

DOI: 10.7868/S2658655X26010031  
УДК 612

Экспериментальные статьи

## ***Enterococcus faecium* L-3 ослабляет тяжесть экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс, влияя на кишечную микробиоту, энтероциты и иммунные функции**

**И.Н. Абдурасулова<sup>1,\*</sup>, А.В. Мацулевич<sup>1</sup>, Н.М. Грефнер<sup>1</sup>,  
А.Н. Трофимов<sup>1</sup>, И.В. Кудрявцев<sup>1</sup>, Е.И. Ермоленко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт экспериментальной медицины,  
Санкт-Петербург, Российская Федерация*

*\*E-mail: i\_abdurasulova@mail.ru*

**Аннотация.** В исследовании изучались механизмы модулирующего влияния пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L-3 на течение экспериментального аллергического/аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у крыс – широко используемой модели рассеянного склероза. ЭАЭ индуцировали у самок крыс Wistar однократной подкожной инъекцией гомогената спинного мозга в полном адьюванте Фрейнда. После индукции ЭАЭ крысы были разделены на две группы, одна из которых получала *E. faecium* L-3 в дозе  $5 \times 8.0$  lg КОЕ/мл со 2-го по 16-й день после индукции. Эффекты *E. faecium* L-3 оценивали по тяжести заболевания ЭАЭ, популяционному составу иммунных клеток, определенному методом проточной цитофлуориметрии, уровню цитокинов, измеренному с помощью ИФА и ОТ-ПЦР, таксономическому составу микробиома кишечника, установленному методом секвенирования гена 16S рРНК и ультраструктурным изменениям эпителия тонкой кишки, выявленным с помощью электронной микроскопии. У крыс, получавших *E. faecium* L-3, наблюдалась задержка появления неврологических симптомов и снижение их тяжести по сравнению с группой без лечения. Введение *E. faecium* L-3 привело к значимым изменениям в составе микробиома кишечника в течение ЭАЭ. На пике заболевания у крыс, получавших пробиотик, наблюдалось более высокое содержание *Bacteroidota* и более низкое содержание *Bacillota* (*Firmicutes*) по сравнению с контрольной группой. Сдвиги в кишечном микробиоме сохранялись также в фазе выздоровления и были связаны с более полным выздоровлением. Введение пробиотика снижало уровень циркулирующего в крови провоспалительного цитокина МСР-1 при одновременном повышении уровня регуляторного цитокина TGF- $\beta$ . Анализ ультраструктуры эпителия кишечника показал, что курсовое введение *E. faecium* L-3 уменьшает повреждение энтероцитов на пике заболевания и способствует восстановлению слизистой оболочки кишечника в фазу выздоровления. Полученные результаты позволяют заключить, что протективное действие *E. faecium* L-3 при ЭАЭ осуществляется локально за счет модуляции состава кишечного микробиома, стимуляции экспрессии IL-10

в мезентериальных лимфоузлах, поддержания и восстановления целостности энтероцитов в тонкой кишке, а также системно, иммунорегуляторными механизмами, опосредуемыми Т-клетками, продуцирующими TGF- $\beta$ . В целом полученные результаты показали, что *E. faecium* L-3 может быть полезным дополнением к существующим методам лечения рассеянного склероза после подтверждения протективного эффекта в рандомизированных клинических исследованиях.

**Ключевые слова:** *Enterococcus faecium* L-3, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, рассеянный склероз, пробиотики, кишечный микробиом, энтероциты, цитокины, иммуномодуляция, ось микробиота–кишечник–мозг

**Финансирование.** Исследования проводились в рамках выполнения государственного задания ФГБНУ “ИЭМ” по теме фундаментальных научных исследований: тема № FGWG-2025-0018 (регистрационный номер: 1024040400018-0.3.1.4), “Роль эндогенных и экзогенных факторов в регуляции интегративных функций головного мозга в норме и патологии”.

**Соблюдение этических стандартов.** Эксперименты на животных выполнялись с соблюдением принципов гуманности (директивы Европейского Сообщества № 86/609 ЕС), одобренных Локальным этическим комитетом при Федеральном государственном бюджетном учреждении “ИЭМ” (протокол № 2/22 от 06.04.2022 г.).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

**Вклад авторов в публикацию.** ИНА – идея, проведение экспериментов, анализ данных, написание рукописи; АВМ – проведение большей части экспериментов, НМГ – электронно-микроскопические исследования; ИВК – проведение исследований методом проточной цитометрии; АНТ – статистический анализ данных, подготовка рисунков, написание рукописи; ЕИЕ – предоставление пробиотика, исследование цитокинов. Все соавторы просмотрели и отредактировали рукопись.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность Ресурсному центру «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета (РНЦ МКТ СПбГУ), предоставившему оборудование для проведения электронно-микроскопических исследований, и центру “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург), где проводилось исследование кишечного микробиома методом секвенирования гена 16S рРНК.

**Ссылка для цитирования:** Абдурасулова И.Н., Мацулевич А.В., Грефнер Н.М., Трофимов А.Н., Кудрявцев И.В., Ермоленко Е.И. *Enterococcus faecium* L-3 ослабляет тяжесть экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс, влияя на кишечную микробиоту, энтероциты и иммунные функции. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова / Russian Journal of Physiology*. 2026. Т. 112. № 1. С. 85–146.  
<https://doi.org/10.7868/S2658655X26010031>

## ***Enterococcus faecium* L-3 Ameliorates the Severity of Experimental Allergic Encephalomyelitis in Rats by Influencing Gut Microbiota, Enterocytes, and Immune Functions**

I.N. Abdurasulova<sup>1,\*</sup>, A.V. Matsulevich<sup>1</sup>, N.M. Grefner<sup>1</sup>,  
A.N. Trofimov<sup>1</sup>, I.V. Kudryavtsev<sup>1</sup>, E.I. Ermolenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation*

\*E-mail: [i\\_abdurasulova@mail.ru](mailto:i_abdurasulova@mail.ru)

**Abstract.** This study explores the mechanisms of the modulating effects of the probiotic strain *Enterococcus faecium* L-3 on the course of experimental allergic/auto-immune encephalomyelitis (EAE) in rats, a widely used model for multiple sclerosis (MS). EAE was induced in female Wistar rats by subcutaneous injection of spinal cord homogenate in complete Freund's adjuvant. After EAE induction, the rats were divided into two groups: one of which received vehicle, and the other received *E. faecium* L-3 at a dose of  $5 \times 8.0$  lg CFU/rats/day from the 2nd to the 16th day after induction. The effects of *E. faecium* L-3 were assessed by the severity of EAE disease, the population composition of immune cells determined by flow cytometry, the level of cytokines measured by ELISA and RT-PCR, the taxonomic composition of the gut microbiome determined by 16S rRNA gene sequencing, and ultrastructural changes in the small intestinal epithelium detected by electron microscopy. Rats treated with *E. faecium* L-3 showed a delay in the onset of neurological symptoms and a decrease in their severity compared to the untreated group. Administration of *E. faecium* L-3 resulted in significant changes in the composition of the gut microbiome during EAE. At the peak of the disease, rats treated with the probiotic had a higher content of *Bacteroidota* and a lower content of *Bacillota* (*Firmicutes*) compared to the control group. Shifts in the gut microbiome also persisted during the recovery phase and were associated with a more complete recovery. Administration of the probiotic decreased the level of circulating proinflammatory cytokine MCP-1, while increasing the level of regulatory cytokine TGF- $\beta$ . Analysis of the intestinal epithelium ultrastructure showed that the course administration of *E. faecium* L-3 reduces enterocyte damage at the peak of the disease and promotes intestinal mucosa restoration in the recovery phase. The obtained results allow us to conclude that the protective effect of *E. faecium* L-3 in EAE is realized locally, by modulating the composition of the intestinal microbiome, stimulating IL-10 expression in the mesenteric lymph nodes, maintaining and restoring the integrity of enterocytes in the small intestine, and systemically, by immunoregulatory mechanisms mediated by T-cells producing TGF- $\beta$ . Overall, the results indicate that *E. faecium* L-3 may be a useful addition to existing treatments for multiple sclerosis after confirming the protective effect in randomized clinical trials.

*Keywords:* *Enterococcus faecium* L-3, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), multiple sclerosis (MS), probiotics, gut microbiome, intestinal barrier, cytokines, immune modulation, microbiota–gut–brain axis

*Funding.* This study was conducted within the framework of the state assignment of the Institute of Experimental Medicine (IEM) under the fundamental research topic No. FGWG-2025-0018 (registration number: 1024040400018-0.3.1.4), “The role of endogenous and exogenous factors in the regulation of integrative brain functions in health and disease”.

*Ethics declarations.* Animal experiments were performed in accordance with the principles of humanity (European Community Directive No. 86/609/EEC) and were approved by the Local Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (Protocol No. 2/22 of April 6, 2022).

*Conflict of interests.* The authors declare no conflicts of interests.

*Authors contribution.* AIN — the concept, experimentation, data analysis, manuscript writing; MAV — performance of the majority of experiments; GNM — electron microscopy studies; KIV — flow cytometry analyses; TAN — statistical analysis, figure preparation, manuscript writing; EEI — providing the probiotic and performing cytokine assays. All co-authors reviewed and edited the manuscript.

*Acknowledgements.* The authors are grateful to “The Center for Molecular and Cell Technologies of Research park” of St. Petersburg State University (CMCTRP SPbU) for providing equipment for electron microscopy studies, and to the Centre “Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology” of the All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology (St. Petersburg), where the intestinal microbiome was analysed by 16S rRNA gene sequencing.

*For Citation:* Abdurasulova I.N., Matsulevich A.V., Grefner N.M., Trofimov A.N., Kudryavtsev I.V., Ermolenko E.I. *Enterococcus faecium* L-3 Ameliorates the Severity of Experimental Allergic Encephalomyelitis in Rats by Influencing Gut Microbiota, Enterocytes, and Immune Functions. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova / Russian Journal of Physiology*. 2026;112(1):85–146. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S2658655X26010031>

## ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальный аутоиммунный/аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) воспроизводит у животных процессы нейровоспаления, демиелинизации, повреждения нейронов и их аксонов, характерные для аутоиммунных заболеваний ЦНС, и считается валидной моделью рассеянного склероза (РС) [1–3].

РС относится к наиболее острым и социально значимым проблемам неврологии и занимает одно из первых мест по частоте поражения и инвалидизации в молодом трудоспособном возрасте [4, 5]. В последние годы заболеваемость РС увеличивается не только среди взрослого населения, но также среди детей и подростков [6–8].

Вопрос об этиологии этого заболевания по-прежнему остается нерешенным [9]. Недостаточная эффективность имеющихся иммуномодулирующих и иммуносупрессирующих лечебных средств, которые лишь изменяют течение РС, замедляя

прогрессирование заболевания, является еще одной проблемой [10]. Кроме того, многие препараты для лечения РС, особенно пероральные, неблагоприятно влияют на деятельность желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [11, 12], что отрицательно отражается на качестве жизни пациентов и снижает приверженность терапии [13]. Это ставит вопросы поиска принципиально иных патогенетических мишеней для фармакологического воздействия.

Сформировавшаяся в последние десятилетия концепция оси “микробиота–кишечник–мозг” открывает новый взгляд на патогенез РС. Согласно этим представлениям, инициирующие РС события запускаются в кишечнике [14]. Нарушения функций ЖКТ выявляются у 75–90% пациентов с РС [15–18], и причиной этих нарушений может быть измененный состав (дисбиоз) кишечной микробиоты. Действительно, в ряде работ описано изменение состава кишечного микробиома при РС с увеличением доли *Bifidobacterium* spp. (филум *Actinomycetota*, ранее *Actinobacteria*), *Akkermansia muciniphila* (филум *Verrucomicrobiota*, ранее *Verrucomicrobia*), *Acinetobacter calcoaceticus* (филум *Pseudomonadota*, ранее *Proteobacteria*), *Streptococcus* spp. (филум *Bacillota*, ранее *Firmicutes*) и снижением численности *Prevotella* spp., *Parabacteroides distasonis* (филум *Bacteroidota*, ранее *Bacteroidetes*), представителей кластридиальных кластеров IV и XIVa (филум *Bacillota*) – продуцентов бутирата [19–26]. Кроме того, показано повышение проницаемости кишечного барьера у пациентов с РС [27], что также рассматривается в качестве фактора патогенеза в современной концепции РС [28]. Имеются доказательства того, что аналогичные изменения состава кишечной микробиоты и увеличение проницаемости кишечника происходят у животных при ЭАЭ, причем эти события предшествуют появлению парезов и параличей у животных [29, 30].

На ключевую роль кишечной микробиоты при ЭАЭ указывает тот факт, что у мышей без микробов (GF-мыши) или у мышей с истощенной антибиотиками кишечной микробиотой заболевание не развивается или снижается его тяжесть [31–34]. Ослабление тяжести ЭАЭ связано с уменьшением пролиферации Th17-клеток [35–37] и увеличением популяции регуляторных T (T reg) клеток [38–41]. Th17-клетки являются основными энцефалитогенными клетками, и их роль в аутоиммунных реакциях в ЦНС была установлена как на животных моделях, так и у людей с РС [24, 42]. На модели ЭАЭ, индуцированного адоптивным переносом миелин-специфических Th17-клеток, было показано, что, прежде чем достичь ЦНС и вызвать неврологические симптомы, эти клетки из системного кровотока мигрируют в кишечник [42].

Появляется все больше данных, что кишечный дисбиоз способствует инициированию аутоиммунного ответа, направленного против антигенов ЦНС, и прогрессированию РС [43, 44]. На модели ЭАЭ установлено, что определенные кишечные бактерии способствуют восприимчивости к хронически-прогрессирующим или рецидивирующе-ремиттирующим формам заболевания [45]. При дисбиозе кишечной микробиоты, когда нарушается соотношение соответствующих видов микроорганизмов, отмечается дисбаланс Th17- и Treg-клеток, поэтому модуляция бактериального кишечного сообщества может представлять новый способ иммунокоррекции.

Наиболее частой стратегией коррекции кишечного дисбиоза является использование пробиотиков. Пробиотики – живые бактерии, которые при введении в организм в адекватных количествах оказывают благотворный эффект на здоровье [46, 47]. Эти микроорганизмы благотворно влияют на физиологические, биохимические и иммунные функции организма, что неоднократно показано в исследованиях [48–50].

В литературе имеется уже довольно много исследований по использованию моно- и поликомпонентных пробиотиков при ЭАЭ, демонстрирующих ослабление тяжести заболевания у животных [51–55]. Ранее нами на модели ЭАЭ показана способность пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L-3 снижать выраженность неврологических нарушений у крыс с ЭАЭ сопоставимо с иммуномодулятором глатирамера ацетатом [56], причем протективный эффект был дозозависимым [57]. Этот пробиотический штамм также проявлял высокую эффективность при коррекции у животных дисбиоза кишечника, индуцированного антибиотиками [58, 59]. Однако неясно, сопряжено ли протективное действие пробиотических энтерококков при ЭАЭ с позитивным влиянием на кишечный эпителий, состав кишечного микробиома и иммунные функции. Решение этих вопросов явилось целью данного исследования.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Животные*

Всего использовано 70 самок крыс Вистар массой тела 230–250 г в возрасте 3-х месяцев. Крысы получены из ФГУП Питомник лабораторных животных “Рапполово”, (Ленинградская область, Россия) и содержались в стандартных условиях с 12-часовым световым циклом при температуре 23 °С со свободным доступом к еде и воде. В качестве пищи использован сухой корм для содержания крыс, мышей, хомяков (артикул 53NN811, ООО “Лабораторкорм”, энергетическая ценность 295 ккал / 100 г).

### *Индукция ЭАЭ*

ЭАЭ индуцировали однократной подкожной инокуляцией энцефалитогенной смеси (ЭГС), состоявшей из гомологичного гомогената спинного мозга, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда (Sigma) (ПАФ) [56].

Для оценки выраженности клинических симптомов ЭАЭ использовали разработанную ранее шкалу: мышечная слабость одной конечности – 0.5 балла, стойкий парез – 1 балл и паралич – 1.5 балла, при поражении нескольких конечностей баллы суммировались для расчета клинического индекса (КИ) [56]. При отсутствии видимых клинических проявлений принимали КИ = 0, при летальном исходе – КИ = 6.0. Животных с КИ = 0.5–2.0 балла считали легко болеющими, при КИ = 2.5–3.5 – средней тяжести, при КИ = 4.0–6.0 – тяжело болеющими.

Кроме того, для оценки тяжести ЭАЭ использовали дополнительные критерии: продолжительность латентного периода (количество дней до появления первых симптомов), длительность заболевания, КИ максимальный (на пике болезни), КИ кумулятивный (сумма всех КИ за период болезни). После индукции ЭАЭ животные случайным образом были разделены на 2 группы: 1-я группа – контрольная – получала физиологический раствор (ФР) в объеме 0.5 мл (EAE + Veh;  $n = 35$ ); 2-я группа, экспериментальная, – *E. faecium* L-3 ( $5 \times 8.0$  Ig КОЕ/мл) в объеме 0.5 мл (EAE + Ef;  $n = 35$ ). Введения пробиотика и ФР осуществляли орогастрально через зонд со 2-го по 16-й день после индукции ЭАЭ. Ранее было показано, что эта доза *E. faecium* L-3 обеспечивает максимальный защитный эффект в модели ЭАЭ на крысах [57].

### Пробиотик

Использовали пробиотический штамм *E. faecium* L-3. Штамм выделен из сквашенного молока, депонирован в GenBank (№ SUB167269, размер 2 629 318 пар оснований содержит 2717 генов) и во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии (ND-79, патент РФ № 2220199). Штамм *E. faecium* L-3 содержит гены 5 бактериоцинов – энтероцинов А, В, X-α, X-β и лактобина [60].

### Сбор материала для исследований

Образцы фекалий и крови собирали на день 0 (перед индукцией), а также на 7-й (конец индуктивной фазы), 14-й (пик заболевания) и 30-й (фаза выздоровления) дни после индукции ЭАЭ.

Образцы спинного мозга и мезентериальные лимфоузлы собирали от животных контрольной (ЕАЕ + Veh) и экспериментальной (ЕАЕ + Ef) групп на 14-й и 28-й день после индукции ЭАЭ.

Все собранные образцы замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  и исследовали одномоментно, за исключением образцов крови для проточной цитометрии, которые анализировали в тот же день.

Образцы кишечника извлекали на 14-й и 28-й день от животных контрольной и экспериментальной групп и интактных животных, сразу фиксировали и делали пробоподготовку для электронной микроскопии.

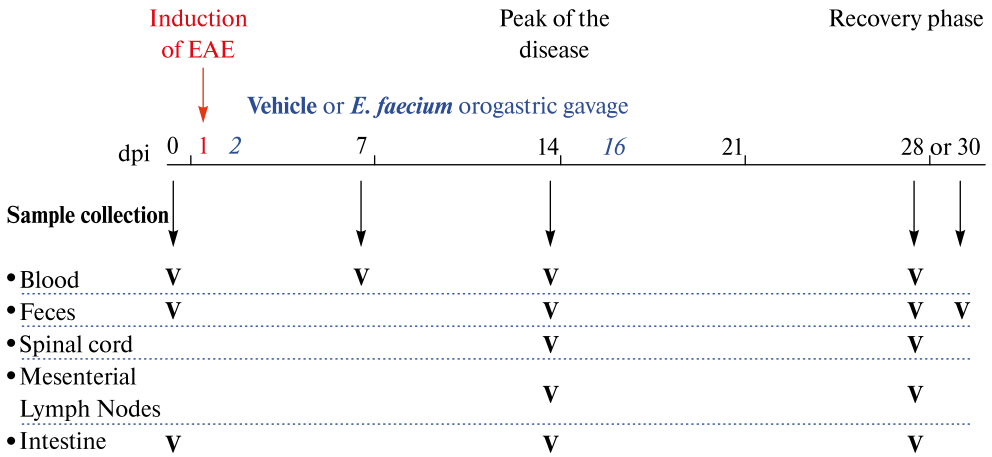
Дизайн исследования представлен на рис. 1.

### Определение состава кишечного микробиома

Состав фекального микробиома был определен в динамике – перед индукцией ЭАЭ, на пике заболевания (14-й д.п.и.) и в фазу выздоровления (30-й д.п.и.) у 8 крыс из каждой группы. Для этого использовали метод секвенирования гена 16S рРНК на платформе Illumina. Свежие образцы фекалий собирали у одних и тех же животных в указанные дни и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до анализа.

Выделение ДНК из образцов фекалий проводили с помощью набора “СОРБ-Б” (ООО “Биолабмикс”, Россия), согласно инструкции производителя. ДНК элюировали в 50 мкл TE -буфера.

Для приготовления ампликонных библиотек методом ПЦР в каждой пробе проводили амплификацию с универсальными праймерами на переменный участок гена 16S рРНК v3–v4, специфичными для широкого круга микроорганизмов, включая бактерии и археи (F515, GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, и R806, GGACTACVSGGGTATCTAAT [61]), с добавлением служебных последовательностей по технологии Illumina, содержащих линкеры и баркоды. ПЦР была проведена в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5–1.0 единицу активности полимеразы Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 10 нг ДНК-матрицы и 2 нМ каждого dNTP (LifeTechnologies). Смесь денатурировали при  $94^{\circ}\text{C}$  1 мин, после чего следовало 35 циклов:  $94^{\circ}\text{C}$  – 30 с,  $50^{\circ}\text{C}$  – 30 с,  $72^{\circ}\text{C}$  – 30 с. Финальная элонгация проводилась при  $72^{\circ}\text{C}$  в течение 3 мин. ПЦР продукты очищали по рекомендованной Illumina методике с использованием AMPureXP (BeckmanCoulter, США). Дальнейшую подготовку библиотек проводили в соответствии с инструкцией производителя MiSeq Reagent Kit Preparation Guide (Illumina). Библиотеки секвенировали в соответствии с инструкцией изготовителя на приборе Illumina MiSeq (Illumina,



**Рис. 1.** Схема эксперимента. ЭАЭ был индуцирован в 1-й день подкожной инъекцией энцефалитогенной смеси, содержащей гомогенат спинного мозга в адьюванте Фрейнда, с оценкой исходных значений уровней цитокинов и популяцией иммунных клеток в крови, состава кишечного микробиома в образцах фекалий, взятых непосредственно перед индукцией ЭАЭ (0 д.п.и.). Исследование охватывает период от индуктивной фазы (2–7 д.п.и.) до пика заболевания (14–16 д.п.и.) и фазу восстановления (17–30 д.п.и.). Введение либо ФР, либо *Enterococcus faecium* L-3 проводилось через орогастральный зонд, начиная со 2-го по 16-й д.п.и. Сбор образцов для анализа включал кровь в дни 0, 7, 14 и 28/30 (для анализа уровня цитокинов и лейкоцитов); фекалии на 1-, 14- и 28/30-й дни (для анализа микробиоты); а также спинной мозг, брыжеечные лимфатические узлы и кишечник на 14-й и 28/30-й дни (для уровня мРНК интерлейкина (IL)-10 и анализа ультраструктуры кишечника соответственно). ЭАЭ – экспериментальный аллергический/аутоиммунный энцефаломиелит; ФР – физиологический раствор; IL-10 – интерлейкин 10; д.п.и. – дни после индукции ЭАЭ

**Fig. 1.** Experimental design. EAE was induced on day 1 by subcutaneous injection of an encephalitogenic mixture containing spinal cord homogenate in Freund's adjuvant, with assessment of baseline cytokine levels and immune cell population in the blood, gut microbiome composition, and fecal samples collected immediately before EAE induction (0 d.p.i.). The study covers the period from the inductive phase (2–7 d.p.i.) to the peak of the disease (14–16 d.p.i.) and the recovery phase (17–30 d.p.i.). Administration of either GF or *Enterococcus faecium* L-3 was performed via orogastric tube from 2 to 16 dpi. Sample collection for analysis included blood on days 0, 7, 14, and 28/30 (for cytokine and leukocyte analysis); faeces on days 1, 14, and 28/30 (for microbiota analysis); and spinal cord, mesenteric lymph nodes, and intestine on days 14 and 28/30 (for interleukin (IL)-10 mRNA levels and intestinal ultrastructure analysis, respectively). EAE – experimental allergic/autoimmune encephalomyelitis; GF – saline; IL-10 – interleukin 10; d.p.i. – day after EAE induction

США), используя набор реактивов MiSeq® ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2 × 300 н). Двусторонние прочтения проверяли по качеству секвенирования, удаляли служебные последовательности, сортировали по баркодам, сливали в единую последовательность с использованием оригинального ПО Illumina.

Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывали с помощью пакетов ПО “Trimmomatic” [62] и “QIIME” [63]. Сначала был произведен первичный анализ качества прочтения, отбор последовательностей на основе качества чтения отдельных оснований (base pair quality), объединение парно-концевых последовательностей с участком перекрытия не менее 35 оснований,

а также удаление последовательностей, длина которых составляет менее 180 пар нуклеотидов. На втором этапе обработки осуществлялось удаление из библиотек всех служебных участков (праймеров), а также последовательностей, содержащих протяженные гомополимерные повторы.

При анализе бактериальных сообществ использовался ОТЕ-пикинг *de novo*. Таксономическая идентификация ОТЕ проводилась с помощью базы данных Ribosomal Database Project (RDP).

#### *Электронная микроскопия тонкой кишки*

Для электронно-микроскопических исследований препараты тонкой кишки готовили по общепринятой методике [64]. Фрагменты кишки размером  $3 \times 3$  мм фиксировали в 2%-ном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (PBS) в течение 1 ч, промывали в PBS 3 раза по 10 мин, постфиксировали в 1%-ном растворе  $\text{OsO}_4$  на PBS 1 ч, вновь промывали 3 раза по 10 мин и обезвоживали в этиловом спирте в возрастающих концентрациях и ацетоне. Затем образцы ткани заливали в смесь эпона и аралдита (соотношение 5 : 3). Из блоков на ультратоме Leica EM UC7 получали ультратонкие срезы, снимали их на сетки с коллодиевой пленкой, затем контрастировали по 10 мин в растворе уранилацетата и в растворе цитрата свинца. Подготовленные таким образом срезы изучали под электронным микроскопом Jeol JEM-1400 и Jeol JEM-2100.

#### *Метод проточной цитофлуориметрии*

Фенотипы циркулирующих в крови иммунных клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии, используя стандартную процедуру окрашивания антителами, как описано ранее [65]. Клетки были окрашены комбинацией следующих флуоресцентно меченных антител: CD3, CD4, CD8, CD161 и CD45RA (BioLegend) – в соответствии с инструкцией производителя. Из каждой группы исследовали образцы крови от 10 животных. Образцы анализировали на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter) с двумя диодными лазерами при длине волны 488 и 635 нм. Математическую обработку данных проточной флуориметрии проводили с использованием программного обеспечения Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter).

#### *Иммуноферментный анализ*

Для определения уровня сывороточных цитокинов MCP-1, интерлейкина IL-17, IL-10 и трансформирующего фактора роста бета (TGFβ) применяли метод иммуноферментного анализа, используя тест-системы с моноклональными антителами (eBioscience, Сан-Диего, Калифорния, США; Bender MedSystems, Вена, Австрия) в соответствии с инструкцией производителя.

#### *Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР)*

Экспрессия мРНК ИЛ-10 в мезентериальных лимфатических узлах и спинном мозге крыс оценивалась на 7-, 14- и 28-й день после инъекции с помощью ОТ-ПЦР. Общая РНК была выделена путем экстракции смесью фенол–хлороформ.

Общий осадок, содержащий мРНК, растворяли в 40 мкл деионизированной воды, обработанной диэтилпиракарбонатом. Затем 1 мкг РНК смешивали

с праймером олиго-dT (10 мкл) и денатурировали при 70 °С в течение 5 мин, после чего немедленно охлаждали на льду. К этой смеси добавляли следующие компоненты: 4 мкл 5X-буфера, нуклеотидтрифосфаты (каждый по 1.25 мМ), 0.5 мкл ингибитора рибонуклеазы, 1 мкл обратной транскриптазы и деионизированную воду для достижения конечного объема 20 мкл. Обратную транскрипцию проводили при 42 °С в течение 60 мин, затем инкубировали в течение 10 мин при 65 °С для инактивации обратной транскриптазы.

Условия ПЦР были следующими: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, затем 28 или 31 цикл денатурации при 95 °С в течение 5 с и отжиг/удлинение при 60 °С в течение 15 мин. Продукты ПЦР визуализировали на 2%-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием, а размеры полос анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ. Относительные уровни экспрессии IL-10 определяли с помощью метода  $2(-\Delta\Delta Ct)$  с  $\beta$ -актином в качестве референсного гена. Прямые и обратные праймеры, используемые для IL-10, были 5'-TGGGTTG-ССАAGCCTTGT-3' и 5'-ATCGATGACAGCGTCGCA-3' (31 цикл, продукт 152 п. н.), а для  $\beta$ -актина 5'-GAAGATCCTGACCGAGCGTG-3' и 5'-AGCACTGTGTTGGCATA-GAG-3' (28 циклов, продукт 326 п. н.). Эксперименты проводились в двух повторах.

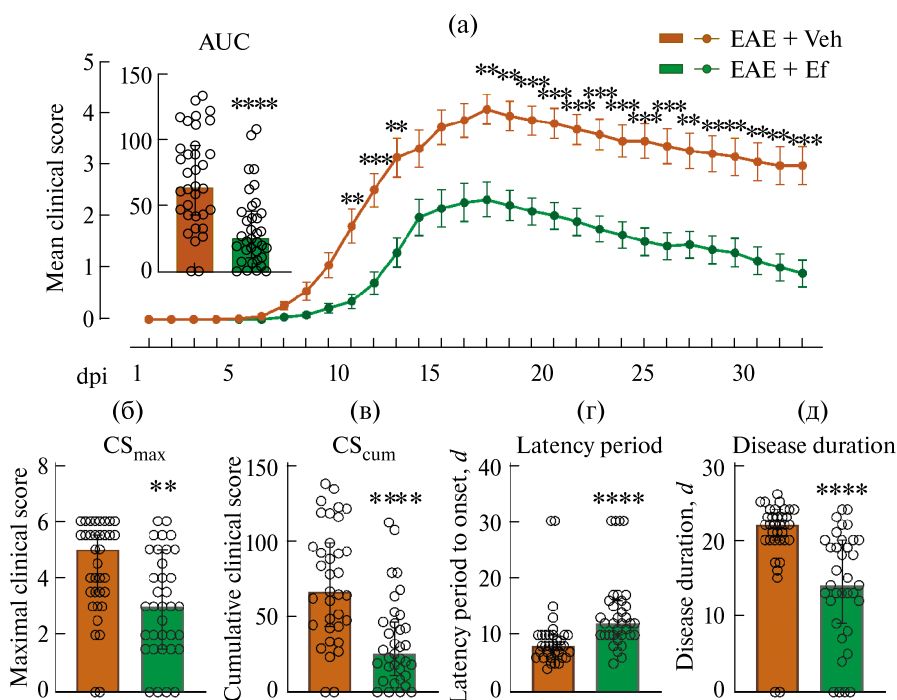
### Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, США) и программного обеспечения Graphpad Prism 10.3 (Graphpad, San Diego, CA, США). Нормальность распределения данных оценивалась с использованием тестов Шапиро–Уилка и Д'Агостино–Пирсона. Для сравнения различий между группами использовали непарный *t*-тест, U-тест Манна–Уитни, однофакторный или двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки HSD, апостериорным тестом Шидака или апостериорной двухэтапной линейной процедурой Бенджамини, Кригера и Йекутиели (BKU). Для сравнения долей использовали тест  $\chi^2$  и точный тест Фишера. Статистическая значимость была установлена на уровне  $p < 0.05$ , а частота ложных срабатываний (FDR) контролировалась на уровне  $q < 0.05$  с использованием метода BKU.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Влияние *Enterococcus faecium* L-3 на течение ЭАЭ у крыс

Курсовое введение *E. faecium* L-3 в целом оказало позитивное влияние на течение ЭАЭ у крыс. Несмотря на то, что по сравнению с контрольной группой у животных, получавших пробиотические энтерококки, общая заболеваемость достоверно не уменьшилась (88.6% vs 94.3%, точный тест Фишера:  $p = 0.33$ ), наблюдалось увеличение доли легко болевших животных (КИмакс  $\leq 2$ : 40.0% vs 11.43%, точный тест Фишера:  $p = 0.006$ ), а количество летальных исходов снизилось в 4 раза (5.7% vs 22.9%, точный тест Фишера:  $p = 0.042$ ). Неврологические нарушения у крыс, получавших *E. faecium* L-3, появлялись на 2.5 дня позже (рис. 2а, г) и были менее выраженными, чем у контрольных крыс, на что указывают медианные значения максимального клинического индекса (рис. 2б) и кумулятивного клинического индекса (рис. 2в). В группе, получавшей пробиотик, также наблюдалось сокращение продолжительности заболевания (рис. 2д). Таким образом, курсовое введение *E. faecium* L-3 оказывало протективный эффект на течение ЭАЭ, как описано ранее [56, 65].



**Рис. 2.** Снижение тяжести клинических проявлений ЭАЭ после введения *Enterococcus faecium* L-3. (а) – динамика среднего клинического индекса значительно ниже в группе *E. faecium* L-3 по сравнению с группой плацебо, особенно на пике заболевания и в фазу выздоровления. Группа крыс, получавшая *E. faecium* L-3, продемонстрировала: (б) – более низкий максимальный клинический индекс (CS\_max), (в) – сниженный кумулятивный клинический индекс (CS\_cum), (г) – более длительный латентный (до появления симптомов) период, (д) – более короткую общую продолжительность заболевания по сравнению с крысами ЭАЭ, получавшими плацебо. dpi – День после индукции ЭАЭ; AUC – площадь под кривой. Данные динамики представлены как среднее  $\pm$  SEM, двухфакторный *rm*-ANOVA, апостериорный тест Шидака; другие данные представлены как медиана с межквартильными интервалами, U-тест Манна–Уитни;  $n = 35$  на группу; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

**Fig. 2.** Reduction in the severity of clinical manifestations of EAE after *Enterococcus faecium* L-3 administration. (a) – The dynamics of the mean clinical index is significantly lower in the *E. faecium* L-3 group compared to the placebo group, especially at the peak of the disease and in the recovery phase. The group of rats treated with *E. faecium* L-3 demonstrated: (b) – a lower maximum clinical score (CS\_max); (v) – a reduced cumulative clinical score (CS\_cum), (r) – a longer latent (before the onset of symptoms) period; (d) – a shorter total duration of the disease compared to the EAE rats treated with placebo. dpi – Day after EAE induction; AUC – area under the curve. The dynamics data are presented as the mean  $\pm$  SEM, two-way *rm*-ANOVA, Šidak *post hoc* test; other data are presented as median with interquartile ranges, Mann–Whitney U test;  $n = 35$  per group; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

### Изменения таксономического состава кишечного микробиома

Для оценки модулирующего действия *E. faecium* L-3 на кишечный микробиом при развитии ЭАЭ был исследован бактериальный состав образцов фекалий непосредственно перед индукцией ЭАЭ, а также динамика его изменений в разные фазы

развития заболевания. До индукции ЭАЭ хотя и отмечалась межиндивидуальная вариация таксономического состава кишечного микробиома, существенных различий между двумя группами крыс не наблюдалось (рис. 3а).

#### Изменения на уровне филумов

На уровне филумов достоверные различия между группами выявлены на 14- и 30-й день после индукции ЭАЭ (рис. 3; в тексте ниже указаны средние значения  $\pm$  SEM).

На пике заболевания (14-й д.п.и.) отмечались статистически значимые различия между группами в представленности филума *Bacteroidota*, при этом изменения (уменьшение с  $24.2 \pm 2.2\%$  до  $5.7 \pm 2.1\%$ ;  $p = 0.0161$ ) по сравнению с исходным уровнем наблюдались только в группе EAE + Veh. В группе EAE + Ef численность *Bacteroidota* на этом сроке была сопоставима с исходным уровнем ( $22.4 \pm 3.7\%$  и  $21.1 \pm 3.8\%$  соответственно) (рис. 3б).

Однако на фоне введения пробиотика происходило постепенное уменьшение представленности другого доминантного филума – *Bacillota*, к 30-му д.п.и. его численность составляла  $51.2 \pm 3.5\%$ , что на 20% меньше по сравнению с исходным уровнем ( $71.9 \pm 3.9\%$ ;  $p = 0.0037$ ) и на 14% меньше по сравнению с 14-м д.п.и. ( $65.5 \pm 3.3\%$ ;  $p = 0.0045$ ) (рис. 3б). На пике ЭАЭ представленность р\_ *Bacillota* в составе кишечного микробиома крыс существенно различалась между группами (EAE + Veh:  $79.8 \pm 3.1\%$  vs EAE + Ef:  $65.5 \pm 3.3\%$ ;  $p = 0.0105$ ).

В результате произошедших сдвигов в представленности доминантных филумов в кишечном микробиоме соотношение *Bacillota/Bacteroidota*, известное как соотношение *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B), было больше в группе EAE + Veh по сравнению с группой EAE + Ef на 14-й д.п.и.:  $15.8 \pm 3.1\%$  vs  $3.4 \pm 0.6\%$ ;  $p = 0.015$  (рис. 3в). То есть клинические симптомы у крыс, получающих пробиотик, и у крыс без пробиотика развиваются на фоне разных микробных сообществ, которые, вероятно, влияют на тяжесть заболевания.

В изменениях р\_ *Pseudomonadota* не обнаружено существенной разницы между группами, хотя значительное сокращение представленности этого филума наблюдалось на 30-й д.п.и. по сравнению с 14-м д.п.и. в обеих группах (рис. 3г;  $p = 0.021$ ). Однако на 14-й д.п.и. только в группе EAE + Veh возрастала представленность р\_ *Thermodesulfobacteriota*. Различия численности р\_ *Thermodesulfobacteriota* между группами на 14-й день достигали уровня статистической значимости ( $2.2\%$  vs  $0.8\%$ ;  $p = 0.033$ ).

Для р\_ *Actinomycetota* с помощью дисперсионного анализа выявлены изменения как в динамике развития ЭАЭ, так и в эффекте действия пробиотика, хотя апостериорный тест подтвердил лишь общее увеличение численности представителей этого филума на 30-й д.п.и. по сравнению с исходным уровнем в обеих группах, без существенных различий между группами (рис. 3ж;  $p = 0.044$ ). Увеличение численности р\_ *Spirochaetota* наблюдалось на 14-й д.п.и. по сравнению с исходным уровнем, повлиявшее на обе группы одинаково, что предполагает эффект, обусловленный развитием заболевания, а не действием пробиотика (рис. 3и;  $p = 0.020$ ).

Для других идентифицированных филумов, включая р\_ *Mycoplasmata* (*Tenericutes*), р\_ *Fusobacteriota*, р\_ *Patescibacteria*, р\_ *Chlamydiota*, р\_ *Deferribacterota*, р\_ *Elusimicrobiota*, р\_ *Planctomycetota* и *Archaea*, существенных различий между группами в исследуемые временные точки не наблюдалось (рис. 3).

### Изменения на уровне классов и порядков

Анализ структуры филума на уровне классов и порядков показал, что изменения р *Bacteroidota* произошли преимущественно за счет варьирования представленности с *Bacteroidia* и о *Bacteroidales*, что совпало с колебаниями значений на уровне филума: оно снизилось в группе EAE + Veh на 14-й д.п.и. по сравнению с исходным уровнем ( $5.7 \pm 2.1\%$  vs  $22.2 \pm 2.2\%$ ;  $p = 0.016$ ) и по сравнению с соответствующей временной точкой в группе EAE + Ef ( $22.4 \pm 3.7\%$ ;  $p = 0.005$ ).

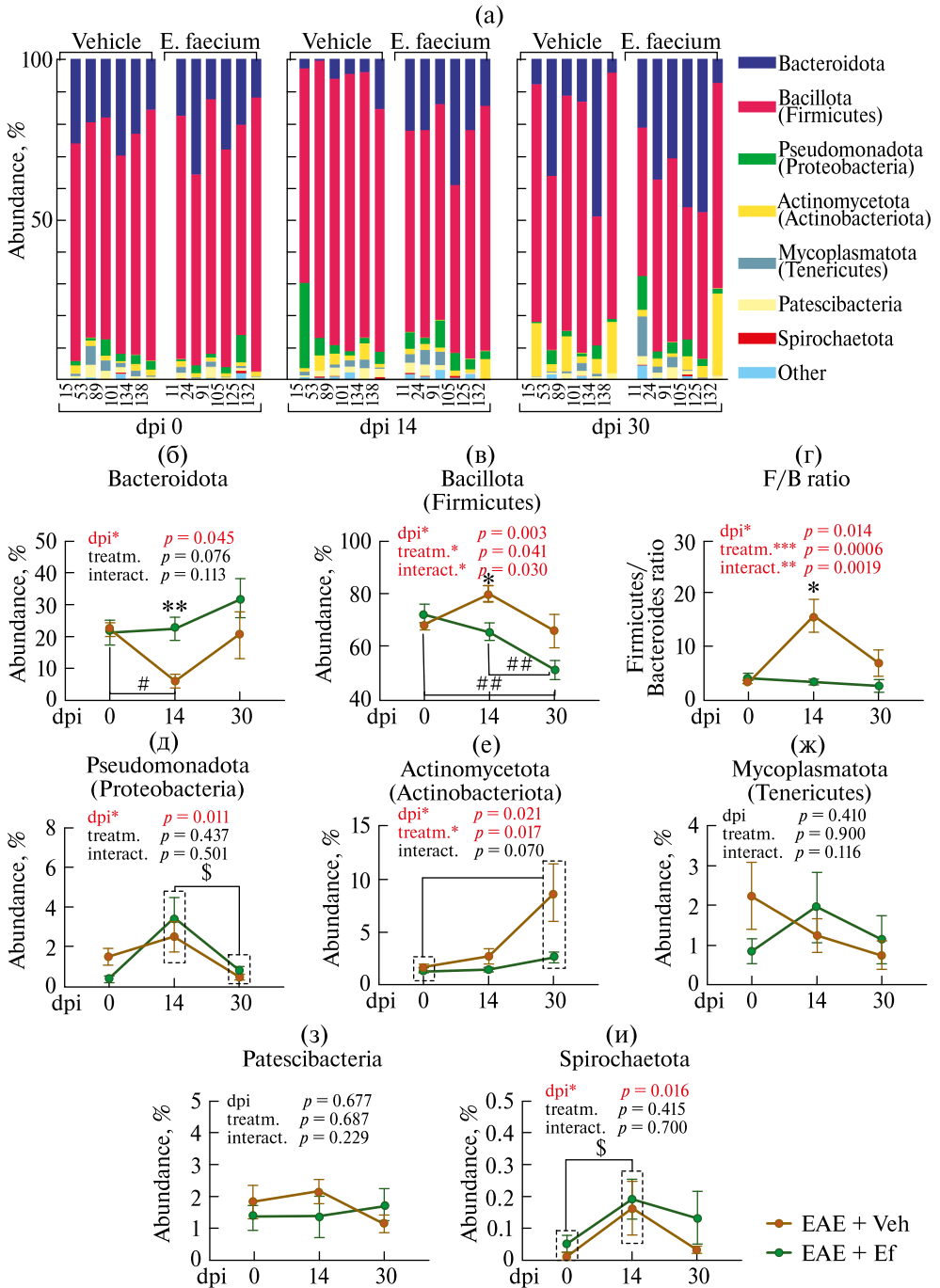
Наблюдаемые изменения численности р *Bacillota* в группе EAE + Ef в основном произошли из-за колебаний представленности с *Clostridia* и о *Eubacteriales* (*Clostridiales*), которая уменьшилась с  $54.2 \pm 2.1\%$  на 14-й д.п.и. до  $36.2 \pm 2.5\%$  на 30-й д.п.и. ( $p = 0.001$ ). Дисперсионный анализ выявил эффект взаимодействия между факторами “день” и “пробиотик” на обилие с *Erysipelotrichia* и о *Erysipelotrichales*, однако апостериорный тест не подтвердил различий между группами или временными точками. Не наблюдалось также влияния прогрессирования ЭАЭ или введения *E. faecium* L-3 на обилие с *Bacilli* и с *Negativicutes*.

Уменьшение р *Pseudomonadota* в обеих группах в фазу выздоровления по сравнению с пиком заболевания произошло из-за изменений представленности с *Gammaproteobacteria*, доля которых в составе микробиома уменьшилась с  $2.2 \pm 0.6\%$  на 14-й день исследования до  $0.2 \pm 0.02\%$  на 30-й день исследования ( $p = 0.016$ ), что способствовало общему уменьшению представленности филума. Другие классы представлены в микробиоме в еще меньшем количестве, максимальная доля с *Alphaproteobacteria* составила  $0.1 \pm 0.03\%$  на 30-й д.п.и. Однако это в 10 раз больше, чем исходный уровень  $0.01 \pm 0.01\%$  ( $p = 0.045$ ). Отмечались изменения численности с *Betaproteobacteria* по дням, однако при апостериорном анализе различий между группами не выявлено. Достоверных различий структуры филума р *Actinomycetota* на уровне классов и порядков не наблюдалось.

На пике заболевания по сравнению с исходным уровнем у животных обеих групп возрастала численность с *Brachyspirae* (ранее *Spirochaetia*) и о *Spirochaetales*, принадлежащих р *Spirochaetota* ( $0.2 \pm 0.05\%$  против  $0.03 \pm 0.01\%$ ;  $p = 0.04$ ). В стадию выздоровления их представленность возвращалась к исходным значениям  $0.04 \pm 0.01\%$  ( $p = 0.024$ ).

### Изменения на уровне семейств

Наиболее обильно представленными семействами филума *Bacteroidota* у крыс были f *Prevotellaceae* и f *Muribacullaceae* (ранее известное, как S24-7), в меньшем количестве были представлены f *Bacteroidaceae* и f *Rikenellaceae*. В группе EAE + Veh на пике заболевания по сравнению с исходным уровнем снизилась численность двух семейств, принадлежащих р *Bacteroidota* (о *Bacteroidales*): *Prevotellaceae* (с  $13.9 \pm 1.9\%$  до  $1.8 \pm 0.4\%$  ( $p = 0.001$ ) и *Muribacullaceae* (с  $7.4 \pm 1.0\%$  до  $2.7 \pm 1.1\%$  ( $p = 0.043$ ) в типе. В этот момент времени в группе EAE + Ef представленность данных классов в микробиоме составила  $11.5 \pm 3.0\%$  и  $8.0 \pm 2.00\%$ , что существенно выше, чем в группе EAE + Veh ( $p = 0.021$ ;  $p = 0.051$ ) (рис. 4а, б). Обилие f *Bacteroidaceae* увеличилось на пике заболевания в группе EAE + Ef по сравнению как с исходным уровнем ( $2.3 \pm 0.3\%$  vs  $0.9 \pm 0.4\%$ ;  $p = 0.028$ ), так и с группой EAE + Veh ( $2.3 \pm 0.3\%$  vs  $0.67 \pm 0.2\%$ ;  $p = 0.005$ ) (рис. 4в). Хотя численность f *Rikenellaceae* колебалась в течение ЭАЭ, статистически значимых различий ни в одной из групп не обнаружено (рис. 4г).





**Рис. 3.** Изменения таксономического состава кишечного микробиома на уровне филума у крыс при развитии ЭАЭ (EAE + Veh) и на фоне введения *E. faecium* L-3 (EAE + Ef): (а) – относительное обилие (%) основных бактериальных филумов на 0-й, 14-й и 30-й д.п.и.; динамика относительного обилия р\_ *Bacteroidota* (б), р\_ *Bacillota* (*Firmicutes*) (в), соотношения F/B (г), р\_ *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) (д), р\_ *Actinomycetota* (*Actinobacteria*) (е), р\_ *Mycoplasmata* (*Tenericutes*) (ж), р\_ *Patescibacteria* (з) и р\_ *Spirochaetota* (и). Среднее значение  $\pm$  SEM,  $n = 6$  на группу, ANOVA или модель со смешанными эффектами с апостериорным тестом Тьюки. \* – Различия между группами в определенные временные точки; # – изменения внутри одной группы в зависимости от временных точек; \$ – объединенная динамика временных точек, когда между группами нет различий, но присутствуют значимые различия в зависимости от временных точек внутри обеих групп. \*, #, \$ –  $p < 0.05$ ; \*\*, ## –  $p < 0.01$

**Fig. 3.** Changes in the taxonomic composition of the intestinal microbiome at the phylum level in rats during the development of EAE (EAE+ Veh) and against the background of the introduction of *E. faecium* L-3 (EAE + Ef). (a) – Relative abundance (%) of the main bacterial phyla at 0, 14 and 30 d.p.i. Dynamics of relative abundance of р\_ *Bacteroidota* (б), р\_ *Bacillota* (*Firmicutes*) (в), F/B ratio (г), р\_ *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) (д), р\_ *Actinomycetota* (*Actinobacteria*) (е), р\_ *Mycoplasmata* (*Tenericutes*) (ж), р\_ *Patescibacteria* (з), and р\_ *Spirochaetota* (и). Mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  per group, ANOVA or mixed-effects model with Tukey's post hoc test. \* – Differences between groups at specific time points; # – changes within one group depending on time points; \$ – combined dynamics of time points, when there are no differences between groups, but there are significant differences depending on time points within both groups. \*, #, \$ –  $p < 0.05$ ; \*\*, ## –  $p < 0.01$

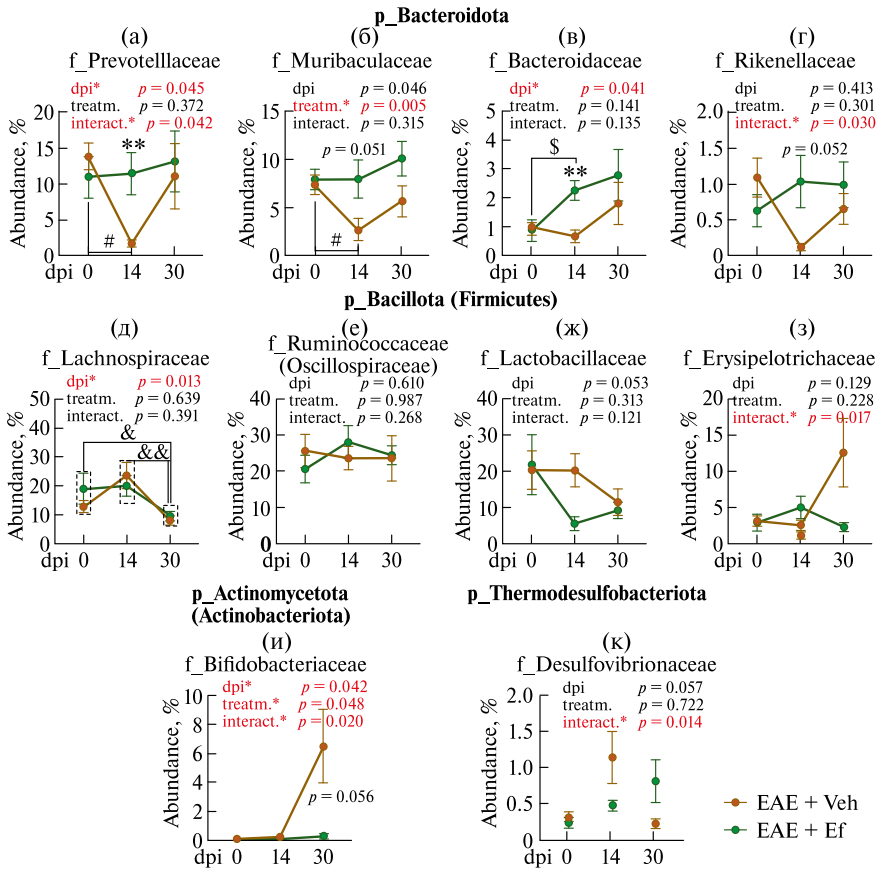
Среди семейств, относящихся к филуму *Bacillota*, не было обнаружено межгрупповых различий. Представленность ф\_ *Lachnospiraceae* в обеих группах снижалась в фазу выздоровления (до  $8.7 \pm 1.2\%$ ) по сравнению с исходным уровнем в группе EAE + Ef ( $15.9 \pm 2.9\%$ ;  $p = 0.042$ ) и на 14-й д.п.и. в группе EAE + Veh ( $21.7 \pm 2.9\%$ ;  $p = 0.006$ ) (рис. 4д). Не наблюдалось значимых эффектов введений *E. faecium* L-3 или дней для ф\_ *Oscillospiraceae* (*Ruminococcaceae*), ф\_ *Lactobacillaceae* и ф\_ *Erysipelotrichaceae*, хотя дисперсионный анализ выявил значимый эффект взаимодействия факторов для ф\_ *Erysipelotrichaceae* попарные сравнения в апостериорном тесте не выявили различий (рис. 4е–з).

Было обнаружено, что доля ф\_ *Bifidobacteriaceae* (р\_ *Actinomycetota*) имела тенденцию к возрастанию на 30-й д.п.и. в группе EAE + Veh по сравнению с группой EAE + Ef ( $6.5 \pm 2.5\%$  vs  $0.2 \pm 0.1\%$ ;  $p = 0.056$ ) (рис. 4и). Динамика изменения численности ф\_ *Desulfovibrionaceae* (р\_ *Thermodesulfobacteriota*) различалась в группах в процессе развития ЭАЭ; однако межгрупповых различий выявлено не было (рис. 4к).

### Изменения на уровне родов и видов

Анализ динамики таксономического состава микробиоты кишечника на уровне родов выявил ряд статистически значимых различий между группами EAE + Veh и EAE + Ef (рис. 5).

Среди представителей филума *Bacteroidota* в процессе развития на фоне введений *E. faecium* L-3 и без пробиотика выявлен различный вектор изменений 2-х бактериальных родов. Отмечалось увеличение относительного обилия *Bacteroides* на 14-й д.п.и. по сравнению с исходным уровнем в группе EAE + Ef ( $p = 0.0088$ ), тогда как в группе EAE + Veh подобных изменений не наблюдалось (рис. 5а). В этот же период зафиксировано увеличение численности *Parabacteroides* в группе EAE + Ef ( $p = 0.0395$ ) (рис. 5ж).



**Рис. 4.** Изменения таксономического состава кишечного микробиома на уровне семейств у крыс при естественном развитии ЭАЭ (EAE + Veh) и на фоне введения *E. faecium* L-3 (EAE + Ef): (а) – *f\_Prevotellaceae*, (б) – *f\_Muribaculaceae*, (в) – *f\_Bacteroidaceae*, (г) – *f\_Rikenellaceae* в филуме *Bacteroidota*; (д) – *f\_Lachnospiraceae*, (е) – *f\_Oscillospiraceae* (*Ruminococcaceae*), (ж) – *f\_Lactobacillaceae*, (з) – *f\_Erysipelotrichaceae* в филуме *Bacillota (Firmicutes)*; (и) – *f\_Bifidobacteriaceae* в филуме *Actinomycetota (Actinobacteria)*; (к) – *f\_Desulfovibrionaceae* в филуме *Thermodesulfobacteriota*. Приведены средние значения  $\pm$  SEM.  $n = 6$  на группу. ANOVA или модель со смешанными эффектами с апостериорным тестом Тьюки. \* – различия между группами в определенные временные точки; # – изменения внутри одной группы в разные временные точки; \$ – объединенная динамика временных точек, когда между группами нет различий, но присутствуют значимые различия в разных временных точках внутри обеих групп. \*, #, \$ –  $p < 0.05$ ; \*\*, ## –  $p < 0.01$

**Fig. 4.** Changes in the taxonomic composition of gut microbiota at the family level in EAE-induced rats treated with vehicle (EAE + Veh) or *E. faecium* L-3 (EAE + Ef): (а) – *f\_Prevotellaceae*, (б) – *f\_Muribaculaceae*, (в) – *f\_Bacteroidaceae*, (г) – *f\_Rikenellaceae* within *p\_Bacteroidota*; (д) – *f\_Lachnospiraceae*, (е) – *f\_Ruminococcaceae (Oscillospiraceae)*, (ж) – *f\_Lactobacillaceae*, (з) – *f\_Erysipelotrichaceae* within *p\_Bacillota (Firmicutes)*; (и) – *f\_Bifidobacteriaceae* within *p\_Actinomycetota (Actinobacteria)*; and (к) – *f\_Desulfovibrionaceae* within *p\_Thermodesulfobacteriota*. Mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  per group, ANOVA or a mixed-effects model with Tukey's post hoc test. \* – Differences between groups at specific timepoints; # – changes within one group across timepoints; \$ – combined timepoint dynamics when no difference exists between groups, but significant differences are present across timepoints within both groups. \*, #, \$ –  $p < 0.05$ ; \*\*, ## –  $p < 0.01$

Два рода *Prevotella* изменялись сходным образом в обеих группах: *Prevotella* 1 характеризовался ростом в фазу выздоровления ( $p = 0.048$ ), а *Prevotella* 2 снижался на пике ЭАЭ ( $p = 0.0144$ ) по сравнению с исходным уровнем (рис. 5б, в). Численность *Rikenellaceae* RC9 gut group уменьшалась на 14-й д.п.и. только в группе ЕАЕ + Veh ( $p = 0.0132$ ), что сопровождалось значимым взаимодействием факторов “время” и “лечение” ( $p = 0.0426$ ).

Среди представителей филума *Bacillota* значимые различия между группами выявлены для двух родов, представленность которых увеличивалась на 14-й д.п.и. в группе ЕАЕ + Veh – *Family XIII* UCG-001 ( $p = 0.0397$ ) (рис. 5е) и *Flavonifractor* ( $p = 0.0461$ ) (рис. 5к).

Изменение численности *Eisenbergiella* (рис. 5з) и *Peptococcus* (рис. 5и) происходило сходным образом в обеих группах со снижением в фазу выздоровления по сравнению с пиком заболевания ( $p = 0.0473$  и  $0.0317$  соответственно). У *Acetatifactor* выявлен эффект взаимодействия факторов ( $p = 0.0174$ ), хотя внутригрупповые различия не достигали значимости.

*Lactobacillus kalixensis* демонстрировал выраженное снижение численности на 14-й д.п.и. ( $p = 0.0026$ ) с последующим ростом к 30-му д.п.и. ( $p = 0.0182$ ) в обеих группах.

Род *Parasutterella* (*Pseudomonadota*) показал значимые изменения между 14-м и 30-м д.п.и. ( $p = 0.0486$ ) без различий между группами. Отмечалось временное увеличение численности рода *Mailhella* (*Thermodesulfobacteriota*) на 14-й д.п.и. ( $p = 0.0444$ ) и снижение к 30-му д.п.и. ( $p = 0.0321$ ) также без межгрупповых различий (рис. 5м, н).

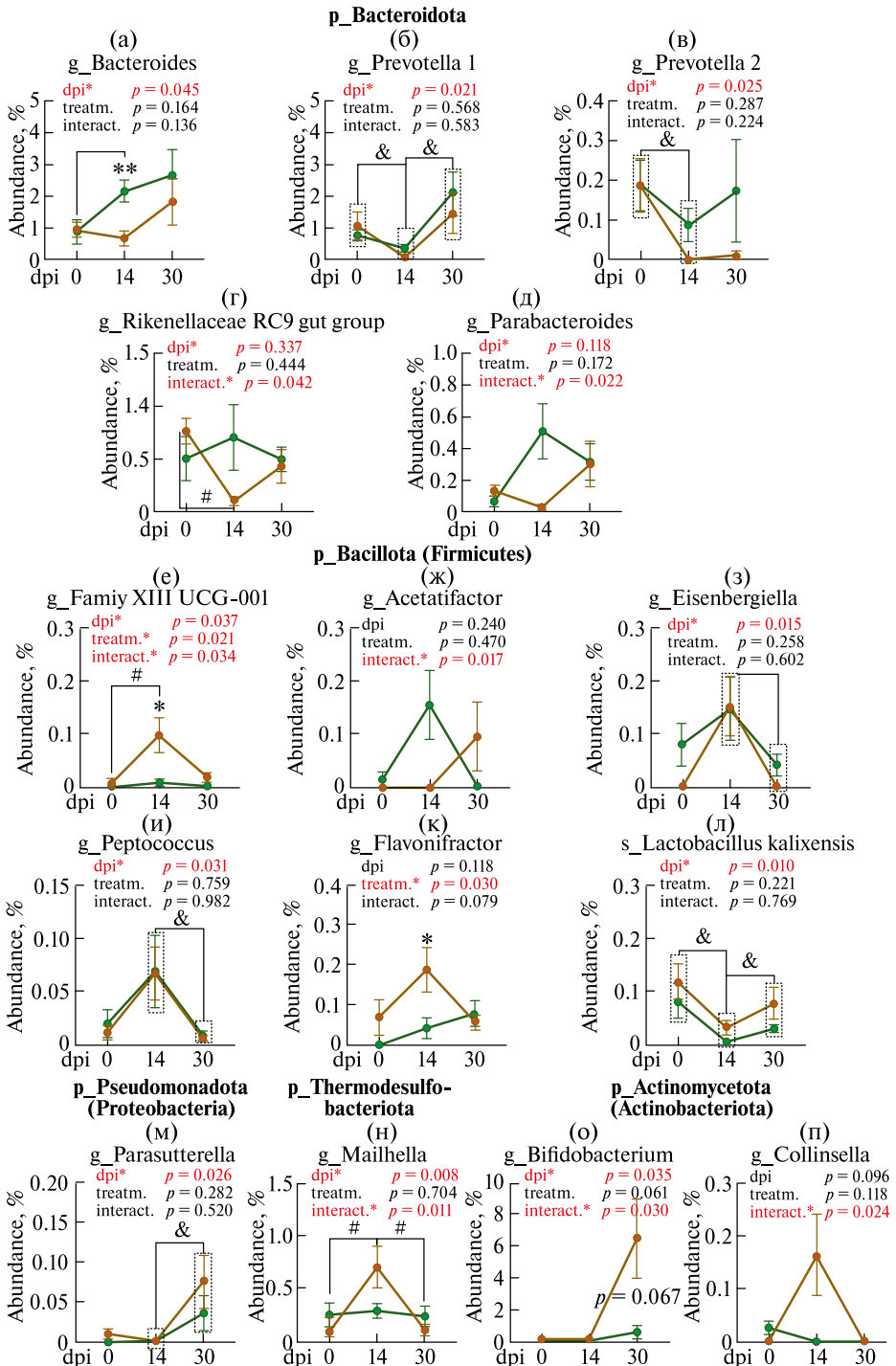
Среди *Actinomycetota* было зафиксировано существенное возрастание численности *Bifidobacterium* ( $p = 0.0304$ ) в группе ЕАЕ + Veh (рис. 5о), а род *Collinsella* демонстрировал динамику с общим эффектом взаимодействия факторов ( $p = 0.0241$ ) без статистически значимых различий между группами (рис. 5п).

Таким образом, введение *E. faecium* L-3 модифицировало динамику обилия нескольких ключевых родов – *Bacteroides*, *Parabacteroides* и *Bifidobacterium*, что способствовало поддержанию более сбалансированного микробного сообщества в фазу восстановления.

### Изменения в структуре энтероцитов

Для оценки вовлеченности кишечника в развитие ЭАЭ и влияния курсового введения *E. faecium* L-3 на состояние кишечника была исследована ультраструктура тонкой кишки на пике заболевания и в стадию выздоровления. Как видно на представленных электронограммах, клетки эпителия тонкой кишки интактных крыс имеют типичное строение (рис. 6а, б). На апикальной поверхности клетки расположены многочисленные микроворсинки, корневые нити которых погружены в цитоплазму энтероцитов. Межклеточные контакты представлены плотными контактами, промежуточными контактами и десмосомами. В цитоплазме клеток присутствуют многочисленные митохондрии, микрофиламенты и микротрубочки. В просвете кишки можно видеть скопление кишечной микробиоты, которая не контактирует с микроворсинками энтероцитов (рис. 6а, б).

На пике ЭАЭ (14-й д.п.и.) отмечались изменения в энтероцитах. В эпителиальном пласте обнаруживались протяженные участки с существенными повреждениями структуры апикальной области клеток. Эти изменения были более



выраженными у крыс из группы ЕАЕ + Veh (рис. 6в). У крыс, получавших *E. faecium* L-3 и имевших симптомы ЭАЭ, на этом сроке также встречались поврежденные эпителиоциты. На фото (рис. 6с, d) представлены энтероциты, у которых набухшие и укороченные микроворсинки распадаются на отдельные фрагменты. В цитоплазме энтероцитов крыс, как группы ЕАЕ + Veh, так и у крыс, получавших *E. faecium* L-3, наблюдались многочисленные вакуоли и отдельные мультивезикулярные тела, при этом структура межклеточных контактов не имела видимых нарушений. На фоне этих изменений структуры энтероцитов среди фрагментов микроворсинок наблюдались микроорганизмы (рис. 6г).

В стадию выздоровления, на 30-й д.п.и. ЭАЭ, у крыс из группы ЕАЕ + Veh область с поврежденными микроворсинками становилась более обширной (рис. 6д). На этих участках вблизи апикальной мембраны наблюдались многочисленные элементы микробиоты кишечника, а в цитоплазме энтероцитов – вакуоли и мультивезикулярные тела, при этом межклеточные контакты по-прежнему не имели видимых нарушений. Тем не менее бактерии из просвета кишки были способны проникать в энтероциты. Разные стадии транслокации бактерий из просвета кишечника в собственную пластинку энтероцитов показаны на рис. 7.

При приближении бактерии к апикальной мембране эпителиоцита между мембраной бактерии и клетки образуются нитчатые структуры, появляющиеся в результате их взаимодействия (рис. 7б). На рис. 7в отмечается инвагинация апикальной мембраны эпителиоцита, куда погружается бактерия. Под апикальной мембраной в месте погружения можно видеть конденсацию актина из терминальной сети эпителиоцита (указана стрелкой). На рис. 7г показана бактерия, погруженная в цитоплазму в апикальной области клетки, сразу под микроворсинками. На двух других рисунках бактерии находятся в глубине цитоплазмы, видна латеральная мембрана эпителиоцита (рис. 7д), и на рис. 7е показана бактерия в базальной части клетки, окруженная выростами базальной мембраны. То есть прослеживается путь

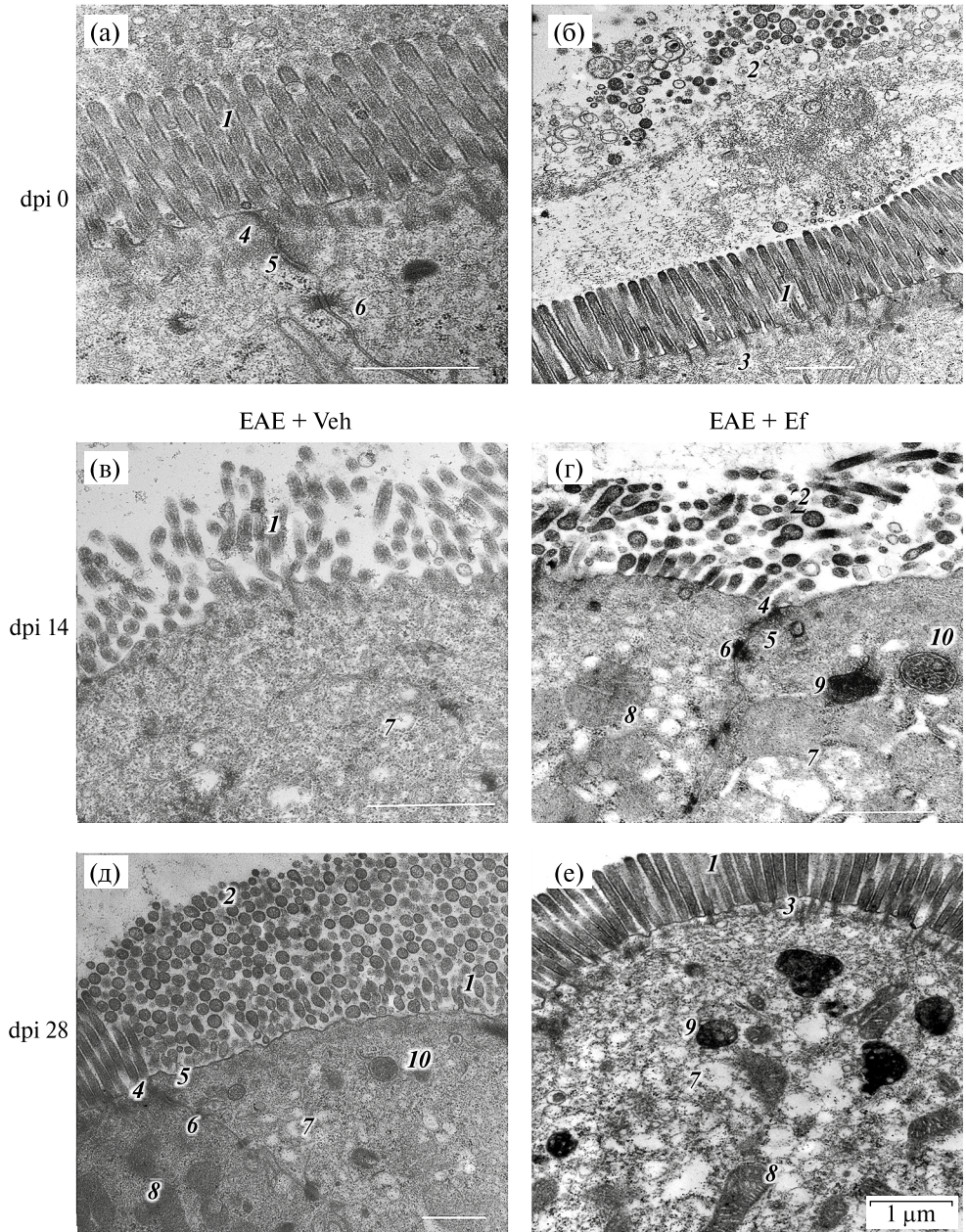
---

**Рис. 5.** Изменения относительного обилия кишечных бактериальных родов при развитии ЭАЭ и после введения *E. faecium* L-3. Динамика относительного обилия (%) для выбранных родов, относимых к: p\_*Bacteroidota*: (а) – *Bacteroides*, (б) – *Prevotella* 1, (в) – *Prevotella* 2, (г) – *Rikenellaceae* RC9 gut group, (д) – *Parabacteroides*; p\_*Bacillota* (*Firmicutes*): (е) – Family XIII UCG-001, (ж) – *Acetatifactor*, (з) – *Eisenbergiella*, (и) – *Peptococcus*, (к) – *Flavonifractor*, (л) – *Lactobacillus kalixensis*; p\_*Pseudomonadota* (*Proteobacteria*): (м) – *Parasutterella*; p\_*Thermodesulfobacteriota*: (н) – *Mailhella*; p\_*Actinomycetota* (*Actinobacteria*): (о) – *Bifidobacterium*, (п) – *Collinsella*. Данные представлены как среднее SEM, n = 6 на группу. Модель со смешанными эффектами или однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. \* – межгрупповые различия; # – динамика внутри группы ЕАЕ + Veh; § – динамика внутри группы ЕАЕ + Ef; & – объединенная динамика; dpi – дни после индукции ЭАЭ

**Fig. 5.** Changes in the abundance of intestinal bacterial genera during EAE development and after *E. faecium* L-3 administration. Dynamics of relative abundance (%) for representative genera across phyla: p\_*Bacteroidota* – *Bacteroides* (a), *Prevotella* 1 (б), *Prevotella* 2 (в), *Rikenellaceae* RC9 gut group (г), *Parabacteroides* (д); p\_*Bacillota* (*Firmicutes*) – Family XIII UCG-001 (е), *Acetatifactor* (ж), *Eisenbergiella* (з), *Peptococcus* (и), *Flavonifractor* (к), *Lactobacillus kalixensis* (л); p\_*Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) – *Parasutterella* (м); p\_*Thermodesulfobacteriota* – *Mailhella* (н); p\_*Actinomycetota* (*Actinobacteria*) – *Bifidobacterium* (о), *Collinsella* (п). Data are shown as mean ± SEM, n = 6 per group. Mixed-effects model or ANOVA with Tukey's *post hoc* test. \* – Intergroup differences; # – intragroup dynamics in EAE+Veh; § – intragroup dynamics in EAE+Ef; & – combined dynamics. dpi – days post induction

транслокации бактерий из просвета кишечника до собственной пластинки — места сосредоточения иммунных клеток.

В отличие от животных контрольной группы с поврежденными энтероцитами даже на 30-й д.п.и., у крыс, получавших *E. faecium* L-3, на пике ЭАЭ клетки



с разрушенными микроворсинками встречались реже, площадь поврежденного эпителия была меньше и повреждения микроворсинок — менее выражены (рис. б).

В фазу выздоровления у крыс этой группы отмечалось частичное восстановление апикальной части эпителиоцитов (рис. бд), однако даже у клеток с неповрежденными микроворсинками сохранялась вакуолизация цитоплазмы, а в апикальной части клетки наблюдались многочисленные лизосомы (рис. бд).

Таким образом, применение пробиотического штамма *E. faecium* L-3 ослабляло повреждение энтероцитов в клиническую фазу ЭАЭ и способствовало регенеративным процессам в эпителиальном пласте в стадию ремиссии.

### *Оценка иммуномодулирующего действия пробиотического штамма Enterococcus faecium L-3 при ЭАЭ*

Одной из возможных причин ослабления тяжести ЭАЭ на фоне введения *E. faecium* L-3 может быть способность этого штамма влиять на иммунные функции [58], поэтому были исследованы фенотипы циркулирующих в крови иммунных клеток и уровень цитокинов.

### *Анализ фенотипов иммунных клеток методом проточной цитофлуориметрии*

В обеих группах доля циркулирующих в крови В-клеток (CD3-CD45RA<sup>+</sup>) уменьшилась на 7-й д.п.и. по сравнению с исходным уровнем (двухфакторный дисперсионный анализ: эффект дня после инъекции  $F(3, 47) = 6.549, p = 0.001$ ; ВКУ:  $q = 0.021$  и  $0.006$  соответственно), при этом численность В-клеток в группе ЕАЭ + Ef оставалась сниженной на 28-й д.п.и. ( $q = 0.006$ ), по сравнению с контрольной группой,

---

**Рис. 6.** Электронограммы тонкого кишечника: (а), (б) — нормальные эпителиальные клетки тонкого кишечника демонстрируют типичные структуры с многочисленными микроворсинками, межклеточными контактами и скоплением микробиоты в просвете; (в), (г) — на пике ЭАЭ поврежденные области с нарушенной структурой микроворсинок были как в группе ЕАЭ + Veh, так и в группе ЕАЭ + Ef, причем в последней наблюдались менее выраженные повреждения; (д), (е) — в фазе восстановления область с поврежденными микроворсинками была более обширной в группе ЕАЭ + Veh, с многочисленными элементами кишечной микробиоты, в то время как у крыс, получавших *E. faecium* L-3, наблюдалось восстановление кишечного эпителия с меньшей частотой клеток с поврежденными микроворсинками и меньшей зоной повреждений. 1 — микроворсинки, 2 — элементы микробиоты, 3 — корневые нити, 4 — плотные контакты, 5 — промежуточные контакты, 6 — десмосомы, 7 — вакуоли, 8 — митохондрии, 9 — лизосомы, 10 — мультивезикулярные тела. Масштабирующий отрезок = 1 мкм. dpi — дни после индукции

**Fig. 6.** Transmission electron micrographs of the small intestine: (a), (b) — Normal small intestinal epithelial cells show typical structures with numerous microvilli, cell-cell contacts and accumulation of microbiota in the lumen. (v), (r) — At the peak of EAE, damaged areas with disrupted microvilli structure were observed in both EAE + Veh and EAE + Ef-treated rats, with less severe damage observed in the latter. (d), (e) — During the recovery phase, the area with damaged microvilli was more extensive in the EAE + Veh group, with abundant elements of intestinal microbiota, while *E. faecium* L-3-treated rats showed recovery of intestinal epithelium with a lower frequency of cells with damaged microvilli and a smaller damage area. 1 — Microvilli, 2 — Microbiota elements, 3 — Rootlets, 4 — Tight junctions, 5 — Adherens junctions, 6 — Desmosomes, 7 — Vacuoles, 8 — Mitochondria, 9 — Lysosomes, 10 — Multivesicular bodies. Scale bar = 1  $\mu$ m. dpi — days post induction

хотя на пике ЭАЭ (14-й д.п.и.) различия между группами в уровне В-клеток не достигали уровня значимости ( $q = 0.059$ ) (рис. 8а).

Усредненная доля Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) среди общего числа лимфоцитов в группе ЕАЕ + Veh существенно не изменялась, тогда как в группе ЕАЕ + Ef увеличивалась на 7-й д.п.и. (двухфакторный дисперсионный анализ: эффект dpi  $F(3, 47) = 5.978$ ,  $p = 0.002$ ; ВКУ:  $q = 0.036$ ) и 28-й д.п.и. (ВКУ:  $q = 0.008$ ) (рис. 8б). В соответствии с экспрессией CD4 или CD8 в общем пуле Т-клеток были идентифицированы Т-хелперы (Th) и цитотоксические Т-клетки (Tcut) соответственно.

Доля Th-клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) существенно не различалась между группами в наблюдаемые временные точки (рис. 8в). Напротив, количество Tcut-клеток (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) увеличилось на 28-й д.п.и. в обеих группах (двухфакторный дисперсионный анализ: эффект дня после инъекции  $F(3, 45) = 6.433$ ,  $p = 0.001$ ; ВКУ:  $q = 0.005$  и  $0.016$  соответственно), что указывает на повышенный ответ этой популяции в стадию выздоровления ЭАЭ (рис. 8г).

Количество CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток (Treg) увеличивалось в группе ЕАЕ + Veh на 7-й д.п.и. (двухфакторный дисперсионный анализ: эффект от д.п.и.  $F(3, 45) = 5.830$ ,  $p = 0.002$ ; ВКУ:  $q = 0.001$ ) и 28-й д.п.и. (ВКУ:  $q = 0.002$ ), тогда как в группе ЕАЕ + Ef такого увеличения не наблюдалось (рис. 8д). У крыс, получавших пробиотик, на 7-й д.п.и. увеличивалась численность другой популяции Treg клеток – CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> (двухфакторный дисперсионный анализ: эффект введений *E. faecium*  $F(1, 47) = 8.326$ ,  $p = 0.006$ ; ВКУ:  $q = 0.012$ ) (рис. 8е).

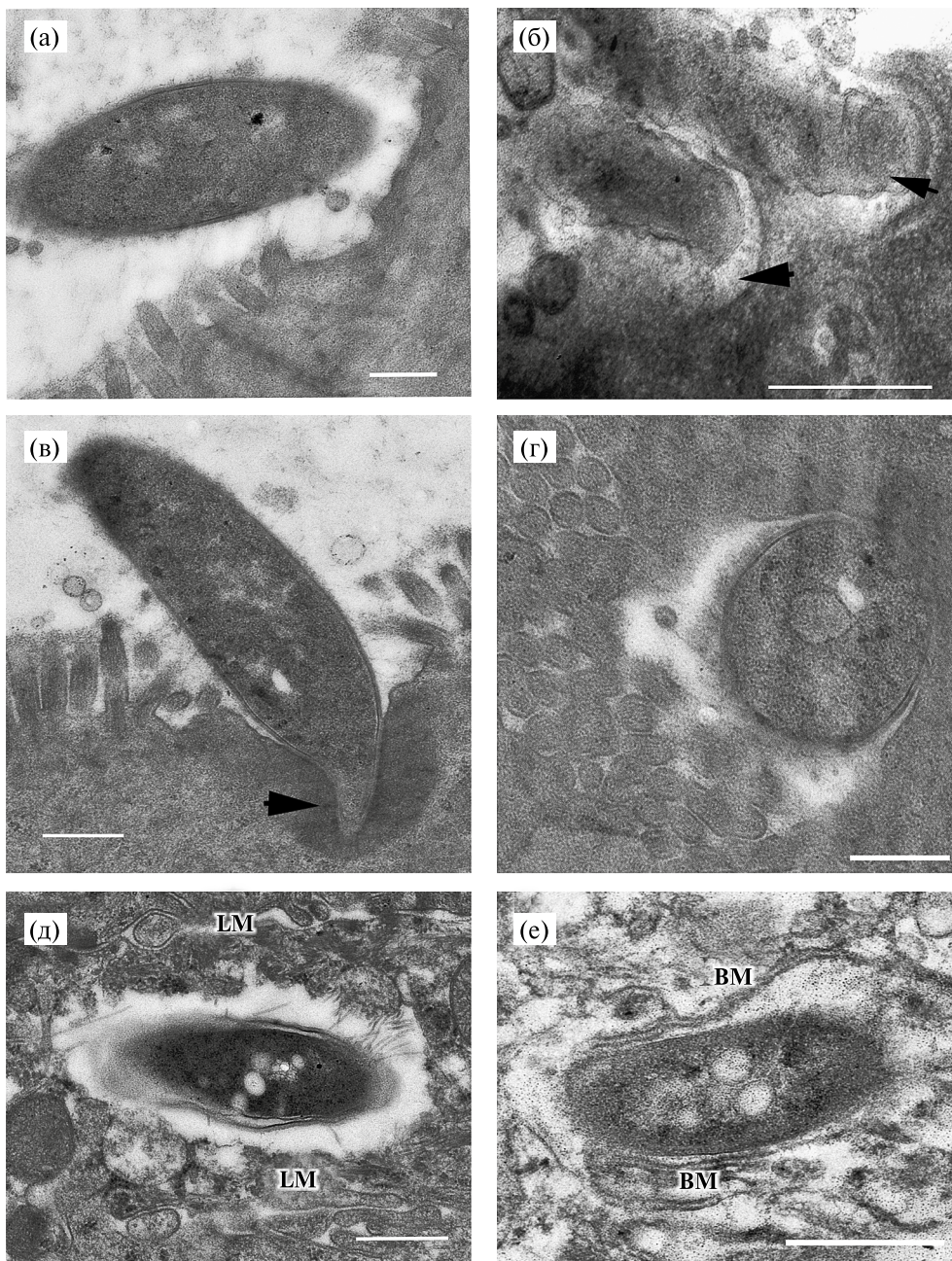
Среди идентифицированных популяций отмечались TNK-клетки (CD3<sup>+</sup>CD161a<sup>+</sup>), доля которых увеличивалась в группе ЕАЕ + Ef на 28-й д.п.и. (двухфакторный дисперсионный анализ: эффект д.п.и.  $F(3, 46) = 3.061$ ,  $p = 0.037$ ; ВКУ:  $q = 0.023$ ), в группе ЕАЕ + Veh существенных вариаций численности этой популяции иммунных клеток не наблюдалось (рис. 8ж).

Из клеток врожденного иммунитета определялись клетки натуральные киллеры (NK) с поверхностными маркерами CD3<sup>-</sup>CD161a<sup>+</sup>, однако существенных различий количества не отмечалось ни в динамике развития ЭАЭ, ни между группами (рис. 8з).

**Рис. 7.** Электронограммы, демонстрирующие проникновение бактерий из просвета кишки до базальной мембраны эпителиоцитов: (а) – бактерия в просвете кишки рядом с эпителиоцитом; (б) – взаимодействие бактерий с апикальной мембраной эпителиоцита, стрелка указывает на нитчатые структуры, появляющиеся в месте взаимодействия; (в) – начало проникновения бактерии в эпителиоцит, стрелка указывает на актин эпителиоцита, конденсированный в месте проникновения бактерии; (г) – бактерия в апикальной части эпителиоцита; (д) – бактерия в цитоплазме эпителиоцита; (е) – бактерия в базальной части эпителиоцита рядом с базолатеральной мембраной. LM – латеральная мембрана эпителиоцита, BM – базальная мембрана. Масштабный отрезок 0.5 мкм

**Fig. 7.** Transmission electron micrographs demonstrating the penetration of bacteria from the intestinal lumen to the basement membrane of epithelial cells. (a) – bacteria in the intestinal lumen near an epithelial cell; (б) – interaction of bacteria with the apical membrane of the epithelial cell, arrow points to the filamentous structures appearing at the site of interaction; (в) – the beginning of bacteria penetration into the epithelial cell, arrow points to epithelial cell actin condensed at the site of bacterial penetration; (г) – bacteria in the apical part of the epithelial cell; (д) – bacteria in the cytoplasm of the epithelial cell; (е) – bacteria in the basal part of the epithelial cell near the basolateral membrane. LM – lateral membrane of the epithelial cell, BM – basement membrane. Scale bar = 0.5 μm

Таким образом, показана разная динамика изменений субпопуляционного состава Т-клеток, а также численности В-клеток в течение ЭАЭ и при развитии ЭАЭ на фоне применения *E. faecium* L-3.



*Анализ циркулирующих в крови цитокинов методом иммуноферментного анализа*

Уровень цитокинов в крови оценивали на 0-, 7-, 14- и 28-й д.п.и. (рис. 9). Различия в популяционном составе иммунных клеток сопровождались специфическими для каждой группы изменениями в цитокиновом профиле в процессе развития ЭАЭ.

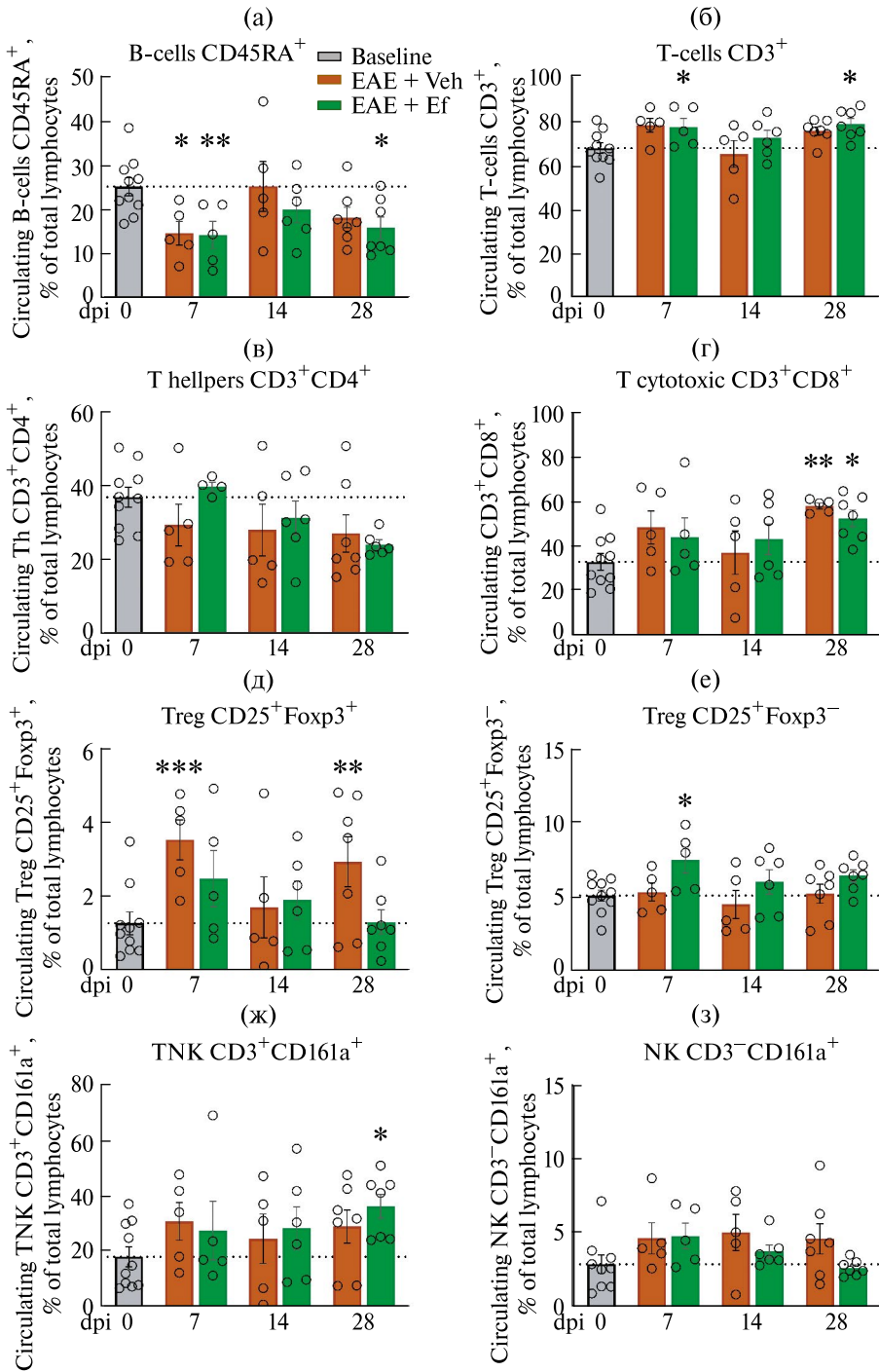
Уровень провоспалительного цитокина – интерлейкина (IL)-1 оставался стабильным на протяжении всего эксперимента, без существенных изменений относительно исходного уровня в обеих группах (рис. 9а). При этом развитие ЭАЭ сопровождалось постепенным повышением уровня моноцитарного хемотаксического фактора-1 (MCP-1) – ключевого фактора, регулирующего миграцию моноцитов/макрофагов и инфильтрацию ими ЦНС.

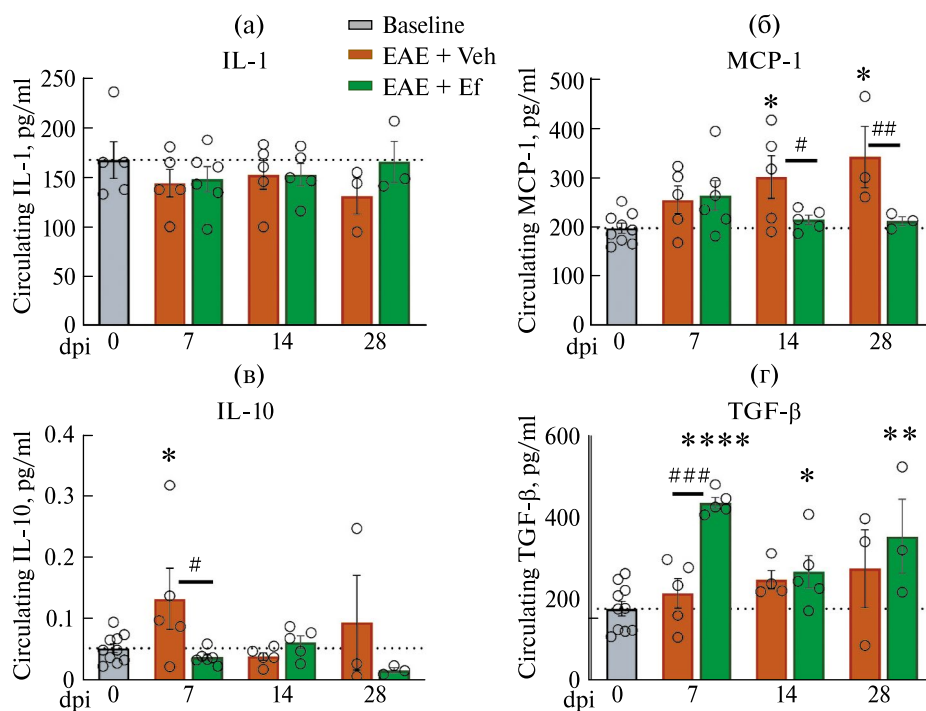
В группе ЕАЭ + Veh уровень MCP-1 достигал максимума на 14- и 28-й д.п.и., в то время как в группе ЕАЭ + Ef поддерживался на уровне, аналогичном исходному, во все временные точки (двухфакторный дисперсионный анализ: эффект д.п.и.  $F(3, 37) = 4.823, p = 0.006$ , эффект пробиотика  $F(1, 37) = 8.045, p = 0.007$ , эффект взаимодействия  $F(3, 37) = 3.168, p = 0.03$ ; ВКУ:  $q = 0.005$  и  $0.002$  соответственно) (рис. 9б). На 14- и 28-й д.п.и. межгрупповые различия также оказались существенными (ВКУ:  $q = 0.022$  и  $0.009$  соответственно).

Течение ЭАЭ в группах ЕАЭ + Veh и ЕАЭ + Ef сопровождалось изменением уровня разных циркулирующих противовоспалительных цитокинов (рис. 9). В группе ЕАЭ + Veh наблюдался выраженный подъем уровня IL-10 на 7-й д.п.и., который вернулся к исходному уровню на 14- и 28-й д.п.и., в группе ЕАЭ + Ef существенных изменений уровня этого цитокина не отмечалось (двухфакторный дисперсионный анализ: эффект пробиотика  $F(1, 39) = 5.4, p = 0.025$ , эффект взаимодействия

**Рис. 8.** Эффекты курсового введения *Enterococcus faecium* L-3 на циркулирующие популяции В-клеток и Т-клеток в модели ЭАЭ. (а) – В-клетки (CD45RA<sup>+</sup>): снизились в группах ЕАЭ + Veh и ЕАЭ + Ef на 7-й день по сравнению с исходным уровнем, оставаясь сниженными в группе ЕАЭ + Ef на 28-й день после индукции. (б) – Т-клетки (CD3<sup>+</sup>): статистически значимое увеличение наблюдалось только в группе ЕАЭ + Ef на 7-й и 28-й день после индукции. (в) – Т-хелперные клетки (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>): без существенных различий. (г) – Т-цитотоксические клетки (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>): увеличились в обеих группах на 28-й день после инъекции. (д) – регуляторные Т-клетки (Treg CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>): увеличились только в группе ЕАЭ + Veh на 7-й и 28-й день после инъекции. (е) – регуляторные Т-клетки (Treg CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>): увеличились в группе ЕАЭ + Ef на 7-й день после инъекции. (ж) – TNK-клетки (CD3<sup>+</sup>CD161a<sup>+</sup>): увеличились в группе ЕАЭ+Ef на 28-й день после инъекции. (з) – NK-клетки (CD3<sup>-</sup>CD161a<sup>+</sup>): существенных различий нет. dpi – день после индукции ЕАЭ. Среднее  $\pm$  SEM, двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорная процедура ВКУ.  $n = 5-10$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  по сравнению с исходным уровнем

**Fig. 8.** Effects of *Enterococcus faecium* L-3 chronic administration on circulating B cell and T cell populations in the EAE model. (a) – B cells (CD45RA<sup>+</sup>): decreased in both the EAE + Veh and EAE + Ef groups at day 7 compared to baseline, remaining decreased in the EAE + Ef group at day 28 of renal failure. (b) – T cells (CD3<sup>+</sup>): statistically significant increases were observed only in the EAE + Ef group at days 7 and 28 of renal failure. (v) – T helper cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>): no significant differences. (r) – T cytotoxic cells (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>): increased in both groups at day 28 post-injection. (d) – Regulatory T cells (Treg CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>): increased only in the EAE + Veh group at days 7 and 28 after injection. (e) – Regulatory T cells (Treg CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>): increased in the EAE + Ef group at day 7 after injection. (zh) – TNK cells (CD3<sup>+</sup>CD161a<sup>+</sup>): increased in the EAE + Ef group at day 28 after injection. (z) – NK cells (CD3<sup>-</sup>CD161a<sup>+</sup>): no significant difference. dpi, day after EAE induction. Mean  $\pm$  SEM, two-way ANOVA, BKU post hoc procedure.  $n = 5-10$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to baseline





**Рис. 9.** Динамика уровней цитокинов в крови на 7-, 14- и 28-й дни после индукции ЭАЭ: (а) – уровни IL-1 не изменились относительно исходного уровня в обеих группах на протяжении всего эксперимента; (б) – уровень MCP-1 в группе *E. faecium* не отличался от исходного уровня (день 0) на 7-, 14- и 28-й д.п.и.; напротив, у животных, которым вводили ФР, уровень MCP-1 был повышен относительно исходного уровня на 14- и 28-й д.п.и. по сравнению с группой, получавшей *E. faecium* L-3; (в) – уровни IL-10 не изменились в крови животных, получавших *E. faecium* L-3, в то время как в группе EAE + Veh его уровень увеличился относительно исходного только на 7-й д.п.и., но не отличался от исходного уровня на 14-й и 28-й д.п.и.; (г) – уровни TGF-β не изменились относительно исходного уровня в группе EAE + Veh и увеличились у животных, получавших *E. faecium* L-3 на 7-й д.п.и. относительно исходного уровня и группы EAE + Veh, и оставались повышенными относительно исходного уровня на 14- и 28-й д.п.и. без различий с группой EAE + Veh в эти временные точки. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорный тест ВКУ.  $n = 3-10$ . Среднее значение  $\pm SEM$ . \* – различия относительно исходного уровня; # – различия между группами.  $*q < 0.05$ ;  $**q < 0.01$ ;  $###q < 0.001$ ;  $****q < 0.0001$

**Fig. 9.** The dynamics of cytokine levels in the blood at Days 7, 14, and 28 after EAE induction. (a) – IL-1 levels did not change relative to Baseline in both groups throughout the experiment. (б) – Level of MCP-1 in *E. faecium* group did not differ from the Baseline (Day -1) on dpi 7, 14, and 28. In contrast, vehicle-treated animals had increased MCP-1 levels relative to the Baseline on dpi 14 and 28 compared to the *E. faecium* group. (в) – IL-10 levels did not change in the blood of animals receiving *E. faecium* L-3, while in the Vehicle group, its level increased relative to Baseline only on dpi 7 but did not differ from Baseline on dpi 14 and 28. (г) – TGF-β levels did not change relative to Baseline in the Vehicle group and increased in animals receiving *E. faecium* L-3 at dpi 7 relative to Baseline and the Vehicle group and remained elevated relative to Baseline at dpi 14 and 28 without differences from the Vehicle group at these time points. Two-way ANOVA and post-hoc BKU procedure.  $n = 3-10$ . Mean  $\pm SEM$ . \* – difference vs. Baseline; # – difference between EAE + Veh vs. EAE + Ef.  $*q < 0.05$ ;  $**q < 0.01$ ;  $###q < 0.001$ ;  $****q < 0.0001$

$F(3, 39) = 3.428, p = 0.026$ ; ВКУ: против исходного уровня  $q = 0.03$  и против ЕАЕ + Еф на 7-й д.п.и.  $q = 0.011$ ). В группе ЕАЕ + Veh на 28-й д.п.и. наблюдался второй подъем уровня IL-10, однако он не достигал уровня статистической значимости из-за большой вариативности межиндивидуальных значений.

В группе ЕАЕ + Еф выявлено значимое увеличение другого противовоспалительного цитокина – TGF- $\beta$  на 7-й д.п.и. (двухфакторный дисперсионный анализ: эффект от д.п.и.  $F(3, 37) = 10.1, p < 0.0001$ , эффект пробиотика  $F(1, 37) = 9.664, p = 0.004$ , эффект взаимодействия  $F(3, 37) = 4.713, p = 0.007$ ; ВКУ: по сравнению с исходным уровнем  $q < 0.0001$  и по сравнению с группой ЕАЕ + Veh на 7-й д.п.и.,  $q = 0.0002$ ). Уровень TGF- $\beta$  в группе ЕАЕ + Еф оставался повышенным также на 14- и 28-й д.п.и. по сравнению с исходным уровнем (ВКУ:  $q = 0.062$  и  $0.003$  соответственно), хотя он существенно не отличался от уровня в группе ЕАЕ + Veh в эту временную точку.

Таким образом, иммунорегуляция в обеих группах в течение ЭАЭ опосредуется разными регуляторными путями: у крыс без лечения – преимущественно IL-10, тогда как у крыс, получавших *E. faecium* L-3, – TGF- $\beta$ .

#### *Анализ уровня экспрессии мРНК IL-10 в мезентериальных лимфатических узлах и спинном мозге крыс*

Значимых изменений экспрессии мРНК IL-10 в мезентериальных лимфатических узлах у крыс группы ЕАЕ + Veh не наблюдалось, однако у крыс, получавших *E. faecium* L-3, на 7 д.п.и. уровень экспрессии мРНК IL-10 был значимо выше, чем в других временных точках и по сравнению с группой ЕАЕ + Veh (рис. 10а).

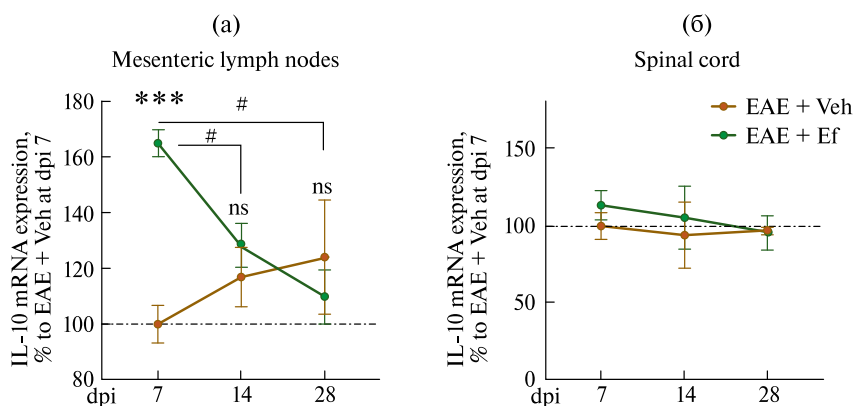
В спинном мозге не обнаружено значимых изменений экспрессии мРНК IL-10 ни в процессе развития ЭАЭ, ни между группами (рис. 10б).

В целом полученные данные подтверждают ранее выявленное протективное действие 15-дневного курсового введения *E. faecium* L-3 на модели ЭАЭ и свидетельствуют о том, что курсовое введение пробиотического штамма *E. faecium* L-3 способно модулировать течение ЭАЭ у крыс, ослабляя выраженность неврологических симптомов и сокращая длительность клинической фазы за счет иммуномодулирующего действия, способности уменьшать повреждение энтероцитов, а также влияния на состав кишечного микробиома.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании на модели ЭАЭ была подтверждена выявленная ранее [56] способность пробиотического штамма *E. faecium* L-3 при курсовом внутрижелудочном введении снижать тяжесть и длительность заболевания, а также уменьшать число заболевших животных. Ранее мы также замечали, что более высокий уровень эндогенных *Enterococcus* перед индукцией ЭАЭ способствовал резистентности животных к развитию заболевания.

В литературе также описан позитивный эффект использования других моноштаммовых пробиотиков, в том числе *Lactobacillus helveticus* SBT2171, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Pediococcus acidilactici* [30, 54, 66], и мультиштаммовых пробиотиков [52]. Преимуществом используемого нами штамма, как показано ранее, является то, что протективное действие *E. faecium* L-3 сопоставимо с действием копаксона (Тева, Израиль) – препарата, более двадцати пяти лет использующегося для лечения РС.



**Рис. 10.** Уровни мРНК IL-10 в брыжеечных лимфатических узлах и спинном мозге. (а) – уровень мРНК IL-10 был повышен на 7-й день после инъекции в брыжеечных лимфатических узлах крыс, получавших *E. faecium* L-3, по сравнению с животными группы EAE + Veh. (б) – в спинном мозге статистически значимых различий не наблюдалось. Среднее значение  $\pm$  SEM, двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорная процедура ВКУ.  $n = 5$  на группу; \*\*\* $p < 0.001$ ; # $p < 0.05$

**Fig. 10.** IL-10 mRNA levels in mesenteric lymph nodes and spinal cord. (a) – IL-10 mRNA was increased at dpi 7 in mesenteric lymph nodes of *E. faecium* L-3 treated rats compared to Vehicle treated animals. (б) – No statistically significant differences were observed in the spinal cord. Mean  $\pm$  SEM, two-way ANOVA, post-hoc BKU procedure.  $n = 5$  per group; \*\*\* $p < 0.001$ ; # $p < 0.05$

Было также показано, что защитный эффект *E. faecium* L-3 и копаксона опосредованы различными иммунорегуляторными путями [65], а также установлен дозозависимый эффект *E. faecium* L-3 [57]. Иной механизм иммунорегуляции, осуществляемый *E. faecium* L-3, был выявлен и по сравнению с естественным путем развития и разрешения индуцированного заболевания. Следует подчеркнуть, что используемая нами модель индуцированного ЭАЭ характеризуется спонтанным полным или частичным выздоровлением животных, то есть воспроизводит эпизод обострения (пик ЭАЭ) и ремиссии РС (фаза выздоровления) [67], при этом у крыс, получавших пробиотик, выздоровление наступает быстрее, а восстановление функций – более полное (рис. 2а). Хотя в целом *E. faecium* L-3 ослабляет тяжесть ЭАЭ, предотвратить развитие заболевания полностью он способен лишь у отдельных животных.

В этом исследовании мы уточняем механизмы, опосредующие протективное действие *E. faecium* L-3, и демонстрируем его эффекты на нескольких уровнях, в соответствии с современной концепцией патогенеза РС [68]. Мы показываем, что более легкое течение ЭАЭ после введения *E. faecium* L-3 связано с его локальным действием в ЖКТ на кишечный микробиом по поддержанию численности филума *Bacteroidota*, представители которого, как известно, способствуют дифференцировке индуцибельных периферических Трег-клеток, продуцирующих IL-10 [40]. Выявленная повышенная экспрессия мРНК противовоспалительного цитокина IL-10 в мезентериальных лимфатических узлах на ранних этапах ЭАЭ (рис. 10а) может отражать это событие. По мере возрастания в составе кишечного микробиома доли микроорганизмов с провоспалительным потенциалом, экспрессия

мРНК IL-10 уменьшается, в кишечнике развивается воспаление и повреждаются энтероциты, хотя и менее интенсивно (рис. 6).

Нарушение кишечного барьера приводит к транслокации бактерий (рис. 7), которая способствует распространению воспалительного процесса на системный уровень, что видно по изменению циркулирующих в крови иммунных клеток и продуцируемых ими цитокинов (рис. 8 и 9) с развитием клинических симптомов. Поскольку *E. faecium* L-3 обеспечивает лучшую сохранность кишечного эпителия, в системный кровоток попадает меньше бактерий, их компонентов, токсинов и других провоспалительных факторов, следовательно, ослабляется интенсивность системного воспаления.

На системном уровне протективное действие *E. faecium* L-3 может опосредоваться циркулирующей в крови популяцией регуляторных Th3-клеток, продуцирующих противовоспалительный цитокин TGF- $\beta$ , ограничивая инфильтрацию ЦНС Т-клетками и макрофагами, влияя на развитие нейровоспаления и повреждение нейронов, как показано ранее [57]. Также ранее показано, что степень инфильтрации ткани ЦНС иммунными клетками в данной модели коррелирует с тяжестью заболевания [69].

#### *Модуляция состава микробиома кишечника введением Enterococcus faecium L-3*

Способность *E. faecium* L-3 модулировать состав кишечной микробиоты показана ранее на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза кишечника [58, 59]. Поскольку у больных РС в 70–90% случаев отмечается дисбиоз ЖКТ [12, 18, 19], мы проверили эту способность на модели ЭАЭ. Оказалось, что *E. faecium* L-3 не только модулирует состав кишечной микробиоты, но также влияет на течение ЭАЭ у животных, ослабляя выраженность клинических симптомов.

Снижение тяжести ЭАЭ у крыс на фоне введения *E. faecium* L-3 сопровождалось паттерном изменений кишечной микробиоты, отличным от группы, не получавшей пробиотик, как на пике заболевания, так и в фазу ремиссии. Это свидетельствует о том, что разные бактериальные сообщества могут вовлекаться в развитие заболевания, способствовать выздоровлению, а также влиять на тяжесть клинических симптомов. Это согласуется с результатами других исследований, как на животных с разным типом течения ЭАЭ, так и на людях с разной тяжестью и типом течения РС, выявившими различия в составе кишечного микробиома [45, 70, 71].

Применение *E. faecium* L-3 препятствовало значимым изменениям филумов, которые происходили на пике ЭАЭ у животных контрольной группы. Отсутствие уменьшения на пике ЭАЭ численности f *Prevotellaceae* у крыс, получавших *E. faecium* L-3, может быть полезным, поскольку при РС также отмечается снижение представленности *Prevotella 1*, *Prevotella 2*, 7 и 9, относящихся к семейству *Prevotellaceae* [20, 22, 72, 73], причем при обострении РС обнаруживается еще более низкий уровень этих микроорганизмов, чем на стадии ремиссии [24]. Собственно, такую картину мы наблюдаем в группе ЕАЭ + Veh.

Уменьшение *Prevotella*, особенно на фоне возрастания количества *Streptococcus*, как было показано, связано с возрастанием доли клеток Th17 в кишечнике, играющих ключевую патогенетическую роль при РС и ЭАЭ [24]. В связи с этим стратегия лечения, направленная на увеличение численности этого таксона, может быть полезной для определенной категории пациентов с РС. Так, увеличение доли *Prevotella* наблюдалось у пациентов в ходе лечения препаратами, изменяющими течение

РС—интерфероном- $\beta$  или глатирамера ацетатом, по сравнению с пациентами, не получавшими терапию [22]. Как показывает данное исследование, аналогичным эффектом обладает *E. faecium* L-3. Протективная роль *Prevotella* подтверждается в исследовании по введению животным *Prevotella histicola*, ослаблявшей выраженность симптомов ЭАЭ [74].

Семейство *Muribacullaceae* в большей степени характерно для мышей и крыс. У людей *Muribacullaceae* в большем количестве встречается в меконии новорожденных, чем в более позднем периоде [75]. Нам не удалось найти сведений о роли этих бактерий при РС, но они считаются основными утилизаторами моносахаридов, образующихся из слизи в кишечнике [76], являются продуцентами янтарной, уксусной и пропионовой кислот, и снижение их количества связано с возникновением воспалительных заболеваний кишечника [77].

Менее распространенное у крыс, но наиболее представленное в I энтеротипе у людей семейство *Bacteroidaceae* [78] по-разному изменялось в обеих группах: уменьшалось в группе EAE + Veh и увеличивалось в группе EAE + Ef. Gandy с соавт. в своем исследовании показали, что мыши с ремиттирующим типом ЭАЭ имеют более высокие уровни *Bacteroides*, чем мыши с прогрессирующим ЭАЭ [45], поэтому, видимо, неслучайно на фоне более высокого уровня *Bacteroidaceae* у крыс, получавших *E. faecium* L-3, течение ЭАЭ протекало в более легкой форме. Полезность этих бактерий при ЭАЭ подтверждена в ряде экспериментов с введением *Bacteroides fragilis* или его полисахарида А [40, 79]. Необходимость оптимального уровня *Bacteroides* для поддержания кишечного гомеостаза подтверждается данными, что у пациентов с РС в ряде исследований происходит повышение представленности этих микроорганизмов, тогда как в других работах отмечается, напротив, их уменьшение [80, 81].

На пике ЭАЭ у крыс контрольной группы отмечалось снижение представленности семейства *Rikenellaceae* (*Bacteroidota*), а в группе, получавшей *E. faecium* L-3, такого колебания не наблюдалось. В исследовании He с соавт. [82] показана противоположная картина в отношении этого семейства — именно в контрольной группе уровень этих бактерий был повышен, тогда как в группе, получавшей пробиотик (использованы *Lactobacillus reuteri*), уровень этих бактерий был снижен. Вероятно, существуют штаммовые или видовые особенности влияния пробиотиков на представительство семейства *Rikenellaceae*.

Можно предположить, что возрастание доли семейства *Rikenellaceae* на пике ЭАЭ происходит за счет *Rikenellaceae* (*RC9 gut group*) и играет негативную роль на фоне приема пробиотика, хотя представленность этого семейства составляет всего 1% по сравнению с другими представителями филума *Bacteroidota* (~20%). Сведений о связи данного семейства с РС мы не обнаружили, но эти бактерии обладают патогенным потенциалом и способствуют развитию воспалительных и аутоиммунных заболеваний и, следовательно, могли влиять на развитие ЭАЭ у крыс, получавших пробиотик.

Снижение в фазу выздоровления *f\_Lachnospiraceae* в группе EAE + Veh, вероятно, может быть связано с хронизацией патологических процессов, поскольку крысы данной группы полностью не выздоравливают. Это согласуется с уменьшенной представленностью *Lachnospiraceae* у пациентов с РС, что отмечают многие авторы [73, 83]. В частности, обилие рода *Coprococcus* из этого семейства истощено у пациентов с РС, а его уровни отрицательно коррелируют с относительным количеством CD4+/IL-17+Th17-клеток [26, 80].

Вероятно, развитие клинических симптомов в группе, получавшей пробиотик, связано также с уменьшением *Lactobacillaceae*. Уменьшение этого семейства в клиническую фазу отмечалось в работах Gandy с соавт. и Johanson с соавт. [45, 84], исследовавших динамику изменений состава микробиома у мышей в процессе развития ЭАЭ. Аналогичную с выявленной нами динамику *Lactobacillaceae* с уменьшением на 14-й день отмечали Sell с соавт. [85], однако мы не наблюдали возрастания численности этого семейства на 30-й д.п.и. – сопоставимый период с 26-м д.п.и., когда отмечалось увеличение *Lactobacillaceae* в исследовании данных авторов [85]. Увеличение *Lactobacillaceae* отмечалось у мышей после введения 17β-эстрадиола на фоне более легкого течения ЭАЭ [86]. Тем не менее при РС в разных когортах описаны разнонаправленные изменения этого бактериального таксона, *Lactobacillaceae* увеличивались в одних исследованиях [70, 87, 88], но уменьшались в других [73, 89]. Следует учитывать, что у представителей *Lactobacillus* обнаружены пептиды миметики ТCR-связывающего остатка фрагмента пептида MOG40–48 (Pro2, Pro5, Pro7 и Pro8) [90], и, хотя колонизация кишечника одними *Lactobacillus* не влияла на тяжесть ЭАЭ, совместная колонизация с *Allobaculum stercoricanis* (*Erysipelotrichaceae*) усугубляла течение заболевания [90].

Считается, что семейство *Erysipelotrichaceae* (*Bacillota*) связано со многими иммунными и воспалительными заболеваниями [91, 92], поскольку индуцирует продукцию воспалительных цитокинов, таких как TNFα, и их уровень коррелирует с уровнем цитокина [93]. Однако у пациентов с ремиттирующим и вторично прогрессирующим типом РС семейство *Erysipelotrichaceae* менее представлено по сравнению с контрольной группой [73, 94]. Эти бактерии участвуют в метаболизме желчных кислот, которые вовлекаются в регуляцию кишечного барьера, поэтому увеличение *Erysipelotrichaceae* на 30-й д.п.и. в контрольной группе, возможно, связано с выздоровлением животных.

Возрастание представленности *Bifidobacteriaceae* в кишечном микробиоме в стадию выздоровления также можно было бы рассматривать как позитивное событие, однако у крыс контрольной группы в эту фазу ЭАЭ отмечался более высокий КИ (рис. 2), то есть у этих крыс выздоровление было менее полным, чем у крыс, получавших пробиотик. Это согласуется с ранее полученными данными [67], что более высокий уровень бифидобактерий в фазу реконвалесценции препятствует выздоровлению. Кроме того, более высокие уровни *Bifidobacterium* spp. наблюдались именно у пациентов с тяжелым течением РС или при обострении [95].

Возрастание численности сульфатредуцирующих *Desulfovibrionaceae* отмечалось у взрослых [81] и у детей с РС, причем у детей значительное повышение относительной численности *Desulfovibrionaceae* происходило на фоне истощения *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* [87]. Эти бактерии также связаны с воспалительными заболеваниями кишечника [96].

Kishikawa с соавт. придерживаются точки зрения, что вклад в патогенез РС вносит не один какой-то таксон, а множество таксонов с умеренными провоспалительными, токсическими и прочими эффектами [97]. Наши данные согласуются с этим мнением и показывают необходимость учитывать соотношение различных бактериальных таксонов, а также локальную субстратную среду. Следует отметить, что изменение численности каких-либо таксонов может выступать в качестве маркера, но говорить о роли этих изменений в патогенезе РС необходимо с осторожностью – увеличение численности какого-либо таксона не всегда может свидетельствовать о его патологической роли, а может играть защитную или компенсаторную роль.

Miyachi с соавт. подчеркивают необходимость рассмотрения синергетического воздействия кишечных микроорганизмов при аутоиммунных заболеваниях [90]. Кроме того, для выяснения роли каких-либо изменений таксономического состава кишечного микробиома необходимо определить его функциональные свойства. Так как известно, что и кишечная микробиота и пробиотические штаммы бактерий вовлекаются в регуляцию барьерной функции, была оценена ультраструктура кишечника крыс в ходе ЭАЭ.

#### *Влияние на ультраструктуру энтероцитов тонкой кишки*

Выявленные нарушения ультраструктуры кишечника у крыс с ЭАЭ согласуются с известным фактом нарушения целостности кишечного барьера у пациентов с РС и у животных с ЭАЭ [29, 98], что способствует показанной впервые в данном исследовании транслокации бактерий в модели ЭАЭ. Отмечалась закономерность: более выраженные повреждения кишечника встречались у крыс с более тяжелым течением ЭАЭ.

Наличие элементов микробиоты в просвете кишки у интактных крыс (рис. 6б) и у животных группы, не получавшей пробиотик (рис. 6д), свидетельствует, что это – индигенные бактерии, среди которых могут присутствовать и энтерококки. Но у крыс, получавших *E. faecium* L-3, в просвете кишки наряду с индигенными могут встречаться и пробиотические микроорганизмы.

Присутствие бактерий среди микроворсинок демонстрирует их способность преодолевать слой слизи и взаимодействовать с энтероцитами, как это показано на рис. 6 и 7. Хотя мы не идентифицировали эти микроорганизмы, вероятно, это патогенные виды, так как показано, что именно патогенные бактерии способны разрушать микроворсинки. Это позволяет патогенным бактериям контактировать с поверхностью энтероцитов, проникать в клетки кишечного эпителия [99–106] и перемещаться до собственной пластинки (рис. 7д). О том, что бактерии проникают в энтероциты, свидетельствует вакуолизация цитоплазмы и наличие лизосом (рис. 6д), поскольку вакуолизация цитоплазмы обычно наблюдается при инфицировании клеток бактериями, а появление лизосом в цитоплазме энтероцитов происходит при фагоцитозе бактерий [99, 100, 107]. Однако вопрос о том, каким путем бактерии проникают в энтероциты, остается открытым. Хотя некоторые авторы утверждают, что бактерии могут проникать через латеральную мембрану [108, 109], мы не наблюдали нарушенных межклеточных контактов ни в одном случае. Данные, представленные на рис. 7, свидетельствуют скорее о трансцеллюлярном пути проникновения бактерий в эпителиоциты. Вероятно, сначала муцин-деградирующие бактерии (*Ruminococcus* spp., *Akkermansia muciniphila*), увеличение численности которых неоднократно показано при РС и ЭАЭ [21, 70, 80, 81, 94, 110], уменьшают слой слизи (нередко проникновение в эпителиальный пласт происходит именно через бокаловидные клетки), что облегчает его преодоление другими бактериями. Далее единичные бактерии “раздвигают” микроворсинки, проходят между ними к поверхности эпителиоцитов и выделяют токсичные вещества, разрушающие микроворсинки. Это открывает путь для массовой транслокации бактерий в местах разрушения микроворсинок. Проникновение внутрь клетки происходит путем эндоцитоза, и далее бактерии транспортируются через цитоплазму в вакуолях до собственной пластинки (рис. 7). Такой путь проникновения и транслокации в культуре клеток эпителия человека показан, например, для *Escherichia coli*, продуцирующих

шига-токсин [111]. Важно еще, что транслоцирующиеся бактерии — живые, о чем свидетельствует их сохранный структура.

Известно, что пробиотические бактерии препятствуют проникновению в клетки кишечного эпителия патогенных микроорганизмов, тем самым предохраняя его от повреждения [112–114]. Введение пробиотических энтерококков может частично заменять элиминированные чувствительные к воспалительной среде индигенные бактерии, участвующие в обеспечении барьерной функции кишечника, предотвращая контакт патогенных бактерий с кишечным эпителием и его разрушение, хотя протекция, оказываемая в кишечнике, неполная. Мы наблюдали у крыс, получавших пробиотик, поврежденные участки эпителия на пике заболевания, хотя и менее обширные, чем у крыс из группы EAE + Veh. Протективный эффект *E. faecium* L-3 отмечался и в стадию выздоровления — у крыс наблюдалось лучшее восстановление микроворсинок. Вероятно, наблюдаемые в стадию выздоровления вакуоли и лизосомы в этой группе отражают транслокацию пробиотических бактерий, которые будут оказывать отсроченное иммуномодулирующее действие пробиотика.

#### Иммуномодуляция

РС и ЭАЭ считаются заболеваниями, опосредованными Т-клетками [115, 116], поскольку адоптивного переноса Т-клеток, активированных антигенами ЦНС, достаточно для индукции ЭАЭ [117, 118]. Активация ЦНС-реактивных Т-клеток инициирует локальную активацию микроглии и привлечение моноцитов из крови [1, 119]. Эти клетки секретируют провоспалительные цитокины и участвуют в демиелинизации [120]. Ранее на модели ЭАЭ показан ряд эффектов, связанных со сдвигом субпопуляций Т-лимфоцитов в сторону CD3+CD4+ или CD3+CD8+, в зависимости от стадии заболевания [121–123]. Перераспределение соотношения этих типов клеток в разные фазы ЭАЭ наблюдалось и в данном исследовании.

В латентную фазу ЭАЭ у животных без лечения, с одной стороны, в периферической крови имеет место увеличение числа CD3+CD8+-Т-клеток, среди которых могут быть цитотоксические Т-клетки, обладающие повреждающим действием при ЭАЭ. С другой стороны, в это время в циркуляции увеличивается число регуляторных CD4+CD25+FoxP3+-Т-клеток с одновременным повышением уровня IL-10, что может, напротив, иметь защитный эффект [124, 125]. Интересно, что у контрольных крыс отмечается большая вариабельность уровня IL-10 в крови на 7-й д.п.и. и 28-й д.п.и. Это отражает обнаруженную ранее связь уровня IL-10 с тяжестью заболевания, когда у животных с меньшей тяжестью заболевания наблюдался более высокий уровень IL-10, и наоборот [126].

Примечательно, что энтерококки запускают иную динамику перераспределения популяций иммунных клеток в крови и иные регуляторные пути, чем в ходе естественного развития ЭАЭ: более позднее (на 28-й д.п.и.) увеличение доли CD3+CD8+-Т-клеток и TNK-клеток, а также стимулируют увеличение Т-клеток CD4+CD25+FoxP3- (на 7-й и 28-й д.п.и.), а не CD4+CD25+FoxP3+-Т-клеток. Оба пика увеличения Т-клеток CD4+CD25+FoxP3- сопровождалось повышением уровня TGF-β у крыс, получавших энтерококки, а оба пика CD4+CD25+FoxP3+-Т-клеток — возрастанием уровня IL-10 в крови животных из группы EAE + Veh. Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы установить, связаны ли эти

различия в популяциях иммунных клеток и регуляторных путях в ответ на энтерококки с отсроченным началом клинических симптомов в группе *E. faecium* L-3.

T-клетки CD4+CD25+FoxP3– возникают, когда T-клетки CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) теряют экспрессию FoxP3. В частности, эта субпопуляция индуцируется из наивных CD4+-T-клеток после приема чужеродного антигена пероральным путем, тем самым вызывая оральную толерантность [127]. Эти клетки теперь идентифицируются как индуцибельные T-хелперы типа 3 на основе их FoxP3-фенотипа [128] и продукции TGF-β [129]. Доля клеток с таким фенотипом в нашем исследовании увеличивалась у крыс, получавших *E. faecium* L-3, в те же сроки, что и возрастание уровня TGF-β. Эти клетки важны для продукции IgA в слизистой оболочке кишечника, который покрывает кишечные бактерии [130].

Сигнализация TGF-β в CD8+-T-клетках важна для содействия апоптозу в короткоживущих эффекторных клетках [131]. TGF-β также индуцирует в эпителиальном слое кишечника специализированную подгруппу T-клеток, играющих важную роль в поддержании иммунных реакций слизистой оболочки [132].

Кроме того, TGF-β может вырабатываться регуляторными CD8+-T-клетками [133]. В последние годы в литературе все чаще обсуждается не только цитотоксическая, но и регуляторная функция части популяции CD3+CD8+-T-клеток. Например, предполагается роль популяции CD8+CD28+-T-клеток в подавлении активности CD4+-T-клеток при опухолевых процессах [134], CD3+CD8+FoxP3+-T-клеток при ревматоидном артрите [135]. Учитывая, что при более легком течении ЭАЭ у крыс, получавших пробиотик, на пике ЭАЭ (14-й д.п.и.) отмечалось более высокое содержание CD3+CD8+-клеток, можно предположить, что по крайней мере часть из них относится к регуляторным клеткам. Интересно, что ряд клинически одобренных препаратов, изменяющих течение РС (ПИТРС), оказывает подобный пробиотический эффект на иммунные клетки. Например, диметилфумарат уменьшает долю CD4+-T-клеток и увеличивает долю CD8+-T-клеток [136], подобно тому, что мы наблюдали при введении пробиотических энтерококков у крыс с индуцированным ЭАЭ.

TGF-β является иммуносупрессивной молекулой, подавляющей синтез ДНК, пролиферацию и рост T-клеток [137–139]. Мыши с дефицитом TGF-β страдают тяжелыми многоочаговыми воспалительными поражениями [140], в то время как блокирование передачи сигналов TGF-β в T-клетках приводит к нарушению развития и функционирования T-клеток [141].

Имеются противоречивые данные о влиянии TGF-β при ЭАЭ. С одной стороны, введение нейтрализующих к TGF-β антител усугубляет течение ЭАЭ у мышей [142], системное введение TGF-β животным с ЭАЭ снижает тяжесть заболевания у мышей, ограничивая вход сенситизированных T-клеток в мозг и ослабляя воспалительные поражения ЦНС [143–145]. С другой стороны, при нокауте гена TGF-β в T-клетках отмечалось ослабление тяжести ЭАЭ [146]. TGF-β совместно с IL-6 необходим для дифференцировки Th17-клеток, в том числе энцефалитогенных Th17-клеток, важных для индукции ЭАЭ [147, 148]. Хотя Th17-клетки, индуцированные TGF-β и IL-6, были слабо патогенными у мышей с ЭАЭ [149–151], поскольку продуцировали большое количество IL-10 [150, 152], при нейтрализации IL-10 патогенность клеток Th17 повышалась [152]. Это, вероятно, объясняется двойственной ролью TGF-β в дифференцировке клеток Th17 и Treg, которая преобразуется в тот или иной подтип в зависимости от окружающей локальной среды,

и необходимы дальнейшие исследования для выяснения факторов, запускающих и опосредующих разные функции TGF- $\beta$ .

Помимо Т-клеток, TGF- $\beta$  также подавляет пролиферацию и активацию В-клеток [153]. Видимо, уменьшение доли В-клеток в группе, получавшей *E. faecium* L-3, связано с этим свойством цитокина. Хотя мы не исследовали дендритные клетки, контроль за аутореактивными миелин-специфическими Т-клетками дендритные клетки осуществляют через TGF- $\beta$ -опосредованный сигналинг [154].

Следует отметить, что на модели ЭАЭ защитный эффект *Pediococcus acidilactici*, другого представителя порядка *Lactobacillales*, опосредовался иным типом индуцированных регуляторных клеток – Tr1 [54].

Наличие экспрессии MCP-1 показано в ЦНС людей с РС [155, 156], как и то, что экспрессия MCP-1 предшествует инфильтрации моноцитов в ЦНС и появлению клинических признаков [157]. Показана связь этого хемокина с проявлением острых симптомов заболевания и иницированием разрушения гематоэнцефалического барьера [158]. Мы не обнаружили значимого увеличения уровня циркулирующего в крови MCP-1 в конце индуктивной фазы ЭАЭ. Уровень хемокина повышался на пике ЭАЭ и оставался повышенным в фазу выздоровления у крыс группы EAE + Veh. Однако у крыс, получавших пробиотик, на всем протяжении ЭАЭ количество MCP-1 находилось на уровне исходных значений. Мы не можем судить о происхождении этого хемокина в крови, но, вероятно, его низкий уровень способствует поддержанию как кишечного, так и гематоэнцефалического барьера и ограничивает миграцию в ЦНС патогенных популяций Т-клеток. Вероятно, раннее (на 7-й д.п.и.) локальное усиление экспрессии мРНК IL-10 в мезентериальных лимфоузлах у крыс, получавших пробиотик, запускает противовоспалительные реакции, которые подавляют продукцию MCP-1 моноцитами/макрофагами, а также снижают выраженность воспаления в кишечнике, способствуя лучшей сохранности кишечного барьера. Соответственно, чем сохраннее кишечный барьер, тем меньше иммунных клеток будет инфильтрировать ЦНС.

В совокупности результаты проведенного исследования демонстрируют иммуномодулирующее действие *E. faecium* L-3, осуществляемое на нескольких уровнях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование предполагает, что пробиотик на основе *E. faecium* L-3, который обладает способностью нормализовать состав микробиоты кишечника, поддерживать кишечный барьер и модулировать иммунную систему хозяина, может служить полезным дополнением к существующим методам лечения или даже быть альтернативным путем иммуномодуляции при РС после подтверждения протективного действия в рандомизированном клиническом исследовании. Результаты также дают важное представление о потенциале пробиотиков как многообещающего терапевтического подхода в терапии других заболеваний, прежде всего аутоиммунных и нейродегенеративных. Однако необходимы дальнейшие исследования для изучения нейропротективного потенциала этого и других пробиотических штаммов, а также основных механизмов их воздействия на ось кишечник-мозг и иммунную систему.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Swanborg R.H. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995. Vol. 77. No. 1. Pp. 4–13. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(95\)90130-2](https://doi.org/10.1016/0090-1229(95)90130-2)
2. Constantinescu C.S., Farooqi N., O'Brien K., Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.* 2011. Vol. 164. No. 4. Pp. 1079–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>
3. Baker D., Amor S. Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2014. Vol. 3. No. 5. Pp. 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2014.05.002>
4. McGinley M.P., Goldschmidt C.H., Rae-Grant A.D. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis: A review. *JAMA.* 2021. Vol. 325. No. 8. Pp. 765–779. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.26858>
5. CAMMS223 Trial Investigators, Coles A.J., Compston D.A.S. et al. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2008. Vol. 359. No. 17. Pp. 1786–1801. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802670>
6. Boyko A., Melnikov M. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Russian Federation: 30 years of studies. *Brain Sci.* 2020. Vol. 10. No. 5. E305. <https://doi.org/10.3390/brainsci10050305>
7. Villagran D.C., Yeh E.A. Pediatric multiple sclerosis: Changing the trajectory of progression. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2023. Vol. 23. No. 11. Pp. 657–669. <https://doi.org/10.1007/s11910-023-01300-3>
8. Teleanu R.I., Niculescu A.-G., Vladacenco O.A. et al. The state of the art of pediatric multiple sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24. No. 9. 8251. <https://doi.org/10.3390/ijms24098251>
9. Oh J., Giacomini P.S., Yong V.W. et al. From progression to progress: The future of multiple sclerosis. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* Vol. 6. No. 16. 11795735241249693. <https://doi.org/10.1177/11795735241249693>
10. Бойко А.Н., Гусев Е.И. Современные алгоритмы диагностики и лечения рассеянного склероза, основанные на индивидуальной оценке состояния пациента. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2017. Т. 117. № 2. С. 92–106. <https://doi.org/10.17116/jnevro20171172292-106>
11. Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Никифорова И.Г. и др. Особенности состава микробиоты кишечника у пациентов с рассеянным склерозом, получающих препараты, изменяющие течение рассеянного склероза. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2018. Т. 118. № 8. Вып. 2. С. 62–69. <https://doi.org/10.17116/jnevro201811808262>
12. Tarasova E.A., Liudyno V.I., Matsulevich A.V. et al. Features of the intestinal microbiota composition in multiple sclerosis patients receiving oral disease-modifying therapy. *Med. Acad. J.* 2021. Vol. 21. No. 4. Pp. 47–56. <https://doi.org/10.17816/MAJ88595>
13. Столяров И.Д., Петров А.М., Ивашкова Е.В. и др. Исследования лекарственных средств при рассеянном склерозе: научные, клинические и этические аспекты. *Неврологический журнал.* 2018. Т. 23. № 1. С. 16–21. <https://doi.org/10.18821/1560-9545-2018-23-1-16-21>

14. Mirza A., Mao-Draayer Y. The gut microbiome and microbial translocation in multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* 2017. Vol. 183. Pp. 213–224.  
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.03.001>
15. Chia Y.W., Fowler C.J., Kamm M.A. et al. Prevalence of bowel dysfunction in patients with multiple sclerosis and bladder dysfunction. *J. Neurol.* 1995. Vol. 242. No. 2. Pp. 105–108. <https://doi.org/10.1007/BF00887825>
16. Wiesel P.H., Norton C., Glickman S. et al. Pathophysiology and management of bowel dysfunction in multiple sclerosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2001. Vol. 13. No. 4. Pp. 441–448. <https://doi.org/10.1097/00042737-200104000-00025>
17. Levinthal D.J., Rahman A., Nusrat S. et al. Adding to the Burden: Gastrointestinal Symptoms and Syndromes in Multiple Sclerosis. *Mult. Scler. Int.* 2013. Vol. 2013. 319201. <https://doi.org/10.1155/2013/319201>
18. Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Ермоленко Е.И. и др. При рассеянном склерозе изменяется качественный и количественный состав микробиоты кишечника. *Медицинский академический журнал.* 2015. Т. 15. № 3. С. 55–67. <https://doi.org/10.17816/MAJ15355-67>
19. Kidd P.M. Multiple sclerosis, an autoimmune inflammatory disease: Prospects for its integrative management. *Altern. Med. Rev.* 2001. Vol. 6. No. 6. Pp. 540–566.
20. Miyake S., Kim S., Suda W. et al. Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10. No. 9. e0137429.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137429>
21. Абдурасулова И.Н., Мацулевич А.В., Тарасова Е.А. и др. Изменения микробиома кишечника при рассеянном склерозе связаны с иммунными изменениями психоэмоциональными нарушениями. *Медицинский академический журнал.* 2019. Т. 19. № 1S. С. 51–54. <https://doi.org/10.17816/MAJ191S151-54>
22. Jangi S., Gandhi R., Cox L.M. et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7. 12015.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms12015>
23. Tremlett H., Fadrosh D.W., Faruqi A.A. et al. Gut microbiota composition and relapse risk in pediatric MS: A pilot study. *J. Neurol. Sci.* 2016. Vol. 363. Pp. 153–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.02.042>
24. Cosorich I., Dalla-Costa G., Sorini C. et al. High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. *Sci. Adv.* 2017. Vol. 3. No. 7. e1700492. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700492>
25. Cekanaviciute E., Yoo B.B., Runia T.F. et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. Vol. 114. No. 40. Pp. 10713–10718.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1711235114>
26. Saresella M., Marventano I., Barone M. et al. Alterations in circulating fatty acids are associated with gut microbiota dysbiosis and inflammation in multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. 1390.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01390>

27. Buscarinu M.C., Cerasoli B., Annibaldi V. et al. Altered intestinal permeability in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: A pilot study. *Mult. Scler.* 2017. Vol. 23. No. 3. Pp. 442–446. <https://doi.org/10.1177/1352458516652498>
28. Rojo D., Méndez-García C., Raczkowska B.A. et al. Exploring the human microbiome from multiple perspectives: Factors altering its composition and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. Vol. 41. No. 4. Pp. 453–478. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw046>
29. Nouri M., Bredberg A., Weström B. et al. Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of autoreactive T cells. *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9. No. 9. e106335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106335>
30. Secher T., Kassem S., Benamar M. et al. Oral administration of the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces susceptibility to neuroinflammation and repairs experimental autoimmune encephalomyelitis-induced intestinal barrier dysfunction. *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. 1096. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01096>
31. Berer K., Mues M., Koutrolos M. et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* 2011. Vol. 479. No. 7374. Pp. 538–541. <https://doi.org/10.1038/nature10554>
32. Ochoa-Repáraz J., Mielcarz D.W., Ditrio L.E. et al. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2009. Vol. 183. No. 10. Pp. 6041–6050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900747>
33. Popovic N., Schubart A., Goetz B.D. et al. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann. Neurol.* 2002. Vol. 51. No. 2. Pp. 215–223. <https://doi.org/10.1002/ana.10092>
34. Nessler S., Dodel R., Bittner A. et al. Effect of minocycline in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* 2002. Vol. 52. No. 5. Pp. 689–690. <https://doi.org/10.1002/ana.10353>
35. Ivanov I.I., de Llanos Frutos R., Manel N. et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe.* 2008. Vol. 4. No. 4. Pp. 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.009>
36. Gaboriau-Routhiau V., Rakotobe S., Lécuyer E. et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity.* 2009. Vol. 31. No. 4. Pp. 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.020>
37. Wu H.-J., Ivanov I.I., Darce J. et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity.* 2010. Vol. 32. No. 6. Pp. 815–827. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.06.001>
38. Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell.* 2005. Vol. 122. No. 1. Pp. 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>

39. Sokol H., Pigneur B., Watterlot L. et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. Vol. 105. No. 43. Pp. 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
40. Ochoa-Repáraz J., Mielcarz D.W., Wang Y. et al. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol*. 2010. Vol. 3. No. 5. Pp. 487–495. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.29>
41. Atarashi K., Tanoue T., Shima T. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*. 2011. Vol. 331. No. 6015. Pp. 337–341. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>
42. Duc D., Vigne S., Bernier-Latmani J. et al. Disrupting myelin-specific Th17 cell gut homing confers protection in an adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Rep*. 2019. Vol. 29. No. 2. Pp. 378–390.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.002>
43. Clemente J.C., Ursell L.K., Parfrey L.W. et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012. Vol. 148. No. 6. Pp. 1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
44. Arndt A., Hoffacker P., Zellmer K. et al. Conventional housing conditions attenuate the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. No. 6. e99794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099794>
45. Gandy K.A.O., Zhang J., Nagarkatti P. et al. The role of gut microbiota in shaping the relapse-remitting and chronic-progressive forms of multiple sclerosis in mouse models. *Sci. Rep*. 2019. Vol. 9. No. 1. 6923. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43356-7>
46. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*. 1991. Vol. 32. No. 4. Pp. 439–442. <https://doi.org/10.1136/gut.32.4.439>
47. Idrees M., Imran M., Atiq N. et al. Probiotics, their action modality and the use of multi-omics in metamorphosis of commensal microbiota into target-based probiotics. *Front. Nutr*. 2022. Vol. 9. 959941. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.959941>
48. Бондаренко В.М., Чуприна Р.П., Аладышева Ж.И. и др. Пробиотики и механизмы их лечебного действия. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2004. № 3. С. 83–87.
49. Rijkers G.T., Bimmel D., Grevers D. et al. Consumer perception of beneficial effects of probiotics for human health. *Benef. Microbes*. 2013. Vol. 4. No. 1. Pp. 117–121. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0050>
50. Hill C., Guarner F., Reid G. et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2014. Vol. 11. No. 8. Pp. 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
51. Ezendam J., de Klerk A., Gremmer E.R., Van Loveren H. Effects of *Bifidobacterium animalis* administered during lactation on allergic and autoimmune responses in rodents. *Clin. Exp. Immunol*. 2008. Vol. 154. No. 3. Pp. 424–431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03788.x>

52. Lavasani S., Dzhambazov B., Nouri M. et al. A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PLoS ONE*. 2010. Vol. 5. No. 2. e9009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009009>
53. Kobayashi T., Kato I., Nanno M. et al. Oral administration of probiotic bacteria, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve*, does not exacerbate neurological symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunoparmacol. Immunotoxicol.* 2010. Vol. 32. No. 1. Pp. 116–124. <https://doi.org/10.3109/08923970903200716>
54. Takata K., Kinoshita M., Okuno T. et al. The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T cells. *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6. No. 11. e27644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027644>
55. Kwon H-K., Kim G-C., Kim Y. et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by probiotic mixture is mediated by a shift in T helper cell immune response. *Clin. Immunol.* 2013. Vol. 146. No. 3. Pp. 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.01.001>
56. Abdurasulova I.N., Matsulevich A.V., Tarasova E.A. et al. *Enterococcus faecium* strain L-3 and glatiramer acetate ameliorate experimental allergic encephalomyelitis in rats by affecting different populations of immune cells. *Benef. Microb.* 2016. Vol. 7. No. 5. Pp. 719–729. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0018>
57. Abdurasulova I.N., Matsulevich A.V., Kirik O.V. et al. The protective effect of *Enterococcus faecium* L-3 in experimental allergic encephalomyelitis in rats is dose-dependent. *Nutrafoods*. 2019. Vol. 2019. Pp. 1–11. <https://doi.org/10.17470/NF-019-00011>
58. Tarasova E., Yermolenko E., Donets V. et al. The influence of probiotic enterococci on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics. *Benef. Microb.* 2010. Vol. 1. No. 3. Pp. 265–270. <https://doi.org/10.3920/BM2010.0008>
59. Ermolenko E., Gromova L., Borshev Y. et al. Influence of different probiotic lactic acid bacteria on microbiota and metabolism of rats with dysbiosis. *Biosci. Microbiota Food Health*. 2013. Vol. 32. No. 2. Pp. 41–49. <https://doi.org/10.12938/bmfh.32.41>
60. Suvorov A.N., Zaharenko S.M., Alekhina G.G. Enterococci as probiotics of choice. *Clin. Nutrition*. 2003. Vol. 1. P. 26–29.
61. Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J*. 2011. Vol. 5. No. 5. Pp. 908–917. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.171>
62. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30. No. 15. Pp. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
63. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*. 2010. Vol. 7. No. 5. Pp. 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

64. Hajibagheri M.A. Preparation of double/single-stranded DNA and RNA molecules for electron microscopy. *Methods Mol. Biol.* 1999. Vol. 117. Pp. 209–227. <https://doi.org/10.1385/1-59259-201-5:209>
65. Абдурасулова И.Н., Ермоленко Е.И., Мацулевич А.В. и др. Влияние пробиотических энтерококков и глатирамера ацетата на тяжесть экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2016. Т. 102. № 4. С. 463–479.
66. Yamashita M., Ukibe K., Matsubara Y. et al. *Lactobacillus helveticus* SBT2171 attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8. 2596. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02596>
67. Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Мацулевич А.В. и др. Изменение качественного и количественного состава кишечной микробиоты у крыс в течение экспериментального аллергического энцефаломиелита. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2015. Т. 101. № 11. С. 1235–1249.
68. Абдурасулова И.Н. Роль микробиоты кишечника в патогенезе рассеянного склероза. Часть 3. Кишечная микробиота как потенциальный триггер рассеянного склероза. *Медицинский академический журнал.* 2024. Т. 24. № 3. С. 5–44. <https://doi.org/10.17816/MAJ633511>
69. Гилерович Е.Г., Федорова Е.А., Абдурасулова И.Н. и др. Анализ морфологических проявлений воспалительной реакции в спинном мозге крыс Вистар на экспериментальной модели. *Морфология.* 2010. Т. 138. № 5. С. 16–20. <https://doi.org/10.17816/morph.399374>
70. Reynders T., Devolder L., Valles-Colomer M. et al. Gut microbiome variation is associated to Multiple Sclerosis phenotypic subtypes. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2020. Vol. 7. No. 4. Pp. 406–419. <https://doi.org/10.1002/acn3.51004>
71. Takewaki D., Suda W., Sato W. et al. Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. Vol. 117. No. 36. Pp. 22402–22412. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011703117>
72. Ventura R.E., Iizumi T., Battaglia T. et al. Gut microbiome of treatment-naïve MS patients of different ethnicities early in disease course. *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. No. 1. 16396. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52894-z>
73. Chen J., Chia N., Kalari K.R. et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. 28484. <https://doi.org/10.1038/srep28484>
74. Shahi S.K., Freedman S.N., Murra A.C. et al. *Prevotella histicola*, A Human Gut Commensal, Is as Potent as COPAXONE® in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. 462. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00462>
75. Kazakova P., Abasolo N., de Cripan S.M. et al. Gut microbiome and small RNA integrative-omic perspective of meconium and milk-fed infant stool samples. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24. No. 9. 8069. <https://doi.org/10.3390/ijms24098069>
76. Pereira F.C., Wasmund K., Cobankovic I. et al. Rational design of a microbial consortium of mucosal sugar utilizers reduces *Clostridiodes difficile* colonization. *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11. No. 1. 5104. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18928-1>

77. Zhang F., Zhou Y., Chen H. et al. Curcumin alleviates DSS-induced anxiety-like behaviors via the microbial-brain-gut axis. *Oxid. Med. Cellular Longev.* 2022. Vol. 2022. 6244757. <https://doi.org/10.1155/2022/6244757>
78. Arumugam M., Raes J., Pelletier E. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011. Vol. 473. No. 7346. Pp. 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
79. Ochoa-Repáraz J., Mielcarz D.W., Ditrío L.E. et al. Central nervous system demyelinating disease protection by the human commensal *Bacteroides fragilis* depends on polysaccharide A expression. *J. Immunol.* 2010. Vol. 185. No. 7. Pp. 4101–4108. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001443>
80. Cantarel B.L., Waubant E., Chehoud C. et al. Gut microbiota in multiple sclerosis: Possible influence of immunomodulators. *J. Invest. Med.* 2015. Vol. 63. No. 5. Pp. 729–734. <https://doi.org/10.1097/JIM.0000000000000192>
81. Galluzzo P., Capri F.C., Vecchioni L. et al. Comparison of the intestinal microbiome of Italian patients with multiple sclerosis and their household relatives. *Life.* 2021. Vol. 11. No. 7. 620. <https://doi.org/10.3390/life11070620>
82. He B., Hoang T.K., Tian X. et al. *Lactobacillus reuteri* reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by modulating gut microbiota. *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. 385. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00385>
83. Cantoni C., Lin Q., Dorsett Y. et al. Alterations of host-gut microbiome interactions in multiple sclerosis. *EBioMedicine.* 2022. Vol. 76. 103798. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103798>
84. Johanson D.M., Goertz J.E., Marin I.A. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with changes of the microbiota composition in the gastrointestinal tract. *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10. No. 1. 15183. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72197-y>
85. Sell L.B., Ramelow C.C., Kohl H.M. et al. Farnesol induces protection against murine CNS inflammatory demyelination and modifies gut microbiome. *Clin. Immunol.* 2022. Vol. 235. 108766. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108766>
86. Benedek G., Zhang J., Nguyen H. et al. Estrogen protection against EAE modulates the microbiota and mucosal-associated regulatory cells. *J. Neuroimmunol.* 2017. Vol. 310. Pp. 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.06.007>
87. Tremlett H., Fadrosh D.W., Faruqi A.A. et al. Gut microbiota in early pediatric multiple sclerosis: A case-control study. *Eur. J. Neurol.* 2016. Vol. 23. No. 8. Pp. 1308–1321. <https://doi.org/10.1111/ene.13026>
88. Swidsinski A., Dörffel Y., Loening-Baucke V. et al. Reduced mass and diversity of the colonic microbiome in patients with multiple sclerosis and their improvement with ketogenic diet. *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8. 1141. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01141>
89. Pellizoni F.P., Leite A.Z., de Campos Rodrigues N. et al. Detection of dysbiosis and increased intestinal permeability in Brazilian patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021. Vol. 18. No. 9. 4621. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094621>

90. Miayaichi E., Kim S.W., Suda W. et al. Gut microorganisms act together to exacerbate inflammation in spinal cords. *Nature*. 2020. Vol. 585. No. 7823. Pp. 102–106. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2634-9>
91. Palm N.W., de Zoete M.R., Cullen T.W. et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*. 2014. Vol. 158. No. 5. Pp. 1000–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.006>
92. Kaakoush N.O. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015. Vol. 5. 84. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00084>
93. Dinh D.M., Volpe G.E., Duffalo C. et al. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J. Infect. Dis.* 2015. Vol. 211. No. 1. Pp. 19–27. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu409>
94. Cox L.M., Maghzi A.H., Liu S. et al. Gut microbiome in progressive multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2021. Vol. 89. No. 6. Pp. 1195–1211. <https://doi.org/10.1002/ana.26084>
95. Абдурасулова И.Н., Мацулевич А.В., Грефнер Н.М. и др. Повышенный уровень *Bifidobacterium* в составе кишечной микробиоты – маркер неблагоприятного течения рассеянного склероза. В сб.: Тезисы 5-го Конгресса по рассеянному склерозу и другим демиелинизирующим заболеваниям (Уфа, 28–30 сентября 2023 г.). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2023. Т. 123. № 7. Вып. 2. С. 136–137. <https://doi.org/10.17116/jnevro2023123072136>
96. Loubinoux J., Bronowicki J.P., Pereira I.A. et al. Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002. Vol. 40. No. 2. Pp. 107–112. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00942.x>
97. Kishikawa T., Ogawa K., Motooka D. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiome in patients with multiple sclerosis revealed novel disease pathology. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020. Vol. 10. 585973. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.585973>
98. Camara-Lemarrooy C.R., Silva C., Greenfield J. et al. Biomarkers of intestinal barrier function in multiple sclerosis are associated with disease activity. *Mult. Scler.* 2019. Vol. 26. No. 11. Pp. 1340–1350. <https://doi.org/10.1177/1352458519863133>
99. de Andrade J.A.B., Freymüller E., Fagundes-Neto U. Pathophysiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infection: an experimental model utilizing transmission electron microscopy. *Arq. Gastroenterol.* 2010. Vol. 47. No. 3. Pp. 306–312. <https://doi.org/10.1590/s0004-28032010000300018>
100. Takeuchi A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Pathol.* 1967. Vol. 50. No. 1. Pp. 109–136.
101. Orenstein J.M., Kotler D.P. Diarrheogenic bacterial enteritis in acquired immune deficiency syndrome: a light and electron microscopy study of 52 cases. *Hum. Pathol.* 1995. Vol. 26. No. 5. Pp. 481–492. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90243-0](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90243-0)
102. Watson P.R., Paulin S.M., Bland A.P. et al. Characterization of intestinal invasion by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella dublin* and effect of a mutation in the *invH* gene. *Infect. Immun.* 1995. Vol. 63. No. 7. Pp. 2743–2754. <https://doi.org/10.1128/iai.63.7.2743-2754.1995>

103. Di Biase A.M., Petrone G., Conte M.P. et al. Infection of human enterocyte-like cells with rotavirus enhances invasiveness of *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. *J. Med. Microbiol.* 2000. Vol. 49. No. 10. Pp. 897–904. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-10-897>
104. Pacheco V.C.R., Yamamoto D., Abe C.M. et al. Invasion of differentiated intestinal Caco-2 cells is a sporadic property among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying common intimin subtypes. *Pathog. Dis.* 2014. Vol. 70. No. 2. Pp. 167–175. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12112>
105. Yu L.C.-H. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. *J. Biomed. Sci.* 2018. Vol. 25. No. 1. 79. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0483-8>
106. Kommnick C., Leppe A., Hensel M. Correlative light and scanning electron microscopy (CLSEM) for analysis of bacterial infection of polarized epithelial cells. *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. No. 1. 17079. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53085-6>
107. Ponnusamy D., Periasamy S., Tripathi B.N. et al. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* invades through M cells and enterocytes across ileal and jejunal mucosa of lambs. *Res. Vet. Sci.* 2013. Vol. 94. No. 2. Pp. 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.023>
108. Wells C.L., van de Westerlo E.M., Jechorek R.P. et al. Exposure of the lateral enterocyte membrane by dissociation of calcium-dependent junctional complex augments endocytosis of enteric bacteria. *Shock.* 1995. Vol. 4. No. 3. Pp. 204–210. <https://doi.org/10.1097/00024382-199509000-00009>
109. Gagnon M., Zihler Berner A., Chervet N. et al. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *J. Microbiol. Meth.* 2013. Vol. 94. No. 3. Pp. 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.027>
110. Tremlett H., Fadrosch D.W., Faruqi A.A. et al. Associations between the gut microbiota and host immune markers in pediatric multiple sclerosis and controls. *BMC Neurol.* 2016. Vol. 16. No. 1. 182. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0703-3>
111. Cordeiro F., da Silva R.I.K., Vargas-Stampe T.L.Z. et al. Cell invasion and survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within cultured human intestinal epithelial cells. *Microbiology.* 2013. Vol. 159. Pt. 8. Pp. 1683–1694. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064204-0>
112. Zareie M., Johnson-Henry K., Jury J. et al. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut.* 2006. Vol. 55. No. 11. Pp. 1553–1560. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.080739>
113. Campana R., van Hemert S., Baffone W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog.* 2017. Vol. 9. 12. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0162-4>
114. Khodaii Z., Ghaderian S.M.H., Natanzi M.M. Probiotic Bacteria and Their Supernatants Protect Enterocyte Cell Lines From Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) Invasion. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 2017. Vol. 6. No. 3. Pp. 183–189. <https://doi.org/10.22088/acadpub.BUMS.6.3.183>

115. Stinissen P., Raus J., Zhang J. Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit. Rev. Immunol.* 1997. Vol. 17. No. 1. Pp. 33–75.  
<https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v17.i1.20>
116. Hafler D.A., Slavik J.M., Anderson D.E. et al. Multiple sclerosis. *Immunol. Rev.* 2005. Vol. 204. Pp. 208–231. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00240.x>
117. Engelhardt B. Regulation of immune cell entry into the central nervous system. *Res. Prob. Cell Diff.* 2006. Vol. 43. Pp. 259–280. [https://doi.org/10.1007/400\\_020](https://doi.org/10.1007/400_020)
118. Zamvil S.S., Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu. Rev. Immunol.* 1990. Vol. 8. Pp. 579–621.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.iy.08.040190.003051>
119. Hickey W.F. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol.* 1991. Vol. 1. No. 2. Pp. 97–105.  
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1991.tb00646.x>
120. Benveniste E.N. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998. Vol. 9. No. 3–4. Pp. 259–275.  
[https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(98\)00015-x](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(98)00015-x)
121. Sonobe Y., Jin S., Wang J. et al. Chronological changes of CD4(+) and CD8(+) T cell subsets in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis. *Tohoku J. Exp. Med.* 2007. Vol. 213. No. 4. Pp. 329–339.  
<https://doi.org/10.1620/tjem.213.329>
122. Weiss H.A., Millward J.M., Owens T. CD8+ T cells in inflammatory demyelinating disease. *J. Neuroimmunol.* 2007. Vol. 191. No. 1–2. Pp. 79–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.09.011>
123. Dombrowski Y., O'Hagan T., Dittmer M. et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat. Neurosci.* 2017. Vol. 20. No. 5. Pp. 674–680. <https://doi.org/10.1038/nn.4528>
124. Kohm A.P., Carpentier P.A., Anger H.A. et al. Cutting Edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2002. Vol. 169. No. 9. Pp. 4712–4716.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.4712>
125. Zhang X., Koldzic D.N., Izikson L. et al. H.L. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 2004. Vol. 16. No. 2. Pp. 249–256.  
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxh029>
126. Житнухин Ю.Л., Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А. и др. Особенности динамики циркулирующих и экспрессируемых цитокинов при индукции экспериментального аллергического энцефаломиелита. *Медицинская иммунология.* 2008. Т. 10. № 2–3. С. 193–202.  
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2008-2-3-193-202>
127. Weiner H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* 2001. Vol. 182. Pp. 207–214.  
<https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2001.1820117.x>

128. Hansmann L., Schmidl C., Kett J. et al. Dominant Th2 differentiation of human regulatory T cells upon loss of FOXP3 expression. *J. Immunol.* 2012. Vol. 188. No. 3. Pp. 1275–1282. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102288>
129. Curotto de Lafaille M.A., Lafaille J.J. Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009. Vol. 30. No. 5. Pp. 626–635. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.002>
130. Weiner H.L. Oral tolerance: Immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* 2001. Vol. 3. No. 11. Pp. 947–954. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01456-3](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01456-3)
131. Travis M.A., Sheppard D. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 32. Pp. 51–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120257>
132. Konkel J.E., Maruyama T., Carpenter A.C. et al. Control of the development of CD8 $\alpha$ + intestinal intraepithelial lymphocytes by TGF-b. *Nat. Immunol.* 2011. Vol. 12. No. 4. Pp. 312–319. <https://doi.org/10.1038/ni.1997>
133. Chen M.-L., Yan B.-S., Kozoriz D. et al. Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 2009. Vol. 39. No. 12. Pp. 3423–3435. <https://doi.org/10.1002/eji.200939441>
134. Filaci G., Fenoglio D., Fravega M. et al. CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J. Immunol.* 2007. Vol. 179. No. 7. Pp. 4323–4334. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4323>
135. Ellis S.D.P., McGovern J.L., van Maurik A. et al. Induced CD8+FoxP3+ Treg cells in rheumatoid arthritis are modulated by p38 phosphorylation and monocytes expressing membrane tumor necrosis factor alpha and CD86. *Arthritis Rheumatol.* 2014. Vol. 66. No. 10. Pp. 2694–2705. <https://doi.org/10.1002/art.38761>
136. Gross C.C., Schulte-Mecklenbeck A., Klinsing S. et al. Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2016. Vol. 3. No. 1. e183. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000183>
137. Kehl J.H., Wakefield L.M., Roberts A.B. et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 1986. Vol. 163. No. 5. Pp. 1037–1050. <https://doi.org/10.1084/jem.163.5.1037>
138. McKarns S.C., Schwartz R.H. Distinct effects of TGF-beta 1 on CD4+ and CD8+ T cell survival, division, and IL-2 production: a role for T cell intrinsic Smad3. *J. Immunol.* 2005. Vol. 174. No. 4. Pp. 2071–2083. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.2071>
139. Shalaby M.R., Ammann A.J. Suppression of immune cell function in vitro by recombinant human transforming growth factor-beta. *Cell Immunol.* 1988. Vol. 112. No. 2. Pp. 343–350. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(88\)90303-6](https://doi.org/10.1016/0008-8749(88)90303-6)
140. Shull M.M., Ormsby I., Kier A.B. et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 1992. Vol. 359. No. 6397. Pp. 693–699. <https://doi.org/10.1038/359693a0>

141. Li M.O., Wan Y.Y., Sanjabi S. et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2006. Vol. 24. Pp. 99–146.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>
142. Mantel P.Y., Schmidt-Weber C.B. Transforming growth factor-beta: Recent advances on its role in immune tolerance. *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 677. Pp. 303–338. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0_21)
143. Mirshafiey A., Mohsenzadegan M. TGFbeta as a promising option in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology.* 2009. Vol. 56. No. 6–7. Pp. 929–936.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.02.007>
144. Racke M.K., Dhib-Jalbut S., Cannella B. et al. Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta1. *J. Immunol.* 1991. Vol. 146. No. 9. Pp. 3012–3017.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.146.9.3012>
145. Racke M.K., Sriram S., Carlino J. et al. Long-term treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta2. *J. Neuroimmunol.* 1993. Vol. 46. No. 1–2. Pp. 175–183.  
[https://doi.org/10.1016/0165-5728\(93\)90247-v](https://doi.org/10.1016/0165-5728(93)90247-v)
146. Li M.O., Wan Y.Y., Flavell R.A. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007. Vol. 26. No. 5. Pp. 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.014>
147. Mangan P.R., Harrington L.E., O’Quinn D.B. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the TH17 lineage. *Nature.* 2006. Vol. 441. No. 7090. Pp. 231–234. <https://doi.org/10.1038/nature04754>
148. Bettelli E., Carrier Y., Gao W. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006. Vol. 441. No. 7090. Pp. 235–238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>
149. Yang Y., Weiner J., Liu Y. et al. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J. Exp. Med.* 2009. Vol. 206. No. 7. Pp. 1549–1564.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20082584>
150. McGeachy M.J., Chen Y., Tato C.M. et al. The interleukin-23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin-17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat. Immunol.* 2009. Vol. 10. No. 3. Pp. 314–324.  
<https://doi.org/10.1038/ni.1698>
151. Ghoreschi K., Laurence A., Yang X.-P. et al. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF-β signaling. *Nature.* 2010. Vol. 467. No. 7318. Pp. 967–971.  
<https://doi.org/10.1038/nature09447>
152. Jäger A., Dardalhon V., Sobel R.A. et al. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J. Immunol.* 2009. Vol. 183. No. 11. Pp. 7169–7177.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901906>
153. Park S.R., Seo G.Y., Choi A.J. et al. Analysis of transforming growth factor-beta1-induced Ig germline γ2b transcription and its implication for IgA isotype switching. *Eur. J. Immunol.* 2005. Vol. 35. No. 3. Pp. 946–956.  
<https://doi.org/10.1002/eji.200425848>

154. Laouar Y., Town T., Jeng D. et al. TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. Vol. 105. No. 31. Pp. 10865–10870. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805058105>
155. Simpson J.E., Newcombe J., Cuzner M.L. et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other  $\beta$ -chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 1998. Vol. 84. No. 2. Pp. 238–249. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(97\)00208-7](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(97)00208-7)
156. Van der Voorn P., Tekstra J., Beelen R.H. et al. Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* 1999. Vol. 154. No. 1. Pp. 45–51. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65249-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65249-2)
157. Berman J.W., Guida M.P., Warren J. et al. Localization of monocyte chemoattractant peptide-1 expression in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis and trauma in the rat. *J. Immunol.* 1996. Vol. 156. No. 8. Pp. 3017–3023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.156.8.3017>
158. Fischer F.R., Santambrogio L., Luo Y. et al. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: Effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression. *J. Neuroimmunol.* 2000. Vol. 110. No. 1–2. Pp. 195–208. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(00\)00351-9](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(00)00351-9)

## REFERENCES

1. Swanborg R.H. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1995;77(1):4–13. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(95\)90130-2](https://doi.org/10.1016/0090-1229(95)90130-2)
2. Constantinescu C.S., Farooqi N., O'Brien K., Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.* 2011;164(4):1079–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>
3. Baker D., Amor S. Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2014;3(5):555–564. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2014.05.002>
4. McGinley M.P., Goldschmidt C.H., Rae-Grant A.D. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis: A review. *JAMA.* 2021;325(8):765–779. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.26858>
5. CAMMS223 Trial Investigators, Coles A.J., Compston D.A.S. et al. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(17):1786–1801. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802670>
6. Boyko A., Melnikov M. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Russian Federation: 30 years of studies. *Brain Sci.* 2020;10(5):E305. <https://doi.org/10.3390/brainsci10050305>
7. Villagran D.C., Yeh E.A. Pediatric multiple sclerosis: Changing the trajectory of progression. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2023;23(11):657–669. <https://doi.org/10.1007/s11910-023-01300-3>

8. Teleanu R.I., Niculescu A.-G., Vladacenco O.A. et al. The state of the art of pediatric multiple sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;**24**(9):8251. <https://doi.org/10.3390/ijms24098251>
9. Oh J., Giacomini P.S., Yong V.W. et al. From progression to progress: The future of multiple sclerosis. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* **6**(16):11795735241249693. <https://doi.org/10.1177/11795735241249693>
10. Boyko A.N., Gusev E.I. Sovremennyye algoritmy diagnostiki i lecheniya rasseyannogo skleroza, osnovannyye na individual'noy otsenke sostoyaniya patsiyenta [Current algorithms of diagnosis and treatment of multiple sclerosis based on the individual assessment of the patient]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2017;**117**(2):92–106. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/jnevro20171172292-106>
11. Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Nikiforova I.G. et al. Osobennosti sostava mikrobioty kishechnika u patsiyentov s rasseyannym sklerozom, poluchayushchikh preparaty, izmenyayushchiye techeniye rasseyannogo skleroza [The intestinal microbiota composition in patients with multiple sclerosis receiving different disease-modifying therapies DMT]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2018;**118**(8-2):62–69. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/jnevro201811808262>
12. Tarasova E.A., Lioudyno V.I., Matsulevich A.V. et al. Features of the intestinal microbiota composition in multiple sclerosis patients receiving oral disease-modifying therapy. *Med. Acad. J.* 2021;**21**(4):47–56. <https://doi.org/10.17816/MAJ88595>
13. Stolyarov I.D., Petrov A.M., Ivashkova E.V. et al. Issledovaniya lekarstvennykh sredstv pri rasseyannom skleroze: nauchnyye, klinicheskiye i eticheskiye aspekty [Drug Trials In Multiple Sclerosis: Scientific, Clinical And Ethical Aspects]. *Nevrologicheskiy zhurnal = Neurological Journal*. 2018;**23**(1):16–21. (In Russ.) <https://doi.org/10.18821/1560-9545-2018-23-1-16-21>
14. Mirza A., Mao-Draayer Y. The gut microbiome and microbial translocation in multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* 2017;**183**:213–224. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.03.001>
15. Chia Y.W., Fowler C.J., Kamm M.A. et al. Prevalence of bowel dysfunction in patients with multiple sclerosis and bladder dysfunction. *J. Neurol.* 1995;**242**(2):105–108. <https://doi.org/10.1007/BF00887825>
16. Wiesel P.H., Norton C., Glickman S. et al. Pathophysiology and management of bowel dysfunction in multiple sclerosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2001;**13**(4):441–448. <https://doi.org/10.1097/00042737-200104000-00025>
17. Levinthal D.J., Rahman A., Nusrat S. et al. Adding to the Burden: Gastrointestinal Symptoms and Syndromes in Multiple Sclerosis. *Mult. Scler. Int.* 2013;**2013**:319201. <https://doi.org/10.1155/2013/319201>
18. Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Ermolenko E.I. et al. Pri rasseyannom skleroze izmenyayetsya kachestvennyy i kolichestvennyy sostav mikrobioty kishechnika [Multiple sclerosis is associated with altered quantitative and qualitative composition of intestinal microbiota]. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical academic journal*. 2015;**15**(3):55–67. <https://doi.org/10.17816/MAJ15355-67>

19. Kidd P.M. Multiple sclerosis, an autoimmune inflammatory disease: Prospects for its integrative management. *Altern. Med. Rev.* 2001;**6**(6):540–566.
20. Miyake S., Kim S., Suda W. et al. Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PLoS ONE.* 2015;**10**(9): e0137429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137429>
21. Abdurasulova I.N., Matsulevich A.V., Tarasova E.A. et al. Izmeneniya mikrobioma kishhechnika pri rasseyannom skleroze svyazany s immunnymi izmeneniyami psikhoeffemotsional'nymi narusheniyami [Changes of intestinal microbiome in multiple sclerosis are associated with immune shift and psychoemotional disorders]. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal = Medical academic journal.* 2019;**19**(1S):51–54. <https://doi.org/10.17816/MAJ191S151-54>
22. Jangi S., Gandhi R., Cox L.M. et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* 2016;**7**:12015. <https://doi.org/10.1038/ncomms12015>
23. Tremlett H., Fadrosh D.W., Faruqi A.A. et al. Gut microbiota composition and relapse risk in pediatric MS: A pilot study. *J. Neurol. Sci.* 2016;**363**:153–157. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.02.042>
24. Cosorich I., Dalla-Costa G., Sorini C. et al. High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. *Sci. Adv.* 2017;**3**(7):e1700492. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700492>
25. Cekanaviciute E., Yoo B.B., Runia T.F. et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017;**114**(40):10713–10718. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711235114>
26. Saresella M., Marventano I., Barone M. et al. Alterations in circulating fatty acids are associated with gut microbiota dysbiosis and inflammation in multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 2020;**11**:1390. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01390>
27. Buscarinu M.C., Cerasoli B., Annibaldi V. et al. Altered intestinal permeability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: A pilot study. *Mult. Scler.* 2017;**23**(3):442–446. <https://doi.org/10.1177/1352458516652498>
28. Rojo D., Méndez-García C., Raczkowska B.A. et al. Exploring the human microbiome from multiple perspectives: Factors altering its composition and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017;**41**(4):453–478. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw046>
29. Nouri M., Bredberg A., Weström B. et al. Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of autoreactive T cells. *PLoS ONE.* 2014;**9**(9):e106335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106335>
30. Secher T., Kassem S., Benamar M. et al. Oral administration of the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces susceptibility to neuroinflammation and repairs experimental autoimmune encephalomyelitis-induced intestinal barrier dysfunction. *Front. Immunol.* 2017;**8**:1096. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01096>
31. Berer K., Mues M., Koutrolos M. et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* 2011;**479**(7374):538–541. <https://doi.org/10.1038/nature10554>

32. Ochoa-Repáraz J., Mielcarz D.W., Ditrio L.E. et al. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2009;**183**(10):6041–6050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900747>
33. Popovic N., Schubart A., Goetz B.D. et al. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann. Neurol.* 2002;**51**(2):215–223. <https://doi.org/10.1002/ana.10092>
34. Nessler S., Dodel R., Bittner A. et al. Effect of minocycline in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* 2002;**52**(5):689–690. <https://doi.org/10.1002/ana.10353>
35. Ivanov I.I., de Llanos Frutos R., Manel N. et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe.* 2008;**4**(4):337–349. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.009>
36. Gaboriau-Routhiau V., Rakotobe S., Lécuyer E. et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity.* 2009;**31**(4):677–689. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.020>
37. Wu H.-J., Ivanov I.I., Darce J. et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity.* 2010;**32**(6):815–827. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.06.001>
38. Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell.* 2005;**122**(1):107–118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>
39. Sokol H., Pigneur B., Watterlot L. et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;**105**(43):16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
40. Ochoa-Repáraz J., Mielcarz D.W., Wang Y. et al. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol.* 2010;**3**(5):487–495. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.29>
41. Atarashi K., Tanoue T., Shima T. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science.* 2011;**331**(6015):337–341. <https://doi.org/10.1126/science.1198469>
42. Duc D., Vigne S., Bernier-Latmani J. et al. Disrupting myelin-specific Th17 cell gut homing confers protection in an adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Rep.* 2019;**29**(2):378–390.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.002>
43. Clemente J.C., Ursell L.K., Parfrey L.W. et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell.* 2012;**148**(6):1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
44. Arndt A., Hoffacker P., Zellmer K. et al. Conventional housing conditions attenuate the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE.* 2014;**9**(6):e99794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099794>
45. Gandy K.A.O., Zhang J., Nagarkatti P. et al. The role of gut microbiota in shaping the relapse-remitting and chronic-progressive forms of multiple sclerosis in mouse models. *Sci. Rep.* 2019;**9**(1):6923. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43356-7>

46. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*. 1991;**32**(4):439–442. <https://doi.org/10.1136/gut.32.4.439>
47. Idrees M., Imran M., Atiq N. et al. Probiotics, their action modality and the use of multi-omics in metamorphosis of commensal microbiota into target-based probiotics. *Front. Nutr.* 2022;**9**:959941. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.959941>
48. Bondarenko V.M., Chuprina R.P., Aladysheva Zh.I. et al. Probiotiki i mekhanizmy ikh lechebnogo deystviya [Probiotics and mechanisms of their curative action]. *Ekspерimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental & clinical gastroenterology*. 2004;**3**:83–87. (In Russ.)
49. Rijkers G.T., Bimmel D., Grevers D. et al. Consumer perception of beneficial effects of probiotics for human health. *Benef. Microbes*. 2013;**4**(1):117–121. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0050>
50. Hill C., Guarner F., Reid G. et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014;**11**(8):506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
51. Ezendam J., de Klerk A., Gremmer E.R., Van Loveren H. Effects of *Bifidobacterium animalis* administered during lactation on allergic and autoimmune responses in rodents. *Clin. Exp. Immunol.* 2008;**154**(3):424–431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03788.x>
52. Lavasani S., Dzhambazov B., Nouri M. et al. A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PLoS ONE*. 2010;**5**(2):e9009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009009>
53. Kobayashi T., Kato I., Nanno M. et al. Oral administration of probiotic bacteria, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve*, does not exacerbate neurological symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2010;**32**(1):116–124. <https://doi.org/10.3109/08923970903200716>
54. Takata K., Kinoshita M., Okuno T. et al. The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T cells. *PLoS ONE*. 2011;**6**(11):e27644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027644>
55. Kwon H.-K., Kim G.-C., Kim Y. et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by probiotic mixture is mediated by a shift in T helper cell immune response. *Clin. Immunol.* 2013;**146**(3):217–227. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.01.001>
56. Abdurasulova I.N., Matsulevich A.V., Tarasova E.A. et al. *Enterococcus faecium* strain L-3 and glatiramer acetate ameliorate experimental allergic encephalomyelitis in rats by affecting different populations of immune cells. *Benef. Microb.* 2016;**7**(5):719–729. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0018>
57. Abdurasulova I.N., Matsulevich A.V., Kirik O.V. et al. The protective effect of *Enterococcus faecium* L-3 in experimental allergic encephalomyelitis in rats is dose-dependent. *Nutrafoods*. 2019;**2019**:1–11. <https://doi.org/10.17470/NF-019-00011>
58. Tarasova E., Yermolenko E., Donets V. et al. The influence of probiotic enterococci on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics. *Benef. Microb.* 2010;**1**(3):265–270. <https://doi.org/10.3920/BM2010.0008>

59. Ermolenko E., Gromova L., Borshev Y. et al. Influence of different probiotic lactic acid bacteria on microbiota and metabolism of rats with dysbiosis. *Biosci. Microbiota Food Health*. 2013;**32**(2):41–49. <https://doi.org/10.12938/bmfh.32.41>
60. Suvorov A.N., Zaharenko S.M., Alekhina G.G. Enterococci as probiotics of choice. *Clinl. Nutrition*. 2003;**1**:26–29.
61. Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J*. 2011;**5**(5):908–917. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.171>
62. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;**30**(15):2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
63. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*. 2010;**7**(5):335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
64. Hajibagheri M.A. Preparation of double/single-stranded DNA and RNA molecules for electron microscopy. *Methods Mol. Biol*. 1999;**117**:209–227. <https://doi.org/10.1385/1-59259-201-5:209>
65. Abdurasulova I.N., Ermolenko E.I., Matsulevich A.V. et al. Vliyaniye probioticheskikh enterokokkov i glatiramera atsetata na tyazhest' eksperimental'nogo allergicheskogo entsefalomiyelita u krysa. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*. 2016;**102**(4):463–479. (In Russ.)
66. Yamashita M., Ukibe K., Matsubara Y. et al. Lactobacillus helveticus SBT2171 attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Front. Microbiol*. 2017;**8**:2596. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02596>
67. Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Matsulevich A.V. et al. Izmeneniye kachestvennogo i kolichestvennogo sostava kishhechnoy mikrobioty u krysa v techeniye eksperimental'nogo allergicheskogo entsefalomiyelita. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*. 2015;**101**(11):1235–1249.
68. Abdurasulova I.N. Rol' mikrobioty kishhechnika v patogeneze rasseyannogo skleroza. Chast' 3. Kishhechnaya mikrobiota kak potentsial'nyy trigger rasseyannogo skleroza [Role of the intestinal microbiota in the pathogenesis of multiple sclerosis. Part 3. Gut microbiota as a potential trigger for multiple sclerosis]. *Meditinskiy akademicheskii zhurnal = Medical academic journal*. 2024;**24**(3):5–44. (In Russ.) <https://doi.org/10.17816/MAJ633511>
69. Gilerovich E.G., Fedorova E.A., Abdurasulova I.N. et al. Analiz morfologicheskikh proyavleniy vospalitel'noy reaktsii v spinnom mozge krysa Vistar na eksperimental'noy modeli [Analysis of morphological manifestations of the inflammatory reaction in wistar rat spinal cord in experimental model]. *Morfologiya = Morphology*. 2010;**138**(5):16–20. (In Russ.) <https://doi.org/10.17816/morph.399374>
70. Reynders T., Devolder L., Valles-Colomer M. et al. Gut microbiome variation is associated to Multiple Sclerosis phenotypic subtypes. *Ann. Clin. Transl. Neurol*. 2020;**7**(4):406–419. <https://doi.org/10.1002/acn3.51004>
71. Takewaki D., Suda W., Sato W. et al. Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020;**117**(36):22402–22412. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011703117>

72. Ventura R.E., Iizumi T., Battaglia T. et al. Gut microbiome of treatment-naive MS patients of different ethnicities early in disease course. *Sci. Rep.* 2019;**9**(1):16396. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52894-z>
73. Chen J., Chia N., Kalari K.R. et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.* 2016;**6**:28484. <https://doi.org/10.1038/srep28484>
74. Shahi S.K., Freedman S.N., Murra A.C. et al. *Prevotella histicola*, A Human Gut Commensal, Is as Potent as COPAXONE® in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 2019;**10**:462. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00462>
75. Kazakova P., Abasolo N., de Cripán S.M. et al. Gut microbiome and small RNA integrative-omic perspective of meconium and milk-fed infant stool samples. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;**24**(9):8069. <https://doi.org/10.3390/ijms24098069>
76. Pereira F.C., Wasmund K., Cobankovic I. et al. Rational design of a microbial consortium of mucosal sugar utilizers reduces *Clostridiodes difficile* colonization. *Nat. Commun.* 2020;**11**(1):5104. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18928-1>
77. Zhang F., Zhou Y., Chen H. et al. Curcumin alleviates DSS-induced anxiety-like behaviors via the microbial-brain-gut axis. *Oxid. Med. Cellular Longev.* 2022;**2022**:6244757. <https://doi.org/10.1155/2022/6244757>
78. Arumugam M., Raes J., Pelletier E. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;**473**(7346):174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
79. Ochoa-Repáraz J., Mielcarz D.W., Ditrio L.E. et al. Central nervous system demyelinating disease protection by the human commensal *Bacteroides fragilis* depends on polysaccharide A expression. *J. Immunol.* 2010;**185**(7):4101–4108. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001443>
80. Cantarel B.L., Waubant E., Chehoud C. et al. Gut microbiota in multiple sclerosis: Possible influence of immunomodulators. *J. Invest. Med.* 2015;**63**(5):729–734. <https://doi.org/10.1097/JIM.0000000000000192>
81. Galluzzo P., Capri F.C., Vecchioni L. et al. Comparison of the intestinal microbiome of Italian patients with multiple sclerosis and their household relatives. *Life.* 2021;**11**(7):620. <https://doi.org/10.3390/life11070620>
82. He B., Hoang T.K., Tian X. et al. *Lactobacillus reuteri* reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by modulating gut microbiota. *Front. Immunol.* 2019;**10**:385. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00385>
83. Cantoni C., Lin Q., Dorsett Y. et al. Alterations of host-gut microbiome interactions in multiple sclerosis. *EBioMedicine.* 2022;**76**:103798. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103798>
84. Johanson D.M., Goertz J.E., Marin I.A. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with changes of the microbiota composition in the gastrointestinal tract. *Sci. Rep.* 2020;**10**(1):15183. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72197-y>
85. Sell L.B., Ramelow C.C., Kohl H.M. et al. Farnesol induces protection against murine CNS inflammatory demyelination and modifies gut microbiome. *Clin. Immunol.* 2022;**235**:108766. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108766>
86. Benedek G., Zhang J., Nguyen H. et al. Estrogen protection against EAE modulates the microbiota and mucosal-associated regulatory cells. *J. Neuroimmunol.* 2017;**310**:51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.06.007>

87. Tremlett H., Fadrosch D.W., Faruqi A.A. et al. Gut microbiota in early pediatric multiple sclerosis: A case-control study. *Eur. J. Neurol.* 2016;**23**(8):1308–1321. <https://doi.org/10.1111/ene.13026>
88. Swidsinski A., Dörffel Y., Loening-Baucke V. et al. Reduced mass and diversity of the colonic microbiome in patients with multiple sclerosis and their improvement with ketogenic diet. *Front. Microbiol.* 2017;**8**:1141. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01141>
89. Pellizoni F.P., Leite A.Z., de Campos Rodrigues N. et al. Detection of dysbiosis and increased intestinal permeability in Brazilian patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021;**18**(9):4621. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094621>
90. Miayaichi E., Kim S.W., Suda W. et al. Gut microorganisms act together to exacerbate inflammation in spinal cords. *Nature.* 2020;**585**(7823):102–106. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2634-9>
91. Palm N.W., de Zoete M.R., Cullen T.W. et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell.* 2014;**158**(5):1000–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.006>
92. Kaakoush N.O. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015;**5**:84. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00084>
93. Dinh D.M., Volpe G.E., Duffalo C. et al. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J. Infect. Dis.* 2015;**211**(1):19–27. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu409>
94. Cox L.M., Maghzi A.H., Liu S. et al. Gut microbiome in progressive multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2021;**89**(6):1195–1211. <https://doi.org/10.1002/ana.26084>
95. Abdurasulova I.N., Matsulevich A.V., Grefner N.M. et al. Povyshennyy uroven' Bifidobacterium v sostave kischechnoy mikrobioty – marker neblagopriyatno-go techeniya rasseyannogo skleroza. In: Tezisy 5-go Kongressa po rasseyannomu sklerozu i drugim demiyeliniziruyushchim zabolevaniyam (Ufa, 28–30 sentyabrya 2023 g.) [Abstracts of the 5th Congress on Multiple Sclerosis and Other Demyelinating Diseases (Ufa, September 28–30, 2023)]. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova. Spetsvypuski = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry (special issues).* 2023;**123**(7-2):136–137. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/jnevro2023123072136>
96. Loubinoux J., Bronowicki J.P., Pereira I.A. et al. Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002;**40**(2):107–112. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00942.x>
97. Kishikawa T., Ogawa K., Motooka D. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiome in patients with multiple sclerosis revealed novel disease pathology. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020;**10**:585973. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.585973>
98. Camara-Lemarroy C.R., Silva C., Greenfield J. et al. Biomarkers of intestinal barrier function in multiple sclerosis are associated with disease activity. *Mult. Scler.* 2019;**26**(11):1340–1350. <https://doi.org/10.1177/1352458519863133>

99. De Andrade J.A.B., Freymüller E., Fagundes-Neto U. Pathophysiology of entero-aggregative *Escherichia coli* infection: an experimental model utilizing transmission electron microscopy. *Arq. Gastroenterol.* 2010;**47**(3):306–312.  
<https://doi.org/10.1590/s0004-28032010000300018>
100. Takeuchi A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Pathol.* 1967;**50**(1):109–136.
101. Orenstein J.M., Kotler D.P. Diarrheogenic bacterial enteritis in acquired immune deficiency syndrome: a light and electron microscopy study of 52 cases. *Hum. Pathol.* 1995;**26**(5):481–492. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90243-0](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90243-0)
102. Watson P.R., Paulin S.M., Bland A.P. et al. Characterization of intestinal invasion by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella dublin* and effect of a mutation in the *invH* gene. *Infect. Immun.* 1995;**63**(7):2743–2754.  
<https://doi.org/10.1128/iai.63.7.2743-2754.1995>
103. Di Biase A.M., Petrone G., Conte M.P. et al. Infection of human enterocyte-like cells with rotavirus enhances invasiveness of *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. *J. Med. Microbiol.* 2000;**49**(10):897–904.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-10-897>
104. Pacheco V.C.R., Yamamoto D., Abe C.M. et al. Invasion of differentiated intestinal Caco-2 cells is a sporadic property among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying common intimin subtypes. *Pathog. Dis.* 2014;**70**(2):167–175.  
<https://doi.org/10.1111/2049-632X.12112>
105. Yu L.C.-H. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. *J. Biomed. Sci.* 2018;**25**(1):79. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0483-8>
106. Kommnick C., Leppe A., Hensel M. Correlative light and scanning electron microscopy (CLSEM) for analysis of bacterial infection of polarized epithelial cells. *Sci. Rep.* 2019;**9**(1):17079. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53085-6>
107. Ponnusamy D., Periasamy S., Tripathi B.N. et al. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* invades through M cells and enterocytes across ileal and jejunal mucosa of lambs. *Res. Vet. Sci.* 2013;**94**(2):306–312.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.023>
108. Wells C.L., van de Westerlo E.M., Jechorek R.P. et al. Exposure of the lateral enterocyte membrane by dissociation of calcium-dependent junctional complex augments endocytosis of enteric bacteria. *Shock.* 1995;**4**(3):204–210.  
<https://doi.org/10.1097/00024382-199509000-00009>
109. Gagnon M., Zihler Berner A., Chervet N. et al. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *J. Microbiol. Meth.* 2013;**94**(3):274–279.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.027>
110. Tremlett H., Fadrosch D.W., Faruqi A.A. et al. Associations between the gut microbiota and host immune markers in pediatric multiple sclerosis and controls. *BMC Neurol.* 2016;**16**(1):182. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0703-3>
111. Cordeiro F., da Silva R.I.K., Vargas-Stampe T.L.Z. et al. Cell invasion and survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within cultured human intestinal epithelial cells. *Microbiology.* 2013;**159**(8):1683–1694.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.064204-0>

112. Zareie M., Johnson-Henry K., Jury J. et al. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut*. 2006;**55**(11):1553–1560. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.080739>
113. Campana R., van Hemert S., Baffone W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog.* 2017;**9**:12. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0162-4>
114. Khodaii Z., Ghaderian S.M.H., Natanzi M.M. Probiotic Bacteria and Their Supernatants Protect Enterocyte Cell Lines From Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) Invasion. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 2017;**6**(3):183–189. <https://doi.org/10.22088/acadpub.BUMS.6.3.183>
115. Stinissen P., Raus J., Zhang J. Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit. Rev. Immunol.* 1997;**17**(1):33–75. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v17.i1.20>
116. Hafler D.A., Slavik J.M., Anderson D.E. et al. Multiple sclerosis. *Immunol. Rev.* 2005;**204**:208–231. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00240.x>
117. Engelhardt B. Regulation of immune cell entry into the central nervous system. *Res. Prob. Cell Diff.* 2006;**43**:259–280. [https://doi.org/10.1007/400\\_020](https://doi.org/10.1007/400_020)
118. Zamvil S.S., Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu. Rev. Immunol.* 1990;**8**:579–621. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.08.040190.003051>
119. Hickey W.F. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol.* 1991;**1**(2):97–105. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1991.tb00646.x>
120. Benveniste E.N. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;**9**(3–4):259–275. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(98\)00015-x](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(98)00015-x)
121. Sonobe Y., Jin S., Wang J. et al. Chronological changes of CD4(+) and CD8(+) T cell subsets in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis. *Tohoku J. Exp. Med.* 2007;**213**(4):329–339. <https://doi.org/10.1620/tjem.213.329>
122. Weiss H.A., Millward J.M., Owens T. CD8+ T cells in inflammatory demyelinating disease. *J. Neuroimmunol.* 2007;**191**(1–2):79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.09.011>
123. Dombrowski Y., O'Hagan T., Dittmer M. et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat. Neurosci.* 2017;**20**(5):674–680. <https://doi.org/10.1038/nn.4528>
124. Kohm A.P., Carpentier P.A., Anger H.A. et al. Cutting Edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2002;**169**(9):4712–4716. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.4712>
125. Zhang X., Koldzic D.N., Izikson L. et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 2004;**16**(2):249–256. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh029>

126. Zhitnukhin Yu.L., Abdurasulova I.N., Tarasova E.A. et al. Osobennosti dinamiki tsirkuliruyushchikh i ekspressiruyemykh tsitokinov pri induktsii eksperimental'nogo allergicheskogo entsefalomyelita [Dynamics of circulating and expressed cytokines upon induction of experimental allergic encephalomyelitis]. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2008;**10**(2–3):193–202. (In Russ.) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2008-2-3-193-202>
127. Weiner H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* 2001;**182**:207–214. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2001.1820117.x>
128. Hansmann L., Schmidl C., Kett J. et al. Dominant Th2 differentiation of human regulatory T cells upon loss of FOXP3 expression. *J. Immunol.* 2012;**188**(3):1275–1282. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102288>
129. Curotto de Lafaille M.A., Lafaille J.J. Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009;**30**(5):626–635. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.002>
130. Weiner H.L. Oral tolerance: Immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* 2001;**3**(11):947–954. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01456-3](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01456-3)
131. Travis M.A., Sheppard D. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2014;**32**:51–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120257>
132. Konkel J.E., Maruyama T., Carpenter A.C. et al. Control of the development of CD8 $\alpha\alpha$ + intestinal intraepithelial lymphocytes by TGF-b. *Nat. Immunol.* 2011;**12**(4):312–319. <https://doi.org/10.1038/ni.1997>
133. Chen M.-L., Yan B.-S., Kozoriz D. et al. Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 2009;**39**(12):3423–3435. <https://doi.org/10.1002/eji.200939441>
134. Filaci G., Fenoglio D., Fravega M. et al. CD8+ CD28– T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J. Immunol.* 2007;**179**(7):4323–4334. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4323>
135. Ellis S.D.P., McGovern J.L., van Maurik A. et al. Induced CD8+FoxP3+ Treg cells in rheumatoid arthritis are modulated by p38 phosphorylation and monocytes expressing membrane tumor necrosis factor alpha and CD86. *Arthritis Rheumatol.* 2014;**66**(10):2694–2705. <https://doi.org/10.1002/art.38761>
136. Gross C.C., Schulte-Mecklenbeck A., Klinsing S. et al. Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2016;**3**(1):e183. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000183>
137. Kehl J.H., Wakefield L.M., Roberts A.B. et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 1986;**163**(5):1037–1050. <https://doi.org/10.1084/jem.163.5.1037>

138. McKarns S.C., Schwartz R.H. Distinct effects of TGF-beta 1 on CD4+ and CD8+ T cell survival, division, and IL-2 production: a role for T cell intrinsic Smad3. *J. Immunol.* 2005;**174**(4):2071–2083. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.2071>
139. Shalaby M.R., Ammann A.J. Suppression of immune cell function in vitro by recombinant human transforming growth factor-beta. *Cell Immunol.* 1988;**112**(2):343–350. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(88\)90303-6](https://doi.org/10.1016/0008-8749(88)90303-6)
140. Shull M.M., Ormsby I., Kier A.B. et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 1992;**359**(6397):693–699. <https://doi.org/10.1038/359693a0>
141. Li M.O., Wan Y.Y., Sanjabi S. et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2006;**24**:99–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>
142. Mantel P.Y., Schmidt-Weber C.B. Transforming growth factor-beta: Recent advances on its role in immune tolerance. *Methods Mol. Biol.* 2011;**677**:303–338. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0_21)
143. Mirshafiey A., Mohsenzadegan M. TGFbeta as a promising option in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology.* 2009;**56**(6–7):929–936. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.02.007>
144. Racke M.K., Dhib-Jalbut S., Cannella B. et al. Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta1. *J. Immunol.* 1991;**146**(9):3012–3017. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.146.9.3012>
145. Racke M.K., Sriram S., Carlino J. et al. Long-term treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta2. *J. Neuroimmunol.* 1993;**46**(1–2):175–183. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(93\)90247-v](https://doi.org/10.1016/0165-5728(93)90247-v)
146. Li M.O., Wan Y.Y., Flavell R.A. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007;**26**(5):579–591. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.014>
147. Mangan P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the TH17 lineage. *Nature.* 2006;**441**(7090):231–234. <https://doi.org/10.1038/nature04754>
148. Bettelli E., Carrier Y., Gao W. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;**441**(7090):235–238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>
149. Yang Y., Weiner J., Liu Y. et al. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J. Exp. Med.* 2009;**206**(7):1549–1564. <https://doi.org/10.1084/jem.20082584>
150. McGeachy M.J., Chen Y., Tato C.M. et al. The interleukin-23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin-17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat. Immunol.* 2009;**10**(3):314–324. <https://doi.org/10.1038/ni.1698>

151. Ghoreschi K., Laurence A., Yang X.-P. et al. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signaling. *Nature*. 2010;**467**(7318):967–971. <https://doi.org/10.1038/nature09447>
152. Jäger A., Dardalhon V., Sobel R.A. et al. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J. Immunol.* 2009;**183**(11):7169–7177. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901906>
153. Park S.R., Seo G.Y., Choi A.J. et al. Analysis of transforming growth factor-beta1-induced Ig germline  $\gamma$ 2b transcription and its implication for IgA isotype switching. *Eur. J. Immunol.* 2005;**35**(3):946–956. <https://doi.org/10.1002/eji.200425848>
154. Laouar Y., Town T., Jeng D. et al. TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;**105**(31):10865–10870. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805058105>
155. Simpson J.E., Newcombe J., Cuzner M.L. et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other  $\beta$ -chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 1998;**84**(2):238–249. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(97\)00208-7](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(97)00208-7)
156. Van der Voorn P., Tekstra J., Beelen R.H. et al. Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* 1999;**154**(1):45–51. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65249-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65249-2)
157. Berman J.W., Guida M.P., Warren J. et al. Localization of monocyte chemoattractant peptide-1 expression in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis and trauma in the rat. *J. Immunol.* 1996;**156**(8):3017–3023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.156.8.3017>
158. Fischer F.R., Santambrogio L., Luo Y. et al. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: Effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression. *J. Neuroimmunol.* 2000;**110**(1–2):195–208. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(00\)00351-9](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(00)00351-9)

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Абдурасулова Ирина Николаевна – к.б.н., зав. лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга, Физиологический отдел им. академика И.П. Павлова, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: i\_abdurasulova@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1010-6768>

Мацулевич Анна Викторовна – научный сотрудник лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга, Физиологический отдел им. академика И.П. Павлова, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: cat\_fly@bk.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-0030-9548>

Грефнер Надежда Михайловна — к.б.н., ведущий инженер лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга, Физиологический отдел им. академика И.П. Павлова, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: ngrafner@yandex.ru  
<https://orcid.org/0009-0005-9795-1180>

Трофимов Александр Николаевич — старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга, Физиологический отдел им. академика И.П. Павлова, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: alexander.n.trofimov@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-6745-6035>

Кудрявцев Игорь Владимирович — к.б.н., зав. лаборатории клеточной иммунологии, Отдел вирусологии и иммунологии им. академика А.А. Смородинцева, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: igorek1981@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>

Ермоленко Елена Игоревна — д.м.н., зав. лаборатории биомедицинской микроэкологии, Отдел молекулярной микробиологии им. академика РАН А.А. Тоголяна, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: lermolenko1@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-2569-6660>

#### AUTHOR INFORMATION

Abdurasulova, Irina N. — Cand. Sc. (Biology); Head of the Laboratory of Neurobiology of Integrative Brain Functions, Academician I.P. Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: i\_abdurasulova@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1010-6768>

Matsulevich, Anna V. — Research Officer, Laboratory of Neurobiology of Integrative Brain Functions, Academician I.P. Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: cat\_fly@bk.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-0030-9548>

Grefner, Nadezhda M. — Cand. Sc. (Biology); Lead Engineer, Laboratory of Neurobiology of Integrative Brain Functions, Academician I.P. Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: ngrafner@yandex.ru  
<https://orcid.org/0009-0005-9795-1180>

Trofimov, Alexander N. — Cand. Sc. (Biology); Senior Research Officer, Laboratory of Neurobiology of Integrative Brain Functions, Academician I.P. Pavlov Department of Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: alexander.n.trofimov@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-6745-6035>

Kudryavtsev, Igor V. — Cand. Sc. (Biology); Head of the Laboratory of Cellular Immunology, Academician A.A. Smorodintsev Department of Virology and Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: igorek1981@yandex.ru,  
<https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>

Ermolenko, Elena I. — Ph.D. (Medicine); Head of the Laboratory of Biomedical Microecology, Academician of the Russian Academy of Sciences A.A. Totolyan Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: lermolenko1@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-2569-6660>

Поступила в редакцию 22.07.2025  
После доработки 03.09.2025  
Принята к публикации 03.09.2025

Received July 22, 2025  
Revised September 3, 2025  
Accepted September 3, 2025