

ВИЗНАЧЕННЯ САЛЬМОНЕЛА-ІНДУКОВАНИХ ЗМІН КИШКОВОГО МІКРОБІОМУ У ЩУРІВ

Букіна Ю.В.

Запорізький державний медичний університет
Кафедра мікробіології, вірусології та імунології
м.Запоріжжя, пр.Маяковського 26, e-mail:
lingvus25@gmail.com

Мікробіом кишечника істотно впливає на функціонування організму: бере участь у процесах метаболізму, інгібуванні прозапальних реакцій, у формуванні вродженої та адаптивної імунної відповіді у слизовій оболонці кишечника [1-4]. Найголовнішою функцією кишкового мікробіому є захист організму від патогенних мікроорганізмів - збудників бактеріальних кишкових інфекцій [5, 6]. Відомо, що дисбіотичні зміни у кишечнику призводять до підвищеної сприйнятливості до патогенних бактерій, таких, наприклад, як сальмонели [7, 8], які є етіологічним чинником гастроентеритів [9]. Однією з найпоширеніших причин зміни мікробіоти є застосування антибіотиків [10-12]. Тому, особливий інтерес викликають процеси взаємодії антибіотиків, *Salmonella enteritidis* і *Salmonella typhimurium* з представниками нормальної мікрофлори кишечника [13-15]. Тому, у нашій роботі для індукції дисбіотичних змін мікрофлори кишечника застосовувався ванкоміцин, який діє проти грампозитивних бактерій і не впливає на грамнегативні (сальмонели). Також, ми приділили увагу визначенню кількісного та видового складу мікробіоти при сальмонела-індукованому запаленні кишечника, що створило підґрунтя для подальшого вивчення молекулярних механізмів взаємодії *Salmonella enteritidis* і *Salmonella typhimurium* з представниками мікрофлори і кишково-асоційованою лімфоїдною тканиною.

Ключові слова: пристінкова мікрофлора, мікробіом, ванкоміцин, сальмонела, бактероїди.

Мета дослідження: проаналізувати зміни кількісного та видового складу мікробіоти тонкого кишківника у щурів при сальмонела-індукованому запаленні кишечника на тлі введення ванкоміцину та *B. fragilis*.

Матеріали та методи. Експерименти по визначенню кількісного та видового вмісту мікроорганізмів у пристінковій мікрофлорі кишечника проведені на 120 щурах (самцях) лінії «Вістар» на базі бактеріологічного відділу мікробіологічної лабораторії Запорізького державного медичного університету в рамках НДР 0118U007141 «Молекулярно-генетичний аналіз змін транскриптому генів імунної відповіді і кишкового мікробіому в умовах експериментальної патології та розробка методів їх корекції». Акліматизація тварин (карантин) тривала 7 днів перед початком дослідження. Всі досліді були проведені в осінньо-зимовий період у віварії Запорізького державного медичного університету. Щури перебували при температурі повітря 18-21 °С, в умовах природного освітлення при

світловому дні 7-00 — 17-00, з вільним доступом до їжі та води. Експериментальну роботу з гризунами проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Всі гризуни, окрім I групи (контрольної, інтактної), отримали ванкоміцин або/та завись мікроорганізмів. З метою швидкої інтерналізації бактерій у слизову оболонку кишечника, суспензію з сальмонелами вводили перорально за допомогою зонду об'ємом 5 мл розміром 16-18, довжиною 5-7,5 мм, розмір накінецьника 2,25. Ванкоміцин тваринам вводили у розрахунок 50 мг на кг ваги тіла, суспензії мікроорганізмів – у кількості 15 мл концентрацією 3×10^8 КУО/г. Так, для моделювання дисбалансу кишкової мікрофлори II групі гризунів було введено лише ванкоміцин (ТЕВА, Угорщина, № UA/8995/01/02), III групі – суспензію *S. enteritidis*, а IV – суспензію *S. typhimurium*. Тварини V та VI експериментальних груп отримали у першу добу ванкоміцин, проте групі V через 24 год. була введена суспензія *S. enteritidis*, а щурам групи VI – суспензія *S. typhimurium*. Гризунам VII та VIII груп, також, у першу добу ввели ванкоміцин, але VII група отримала на другий день завись *S. enteritidis*, а на третій – *B. fragilis*, тоді як щурам VIII групи на другий день було введено суспензію *S. typhimurium*, а на третій – *B. fragilis*. У якості матеріалу для бактеріологічних досліджень мікрофлори кишечника використовували змиви з клубової кишки щурів. Експериментальні дослідження проведені за авторською методикою. Для виділення пристінкової мікрофлори з клубової кишки, на поживні середовища засівали по 0,1 мл змивів. Виділення та ідентифікацію сальмонел виконували згідно наказу МОЗ України № 425 від 24.05.2013 р. «Про затвердження методичних рекомендацій «Методи виділення та ідентифікації сальмонел»». Для сальмонел використовували магнієве середовище збагачення, в якому змиви розчиняли 1:10. Висіви з отриманих суспензій робили на вісмут-сульфіт агар (BCA) і на середовище Ендо одразу та через 24 год інкубації у термостаті при 37 °С, після чого середовище Ендо інкубували 20 год, BCA – 48 год при температурі 37 °С. Для виділення різних видів мікроорганізмів використовували живильні середовища Ні Crome™ та диференційно-діагностичні середовища виробництва НіMedia (Індія). Біохімічну ідентифікацію проводили згідно з «Визначником бактерій Берджи» (1997), відповідно до інструктивно-методичних документів та даних сучасної літератури [16]. Ідентифікацію представників роду *Pseudomonas* проводили відповідно до методичних рекомендацій «Биологическая характеристика и микробиологическая идентификация неферментирующих грамотрицательных бактерий» (Харків, 2010). Визначення бактероїдів і пептострептококів проводили згідно з методичними рекомендаціями «Лабораторная диагностика гнойно-воспалительных заболеваний, обусловленных аспорогенными анаэробными микроорганизмами» (Харків, 2000). Приналежність бактерій до роду *Enterococcus* проводили відповідно до методичних

рекомендацій «Микробиологическая диагностика стрептококковой, энтерококковой и пептострептококковой инфекций» (Харків, 2007). В експериментальній роботі використовували штами *S. enteritidis* і *S. typhimurium*, які були отримані з музею штамів мікроорганізмів «Українського центру з контролю і моніторингу захворювань» МОЗ України (Київ) та культуру *Bacteroides fragilis*, виділену з кишечника інтактних гризунів. Приналежність даного штаму до роду *Bacteroides* була встановлена за культуральними ознаками, а також методом ПЛР («бактопол» набір для визначення *Bacteroides fragilis*, *vulgatus*, *thetalotomicron*, *ovatus*). Ізолят був підтверджений як *Bacteroides fragilis* за рядом біохімічних ознак.

Підрахунок кількості мікроорганізмів проводили за формулою:

$$M=N \times 10^{n+1},$$

де M – кількість мікроорганізмів в 1 г досліджуваного матеріалу,

N – кількість колоній, що вирости на агарі,

n – ступінь розведення досліджуваного матеріалу.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою ліцензійних комп'ютерних програм Microsoft Excel 2010 і StatSoft Statistica v12. При аналізі розподілів кількісних даних визначили рівень центральної тенденції - медіана (Me), і рівень дисперсії - інтерквантільний розмах у вигляді 25 і 75 перцентилей. Розрахунок достовірності відмінностей між середніми значеннями оцінили, використовуючи непараметричний критерій Mann-Whitney (U-test). Критерієм статистичної значущості був рівень $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Отримані в ході досліджень дані показали, що при введенні ванкоміцину та бактеріальних агентів кількісний і якісний склад представників пристінкової мікробіоти різко змінювався (табл. 1).

Так, в групах II, III, IV відзначалось зменшення кількості *E. coli* у 10, 7 та 110 разів відповідно ($p \leq 0,05$), а частота виділення представників даного виду складала 10 і 14% (II, III групи). Результати досліджень проведених вченими показали, що вміст *E. coli* після введення шурам ванкоміцину знижувався у декілька тисяч разів, також зменшення відзначалось і при інфікуванні сальмонелами - у 2 рази [17]. Чисельність *P. aeruginosa* значно зменшувалась тільки в третій групі ($p \leq 0,05$). У той же час Santos et al. (2009) у своїй роботі показали збільшення числа псевдомонад у 2 рази при введенні шурам *S. enteritidis* [18]. Кількість представників *Bacteroides spp.* достовірно зменшувалась у декілька тисяч разів (II група) та у 70 і 87 разів (III і IV групи) ($p \leq 0,05$) (табл.1). Наші дані узгоджуються з результатами дослідників, які вивчали склад пристінкової мікрофлори кишківника шурів, і показали різке зниження бактероїдів у 2 рази при введенні ванкоміцину, а також у декілька тисяч разів при введенні сальмонел [19]. В ході проведення аналогічних експериментів Parkes et al. (2012) прийшли до висновків, що після введення ванкоміцину

і сальмонел кількість *E. faecalis*, *E. faecium* зменшувалась на незначну кількість [20]. В результатах наших досліджень частота виділення ентерококів складала 16% і тільки в II групі, а рівень вмісту *E. faecalis* і *E. faecium* зменшився у 861, 6 та декілька тисяч разів (II, III, IV групи) ($p \leq 0,05$). Кількість *Proteus spp.* достовірно зменшувалась в II групі у 27 разів та стрімко збільшувалась у IV групі ($p \leq 0,05$). Проте, протеї виділялись з частотою 22 і 78% в III, IV групах (табл. 3). Згідно з літературними даними при введенні мишам ванкоміцину, а також сальмонел, вміст *Proteus spp.* збільшувалась у 4 і 48 разів [21], що схоже з даними отриманими в ході нашого експерименту. В III групі відзначалось різке зменшення вмісту представників *Enterobacter spp.* і *Klebsiella spp.* у 847 та 150 разів, а у II групі спостерігалось збільшення їх кількості у 7 та 46 разів відповідно ($p \leq 0,05$). Частота виділення цих представників складала 87% і тільки в II групі. Turnbaugh (2006) у своїх дослідженнях показав, що при введенні шурам ванкоміцину у пристінковому вмісті тонкого кишківника спостерігалось зменшення кількості представників родини *Enterobacteriaceae* у 3 рази [22]. У той же час, за даними Серікова І. (2008), при введенні ванкоміцину кількість ентеробактерій збільшувалась у 11 разів, а при введенні сальмонел зменшувалась у 2 рази [23], що узгоджується з отриманими нами даними. Кількісний склад *Peptostreptococcus anaerobius* значно зменшився у всіх трьох дослідних групах ($p \leq 0,05$). Група вчених з Америки виявила зменшення вмісту пептострептококів цього виду у 10 разів [24], тоді як Kerckhoffs (2009) у своїх дослідях продемонстрував зменшення *P. anaerobius* у 5 разів при введенні ванкоміцину, і їх повну відсутність при введенні сальмонел [25]. Разом із цим, кількість стафілококів в II групі знизилась у 10 разів. Особливих змін не виявлено при підрахунку вмісту клостридій і лактобацил, лише у II групі нами визначено незначне зниження у 550 разів бактерій роду *Clostridium* та у 46 разів *Lactobacillus*. Проте, лактобактерії виділялись з частотою 2, 72, 85% в усіх трьох експериментальних групах. У своїх дослідженнях Nagpal R. et al. (2018) продемонстрували аналогічні зміни кишкової мікробіоти у шурів при розвитку дисбіозу [27]. Частота виділення представників умовно патогенної флори таких як: стафілококи, біфідобактерії, кандіди, складала 10, 77, 81%; 9% (II група) та 5, 68% (II III групи) відповідно. Вміст представників *Salmonella spp.* збільшився в II групі у 49 разів і, також, значне його зростання спостерігалось в III та IV групах ($p \leq 0,05$). За результатами досліджень проведених європейськими вченими, після обробки шурів ванкоміцином, спостерігалось незначне збільшення вмісту сальмонел, а при інфікуванні шурів цей показник зростав у 1029 разів [28], що не суперечить нашим результатам.

В результаті порівняння показників, отриманих при введенні шурам *Salmonella enteritidis* і *Salmonella typhimurium* на тлі разового прийому ванкоміцину відбувалась більш різка зміна кількісного та видового складу мікробіоти, ніж при введенні

сальмонел без прийому антибіотиків. Так, в групах V і VI, відзначалось збільшення кількості *E.coli* у 65, та 105 разів ($p \leq 0,05$), а частота їх виділення в цих групах склала 35 та 95%. Це не суперечить результатам Stecher B. (2010), який продемонстрував, що після введення мишам *S. enteritidis* і *S. typhimurium* в умовах антибіотикотерапії, кількість *E. coli* зросла у 2 рази [29]. Значне зростання вмісту *P. aeruginosa* спостерігалось в п'ятій групі, а в шостій, лише у 3 рази ($p \leq 0,05$). Forbs et al. (2016), при проведенні обстеження пацієнтів з інфекційними захворюваннями кишечника, виявили незначне зменшення кількості псевдомонад [30]. Частота виділення лактобацил в V і VI групі становила 30 і 6%, однак їх чисельність суттєво не змінилась і виділялась з матеріалу від щурів VI групи дані показники відповідали зменшенню у 17 разів (табл. 3). Результати Marina Lleal (2019), при дослідженні мікрофлори кишечника щурів, також, вказують на зменшення кількості представників цього роду [31].

За даними наданих Sekirov et al. (2008), при введенні мишам антибіотику і сальмонел, кількість представників *Bacteroides spp.* у пристінковому вмісті кишечника, зменшувалась у 4 рази [30]. Ці дані не суперечать результатам наших досліджень, де при введенні ванкоміцину і сальмонел, в V і VI групах, також відзначалось зменшення числа *Bacteroides spp.* у 9 і 10 разів ($p \leq 0,05$) (див.табл.1). Рівень вмісту *E. faecalis* і *E. faecium* значно зменшився лише в п'ятій групі ($p \leq 0,05$), а в VI групі частота їх виділення склала 19% (табл. 3). Кількість *Proteus spp.* достовірно зменшилась у 17 разів в V групі і, також, значне зниження відзначалось в VI групі ($p \leq 0,05$). За даними літератури у мишей при введенні антибіотиків також відзначалось підвищена сприйнятливість до інфекційних агентів, що призводило до зменшення аутохтонних груп мікроорганізмів, у тому числі і *Proteus spp.*, що підтверджує отримані нами дані [32].

Різде збільшення вмісту представників *Enterobacter spp.* і *Klebsiella spp.* спостерігалось у V та VI групах ($p \leq 0,05$). Частота виділення клебсієл у пристінковому вмісті у цих групах склала 19 та 15% відповідно. Hyun Joо Song et al. (2009) в своїх дослідженнях показали, що у пацієнтів, при сальмонела-індукованому запаленні, на тлі проведення антибіотикотерапії, кількість ентеробактерій і клебсієл збільшувалась у 6 разів, що цілком узгоджується з нашими результатами [33]. Згідно з літературними даними при спільному введенні шурам ванкоміцину і сальмонел, кількість пептострептококів зменшувалась у 5 разів [34]. Ці дані не суперечать нашим отриманим результатам, які також показали зниження вмісту представників *Peptostreptococcus anaerobius* в V та VI групах у 20 і 9 разів відповідно ($p \leq 0,05$). Частота виділення у пристінковому вмісті грибів роду кандиди склала 57% (V група) та стафілококів - 95% у VI експериментальній групі (табл. 3). Кількість *Salmonella spp.* достовірно зменшилася лише в V групі у 7 разів ($p \leq 0,05$). Однак, дані, отримані Barthel et al. (2003), при проведенні аналогічного експерименту на мишах, говорять про збільшення сальмонел у

пристінковому вмісті тонкого кишечника у 3 і 5 разів [35].

В ході експерименту нами були отримані результати бактеріологічних досліджень, які продемонстрували виражені зміни кількісного та видового складу пристінкової мікробіоти при введенні експериментальним тваринам *B. fragilis* (табл. 2). Так, значне зменшення вмісту *E. coli* відзначалось в VII групі, а в VIII - у 538 разів ($p \leq 0,05$). Чисельність *P. aeruginosa* в групах VII та VIII значно зменшувалась, а кількість представників *Bacteroides spp.* закономірно достовірно збільшувалась ($p \leq 0,05$).

Кількісний вміст *E. faecalis* і *E. faecium* збільшився у 10 і 19 разів у VII та VIII групах ($p \leq 0,05$), а кількість *Proteus spp.* зменшилась лише в VII групі у 322 рази ($p \leq 0,05$). Частота виділення ентерококів в цих групах склала 10 і 13%, а протеїв - 29% і тільки у VIII групі. Також, в VII і VIII групах відзначалось різке зменшення вмісту представників *Enterobacter spp.* і *Klebsiella spp.* ($p \leq 0,05$). Кількість представників *Peptostreptococcus anaerobius* достовірно збільшилась у 7 та 12 разів (VII і VIII групи) ($p \leq 0,05$). Також, при бактеріологічному дослідженні вмісту кишечника щурів, виявлено збільшення чисельності лактобактерій у декілька тисяч (VII) і 40 разів (VIII), а їх частота виділення в цих експериментальних групах склала 27 та 40% відповідно. El Aidy et al., 2012 у своїх дослідженнях показав збільшення чисельності представників аутохтонної мікрофлори за рахунок її корекції *B. fragilis* [36]. Частота виділення стафілококів виявлялась у 68% і тільки в VIII групі (табл.4). Що стосується *S. enteritidis* та *S. typhimurium*, то в VII і VIII групах відзначалось виражене зменшення їх кількості ($p \leq 0,05$) (табл.2).

Отримані нами результати свідчать про можливість використання *B. fragilis* для корекції сальмонела-індукованих змін кишкового мікробіому. Ми спостерігали при цьому зменшення рівня *Salmonella spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, а також збільшення *Bacteroides spp.*, *E. faecalis*, *E. faecium* і *Peptostreptococcus anaerobius*. Здатність *B. fragilis* впливати на кількісний вміст мікроорганізмів при розвитку сальмонела-індукованих запальних захворювань кишечника була показана і в ряді інших робіт [37].

B. fragilis є одними з основних продуцентів коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК), які активують клітини за допомогою free fatty acid receptor 2 (FFAR2), що експресується в клітинах імунної системи, епітеліоцитах кишечника і грає важливу роль в імунній регуляції, метаболічному гомеостазі та обумовлює зниження коліт-асоційованого запалення [38, 39]. Крім того, полісахарид А *B. fragilis* є важливим індуктором диференціювання Treg-клітин [40, 41].

Таблиця 1. Кількісний вміст мікроорганізмів (КУО/г) у пристінковому вмісті тонкого кишечника у щурів при введенні ванкоміцину та *S. enteritidis*, *S.typhimurium*

Групи мікроорганізмів	Групи експериментальних тварин					
	Контроль (n=15)	Vancomycin (n=15)	<i>S. enteritidis</i> (n=15)	<i>S.typhimurium</i> (n=15)	Vancomycin+ <i>S. enteritidis</i> (n=15)	Vancomycin+ <i>S.typhimurium</i> (n=15)
	Кількість мікроорганізмів (Ме (Q25-Q75)) КУО/г					
<i>E. coli</i>	2,2×10 ⁵ (1,0×10 ⁵ -5,2×10 ⁵)	2,1×10 ⁴ (1,6×10 ⁴ -9,0×10 ⁴)*	3,0×10 ⁴ (1,2×10 ⁴ -8,0×10 ⁴)*	2,0×10 ³ (1,8×10 ³ -2,4×10 ³)*	1,95×10 ⁶ (1,2×10 ⁶ -2,8×10 ⁶) ^a	2,1×10 ⁵ (1,5×10 ⁵ -2,9×10 ⁵) ^b
<i>P. aeruginosa</i>	7,05×10 ⁴ (2,4×10 ⁴ -1,5×10 ⁵)	8,7×10 ⁴ (3,0×10 ⁴ -3,2×10 ⁵)	2,2×10 ¹ (1,6×10 ¹ -3,2×10 ¹)*	1,25×10 ⁵ (5,0×10 ⁴ - 2,0×10 ⁵)	2,2×10 ⁶ (1,4×10 ⁵ -3,5×10 ⁶) ^a	3,7×10 ⁵ (2,1×10 ⁵ -1,8×10 ⁶) ^b
Бактероїди	1,65×10 ⁵ (1,2×10 ⁴ -3,6×10 ⁵)	4,0×10 ¹ (1,3×10 ¹ -1,0×10 ²)*	2,35×10 ³ (2,1×10 ³ -3,1×10 ³)*	1,9×10 ³ (1,2×10 ³ -2,1×10 ³)*	2,6×10 ² (1,8×10 ² -4,0×10 ²) ^a	1,85×10 ² (1,2×10 ² -3,3×10 ²) ^b
<i>E. faecalis</i> і <i>E.faecium</i>	1,55×10 ⁵ (4,0×10 ⁴ -5,0×10 ⁵)	1,8×10 ² (4,4×10 ¹ -4,3×10 ²)*	2,45×10 ⁴ (1,8×10 ⁴ -4,0×10 ⁴)*	1,1×10 ² (2,9×10 ¹ -1,4×10 ²)*	2,3×10 ¹ (2,1×10 ¹ -3,1×10 ¹) ^a	2,0×10 ² (1,1×10 ² - 3,6×10 ²)
Протеї	6,84×10 ⁴ (3,4×10 ⁴ -2,4×10 ⁵)	2,5×10 ³ (1,4×10 ³ -3,7×10 ³)*	1,5×10 ⁵ (4,1×10 ⁴ -2,2×10 ⁵)	1,5×10 ⁸ (4,2×10 ⁷ -2,0×10 ⁸)*	8,7×10 ³ (4,0×10 ³ -2,4×10 ⁴) ^a	2,7×10 ¹ (1,6×10 ¹ -1,0×10 ²) ^b
Ентеробактери	3,05×10 ⁵ (1,1×10 ⁵ -4,5×10 ⁵)	2,25×10 ⁶ (1,6×10 ⁶ -4,0×10 ⁶)*	3,6×10 ² (2,1×10 ² -6,0×10 ²)*	2,05×10 ² (1,8×10 ² -3,0×10 ²)*	1,9×10 ⁶ (4,0×10 ⁵ -3,6×10 ⁶) ^a	2,8×10 ⁶ (2,4×10 ⁶ -6,3×10 ⁶) ^b
Клебсієли	4,05×10 ⁴ (2,0×10 ⁴ -4,3×10 ⁵)	1,85×10 ⁶ (4,4×10 ⁵ -2,4×10 ⁶)*	2,7×10 ² (1,8×10 ² -4,0×10 ²)*	2,85×10 ² (1,8×10 ² -4,0×10 ²)*	2,2×10 ⁶ (6,0×10 ⁵ -3,6×10 ⁶) ^a	2,45×10 ⁶ (1,4×10 ⁶ -3,6×10 ⁶) ^b
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	9,35×10 ⁵ (3,2×10 ⁵ -1,7×10 ⁶)	2,7×10 ² (1,8×10 ² -4,0×10 ²)*	5,55×10 ² (4,4×10 ² -1,2×10 ³)*	2,6×10 ² (2,0×10 ² -3,7×10 ²)*	2,7×10 ¹ (2,1×10 ¹ -3,8×10 ¹) ^a	2,9×10 ¹ (1,9×10 ¹ -4,2×10 ¹) ^b
Стафілококи	2,6×10 ⁵ (1×10 ⁵ -5×10 ⁵)	2,65×10 ⁴ (1×10 ⁴ -8×10 ⁴)*	2×10 ⁵ (1×10 ⁵ -3×10 ⁵)	2,1×10 ⁵ (2×10 ⁵ -7,2×10 ⁵)	0	2×10 ⁵ (6×10 ⁴ -3,2×10 ⁵)
Клостридії	5,5×10 ⁶ (1×10 ⁶ - 1×10 ⁸)	1×10 ⁴ (1×10 ⁴ -1×10 ⁵)*	1×10 ⁶ (1×10 ⁶ -1×10 ⁸)	1×10 ⁶ (1×10 ⁴ - 1×10 ⁹)*	1×10 ⁶ (1×10 ⁶ - 1×10 ⁸)	5,05×10 ⁵ (1×10 ⁴ - 1×10 ⁹)
Лактобацили	1,6×10 ⁶ (1×10 ⁶ - 8×10 ⁶)	3,5×10 ⁴ (2×10 ⁴ -2,8×10 ⁵)*	2,05×10 ⁶ (5,2×10 ⁵ -4×10 ⁶)	3,45×10 ⁶ (8×10 ⁵ - 6×10 ⁶)	6,2×10 ⁵ (2×10 ⁵ - 2×10 ⁶)	2×10 ⁵ (1×10 ⁵ -2,5×10 ⁵) ^b
Біфідобактерії	5,5×10 ⁶ (1×10 ⁶ - 1×10 ⁸)	0	5,05×10 ⁵ (1×10 ⁴ -1×10 ⁶)*	1×10 ⁴ (1×10 ⁴ - 5×10 ⁵)*	0	1×10 ⁴ (1×10 ⁴ - 5×10 ⁵)
Кандіди	1,25×10 ⁵ (2×10 ⁴ - 2×10 ⁵)	2,2×10 ⁴ (2×10 ⁴ - 4×10 ⁴)	5,5×10 ⁵ (2×10 ⁴ -8×10 ⁶)	0	1,05×10 ⁶ (2×10 ⁵ - 7×10 ⁶)	0
Сальмонели	6,9×10 ¹ (4,3×10 ¹ -2,3×10 ²)	3,4×10 ³ (2,5×10 ³ -4,3×10 ³)*	2,2×10 ⁶ (1,0×10 ⁶ -4,0×10 ⁶)*	1,45×10 ⁵ (1,0×10 ⁵ -4,0×10 ⁵)*	3,0×10 ⁵ (2,0×10 ⁵ -4,4×10 ⁵) ^a	4,0×10 ⁵ (2,0×10 ⁵ - 2,2×10 ⁶)

Примітки: * достовірність відмінностей параметрів $p \leq 0,05$ по відношенню до контролю; ^a достовірність параметрів по відношенню до групи *S. enteritidis* $p \leq 0,05$; ^b достовірність параметрів по відношенню до групи *S.typhimurium* $p \leq 0,05$.

Таблиця 2. Кількісний склад пристінкової мікробіоти клубової кишки щурів при введенні сальмонел, *B. fragilis* на тлі прийому ванкоміцину

Групи мікроорганізмів	Групи експериментальних тварин			
	Vancomycin+S. enteritidis (n=15)	Vancomycin+S. typhimurium (n=15)	Vancomycin+S. enteritidis +B. fragilis (n=15)	Vancomycin+S. typhimurium+B. fragilis (n=15)
Кількість мікроорганізмів (Me (Q25-Q75))КУО/г				
<i>E. coli</i>	1,95×10 ⁶ (1,2×10 ⁶ -2,8×10 ⁶)	2,1×10 ⁵ (1,5×10 ⁵ -2,9×10 ⁵)	1,35×10 ² (2,9×10 ¹ -1,8×10 ²)*	3,9×10 ² (2,0×10 ² -6,0×10 ²)*
<i>P. aeruginosa</i>	2,2×10 ⁶ (1,4×10 ⁵ -3,5×10 ⁶)	3,7×10 ⁵ (2,1×10 ⁵ -1,8×10 ⁶)	2,05×10 ² (1,2×10 ² -3,0×10 ²)*	1,9×10 ² (1,4×10 ² -4,0×10 ²)*
<i>Бактероїди</i>	2,6×10 ² (1,8×10 ² -4,0×10 ²)	1,85×10 ² (1,2×10 ² -3,3×10 ²)	4,15×10 ⁵ (2,1×10 ⁵ -3,2×10 ⁶)*	8,8×10 ⁶ (4,0×10 ⁶ -2,0×10 ⁷)*
<i>E. faecalis</i> і <i>E. faecium</i>	2,3×10 ¹ (2,1×10 ¹ -3,1×10 ¹)	2,0×10 ² (1,1×10 ² -3,6×10 ²)	2,4×10 ² (1,2×10 ³ -5,6×10 ³)*	3,75×10 ³ (2,5×10 ³ -7,0×10 ³)*
<i>Протеї</i>	8,7×10 ³ (4,0×10 ³ -2,4×10 ⁴)	2,7×10 ¹ (1,6×10 ¹ -1,0×10 ²)	2,7×10 ¹ (1,2×10 ¹ -3,2×10 ¹)*	7,9×10 ¹ (6,0×10 ¹ -1,2×10 ²)
<i>Ентеробактери</i>	1,9×10 ⁶ (4,0×10 ⁵ -3,6×10 ⁶)	2,8×10 ⁶ (2,4×10 ⁶ -6,3×10 ⁶)	4,3×10 ² (1,3×10 ² -7,0×10 ²)*	2,3×10 ² (1,8×10 ² -2,9×10 ²)*
<i>Клебсіели</i>	2,2×10 ⁶ (6,0×10 ⁵ -3,6×10 ⁶)	2,45×10 ⁶ (1,4×10 ⁶ -3,6×10 ⁶)	2,3×10 ² (1,4×10 ² -4,0×10 ²)*	1,6×10 ² (1,2×10 ² -2,8×10 ²)*
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2,7×10 ¹ (2,1×10 ¹ -3,8×10 ¹)	2,9×10 ¹ (1,9×10 ¹ -4,2×10 ¹)	1,9×10 ² (1,5×10 ¹ -2,1×10 ²)	3,45×10 ² (3,0×10 ¹ -5,2×10 ²)*
<i>Стафілококи</i>	0	2×10 ⁵ (6×10 ⁴ -3,2×10 ⁵)	2,25×10 ⁵ (1,6×10 ⁵ -3,2×10 ⁵)	2,65×10 ⁵ (1,5×10 ⁵ -5×10 ⁵)
<i>Клостридії</i>	1×10 ⁶ (1×10 ⁶ -1×10 ⁸)	5,05×10 ⁵ (1×10 ⁴ -1×10 ⁶)	1×10 ⁵ (1×10 ⁴ -1×10 ⁶)	1×10 ⁴ (1×10 ⁴ -1×10 ⁶)
<i>Лактобацили</i>	6,2×10 ⁵ (2×10 ⁵ -2×10 ⁶)	2×10 ⁵ (1×10 ⁵ -2,5×10 ⁵)	1,7×10 ⁷ (2,3×10 ⁶ -2,9×10 ⁷)*	8×10 ⁶ (4×10 ⁶ -4×10 ⁷)*
<i>Біфідобактрії</i>	0	1×10 ⁴ (1×10 ⁴ -5×10 ⁵)	0	0
<i>Кандіди</i>	1,05×10 ⁶ (2×10 ⁵ -7×10 ⁶)	0	0	0
<i>Сальмонели</i>	3,0×10 ⁵ (2,0×10 ⁵ -4,4×10 ⁵)	4,0×10 ⁵ (2,0×10 ⁵ -2,2×10 ⁶)	1,0×10 ¹ (1,2×10 ¹ -2,9×10 ¹)*	9,0×10 ¹ (5,0×10 ¹ -1,4×10 ²)*

Примітка: * достовірність відмінностей параметрів p≤0,05 по відношенню до груп Vancomycin + *S. enteritidis* і Vancomycin + *S. typhimurium*

Таблиця 3. Частота виділення мікроорганізмів у пристінковому вмісті кишечника щурів при введенні ванкоміцину та *S.enteritidis*, *S.typhimurium*

Групи мікроорганізмів	Групи експериментальних тварин					
	Контроль (n=15)	Vancomycin (n=15)	<i>S.enteritidis</i> (n=15)	<i>S.typhimurium</i> (n=15)	Vancomycin+ <i>S.enteritidis</i> (n=15)	Vancomycin+ <i>S.typhimurium</i> (n=15)
Частота виділення (%) мікроорганізмів						
<i>E. coli</i>	100	10	14	0	35	95
<i>Стафілококи</i>	100	10	77	81	0	95
<i>Ентерококи</i>	100	0	16	0	0	19
<i>Біфідобактерії</i>	100	0	9	0	0	0
<i>Лактобактерії</i>	100	2	72	85	30	6
<i>Klebsiella spp.</i>	10	87	0	0	19	15
<i>Proteus spp.</i>	10	0	22	78	0	0
<i>Кандіди</i>	30	5	68	0	57	0

Примітка: відмінність параметрів по відношенню до контролю; по відношенню до групи *S. enteritidis*; по відношенню до групи *S.typhimurium*

Таблиця 4. Частота виділення мікроорганізмів у пристінковому вмісті кишечника щурів при введенні сальмонел, *B. fragilis* на тлі прийому ванкоміцину

Групи мікроорганізмів	Групи експериментальних тварин			
	Vancomycin+ <i>S.enteritidis</i> (n=15)	Vancomycin+ <i>S.typhimurium</i> (n=15)	Vancomycin+ <i>S.enteritidis</i> + <i>B.fragilis</i> (n=15)	Vancomycin+ <i>S.typhimurium</i> + <i>B.fragilis</i> (n=15)
Частота виділення (%) мікроорганізмів				
<i>E. coli</i>	35	95	0	0
<i>Стафілококи</i>	0	95	0	68
<i>Ентерококи</i>	0	19	10	13
<i>Біфідобактерії</i>	0	0	0	0
<i>Лактобактерії</i>	30	6	27	40
<i>Klebsiella spp.</i>	19	15	0	0
<i>Proteus spp.</i>	0	0	0	29
<i>Кандіди</i>	57	0	0	0

Примітка: відмінність параметрів по відношенню до груп Vancomycin + *S.enteritidis* і Vancomycin + *S.typhimurium*

Висновки.

1. Отримані данні в цьому дослідженні дані свідчать про те, що антибіотико-індуковані зміни кількісного та якісного складу пристінкової мікрофлори зумовлені впливом ванкоміцину на грампозитивні мікроорганізми. При цьому відбувалось зменшення кількості аутохтонних облигатних анаеробних бактерій (бактероїдів), клостридій, елімінація ентерококів, пептострептококів, стафілококів, біфідобактерій, лактобактерій і збільшення кількості ентеробактерій, протеїв, клебсієл і сальмонел. Зменшення кількості *E. coli* та *Bacteroides spp.* при введенні *S. enteritidis* і *S. typhimurium* супроводжувалось збільшенням у пристінковому вмісті кишківника таких мікроорганізмів, як *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Peptostreptococcus anaerobius*, що, можливо, відбувалось внаслідок конкурування останніх за мікробіоматерію кишківника.

2. Введення *S. enteritidis* і *S. typhimurium*, на тлі попередньої обробки ванкоміцином, викликало різку зміну складу мікробіоти у пристінковому вмісті тонкого кишечника: збільшення *Salmonella spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, а також різке зменшення кількості *Bacteroides spp.*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Proteus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Peptostreptococcus anaerobius*. Ці дані свідчать про те, що викликаний ванкоміцином дисбаланс пристінкової мікробіоти кишечника полегшує проникнення і колонізацію патогенних мікроорганізмів (*S. enteritidis* і *S. typhimurium*) та сприяє розвитку захворювань кишечника.

3. При введенні експериментальним тваринам *B. fragilis*, які отримували *S. enteritidis* або *S. typhimurium* на тлі попередньої обробки ванкоміцином, спостерігалась зміна кількісного складу мікробіоти у пристінковому вмісті тонкого кишечника, а саме: зменшення кількості *Salmonella spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, а також збільшення *Bacteroides spp.*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Lactobacillus spp.* і *Peptostreptococcus anaerobius*.

Quantitative determination of microbiom in the destination content the gut in rats

Bukina Yu.V.

Zaporizhzhya State Medical University

Department of Microbiology, Virology and Immunology

Zaporozhye, Mayakovsky Ave. 26 e-mail:
lingvus25@gmail.com

Introduction. The gut microbiome significantly affects the functioning of the body: it participates in the protection of the body against pathogenic microorganisms, in the processes of metabolism, inhibition of inflammatory responses, in the formation of innate and adaptive immune response in the intestinal mucosa. One of the reasons for changing the microbiota is the use of antibiotics. Therefore, the processes of interaction of antibiotics, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* with representatives of normal

intestinal microflora are of particular interest. **Materials and methods.** The quantitative and qualitative composition of the wall microbiota in rats by bacteriological method, the statistical analysis of data using the program StatSoft Statistica v12 were conducted. **Results & discussion.** With the introduction of vancomycin and *S. enteritidis*, *S. typhimurium* in groups II, III, IV there was a decrease in *E. coli* quantitative content by 10, 7 and 110 times, respectively ($p \leq 0.05$). The number of *P. aeruginosa* decreased significantly only in the third group ($p \leq 0.05$). The number of representatives of *Bacteroides spp.* significantly decreased by several thousand times (group II) and by 70 and 87 times (groups III and IV) ($p \leq 0.05$). The content of *E. faecalis* and *E. faecium* decreased by 861,6 and several thousand times (groups II, III, IV) ($p \leq 0.05$). The number of *Proteus spp.* significantly decreased in group II by 27 times and increased rapidly in group IV ($p \leq 0.05$). Group III showed a sharp decrease in the content of representatives of *Enterobacter spp.* and *Klebsiella spp.* in 847 and 150 times, and in group II there is an increase in their number by 7 and 46 times, respectively ($p \leq 0.05$). The number of *Staphylococcus spp.* decreased by 9.8 times only in II group. The quantitative content of *Clostridium spp.* decreased by several thousand times (group II) and by 5.5 times (group IV) ($p \leq 0.05$). The number of *Lactobacillus spp.* decreased by several thousand times (group II). The number of representatives of *Bifidobacterium spp.* significantly decreased by 10.9 times and by several thousand times (groups III, IV). The quantitative content of *Peptostreptococcus anaerobius* decreased significantly in all three study groups ($p \leq 0.05$). The content of *Salmonella spp.* increased in group II by 49 times and significant increase was observed in groups III and IV ($p \leq 0.05$). The introduction of salmonella, against the background of vancomycin pre-treatment, causes a dramatic change in the composition of the microbiota in groups V and VI, namely: an increase in the number of *E. coli* 65 and 105 times, a significant increase in the content of *P. aeruginosa* in the V group, and in the VI, 3 times. Also, in these groups there is a decrease in the number of *Bacteroides spp.* 9 and 10 times ($p \leq 0.05$). The content of *E. faecalis* and *E. faecium* decreased significantly only in the fifth group ($p \leq 0.05$). The number of *Proteus spp.* decreases 17 times in group V and also a significant decrease was observed in group VI ($p \leq 0.05$). A sharp increase in the content of representatives of *Enterobacter spp.* and *Klebsiella spp.* was observed in the V and VI groups ($p \leq 0.05$). However, representatives of *Peptostreptococcus anaerobius* in V and VI groups decreased 20 and 9 times, respectively ($p \leq 0.05$). The number of *Salmonella spp.* decreased only in group V 7 times ($p \leq 0.05$). With the introduction of experimental animals *B. fragilis* treated with *S. enteritidis*, *S. typhimurium* on the background of vancomycin pre-treatment, a significant decrease in the level of *E. coli* in group VII, and in VIII - by 538 times ($p \leq 0.05$). The number of *P. aeruginosa* in groups VII and VIII decreased significantly and the number of representatives of *Bacteroides spp.* naturally increases ($p \leq 0.05$). The content of *Lactobacillus spp.* decrease by 10.3 times only in VI group. The content of *E. faecalis* and *E. faecium*

increased by 10 and 19 times in the seventh and eighth groups respectively, and the number of *Proteus spp.* decreases only in group VII 322 times ($p \leq 0.05$). Also, in VII and VIII groups there is a sharp decrease in the content of representatives of *Enterobacter spp.* and *Klebsiella spp.* ($p \leq 0.05$). The level of representatives of *Peptostreptococcus anaerobius* and *Lactobacillus spp.* increased significantly 7, 12 times and several thousand and 40 times (groups VII and VIII, respectively) ($p \leq 0.05$). The number of *S. enteritidis* and *S. typhimurium* in the VII and VIII groups decreased intensively ($p \leq 0.05$).

Conclusions. The introduction of *B. fragilis* can be used in the treatment of inflammatory bowel diseases or diseases with impaired barrier function of the intestine.

Keywords: parietal microflora, microbiome, vancomycin, salmonella, bacteroids.

References:

1. Macpherson NL, Harris Macpherson AJ. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system // Nature Reviews Immunology. 2004. Vol. 4. P. 478–485.
2. Deplancke B, Gaskins Deplancke HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer // The American Journal of Clinical Nutrition. 2001. Vol. 73. P. 1131–1141.
3. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system // Nature. 2011. Vol. 474. P. 327–336.
4. Stecher B, Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease // Trends Microbiology. 2008. Vol. 16. P. 107–114.
5. Vollaard EJ, Clasener HA. Colonization resistance // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1994. Vol. 38. P. 409–414.
6. Stecher B, Hardt WD. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut // Current Opinion in Microbiology. 2011. Vol. 14. P. 82–91.
7. Monack DM, Bouley DM, Falkow SJ. *Salmonella typhimurium* persists with in macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization // Experimental Medicine. 2004. Vol. 199. P. 231–241.
8. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota // Microbiology. 2010. Vol. 156. P. 3216–3223.
9. Ubeda C, Pamer EG. Antibiotics, microbiota and immune defense // Trends Immunology. 2012. Vol. 33. P. 459–466.
10. Pérez-Cobas AE, Artacho A, Knecht H, Ferrús ML, Friedrichs A, Ott SJ. Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. 201–208.
11. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity // Nature. 2012. Vol. 488. P. 621–626.
12. Zhang Y, Limaye PB, Renaud HJ, Klaassen CD. Effect of various antibiotics on modulation of intestinal microbiota and bile acid profile in mice // Toxicology and Applied Pharmacology. 2014. Vol. 277. P. 138–145.
13. Fujimura KE, Slusher NA, Cabana MD, Lynch SV. Role of the gut microbiota in defining human health // Expert Review of Anti - infective Therapy. 2010. Vol. 8. P. 435–454.
14. Wlodarska M, Willing B, Keeney KM, Menendez A, Bergstrom KS, Gill N. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis // PubMed. 2011. Vol. 79. P. 1536–1545.
15. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability // PubMed. 2009. Vol. 58. P. 1091–1093.
16. De Vos P, Garrity G, Jones D. Identification of Procarayotes // Bergey's manual of systematic bacteriology. 2009. Vol. 1. P. 1422.
17. Ertazzoni Minelli E, Benini A, Barzoi E, DeBastiani G, Periti P. Effects on intestinal microflora during systemic antimicrobial prophylaxis in orthopaedic patients: Teicoplanin versus Cefazolin // Recent Advances in Chemotherapy. 1992. Vol. 1. P. 1230–1231.
18. Santos RL, Raffatellu M, Bevins CL, Adams LG, Tukel C, Tsolis RM, Baumler AJ. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style // PubMed. 2009. Vol. 17. P. 498–506.
19. Carroll IM, Chang YH, Park J. Luminal and mucosal-associated intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome // Gut Pathogenes. 2010. Vol. 2. P. 19.
20. Parkes GC, Rayment NB, Hudspith BN. Distinct microbial population exist in the mucosal-associated microbiota of subgroups of irritable bowel syndrome // Neurogastroenterol Motil. 2012. Vol. 24. P. 31–39.
21. Awoniyi M, Miller SI, Wilson CB, Hajjar AM, Smith KD. Homeostatic regulation of Salmonella-induced mucosal inflammation and injury by IL-23 // PubMed. 2012. Vol. 7. P. 731–737
22. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest // PLoS One. 2006. Vol. 444. P. 1027–1031.
23. Sekirov I, Tam NM, Jogova M, Robertson ML, Li Y. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection // PubMed. 2008. Vol. 76. P. 4726–4736.
24. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F. Recognition of commensally microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis // Cell. 2004. Vol. 118. P. 229–241.
25. Kerckhoffs AP, Samson M, van der Rest ME. Lower *Bifidobacteria* counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients // PLoS One. 2009. Vol. 15. P. 2887–2892.
26. Panda S, Elkhader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota // PLoS One. 2014. Vol. 9. P. 954–967.
27. Nagpal R, Wang S, Solberg Woods LC. Comparative Microbiome Signatures and Short-Chain Fatty Acids in Mouse, Rat, Non-human Primate, and Human Feces. *Front Microbiol.* 2018. Vol. 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02897

27. Stecher B, Chaffron S R. Käppeli Like Will to Like: Abundances of Closely Related Species Can Predict Susceptibility to Intestinal Colonization by Pathogenic and Commensal Bacteria // PLoS Pathogens. 2010. Vol. 6. № 1: e1000711.
28. Grassl G, Finlay B. Pathogenesis of enteric Salmonella infections. // Curr. Opin. Gastroenterol. 2008. Vol. 24. P. 22–26.
29. Sekirov I, Tam NM, Jogova M, Robertson ML, Li Y. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection // PubMed. 2008. Vol. 76. P. 4726–4736.
30. Marina Lleal, Guillaume Sarrabayrousea, Joseane Willamil, Alba Santiagoa, Marta Pozueloa, Chaysavanh Manichanha. A single faecal microbiota transplantation modulates the microbiome and improves clinical manifestations in a rat model of colitis. EBioMedicine. 2019. Vol. 48. P. 630–641.
31. Ubeda C, Pham N, Trevor C. Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans // Current Opinion in Microbiology. 2014. Vol. 17. P. 67–74.
32. Hyun Joo Song, Ki-Nam Shim, Sung-Ae Jung. Antibiotic-Associated Diarrhea // Korean Journal Internal Medicine. 2008. Vol. 23. P. 9–15.
33. Haibo Mu, Hu Bai. Pathogen-targeting glycovesicles as a therapy for salmonellosis // Nature Communications. 2019. Vol. 10. Article number-4039.
34. Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martinez L. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* colitis model that allows analysis of both pathogen and host // Infections Immunology. 2003. Vol. 71. P. 2839–2858.
35. Taylor DN, McKenzie R, Durbin A. Rifaximin, a nonabsorbed oral antibiotic, prevents shigellosis after experimental challenge // Clinical Infections Diseases 2006. Vol. 42. P. 1283–1288.
36. Miki T, Goto R, Fujimoto M, Okada N, Hardt W.D. The Bactericidal Lectin RegIII β Prolongs Gut Colonization and Enteropathy in the Streptomycin Mouse Model for Salmonella Diarrhea // Cell Host Microbe. 2017. Vol. 10. P. 30519–30524.
37. El Aidy S, van Baarlen P, Derrien M, Lindenbergh-Kortleve DJ, Hooiveld G, Levenez F. Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunol.* 2012. P. 5567–5579.
38. Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MA. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids // Clinical & Translational Immunology. 2016. Vol. 22.5(4):e73.
39. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 // Nature. 2009. Vol. 29. P. 1282–6.
40. Surana NK, Kasper DL. The yin yang of bacterial polysaccharides: lessons learned from *B. fragilis* PSA // Immunology Review. 2012. Vol. 245. P. 13–26.
41. Zeng H, Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function // Trends Immunology. 2015. Vol. 36. P. 3–12.