены и другие бактерии, однако доля других бактерий в IgA-фракции была относительно низкой (данные не

показаны). Далее ввиду увеличенной продукции и лимита транспорта часть IgA-антител, индуцированных бактерией *Akkermansia* при HGD, остается в системе и таргетирует ткани организма.

Относительно аутореактивности антител у пациентов с сахарным диабетом второго типа известно, что у них наблюдаются повышенные титры антител к Ox-LDL (Vavuli, et al., 2016). В нашей работе помимо реактивности к Ox-LDL (данные не показаны) нами была изучена также реактивность к различным органам. Поджелудочная железа представляет особый интерес, так как этот орган является главным регулятором глюкозного обмена на периферии (Solomon et al., 2013). Интересно, что HGD-IgA-антитела кросс-реагируют с *Akkermansia* и поджелудочной железой, где обе стороны имеют по всей видимости схожие по последовательности антигены. До сих пор остается неизученным вопрос, являются ли такие HGD-IgA-антитела патогенными, или они нужны в дальнейшем для регуляции заболевания. Ранее была опубликована работа, в которой показали, что IgA важен для защиты от развития глюкозотолерантности и инсулинорезистентности в модели высокожировой диеты (Luck, et al., 2019). Поэтому мы предполагаем, что в модели HGD значимость IgA-антител может быть схожей, однако, для этого необходимо провести функциональные эксперименты с выделенными HGD-IgA-антителами и эксперименты с IgA-дефицитными мышами.

Наши данные свидетельствуют о том, что рост IgA и индукция аутореактивности происходит только в случае HGD на молодых мышах, то есть в процессе формирования микробиоты взрослого типа (Рис. 26, 42 и данные не показаны). В другом исследовании было также показано, что развитие кишечной иммунной системы, в частности индукция Treg и IgA, определяется переходом от начальной микробиоты к взрослому типу (Lubin, et al., 2023). Также, было показано, что *Akkermansia muciniphila* способна индуцировать периферические Treg, и зависит от TLR4 (Liu, et al., 2022d). В нашей работе образование антител IgA, реагирующих и с микробиотой, и с тканями организма, также зависит от TLR4-пути. TLR4-рецептор повсеместно экспрессируется на различных типах клеток (Vaure et al., 2014). Поэтому дальнейшим направлением данной научной работы может быть изучение клеточного источника TLR4 с использованием мышей с делецией гена *Tlr4* в разных типах клеток, поскольку на данном этапе использование мышей с полным нокаутом по TLR4 не дает полного понимания того, какие именно клетки являются важными для проведения TLR4 сигнала, и на какие конкретно клетки влияет глюкоза, модулируя их метаболизм. На данный момент есть ряд работ, где исследовали различные клеточные источники в регуляции метаболизма. Например, TLR4 из эпителиальных клеток оказался важным в контроле глюкозотолерантности в модели ожирения (Lu et al., 2018). С другой стороны, гепатоцитарный TLR4, наоборот, промотирует

нарушение чувствительности к глюкозе, тогда как TLR4 миелоидного происхождения не играет роли в данном процессе при ожирении, индуцированном диетой (Jia, et al., 2014).

TLR4-сигнальный путь индуцирует выработку провоспалительных цитокинов, таких как TNF и IL-6, продукция которых также повышена при нетолерантности к глюкозе. Интересно, что блокировка TNF приводила как к уменьшению содержания тотального IgA, так и уменьшению аутореактивности к поджелудочной железе. Но при этом нарушенная толерантность к глюкозе оставалась неизменной. Это также коррелирует с данными блокировки TNF у пациентов с диабетом второго типа (Bernstein et al., 2006, Ferraz-Amaro et al., 2011) и данными, полученными на *Tnf^{f/-}* мышах (Uysal et al., 1997). С другой стороны, блокировка IL-6 во время HGD не предотвращала снижение количества IgA, но улучшала толерантность к глюкозе. В опубликованных работах, где изучалась роль IL-6 в регуляции инсулинорезистентности, выяснили, что блокировка IL-6 улучшала чувствительность гепатоцитов к инсулину в мышинных моделях ожирения (Klover et al., 2005). Тем не менее, вклад IL-6 в регуляцию чувствительности к инсулину до сих пор невыяснен ввиду противоположных данных на мышах с делецией *Il-6* (Di Gregorio et al., 2004, Wallenius et al., 2002). Из наших данных следует, что повышенный уровень IgA в крови и нарушенная толерантность к глюкозе не всегда коррелируют друг с другом и имеют разные механизмы регуляции, что до настоящего момента не было изучено.

Применение IgA-антител, таргетирующих микробиоту, для лечения различных заболеваний или для их превенции представляет новый подход направленного таргетирования микробиоты. Пример положительного действия таких моноклональных IgA был опубликован недавно. Авторы работы показали важную роль IgA-антител в защите от пневмонии, вызванной *Pseudomonas aeruginosa* (Robak, et al., 2018). В другой работе определили, что димерный IgA при транспорте через эпителиальные клетки кишечника может связываться с мутированным онкогеном KRAS^{G12D} и нейтрализовывать его, тем самым защищая от развития рака (Biswas et al., 2023). Авторы не изучали в данном исследовании роль микробиоты и возможность индукции таких антител *in vivo*, что было бы интересным продолжением работы. Тем не менее, IgA может представлять интерес в терапии заболеваний ввиду своей стабильности, высокой степени гликозилирования, а также способности таких антител секретироваться на слизистые и таргетировать компоненты микробиоты. Поскольку многие заболевания связаны с дисрегуляцией микробиоты, то манипуляция отдельными бактериями при помощи антител представляет собой потенциальный терапевтический ресурс. Например, в нашем исследовании основным фенотипом со стороны изменения состава микробиоты после HGD является разрастание *Akkermansia* и усиленное распознавание ее IgA-антителами. Можно предположить,

что модулируя рост данной бактерии можно влиять на развитие нарушенной толерантности к глюкозе. Это будет являться логичным продолжением данной работы.

В данной работе мы определили, по крайней мере, виментин ацинарных клеток поджелудочной железы как антиген IgA-антител, которые продуцируются в увеличенном количестве. Предварительная блокировка HGD-сыворотки рекомбинантным виментином приводила к уменьшенному связыванию HGD-IgA к ткани поджелудочной железы. В то же время, предварительная блокировка HGD-сыворотки лизатом *Akkermansia muciniphila* приводила также к уменьшению реактивности HGD-IgA с тканью поджелудочной железы. Эти данные указывают на молекулярную схожесть между виментином и белками *Akkermansia muciniphila*, которые кросс-распознаются HGD-IgA-антителами.

Таким образом, здесь мы приводим два случая того, что микробиота – огромный резервуар различных антигенов, которые могут мимикрировать под различные белки других микроорганизмов или организма-хозяина в контексте измененной диеты и в контексте противовирусного иммунного ответа. Полученные нами результаты в первой части работы свидетельствуют о том, что отдельные бактерии рото-носоглоточной микробиоты участвуют в регуляции мукозального иммунитета к SARS-CoV-2 по механизму молекулярной мимикрии белка SARS-CoV-2 Spike различными белками бактерий *S. salivarius* и *B. pseudocatenuatum*. Антитела, индуцируемые при вакцинации, в свою очередь, поддерживают присутствие полезных бактерий на слизистых, замыкая петлю положительной обратной связи. Во второй части работы нами был изучен до сих пор неисследованный феномен повышенного содержания IgA при развитии нетолерантности к глюкозе. А именно, индукция IgA происходила за счет обогащения кишечника бактерией *Akkermansia muciniphila*, которая, в свою очередь, индуцировала IgA-антитела против себя и кросс-специфично к поджелудочной железе, а именно к виментину в поджелудочной железе. Данный фенотип зависел от TLR4-сигнального пути и от цитокинов, которые запускаются от активации TLR4. Примечательно, что индукция аутореактивных IgA-антител и развитие нетолерантности к глюкозе контролировались TNF и IL-6 соответственно.

Заключение

В данной работе нами было изучено взаимодействие между микробиотой и иммунной системой организма-хозяина в контексте диеты с повышенным содержанием глюкозы, а также в контексте противовирусного иммунного ответа.

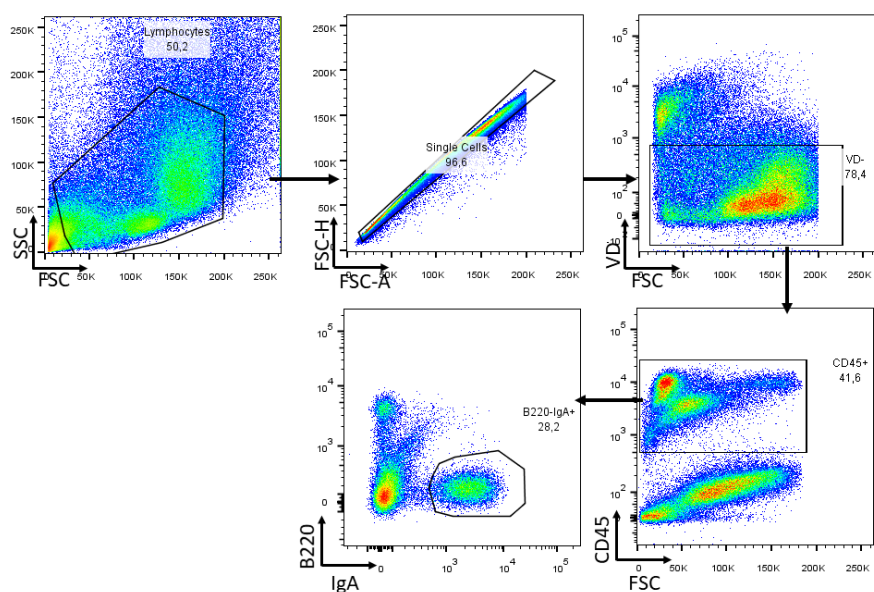
В частности, диета с повышенным содержанием глюкозы приводила к нарушению глюкозотолерантности и изменяла состав микробиоты кишечника, которая была обогащена представителями рода *Akkermansia*. Далее *Akkermansia* вызывала индукцию IgA-антител. Эти антитела, секретирясь в просвет кишечника связывались с *Akkermansia* и с другими компонентами микробиоты. При этом IgA кросс-реагировали с тканями организма-хозяина, в частности, с поджелудочной железой. Продукция кросс-реактивных аутореактивных IgA антител зависела от TLR4-TNF-пути. Однако до сих пор остается не выясненным, защищает ли данная бактерия от развития нарушенной толерантности к глюкозе или промотирует его. Логичным продолжением данной работы может являться применение моноклональных IgA-антител, таргетирующих *Akkermansia muciniphila*, в целях понимания роли данной бактерии в регуляции чувствительности к глюкозе. С другой стороны, вопрос функциональной значимости IgA-антител, индуцируемых при HGD, также представляет интерес.

Кроме этого, нами был показан новый пример, когда антигены бактериальной микробиоты являются ресурсами кросс-специфичного иммунного ответа, в частности, *S. salivarius* вызывал продукцию кросс-специфичных антител против Spike-белка SARS-CoV-2. Эти данные дополняют представление о том, что микробиота – ценный резервуар антигенов, которые могут способствовать протективному или патогенному кросс-иммунному ответу. Также нами была определена причина, по которой люди, не подвергавшиеся заболеванию SARS-CoV-2, имели антитела на слизистых к данному вирусу. Наконец, мы показали, что применение пробиотического штамма *S. salivarius K12* в течение двух недель способствует росту специфических антител против Spike-белка SARS-CoV-2. Необходимы дополнительные исследования с более длительным периодом наблюдения и большим числом участников, чтобы определить устойчивость этого кросс-взаимодействия микробиоты и антител в долгосрочной перспективе, а также оценить защитный потенциал от инфицирования вирусом SARS-CoV-2 или защиту от развития тяжелых симптомов заболевания.

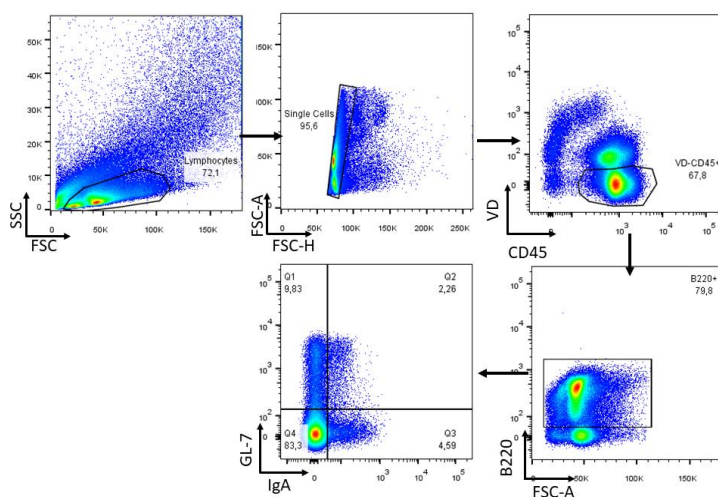
По результатам работы были сформулированы следующие **выводы**:

1. Вакцинация против SARS-CoV-2 способствует индукции Spike-специфичных IgA и IgG на системном уровне и в ротоносоглотке, а также изменяет состав микробиоты слизистых оболочек ротоносоглотки, но не кишечника, приводя к увеличению относительного содержания *S. salivarius*.
2. Антитела, специфичные к Spike-SARS-CoV-2, являются реактивными к компонентам микробиоты, таким как *S. salivarius*, *B.pseudocatenulatum*, *B. longum* и другим.
3. Бактерии, распознающиеся антителами против SARS-CoV-2, способны индуцировать антительный ответ против Spike *in vivo* и способствуют защите против коронавируса SARS-CoV-2 у мышей, гуманизированных по ACE-2 рецептору.
4. Диета HGD способствует развитию нарушенной толерантности к глюкозе, приводит к повышению продукции IgA-антител в сыворотке, а также изменяет состав микробиоты кишечника, увеличивая рост *A. muciniphila*.
5. IgA-антитела, индуцируемые HGD, образуются в TLR4-зависимой манере и кросс-реагируют с различными антигенами поджелудочной железы и с антигенами *A. muciniphila*.

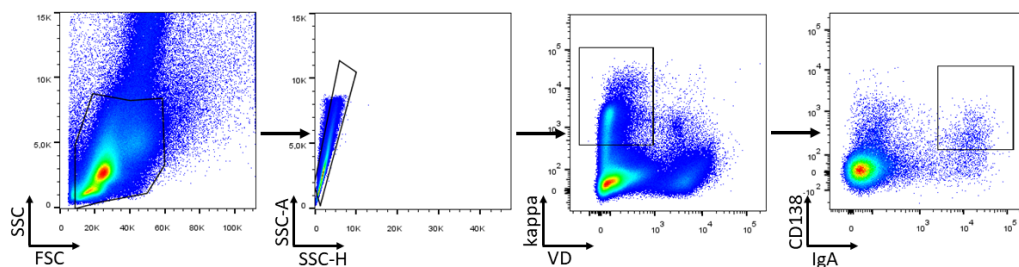
Приложение



Приложение 1. Стратегия гейтирования IgA⁺ плазматических клеток в *lamina propria* методом проточной цитофлуориметрии.



Приложение 2. Стратегия гейтирования IgA⁺ В-клеток в пейеровых бляшках методом проточной цитофлуориметрии.



Приложение 3. Стратегия гейтирования IgA⁺ плазматических клеток в печени, селезенке и костном мозге методом проточной цитофлуориметрии.

Таблица 3. Характеристика доноров в исследовании влияния вакцинации на состав микробиоты.

Параметр	Число доноров
Общее число доноров	19
Мужчины (%)	10 (53)
Возраст, год (IQR)	48,6 (25)
Осложнения, n (%)	0 (0)
Применение антибиотиков, n (%)	0 (0)

Таблица 4. Характеристика доноров в исследовании связывания компонентов кишечной микробиоты антителами против RBD-домена белка Spike вируса SARS-CoV-2.

Параметр	Число доноров
Общее число доноров	12
Мужчины (%)	6 (50)
Возраст, год (IQR)	60 (8,5)
Осложнения, n (%)	0 (0)
Применение антибиотиков, n (%)	0 (0)

Таблица 5. Характеристика доноров в исследовании роли *S. salivarius* BLIS K12 в индукции анти-Spike-антител у вакцинированных доноров.

Параметр	+K12	-K12
Общее число доноров	15	21
Мужчины (%)	7 (44)	7(33)
Возраст, год (IQR)	27 (8)	36 (16)
Осложнения, n (%)	0 (0)	0(0)
Применение антибиотиков, n (%)	0 (0)	0 (0)

Таблица 6. Характеристика доноров с ревматоидным артритом в исследовании по изучению индукции антител в слюне и изменению микробиоты оральной полости при вакцинации против SARS-CoV-2.

Параметр	Число доноров
Общее число доноров	23
Мужчины (%)	5 (21)
Возраст, год (IQR)	68 (20)
Осложнения, n (%)	0 (0)
Применение антибиотиков, n (%)	0 (0)
Вакцинация 2x BNT162b2, n (%)	20(87)
Вакцинация 2x mRNA-1273, n (%)	1(4)
Вакцинация 2x ChAdOx1, n (%)	2(8)
Иммуносупрессия	
Ритуксимаб	11(48)
Метотрексат	10 (43)

Лефлуномид	1 (4)
Ингибиторы JAK-киназ	1 (4)
Ингибиторы TNF	1 (4)
Абатацепт	3 (13)
Преднизалон	5 (22)

Таблица 7. Список кандидатных белков поджелудочной железы, которые были выделены при помощи иммунопреципитации и дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

Белок	Кол-во уникальных пептидов	Мол. масса, кДа
Desmoplakin	50	332,91
78 kDa glucose-regulated protein	54	72,421
Polyadenylate-binding protein 1	33	70,67
Pancreatic alpha-amylase	38	57,318
Protein disulfide-isomerase	45	57,058
Vimentin	11	53,687
Actin, cytoplasmic 1; Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed	1	41,736
Elongation factor 2	33	95,313
Bile salt-activated lipase	29	65,812
Protein disulfide-isomerase A2	32	58,316
Cytosol aminopeptidase	9	56,141
Pancreatic triacylglycerol lipase	23	51,427
Carboxypeptidase A1	23	47,384
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	37	102,09
Stress-70 protein, mitochondrial	15	73,46
Fibronectin; Anastellin	0	272,53
Protein disulfide-isomerase A3	22	56,678
Inactive pancreatic lipase-related protein 1	23	52,695
Hypoxia up-regulated protein 1	24	111,18
Chymotrypsin-like elastase family member 1	14	28,9
Chymotrypsinogen B; Chymotrypsin B chain A; Chymotrypsin B chain B; Chymotrypsin B chain C	14	27,822
Gelsolin	11	85,941
Transketolase	16	67,63
Junction plakoglobin	14	81,8
Chymotrypsin-like elastase family member 2A	14	28,913
Endoplasmic reticulum chaperone protein	24	92,475
Pyruvate kinase PKM	14	57,844
Myosin regulatory light chain 12B	1	19,779
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	25	89,321
Chymotrypsin-like elastase family member 3B	9	28,904

Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, alpha skeletal muscle;Actin, gamma-enteric smooth muscle;Actin, aortic smooth muscle	8	42,019
Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2	2	59,153
Insulin-2;Insulin-2 B chain;Insulin-2 A chain	3	12,364

Таблица 8. Список кандидатных белков *Akkermansia muciniphila*, которые были выделены при помощи вестерн-блота и дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

Белок	Кол-во уникальных пептидов	Мол. масса, Да
Uncharacterized protein OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=CXU07_07735 PE=4 SV=1	60	120947
Tetratricopeptide repeat protein OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=J5W73_02815 PE=4 SV=1	60	120829
DNA topoisomerase OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=CXU07_05085 PE=3 SV=1	38	97223
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=AKKM5201_00390 PE=4 SV=1	41	96497
Beta-N-acetylglucosaminidase domain-containing protein OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=J5W73_00280 PE=4 SV=1	42	104657
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=J5W45_00340 PE=4 SV=1	32	96499
Valine--tRNA ligase OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=valS PE=3 SV=1	32	100435
Tol-pal system protein YbgF OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=AMLFYP55_00326 PE=4 SV=1	33	120722
Leucine--tRNA ligase OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=leuS PE=3 SV=1	25	98113
DNA gyrase subunit B OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=gyrB PE=3 SV=1	32	95000
Tetratricopeptide repeat protein OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=J5W73_08385 PE=3 SV=1	24	89969
Beta-N-acetylglucosaminidase domain-containing protein OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=J5W73_00280 PE=4 SV=1	28	104657
Beta-N-acetylglucosaminidase domain-containing protein OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=J5W73_00280 PE=4 SV=1	25	104657
Isoleucine--tRNA ligase OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=ileS PE=3 SV=1	29	102394
Isoleucine--tRNA ligase OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=ileS PE=3 SV=1	30	102394
Tetratricopeptide repeat protein OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=J5W62_08520 PE=3 SV=1	24	91042
Leucine--tRNA ligase OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=leuS PE=3 SV=1	25	98112

Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring) OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=J5W73_08675 PE=4 SV=1	20	82806
Insulinase family protein OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=J5W73_02975 PE=3 SV=1	51	163840
SeI1 repeat family protein OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=J5W73_11060 PE=4 SV=1	24	101343
AsmA_2 domain-containing protein OS=Akkermansia muciniphila OX=239935 GN=CXT92_07405 PE=4 SV=1	24	116073

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность моему научному руководителю Андрею Алексеевичу Круглову за неоценимый вклад в развитие моей научной деятельности, помощь в обозначении целей данной исследовательской работы, мотивирующие разговоры и плодотворное обсуждение результатов. Отдельно благодарю сотрудников и студентов отдела иммунологии НИИ ФХБ А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова Семина Ярослава Константиновича, Шаранову Наталью Эдуардовну, Гимаева Илью Альбертовича, Якупову Алису Газинуровну и Казаряна Рафаэла Шаеновича за помощь в освоении новых методик, в проведении экспериментов и за создание дружественной атмосферы.

Выражаю благодарность сотрудникам лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ИМБ В.А. Энгельгардта РАН под руководством Сергея Артуровича Недоспасова – Друцкой Марине Сергеевне и Губернаторовой Екатерине Олеговне за помощь в проведении некоторых экспериментов и поддержку.

Хотелось бы сказать спасибо сотрудникам лаборатории регуляции синтеза белка (зав. И.Н. Шатский) НИИ ФХБ А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова за помощь в проведении некоторых экспериментов и за дружественную атмосферу в институте.

Спасибо Ивану Витальевичу Смирнову (ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук) за помощь в проведении масс-спектрометрического анализа и Козловской Любове Игоревне (Федеральный научный центр им. И.П. Чумакова) за помощь в организации и проведении экспериментов с мышами K18-hACE2 Tg.

Отдельно благодарю сотрудников кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова – заведующего кафедрой Сергея Артуровича Недоспасова за формирование сильной научной базы по современной иммунологии, Взорову Нину Владимировну, Киселевского Дмитрия Борисовича за организацию учебного процесса, а также своих одноклассников, с которыми весь процесс обучения проходил в благоприятной и мотивирующей атмосфере.

Выражаю также глубокую благодарность сотрудникам Немецкого ревматологического научного центра (г. Берлин, Германия) – Фарзину Машреги и Катрин Леманн за помощь в проведении экспериментов по секвенированию микробиоты и обсуждение результатов, Павлу Дуреку за помощь в анализе данных секвенирования микробиоты, а также Юстусу Нинеманну за помощь в освоении новых методов.

Наконец, спасибо моим родителям и близким за поддержку на всех этапах моей учебной и научной деятельности.

Список литературы

1. Ansaldo E., Slayden L.C., Ching K.L., Koch M.A., Wolf N.K., Plichta D.R., Brown E.M., Graham D.B., Xavier R.J., Moon J.J. and Barton G.M. Akkermansia muciniphila induces intestinal adaptive immune responses during homeostasis // *Science*. 2019. V. 364. №. 6446. P. 1179-1184.
2. Armstrong A.J.S., Horton D.B., Andrews T., Greenberg P., Roy J., Gennaro M.L., Carson J.L., Panettieri R.A., Barrett E.S. and Blaser M.J. Saliva microbiome in relation to SARS-CoV-2 infection in a prospective cohort of healthy US adults // *EBioMedicine*. 2023. V. 94. №. P. 104731.
3. Arnone D., Vallier M., Hergalant S., Chabot C., Ndiaye N.C., Moulin D., Aignatoaei A.M., Alberto J.M., Louis H., Boulard O., Mayeur C., Dreumont N., Peuker K., Strigli A., Zeissig S., Hansmannel F., Chamaillard M., Kokten T. and Peyrin-Biroulet L. Long-Term Overconsumption of Fat and Sugar Causes a Partially Reversible Pre-inflammatory Bowel Disease State // *Front Nutr*. 2021. V. 8. №. P. 758518.
4. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.M., Bertalan M., Borruel N., Casellas F., Fernandez L., Gautier L., Hansen T., Hattori M., Hayashi T., Kleerebezem M., Kurokawa K., Leclerc M., Levenez F., Manichanh C., Nielsen H.B., Nielsen T., Pons N., Poulain J., Qin J., Sicheritz-Ponten T., Tims S., Torrents D., Ugarte E., Zoetendal E.G., Wang J., Guarner F., Pedersen O., de Vos W.M., Brunak S., Dore J., Meta H.I.T.C., Antolin M., Artiguenave F., Blottiere H.M., Almeida M., Brechot C., Cara C., Chervaux C., Cultrone A., Delorme C., Denariaz G., Dervyn R., Foerster K.U., Friss C., van de Guchte M., Guedon E., Haimet F., Huber W., van Hylckama-Vlieg J., Jamet A., Juste C., Kaci G., Knol J., Lakhdari O., Layec S., Le Roux K., Maguin E., Merieux A., Melo Minardi R., M'Rini C., Muller J., Oozeer R., Parkhill J., Renault P., Rescigno M., Sanchez N., Sunagawa S., Torrejon A., Turner K., Vandemeulebrouck G., Varela E., Winogradsky Y., Zeller G., Weissenbach J., Ehrlich S.D. and Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome // *Nature*. 2011. V. 473. №. 7346. P. 174-180.
5. Backhed F., Roswall J., Peng Y., Feng Q., Jia H., Kovatcheva-Datchary P., Li Y., Xia Y., Xie H., Zhong H., Khan M.T., Zhang J., Li J., Xiao L., Al-Aama J., Zhang D., Lee Y.S., Kotowska D., Colding C., Tremaroli V., Yin Y., Bergman S., Xu X., Madsen L., Kristiansen K., Dahlgren J. and Wang J. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life // *Cell Host Microbe*. 2015. V. 17. №. 5. P. 690-703.
6. Bae M., Cassilly C.D., Liu X., Park S.M., Tusi B.K., Chen X., Kwon J., Filipcik P., Bolze A.S., Liu Z., Vlamakis H., Graham D.B., Buhrlage S.J., Xavier R.J. and Clardy J. Akkermansia muciniphila phospholipid induces homeostatic immune responses // *Nature*. 2022. V. 608. №. 7921. P. 168-173.
7. Bai X., Chen S., Chi X., Xie B., Guo X., Feng H., Wei P., Zhang D., Xie S., Xie T., Chen Y., Gou M., Qiao Q., Liu X., Jin W., Xu W., Zhao Z., Xing Q., Wang

- X., Zhang X. and Dong C. Reciprocal regulation of T follicular helper cells and dendritic cells drives colitis development // *Nat Immunol.* 2024. V. №. P.
8. Baker J.L., Mark Welch J.L., Kauffman K.M., McLean J.S. and He X. The oral microbiome: diversity, biogeography and human health // *Nat Rev Microbiol.* 2024. V. 22. №. 2. P. 89-104.
 9. Barreau F., Meinzer U., Chareyre F., Berrebi D., Niwa-Kawakita M., Dussaillant M., Foligne B., Ollendorff V., Heyman M., Bonacorsi S., Lesuffleur T., Sterkers G., Giovannini M. and Hugot J.P. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice // *PLoS One.* 2007. V. 2. №. 6. P. e523.
 10. Belkaid Y. and Harrison O.J. Homeostatic Immunity and the Microbiota // *Immunity.* 2017. V. 46. №. 4. P. 562-576.
 11. Beller A., Kruglov A., Durek P., von Goetze V., Werner K., Heinz G.A., Ninnemann J., Lehmann K., Maier R., Hoffmann U., Riedel R., Heiking K., Zimmermann J., Siegmund B., Mashreghi M.F., Radbruch A. and Chang H.D. Specific microbiota enhances intestinal IgA levels by inducing TGF-beta in T follicular helper cells of Peyer's patches in mice // *Eur J Immunol.* 2020. V. 50. №. 6. P. 783-794.
 12. Bernstein L.E., Berry J., Kim S., Canavan B. and Grinspoon S.K. Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome // *Arch Intern Med.* 2006. V. 166. №. 8. P. 902-908.
 13. Biswas S., Mandal G., Anadon C.M., Chaurio R.A., Lopez-Bailon L.U., Nagy M.Z., Mine J.A., Hanggi K., Sprenger K.B., Innamarato P., Harro C.M., Powers J.J., Johnson J., Fang B., Eysha M., Nan X., Li R., Perez B.A., Curiel T.J., Yu X., Rodriguez P.C. and Conejo-Garcia J.R. Targeting intracellular oncoproteins with dimeric IgA promotes expulsion from the cytoplasm and immune-mediated control of epithelial cancers // *Immunity.* 2023. V. 56. №. 11. P. 2570-2583 e2576.
 14. Bogaert D., van Beveren G.J., de Koff E.M., Lusarreta Parga P., Balcazar Lopez C.E., Koppensteiner L., Clerc M., Hasrat R., Arp K., Chu M., de Groot P.C.M., Sanders E.A.M., van Houten M.A. and de Steenhuijsen Pijters W.A.A. Mother-to-infant microbiota transmission and infant microbiota development across multiple body sites // *Cell Host Microbe.* 2023. V. 31. №. 3. P. 447-460 e446.
 15. Brandtzaeg P. and Korsrud F.R. Significance of different J chain profiles in human tissues: generation of IgA and IgM with binding site for secretory component is related to the J chain expressing capacity of the total local immunocyte population, including IgG and IgD producing cells, and depends on the clinical state of the tissue // *Clin Exp Immunol.* 1984. V. 58. №. 3. P. 709-718.
 16. Braun J., Loyal L., Frensch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Rohmel J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I., Muller M.A., Hocke A., Witzernath M., Suttorp N., Kern F., Reimer U., Wenschuh H., Drosten C., Corman V.M., Giesecke-Thiel C., Sander L.E.

- and Thiel A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19 // *Nature*. 2020. V. 587. №. 7833. P. 270-274.
17. Breedveld A. and van Egmond M. IgA and Fc α RI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities // *Front Immunol*. 2019. V. 10. №. P. 553.
 18. Bruno M.E., Frantz A.L., Rogier E.W., Johansen F.E. and Kaetzel C.S. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor by the classical and alternative NF-kappaB pathways in intestinal epithelial cells // *Mucosal Immunol*. 2011. V. 4. №. 4. P. 468-478.
 19. Bunker J.J. and Bendelac A. IgA Responses to Microbiota // *Immunity*. 2018. V. 49. №. 2. P. 211-224.
 20. Bunker J.J., Erickson S.A., Flynn T.M., Henry C., Koval J.C., Meisel M., Jabri B., Antonopoulos D.A., Wilson P.C. and Bendelac A. Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota // *Science*. 2017. V. 358. №. 6361. P.
 21. Bunker J.J., Flynn T.M., Koval J.C., Shaw D.G., Meisel M., McDonald B.D., Ishizuka I.E., Dent A.L., Wilson P.C., Jabri B., Antonopoulos D.A. and Bendelac A. Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A // *Immunity*. 2015. V. 43. №. 3. P. 541-553.
 22. Buraczynska M., Baranowicz-Gaszczyk I., Tarach J. and Ksiazek A. Toll-like receptor 4 gene polymorphism and early onset of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes // *Hum Immunol*. 2009. V. 70. №. 2. P. 121-124.
 23. Cao A.T., Yao S., Gong B., Elson C.O. and Cong Y. Th17 cells upregulate polymeric Ig receptor and intestinal IgA and contribute to intestinal homeostasis // *J Immunol*. 2012. V. 189. №. 9. P. 4666-4673.
 24. Cao A.T., Yao S., Gong B., Nurieva R.I., Elson C.O. and Cong Y. Interleukin (IL)-21 promotes intestinal IgA response to microbiota // *Mucosal Immunol*. 2015. V. 8. №. 5. P. 1072-1082.
 25. Caruso R., Lo B.C. and Nunez G. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease // *Nat Rev Immunol*. 2020. V. 20. №. 7. P. 411-426.
 26. Cazac B.B. and Roes J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo // *Immunity*. 2000. V. 13. №. 4. P. 443-451.
 27. Ceglia S., Berthelette A., Howley K., Li Y., Mortzfeld B., Bhattarai S.K., Yiew N.K.H., Xu Y., Brink R., Cyster J.G., Hooper L.V., Randolph G.J., Bucci V. and Reboldi A. An epithelial cell-derived metabolite tunes immunoglobulin A secretion by gut-resident plasma cells // *Nat Immunol*. 2023. V. 24. №. 3. P. 531-544.
 28. Cerutti A. and Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses // *Immunity*. 2008. V. 28. №. 6. P. 740-750.
 29. Cheung K.S., Hung I.F.N., Chan P.P.Y., Lung K.C., Tso E., Liu R., Ng Y.Y., Chu M.Y., Chung T.W.H., Tam A.R., Yip C.C.Y., Leung K.H., Fung A.Y., Zhang R.R., Lin Y., Cheng H.M., Zhang A.J.X., To K.K.W., Chan K.H., Yuen K.Y. and Leung W.K. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort:

- Systematic Review and Meta-analysis // *Gastroenterology*. 2020. V. 159. №. 1. P. 81-95.
30. Choi Y., Bose S., Seo J., Shin J.H., Lee D., Kim Y., Kang S.G. and Kim H. Effects of Live and Pasteurized Forms of *Akkermansia* from the Human Gut on Obesity and Metabolic Dysregulation // *Microorganisms*. 2021. V. 9. №. 10. P.
 31. Chorny A., Puga I. and Cerutti A. Innate signaling networks in mucosal IgA class switching // *Adv Immunol*. 2010. V. 107. №. P. 31-69.
 32. Clemente J.C., Ursell L.K., Parfrey L.W. and Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view // *Cell*. 2012. V. 148. №. 6. P. 1258-1270.
 33. Collado M.C., Derrien M., Isolauri E., de Vos W.M. and Salminen S. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly // *Appl Environ Microbiol*. 2007. V. 73. №. 23. P. 7767-7770.
 34. Conley M.E. and Delacroix D.L. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? // *Ann Intern Med*. 1987. V. 106. №. 6. P. 892-899.
 35. Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency // *J Clin Immunol*. 2001. V. 21. №. 5. P. 303-309.
 36. Dao M.C., Everard A., Aron-Wisnewsky J., Sokolovska N., Prifti E., Verger E.O., Kayser B.D., Levenez F., Chilloux J., Hoyles L., Consortium M.I.-O., Dumas M.E., Rizkalla S.W., Dore J., Cani P.D. and Clement K. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology // *Gut*. 2016. V. 65. №. 3. P. 426-436.
 37. Darwich A., Pozzi C., Fornasa G., Lizier M., Azzolini E., Spadoni I., Carli F., Voza A., Desai A., Ferrero C., Germagnoli L., Task-force I.C.-., Mantovani A. and Rescigno M. BNT162b2 vaccine induces antibody release in saliva: a possible role for mucosal viral protection? // *EMBO Mol Med*. 2022. V. 14. №. 5. P. e15326.
 38. Depommier C., Van Hul M., Everard A., Delzenne N.M., De Vos W.M. and Cani P.D. Pasteurized *Akkermansia muciniphila* increases whole-body energy expenditure and fecal energy excretion in diet-induced obese mice // *Gut Microbes*. 2020. V. 11. №. 5. P. 1231-1245.
 39. Derrien M., Vaughan E.E., Plugge C.M. and de Vos W.M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium // *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004. V. 54. №. Pt 5. P. 1469-1476.
 40. Di Gregorio G.B., Hensley L., Lu T., Ranganathan G. and Kern P.A. Lipid and carbohydrate metabolism in mice with a targeted mutation in the IL-6 gene: absence of development of age-related obesity // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004. V. 287. №. 1. P. E182-187.
 41. Di Pierro F., Iqtadar S., Mumtaz S.U., Bertuccioli A., Recchia M., Zerbinati N. and Khan A. Clinical Effects of *Streptococcus salivarius* K12 in Hospitalized

- COVID-19 Patients: Results of a Preliminary Study // *Microorganisms*. 2022. V. 10. №. 10. P.
42. Do M.H., Lee E., Oh M.J., Kim Y. and Park H.Y. High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change // *Nutrients*. 2018. V. 10. №. 6. P.
43. Donaldson G.P., Ladinsky M.S., Yu K.B., Sanders J.G., Yoo B.B., Chou W.C., Conner M.E., Earl A.M., Knight R., Bjorkman P.J. and Mazmanian S.K. Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization // *Science*. 2018. V. 360. №. 6390. P. 795-800.
44. Donaldson G.P., Lee S.M. and Mazmanian S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota // *Nat Rev Microbiol*. 2016. V. 14. №. 1. P. 20-32.
45. Dunseath G.J., Luzio S.D., Peter R. and Owens D.R. The pathophysiology of glucose intolerance in newly diagnosed, untreated T2DM // *Acta Diabetol*. 2022. V. 59. №. 2. P. 207-215.
46. Everard A., Belzer C., Geurts L., Ouwerkerk J.P., Druart C., Bindels L.B., Guiot Y., Derrien M., Muccioli G.G., Delzenne N.M., de Vos W.M. and Cani P.D. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. V. 110. №. 22. P. 9066-9071.
47. F D.I.P. and Colombo M. The administration of *S. salivarius* K12 to children may reduce the rate of SARS-CoV-2 infection // *Minerva Med*. 2021. V. 112. №. 4. P. 514-516.
48. Fadlallah J., El Kafsi H., Sterlin D., Juste C., Parizot C., Dorgham K., Autaa G., Gouas D., Almeida M., Lepage P., Pons N., Le Chatelier E., Levenez F., Kennedy S., Galleron N., de Barros J.P., Malphettes M., Galicier L., Boutboul D., Mathian A., Miyara M., Oksenhendler E., Amoura Z., Dore J., Fieschi C., Ehrlich S.D., Larsen M. and Gorochov G. Microbial ecology perturbation in human IgA deficiency // *Sci Transl Med*. 2018. V. 10. №. 439. P.
49. Fagarasan S. and Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences // *Nat Rev Immunol*. 2003. V. 3. №. 1. P. 63-72.
50. Fagarasan S., Kawamoto S., Kanagawa O. and Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis // *Annu Rev Immunol*. 2010. V. 28. №. P. 243-273.
51. Fagarasan S., Kinoshita K., Muramatsu M., Ikuta K. and Honjo T. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria // *Nature*. 2001. V. 413. №. 6856. P. 639-643.
52. Ferraz-Amaro I., Arce-Franco M., Muniz J., Lopez-Fernandez J., Hernandez-Hernandez V., Franco A., Quevedo J., Martinez-Martin J. and Diaz-Gonzalez F. Systemic blockade of TNF-alpha does not improve insulin resistance in humans // *Horm Metab Res*. 2011. V. 43. №. 11. P. 801-808.
53. Forster S.C., Kumar N., Anonye B.O., Almeida A., Viciani E., Stares M.D., Dunn M., Mkandawire T.T., Zhu A., Shao Y., Pike L.J., Louie T., Browne H.P., Mitchell A.L., Neville B.A., Finn R.D. and Lawley T.D. A human gut bacterial

- genome and culture collection for improved metagenomic analyses // *Nat Biotechnol.* 2019. V. 37. №. 2. P. 186-192.
54. Fritz J.H., Rojas O.L., Simard N., McCarthy D.D., Hapfelmeier S., Rubino S., Robertson S.J., Larijani M., Gosselin J., Ivanov, II, Martin A., Casellas R., Philpott D.J., Girardin S.E., McCoy K.D., Macpherson A.J., Paige C.J. and Gommerman J.L. Acquisition of a multifunctional IgA⁺ plasma cell phenotype in the gut // *Nature.* 2011. V. 481. №. 7380. P. 199-203.
55. Fu Y., Wang Z., Yu B., Lin Y., Huang E., Liu R., Zhao C., Lu M., Xu W., Liu H., Liu Y., Wang L. and Chu Y. Intestinal CD11b(+) B Cells Ameliorate Colitis by Secreting Immunoglobulin A // *Front Immunol.* 2021. V. 12. №. P. 697725.
56. Fulde M., Sommer F., Chassaing B., van Vorst K., Dupont A., Hensel M., Basic M., Klopfleisch R., Rosenstiel P., Bleich A., Backhed F., Gewirtz A.T. and Hornef M.W. Neonatal selection by Toll-like receptor 5 influences long-term gut microbiota composition // *Nature.* 2018. V. 560. №. 7719. P. 489-493.
57. Galeeva J.S., Fedorov D.E., Starikova E.V., Manolov A.I., Pavlenko A.V., Selezneva O.V., Klimina K.M., Veselovsky V.A., Morozov M.D., Yanushevich O.O., Krikheli N.I., Levchenko O.V., Andreev D.N., Sokolov F.S., Fomenko A.K., Devkota M.K., Andreev N.G., Zaborovskiy A.V., Bely P.A., Tsaregorodtsev S.V., Evdokimov V.V., Maev I.V., Govorun V.M. and Ilina E.N. Microbial Signatures in COVID-19: Distinguishing Mild and Severe Disease via Gut Microbiota // *Biomedicines.* 2024. V. 12. №. 5. P.
58. Ganjifrockwala F., Joseph J. and George G. Serum Oxidized LDL Levels in Type 2 Diabetic Patients with Retinopathy in Mthatha Region of the Eastern Cape Province of South Africa // *Oxid Med Cell Longev.* 2016. V. 2016. №. P. 2063103.
59. Gensollen T., Iyer S.S., Kasper D.L. and Blumberg R.S. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system // *Science.* 2016. V. 352. №. 6285. P. 539-544.
60. Giacco F. and Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications // *Circ Res.* 2010. V. 107. №. 9. P. 1058-1070.
61. Gil-Cruz C., Perez-Shibayama C., De Martin A., Ronchi F., van der Borgh K., Niederer R., Onder L., Lutge M., Novkovic M., Nindl V., Ramos G., Arnoldini M., Slack E.M.C., Boivin-Jahns V., Jahns R., Wyss M., Mooser C., Lambrecht B.N., Maeder M.T., Rickli H., Flatz L., Eriksson U., Geuking M.B., McCoy K.D. and Ludewig B. Microbiota-derived peptide mimics drive lethal inflammatory cardiomyopathy // *Science.* 2019. V. 366. №. 6467. P. 881-886.
62. Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D., Boneca I.G., Philpott D.J., Sansonetti P.J. and Mengin-Lecreulx D. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2 // *J Biol Chem.* 2003. V. 278. №. 43. P. 41702-41708.
63. Girdhar K., Huang Q., Chow I.T., Vatanen T., Brady C., Raisingani A., Autissier P., Atkinson M.A., Kwok W.W., Kahn C.R. and Altindis E. A gut

- microbial peptide and molecular mimicry in the pathogenesis of type 1 diabetes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022. V. 119. №. 31. P. e2120028119.
64. Gluvic Z., Zanic B., Resanovic I., Obradovic M., Mitrovic A., Radak D. and Isenovic E.R. Link between Metabolic Syndrome and Insulin Resistance // *Curr Vasc Pharmacol*. 2017. V. 15. №. 1. P. 30-39.
65. Gommerman J.L., Browning J.L. and Ware C.F. The Lymphotoxin Network: orchestrating a type I interferon response to optimize adaptive immunity // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014. V. 25. №. 2. P. 139-145.
66. Gonzalez-Quintela A., Alende R., Gude F., Campos J., Rey J., Meijide L.M., Fernandez-Merino C. and Vidal C. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities // *Clin Exp Immunol*. 2008. V. 151. №. 1. P. 42-50.
67. Goto Y., Panea C., Nakato G., Cebula A., Lee C., Diez M.G., Laufer T.M., Ignatowicz L. and Ivanov, II. Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation // *Immunity*. 2014. V. 40. №. 4. P. 594-607.
68. Gray J., Oehrle K., Worthen G., Alenghat T., Whitsett J. and Deshmukh H. Intestinal commensal bacteria mediate lung mucosal immunity and promote resistance of newborn mice to infection // *Sci Transl Med*. 2017. V. 9. №. 376. P.
69. Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Kruglov A.A., Marakusha B.I., Shakhov A.N., Murakami T., Drutskaya L.N., Forster I., Clausen B.E., Tessarollo L., Ryffel B., Kuprash D.V. and Nedospasov S.A. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects // *Immunity*. 2005. V. 22. №. 1. P. 93-104.
70. Gutzeit C., Magri G. and Cerutti A. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction // *Immunol Rev*. 2014. V. 260. №. 1. P. 76-85.
71. Guzman M., Lundborg L.R., Yeasmin S., Tyler C.J., Zgajnar N.R., Taupin V., Dobaczewska K., Mikulski Z., Bamias G. and Rivera-Nieves J. An integrin alphaEbeta7-dependent mechanism of IgA transcytosis requires direct plasma cell contact with intestinal epithelium // *Mucosal Immunol*. 2021. V. 14. №. 6. P. 1347-1357.
72. He B., Xu W., Santini P.A., Polydorides A.D., Chiu A., Estrella J., Shan M., Chadburn A., Villanacci V., Plebani A., Knowles D.M., Rescigno M. and Cerutti A. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL // *Immunity*. 2007. V. 26. №. 6. P. 812-826.
73. Hernandez-Teran A., Mejia-Nepomuceno F., Herrera M.T., Barreto O., Garcia E., Castillejos M., Boukadida C., Matias-Florentino M., Rincon-Rubio A., Avila-Rios S., Mujica-Sanchez M., Serna-Munoz R., Becerril-Vargas E., Guadarrama-Perez C., Ahumada-Topete V.H., Rodriguez-Llamazares S.,

- Martinez-Orozco J.A., Salas-Hernandez J., Perez-Padilla R. and Vazquez-Perez J.A. Dysbiosis and structural disruption of the respiratory microbiota in COVID-19 patients with severe and fatal outcomes // *Sci Rep*. 2021. V. 11. №. 1. P. 21297.
74. Hirota K., Turner J.E., Villa M., Duarte J.H., Demengeot J., Steinmetz O.M. and Stockinger B. Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses // *Nat Immunol*. 2013. V. 14. №. 4. P. 372-379.
75. Holvoet P., Lee D.H., Steffes M., Gross M. and Jacobs D.R., Jr. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome // *JAMA*. 2008. V. 299. №. 19. P. 2287-2293.
76. Honda K. and Littman D.R. The microbiome in infectious disease and inflammation // *Annu Rev Immunol*. 2012. V. 30. №. P. 759-795.
77. Honka M.J., Latva-Rasku A., Bucci M., Virtanen K.A., Hannukainen J.C., Kalliokoski K.K. and Nuutila P. Insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle, adipose tissue and liver: a positron emission tomography study // *Eur J Endocrinol*. 2018. V. 178. №. 5. P. 523-531.
78. Hooper L.V., Littman D.R. and Macpherson A.J. Interactions between the microbiota and the immune system // *Science*. 2012. V. 336. №. 6086. P. 1268-1273.
79. Hoque M.N., Sarkar M.M.H., Rahman M.S., Akter S., Banu T.A., Goswami B., Jahan I., Hossain M.S., Shamsuzzaman A.K.M., Nafisa T., Molla M.M.A., Yeasmin M., Ghosh A.K., Osman E., Alam S.K.S., Uzzaman M.S., Habib M.A., Mahmud A.S.M., Crandall K.A., Islam T. and Khan M.S. SARS-CoV-2 infection reduces human nasopharyngeal commensal microbiome with inclusion of pathobionts // *Sci Rep*. 2021. V. 11. №. 1. P. 24042.
80. Hou K., Wu Z.X., Chen X.Y., Wang J.Q., Zhang D., Xiao C., Zhu D., Koya J.B., Wei L., Li J. and Chen Z.S. Microbiota in health and diseases // *Signal Transduct Target Ther*. 2022. V. 7. №. 1. P. 135.
81. Ichinohe T., Pang I.K., Kumamoto Y., Peaper D.R., Ho J.H., Murray T.S. and Iwasaki A. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. V. 108. №. 13. P. 5354-5359.
82. Isho B., Abe K.T., Zuo M., Jamal A.J., Rathod B., Wang J.H., Li Z., Chao G., Rojas O.L., Bang Y.M., Pu A., Christie-Holmes N., Gervais C., Ceccarelli D., Samavarchi-Tehrani P., Guvenc F., Budyłowski P., Li A., Paterson A., Yue F.Y., Marin L.M., Caldwell L., Wrana J.L., Colwill K., Sicheri F., Mubareka S., Gray-Owen S.D., Drews S.J., Siqueira W.L., Barrios-Rodiles M., Ostrowski M., Rini J.M., Durocher Y., McGeer A.J., Gommerman J.L. and Gingras A.C. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients // *Sci Immunol*. 2020. V. 5. №. 52. P.
83. Jackson C.B., Farzan M., Chen B. and Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022. V. 23. №. 1. P. 3-20.

84. Jakobsson H.E., Abrahamsson T.R., Jenmalm M.C., Harris K., Quince C., Jernberg C., Bjorksten B., Engstrand L. and Andersson A.F. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section // *Gut*. 2014. V. 63. №. 4. P. 559-566.
85. Jayashree B., Bibin Y.S., Prabhu D., Shanthirani C.S., Gokulakrishnan K., Lakshmi B.S., Mohan V. and Balasubramanyam M. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes // *Mol Cell Biochem*. 2014. V. 388. №. 1-2. P. 203-210.
86. Jia L., Vianna C.R., Fukuda M., Berglund E.D., Liu C., Tao C., Sun K., Liu T., Harper M.J., Lee C.E., Lee S., Scherer P.E. and Elmquist J.K. Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance // *Nat Commun*. 2014. V. 5. №. P. 3878.
87. Jogdand G.M., Mohanty S. and Devadas S. Regulators of Tfh Cell Differentiation // *Front Immunol*. 2016. V. 7. №. P. 520.
88. Johansen F.E., Pekna M., Norderhaug I.N., Haneberg B., Hietala M.A., Krajci P., Betsholtz C. and Brandtzaeg P. Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice // *J Exp Med*. 1999. V. 190. №. 7. P. 915-922.
89. Johansson M.E., Phillipson M., Petersson J., Velcich A., Holm L. and Hansson G.C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. V. 105. №. 39. P. 15064-15069.
90. Kang H.S., Chin R.K., Wang Y., Yu P., Wang J., Newell K.A. and Fu Y.X. Signaling via LTbetaR on the lamina propria stromal cells of the gut is required for IgA production // *Nat Immunol*. 2002. V. 3. №. 6. P. 576-582.
91. Khan S., Waliullah S., Godfrey V., Khan M.A.W., Ramachandran R.A., Cantarel B.L., Behrendt C., Peng L., Hooper L.V. and Zaki H. Dietary simple sugars alter microbial ecology in the gut and promote colitis in mice // *Sci Transl Med*. 2020. V. 12. №. 567. P.
92. Kim K.A., Gu W., Lee I.A., Joh E.H. and Kim D.H. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway // *PLoS One*. 2012. V. 7. №. 10. P. e47713.
93. Kim M., Galan C., Hill A.A., Wu W.J., Fehlner-Peach H., Song H.W., Schady D., Bettini M.L., Simpson K.W., Longman R.S., Littman D.R. and Diehl G.E. Critical Role for the Microbiota in CX(3)CR1(+) Intestinal Mononuclear Phagocyte Regulation of Intestinal T Cell Responses // *Immunity*. 2018a. V. 49. №. 1. P. 151-163 e155.
94. Kim Y., Kim G., Kim S., Cho B., Kim S.Y., Do E.J., Bae D.J., Kim S., Kweon M.N., Song J.S., Park S.H., Hwang S.W., Kim M.N., Kim Y., Min K., Kim S.H., Adams M.D., Lee C., Park H. and Park S.R. Fecal microbiota

- transplantation improves anti-PD-1 inhibitor efficacy in unresectable or metastatic solid cancers refractory to anti-PD-1 inhibitor // *Cell Host Microbe*. 2024. V. №. P.
95. Kim Y.I., Song J.H., Ko H.J., Kweon M.N., Kang C.Y., Reinecker H.C. and Chang S.Y. CX(3)CR1(+) Macrophages and CD8(+) T Cells Control Intestinal IgA Production // *J Immunol*. 2018b. V. 201. №. 4. P. 1287-1294.
 96. Kimura S., Kobayashi N., Nakamura Y., Kanaya T., Takahashi D., Fujiki R., Mutoh M., Obata Y., Iwanaga T., Nakagawa T., Kato N., Sato S., Kaisho T., Ohno H. and Hase K. Sox8 is essential for M cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice // *J Exp Med*. 2019. V. 216. №. 4. P. 831-846.
 97. Klover P.J., Clementi A.H. and Mooney R.A. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity // *Endocrinology*. 2005. V. 146. №. 8. P. 3417-3427.
 98. Korpela K., Blakstad E.W., Moltu S.J., Strommen K., Nakstad B., Ronnestad A.E., Braekke K., Iversen P.O., Drevon C.A. and de Vos W. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates // *Sci Rep*. 2018. V. 8. №. 1. P. 2453.
 99. Kozlovskaya L.I., Piniava A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Antonova L.P., Mefyod K.M., Prokosheva L.S., Sibirskina A.S., Tarasova Y.Y., Bayurova E.O., Gancharova O.S., Illarionova V.V., Glukhov G.S., Sokolova O.S., Shaitan K.V., Moysenovich A.M., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Gmyl L.V., Ipatova E.G., Kirpichnikov M.P., Egorov A.M., Siniugina A.A. and Ishmukhametov A.A. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies // *Emerg Microbes Infect*. 2021. V. 10. №. 1. P. 1790-1806.
 100. Kreye J., Reincke S.M., Kornau H.C., Sanchez-Sendin E., Corman V.M., Liu H., Yuan M., Wu N.C., Zhu X., Lee C.D., Trimpert J., Holtje M., Dietert K., Stoffler L., von Wardenburg N., van Hoof S., Homeyer M.A., Hoffmann J., Abdelgawad A., Gruber A.D., Bertzbach L.D., Vladimirova D., Li L.Y., Barthel P.C., Skriner K., Hocke A.C., Hippenstiel S., Witzenrath M., Suttorp N., Kurth F., Franke C., Endres M., Schmitz D., Jeworowski L.M., Richter A., Schmidt M.L., Schwarz T., Muller M.A., Drosten C., Wendisch D., Sander L.E., Osterrieder N., Wilson I.A. and Pruss H. A Therapeutic Non-self-reactive SARS-CoV-2 Antibody Protects from Lung Pathology in a COVID-19 Hamster Model // *Cell*. 2020. V. 183. №. 4. P. 1058-1069 e1019.
 101. Kruglov A.A., Grivennikov S.I., Kuprash D.V., Winsauer C., Prepens S., Seleznik G.M., Eberl G., Littman D.R., Heikenwalder M., Tumanov A.V. and Nedospasov S.A. Nonredundant function of soluble LTalpha3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis // *Science*. 2013. V. 342. №. 6163. P. 1243-1246.

102. Kubinak J.L., Petersen C., Stephens W.Z., Soto R., Bake E., O'Connell R.M. and Round J.L. MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health // *Cell Host Microbe*. 2015. V. 17. №. 2. P. 153-163.
103. Kunath B.J., De Rudder C., Laczny C.C., Letellier E. and Wilmes P. The oral-gut microbiome axis in health and disease // *Nat Rev Microbiol*. 2024. V. №. P.
104. Kunisawa J., Gohda M., Hashimoto E., Ishikawa I., Higuchi M., Suzuki Y., Goto Y., Panea C., Ivanov, II, Sumiya R., Aayam L., Wake T., Tajiri S., Kurashima Y., Shikata S., Akira S., Takeda K. and Kiyono H. Microbe-dependent CD11b+ IgA+ plasma cells mediate robust early-phase intestinal IgA responses in mice // *Nat Commun*. 2013. V. 4. №. P. 1772.
105. Kuprash D.V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Koroleva E.P., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Shakhov A.N., Southon E., Murphy W.J., Tessarollo L., Grivennikov S.I. and Nedospasov S.A. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches // *Eur J Immunol*. 2005. V. 35. №. 5. P. 1592-1600.
106. Kurashima Y., Kigoshi T., Murasaki S., Arai F., Shimada K., Seki N., Kim Y.G., Hase K., Ohno H., Kawano K., Ashida H., Suzuki T., Morimoto M., Saito Y., Sasou A., Goda Y., Yuki Y., Inagaki Y., Iijima H., Suda W., Hattori M. and Kiyono H. Pancreatic glycoprotein 2 is a first line of defense for mucosal protection in intestinal inflammation // *Nat Commun*. 2021. V. 12. №. 1. P. 1067.
107. Lamers M.M., Beumer J., van der Vaart J., Knoops K., Puschhof J., Breugem T.I., Ravelli R.B.G., Paul van Schayck J., Mykytyn A.Z., Duimel H.Q., van Donselaar E., Riesebosch S., Kuijpers H.J.H., Schipper D., van de Wetering W.J., de Graaf M., Koopmans M., Cuppen E., Peters P.J., Haagsmans B.L. and Clevers H. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes // *Science*. 2020. V. 369. №. 6499. P. 50-54.
108. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009. V. 1. №. 6. P. a001651.
109. Lecuyer E., Rakotobe S., Lengline-Garnier H., Lebreton C., Picard M., Juste C., Fritzen R., Eberl G., McCoy K.D., Macpherson A.J., Reynaud C.A., Cerf-Bensussan N. and Gaboriau-Routhiau V. Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses // *Immunity*. 2014. V. 40. №. 4. P. 608-620.
110. Lin X., Wang Y., Ma Z., Xie M., Liu Z., Cheng J., Tian Y. and Shi H. Correlation between caries activity and salivary microbiota in preschool children // *Front Cell Infect Microbiol*. 2023. V. 13. №. P. 1141474.
111. Liu M., Huang Y., Xu X., Li X., Alam M., Arunagiri A., Haataja L., Ding L., Wang S., Itkin-Ansari P., Kaufman R.J., Tsai B., Qi L. and Arvan P. Normal and defective pathways in biogenesis and maintenance of the insulin storage pool // *J Clin Invest*. 2021. V. 131. №. 2. P.

112. Liu Q., Mak J.W.Y., Su Q., Yeoh Y.K., Lui G.C., Ng S.S.S., Zhang F., Li A.Y.L., Lu W., Hui D.S., Chan P.K., Chan F.K.L. and Ng S.C. Gut microbiota dynamics in a prospective cohort of patients with post-acute COVID-19 syndrome // *Gut*. 2022a. V. 71. №. 3. P. 544-552.
113. Liu Q., Su Q., Zhang F., Tun H.M., Mak J.W.Y., Lui G.C., Ng S.S.S., Ching J.Y.L., Li A., Lu W., Liu C., Cheung C.P., Hui D.S.C., Chan P.K.S., Chan F.K.L. and Ng S.C. Multi-kingdom gut microbiota analyses define COVID-19 severity and post-acute COVID-19 syndrome // *Nat Commun*. 2022b. V. 13. №. 1. P. 6806.
114. Liu X., Yao J., Zhao Y., Wang J. and Qi H. Heterogeneous plasma cells and long-lived subsets in response to immunization, autoantigen and microbiota // *Nat Immunol*. 2022c. V. 23. №. 11. P. 1564-1576.
115. Liu Y., Yang M., Tang L., Wang F., Huang S., Liu S., Lei Y., Wang S., Xie Z., Wang W., Zhao X., Tang B. and Yang S. TLR4 regulates RORgammat(+) regulatory T-cell responses and susceptibility to colon inflammation through interaction with *Akkermansia muciniphila* // *Microbiome*. 2022d. V. 10. №. 1. P. 98.
116. Lu P., Sodhi C.P., Yamaguchi Y., Jia H., Prindle T., Jr., Fulton W.B., Vikram A., Bibby K.J., Morowitz M.J. and Hackam D.J. Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 prevents metabolic syndrome by regulating interactions between microbes and intestinal epithelial cells in mice // *Mucosal Immunol*. 2018. V. 11. №. 3. P. 727-740.
117. Lubin J.B., Green J., Maddux S., Denu L., Duranova T., Lanza M., Wynosky-Dolfi M., Flores J.N., Grimes L.P., Brodsky I.E., Planet P.J. and Silverman M.A. Arresting microbiome development limits immune system maturation and resistance to infection in mice // *Cell Host Microbe*. 2023. V. 31. №. 4. P. 554-570 e557.
118. Luck H., Khan S., Kim J.H., Copeland J.K., Revelo X.S., Tsai S., Chakraborty M., Cheng K., Tao Chan Y., Nohr M.K., Clemente-Casares X., Perry M.C., Ghazarian M., Lei H., Lin Y.H., Coburn B., Okrainec A., Jackson T., Poutanen S., Gaisano H., Allard J.P., Guttman D.S., Conner M.E., Winer S. and Winer D.A. Gut-associated IgA(+) immune cells regulate obesity-related insulin resistance // *Nat Commun*. 2019. V. 10. №. 1. P. 3650.
119. Lycke N., Erlandsson L., Ekman L., Schon K. and Leanderson T. Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection // *J Immunol*. 1999. V. 163. №. 2. P. 913-919.
120. Magri G., Comerma L., Pybus M., Sintes J., Llige D., Segura-Garzon D., Bascones S., Yeste A., Grasset E.K., Gutzeit C., Uzzan M., Ramanujam M., van Zelm M.C., Albero-Gonzalez R., Vazquez I., Iglesias M., Serrano S., Marquez L., Mercade E., Mehandru S. and Cerutti A. Human Secretory IgM Emerges from Plasma Cells Clonally Related to Gut Memory B Cells and Targets Highly Diverse Commensals // *Immunity*. 2017. V. 47. №. 1. P. 118-134 e118.

121. Majdoubi A., Michalski C., O'Connell S.E., Dada S., Narpala S., Gelinas J., Mehta D., Cheung C., Winkler D.F., Basappa M., Liu A.C., Gorges M., Barakauskas V.E., Irvine M., Mehalko J., Esposito D., Sekirov I., Jassem A.N., Goldfarb D.M., Pelech S., Douek D.C., McDermott A.B. and Lavoie P.M. A majority of uninfected adults show preexisting antibody reactivity against SARS-CoV-2 // *JCI Insight*. 2021. V. 6. №. 8. P.
122. Manolakis A.C., Kapsoritakis A.N., Tiaka E.K., Sidiropoulos A., Gerovassili A., Satra M., Vamvakopoulou D., Tsiopoulos F., Papanas N., Skoularigis I., Potamianos S.P. and Vamvakopoulos N. TLR4 gene polymorphisms: evidence for protection against type 2 diabetes but not for diabetes-associated ischaemic heart disease // *Eur J Endocrinol*. 2011. V. 165. №. 2. P. 261-267.
123. Mantis N.J., Rol N. and Corthesy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut // *Mucosal Immunol*. 2011. V. 4. №. 6. P. 603-611.
124. Marcos A., Nova E. and Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition // *Eur J Clin Nutr*. 2003. V. 57 Suppl 1. №. P. S66-69.
125. Mark Welch J.L., Ramirez-Puebla S.T. and Borisy G.G. Oral Microbiome Geography: Micron-Scale Habitat and Niche // *Cell Host Microbe*. 2020. V. 28. №. 2. P. 160-168.
126. Martinez-Medina M. and Garcia-Gil L.J. Escherichia coli in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive Escherichia coli pathogenicity // *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014. V. 5. №. 3. P. 213-227.
127. Martino C., Dilmore A.H., Burcham Z.M., Metcalf J.L., Jeste D. and Knight R. Microbiota succession throughout life from the cradle to the grave // *Nat Rev Microbiol*. 2022. V. 20. №. 12. P. 707-720.
128. Mazzini E., Massimiliano L., Penna G. and Rescigno M. Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to CD103(+) dendritic cells // *Immunity*. 2014. V. 40. №. 2. P. 248-261.
129. McCallum G. and Tropini C. The gut microbiota and its biogeography // *Nat Rev Microbiol*. 2024. V. 22. №. 2. P. 105-118.
130. Meyer C., Pimenta W., Woerle H.J., Van Haeften T., Szoke E., Mitrakou A. and Gerich J. Different mechanisms for impaired fasting glucose and impaired postprandial glucose tolerance in humans // *Diabetes Care*. 2006. V. 29. №. 8. P. 1909-1914.
131. Mirpuri J., Raetz M., Sturge C.R., Wilhelm C.L., Benson A., Savani R.C., Hooper L.V. and Yarovinsky F. Proteobacteria-specific IgA regulates maturation of the intestinal microbiota // *Gut Microbes*. 2014. V. 5. №. 1. P. 28-39.
132. Miyauchi E., Kim S.W., Suda W., Kawasumi M., Onawa S., Taguchi-Atarashi N., Morita H., Taylor T.D., Hattori M. and Ohno H. Gut

- microorganisms act together to exacerbate inflammation in spinal cords // Nature. 2020. V. 585. №. 7823. P. 102-106.
133. Moor K., Diard M., Sellin M.E., Felmy B., Wotzka S.Y., Toska A., Bakkeren E., Arnoldini M., Bansept F., Co A.D., Voller T., Minola A., Fernandez-Rodriguez B., Agatic G., Barbieri S., Piccoli L., Casiraghi C., Corti D., Lanzavecchia A., Regoes R.R., Loverdo C., Stocker R., Brumley D.R., Hardt W.D. and Slack E. High-avidity IgA protects the intestine by enchainning growing bacteria // Nature. 2017. V. 544. №. 7651. P. 498-502.
134. Moro-Sibilot L., Blanc P., Taillardet M., Bardel E., Couillault C., Boschetti G., Traverse-Glehen A., Defrance T., Kaiserlian D. and Dubois B. Mouse and Human Liver Contain Immunoglobulin A-Secreting Cells Originating From Peyer's Patches and Directed Against Intestinal Antigens // Gastroenterology. 2016. V. 151. №. 2. P. 311-323.
135. Muniz L.R., Knosp C. and Yeretssian G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease // Front Immunol. 2012. V. 3. №. P. 310.
136. Nagashima K., Sawa S., Nitta T., Tsutsumi M., Okamura T., Penninger J.M., Nakashima T. and Takayanagi H. Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota // Nat Immunol. 2017. V. 18. №. 6. P. 675-682.
137. Nakanishi Y., Sato T. and Ohteki T. Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization // Mucosal Immunol. 2015. V. 8. №. 1. P. 152-160.
138. Natarajan A., Zlitni S., Brooks E.F., Vance S.E., Dahlen A., Hedlin H., Park R.M., Han A., Schmidtke D.T., Verma R., Jacobson K.B., Parsonnet J., Bonilla H.F., Singh U., Pinsky B.A., Andrews J.R., Jagannathan P. and Bhatt A.S. Gastrointestinal symptoms and fecal shedding of SARS-CoV-2 RNA suggest prolonged gastrointestinal infection // Med. 2022. V. 3. №. 6. P. 371-387 e379.
139. Neumann C., Blume J., Roy U., Teh P.P., Vasanthakumar A., Beller A., Liao Y., Heinrich F., Arenzana T.L., Hackney J.A., Eidenschenk C., Galvez E.J.C., Stehle C., Heinz G.A., Maschmeyer P., Sidwell T., Hu Y., Amsen D., Romagnani C., Chang H.D., Kruglov A., Mashreghi M.F., Shi W., Strowig T., Rutz S., Kallies A. and Scheffold A. c-Maf-dependent T(reg) cell control of intestinal T(H)17 cells and IgA establishes host-microbiota homeostasis // Nat Immunol. 2019. V. 20. №. 4. P. 471-481.
140. Neurath M.F., Weigmann B., Finotto S., Glickman J., Nieuwenhuis E., Iijima H., Mizoguchi A., Mizoguchi E., Mudter J., Galle P.R., Bhan A., Autschbach F., Sullivan B.M., Szabo S.J., Glimcher L.H. and Blumberg R.S. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease // J Exp Med. 2002. V. 195. №. 9. P. 1129-1143.

141. Neutra M.R., Mantis N.J. and Kraehenbuhl J.P. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues // *Nat Immunol.* 2001. V. 2. №. 11. P. 1004-1009.
142. Ng K.W., Faulkner N., Cornish G.H., Rosa A., Harvey R., Hussain S., Ulferts R., Earl C., Wrobel A.G., Benton D.J., Roustan C., Bolland W., Thompson R., Agua-Doce A., Hobson P., Heaney J., Rickman H., Paraskevopoulou S., Houlihan C.F., Thomson K., Sanchez E., Shin G.Y., Spyer M.J., Joshi D., O'Reilly N., Walker P.A., Kjaer S., Riddell A., Moore C., Jebson B.R., Wilkinson M., Marshall L.R., Rosser E.C., Radziszewska A., Peckham H., Ciurtin C., Wedderburn L.R., Beale R., Swanton C., Gandhi S., Stockinger B., McCauley J., Gamblin S.J., McCoy L.E., Cherepanov P., Nastouli E. and Kassiotis G. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans // *Science.* 2020. V. 370. №. 6522. P. 1339-1343.
143. Ni J., Wu G.D., Albenberg L. and Tomov V.T. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017. V. 14. №. 10. P. 573-584.
144. Niess J.H., Brand S., Gu X., Landsman L., Jung S., McCormick B.A., Vyas J.M., Boes M., Ploegh H.L., Fox J.G., Littman D.R. and Reinecker H.C. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance // *Science.* 2005. V. 307. №. 5707. P. 254-258.
145. Ouellette A.J. Paneth cell alpha-defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine // *Springer Semin Immunopathol.* 2005. V. 27. №. 2. P. 133-146.
146. Oviedo-Boyso J., Bravo-Patino A. and Baizabal-Aguirre V.M. Collaborative action of Toll-like and NOD-like receptors as modulators of the inflammatory response to pathogenic bacteria // *Mediators Inflamm.* 2014. V. 2014. №. P. 432785.
147. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA // *Nat Rev Immunol.* 2012. V. 12. №. 12. P. 821-832.
148. Pabst O. and Slack E. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific // *Mucosal Immunol.* 2020. V. 13. №. 1. P. 12-21.
149. Palm N.W., de Zoete M.R., Cullen T.W., Barry N.A., Stefanowski J., Hao L., Degnan P.H., Hu J., Peter I., Zhang W., Ruggiero E., Cho J.H., Goodman A.L. and Flavell R.A. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease // *Cell.* 2014. V. 158. №. 5. P. 1000-1010.
150. Parlato M. and Yeretssian G. NOD-like receptors in intestinal homeostasis and epithelial tissue repair // *Int J Mol Sci.* 2014. V. 15. №. 6. P. 9594-9627.
151. Pasparakis M., Alexopoulou L., Episkopou V. and Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic

- cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response // *J Exp Med*. 1996. V. 184. №. 4. P. 1397-1411.
152. Pena-Cearra A., Palacios A., Pellon A., Castelo J., Pasco S.T., Seoane I., Barriales D., Martin J.E., Pascual-Itoiz M.A., Gonzalez-Lopez M., Martin-Ruiz I., Macias-Camara N., Gutiez N., Araujo-Aris S., Aransay A.M., Rodriguez H., Anguita J. and Abecia L. Akkermansia muciniphila-induced trained immune phenotype increases bacterial intracellular survival and attenuates inflammation // *Commun Biol*. 2024. V. 7. №. 1. P. 192.
153. Petersen M.C. and Shulman G.I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance // *Physiol Rev*. 2018. V. 98. №. 4. P. 2133-2223.
154. Peterson L.W. and Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis // *Nat Rev Immunol*. 2014. V. 14. №. 3. P. 141-153.
155. Plovier H., Everard A., Druart C., Depommier C., Van Hul M., Geurts L., Chilloux J., Ottman N., Duparc T., Lichtenstein L., Myridakis A., Delzenne N.M., Klievink J., Bhattacharjee A., van der Ark K.C., Aalvink S., Martinez L.O., Dumas M.E., Maiter D., Loumaye A., Hermans M.P., Thissen J.P., Belzer C., de Vos W.M. and Cani P.D. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice // *Nat Med*. 2017. V. 23. №. 1. P. 107-113.
156. Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., Liang S., Zhang W., Guan Y., Shen D., Peng Y., Zhang D., Jie Z., Wu W., Qin Y., Xue W., Li J., Han L., Lu D., Wu P., Dai Y., Sun X., Li Z., Tang A., Zhong S., Li X., Chen W., Xu R., Wang M., Feng Q., Gong M., Yu J., Zhang Y., Zhang M., Hansen T., Sanchez G., Raes J., Falony G., Okuda S., Almeida M., LeChatelier E., Renault P., Pons N., Batto J.M., Zhang Z., Chen H., Yang R., Zheng W., Li S., Yang H., Wang J., Ehrlich S.D., Nielsen R., Pedersen O., Kristiansen K. and Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes // *Nature*. 2012. V. 490. №. 7418. P. 55-60.
157. Reboldi A., Arnon T.I., Rodda L.B., Atakilit A., Sheppard D. and Cyster J.G. IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches // *Science*. 2016. V. 352. №. 6287. P. aaf4822.
158. Renegar K.B., Small P.A., Jr., Boykins L.G. and Wright P.F. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract // *J Immunol*. 2004. V. 173. №. 3. P. 1978-1986.
159. Rinninella E., Raoul P., Cintoni M., Franceschi F., Miggiano G.A.D., Gasbarrini A. and Mele M.C. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases // *Microorganisms*. 2019. V. 7. №. 1. P.
160. Robak O.H., Heimesaat M.M., Kruglov A.A., Prepens S., Ninnemann J., Gutbier B., Reppe K., Hochrein H., Suter M., Kirschning C.J., Marathe V., Buer J., Hornef M.W., Schnare M., Schneider P., Witzentrath M., Bereswill S., Steinhoff U., Suttorp N., Sander L.E., Chaput C. and Opitz B. Antibiotic

- treatment-induced secondary IgA deficiency enhances susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia // *J Clin Invest*. 2018. V. 128. №. 8. P. 3535-3545.
161. Rodriguez-Segade S., Camina M.F., Carnero A., Lorenzo M.J., Alban A., Quinteiro C. and Lojo S. High serum IgA concentrations in patients with diabetes mellitus: age-wise distribution and relation to chronic complications // *Clin Chem*. 1996. V. 42. №. 7. P. 1064-1067.
162. Rollenske T., Szijarto V., Lukasiewicz J., Guachalla L.M., Stojkovic K., Hartl K., Stulik L., Kocher S., Lasitschka F., Al-Saeedi M., Schroder-Braunstein J., von Frankenberg M., Gaebelein G., Hoffmann P., Klein S., Heeg K., Nagy E., Nagy G. and Wardemann H. Cross-specificity of protective human antibodies against *Klebsiella pneumoniae* LPS O-antigen // *Nat Immunol*. 2018. V. 19. №. 6. P. 617-624.
163. Routy B., Le Chatelier E., Derosa L., Duong C.P.M., Alou M.T., Daillere R., Fluckiger A., Messaoudene M., Rauber C., Roberti M.P., Fidelle M., Flament C., Poirier-Colame V., Opolon P., Klein C., Iribarren K., Mondragon L., Jacquilot N., Qu B., Ferrere G., Clemenson C., Mezquita L., Masip J.R., Naltet C., Brosseau S., Kaderbhai C., Richard C., Rizvi H., Levenez F., Galleron N., Quinquis B., Pons N., Ryffel B., Minard-Colin V., Gonin P., Soria J.C., Deutsch E., Loriot Y., Ghiringhelli F., Zalcman G., Goldwasser F., Escudier B., Hellmann M.D., Eggermont A., Raoult D., Albiges L., Kroemer G. and Zitvogel L. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors // *Science*. 2018. V. 359. №. 6371. P. 91-97.
164. Samuel V.T. and Shulman G.I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links // *Cell*. 2012. V. 148. №. 5. P. 852-871.
165. Sano K., Bhavsar D., Singh G., Floda D., Srivastava K., Gleason C., Group P.S., Carreno J.M., Simon V. and Krammer F. SARS-CoV-2 vaccination induces mucosal antibody responses in previously infected individuals // *Nat Commun*. 2022. V. 13. №. 1. P. 5135.
166. Satokari R. High Intake of Sugar and the Balance between Pro- and Anti-Inflammatory Gut Bacteria // *Nutrients*. 2020. V. 12. №. 5. P.
167. Schaupp L., Muth S., Rogell L., Kofoed-Branzk M., Melchior F., Lienenklaus S., Ganal-Vonarburg S.C., Klein M., Guendel F., Hain T., Schutze K., Grundmann U., Schmitt V., Dorsch M., Spanier J., Larsen P.K., Schwanz T., Jackel S., Reinhardt C., Bopp T., Danckwardt S., Mahnke K., Heinz G.A., Mashreghi M.F., Durek P., Kalinke U., Kretz O., Huber T.B., Weiss S., Wilhelm C., Macpherson A.J., Schild H., Diefenbach A. and Probst H.C. Microbiota-Induced Type I Interferons Instruct a Poised Basal State of Dendritic Cells // *Cell*. 2020. V. 181. №. 5. P. 1080-1096 e1019.
168. Schinner S., Scherbaum W.A., Bornstein S.R. and Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance // *Diabet Med*. 2005. V. 22. №. 6. P. 674-682.

169. Schneeberger M., Everard A., Gomez-Valades A.G., Matamoros S., Ramirez S., Delzenne N.M., Gomis R., Claret M. and Cani P.D. Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice // *Sci Rep*. 2015. V. 5. №. P. 16643.
170. Selva K.J., van de Sandt C.E., Lemke M.M., Lee C.Y., Shoffner S.K., Chua B.Y., Davis S.K., Nguyen T.H.O., Rowntree L.C., Hensen L., Koutsakos M., Wong C.Y., Mordant F., Jackson D.C., Flanagan K.L., Crowe J., Tosif S., Neeland M.R., Sutton P., Licciardi P.V., Crawford N.W., Cheng A.C., Doolan D.L., Amanat F., Krammer F., Chappell K., Modhiran N., Watterson D., Young P., Lee W.S., Wines B.D., Mark Hogarth P., Esterbauer R., Kelly H.G., Tan H.X., Juno J.A., Wheatley A.K., Kent S.J., Arnold K.B., Kedzierska K. and Chung A.W. Systems serology detects functionally distinct coronavirus antibody features in children and elderly // *Nat Commun*. 2021. V. 12. №. 1. P. 2037.
171. Semin I., Ninnemann J., Bondareva M., Gimaev I. and Kruglov A.A. Interplay Between Microbiota, Toll-Like Receptors and Cytokines for the Maintenance of Epithelial Barrier Integrity // *Front Med (Lausanne)*. 2021. V. 8. №. P. 644333.
172. Shapiro J.M., de Zoete M.R., Palm N.W., Laenen Y., Bright R., Mallette M., Bu K., Bielecka A.A., Xu F., Hurtado-Lorenzo A., Shah S.A., Cho J.H., LeLeiko N.S., Sands B.E., Flavell R.A. and Clemente J.C. Immunoglobulin A Targets a Unique Subset of the Microbiota in Inflammatory Bowel Disease // *Cell Host Microbe*. 2021. V. 29. №. 1. P. 83-93 e83.
173. Sharanova N.E., Ninnemann J., Bondareva M.A., Semin Y.K., Nomokonova A.V. and Kruglov A.A. [Analysis of the Specificity of IgA Antibodies Produced in the Mouse Small Intestine] // *Mol Biol (Mosk)*. 2017. V. 51. №. 6. P. 938-944.
174. Sheikh-Mohamed S., Isho B., Chao G.Y.C., Zuo M., Cohen C., Lustig Y., Nahass G.R., Salomon-Shulman R.E., Blacker G., Fazel-Zarandi M., Rathod B., Colwill K., Jamal A., Li Z., de Launay K.Q., Takaoka A., Garnham-Takaoka J., Patel A., Fahim C., Paterson A., Li A.X., Haq N., Barati S., Gilbert L., Green K., Mozafarihashjin M., Samaan P., Budykowski P., Siqueira W.L., Mubareka S., Ostrowski M., Rini J.M., Rojas O.L., Weissman I.L., Tal M.C., McGeer A., Regev-Yochay G., Straus S., Gingras A.C. and Gommerman J.L. Systemic and mucosal IgA responses are variably induced in response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination and are associated with protection against subsequent infection // *Mucosal Immunol*. 2022. V. 15. №. 5. P. 799-808.
175. Shi H., Kokoeva M.V., Inouye K., Tzamelis I., Yin H. and Flier J.S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance // *J Clin Invest*. 2006. V. 116. №. 11. P. 3015-3025.
176. Solinas G. and Becattini B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response // *Mol Metab*. 2017. V. 6. №. 2. P. 174-184.

177. Solomon T.P., Malin S.K., Karstoft K., Kashyap S.R., Haus J.M. and Kirwan J.P. Pancreatic beta-cell function is a stronger predictor of changes in glycemic control after an aerobic exercise intervention than insulin sensitivity // *J Clin Endocrinol Metab.* 2013. V. 98. №. 10. P. 4176-4186.
178. Sonoda E., Matsumoto R., Hitoshi Y., Ishii T., Sugimoto M., Araki S., Tominaga A., Yamaguchi N. and Takatsu K. Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production // *J Exp Med.* 1989. V. 170. №. 4. P. 1415-1420.
179. Soria M.E., Corton M., Martinez-Gonzalez B., Lobo-Vega R., Vazquez-Sirvent L., Lopez-Rodriguez R., Almoguera B., Mahillo I., Minguez P., Herrero A., Taracido J.C., Macias-Valcayo A., Esteban J., Fernandez-Roblas R., Gadea I., Ruiz-Hornillos J., Ayuso C. and Perales C. High SARS-CoV-2 viral load is associated with a worse clinical outcome of COVID-19 disease // *Access Microbiol.* 2021. V. 3. №. 9. P. 000259.
180. Spiekermann G.M., Finn P.W., Ward E.S., Dumont J., Dickinson B.L., Blumberg R.S. and Lencer W.I. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung // *J Exp Med.* 2002. V. 196. №. 3. P. 303-310.
181. Stephens J.M., Lee J. and Pilch P.F. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction // *J Biol Chem.* 1997. V. 272. №. 2. P. 971-976.
182. Sun B., Chen H., Xue J., Li P. and Fu X. The role of GLUT2 in glucose metabolism in multiple organs and tissues // *Mol Biol Rep.* 2023. V. 50. №. 8. P. 6963-6974.
183. Tai N., Peng J., Liu F., Gulden E., Hu Y., Zhang X., Chen L., Wong F.S. and Wen L. Microbial antigen mimics activate diabetogenic CD8 T cells in NOD mice // *J Exp Med.* 2016. V. 213. №. 10. P. 2129-2146.
184. Takeuchi T., Miyauchi E., Kanaya T., Kato T., Nakanishi Y., Watanabe T., Kitami T., Taida T., Sasaki T., Negishi H., Shimamoto S., Matsuyama A., Kimura I., Williams I.R., Ohara O. and Ohno H. Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria // *Nature.* 2021. V. 595. №. 7868. P. 560-564.
185. Tamburini S., Shen N., Wu H.C. and Clemente J.C. The microbiome in early life: implications for health outcomes // *Nat Med.* 2016. V. 22. №. 7. P. 713-722.
186. Tao W., Zhang G., Wang X., Guo M., Zeng W., Xu Z., Cao D., Pan A., Wang Y., Zhang K., Ma X., Chen Z., Jin T., Liu L., Weng J. and Zhu S. Analysis of the intestinal microbiota in COVID-19 patients and its correlation with the inflammatory factor IL-18 // *Med Microecol.* 2020. V. 5. №. P. 100023.
187. Thaiss C.A., Levy M., Grosheva I., Zheng D., Soffer E., Blacher E., Braverman S., Tengeler A.C., Barak O., Elazar M., Ben-Zeev R., Lehavi-Regev

- D., Katz M.N., Pevsner-Fischer M., Gertler A., Halpern Z., Harmelin A., Aamar S., Serradas P., Grosfeld A., Shapiro H., Geiger B. and Elinav E. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection // *Science*. 2018. V. 359. №. 6382. P. 1376-1383.
188. Tierney B.T., Yang Z., Lubert J.M., Beaudin M., Wibowo M.C., Baek C., Mehlenbacher E., Patel C.J. and Kostic A.D. The Landscape of Genetic Content in the Gut and Oral Human Microbiome // *Cell Host Microbe*. 2019. V. 26. №. 2. P. 283-295 e288.
189. Townsend G.E., 2nd, Han W., Schwalm N.D., 3rd, Raghavan V., Barry N.A., Goodman A.L. and Groisman E.A. Dietary sugar silences a colonization factor in a mammalian gut symbiont // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019. V. 116. №. 1. P. 233-238.
190. Trama A.M., Moody M.A., Alam S.M., Jaeger F.H., Lockwood B., Parks R., Lloyd K.E., Stolarchuk C., Searce R., Foulger A., Marshall D.J., Whitesides J.F., Jeffries T.L., Jr., Wiehe K., Morris L., Lambson B., Soderberg K., Hwang K.K., Tomaras G.D., Vandergrift N., Jackson K.J.L., Roskin K.M., Boyd S.D., Kepler T.B., Liao H.X. and Haynes B.F. HIV-1 envelope gp41 antibodies can originate from terminal ileum B cells that share cross-reactivity with commensal bacteria // *Cell Host Microbe*. 2014. V. 16. №. 2. P. 215-226.
191. Tropini C., Earle K.A., Huang K.C. and Sonnenburg J.L. The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function // *Cell Host Microbe*. 2017. V. 21. №. 4. P. 433-442.
192. Tseng C.H. and Wu C.Y. The gut microbiome in obesity // *J Formos Med Assoc*. 2019. V. 118 Suppl 1. №. P. S3-S9.
193. Tumanov A.V., Grivennikov S.I., Kruglov A.A., Shebzukhov Y.V., Koroleva E.P., Piao Y., Cui C.Y., Kuprash D.V. and Nedospasov S.A. Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs // *Blood*. 2010. V. 116. №. 18. P. 3456-3464.
194. Uematsu S., Fujimoto K., Jang M.H., Yang B.G., Jung Y.J., Nishiyama M., Sato S., Tsujimura T., Yamamoto M., Yokota Y., Kiyono H., Miyasaka M., Ishii K.J. and Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5 // *Nat Immunol*. 2008. V. 9. №. 7. P. 769-776.
195. Uysal K.T., Wiesbrock S.M., Marino M.W. and Hotamisligil G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function // *Nature*. 1997. V. 389. №. 6651. P. 610-614.
196. van der Waaij L.A., Limburg P.C., Mesander G. and van der Waaij D. In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces // *Gut*. 1996. V. 38. №. 3. P. 348-354.
197. Vaure C. and Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species // *Front Immunol*. 2014. V. 5. №. P. 316.

198. Vavuli S., Salonurmi T., Loukovaara S., Nissinen A.E., Savolainen M.J. and Liinamaa M.J. Elevated Levels of Plasma IgA Autoantibodies against Oxidized LDL Found in Proliferative Diabetic Retinopathy but Not in Nonproliferative Retinopathy // *J Diabetes Res.* 2016. V. 2016. №. P. 2614153.
199. Wallenius V., Wallenius K., Ahren B., Rudling M., Carlsten H., Dickson S.L., Ohlsson C. and Jansson J.O. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity // *Nat Med.* 2002. V. 8. №. 1. P. 75-79.
200. Wang Y., Wang Y., Luo W., Huang L., Xiao J., Li F., Qin S., Song X., Wu Y., Zeng Q., Jin F. and Wang Y. A comprehensive investigation of the mRNA and protein level of ACE2, the putative receptor of SARS-CoV-2, in human tissues and blood cells // *Int J Med Sci.* 2020. V. 17. №. 11. P. 1522-1531.
201. Wells D.A., Cantoni D., Mayora-Neto M., Genova C.D., Sampson A., Ferrari M., Carnell G., Nadesalingam A., Smith P., Chan A., Raddi G., Castillo-Olivares J., Baxendale H., Temperton N. and Heeney J.L. Human seasonal coronavirus neutralization and COVID-19 severity // *J Med Virol.* 2022a. V. 94. №. 10. P. 4820-4829.
202. Wells P.M., Sprockett D.D., Bowyer R.C.E., Kurushima Y., Relman D.A., Williams F.M.K. and Steves C.J. Influential factors of saliva microbiota composition // *Sci Rep.* 2022b. V. 12. №. 1. P. 18894.
203. Williams W.B., Liao H.X., Moody M.A., Kepler T.B., Alam S.M., Gao F., Wiehe K., Trama A.M., Jones K., Zhang R., Song H., Marshall D.J., Whitesides J.F., Sawatzki K., Hua A., Liu P., Tay M.Z., Seaton K.E., Shen X., Foulger A., Lloyd K.E., Parks R., Pollara J., Ferrari G., Yu J.S., Vandergrift N., Montefiori D.C., Sobieszczyk M.E., Hammer S., Karuna S., Gilbert P., Grove D., Grunenberg N., McElrath M.J., Mascola J.R., Koup R.A., Corey L., Nabel G.J., Morgan C., Churchyard G., Maenza J., Keefer M., Graham B.S., Baden L.R., Tomaras G.D. and Haynes B.F. HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies // *Science.* 2015. V. 349. №. 6249. P. aab1253.
204. Wilmore J.R., Gaudette B.T., Gomez Atria D., Hashemi T., Jones D.D., Gardner C.A., Cole S.D., Misic A.M., Beiting D.P. and Allman D. Commensal Microbes Induce Serum IgA Responses that Protect against Polymicrobial Sepsis // *Cell Host Microbe.* 2018. V. 23. №. 3. P. 302-311 e303.
205. Wilson E. and Butcher E.C. CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate // *J Exp Med.* 2004. V. 200. №. 6. P. 805-809.
206. Winsauer C., Prepens S., Schlienz D., Nedospasov S. and Kruglov A.A. Novel mouse model to study T cell-dependent IgA induction in vivo // *J Immunol Methods.* 2015. V. 421. №. P. 54-60.
207. Woo P.C., Leung P.K., Leung K.W. and Yuen K.Y. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of an Enterobacteriaceae species from a bone marrow transplant recipient // *Mol Pathol.* 2000. V. 53. №. 4. P. 211-215.

208. Wrammert J., Kallberg E., Agace W.W. and Leanderson T. Ly6C expression differentiates plasma cells from other B cell subsets in mice // *Eur J Immunol.* 2002. V. 32. №. 1. P. 97-103.
209. Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y.Y., Keilbaugh S.A., Bewtra M., Knights D., Walters W.A., Knight R., Sinha R., Gilroy E., Gupta K., Baldassano R., Nessel L., Li H., Bushman F.D. and Lewis J.D. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes // *Science.* 2011. V. 334. №. 6052. P. 105-108.
210. Wu W., Sun M., Chen F., Cao A.T., Liu H., Zhao Y., Huang X., Xiao Y., Yao S., Zhao Q., Liu Z. and Cong Y. Microbiota metabolite short-chain fatty acid acetate promotes intestinal IgA response to microbiota which is mediated by GPR43 // *Mucosal Immunol.* 2017. V. 10. №. 4. P. 946-956.
211. Wu Y., Wang F., Shen C., Peng W., Li D., Zhao C., Li Z., Li S., Bi Y., Yang Y., Gong Y., Xiao H., Fan Z., Tan S., Wu G., Tan W., Lu X., Fan C., Wang Q., Liu Y., Zhang C., Qi J., Gao G.F., Gao F. and Liu L. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2 // *Science.* 2020. V. 368. №. 6496. P. 1274-1278.
212. Yang W., Yu T., Huang X., Bilotta A.J., Xu L., Lu Y., Sun J., Pan F., Zhou J., Zhang W., Yao S., Maynard C.L., Singh N., Dann S.M., Liu Z. and Cong Y. Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity // *Nat Commun.* 2020. V. 11. №. 1. P. 4457.
213. Yoon H.S., Cho C.H., Yun M.S., Jang S.J., You H.J., Kim J.H., Han D., Cha K.H., Moon S.H., Lee K., Kim Y.J., Lee S.J., Nam T.W. and Ko G. *Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice // *Nat Microbiol.* 2021. V. 6. №. 5. P. 563-573.
214. Zaccardi F., Webb D.R., Yates T. and Davies M.J. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective // *Postgrad Med J.* 2016. V. 92. №. 1084. P. 63-69.
215. Zambon J.J., Grossi S.G., Machtei E.E., Ho A.W., Dunford R. and Genco R.J. Cigarette Smoking Increases the Risk for Subgingival Infection With Periodontal Pathogens // *J Periodontol.* 1996. V. 67 Suppl 10S. №. P. 1050-1054.
216. Zegarra-Ruiz D.F., Kim D.V., Norwood K., Kim M., Wu W.H., Saldana-Morales F.B., Hill A.A., Majumdar S., Orozco S., Bell R., Round J.L., Longman R.S., Egawa T., Bettini M.L. and Diehl G.E. Thymic development of gut-microbiota-specific T cells // *Nature.* 2021. V. 594. №. 7863. P. 413-417.
217. Zhang D., Jin W., Wu R., Li J., Park S.A., Tu E., Zanvit P., Xu J., Liu O., Cain A. and Chen W. High Glucose Intake Exacerbates Autoimmunity through Reactive-Oxygen-Species-Mediated TGF-beta Cytokine Activation // *Immunity.* 2019. V. 51. №. 4. P. 671-681 e675.

218. Zhang F., Lau R.I., Liu Q., Su Q., Chan F.K.L. and Ng S.C. Gut microbiota in COVID-19: key microbial changes, potential mechanisms and clinical applications // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2023a. V. 20. №. 5. P. 323-337.
219. Zhang J., Ni Y., Qian L., Fang Q., Zheng T., Zhang M., Gao Q., Zhang Y., Ni J., Hou X., Bao Y., Kovatcheva-Datchary P., Xu A., Li H., Panagiotou G. and Jia W. Decreased Abundance of *Akkermansia muciniphila* Leads to the Impairment of Insulin Secretion and Glucose Homeostasis in Lean Type 2 Diabetes // *Adv Sci (Weinh)*. 2021. V. 8. №. 16. P. e2100536.
220. Zhang Q., Linke V., Overmyer K.A., Traeger L.L., Kasahara K., Miller I.J., Manson D.E., Polaske T.J., Kerby R.L., Kemis J.H., Trujillo E.A., Reddy T.R., Russell J.D., Schueler K.L., Stapleton D.S., Rabaglia M.E., Seldin M., Gatti D.M., Keele G.R., Pham D.T., Gerdt J.P., Vivas E.I., Lusic A.J., Keller M.P., Churchill G.A., Blackwell H.E., Broman K.W., Attie A.D., Coon J.J. and Rey F.E. Genetic mapping of microbial and host traits reveals production of immunomodulatory lipids by *Akkermansia muciniphila* in the murine gut // *Nat Microbiol*. 2023b. V. 8. №. 3. P. 424-440.
221. Zhou L., Qiu W., Wang J., Zhao A., Zhou C., Sun T., Xiong Z., Cao P., Shen W., Chen J., Lai X., Zhao L.H., Wu Y., Li M., Qiu F., Yu Y., Xu Z.Z., Zhou H., Jia W., Liao Y., Retnakaran R., Krewski D., Wen S.W., Clemente J.C., Chen T., Xie R.H. and He Y. Effects of vaginal microbiota transfer on the neurodevelopment and microbiome of cesarean-born infants: A blinded randomized controlled trial // *Cell Host Microbe*. 2023. V. 31. №. 7. P. 1232-1247 e1235.
222. Zuo T., Liu Q., Zhang F., Lui G.C., Tso E.Y., Yeoh Y.K., Chen Z., Boon S.S., Chan F.K., Chan P.K. and Ng S.C. Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19 // *Gut*. 2021. V. 70. №. 2. P. 276-284.
223. Zuo T., Zhang F., Lui G.C.Y., Yeoh Y.K., Li A.Y.L., Zhan H., Wan Y., Chung A.C.K., Cheung C.P., Chen N., Lai C.K.C., Chen Z., Tso E.Y.K., Fung K.S.C., Chan V., Ling L., Joynt G., Hui D.S.C., Chan F.K.L., Chan P.K.S. and Ng S.C. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization // *Gastroenterology*. 2020. V. 159. №. 3. P. 944-955 e948.