

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**Захарова Юлия Викторовна**

**РОЛЬ БИФИДОБАКТЕРИЙ В КИШЕЧНОМ  
МИКРОБИОЦЕНОЗЕ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ**

**03.02.03 – микробиология**

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

**Научный консультант:**  
доктор медицинских наук,  
доцент Л.А. Леванова

**Кемерово – 2019**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
Актуальность темы исследования .....	4
Степень разработанности темы исследования .....	5
Цель исследования .....	7
Задачи исследования .....	7
Научная новизна .....	8
Теоретическая и практическая значимость .....	9
Методология и методы исследования .....	11
Предмет изучения .....	12
Материал исследования.....	13
Микробиологические методы исследования .....	15
Физико-химические методы исследования .....	24
Статистические методы исследования .....	30
Личное участие автора в получении результатов .....	31
Положения, выносимые на защиту .....	33
Степень достоверности и апробация результатов .....	33
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	36
1.1. Механизмы доминирования бифидобактерий в кишечном микробиоценозе, их роль в поддержании здоровья человека .....	36
1.2. ВИЧ-ассоциированные изменения микрофлоры кишечника .....	48
1.3. Особенности биологических свойств кишечной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных людей, роль в патогенезе инфекции .....	57
1.4. Специфическая модуляция микробиоты кишечника у ВИЧ- инфицированных людей .....	62
1.4.1. Пробиотики при ВИЧ-инфекции: преимущества и риски применения .....	63
1.4.2. Использование пребиотиков и симбиотических препаратов при ВИЧ-ассоциированных микробиологических нарушениях .....	67
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	
<b>ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ</b> .....	71
2.1. Биоразнообразие культивируемой микрофлоры у ВИЧ- инфицированных детей .....	71
2.2. Состояние кишечного микробиоценоза ВИЧ-инфицированных детей .....	74
2.3. Состояние кишечной микрофлоры у детей на разных стадиях ВИЧ-инфекции .....	83
2.4. Факторы вирулентности энтеробактерий и стафилококков у ВИЧ-	

инфицированных детей .....	91
2.5. Биологический профиль бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей, в зависимости от степени микрoэкологических нарушений .....	96
<b>ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БИФИДОБАКТЕРИЙ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ</b>	107
3.1. Молекулярные механизмы гидрофобности бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей .....	107
3.2. Молекулярные особенности липотейхоевых кислот у бифидобактерий при ВИЧ-инфекции .....	115
3.3. Аутоагрегация и специфическая адгезия бифидобактерий .....	119
3.4. Антиоксидантная активность бифидобактерий при ВИЧ-инфекции	121
3.5. Распространенность и уровень экспрессии факторов антагонизма у бифидобактерий .....	125
3.6. Влияние липаз стафилококков на состояние клеточной мембраны бифидобактерий <i>in vitro</i> .....	128
3.7. Оценка роли бифидобактерий в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей .....	132
<b>ГЛАВА 4. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИФИДОБАКТЕРИЙ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ</b>	136
4.1. Активность метаболизма аминокислот бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей .....	136
4.2. Биологические эффекты экзометаболитов бифидобактерий, изолированных от ВИЧ-инфицированных детей .....	140
<b>ГЛАВА 5. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ УПРАВЛЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЕЙ И БИОЛОГИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ БИФИДОБАКТЕРИЙ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ</b>	146
5.1. Технология выбора пробиотического штамма бифидобактерий для ВИЧ-инфицированных детей .....	148
5.2. Средства и прикладные точки для модуляции биологических свойств и содержания бифидофлоры при ВИЧ-инфекции .....	154
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	161
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	182
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b> .....	184
<b>ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ</b> .....	186
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	187
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	188
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 1</b> .....	216

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Среди более 500 видов микроорганизмов, заселяющих толстый кишечник, бифидобактерии занимают одну из лидирующих позиций по количественному содержанию, функциональной активности и значимости для всего кишечного микробиоценоза [9, 52, 101, 142, 154]. Представители рода *Bifidobacterium* относятся к доминирующей микрофлоре кишечника, формирующие сложные межмикробные связи и вступающие в различные типы взаимоотношений с другими представителями кишечного микробиоценоза [53, 61, 213]. Доминирование бифидобактерий в кишечном микробиоценозе связывают с высоко развитой системой адгезинов, продукцией бактериоцинов и других антимикробных субстанций, с уникальной системой ферментов - «бифидо-шунта», который обуславливает высокую скорость метаболизма и широкую субстратную специфичность микроорганизмов рода *Bifidobacterium* [41, 123, 139, 167]. Бифидобактерии путем прямого или опосредованного воздействия модулируют факторы персистенции, поверхностные свойства, био пленкообразующую активность, а также количественное содержание факультативной кишечной микрофлоры [72, 76]. Продукты обмена веществ бифидобактерий используются в качестве субстрата представителями кишечного микробиоценоза и рассматриваются как вариант «перекрестного питания» и регулирования микробиоценоза [126, 189, 210]. Таким образом, бифидобактерии рассматривают как естественных биорегуляторов состояния кишечного микробиоценоза.

Изменения кишечного микробиоценоза при ВИЧ-инфекции наблюдаются уже на 21-28 сутки от момента инфицирования, так как кишечник является одним из локусов репликации ВИЧ [164, 195]. Кроме того, ингибирующие действие на микробиоту кишечника оказывают антиретровирусные препараты, потенцируя развитие микрoэкологических нарушений [147]. Нарушается структура микробиоценоза, отмечается изменение метаболизма микрофлоры при ВИЧ-инфекции. Снижается способность кишечных бактерий синтезировать некоторые

аминокислоты, отмечают снижение числа генов, кодирующих ферменты энергетических путей. Кроме того, активизируется кинурениновый путь распада триптофана и в кишечнике накапливаются катаболиты, которые изменяют баланс циркулирующих Treg и Th17 клеток. Это ведет к нарушению мукозального иммунитета и увеличению микробной транслокации через слизистую оболочку кишечника [35, 211, 216]. Микрофлора, попадая в кровоток, способствует развитию хронической иммунной дисфункции, растут риски развития смерти у ВИЧ-инфицированных [133, 157], в связи с этим очевидна необходимость коррекции микрофлоры кишечника при ВИЧ-инфекции. Однако, имеются противоречивые данные по использованию пробиотических бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных [147, 195]. Обусловлено это недостаточностью данных о роли бифидобактерий в регулировании кишечного микробиоценоза при ВИЧ-инфекции и о влиянии на течение заболевания. Для решения этой проблемы необходимы классические бактериологические исследования по изучению свойств бифидофлоры при взаимодействии с другими представителями кишечного микробиоценоза пациентов с ВИЧ-статусом.

### **Степень разработанности темы исследования**

Установлено, что при ВИЧ-инфекции снижается количественный уровень некоторых представителей типа *Firmicutes*, таких как *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium spp.*, в том числе с иммунорегуляторными свойствами [211]. Увеличивается количественный уровень представителей рода *Prevotella* [176], снижается уровень *Bacteroides spp.* [120]. Данные микроорганизмы играют ключевую роль в поддержании адаптивного иммунитета, индуцируя превращение CD4<sup>+</sup> Т-клеток в Treg. Другие бактериальные индукторы циркулирующих Treg - *B. massiliensis*, *B. thetaiotaomicron*, *Parabacteroides distasonis* или *B. uniformis* - достигают очень низкого количественного уровня только при поздних стадиях ВИЧ-инфекции [111]. Большинство исследователей отмечают у ВИЧ-инфицированных увеличение удельного веса протеобактерий [144, 155, 211]. У нелеченных и прошедших курс антиретровирусной терапии

ВИЧ-инфицированных пациентов повышается содержание не только индигенных и условно-патогенных энтеробактерий рода *Escherichia*, *Klebsiella*, но также отмечается рост частоты колонизации слизистой патогенными бактериями родов *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.* [57, 164]. В экспериментах *in vitro* установлено, что *Escherichia coli* индуцирует увеличение репликации ВИЧ-1 [111]. Уровень липополисахарида энтеробактерий в кровотоке ВИЧ-инфицированных коррелирует со смертностью пациентов и с развитием у них гипертонии [132]. Секвенирование содержимого кишечника ВИЧ-инфицированных свидетельствуют об изменениях микробиома, которые сохраняются даже при краткосрочных курсах антиретровирусной терапии [152, 155, 164].

Установлено, что ВИЧ оказывает значительное влияние на метаболизм кишечной экосистемы. Метапротеомный анализ показал низкий уровень экспрессии белков бактериями при ВИЧ-инфекции, участвующих в обмене пролина, фенилаланина и лизина [211, 216]. При этом у ВИЧ-инфицированных пациентов в кишечнике накапливаются продукты кинуренинового пути окисления триптофана, тогда как у здоровых людей данные продукты не регистрируются [211]. Продукты катаболизма триптофана подавляют Т-клеточный ответ при аутоиммунных заболеваниях, при отторжении трансплантата, вирусных инфекциях, а при ВИЧ-инфекции способствуют прогрессированию заболевания [35, 107]. Обнаружено, что более 140 родов микроорганизмов имеют отношение к метаболизму триптофана [145]. Для микрофлоры людей с ВИЧ-статусом характерно большое количество активных генов, «ответственных» за функционирование рибосом, за биосинтез ЛПС. При этом у микробиоты пациентов с ВИЧ-инфекцией, по сравнению в ВИЧ-негативными людьми снижено число экспрессирующих генов, кодирующих ферменты энергетических путей, таких как метаболизм пирувата, гликолиз и глюконеогенез [143].

Очевидно, что пациенты с ВИЧ-инфекцией нуждаются в коррекции микрoэкологических нарушений кишечника. Однако в 39 рандомизированных контролируемых исследований по оценке пробиотикотерапии на течение ВИЧ-инфекции и маркеры бактериальной транслокации получены противоречивые

результаты – от положительного эффекта до его отсутствия [195]. На основе мета-анализа однозначно было доказано отсутствие рисков развития сепсиса, что позволило говорить о пробиотиках, как о перспективных средствах при лечении ВИЧ-инфекции [190].

Таким образом, данные о состоянии микробиоценоза кишечника ВИЧ-инфицированных немногочисленны, противоречивы, получены при исследованиях на группах небольшого объема. Не изучены биологические свойства как доминантных, так и ассоциативных представителей кишечного микробиоценоза. Сложно судить о функциональной полноценности и роли бифидобактерий в регулировании микробиоценоза у ВИЧ-инфицированных пациентов. Поэтому требуются классические микробиологические исследования, позволяющие изучить механизмы взаимодействий доминантных бифидобактерий с другими представителями кишечного сообщества, определить принципы и средства коррекции микрoэкологических нарушений.

### **Цель исследования**

Определение особенностей жизнедеятельности представителей рода *Bifidobacterium* на основе изучения их функциональных характеристик при взаимодействии с кишечной условно-патогенной микрофлорой у ВИЧ-инфицированных детей.

### **Задачи исследования**

1. Изучить состояние кишечного микробиоценоза, характер изменений микрофлоры кишечника, выявить группы риска по развитию глубоких микрoэкологических нарушений у ВИЧ-инфицированных детей.
2. Исследовать биологические свойства бифидобактерий у детей с ВИЧ-инфекцией, определить характер функциональных изменений бифидофлоры при разных степенях микрoэкологических нарушений кишечника.
3. Определить частоту формирования и типы симбиотических связей бифидобактерий с условно-патогенной микрофлорой.

4. Выявить у условно-патогенных микроорганизмов частоту продукции факторов инвазии, рассчитать риски транслокации микрофлоры через слизистую кишечника ВИЧ-инфицированных детей. Оценить *in vitro* влияние липаз стафилококков на клеточные мембраны бифидобактерий.
5. Оценить у бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей активность синтеза отдельных аминокислот, в том числе их участие в обмене триптофана и патогенетически значимого кинуренина.
6. Обосновать принципы и средства коррекции бифидофлоры у ВИЧ-инфицированных детей.

### Научная новизна

Установлены особенности кишечного микробиоценоза у ВИЧ-инфицированных детей, выражающиеся в высокой частоте колонизации слизистой кишечника энтеробактериями и стафилококками при сохранении высокой частоты и численности бифидобактерий. Характер микрофлоры у ВИЧ-инфицированных пациентов при развитии микрoэкологических нарушений отражает общие закономерности изменений кишечного микробиоценоза, характеризующиеся снижением уровня индигенной микрофлоры и повышением содержания условно-патогенных микросимбионтов. Группами риска по развитию выраженных микрoэкологических нарушений являются дети со 2 и 4 стадиями ВИЧ-инфекции.

Стафилококки у ВИЧ-инфицированных детей характеризуются высоким уровнем продукции липаз, что повышает риски транслокации микроорганизмов через слизистую кишечника и является фактором, определяющим поверхностные свойства бифидобактерий, изменение которых связано с модуляцией жирнокислотного состава клеточных мембран.

Выявлены особенности жизнедеятельности бифидобактерий в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей, что обусловлено изменениями их функциональных свойств, как доминантных кишечных микросимбионтов. Функциональная недостаточность представителей рода *Bifidobacterium*,



проявляющаяся снижением гидрофобности, специфической адгезии, кислотообразования, антиоксидантной активности формируется уже при второй степени микрoэкологических нарушений кишечника, что предопределяет необходимость ранней коррекции кишечной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных детей, до развития функциональной неполноценности бифидофлоры.

Установлено, что бифидобактерии у ВИЧ-инфицированных детей являются активными продуцентами аминокислот. Бифидобактерии участвуют в обмене триптофана, что выражается высоким уровнем продукции данной аминокислоты и низкой накопительной способностью кинуренина, имеющего патогенетическое значение при ВИЧ-инфекции, что расширяет круг клинических синдромов, корректируемых с помощью бифидосодержащих препаратов, и создает предпосылки для создания пробиотических композиций для ВИЧ-инфицированных детей.

Показана низкая биосовместимость бифидобактерий, выделенных от детей с ВИЧ-инфекцией, с пробиотическими штаммами, что послужило основой для разработки алгоритма персонализированного выбора пробиотиков при ВИЧ-инфекции. Предложены подходы по коррекции бифидофлоры у ВИЧ-инфицированных детей, основанные на индивидуализации подбора пробиотических биосовместимых штаммов и восстановлении функциональных характеристик бифидофлоры, формирующихся при взаимодействии с условно-патогенными кишечными микросимбионтами.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Определены функциональные особенности бифидобактерий при взаимодействии с условно-патогенными бактериями в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей, что дополняет фундаментальные знания о закономерностях взаимоотношений микроорганизмов в сложных микробных сообществах и механизмах развития вторичных инфекций при иммунодефицитах. Показано изменение биологических свойств бифидобактерий у ВИЧ-

инфицированных пациентов, что подтверждает современные представления о специфичности качественных модификаций микрофлоры при различных патологических состояниях и обосновывает необходимость разработки методов коррекции микробиологических нарушений для пациентов с конкретной нозологией.

Установлена высокая активность бифидобактерий при ВИЧ-инфекции в синтезе пролина, фенилаланина, лизина, серина, цистеина, триптофана, что указывает на значительный вклад бифидофлоры в нивелирование нарушений белкового обмена у ВИЧ-инфицированных детей и обуславливает важность поддержания количественного уровня данных микросимбионтов при ВИЧ-инфекции. Низкая способность бифидобактерий пациентов аккумулировать кинуренин, как токсичный продукт распада триптофана, делает необходимым поиск штаммов с кинуренин-накопительной активностью с целью создания пробиотиков для когорты ВИЧ-инфицированных пациентов.

Предложен новый способ получения бифидогенного фактора, что определяет возможности создания препаратов для коррекции нормальной микрофлоры с селективным эффектом (патент на изобретение РФ № 2553513 «Способ получения бифидогенного фактора» от 20.06.2015 г.).

Разработан новый количественный способ определения антиоксидантной активности микроорганизмов (патент на изобретение РФ № 2465593 «Способ количественного определения антиоксидантной активности микроорганизмов» от 27.10.2012 г.), что позволило установить нарушения антиоксидантных свойств бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных и определить мишени при коррекции биологических свойств.

Сформулированы и обоснованы подходы в коррекции бифидофлоры при ВИЧ-инфекции, которые предполагают восстановление количественного содержания бифидобактерий и нивелирование их функциональной недостаточности. Разработанный алгоритм персонализированного выбора бифидосодержащего пробиотика для ВИЧ-инфицированных пациентов позволяет повысить эффективность пробиотикотерапии, за счет применения

биосовместимых штаммов. В качестве средств для модуляции функциональных свойств бифидобактерий предложены препараты с мембранопротекторной и антиоксидантной активностью, что определяет новые методологические подходы коррекции кишечного микробиоценоза у лиц с иммунодефицитами.

Разработаны и внедрены в практику методические рекомендации:

1. «Методы исследования биологических свойств микроорганизмов», утвержденные 2. 07. 2013 г. начальником Департамента охраны здоровья населения Кемеровской области (акт внедрения ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С. В. Беяева» от 13.12.2018 г.).
2. «Бифидобактерии: выделение, идентификация, изучение биологических свойств», утвержденные 3. 11. 2017 г. начальником Департамента охраны здоровья населения Кемеровской области (акт внедрения ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С. В. Беяева» от 13. 12. 2018 г.).
3. «Исследование микрофлоры кишечника у ВИЧ-инфицированных детей. Коррекция микрoэкологических нарушений», утвержденные 9. 11. 2018 г. и.о. начальника Департамента охраны здоровья населения Кемеровской области (акт внедрения ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая инфекционная больница» от 4. 12. 2018 г.).

Материалы работы используются в учебном процессе последипломного образования кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава России (акт внедрения от 20.09.2018 г.).

### **Методология и методы исследования**

В основе методологии был положен принцип исследования симбиотических связей бифидобактерий с условно-патогенными микроорганизмами в кишечном микробиоценозе на основе комплексной оценки их биологических свойств. Программа исследования предусматривала 5 этапов: подготовительный (организационный), экспериментально-исследовательский, этапа обработки полученной информации, анализа полученных данных, этап разработки практических рекомендаций. На основании анализа литературы проводили

обоснование цели и задач исследования, определяли объект, объем и единицы наблюдения, осуществляли выбор и описание методов исследования. Экспериментально-исследовательский этап включал изучение структурно-функциональных характеристик бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей и механизмов их взаимодействия с кишечными микросимбионтами. Исследование вели в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта исследования» (1964 г. с поправками от 2013 г.), эксперименты на животных велись с соблюдением норм биоэтики (протокол комитета по этике № 166/к от 27.01.2016 г.). После анализа данных и верификации результатов исследования разработаны методические рекомендации по изучению биологических свойств микрофлоры кишечника и по коррекции кишечной нормофлоры при ВИЧ-инфекции. В работе использованы микробиологические (бактериологические, биологические), физико-химические (хроматографические, спектральные) (Таблица 1) и статистические методы исследования.

Таблица 1 – Виды и количество исследований

Наименование исследований		Кол-во исследований
Микробиологические исследования (микробиоценозы)		163
Микробиологические исследования (биологические свойства бактерий)		2032
Биологические исследования на животных		42
Хроматографические методы	Высокоэффективная жидкостная хроматография	48
	Газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием	45
	Тонкослойная хроматография	3
Инфракрасная спектроскопия		3

### Предмет изучения

Микробиоценозы ВИЧ-инфицированных детей, состав и биологические свойства бифидобактерий, отражающие их адгезивный, колонизационный,

антагонистический и биохимический потенциал, состав и свойства условно-патогенных микросимбионтов кишечника при ВИЧ-инфекции.

### Материал исследования

#### Штаммы микроорганизмов

В работе использованы коллекционные (Таблица 2) и выделенные из коммерческих пробиотических препаратов (Таблица 3) штаммы микроорганизмов.

Таблица 2 – Коллекционные штаммы микроорганизмов

№	Вид микроорганизма и номер штамма	Коллекция
1	<i>Bifidobacterium bifidum 1</i>	Государственная коллекция нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
2	<i>Bifidobacterium bifidum 791</i>	Государственная коллекция нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
3	<i>Micrococcus lysodeiaticus 2665</i>	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ

Таблица 3 – Штаммы бифидобактерий, выделенные из коммерческих пробиотических препаратов

Торговое название препарата	Страна производитель	Название штаммов бифидобактерий
Линекс®	Словения	<i>Bifidobacterium infantis</i>
Линекс® форте	Германия	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>
ПробиоЛог®	Франция	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> (BB-12)
Бифидумбактерин™	Россия	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

Продолжение таблицы 3

Бак Сет форте™	Великобритания	<i>Bifidobacterium bifidum</i> PXN23 <i>Bifidobacterium longum</i> PXN30 <i>Bifidobacterium breve</i> PXN 25 <i>Bifidobacterium infantis</i> PXN 27
Бак Сет беби®	Великобритания	<i>Bifidobacterium breve</i> PXN 25 <i>Bifidobacterium infantis</i> PXN 27 <i>Bifidobacterium longum</i> PXN30
Максилак®	Польша	<i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Примадофилюс® Бифидус	США	<i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium longum</i>

### Животные

Биологические эффекты экзометаболитов бифидобактерий белково-пептидной природы изучены на 30 мышах имбредной линии BALB/c. Возраст животных был 6-8 недель, масса тела 18-20 г. Животные получены из Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (НИИФиРМ им. Е.Д.Гольдберга Томского НИМЦ). Работы с животными вели в соответствии с Директивой Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [25], а также в соответствии с нормативными документами Российской Федерации [71].

### Коммерческие препараты

Диклофенак натрия – коммерческий препарат (ФК «Озон Фармацевтика», Россия). Фармакологическая группа: нестероидный противовоспалительный препарат. Раствор для парентерального введения, в виде прозрачной, бесцветной

или светло-желтой жидкости, в ампулах по 3 мл. В 1 мл раствора содержится 25 мг действующего вещества – диклофенака натрия.

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (торговое название «Мексидол»®) – коммерческий препарат («Фармасофт» НПК ООО, Россия). Фармакологическая группа: антиоксидант. Раствор для внутривенного и внутримышечного введения, бесцветный или слегка желтоватый, прозрачный, в ампулах по 2 мл.

### Образцы материалов для исследования

Материал получали от детей с ВИЧ-инфекцией, госпитализированных в отделение капельных инфекций (№ 1) Государственного автономного учреждения здравоохранения Кемеровской области "Кемеровская областная клиническая инфекционная больница" (ГАУЗ КО «КОКИБ»), при участии врачей-инфекционистов Лихтенвальд А. С. и Марковской А. А.

Сбор материала и бактериологическое исследование содержимого толстой кишки проведено в соответствии с нормативными требованиями [72]. Забор материала вели до начала антибактериальной терапии и/или не ранее, чем через 1 месяц после приема антибиотиков. Доставка материала осуществлялась в течение 2 часов от момента сбора в термосумках.

На преаналитическом этапе материал от пациентов регистрировали, определяли рН кала с помощью бумаги индикаторной универсальной (Lachema, Чехия). Готовили разведения от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$  и засеивали на питательные среды.

### **Микробиологические методы исследования**

Микробиологические методы исследования включали количественный бактериологический метод изучения кишечного микробиоценоза, исследование способности бактерий к адгезии, определение типа взаимодействия микроорганизмов, исследование факторов вирулентности условно-патогенных бактерий (ДНКазная, липазная, гемолитическая активности). Активность экзометаболитов бифидобактерий была изучена с использованием биологического метода.

Изучение кишечного микробиоценоза

Выделение и определение количественного содержания бифидобактерий осуществляли методом серийных разведений с использованием Бифидум-среды (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посевы культивировали в анаэробной атмосфере в анаэроостатах (BBL, США) при температуре 37<sup>0</sup> С в течение двух суток. С подозрительных колоний делали мазки, в мазках по Граму изучали морфологические и тинкториальные свойства бактерий. Подозрительные колонии отсеивали на жидкую Бифидум-среду (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) для накопления чистой культуры, на MRS (HiMedia, Индия) для верификационного теста и параллельно проводили тест на аэротолерантность.

Верификация на родовом уровне включала определение наличия специфического фермента бифидобактерий фруктозо-6-фосфат фосфокетотазы (Ф-6-ФФК). Верификационный тест ставили согласно Scardovi (1986). Для этого микроорганизмы, выращенные на MRS Broth (HiMedia, Индия) промывали дважды 50 мМ фосфатным буфером (рН 6,5). Клетки разрушали ультразвуком на холоду. Далее последовательно добавляли по 0,25 мл раствора натрия фторида, натрия йодоацетата и фруктозо-6-фосфата. Для остановки реакции добавляли смесь, состоящую из гидроксилamina солянокислого, смеси трихлоруксусной кислоты и хлористоводородной кислоты 4 М (1,5 : 1 : 1 по объему). Далее, добавляли 1 мл цвет-индикаторного агента (раствор FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 5% (м/о)). Пробирка без фруктозо-6-фосфата служила в качестве контроля, для упрощения визуального сравнения. При образовании из фруктозо-6-фосфата ацетил-фосфата формировался гидроксамат хелат железа с красновато-фиолетовой окраской, что является показателем наличия Ф-6-ФФК.

Дополнительно подтверждали принадлежность культур к роду *Bifidobacterium* с помощью коммерческой тест-системы API 20 А (bioMerieux, Франция). Бифидобактерии до вида идентифицировали согласно руководству «Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual» (2002) по биохимическим свойствам с помощью коммерческих тест-систем АНАЭРО-TEST 23 (Lachema diagnostica s.r.o., Чехия). Учет результатов проводили через 24 часа с помощью



цветовой шкалы и таблицы интерпретации результатов исследования, предложенных производителем и по Bergey's Manual of Systematic Bacteriology : 2nd ed. (2012).

Выделение других кишечных микросимбионтов проводили с использованием селективных и дифференциально-диагностических питательных сред. Энтеробактерии выделяли на среде Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), энтерококков на Энтерококкагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), стафилококков на желточно-солевом агаре, лактобацилл на среде MRS (HIMEDIA, Индия). Гемофилы выделяли на мясо-пептонном агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 3% взвеси человеческих эритроцитов, грибы на среде № 2 Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и на HiChrome *Candida* Agar (HIMEDIA, Индия).

Идентификацию микроорганизмов проводили с использованием коммерческих тест-систем:

микроорганизмы рода *Staphylococcus* идентифицировали с помощью тест систем STAPHYtest 16 (Lachema diagnostica s.r.o, Чехия) и ПБДС (НПО «Диагностические системы», Россия);

микроорганизмы рода *Streptococcus* идентифицировали с помощью STREPTOtest 16 (Lachema diagnostica s.r.o , Чехия);

энтеробактерии - ENTEROtest 24 (Lachema diagnostica s.r.o, Чехия), ПБДЭ (НПО «Диагностические системы», Россия) и СИБ для энтеробактерий набор № 2 (НПО «Микроген», Нижний-Новгород);

лактобациллы, пропионибактерии, актиномицеты - АНАЭРО-TEST 23 (Lachema diagnostica s.r.o., Чехия) и API 20 A (bioMerieux, Франция);

грибы роды *Candida* - по ростовым трубкам (РТ-тест) и с помощью тест-системы AUXOCOLOR (BioRad, Франция).

Выделены 1150 кишечных микросимбионтов, идентифицированы до рода 238, до вида 912 культур. Состояние микробиоценоза кишечника оценивали согласно [63].

Изучение специфической адгезии бактерий (по В.И. Брилису, 1986)

К 0,5 мл эритроцитарной массы человека 0 (I) группы Rh<sup>+</sup> добавляли 2 мл стерильного 0,9% раствора NaCl (pH=7,2), что позволяло добиться густоты взвеси около  $10^8$  эритроцитов в 1 мл. Готовили взвесь суточной культуры бактерий в стерильном растворе 0,9% NaCl, стандартизировали по стандарту мутности MacFarland (№ 5), что соответствует  $1,5 \times 10^9$  бактериальных клеток в 1 мл. Эритроцитарную массу и бактериальную взвесь по 50 мкл в пробирке типа «Эппендорф» перемешивали путем встряхивания. Для каждого компонента брали чистый наконечник для пипетки. Инкубировали эритроциты с бактериями при 37<sup>0</sup> С в течение 1 часа в термостате, регулярно через 15 минут встряхивая смесь. После инкубации с помощью пипетки по 50 мкл смеси наносили ближе к одному из краев предметного стекла и с помощью второго стекла делали мазок по типу «толстой капли». Высушивали мазки естественным способом. Фиксировали химическим методом с помощью 96 % спирта. Окрашивали по Романовскому-Гимзе в течение 15 - 20 минут, далее проводили иммерсионную микроскопию, определяли следующие показатели:

СПА – средний показатель адгезии – это среднее количество бактерий, прикрепившихся к одному эритроциту,

КУЭ – коэффициент участия эритроцитов – это доля эритроцитов, с наличием на поверхности адгезировавшихся микробов.

ИАМ – индекс адгезии микроорганизмов – среднее число микроорганизмов на одном эритроците, определяли с использованием формулы:

$$\text{ИАМ} = (\text{СПА} \times 100) / \text{КУЭ}.$$

Интерпретировали результаты следующим образом: неадгезивные микроорганизмы ИАМ  $\leq 1,75$ ; низкоадгезивные ИАМ=1,76-2,5; среднеадгезивные ИАМ=2,51 - 4,0; высокоадгезивные ИАМ  $\geq 4,0$ .

Метод оценки отсроченного антагонизма бактерий [64]

Использовали метод перпендикулярных штрихов. Суточную культуру испытуемых бактерий высевали на Мюллер-Хинтон агар (ФБУН ГНЦ ПМБ,

Оболенск) в центр чашки в виде штриха. Далее проводили культивирование при 37<sup>0</sup> С в течение 24 часов с учетом типа дыхания бактерий. Через сутки подсевали вторую культуру в виде перпендикулярного штриха на расстоянии от зоны роста 1-2 мм. Снова осуществляли культивирование в течение 24 часов. Учет результатов осуществляли путем измерения зоны задержки роста культур в мм.

Оценка биосовместимости штаммов бифидобактерий (по Н. А. Глушановой, 1999)

Выращивали испытуемые культуры на жидкой Бифидум-среде (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) в течение 18-20 часов при 37<sup>0</sup> С. Основной опыт ставили на агаризированной среде Мюллера-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Одну испытуемую культуру наносили бактериологической петлей d=3 мм на питательную среду и оставляли до полного впитывания при комнатной температуре. Стерильной петлей того же диаметра, отступив 1-2 мм от края первого пятна, наносили каплю второй испытуемой культуры. Растекаясь по поверхности, вторая капля попадала на первую культуру наполовину диаметра. В этой части культуры развивались совместно, конкурируя друг с другом. После высыхания второй капли, чашки с посевами инкубировали в течение 24-48 часов с учетом типа дыхания микроорганизмов при 37<sup>0</sup> С. На одной чашке ставили до 10 опытов. В качестве контроля наслаивали две капли одной и той же культуры. В случае обнаружения роста двух исследуемых культур их считали биосовместимыми. Бионесовместимость регистрировали при отсутствии роста одной из культур или ее задержке, а взаимоотношения между штаммами расценивали как антагонистические.

Полуколичественный метод определения способности бактерий продуцировать лизоцим (по З. В. Ермольевой, И.С. Буяновской, 1946)

Суточную бульонную культуру бифидобактерий подвергали центрифугированию при 8 000 gm, с последующим титрованием культуральной жидкости от 1:1 до 1:32. Готовили взвесь тест-культуры *Micrococcus lysodeicticus*

(ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ) в 0,9% растворе NaCl, стандартизировали ее по стандарту мутности 5 ЕД (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ), что соответствует  $2,5 \times 10^8$  бактериальных клеток в 1 мл. В каждую пробирку с культуральной жидкостью и ее разведениями вносим по 1 мл стандартизированной взвеси *Micrococcus lysodeicticus*. Смесь инкубировали 3 часа при 37<sup>0</sup> С. Ставили 2 контроля: контроль тест-культуры (контроль 1) и контроль культуральной жидкости (контроль 2). Для контроля 1 брали пробирку с 2 мл 0,9% растворе NaCl и добавляли 1 мл взвеси *Micrococcus lysodeicticus*. Контроль 2: в пробирку с 2 мл культуральной жидкости добавляли 1 мл 0,9% раствора NaCl. Контроли инкубировали 3 часа при 37<sup>0</sup> С. Результат определяли визуально по наличию лизиса индикаторной культуры, при этом учитывали титр лизоцима в культуральной жидкости, т.е. наибольшее разведение, где шел лизис *Micrococcus lysodeicticus*.

#### Изучение факторов вирулентности бактерий

ДНКазную и липазную активность микроорганизмов определяли на Tributhyrin Agar Base without Tributhyrin (HIMEDIA, Индия) и DNA Base Agar (HIMEDIA, Индия). Способность микроорганизмов продуцировать гемолизины изучали на 5% кровяном мясо-пептонном агаре.

Оценку наличия ДНКазной активности проводили через 24 часа после инкубирования по наличию зоны гидролиза ДНК вокруг бляшек, которая имела розовый цвет. О липазной активности судили по наличию прозрачной зоны вокруг бляшек микроорганизмов, гемолитической активности по наличию зон гемолиза.

Количественно липазную активность определяли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия) в кварцевых кюветах 1x1 с помощью набора «LIPASA liquicolor» (HUMAN, Германия). Кинетические показатели липазной активности фиксировали через каждые 30 минут от 0 до 2 часов от начала опыта. При величинах от 0 до 30 Е/л культуры считали с низкой липазной активностью, от 31 до 60 Е/л – со средней и от 61 и выше Е/л – с высокой активностью синтеза липазы.

Биологический метод изучения активности экзометаболитов белково-пептидной природы, выделенных из супернатантов бифидобактерий

Первоначально получали супернатанты бифидобактерий. Для этого чистые культуры бифидобактерий культивировали в 10 мл Бифидум-среды (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) в стандартных условиях. Далее бактериальную массу центрифугировали при 3000 gm в течение 20 минут. Супернатанты отделяли стерильными пипетками и добавляли трехкратный объем раствора ацетона (х.ч.). Содержимое пробирок охлаждали при + 4°С в течение суток. Образцы подвергали центрифугированию при 10 000 gm, отделяя осадок. Осадок растворяли в деионизированной воде и проводили повторную очистку переосаждением дважды. Выделение экзометаболитов белково-пептидной природы из супернатантов проводили на Сефадексе G 100, с последующим осаждением ацетоном (х.ч).

Психотропную активность исследовали по тесту отчаяния по R. D. Porsolt (1977). Тест отчаяния базируется на наблюдении у животного при вынужденном плавании в цилиндре с водой количества и длительности неподвижных поз (иммобилизация). В данном тесте иммобилизация животного интерпретируется как «пассивный стресс», т.е. поведение отчаяния. Установка для формирования депрессивноподобного состояния (поведенческого отчаяния) по методу R. D. Porsolt у мышей представляет собой стеклянный цилиндр диаметром 10 см и высотой 25 см, который на высоту 6 см наполняют водой (температура 25 °С). За сутки до тестирования каждое животное помещают в сосуд с водой на 5 минут для адаптации. В день эксперимента мышь опускают в цилиндр с водой таким образом, чтобы она не могла выбраться или найти опору, т.е. животное не должно касаться лапами дна. Попадая в воду, у мышей проявляется бурная двигательная активность, направленная на поиск выхода из авersiveй стрессорной ситуации, но потом животные прекращают попытки и «зависают» в воде в специфической позе, характеризующейся полной неподвижностью или заметны слабые ее движения, необходимые животному для удержания головы над поверхностью воды. Такое поведение является проявлением отчаяния и депрессивноподобного

состояния. Основной показатель степени выраженности депрессивноподобного состояния в данном тесте – это сумма актов иммобилизации у каждой мыши в течение 180 секунд наблюдения. Критерием наличия антидепрессивной активности является статистически значимое уменьшение длительности иммобилизации.

Для изучения противовоспалительной активности полученные экзометаболиты бифидобактерий вводили мышам внутрижелудочно однократно в сутки на протяжении 5-ти дней с содержанием белковой фракции 200 мг/кг по сухому остатку, предварительно растворив его в изотоническом растворе. Данные представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика объектов и дизайн исследования при изучении противовоспалительной и психотропной активности метаболитов бифидобактерий

Группа животных	Вводимое вещество	Доза, мк/кг	Число животных	Микроорганизмы, номер штамма	Статус, стадия ВИЧ-инфекции
Контрольная № 1*	Диклофенак натрия	10	6	-	-
Контрольная № 2**	Вода	-	6	-	-
Группа I	Экзометаболиты	200	6	<i>Bifidobacterium spp.</i> , 74	ВИЧ-
Группа II	Экзометаболиты	200	6	<i>Bifidobacterium spp.</i> , 85	ВИЧ+, 2 В
Группа III	Экзометаболиты	200	6	<i>Bifidobacterium spp.</i> , 87	ВИЧ+, 4 Б
Группа IV	Экзометаболиты	200	6	<i>Bifidobacterium spp.</i> , 88	ВИЧ+, 2 А
Группа V	Экзометаболиты	200	6	<i>Bifidobacterium spp.</i> , 88	ВИЧ+, 2 А

Примечание: \*контрольная группа животных при изучении противовоспалительной активности экзометаболитов; \*\*контрольная группа животных при изучении психотропной активности экзометаболитов.

Препаратом сравнения был диклофенак натрия с содержанием основного действующего вещества равным 10 мг/кг (контрольная группа 1). Острый формалиновый отек индуцировали путем субплантарного введения в заднюю

правую лапу мыши 0,2 мл 2% водного раствора формалина. При изучении психотропной активности белково-пептидных комплексов, выделенных из супернатантов бифидофлоры, контрольная группа животных (№ 2) получала эквивалентное количество воды очищенной.

Исследовали противовоспалительную активность экзометаболитов бифидобактерий, изолированных от ВИЧ-инфицированных детей на разных стадиях ВИЧ-инфекции, в условиях методики «острое формалиновое воспаление».

Прирост отека рассчитывали в процентах по формуле 1:

$$\% \text{ прироста отека} = \frac{\text{б.к.} - \text{з.к.}}{\text{з.к.}} \times 100 \% \quad (1)$$

где б.к.- масса больной конечности, з.к.- масса здоровой конечности

Противовоспалительную активность исследуемых образцов оценивали по величине угнетения отека в процентах по формуле 2:

$$\% \text{ угнетения отека} = \frac{\% \text{ п.к.} - \% \text{ п.о.}}{\% \text{ п.к.}} \times 100 \% \quad (2)$$

где % п.к.- прирост массы конечности в контроле, % п.о.- прирост массы конечности в опыте.

#### Оценка альфа-разнообразия и постоянства микробных видов в кишечном микробиоценозе

Оценку разнообразия внутри сообщества микроорганизмов (альфа-разнообразия) кишечника проводили по R. Whittaker [36]. Определяли количество культивируемых (богатство) таксонов микроорганизмов и индекс разнообразия кишечного микробиоценоза Маргалефа (Mg), Менхиника (Mn).

$$Mg = S - 1 / \ln S$$

$$Mn = S / \sqrt{N}$$

S – количество обнаруженных таксонов в микробиоценозе

N – общее число особей

Так как индексы Маргалефа (Mg) и Менхиника (Mn) не учитывают количественную характеристику видов для оценки разнообразия микробной системы был также использован индекс Симпсона:

$$D = \sum [ n_i (n_i - 1) / N (N - 1) ]$$

где  $n_i$  – число особей в  $i$  таксоне,  $N$  – общее количество особей.

По формуле Р. Дажо (1975) в модификации Ю. Одум (1986) определяли постоянство микробных таксонов  $C$  (%):

$$C = (p : P) \times 100\%$$

$p$  – количество лиц, у которых обнаружен изучаемый таксон микроорганизмов

$P$  – общее число обследованных лиц

Микроорганизмы считали постоянными при  $C > 50\%$ , добавочными при  $25\% < C < 50\%$  и случайными при  $C < 25\%$ .

### **Физико-химические методы исследования**

В работе использован целый комплекс физико-химических методов исследования биологических свойств микробов, который включал в себя группу спектральных (фотометрический, спектроскопический) и хроматографических (газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором и высокоэффективная жидкостная хроматография) методов.

*Изучение гидрофобности клеточных стенок бактерий (по M. Rosenberg et al, 1980 с модификациями L-Q Wang et al, 2010)*

Проводили посев бифидобактерий в жидкую Бифидум-среду (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) объемом 5 мл, инкубацию проводили при  $37^{\circ}C$  24 часа.

Пробирки с бактериальной массой центрифугировали при 8 000 g в течение 10 мин. Осторожно сливали питательную среду. В пробирку добавляли фосфатно-буферную смесь в  $V=3-4$  мл и перемешиваем на центрифуге «Vortex» до получения суспензии. Такую манипуляцию по отмывке бактерий проводили трижды. Далее определяли оптическую плотность ( $A_0$ ) бактериальной суспензии



на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия) при длине волны 600 nm против фосфатно-буферной смеси. Затем к 3 мл бактериальной суспензии добавляли 1 мл додекана или гексадекана. Фазы перемешивали на центрифуге «Vortex» в течение 2 минут и оставляли на 1 час в термостате при температуре 37<sup>0</sup> С для их разделения.

С помощью пипетки отбирали из пробирки нижнюю (водную) фазу и определяли оптическую плотность (А) водной фазы при 600 nm против фосфатно-буферной смеси.

Гидрофобность (Н%) рассчитывали в процентах по формуле:

$$H\% = \left[ \frac{A_0 - A}{A_0} \right] \times 100$$

где  $A_0$  – экстинкция суспензии бактерий до обработки алканом

$A$  – экстинкция суспензии бактерий после обработки алканом.

Интерпретацию результатов проводили следующим образом: при значении  $H$  (%) 60 и более штамм считали высокогидрофобным, 40 – 59 – среднегидрофобным и менее 39 – низкогидрофобным.

#### Изучение аутоагрегации бифидобактерий (Del Re et al., 2000)

Бифидобактерии выращивали на жидкой Бифидум-среде (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Культивирование проводили при 37<sup>0</sup> С, 24 часа. Пробирки с культурой вынимали из термостата и оставляли на 2-3 часа при комнатной температуре, для того чтобы взвесь бактерий приобрела температуру 25-26<sup>0</sup> С. Бактериальную культуру перемешивали на центрифуге «Vortex» в течение 10 секунд. С помощью автоматической пипетки переносили 0,4 мл суспензии культуры в кварцевую кювету (1x1) с 3,6 мл фосфатно-буферной смеси (рН=7,2). Сразу же измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм. Для сравнения использовали фосфатно-буферную смесь. Проводили последовательные измерения оптической плотности содержимого кюветы через 30, 60, 90, 120 мин при температуре 25<sup>0</sup> С. Показатель аутоагрегации вычисляли по формуле

$$A\% = \left| \left( 1 - \frac{A_{120}}{A_0} \right) \right| \times 100$$

$A_t$  – оптическая плотность после 120 мин.

$A_0$  – оптическая плотность при  $t=0$  мин.

Культуры считали низкоагрегативными при  $A$  (%) < 10, среднеагрегативными при  $A$  (%) 10-40, высокоагрегативными > 40.

Определение активности кислотообразования в процессе ферментации сахаров  
[64]

Проводили посев бифидобактерий в 10 мл жидкой Бифидум-среды (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посевы выращивали при  $37^{\circ}\text{C}$  24 часа. Накопленную бактериальную массу переливали в стерильную колбу с широким горлышком. Далее трижды проводили титрование 0,1 М раствором натрия гидроксида по индикатору фенолфталеину, до появления стойкого слабо-розового окрашивания, стабильного в течение 5 минут. Объем раствора натрия гидроксида, затраченный на нейтрализацию, эквивалентен количеству кислоты, которая содержалась в 10 мл культуральной жидкости. Рассчитывали среднее количество титранта, пошедшего на титрование трех проб.

Кислотность выражали градусами Тернера ( $^{\circ}\text{T}$ ) и вычисляли по формуле:

$$T = A \times K \times 10$$

где  $A$  - количество натрия гидроксида 0,1 М, затраченного на титрование 10 мл анализируемого образца,

$K$  - поправка к титранту, соответствующий объему 0,1 М раствора натрия гидроксида затраченного, на нейтрализацию 0,1 М раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$

10 – поправочный коэффициент на массу анализируемой пробы

Активность кислотообразования культуры рассчитывали, как среднее значение для двух проб.

Кислотообразование считали низким при значении  $^{\circ}\text{T}$  до 50; средним – при 51-100  $^{\circ}\text{T}$ ; высоким - 101  $^{\circ}\text{T}$  и выше.

Изучение строения липотейхоевых кислот бифидобактерий методом тонкослойной хроматографии и инфракрасной спектроскопией с Фурье преобразованием

Для экстракции ЛТК суточную бактериальную массу центрифугировали при 5000 g 10 мин, затем добавляли стерильный раствор натрия хлорида и встряхивали на центрифуге типа «Vortex» 2 мин. Ресуспендирование и отмывку осуществляли трижды. Отмытые в изотоническом растворе натрия хлорида бактериальные клетки массой 3,0 г (точная навеска) трехкратно экстрагировали тремя миллилитрами смеси *n*-гексан : хлороформ (1:1) и объединяли органические фазы. Растворители отгоняли в токе азота.

Хроматографию проводили при помощи пластин Sorbfil ПТСХ-АФ-В 10x15 см с размером частиц сорбента 8x12 мкм (ООО «Имид», Россия). Экстракт в объеме 50 мкл наносили на линию старта при помощи аппликатора автоматического Sorbfil АПА -2 (ООО «Имид», Россия). Подвижная фаза состояла из смеси:  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  в объемном соотношении (60:30:5). Для визуализации хроматограммы пластину обрабатывали 5% этанольным раствором фосфорно-молибденовой кислоты, используя вариант погружения, выполненный на приборе Sorbfil ПОЖ – 3 (ООО «Имид», Россия). Далее пластину прогревали при 100<sup>0</sup> С 5-10 мин.

Экстракцию разделенных компонентов из хроматографических зон осуществляли трижды по 1 мл хлороформа, объединяя экстракты. Затем растворитель отгоняли в токе азота при дробном нанесении на калий бромидное окно. Получение спектров осуществляли на приборе ФСМ-1202 (Инфраспек, Россия) при следующих параметрах прибора: режим пропускания в среднем диапазоне 4000-400 см<sup>-1</sup> с шаговым разрешением 4 см<sup>-1</sup> и числом сканов 35. Управление прибором и обработку спектральных данных осуществляли с использованием ПО Fspec (4.0.0.2) и Aspec (1.1) (ООО «Мониторинг», Санкт-Петербург).

Определение жирнокислотного состава клеточных стенок бифидобактерий методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Липидную фракцию клеточных стенок микроорганизмов выделяли из отмытой 0,9% раствором натрия хлорида бульонной культуры бифидобактерий. Экстракцию осуществляли смесью *n*-гексан : хлороформ (1:1). Метилирование жирных кислот проводили следующим образом: 1 мл образца вносили в виалу и высушивали в токе азота, затем в виалу вносили 0,5 мл смеси 3% раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в MeOH, приготовленной *in situ*. Сразу же добавляли внутренний стандарт - ундеценовую кислоту 0,01 мг. Затем образец нагревали при 90<sup>0</sup> С. Экстракцию метилированных жирных кислот осуществляли 0,7 мл гексана. Объем отобранной гексановой фракции уменьшали до объема 0,2 мл отдувкой азотом. Анализ выполняли на хроматографе Agilent 7000В (Германия) с масс-спектрометрической детекцией. Использовали следующую колонку: ZB-WAX, 30м\*0.25мм\*0.25мкм. Объем вводимой пробы был 2 мкл, ввод осуществляли без деления потока с температурой термостата 50 °С при повышении 8 °С/мин до 260 °С в течение 5 мин.

Определение аминокислот бифидобактерий методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [78]

Анализ проводили на ВЭЖХ хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence, (Япония) с диодно-матричным и рефрактометрическим детектированием. В качестве стационарной фазы использовали октодецилсиликагель 250x4.6 мм Kromasil (Германия) с размером частиц 5 мкм и шириной пор 110 Å. Элюцию осуществляли в градиентном режиме при общем потоке 1,0 мл/мин и температуре термостата 40<sup>0</sup> С. В качестве подвижной фазы использовали следующие растворы: 6.0 mM натрия ацетата pH 5.5 (А); 6,0 mM натрия ацетата pH 4,05 (В), ацетонитрила с 1% содержанием изопропилового спирта по объему (С).

В качестве стандартных веществ использованы коммерческие образцы аминокислот («Реахим», Россия) и *L*-кинуренин («Sigma», Германия). Стандарты аминокислот готовили с использованием воды деионизированной. В работе

использован ацетонитрил, а также изопропиловый спирт квалификации для ВЭЖХ «Panreak», натрия ацетат «Panreak», фенилизотиоцианат (ФИТЦ) («Fluka»), кислоты соляной и натрия гидроксида («Sigma»).

Для проведения гидролиза бактериальную массу (10 г), выращенную на жидкой питательной среде и предварительно отмытую, помещали в реакционный сосуд, добавляли кислоты хлористоводородной 6 М десять миллилитров. Смесь тщательно перемешивали и обдували током азота. Далее образцы помещали в сушильный шкаф с температурой  $110^{\circ}\text{C}$  на 17 ч. После охлаждения гидролизаты фильтровали через беззольный бумажный фильтр (синяя лента), отбирая среднюю порцию аликвоты объемом 500 мкл. Затем аликвоты высушивали в вакууме. Остаток защелачивали добавлением 0,15 М раствора натрия гидроксида 100 мкл, тщательно перемешивали и вносили 0,35 мл фенилизотиоцианата. Затем образцы находились 20 мин в затененном месте при комнатной температуре. Далее раствор вакуумировали на роторном испарителе ИКА-8 (Германия). Сухой остаток растворяли в воде очищенной, с последующей фильтрацией фильтр «Amprer» с диаметром пор 0,45 мкм. Градуировочный график зависимости оптических плотностей от концентрации строили с использованием концентрированного раствора аминокислот в 1 М растворе кислоты хлористоводородной.

#### Выделение липаз стафилококков

Для выделения бактериальных липаз был использован аффинный сорбент на основе Toyopearl HW-55 с иммобилизованным дициловым фрагментом. Чистые культуры стафилококков культивировали 24 часа при  $37^{\circ}\text{C}$  на мясо-пептонном бульоне (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Питательную среду объемом 5 мл, освобожденную центрифугированием от бактериальных клеток, дробно насыщали сульфатом аммония 2 М, до выпадения осадка. Осадок отделяли центрифугированием при 10 тыс.об/мин. Белковую фракцию растворяли в фосфатном буфере 0,01 М ( $\text{pH} = 7,2$ ). К 2,0 мл раствора белков добавляли 1,0 г аффинного сорбента с последующим инкубированием в течение 2 ч при  $25^{\circ}\text{C}$  при периодическом встряхивании. Затем, частицы сорбента с адсорбированной

липазой упаковывали в колонку Bio-Rad (диаметр 10 мм). Все последующие этапы элюирования проводили на хроматографе BioLogic LP (USA) при скорости потока 0,5 мл/мин. Холостой отмыв сорбента вели фосфатным буфером 0,01 М (рН =7,2) до отрицательной реакции (с реактивом Бренстеда-Лоури) на белок в элюате. Далее элюирование осуществляли последовательным использованием 50 % раствора этиленгликоля -15 мл, дезоксихолата натрия 0,5% - 15 мл; тритона X-100 0,1 мл с 0,02% раствором мочевины - 9 мл; затем в градиентном режиме, увеличивая на 0,2% через каждые 12 мл до 0,8% дезоксихолата натрия. Очистку фермента от детергентов проводили с использованием гельпроникающей хроматографии на Сефадексе G-25, предварительно уравновешенного фосфатным буфером 0,01 М (рН =7,2) на колонке Bio-Rad 1,5 x 40 см на хроматографе BioLogic LP (USA). Скорость потока составила 1,0 мл/мин.

#### Получение контролей для определения антиоксидантной активности микроорганизмов

Контроль 1 (эталонный антиоксидант): в чистую, сухую, обезжиренную пробирку помещали 0,5 мл 0,1% раствора лецитина, 0,3 мл раствора эмоксипина и 0,8 мл 0,79 М раствора аскорбиновой кислоты. Тщательно перемешивали.

Контроль 2 (образец иницированного перекисного окисления без антиоксиданта): в чистую, сухую, обезжиренную пробирку помещали 0,5 мл 0,1% раствора лецитина и 0,8 мл 0,79 М раствора аскорбиновой кислоты. Тщательно перемешивали.

Контроль 3 (собственное окисление 2-ТБК): в чистую, сухую, обезжиренную пробирку помещали 0,3 мл бактериальной суспензии и 0,8 мл 0,79 М раствора аскорбиновой кислоты. Тщательно перемешивали.

#### **Статистические методы исследования**

На начальном этапе обработки полученной информации проводили формирование базы данных с применением программы Microsoft Office Excel 2003 (лицензионное соглашение 74017-640-0000106-57177). База данных

включала информацию о качественном и количественном составе кишечных микросимбионтов, а также количественные характеристики их биологических свойств. Для статистического анализа использовали программно-методический комплекс анализа данных IBM SPSS Statistics / PS IMAGO. Описательная статистика представлена относительными данными, выраженными в % и средними значениями признаков, представленными в виде медианы с 25 и 75 процентилями (Me (LQ; UQ)). Перед статистической обработкой строили гистограммы для определения характера распределения данных. Достоверность различий в парных независимых совокупностях оценивали с помощью непараметрических критериев оценки достоверности (критерия U – Манна-Уитни, критерия  $\chi^2$ ). Различия считали значимыми при достижении уровня достоверности  $p < 0,05$ . Коэффициент ранговой корреляции Спирмена использовали для анализа связей между адгезией и содержанием микроорганизмов, а также между адгезией и липазной активностью. Для оценки силы связи использовали шкалу Чеддока:  $r = 0 - 0,3$  очень слабая;  $r = 0,3 - 0,5$  слабая;  $r = 0,5 - 0,7$  средняя;  $r = 0,7 - 0,9$  сильная;  $r = 0,9 - 1,0$  очень сильная.

Сравнение вероятности развития оппортунистических инфекций в сравниваемых когортах проводили по величине относительного риска (RR). Для этого первоначально в изучаемых группах вычисляли суммарные абсолютные риски транслокации условно-патогенных микроорганизмов с учетом уровня экспрессии факторов вирулентности, затем определяли отношение двух абсолютных рисков. По величинам RR проводили оценку наличия причинно-следственных связей между вирулентностью микроорганизмов и ВИЧ-статусом.

### **Личное участие автора в получении результатов**

Автором на основе поиска и анализа литературных источников определена основная идея научного исследования, разработана программа и план исследования, сформулированы цели, задачи, выбраны объекты, предмет, методология и методы исследования. Формирование групп пациентов проводили на базе Государственного автономного учреждения здравоохранения

Кемеровской области "Кемеровская областная клиническая инфекционная больница" (ГАУЗ КО «КОКИБ») совместно с врачами-инфекционистами отделения капельных инфекций (№1) Лихтенвальд А. С. и Марковской А. А.

Автором лично проведено бактериологическое исследование всего материала, изучены биологические свойства микроорганизмов, с последующим анализом, интерпретацией полученных данных. Автор участвовала в пробоподготовке бактериальных образцов и экзометаболитов для хроматографических, спектральных и биологических исследований. Хроматографические исследования выполнены и интерпретированы совместно с заведующим отделом химии природных, техногенных и биологически активных веществ Центральной научно-исследовательской лаборатории Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России к.ф.н, с.н.с., доцентом Сухих А. С., а также к.х.н. Шашковым М. В. (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск). Биологические экспериментальные исследования на животных проведены совместно с доцентом кафедры фармацевтической и общей химии к.ф.н. Федоровой Ю. С. на базе «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (г. Томск). Статистическая обработка результатов проведена совместно с доцентом кафедры эпидемиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России к.м.н. Штернис Т. А. На основе анализа всех полученных результатов автором сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы, а также подготовлены методические рекомендации.



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

1. Нарушения кишечной микроэкологии у ВИЧ-инфицированных детей развиваются на фоне изменений биологических свойств бифидобактерий. С увеличением степени кишечного дисбиоза снижается колонизационная способность, кислотообразование, антиоксидантные свойства бифидобактерий.
2. Низкая частота и количественные характеристики антимикробных факторов бифидофлоры ВИЧ-инфицированных детей способствуют формированию многокомпонентных ассоциаций условно-патогенных бактерий, продуцирующих высокие уровни липаз. Под воздействием липаз происходит изменение поверхностных свойств бифидобактерий, определяющих их колонизационную способность.
3. Бифидобактерии у ВИЧ-инфицированных детей характеризуются высокой активностью метаболизма аминокислот и участием в обмене триптофана.
4. Основными подходами в коррекции микроэкологических нарушений у ВИЧ-инфицированных детей является восстановление количественного уровня бифидофлоры на основе индивидуального выбора пробиотических биосовместимых штаммов и мероприятия, направленные на модуляцию их биологических свойств.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность полученных результатов обеспечивается достаточным объемом исследований, использованием современных методов, общепринятых методик и формированием заключений на основе принципов доказательной медицины. Выделены 1150 кишечных микросимбионтов, изучены биологические свойства у 119 культур бифидобактерий и 274 культур условно-патогенных микроорганизмов. Всего проведено 2032 опыта по исследованию биологических свойств микроорганизмов. В работе применяли количественный бактериологический метод, экспериментальные исследования на животных, а также современные хроматографические (ВЖЭХ, ГХ-МС, тонкослойную хроматографию) и спектральные методы исследования (спектроскопическая

фотометрия и инфракрасная спектроскопия). Работа выполнена в рамках комплексной научно-исследовательской темы «Исследование микрофлоры населения Кузбасса в норме и при патологических состояниях» (номер государственной регистрации 01200902450) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 5 от 28.01.16 г.). Исследования проведены на оборудовании, имеющем сертификаты качества и свидетельства о поверке. Комиссия, сформированная в соответствии с приказом ректора ФГБОУ ВО КеМГМУ Минздрава РФ № 251 от 09.01.2019 г., подтверждает подлинность первичных материалов и личный вклад автора в исследование.

Апробация диссертации проведена на совместном заседании кафедр микробиологии, иммунологии и вирусологии, эпидемиологии, инфекционных болезней, нормальной физиологии, патологической физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и кафедры генетики Института биологии, экологии и природных ресурсов ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» (протокол № 1 от 20.02.2019 г.).

Результаты исследований доложены на 12 научно-практических конференциях: Всероссийской научно-практической конференции «Многопрофильная больница: проблемы и решения» (Ленинск-Кузнецкий, 2012, 2017, 2018); Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2012, 2016, 2019); VIII Российской научной конференции с международным участием «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» (Оренбург, 2015); 42 научной сессии ЦНИИГ «Принципы доказательной медицины в клиническую практику» (Москва, 2016); 22 Объединенной Российской гастроэнтерологической неделе (Москва, 2016); Юбилейной конференции по микологии и микробиологии (Москва, 2018); 18 Сибирской

гастроэнтерологической конференции «Современные проблемы заболеваний органов пищеварения» (Кемерово, 2018), Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 55-летию медико-профилактического факультета КемГМУ «Актуальные вопросы Госсанэпиднадзора в Сибири» (Кемерово, 2018).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Механизмы доминирования бифидобактерий в кишечном микробиоценозе, их роль в поддержании здоровья человека

Бифидобактерии являются доминирующими микросимбионтами в толстом кишечнике человека, регулирующими состояние всего микробиоценоза [2, 15, 80, 121]. В 1899 году бифидобактерии обнаружил Henry Tisser, который изолировал их из детского кала и называл их “*Bacillus bifidus communis*”. В 1924 году Orla-Jensen выделила род *Bifidobacterium* в качестве отдельного таксона. В настоящее время в составе рода *Bifidobacterium* насчитывают более 40 видов [119]. При этом благодаря внедрению молекулярно-генетических методов не только выявляются и описываются новые виды, но и реклассифицируются уже известные, в том числе и производственные штаммы [5, 40, 97, 119]. Несмотря на то, что классификация бифидобактерий не закончена, изучены многие биологические свойства этих микроорганизмов, позволяющие им поддерживать здоровье человека [16, 33, 205, 206].

В первую очередь бифидобактерии обеспечивают формирование биопленки на слизистой кишечника, которая предупреждает адгезию патогенной и условно-патогенной микрофлоры, механически блокируя рецепторы [176]. Исследования последних лет свидетельствуют о высоко развитой системе адгезинов у бифидобактерий. Взаимодействия с тканями макроорганизма у представителей нормальной микрофлоры и у патогенных микроорганизмов схожи. Существует два механизма прикрепления бактерий к субстратам и клеткам – неспецифическая и специфическая адгезия. Неспецифическая адгезия определяется физико-химическими свойствами микробных клеток – гидрофобностью, общим зарядом поверхности, наличием ионных связей с ионогенными группами [194, 210]. Специфическая адгезия связана с наличием у микроорганизмов молекул-адгезинов (лигандов), обладающих высоким сродством к рецепторам слизистых и кожи человека [109]. Достижения в изучении у бифидобактерий молекул и структур, участвующих в адгезии, связаны с секвенированием генома пробиотических штаммов. Это обусловлено необходимостью совершенствования

их функциональных свойств, в том числе и адгезивных характеристик [142, 222]. У бифидобактерий обнаружены гены, кодирующие поверхностные белки, обладающие сродством к углеводам и производным гликоконъюгатам. В настоящее время адгезивные молекулы и структуры у бифидобактерий стали активно изучать с помощью физико-химических (ядерно-магнитный резонанс, масс-спектрометрия) и физических (электронная и атомно-силовая микроскопия) методов.

Атомно-силовая микроскопия выявила на поверхности бифидобактерий пилеподобные структуры [141]. Пилеподобные выросты обнаружены у штаммов *Bifidobacterium bifidum*, *B. dentium*, *B. longum subsp. longum*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. adolescentis*. Выявлено, что у *B. longum subsp. infantis* данные структуры малочисленны или отсутствуют, а у *B. bifidum* расположены по полюсам клеток в виде плотных пучков. Пили бифидобактерий имеют такое же строение, как и у большинства грамположительных микроорганизмов. Они отличаются от пилей грамотрицательных бактерий, чьи субъединицы взаимодействуют посредством нековалентных связей [113]. Ворсинки у грамположительных бактерий, в том числе и у бифидобактерий, имеют ковалентную полимеризацию субъединиц пилина, которая осуществляется ферментом с транспептидазной активностью, под названием сортаза [168]. Длина пилеподобных структур у бифидобактерий колеблется в диапазоне от 100 нм до нескольких микрон, высота от 0,5 до 2 нм, ширина от 10 до 30 нм [141]. Гены, кодирующие субъединицы пилина и сортазы, выявлены в геномах *B. longum subsp. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. adolescentis*. Однако в геноме *B. longum subsp. infantis* эти гены не обнаружены [168, 223]. Самое большое число генов, кодирующих пилеподобные структуры, идентифицировано в геноме *B. dentium*, поэтому данный вид бифидобактерий обладает широкими адаптационными возможностями. Генетический кластер факторов адгезии у бифидобактерий включает гены, кодирующие основные субъединицы белка пилина и один или несколько генов, несущих информацию о дополнительных минорных субъединицах этого белка. По аминокислотной последовательности малые субъединицы пилина соответствуют минорным

субъединицам пилина, выявленным у других грамположительных микроорганизмов, таких как стрептококки и актиномицеты [220]. Кластеры генов, кодирующие у бифидобактерий пилеподобные структуры, фланкированы транспозонами, что говорит о их приобретении при конъюгации, т.е. за счет горизонтального переноса генетического материала.

Видовая принадлежность и состав субстратов для культивирования определяют образование пилеподобных структур у бифидофлоры. Так, у *B. bifidum* в бульоне MRS с фруктоолигосахаридами (ФОС) регистрируется образование большого количества пилей, тогда как у *B. dentium* данный процесс идет слабо [111]. Лактоза стимулирует у *B. dentium* экспрессию генов, кодирующих пили. Различие фенотипов у *B. bifidum* и *B. dentium* связывают с отличием условий в биотопах, которые заселяют эти микроорганизмы - ротовая полость и кишечник соответственно [148]. У *B. adolescentis* в присутствии коровьего молока, N-ацетилглюкозамина и ФОС отмечается усиленная транскрипция генов, кодирующих пилин/сортазу [135, 168]. Таким образом, индукция транскрипции генных кластеров у бифидофлоры связана с воздействием различных гликанов, что может быть следствием приспособления бифидобактерий к различным биотопам, отличающихся составом сахаров [194, 201, 207].

Помимо фимбриальных адгезинов у бифидобактерий выявлены и афимбриальные факторы адгезии. Роль таких адгезинов выполняют поверхностно-связанные белки-ферменты. Они обеспечивают колонизацию кишечника человека, разрушая внеклеточный матрикс [115, 223]. В качестве адгезина к муцину у *B. bifidum* выступает фермент трансальдолаза [144]. Этот фермент отвечает за превращение фруктозо-6-фосфата и эритрозо-4-фосфата в седогептулозу-7-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат в пентозофосфатном пути расщепления углеводов. Чаще данный фермент обнаруживают на цитоплазматической мембране микроорганизмов. Однако некоторые виды бифидобактерий выделяют его во внеклеточное пространство. Среди 14 белков, выделенных из внеклеточного протеома у *B. longum*, обнаруживается и

трансальдолаза. Этот белок с ферментативной активностью также секретируют в окружающую среду пробиотические штаммы *B. animalis subsp. lactis* [144]. Визуализировать трансальдолазу на поверхности бактериальной клетки позволила обработка *B. bifidum* мечеными антителами. Действительно, недавние исследования показали связь ферментов, расщепляющих у прокариот и эукариот углеводы, с клеточной стенкой и их способность выполнять функции «по совместительству» [43, 140, 196, 223].

Роль трансальдолазы *B. bifidum* как адгезина, взаимодействующего с муцином, была исследована путем выделения гена, кодирующего фермент у бифидобактерий, с последующим внедрением его в геном пробиотического штамма лактобацилл. Полученный рекомбинантный штамм лактобацилл, экспрессирующий трансальдолазу, отличался в три раза более высокой адгезией к муцину, чем штамм без этого гена. Кроме того, существует связь между адгезией к муцину и способностью бифидофлоры к аутоагрегации [144]. При воздействии на бифидобактерии протеиназ клетки теряли способность к аутоагрегации и восстанавливали ее при добавлении экстракта белка бактерий или чистой трансальдолазы [144]. Аутоагрегация важна для выживания бактерий при транзите по желудочно-кишечному тракту. Она обеспечивает возможность колонизации, как минимум, среднего отдела кишечника [192]. Способность к агрегации у пробиотических штаммов может также обеспечивать их коагрегацию с патогенными бактериями, тем самым, способствуя уменьшению их вирулентности и выведению возбудителей из разных отделов желудочно-кишечного тракта [119]. Важно, что секреция трансальдолазы у *B. longum* сильно уменьшается при низких значениях pH, облегчая тем самым прохождение бактерий через желудок. Это предотвращает преждевременную адгезию и колонизацию верхних отделов пищеварительного тракта [170]. Таким образом, трансальдолаза у бифидобактерий участвует в пентозофосфатном пути катаболизма углеводов, является специфическим адгезином, связывающимся с муцином слизистой оболочки и фактором коагрегации с патогенными микроорганизмами, т.е. выполняет несколько функций «по-совместительству».

Енолаза является еще одним сахаролитическим ферментом, участвующим в адгезии у бифидобактерий [211]. Енолаза обеспечивает превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенолпируват. Этот белок имеет сродство к человеческому плазминогену. Взаимодействие бифидобактерий с системой плазминогена/плазмина представляет собой новый вариант молекулярных связей между бифидобактериями и макроорганизмом. Плазминоген - это профермент плазмина, являющийся трипсиноподобной сериновой протеазой с широким спектром субстратной специфичности. Он продуцируется печенью, однако выявлены и другие источники плазминогена, в том числе кишечник. Активная форма плазмина вызывает фибринолиз и деградацию экстрацеллюлярного матрикса и базальной мембраны. Вмешательство в плазминоген/плазмин систему используется как стратегия колонизации хозяина некоторыми патогенными микроорганизмами и комменсалами желудочно-кишечного тракта человека [41]. Прикрепление плазминогена на поверхности микробной клетки и его последующее преобразование в плазмин обеспечивает микроорганизм поверхностно-связанным белком с протеолитической активностью [46]. Это облегчает инвазию бактерий между молекулярными и физическими барьерами макроорганизма и позволяет удовлетворять им питательные потребности в процессе колонизации слизистых [43, 223]. Разные виды бактерий имеют несколько рецепторов для плазминогена человека. Кроме взаимодействия с плазминогеном эти структуры выполняют и другие функции: обеспечивают поглощение питательных веществ, движение, ферментативную активность. В настоящее время показана дозозависимая активность енолазы, как плазминоген-связывающего рецептора у трех видов бифидобактерий: *B. bifidum*, *B. lactis* и *B. longum* [211]. С помощью иммунной электронной микроскопии установлено, что эпитопы енолазы распределены не равномерно. До сих пор в литературе обсуждаются механизмы секреции этого важнейшего гликолитического фермента на поверхность микробной клетки [201, 222]. Очищенная енолаза, выделенная у *B. lactis*, характеризуется более высоким сродством к плазминогену по сравнению с ферментом эукариот и меньшим сродством по сравнению с енолазой патогенных



микроорганизмов - *Streptococcus pyogenes*, *S. suis*, *S. pneumoniae* [220]. Это обусловлено тем, что у енолазы *B. lactis* присутствует только один сайт связывания с человеческим плазминогеном [120, 183, 184]. Кроме бифидобактерий поверхностные енолазы обнаружены у представителей рода *Lactobacillus* [198, 201]. Однако, если у *L. crispatus* поверхностная енолаза связывается с человеческим плазминогеном, то у *L. plantarum* енолаза является фибронектин-связывающим белком. Способность енолазы бифидобактерий взаимодействовать с ламинином и фибронектином еще не исследована.

Недавно у пробиотической культуры *B. bifidum* был обнаружен поверхностный липопротеин Вор А [146, 192, 202]. Первоначально его позиционировали как видоспецифичный белок, который обеспечивал *in vitro* высокую способность к адгезии у *B. bifidum* на эпителиальных клетках линий Т-84, Сасо-2, НТ-29. Объяснялось это тем, что при обработке штамма проназой К значительно снижалась его адгезия на всех эпителиальных клетках [142, 146]. Ген липопротеина Вор А, обнаружен, выделен и успешно экспрессирован с помощью *Escherichia coli* у 15 штаммов *B. bifidum*. С помощью этого гена предполагали получать рекомбинантные пробиотические культуры бифидобактерий с высокой способностью к адгезии. Однако использование антисыворотки против выделенных из мембраны и рекомбинантных липопротеинов заставило пересмотреть роль Вор А у *B. bifidum* [155]. Обработка антисывороткой *B. bifidum* не вызывала *in vitro* снижение их адгезии на эпителиальных клетках. Это позволило подтвердить, что Вор А не несет функции адгезина. Блокировка адгезии *B. bifidum* на эпителии происходила также при обработке клеток Сасо-2 рекомбинантным липопротеином с гидрофобным липидным концом [155, 202]. Известно, что чем выше гидрофобность поверхности бактерий пробиотического происхождения, тем выше их способность снижать адгезию у патогенных микроорганизмов [47, 210]. Иными словами, гидрофобные молекулы создают стерические помехи, блокируя связывание бактерий с клеточными сайтами. Также происходит конкурентное ингибирование адгезии бифидофлоры на эпителии, вызванное неспецифическим гидрофобным взаимодействием

липопротеина Вор А с клетками Сасо-2 [155, 192]. Известно, что рекомбинантный белок Вор А не влияет на связывание микроорганизмов с фибронектином и обуславливает умеренную способность бифидобактерий к адгезии на кишечной слизи [155]. Таким образом, липопротеин Вор А у *B. bifidum* влияет на гидрофобность поверхности, выполняя опосредованную роль в процессе адгезии.

Для адгезии на эпителиальных клетках бифидобактерии используют еще одну полимерную структуру - липотейхоевые кислоты (ЛТК) [210, 194]. Они состоят из гликолипидных фрагментов и 1,3-связанных цепей полиглицеролфосфата, обнаружены у многих грамположительных микроорганизмов. Липидные остатки ЛТК заякорены в клеточной стенке бактерий [119]. Бифидобактерии характеризуются уникальным строением данных полимеров. У них анионные глицерофосфатные цепочки расположены на галактофурановых цепях в виде боковых радикалов. У других грамположительных бактерий остатки глицерофосфатов образуют гидрофильные цепи. У *B. breve*, *B. bifidum* и *B. longum* обнаружены ЛТК двух типов, они отличаются содержанием жирных кислот. У некоторых штаммов остатки жирных кислот могут присоединяться к галактопиранозе липидного якоря [89, 222]. В составе липидной части ЛТК у бифидобактерий могут содержаться молекулы олеиновой и пальмитиновой кислот, на долю которых приходится до 40%, тогда как у представителей рода *Streptococcus*, например, их содержание составляет не более 24% [119, 222]. По данным ядерно-магнитного резонанса, у бифидобактерий в гликановых цепях ЛТК присутствуют 1,6 -β -связи, а в галактофуранановых цепях обнаружены 1,5 -β -связи. Длина β-гликановых и β-галактофуранановых цепей, а также число глицерофосфатных цепочек зависят от штаммовой и видовой специфичности, т.е. эти полимеры значимы для таксономии микроорганизмов [119]. ЛТК позволяют бифидобактериям обратимо связываться с эпителием толстого кишечника, при этом с колоноцитами взаимодействуют липидные части кислот. Благодаря липидным остаткам ЛТК, грамположительные бактерии приобретают определенную гидрофобность микробных поверхностей и обратимую неспецифическую адгезию [112, 114].

Таким образом, бифидобактерии имеют широкий набор адгезинов, что позволяет им успешно конкурировать с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами в борьбе за рецепторы на слизистой. Факторы адгезии бифидобактерий - это один из инструментов, позволяющий им занимать доминирующее положение в кишечном микробиоценозе.

Немаловажное значение для самих бифидобактерий и для здоровья человека играет совершенно уникальный путь расщепления углеводов, так называемый «бифидо-шунт», в котором фруктозо-6-фосфокетолаза расщепляет фруктозу-6-фосфат до ацетилфосфата и эритрозы-4-фосфата. Конечные продукты образуются путем последовательного действия трасальдолазы, транскетолазы, ксилозы 5-фосфат-фосфокетолазы и ферментов пути Эмбдена–Мейерхофа, которые действуют на глицеральдегид-3-фосфат [119, 120]. До настоящего времени многие ферменты, расщепляющие моно - и дисахариды во фруктоза-6-фосфатном шунте, не изучены. Однако секвенирование геномов *B. longum subsp. longum*, *B. longum subsp. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis subsp. lactis* позволило выявить неожиданно большое число генов, ответственных за экспрессию ферментов, расщепляющих различные олигосахариды [120, 201]. Часть ферментов относится к классу гликозилгидролаз, которые действуют на гликоконъюгаты, гликопротеины и на неперевариваемые волокна [115, 184]. Умение бифидобактерий использовать в качестве источников питания разнообразные субстраты, повышает их конкурентоспособность среди других микросимбионтов толстой кишки [121, 184]. При ферментации сахаров бифидобактерии продуцируют органические кислоты. Уксусная и молочная кислоты образуются в соотношении 3 : 2 моляра. Продуцируются небольшие количества этанола, муравьиной и янтарной кислот [15, 95]. С уксусной и молочной кислотой связывают антагонизм бифидобактерий по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам – сальмонеллам, энтерогеморрагическим кишечным палочкам, листериям, клостридиям, грибам рода *Candida* [53], токсическое действие которых основано на подавлении роста и процессов деления клеток микроорганизмов [187]. Марков А.А. с соавт. приводит данные о

высокой активности метаболитов *B. bifidum* в отношении полирезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, что является новой стратегией в лечении инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами [52]. От некоторых бифидобактерий были получены антимикробные пептиды против листерий. Уникальный бактериоцин – бифидоцин Б от *B. bifidum* NCFB 1454 активен в отношении грамположительных бактерий. У бифидобактерий также выявлены бактериоцин-подобные вещества, которые обладают антибактериальной активностью в отношении представителей родов *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Helicobacter* и *Vibrio* [166]. Еще одним механизмом антагонизма бифидобактерий с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами является наличие уникальной системы связывания железа, которая изучена у *B. bifidum*, *B. thermophilum*. Бифидобактерии накапливают железо в окисленной форме. Эта форма железа образуется в анаэробных условиях, которые создаются в толстой кишке человека. Бифидобактерии обладают мембраносвязанными железоредуктазами, которые обеспечивают превращение железа из трехвалентного в окисленное на поверхности клетки. При этом поглощение железа не зависит от сидерофорного типа носителей, оно осуществляется с помощью протонных насосов [194, 187]. Уровень экспрессии факторов анагонизма представителей рода *Bifidobacterium* варьирует в зависимости от вида бифидобактерий и микробиологического состояния кишечника [14, 15, 166].

Продукты обмена веществ бифидофлоры играют не только роль факторов антагонизма. Современные исследования обмена веществ бифидобактерий свидетельствуют об использовании их метаболитических продуктов в качестве субстрата другими представителями кишечного микробиоценоза, что рассматривают как вариант «перекрестного питания» и регулирования доминирующей микрофлорой всего микробиоценоза [213]. Так, молочная кислота бифидобактерий используется как субстрат пропионибактериями для производства пропионовой и уксусной кислот, обладающих мощным антибактериальным действием. Капроновая и уксусная кислоты являются

сигнальными молекулами в межмикробных взаимодействиях бифидобактерий с бациллами и дрожжевыми грибами [27, 121]. Благодаря этим кислотам, бифидобактерии регулируют экспрессию генов биопленкообразования этих условно-патогенных микроорганизмов [7, 16, 53], а также осуществляют ауторегуляцию. Так Бухариным О. В. и соавт. показано, что при снижении способности бифидобактерий образовывать уксусную кислоту, уменьшается их адгезия и образование биопленок [16]. Продукты ферментации сахаров оказывают антиканцерогенный, противовоспалительный и иммуномодулирующий эффекты. Продуцируемые кислоты способствуют пролиферации и дифференцировке кишечных популяций T-reg клеток [18, 116, 156, 160].

Многие штаммы бифидобактерий и лактобацилл способны продуцировать экзополисахариды [182]. У бифидобактерий найдены восемь высокоаффинных олигосахарид-транспортеров, которые вызывают олигомеризацию сахаров [190]. Все продуцируемые экзополисахариды являются гетерополисахаридами, содержащими глюкозу, галактозу, в некоторых случаях - рамнозу. При сокультивировании гетеропродуцирующих бифидобактерий с остальными представителями фекальной микрофлоры отмечается увеличение продукции и изменение профиля продуцируемых симбионтными микробами органических кислот. Прежде всего, регистрируется снижение молярных пропорций уксусной кислоты, повышение уровня пропионовой и масляной кислот, уменьшение коэффициента соотношения «уксусная кислота / пропионовая кислота». Самое сильное понижение этого коэффициента вызывают экзополисахариды, полученные от *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* [185], что позволяет их использовать в качестве гипополипидемических пребиотиков. Кроме изменения в спектре продуцируемых органических кислот, экзополисахариды бифидобактерий изменяют структуру кишечного микробиоценоза. Так, под влиянием гетерополисахаридов *B. pseudocatenulatum* увеличивается содержание *Desulfovibrio* и *Faecalibacterium prausnitzii*, в то время как использование *B. longum* поддерживает популяцию *Anaerostipes*, *Prevotella* и/или *Oscillospira* [185]. Регулирование бифидобактериями количества масляно-продуцирующих

микроорганизмов характеризует их протективные свойства в отношении сохранения стабильности слизистой кишечника. Дефицит масляной кислоты способствует повышению риска онкопатологии, воспалительных, аутоиммунных заболеваний кишечника [127, 129, 157, 159]. После использования экзополимеров *B. longum* и *B. animalis* в кишечном микробиоценозе снижается количественный уровень вплоть до полного исчезновения *Shigella flexnera* и *E. coli lac*- [185].

Благодаря экзополисахаридам бифидобактерии предотвращают апоптоз эпителиоцитов, наблюдаемый при воспалительных заболеваниях кишечника. Hughes K. et al. сообщают, что колонизация мышей *B. breve* значительно уменьшает патологический апоптотический путь «линъки» эпителия кишечника, через ранее неизвестный механизм воздействия экзополимеров бифидобактерий на MyD88 рецепторы [151]. В экспериментальной модели липополисахарид (ЛПС) - индуцированного апоптоза энтероцитов мышей показано, что после колонизации *B. breve* UCC2003 не происходит никаких изменений в уровнях TNF- $\alpha$ , не происходит увеличения количества макрофагов в подслизистом слое. При этом у мышей, несущих усеченный эпителиальный рецептор MyD88, после колонизации *B. breve* UCC2003 отмечается выраженный апоптоз эпителиоцитов. Тогда как у MyD88 - положительного контроля животных при приеме *B. breve* UCC2003 регистрировали снижение ЛПС-индуцированного процесса апоптоза клеток [151]. Таким образом, качественный состав бифидобактерий влияет на состояния, сопровождающиеся повышенной проницаемостью слизистой, в том числе на исходы заболеваний кишечника [10, 53].

Немаловажным свойством бифидофлоры является высокая распространенность среди них и уровень экспрессии факторов персистенции, которые нивелируют действие врожденного и адаптивного иммунитета [6, 18]. Эти факторы зачастую являются губительными для патогенной микрофлоры. По данным Бухарина О. В. и соавт., антилизоцимной активностью обладают 85% штаммов *B. bifidum*, 71% *B. adolescentis*, 70% *B. longum* и 64% изолятов *B. breve* [19]. Антилактоферриновой способностью характеризуются 77% *B. bifidum*, 62-

63% *B. longum* и *B. adolescentis*, 54% *B. breve*. Также бифидобактерии способны вызывать деградацию секреторного иммуноглобулина А (sIgA). Частота экспрессии данного признака у разных видов бифидобактерий составляет 42% - 62% [18]. Однако количественный уровень всех продуцируемых факторов, направленных на инактивацию факторов иммунитета организма хозяина, зависит от состояния микробиоценоза. При эубиозе – максимальный, при дисбиотических нарушениях II и III степени – снижается [6, 19].

В основе способности бифидобактерий управлять формой иммунного ответа лежит их взаимодействие с миелоидными дендритными клетками (МДК), макрофагами и «селекция» продуцируемых клетками цитокинов [1, 16, 28]. В зависимости от вида бифидобактерий может происходить иммунная активация или наоборот формироваться иммунологическая толерантность [16, 79, 86]. Показано, что стимуляция МДК штаммами *B. breve* BM 12/11 обуславливает синтез IL-12, формируется высокое соотношение IL-12 / IL -10 и в результате наивные Т-клетки дифференцируются в Th1. При стимуляции МДК штаммами *B. bifidum* регистрируется высокий индекс IL-1 $\beta$  / IL-12 и низкий индекс IL- 12 / IL-10, при этом Т-клетки дифференцируются в эффекторные, активные против внеклеточных патогенных бактерий Th17 [1, 161, 214].

В настоящее время активно изучается индукция бифидобактериями дифференцировки Treg клеток, которые необходимы для поддержания иммунологической толерантности [31]. Уменьшение их количества в организме приводит к аутоиммунным заболеваниям [127]. Они выделены из тимуса, из периферийных лимфоидных органов, включая слизистую кишки, где Treg играют важную роль в поддержании толерантности к желудочно-кишечной микробиоте и пищевым антигенам. МДК в слизистой оболочке ответственны за дифференцировку Т-клеток в Treg опосредованно через TGF- $\beta$  и ретиноевую кислоту. Преобразование управляется специфическими микроэкологическими факторами, связанными также с бифидофлорой [116, 205]. МДК человека, стимулированные *B. infantis*, выборочно способствовали усилению активности экспрессия Foxp3 в наивных лимфоцитах. Однако не все комменсальные

микроорганизмы эффективны в отношении стимуляции Treg в естественных условиях. Сравнение трех различных синантропных бактерий *B. longum*, *B. breve* и *L. salivarius* показали, что только *B. longum* индуцируют дифференциацию T-клеток в Treg [189, 214]. Полученные результаты указывают, что коррекция видового состава бифидобактерий позволяет изменить вариант иммунного ответа, снизить риски возникновения воспалительных, аутоиммунных, аллергических заболеваний и проницаемость слизистой кишечника.

Таким образом, современные данные свидетельствуют об уникальных биологических свойствах бифидобактерий, позволяющих им успешно конкурировать с другими представителями кишечного микробиоценоза и занимать доминирующее положение среди микросимбионтов. Бифидобактерии являются привлекательным инструментом управления кишечной экосистемой и различными физиологическими функциями организма хозяина [106]. Коррекция структуры бифидобактерий и микробиоценоза в целом уже подтвердила свою эффективность при метаболическом синдроме, аутоиммунных, аллергических и онкологических заболеваниях [39, 67, 90]. Поэтому необходимо проводить поиск данных о применении бифидобактерий при ВИЧ-инфекции и оценке влияния приема пробиотических бактерий на течение инфекции. Далее был проведен анализ литературных данных о состоянии микрофлоры кишечника у ВИЧ-инфицированных и оценка роли микрофлоры в патогенезе заболевания.

## **1.2. ВИЧ-ассоциированные изменения микрофлоры кишечника**

Эпителий кишечника является одним из локусов, в котором осуществляется первичная репликация вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Возникающие структурные нарушения слизистой кишечника влияют на состояние микробиоты, которая является частью неспецифической защиты макроорганизма. С изменениями кишечной микрофлоры в настоящее время связывают большое число разнообразных болезней человека [29, 68, 87, 107]. И только относительно недавно стали проводиться исследования микрофлоры желудочно-кишечного тракта при ВИЧ-инфекции [145, 162, 167, 218]. Данные работы немногочисленны,



а также проведены на группах ВИЧ-инфицированных пациентов небольшого объема. Между тем исследования мукозальной и просветной кишечной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных пациентов являются актуальными с точки зрения определения патофизиологических и иммунологических механизмов прогрессирования ВИЧ-инфекции.

Первоначально исследования микробиома кишечника у ВИЧ-инфицированных были посвящены определению механизмов и факторов возникновения бактериемий. Наиболее часто в крови у ВИЧ-позитивных пациентов обнаруживали *Streptococcus pneumoniae* и *Salmonella spp.* [88, 145]. Доказано, что возникновение инвазивных пневмококковых заболеваний зависит от количества CD 4<sup>+</sup> Т-клеток [74], однако факторы риска для инвазии сальмонелл в кровеносное русло не выявлены [152]. Уже установлено, что кишечные микроорганизмы-резиденты провоцируют воспаление, которое сохраняется у ВИЧ-инфицированных пациентов даже во время терапии антиретровирусными препаратами [143, 172]. Связывают это с тем, что ВИЧ вызывает быстрое и глубокое повреждение CD 4<sup>+</sup> Т-клеток собственной пластинки (*lamina propria*) слизистой кишечника, влияя в целом на гомеостаз кишечника. Структурные повреждения слизистой кишки во время первичной репликации ВИЧ-1 приводят к образованию “дырявого кишечника”, поэтому микроорганизмы транслоцируются из кишечника в кровь и вызывают активацию иммунной системы и прогрессирование ВИЧ-инфекции [50, 172].

Определение уровня липополисахарида (ЛПС) грамотрицательных бактерий в кровотоке ВИЧ-1 инфицированных позволило установить, что микробная транслокация начинается в конце острой фазы инфекции – с 21-28 дня до 200-дня от момента инфицирования [164, 167, 174]. В начале острой фазы инфекции большинство микробных продуктов, найденных в собственной пластинке слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, локализируются в макрофагах, которые ограничивают их циркуляцию [131]. Однако уже в конце острой фазы ВИЧ-инфекции идет преимущественная потеря слизистой эффекторных Th 17, приводящая к повреждению эпителиального барьера [160]. Также ВИЧ-

инфицированные пациенты имеют низкие уровни кишечных CD13<sup>+</sup> миеломоноцитарных клеток, в том числе дендритных клеток, макрофагов и гранулоцитов, по сравнению с лицами без ВИЧ-статуса, что нарушает процесс удаления микробных продуктов из кишечника и позволяет им попасть в кровоток [131]. В норме ЛПС является модулятором врожденной и адаптивной иммунной системы. Кроме того, циркулирующий ЛПС, а также ДНК энтеробактерий вызывают Т-клеточную иммунологическую гиперактивацию, которую рассматривают как механизм защиты от патогенных микроорганизмов. Однако при ВИЧ-инфекции хроническая иммунная активация и воспаление являются предикторами исхода и основными признаками данного заболевания [38, 122, 125]. В дополнение к ЛПС у ВИЧ-инфицированных людей в качестве показателей системной микробной транслокации используют и другие маркеры, такие как sCD14, sCD163, белок, связывающий жирные кислоты кишечника, учитывают соотношение кинуренин/триптофан, уровень рецепторов к фактору некроза опухоли, С-реактивный белок, количество D-димеров. Повышение уровней данных показателей коррелирует с прогрессированием заболевания и смертностью у нелеченых ВИЧ-инфицированных пациентов [123, 124, 143, 158, 199].

Исследования, посвященные изучению микробиома слизистой прямой кишки у ВИЧ-инфицированных пациентов, в настоящее время основаны на секвенировании у них содержимого дистального отдела кишечника. Полученные данные по кишечному бактериальному микробиому пациентов с ВИЧ-статусом противоречивы. Так, в большинстве случаев, установлено, что при ВИЧ-инфекции отмечается уменьшение разнообразия фекальной микробиоты по сравнению со здоровыми людьми [122, 133, 169, 218]. Кроме того, индекс филогенетического разнообразия микрофлоры снижается у пациентов, не получавших АРТ по сравнению с группой, прошедших лечение, что позволило сделать заключение о положительном влиянии противовирусной терапии на восстановление видового богатства микрофлоры кишечника [125]. Однако в исследованиях Dinh et al. было показано снижение разнообразия микрофлоры у 21

пациента с ВИЧ-инфекцией, из которых 19 получали противовирусную терапию. В то же время не было различий с когортой пролеченных больных [131]. Это поставило под сомнение, что антиретровирусная терапия (АРТ) является способом восстановления кишечного микробиома при ВИЧ-инфекции. Не согласуются с данными большинства исследователей результаты, полученные Lozupone et al. [164]. При изучении микробиома у 25 ВИЧ-инфицированных было показано высокое разнообразие и богатство микрофлоры по сравнению с 13 ВИЧ-отрицательными людьми. Причем у ВИЧ-инфицированных лиц даже после 6,7–8,5 месяцев АРТ микрофлора сильно отличалась от микрофлоры ВИЧ-отрицательных людей, указывая на то, что краткосрочные курсы АРТ недостаточны для восстановления микробиоценоза [164]. Вероятнее всего, противоречивость полученных данных связана с тем, что в исследованиях не были учтены факторы, которые могут повлиять на состояние микрофлоры, например, стадия, продолжительность болезни, наличие сопутствующих соматических заболеваний и многие другие. Действительно, несколько исследований свидетельствуют, что количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток является одним из факторов, определяющих структуру бактериального сообщества при ВИЧ-инфекции, чего не было учтено в предыдущих случаях [38, 58, 117, 180]. Так исследования, проведенные в Уганде позволили охарактеризовать бактериальный микробиом у 37 ВИЧ-отрицательных людей и 73 ВИЧ-положительных пациентов (39 пациентов после АРТ и 34 ВИЧ-нелеченных пациентов). Сформированные группы были сходными по возрасту и полу. При этом в когорте ВИЧ-инфицированных учитывали влияние на микробиом таких факторов, как продолжительность АРТ, величина вирусной нагрузки, уровень CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Установлено, что у пациентов с ВИЧ-статусом и уровнем CD4<sup>+</sup> < 200 кл/мл отмечается значительное сокращение количественного уровня бактерий по сравнению с ВИЧ-инфицированными пациентами с уровнем CD4<sup>+</sup> > 200 кл/мл и незначительное снижение по сравнению с ВИЧ-отрицательными пациентами. Филогенетическое разнообразие бактерий значительно снижено также у ВИЧ-инфицированных с CD4<sup>+</sup> < 200 кл/мл по сравнению с ВИЧ-отрицательными

пациентами и пациентами с ВИЧ статусом с содержанием  $CD4^+$  > 200 кл/мл. Однако не установлено корреляционных связей между величиной вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции и филогенетическим разнообразием в группах леченных и нелеченных ВИЧ-инфицированных людей [169]. Уменьшение богатства и филогенетического разнообразия бактерий кишечного микробиома у больных в поздней стадии ВИЧ-инфекции были схожими с результатами, полученными при исследовании микробиома макак-резусов, инфицированных вирусом иммунодефицита обезьян (Simian immunodeficiency viruses – SIV) [149]. Доказано, что потеря разнообразия микрофлоры приводит к инфекционной диарее, ассоциированной с *Clostridium difficile* или сальмонеллезной инфекцией. Аналогичные выводы были недавно сделаны и в отношении развития кампилобактерной инфекции [134, 165]. Таким образом, у ВИЧ-инфицированных снижается разнообразие нормальной микрофлоры, что «открывает» входные ворота для условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

С помощью секвенирования определены конкретные таксоны, ассоциированные с дефицитом Т-лимфоцитов при ВИЧ-1 инфекции. Перечень включает 13 бактериальных семейств: *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Planococcaceae*, *Actinomycetaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Gemellaceae*, *Comamonadaceae*, *Leuconostocaceae* и *Leptotrichiaceae* [133, 224]. В других работах отмечается, что особенностью фекальной микробиоты у лиц с хронической ВИЧ-инфекцией является значительно более высокий количественный уровень представителей семейств *Prevotellaceae*, *Erysipelotrichaceae* (*Catenibacterium* и *Bulleidia*), *Veillonellaceae* (*Dialister* и *Mitsuokella*) и рода *Desulfovibrio* по сравнению с ВИЧ-отрицательными людьми [131, 163, 171].

Кроме влияния уровня Т-клеток на структуру бактериального сообщества у ВИЧ-инфицированных установлены корреляционные связи между бактериальным разнообразием и уровнем плазменного sCD14. Увеличение циркулирующего sCD14 при ВИЧ-инфекции ассоциируют с ростом смертности при данном

заболевании, так как предполагают, что данный белок может быть посредником бактериальной транслокации из кишечника [123, 145]. Корреляционный анализ выявил, что 144 бактериальных таксона существенно связаны с уровнем sCD14, в том числе 23 относящихся к семейству *Bacteroidaceae* и 23 к *Ruminococcaceae* [122, 171].

Многочисленные исследования демонстрируют, что при ВИЧ-1 инфекции снижается количественный уровень представителей типа *Firmicutes*, который включает в себя довольно разнообразные группы грамположительных бактерий (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.*), в том числе с иммунорегуляторными свойствами [130]. Уменьшение числа бактерий типа *Firmicutes* были зарегистрированы как на слизистой оболочке, так и в образцах стула у леченных и нелеченных пациентов с ВИЧ-статусом. Интересен тот факт, что количественный уровень лактобацилл снижается на слизистой двенадцатиперстной кишки у ВИЧ-1-инфицированных пациентов в начальной стадии инфекции [2], и повышается у пациентов с низким уровнем CD4 Т-клеток и высоким уровнем вирусной нагрузки [59, 130].

Отдел *Firmicutes* также включают в себя несколько родов (например, *Roseburia spp.*, *Faecalibacterium spp.*, *Coprococcus spp.*, *Eubacterium spp.*), которые производят бутират в качестве побочного продукта брожения [183]. Бутират играет важную роль в регуляции кишечного гомеостаза, является источником энергии для эпителиальных клеток и сигнальной молекулой, которая регулирует кишечные клеточные иммунные реакции [185, 203, 184]. Количественный уровень данных бактерий снижается у нелеченных пациентов [133, 224] и после АРТ [153, 169]. Несколько исследований выявили у ВИЧ-инфицированных снижение числа представителей класса *Clostridia*, из которых многие члены участвуют в поддержании иммунного гомеостаза. McHardy et al. отметили значительное уменьшение представителей данного класса при АРТ, в основном из-за снижения числа микроорганизмов из семейства *Ruminococcaceae* и семейства *Lachnospiraceae* [167]. При этом авторы исследования делают предположение о том, что препараты, которыми проводят АРТ, оказывают прямое ингибирующее

действие на микробиоту кишечника и в большей степени потенцируют развитие микрoэкологических нарушений [167]. Необходимо отметить, что роль этих семейств в поддержании гомеостаза слизистой кишечника еще не установлена, хотя о значении бактерий семейства *Ruminococcaceae* в функционировании кишечного барьера ранее уже упоминалось [157]. Интересно, что на состояние активации и созревание толстокишечных МДК у пациентов с ВИЧ-инфекцией влияет низкий уровень мукозальных видов бактерий слизистой оболочки, прежде всего штамма *Ruminococcus bromii* [157, 159]. Особое внимание в последние годы было уделено *Faecalibacterium prausnitzii*, облигатному анаэробу, принадлежащего к семейству *Lachnospiraceae* [159]. Снижение численности этих комменсальных бактерий часто связывают с воспалительным заболеванием кишечника, или болезнью Крона, предполагая наличие у бактерий противовоспалительных свойств [82, 129]. Действительно, уменьшение уровня микроорганизмов семейства *Lachnospiraceae* было отмечено и у ВИЧ-инфицированных пациентов в нескольких исследованиях [167, 219]. Однако полученные результаты не подтверждены статистически, поэтому необходима дальнейшая работа в данном направлении, чтобы определить, не является ли данное снижение представителей класса *Clostridia* артефактом.

Однако не все виды бактерий, относящихся к типу *Firmicutes*, имеют тенденцию к снижению количественного уровня при ВИЧ-1 инфекции. Например, в ряде исследований число представителей семейства *Erysipelotrichaceae* класса *Mollicutes* было увеличено как на слизистой оболочке, так и в фекалиях нелеченых и леченых ВИЧ-1-инфицированных пациентов [132, 164, 216]. Повышение содержания представителей данного класса связывают с воспалительными расстройствами кишечника, с ожирением и повышенным кардиоваскулярным риском смерти [23, 62, 150, 179, 197].

Большинство исследователей указывают на увеличение у ВИЧ-инфицированных в составе микрофлоры кишечника представителей рода *Prevotella* [132, 145, 169], несмотря на различия в способах забора материала (например, биопсия слизистой или фекалии), в статусе пациента (после АРТ или

не принимавший противовирусные препараты), и методах, используемых для исследования флоры [143, 164, 172]. Nowak et al. в своих работах отмечает значительное снижение превотелл у ВИЧ-позитивных пациентов, перенесших АРТ, по сравнению с нелеченными людьми [174]. Относительное увеличение количественного уровня превотелл коррелирует с уровнем CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в слизистой ткани. Так же у пациентов с ВИЧ статусом недавно установлена высокая частота обнаружения в кишечном микробиоценозе *Prevotella copri*, *Prevotella stercorae* [131]. Кроме того, количественный уровень превотелл связан с величиной вирусной нагрузки, с продукцией и уровнем цитокинов, как в тканях, так и в кровотоке. Известно, что микробиота, богатая превотеллами, обуславливает высокие уровни в плазме крови триметиламин-N-оксида, который имеет проатерогенный эффект [179]. Учитывая высокие темпы и раннее начало атеросклероза и ишемической болезни сердца у ВИЧ-инфицированных лиц, полученные данные по микробиоте позволяют предположить некоторые механизмы развития у них данной патологии.

На фоне увеличения колонизации слизистой превотеллами у ВИЧ-инфицированных пациентов отмечают снижение количественного уровня *Bacteroides spp.* [130, 131, 171]. Среди видов, принадлежащих к роду *Bacteroides*, у пациентов с ВИЧ-статусом значительно снижается титр *Bacteroides fragilis*, причем как в образцах муцина [218], так и в биоптатах толстой кишки [224]. Полагают, что данный вид микроорганизмов может играть ключевую роль в поддержании адаптивного иммунитета, индуцируя превращение CD4<sup>+</sup> Т-клеток в Treg [177, 130]. Другие бактериальные индукторы циркулирующих Treg, такие как *B. massiliensis*, *B. thetaiotaomicron*, *Parabacteroides distasonis* или *B. uniformis*, достигают очень низкого количественного уровня только при поздних стадиях ВИЧ-инфекции [169]. Следует отметить, что при ВИЧ-инфекции среди представителей типа *Bacteroides*, также значительно снижено число микроорганизмов семейства *Rikenellaceae*. При этом в большей степени страдает род *Alistipes* [132, 145, 169], хотя механизмы угнетения количественного уровня данных микроорганизмов в микробиоме ВИЧ-инфицированных пациентов еще не

истолкованы. На сегодняшний день известно, что низкий количественный уровень *Alistipes spp.* наблюдается не только при ВИЧ-инфекции, но и при воспалительных заболеваниях кишечника. Однако этот факт требует дальнейшего исследования.

При ВИЧ-инфекции отмечается увеличение удельного веса протеобактерий по отношению к другим представителям кишечной флоры [133, 143, 169]. У нелеченных и прошедших курс АРТ ВИЧ-инфицированных установлено увеличение доли не только индигенных и условно-патогенных представителей энтеробактерий рода *Escherichia*, *Klebsiella*, но и рост частоты колонизации слизистой патогенными микроорганизмами родов *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, а также *Acinetobacter spp.* [35, 59]. Существенное увеличение энтеробактерий при АРТ связывают с уровнями sCD14, IL-1 $\beta$ , интерферонов и хроническим воспалительным процессом у ВИЧ-инфицированных пациентов без АРТ [169]. Вследствие воспаления в кишечнике развиваются микроэкологические нарушения, как при любом другом заболевании, поэтому увеличивается количество кислородных и/или азотных радикалов, что способствует активному росту и размножению факультативных анаэробов [143, 171]. В экспериментах *in vitro* установлено, что кишечные палочки увеличивают репликацию ВИЧ-1, которое оценивали по высоким уровням белка p24 ВИЧ-1, по сравнению с опытом, где вирус реплицировался самостоятельно [169]. В то же время ЛПС как структурный компонент бактерий самостоятельно не вызывает повышения репликации вируса. Однако уровень ЛПС в кровотоке ВИЧ-инфицированных коррелирует со смертностью пациентов и с развитием у них гипертонии [175]. При этом действие ЛПС не зависит от уровня Т-клеток CD4<sup>+</sup> [171]. Недавние исследования показали, что низкий уровень кислорода в ткани кишечника способствует размножению сальмонелл и повышает их вирулентность.

Изменение соотношения некоторых представителей кишечного микробиома по отношению к друг другу используют как маркеры стадий ВИЧ-инфекции. Так о прогрессировании заболевания говорит увеличение числа представителей типа *Proteobacteria*, вместе со снижением количества рода *Bacteroides* [164]. В других



исследованиях о прогрессировании судят по увеличению представителей рода *Prevotella* и уменьшению микроорганизмов, относящихся к типу *Firmicutes* [169]. Интересными являются исследования, которые продемонстрировали, что у SIV-инфицированных макаков-резусов увеличивается количественный уровень протеобактерий. Данные микроорганизмы проявляют большую метаболическую активность, по сравнению с другими представителями кишечного микробиома, а также являются бактериями, которые транслоцируются при лентивирусных инфекциях [149].

Анализ литературных данных показывает, что при ВИЧ-инфекции формируются микрoэкологические нарушения в кишечной экосистеме. Однако данные о состоянии микробиоценоза кишечника ВИЧ-инфицированных противоречивы. Зачастую дизайн исследования не предполагает наличие контрольной группы, т.е. группы лиц без ВИЧ-статуса, поэтому сложно делать выводы о наличии или отсутствии каких-либо специфических изменений микробиоценоза при данном заболевании. В исследованиях используются современные молекулярно-генетические методы исследования микрофлоры без выделения чистых культур, которые позволяют определить только различия в качественном и количественном составе. Поэтому практически не изучены биологические свойства как доминантных, так и ассоциативных представителей кишечного микробиоценоза. Проводятся параллели между состоянием микрофлоры при ВИЧ-инфекции и другими заболеваниями, делаются косвенные выводы о патогенетическом влиянии симбионтных бактерий на течение инфекции. В связи с этим был проведен целенаправленный поиск исследований, посвященный изучению функциональной активности различных кишечных микросимбионтов у ВИЧ-инфицированных.

### **1.3. Особенности биологических свойств кишечной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных людей, роль в патогенезе инфекции**

В настоящее время изучение кишечного микробиома у ВИЧ-инфицированных все чаще привлекает внимание исследователей разных стран, с

точки зрения определения патофизиологических и иммунологических механизмов прогрессирования ВИЧ-инфекции. При этом помимо оценки общего разнообразия и количественного состава микрофлоры актуальным является определение функционального состояния различных членов микробного сообщества [134, 153, 164]. Исследования ключевых путей метаболизма бактерий при ВИЧ-1 инфекции необходимы для лучшего понимания взаимодействия между микробиотой и иммунной системой, для разработки новых методов улучшения качества жизни ВИЧ-1 инфицированных людей и увеличения их продолжительности жизни.

Репликация ВИЧ-1 в энтероцитах уже на ранних этапах инфекции приводит к нарушению структуры слизистой кишечника и к изменению микробиома [132, 143, 169]. Этому также способствуют многочисленные факторы, такие как апоптоз энтероцитов, функциональные ошибки в производстве муцина и Ig A, потеря субмукозных лимфоцитов [123]. В связи с этим создаются предпосылки для изменения ключевых путей метаболизма бактерий.

В настоящее время уже известно о специфических особенностях метаболизма нормальной микрофлоры при ожирении, системной красной волчанке (СКВ), *Clostridium difficile* - ассоциированной диарее, вызванной токсигенными штаммами (CDAD t+) [28, 39, 68, 93]. Однако исследования показали, что ВИЧ-1 способствует более значительному влиянию на метаболизм кишечной экосистемы по сравнению с другими изученными состояниями и заболеваниями. Так, в работе Serrano-Villar S. et al. показано, что общее количество метаболитов, производимых и накапливаемых кишечными бактериями при ожирении и СКВ, уменьшается на 5% и 8% соответственно, по сравнению с микрофлорой относительно здоровых людей. Напротив, у больных CDAD t+ количество метаболитов увеличивается. При ВИЧ-инфекции также отмечается рост числа метаболитов в следующем порядке: у отвечающих на антиретровирусную терапию ВИЧ-инфицированных на 13%, у неответающих на АРТ на 9%, у нелеченных ВИЧ-пациентов на 5% [193].

Установлено, что у кишечной микробиоты ВИЧ-инфицированных отмечается нарушение метаболизма, так как при проведении жидкостной хроматографии образцов фекалий и экстрактов бактериальных клеток у них зарегистрированы вещества 139 молекулярных масс, тогда как при СКВ и CDAD t+ обнаружены метаболиты 332 молекулярных масс. Метаболическими биомаркерами, которые отличают микрофлору ВИЧ-инфицированных от СКВ и CDAD t+ являются три аминокислоты: пролин, фенилаланин и лизин. Накопленный уровень этих аминокислот в бактериальных экстрактах был ниже предела обнаружения у всех трех групп ВИЧ-инфицированных пациентов, но они накапливаются в значительных количествах у пациентов с СКВ и CDAD t+ и у здоровых людей. Эти результаты согласуются с выводом о том, что промежуточные продукты биосинтеза и деградации пролина, лизина присутствовали в больших количествах в образцах, полученных от больных ВИЧ-инфекцией [193]. Мета-протеомный анализ показал низкий уровень экспрессии белков, участвующих в обмене пролина, фенилаланина и лизина у микроорганизмов от ВИЧ-инфицированных. При этом во всех трех группах ВИЧ-инфицированных пациентов в кишечнике накапливались продукты кинуренинового пути катаболизма триптофана, тогда как при СКВ, CDAD t+ и у здоровых людей данные продукты были ниже предела обнаружения [130, 217].

Последние данные свидетельствуют, что избыток продуктов деградации триптофана у ВИЧ-инфицированных пациентов есть результат индукции активности фермента индоламин-2,3-диоксигеназы 1 (ИДО-1). ИДО-1 - это основной индуцибельный фермент катаболизма триптофана через кинурениновый путь. Данный фермент преимущественно обнаруживается в макрофагах и дендритных клетках (ДК) и регулируется интерферонами (ИФН) и агонистами Toll-подобных рецепторов (TLRs). Увеличенный катаболизм триптофана под действием ИДО-1 подавляет Т-клеточный ответ при различных заболеваниях или состояниях, включая аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата, вирусные инфекции, рак и беременность [37, 118, 204]. Такое подавление, по мнению большинства исследователей, происходит либо потому, что высокая

активность ИДО-1 снижает количество триптофана или потому, что производные катаболизма триптофана являются токсичными для Т-клеток. В любом случае способность ИДО-1 подавлять иммунные реакции обуславливает развитие иммунодефицита, наблюдаемого у людей с прогрессированием ВИЧ-инфекции [123, 143, 154]. Хотя снижение общего количества  $CD4^+$  Т-клеток является патогномоничным для прогрессирующей ВИЧ-инфекции, определение субпопуляций  $CD4^+$  Т-хелперов и факторов их повреждающих остается актуальным на сегодняшний день. Первоначально исследование различных субпопуляций  $CD4^+$  Т-клеток проводили на биологических моделях. Так, у макаков, инфицированных вирусом иммунодефицита обезьян – SIV, регистрировали изменение баланса циркулирующих Treg и Th17 клеток. Далее было продемонстрировано, что количество Th17 клеток также снижается и при ВИЧ-инфекции, что ведет к нарушению мукозального иммунитета и увеличению микробной транслокации через слизистую оболочку кишечника [149]. Катаболизм триптофана через кинурениновый путь регулирует баланс между Th17 и другими субпопуляциями клеток, в том числе циркулирующими Treg клетками.

Опыты Favre D. et al. [139] *in vitro* по влиянию различных катаболитов триптофана на дифференциацию Т-клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов показали значимость для данного процесса 3-гидроксикинурениновой кислоты, 3-гидроксиантраниловой кислоты. В частности, такой катаболит триптофана, как хинолиновая кислота ассоциировалась с неврологическими дефектами при ВИЧ-инфекции. А присутствие 3-гидроксикинурениновой и 3-гидроксиантраниловой кислот приводило к уменьшению количества IL-17–продуцирующих Т-клеток. При этом 3-гидроксиантраниловая кислота повышала долю  $CD4^+CD25^+$  Т клеток, экспрессирующих FoxP3, т.е. Treg [139]. Таким образом, растет понимание того, что избыток продуктов распада триптофана может негативно влиять на мукозальный иммунитет, и индукция кинуренинового пути связана с неблагоприятным клиническим исходом для ВИЧ-инфицированных.

В настоящее время есть предположения, что кишечные бактерии могут влиять на активность кинуренинового пути, т.е. на количество продуктов распада

триптофана в кишечнике, тем самым уменьшая или усиливая их влияние на слизистую оболочку и на иммунную систему ВИЧ-инфицированных. В работе Vujkovic-Cvijin I. et al. при сравнении численности таксонов и плазменного соотношения кинуренин/триптофан обнаружено, что таксоны 140 родов микроорганизмов достоверно связаны с метаболизмом триптофана [209]. Хотя бактерии являются одними из основных производителей незаменимой аминокислоты триптофана, сравнительно мало известно, как кодируется процесс катаболизма триптофана у бактерий [186, 204]. Действительно, геномные исследования выявили гены у несколько родов в семействе *Enterobacteriaceae*, которые кодируют ферменты, гомологичные тем, которые необходимы для катаболизма триптофана. Обнаружено, что микроорганизмы, синтезирующие генетические гомологи ферментов катаболизма триптофана через кинурениновый путь входили в состав «ассоциированных с заболеванием микробных сообществ» с большими количественными уровнями. Это были *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Shewanella* и *Bacillus*, а также члены семейств *Rhodobacteraceae*, *Micrococcaceae*, *Halomonadaceae*. Кроме того, один или несколько представителей перечисленных родов бактерий синтезировали до трех-четырёх гомологов ферментов для иммуноактивного кининуренинового пути [172, 193, 209]. Для подтверждения участия микрофлоры в кининурениновом пути были проведены исследования участия в катаболизме триптофана сапрофитических микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* и резидентов кишечного биотопа *E. coli in vitro*. Было обнаружено, что *P. fluorescens* штамм А 506 производит значительное количество кинуренина из триптофана, по сравнению с кишечной палочкой [193]. Поэтому любые микробиологические нарушения при ВИЧ-инфекции могут сопровождаться включением в микробиоценоз сапрофитной микрофлоры, которая обладает способностью продуцировать катаболиты триптофана, влияющие на мукозальный иммунитет.

Исследования метагенома ВИЧ-ассоциированных бактериальных сообществ позволили выявить еще ряд функциональных особенностей микрофлоры [154, 186]. Наиболее распространенными категориями генов у микроорганизмов,

выделенных от ВИЧ-положительных людей, были гены, кодирующие ферменты углеводного обмена (19,2%), метаболизм аминокислот (13,8%), энергетический обмен (9,2%) и обмен нуклеотидов (8,8%). При этом обнаружены различия в 173 генах у микробиоты, ассоциированной с ВИЧ-инфекцией, по сравнению с метагеномом бактериальных сообществ от ВИЧ-отрицательных людей. Для микрофлоры людей с ВИЧ-статусом характерно большое количество генов, «ответственных» за функционирование рибосом, за биосинтез ЛПС и имеющие отношение к биосинтезу триптофана. При этом у микробиоты пациентов с ВИЧ-инфекцией по сравнению с ВИЧ-негативными людьми было снижено число генов, кодирующих ферменты метаболизма пирувата, гликолиза и глюконеогенеза. Кроме того, отмечается недостаток генов, ответственных за обмен аминокислот (глицина, серина, треонина и гистидина). Однако микробиота ВИЧ-положительных людей характеризовалась увеличенным количеством генов метаболизма глутатиона, D-глутамина и D-глутамата [49, 132].

На основании проведенного анализа литературных данных установлено, что метаболиты и амфиболиты кишечной микрофлоры влияют на течение и прогрессирование ВИЧ-инфекции. Существуют функциональные особенности микрофлоры, обусловленные снижением числа активных генов, кодирующих ферменты энергетических путей, обмен некоторых аминокислот. Так как не указываются конкретные таксоны микроорганизмов, у которых регистрируются ВИЧ-ассоциированные изменения метаболизма, сложно судить о свойствах бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных. Снижение уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты основных путей метаболизма бифидобактерий, может сопровождаться изменением профиля метаболитов и состава всей кишечной микрофлоры.

#### **1.4. Специфическая модуляция микробиоты кишечника у ВИЧ-инфицированных людей**

Слизистая кишечника является одной из первичных мишеней для репликации вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1), в результате чего

возникает воспаление слизистой, изменяется архитектура и состав фекальной микробиоты. ВИЧ изменяет взаимодействие между бактериальными сообществами кишечника, поэтому начинают преобладать бактериальные популяции, которые являются провоспалительными или потенциально патогенными, что коррелирует с состоянием иммунного статуса [122, 145, 193]. Эти нарушения экосистемы кишечника могут выйти далеко за пределы композиционной структуры и достичь функциональных изменений у бактерий, приводящих к активации генов продукты экспрессии которых, участвуют в воспалении [145] и производстве метаболитов, влияющих на здоровье человека. Такими метаболитами являются иммуномодулирующие производные кинуренина и короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК) [92, 105, 209]. Кроме того, сама микрофлора, попадая в кровоток через поврежденную слизистую, способствует развитию хронической иммунной дисфункции, что повышает риск развития смерти у ВИЧ-инфицированных [118, 123]. В связи с этим очевидна необходимость коррекции микрофлоры кишечника при ВИЧ-инфекции с последующей оценкой влияния средств коррекции не только на микробиоту, но и на течение ВИЧ-инфекции в целом.

#### **1.4.1. Пробиотики при ВИЧ-инфекции: преимущества и риски применения**

Один из подходов, используемых для поддержания полезной микрофлоры желудочно-кишечного тракта при различных состояниях, заключается в употреблении пробиотиков [11, 30, 83, 102, 195]. Иммуномодулирующие свойства пробиотиков являются новой базой проектирования клинических исследований при таких заболеваниях, как аллергия, урогенитальные инфекции, рак, хеликобактерная инфекция, заболевания печени, заболевания толстого кишечника, синдром раздраженного кишечника (СРК) и панкреатит [178, 181].

Существует немного клинических исследований, демонстрирующих использование пробиотиков для лечения ВИЧ-инфекции [24, 98]. Ранее было показано, что *L. reuteri* способны снизить диарею и фекальные потери от *Cryptosporidium parvum* у мышей с иммунодефицитом. Основываясь на этих

результатах, Patel A. R. et al. провели эксперимент в течение 21 дня по оценке безопасности и толерантности сублимированного препарата *L. reuteri* у 39 пациентов, инфицированных ВИЧ. Они пришли к выводу, что *L. reuteri* можно назначать ВИЧ-инфицированным в концентрации  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/день без каких-либо клинически значимых проблем безопасности или проблем толерантности [178].

При диарее у ВИЧ-инфицированных детей положительное влияние оказывал пробиотический препарат на основе *L. plantarum* 299 v. Отмечается, что влияние будет более активным при использовании нескольких пробиотиков, т.е. консорциума. Показано также высокая эффективность терапии при сочетанном введении лактобацилл с бифидобактериями, которые оказывали иммуномодулирующее действие [188]. Wilson N. L. et al. в плацебо-контролируемом исследовании оценивали эффективность влияния *L. rhamnosus* GG в отношении кишечной симптоматики ВИЧ-инфицированных, получающих АРТ [147]. Между группами не было никаких значительных различий в частоте и характере диареи. Однако число копий РНК ВИЧ в крови и количества клеток CD4+ у ВИЧ-инфицированных оставалось стабильным во время всего курса пробиотикотерапии. Влияние лактобацилл на уровень репликации ВИЧ подтверждается также исследованиями Perez-Santiago J. et al. [180]. Было обнаружено, что пробиотические бактерии *L. acidophilus* в высокой концентрации обладают вирулицидным действием к ВИЧ-1 из-за их способности продуцировать антимикробные соединения, включая перекись водорода, пероксидазы (миелопероксидазы, пероксидазы эозинофилов) и галогениды (хлорид, йодид, бромид, роданид) [180, 200, 208].

Необходимо отметить, что большинство исследований по оценке влияния пробиотиков на течение ВИЧ-инфекции основаны на использовании различных штаммов лактобацилл. Несмотря на положительное влияние бифидобактерий на гомеостаз человека и широкое их использование при аутоиммунных, воспалительных, онкологических и других заболеваний, было проведено всего несколько исследований в когорте ВИЧ-инфицированных по использованию



бифидобактерий: *B. lactis Bi-07*, *B. bifidum* [128, 188]. Получены противоречивые результаты. Так, при использовании *B. bifidum* в комплексе с термофильным стрептококком у 37 ВИЧ-инфицированных детей в течение 2 месяцев не было выявлено различий в уровнях CD4+ клеток и частоте стула по сравнению с 40 ВИЧ-инфицированными детьми, которые получали плацебо. Другое исследование, наоборот, демонстрирует положительный эффект от применения *B. lactis Bi-07* более 16 недель, который выражался в увеличении количества CD4+ клеток, снижении уровня ДНК бактерий в кровотоке у людей с ВИЧ-статусом. Однако основной недостаток данного исследования заключается в малом объеме выборки, которая составила 20 человек.

Несмотря на имеющиеся данные о положительном влиянии пробиотиков на течение ВИЧ-инфекции, все-таки у некоторых практикующих врачей и ученых существуют опасения по использованию живых организмов для коррекции микрофлоры в условиях повышенной проницаемости эпителиального барьера кишечника [24, 145, 195, 212]. Самое серьезное потенциальное неблагоприятное событие от использования живых организмов - это развитие сепсиса [69, 75, 84]. Многочисленные сообщения свидетельствуют о возможности пробиотических организмов вызывать инфекцию кровотока [65, 138]. Поэтому актуальным является мета-анализ рисков развития сепсиса у ВИЧ-инфицированных и оценка уровня доказательности положительного влияния пробиотиков при ВИЧ-инфекции, проведенный Stiksrud S. et al. [199]. Рандомизированные контролируемые исследования показали эффективность использования пробиотиков для уменьшения продолжительности диареи у детей с ВИЧ-инфекцией. Чаще всего причиной диареи у лиц с ВИЧ-статусом является ротавирусная инфекция, а также прием антибиотиков и АРТ. При этом доказательства достаточно надежны при использовании пробиотиков для первичной профилактики инфекций, ассоциированных с *C. difficile*. Всего в работе было проанализировано 39 рандомизированных контролируемых исследований, где общее количество участников исследований составило 9401, из них 5060 получало пробиотические препараты. Риск развития сепсиса при ВИЧ-

инфекции, по данным мета-анализа, стремился к нулю. В этом же исследовании делается заключение о положительном влиянии пробиотиков на клиническое течение ВИЧ-инфекции, на состояние иммунного статуса, так как происходит умеренное увеличение количества CD4 клеток. Пробиотикотерапия предупреждает рецидивирование бактериального вагиноза у женщин с ВИЧ-стаусом, что, возможно, снижает риск передачи ВИЧ [173, 199]. В то же время пробиотики проявляют двоякое влияние на маркеры бактериальной транслокации. Всего было найдено 6 исследований, в которых оценивали влияние пробиотиков на маркеры транслокации при ВИЧ-инфекции. В 4 исследованиях были показаны эффекты - снижение бактериальной ДНК в плазме крови после 16-недельного приема симбиотика, статистически значимое снижение уровня ЛПС-связывающего белка (маркер транслокации) и IL-6 (маркер воспаления) после 4 недель приема *Saccharomyces boulardii* [178]. 2 исследования не показали никакого эффекта. Прием комплексного пробиотика в течение 48 недель не оказал влияния на маркеры транслокации sCD14 [145]. Однако окончательные выводы трудно сделать из-за различий сравниваемых популяций, применяемых пробиотических штаммов и продолжительности исследований. Также отсутствуют данные о структуре кишечного микробиома лиц, участвующих в исследованиях.

Учитывая отсутствие доказательств развития неблагоприятных исходов, доступную цену и экономический потенциал для людей с невысоким достатком, использование пробиотиков является перспективным при лечении ВИЧ-инфекции. Для оптимального восстановления и поддержания кишечного, вагинального или ректального микробиомов у ВИЧ-инфицированных, требуется создание теоретических основ применения пробиотиков, основанных на оценке структуры доминантной микрофлоры, ее биологических свойств и характера формирующихся микробиологических нарушений. В связи с тем, что введение экзогенных пробиотических штаммов рассматривается как «пересадка органа», для нивелирования его отторжения необходимы фундаментальные исследования *in vitro* по оценке взаимодействия нормофлоры ВИЧ-инфицированных и

экзогенно вносимых пробиотических штаммов. Все это в целом создает перспективы для дальнейших исследований фундаментального и прикладного характера, основной целью которых является увеличение продолжительности и качества жизни пациентов с ВИЧ-инфекцией.

#### **1.4.2. Использование пребиотиков и симбиотических препаратов при ВИЧ-ассоциированных микрoэкологических нарушениях**

В настоящее время начали активно проводиться исследования по созданию пре- и симбиотических препаратов для коррекции микрофлоры ВИЧ-инфицированных [188, 191]. ВИЧ-ассоциированный композиционный сдвиг микрофлоры потенцирует нарушение синтеза некоторых бактериальных метаболитов, которые оказывают влияние на состояние слизистой и, прежде всего, на проницаемость. Так, глутамин является метаболитом, который обеспечивает энергией энтероциты, увеличивает обновляемость клеток, ослабляет бактериальную транслокацию. Бутират, как продукт сбраживания клетчатки, считается источником энергии для эпителиальных клеток толстой кишки [3, 49]. Этот метаболит активирует гены, продукты экспрессии которых участвуют в глюконеогенезе толстой кишки, или гены, ответственные за пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток. Кроме того, бутират способствует поддержанию гомеостаза в кишечнике путем содействия иммунотолерантности для бактерий-комменсалов через регулирование провоспалительных медиаторов. Поэтому в настоящее время в состав пребиотических препаратов или/и симбиотиков для ВИЧ-инфицированных вводят различные аминокислоты, жирные кислоты и другие метаболиты нормофлоры [49, 66, 104]. Так, Gori et al. в плацебо контролируемом исследовании в группе ВИЧ-инфицированных, не проходивших АРТ, установил, что симбиотик, включающий фруктоолигосахариды (ФОС), смесь галактоолигосахаридов (ГОС), полиненасыщенные кислоты и бактериальные культуры *L. rhamnosus*, *L. reuteri* и *B. lactis Bi-07*, вызывает значительное снижение маркеров воспаления (sCD14) и активацию Т-клеток в связи с увеличением бифидобактерий и снижением уровней

патогенных *Clostridium lituseburense* и *C. histolyticum* [145]. У SIV-зараженных макаков, находящихся на АРТ и принимавших симбиотики (смесь пребиотиков и пробиотиков), повысился уровень и функциональная активность антиген-представляющих клеток желудочно-кишечного тракта, увеличилось количество и функциональная активность Т-клеток CD4+, также уменьшился фиброз лимфоидных фолликулов в кишечнике [149].

Serrano-Villar et al. в двойном слепом рандомизированном контролируемом исследовании в течение 6 недель оценивали влияние пребиотика, включающего ГОС, ФОС и глутамин, на разные категории ВИЧ-инфицированных: 12 ВИЧ-положительных пациентов с вирусемией, 23 пациента на АРТ, из которых 15 человек с подавленной вирусемией и 8 - «не ответчиков» на лечение [193]. Прием пребиотиков не привел к значительному изменению альфа-разнообразия микробных популяций (число таксонов) [100] в кишечнике во всех группах ВИЧ-инфицированных, тогда как анализ изменений в бета-разнообразии показал, что пребиотическое вмешательство значительно модифицирует структуру микробиоты во всех группах. После приема пребиотика значительное изменение количественного уровня бактерий регистрировали только у ВИЧ-положительных пациентов без лечения, что было связано с увеличением количества *Firmicutes* (*Faecalibacterium*, *Catenibacterium*, *Blautia*, *Eubacterium*) и *Actinobacteria* (*Collinsella* и *Corynebacterium*). Интересно, что в группе нелеченых ВИЧ-пациентов, принимавших пребиотик, отмечали снижение ВИЧ-ассоциированного дисбактериоза, чего не наблюдали у пациентов на АРТ. У ВИЧ-инфицированных пациентов регистрировали высокую продукцию бутирата, при чем обилие бутирата положительно коррелировало с числом бутират-продуцирующих видов, в том числе *Roseburia faecis*, *Lachnospira*, *Ruminococcus torques* и *Faecalibacterium prausnitzii* [193].

Исследователи предполагают, что причиной отсутствия эффекта от пребиотического вмешательства у лиц после АРТ является сформировавшийся устойчивый патомикробиоценоз и функциональная неполноценность штаммов. Микрофлора вирус-нелеченных пациентов характеризуется уменьшенным

сопротивлением к внешнему вмешательству, поэтому она четко среагировала на пребиотики [193]. Из этого следует, что ВИЧ-ассоциированный дисбиоз может достичь стабильности со временем, поэтому у пациентов, которые имеют длительный анамнез ВИЧ-инфекции, микроэкологические нарушения корректируется более трудно. Если учесть, что ГОС главным образом расщепляются актинобактериями (*Bifidobacterium*, *Collinsella*), ФОС метаболизируют множество микроорганизмов разных типов (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*), то модуляторная возможность приема пре- или/и симбиотических препаратов может варьировать в зависимости от качественного состава микрофлоры кишечника, ферментативной активности исходного измененного бактериального сообщества, от типа и химической структуры пребиотиков. Несмотря на достигнутые успехи в модуляции микрофлоры у ВИЧ-инфицированных пребиотиками и симбиотическими препаратами, на сегодняшний день существует еще множество не выясненных вопросов. Данные о биохимической активности микрофлоры у разной категории пациентов с ВИЧ-статусом немногочисленны, что затрудняет использование у них пребиотиков и симбиотиков. Очевидным является поиск новых субстанций, которые могут использоваться как пребиотические компоненты именно при ВИЧ-инфекции с учетом метаболических особенностей микрофлоры. Персонализированные методы лечения на основе коррекции структуры и биологических свойств микробиоты помогут понять, как мы можем использовать микробные взаимодействия для восстановления здоровья лиц, живущих с ВИЧ-инфекцией.

Анализ литературных данных показал, что имеются следующие противоречия, которые определили основные направления научных исследований микробиоценоза ВИЧ-инфицированных:

**Противоречие 1.** Имеется достаточная доказательная база по ключевой роли бифидобактерий в кишечном микробиоценозе, их регуляторному влиянию на функционирование всей экосистемы кишечника и в поддержании здоровья людей. При этом наряду с достижениями в изучении микрофлоры у ВИЧ-инфицированных и доказательства ее участия в патогенезе инфекции, обращает

на себя внимание недостаточность данных о роли бифидобактерий в формировании кишечного микробиоценоза при ВИЧ-инфекции и их влияния (положительного или отрицательного) на течение заболевания. Для того, чтобы нивелировать это противоречие требуется изучить состав, а также функциональные свойства бифидофлоры, позволяющие им осуществлять регуляцию кишечного микробиоценоза. Нет данных по качественному и количественному составу других культивируемых доминантных микроорганизмов (кишечных палочек, энтерококков), не описан характер их взаимодействия с бифидобактериями. Плохо изучены биологические характеристики условно-патогенных микроорганизмов, которые обнаруживаются в кишечнике ВИЧ-инфицированных, нет данных по экспрессии ими факторов инвазии, которые могут влиять на проницаемость кишечного эпителия и биологические свойства бифидобактерий.

**Противоречие 2.** Рандомизированные плацебо-контролируемые исследования свидетельствуют об эффективности приема пробиотиков, пребиотиков и симбиотиков при аутоиммунных, аллергических и онкологических заболеваниях, т.е. тех заболеваниях, в основе которых лежат иммунологические механизмы и доказана патогенетическая роль изменений микрофлоры кишечника. Имеются данные об участии дисбиозной микрофлоры в прогрессировании ВИЧ-инфекции, тем не менее, использование иммунобиологических препаратов на основе пробиотических штаммов не нашло широкого применения при лечении ВИЧ-инфекции. Имеющиеся немногочисленные исследования по использованию пробиотических бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных, а самое главное, противоречивость полученных результатов свидетельствует о необходимости создания теоретических основ управления структурой и биологическими свойствами доминантных бифидобактерий. Для решения этой проблемы необходимы классические бактериологические исследования по изучению как бифидофлоры пациентов с ВИЧ-статусом, так и свойств пробиотических штаммов и возможности их безопасного использования у различных категорий ВИЧ-инфицированных пациентов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

В настоящее время исследование микрофлоры кишечника осуществляют в доминирующем числе случаев с помощью молекулярно-генетических методов, поэтому в первую очередь оценивают структуру микробного сообщества *in situ* [26, 29, 133, 145]. Как любая экологическая система, кишечный микробиоценоз подчиняется закону биоразнообразия, т.е. чем разнообразнее система, тем выше пластичность и способность к саморегуляции [36, 100]. В связи с этим мы оценили кишечный микробиоценоз ВИЧ-инфицированных детей с помощью простых и наглядных индексов.

#### 2.1. Биоразнообразие культивируемой микрофлоры у ВИЧ-инфицированных детей

При оценке разнообразия внутри сообщества кишечных микроорганизмов (альфа-разнообразия) установлено отсутствие статистически значимых отличий микрофлоры у ВИЧ-инфицированных детей по количественному уровню микроорганизмов в кишечнике и по числу таксонов (Таблица 5).

Таблица 5 – Сравнение показателей альфа-разнообразия культивируемой микрофлоры у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей

Группа	Средний количественный уровень	Число родов	Число видов	Индекс разнообразия Маргалефа Mg	Индекс разнообразия Менхиника Mn	Индекс Симпсона D
ВИЧ+ (n=89)	$1,4 \times 10^{12}$	18	41	10,8	$3,46 \times 10^{-5}$	0,33*
ВИЧ- (n=74)	$1,2 \times 10^{12}$	17	31	8,7	$2,82 \times 10^{-5}$	5,1

Примечание: \* достигнутый уровень достоверности различий  $p=0,001$

Так же сходными являются индексы разнообразия микрофлоры Маргалефа и Менхиника, которые показывают одинаковую выравненность микрофлоры в исследуемых группах. Данные показатели не учитывают обилие отдельных таксонов, выделенных у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей.

Однако количественный уровень отдельных культивируемых симбионтов учтен индексом Симпсона, который свидетельствует о значимых отличиях в выравненности обилия таксонов в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей и детей группы сравнения. Чем меньше индекс Симпсона  $D$ , тем выше выравненность (обилие таксонов) микробной популяции. Индекс Симпсона у детей с ВИЧ-инфекцией в 15,5 раз меньше, чем в группе детей без ВИЧ-статуса, т.е. кишечный микробиоценоз у ВИЧ-инфицированных более выравненный по количественному уровню и однородный. Это может быть обусловлено снижением геометрической концентрации облигатной микрофлоры и одновременным повышением титров условно-патогенных микросимбионтов.

Анализ культивируемой микрофлоры по коэффициенту постоянства позволил установить состав облигатной, добавочной и случайной микрофлоры у детей с ВИЧ-инфекцией. При этом постоянная микрофлора у ВИЧ-инфицированных детей была представлена микроорганизмами рода *Bifidobacterium* (C=100%), *Lactobacillus* (C=78%), *Staphylococcus* (C=97%), а также лактозопозитивными кишечными палочками (C=81%), *E. faecalis* (C=91%), *E. faecium* (C=53%). У детей без ВИЧ-статуса в состав облигатной микрофлоры входили те же таксоны микроорганизмов, за исключением, *E. faecium*, так как значение C, равное 34%, позволило отнести данные бактерии в группу добавочных микросимбионтов. Высокая частота обнаружения грибов рода *Candida* в исследуемых популяциях (C=58-70%) позволила идентифицировать данных микромицетов как постоянную микрофлору как в группе ВИЧ-инфицированных, так и в группе здоровых детей. В целом состав группы добавочных кишечных микроорганизмов в сравниваемых популяциях детей был немногочисленный по числу таксонов (Таблица 6).



Таблица 6 – Состав культивируемой микрофлоры кишечника у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей по показателю постоянства (С)

Группа детей	Постоянная микрофлора С>50%	Добавочная микрофлора 25%<С<50%	Случайная микрофлора С<25%
ВИЧ+	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>E.coli lac-</i>
	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>E.coli hly+</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
	<i>E.coli lac+</i>		<i>Bacillus spp</i>
	<i>E.faecalis</i>		<i>Proteus spp</i>
	<i>E.faecium</i>		<i>Pseudomonas spp.</i>
	<i>Staphylococcus spp.</i>		<i>Actinomyces spp.</i>
	<i>Candida spp.</i>		
ВИЧ-	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>E.coli lac-</i>
	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.coli hly+</i>
	<i>E.coli lac+</i>		<i>Bacillus spp</i>
	<i>E.faecalis</i>		<i>Proteus spp</i>
	<i>Staphylococcus spp.</i>		<i>Actinomyces spp.</i>
	<i>Candida spp.</i>		<i>Streptococcus spp.</i>

У детей с ВИЧ-инфекцией к добавочной микрофлоре были отнесены только *Klebsiella spp.* (С=34%) и гемолизинпродуцирующие кишечные палочки (С=30%). Добавочная микрофлора детей группы сравнения была представлена также микроорганизмами рода *Klebsiella spp.* (С=38%) и *E. faecium* (С=34%).

К случайной микрофлоре кишечника ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей было отнесено по 6 таксонов. В основном случайными микросимбионтами были условно-патогенные и патогенные бактерии. У ВИЧ-инфицированных детей к группе случайных микроорганизмов были отнесены *E.coli lac-* (С=20%), *Actinomyces spp.* (С=18%), *Bacillus spp.* (С=7%), β-гемолитические стрептококки (С=3%), *Pseudomonas* (С=2%), *Proteus spp.* (С=1%). Случайной микрофлорой кишечника в группе ВИЧ-негативных детей были *E.coli hly+* (С=23%), *Actinomyces spp.* (С=11%), *Proteus spp.* (С=7%), *Streptococcus spp.* (С=7%), *E.coli lac-* (С=4%), *Bacillus spp.* (С=1%).

По данным литературы, в кишечном микробиоценозе людей преобладают анаэробные виды микроорганизмов, так как соотношение аэробных к анаэробным видам составляет от 1 : 10 до 1 : 100. Изменение данного соотношения в сторону аэробных микроорганизмов рассматривают как микрoэкологические нарушения [22, 52, 58]. Соотношение общего количества факультативных анаэробов к

облигатным анаэробам у ВИЧ-инфицированных составило 1 : 23, тогда как в группе ВИЧ-негативных детей 1 : 76. Это соотношение разных по типу дыхания микроорганизмов в группе ВИЧ-инфицированных согласуется с обнаруженной ранее выравненностью таксонов, т.е. в целом наблюдаем снижение количества облигатных бактерий и увеличение титров факультативных анаэробов.

Таким образом, микробная популяция кишечника у ВИЧ-инфицированных детей по количеству таксонов и общему числу микросимбионтов не отличается от микрофлоры кишечника детей группы сравнения. Отмечается сходство качественного состава постоянной, добавочной и случайной микрофлоры с микрофлорой детей без ВИЧ-статуса. При этом при ВИЧ-инфекции регистрируется выравненность количественного уровня таксонов и снижение соотношения количества аэробных и анаэробных видов.

## **2.2. Состояние кишечного микробиоценоза ВИЧ-инфицированных детей**

Микрофлора кишечника является чувствительным индикатором множества патологических состояний и заболеваний, так как ее изменения происходят задолго до клинической манифестации болезни [20, 29, 67, 129]. На сегодняшний день немногочисленные данные о состоянии кишечного микробиоценоза у ВИЧ-инфицированных свидетельствуют о наличии ее изменений, которые происходят уже в инкубационном периоде болезни и сохраняются на всех стадиях ВИЧ-инфекции. Структура микрофлоры меняется из-за повреждения слизистой кишечника вследствие репликации вируса, применения АРТ, а также в результате нарушения иммунологической реактивности [145, 174]. Отсутствие данных по структуре и количественному составу культивируемой микрофлоры, частоте и характере микробиологических нарушений значительно затрудняет профилактику их развития, а также ее коррекцию.

Обследовано 89 детей с ВИЧ-инфекцией, средний возраст которых составил  $24 \pm 2$  мес, поступивших в отделение капельных инфекций (№ 1) ГАУЗ КО «КОКИБ». 10 (11%) детей были госпитализированы по поводу вторичных бактериальных заболеваний и 79 (89%) человек с острыми респираторными

вирусными инфекциями. Диагноз ВИЧ-инфекция выставлен врачами-инфекционистами на основании эпидемиологического анамнеза (перинатальный контакт) и лабораторных исследований, выполненных в соответствии с протоколами ведения больных. Лиц мужского пола было 49 (55%), женского - 40 (45%) человек. Средний вес детей при рождении  $2830 \pm 94$  г. Дети на момент исследования имели преимущественно мясо-молочный рацион питания. Питание детей изучено с помощью раздаточного анкетирования матерей без интервьюирования. Анкета разработана на основе опросников НИИ питания Российской академии медицинских наук по изучению питания и здоровья детей в возрасте от 0-5 лет (2002, Москва) (Приложение 1). 71 ребенок (79,8%) получал стандартную (базовую) терапию при ВИЧ-инфекции – два нуклеозидных ингибитора обратной транскриптазы + один ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы или один ингибитор протеазы. Дети были неорганизованны. Семьи в 73% были полными. Социальный статус детей основной группы: 32 женщины (36 %) и 40 отцов (45%) являлись потребителями парентеральных наркотических средств. 79% родителей имели среднее или средне-профессиональное образование, 21% - высшее; у 75 (84%) семей постоянный среднегодовой семейный доход не превышал двух прожиточных минимумов, у остальных - был ниже прожиточного минимума по региону. Все дети с ВИЧ-статусом при включении в основную группу были обследованы на гельминтоз. Дети, которые имели жидкий стул, дополнительно были обследованы на криптоспоридиоз. По данным историй болезни, гельминты и криптоспоридии у ВИЧ-инфицированных детей не выделены.

Группу сравнения (n=74) формировали с учетом возрастной, гендерной, социальной характеристик, характера вскармливания и питания ВИЧ-инфицированных детей. Критерием включения в группу сравнения было отсутствие у детей по данным эпидемиологического анамнеза ВИЧ-статуса. Все дети группы сравнения были рождены путем операции Кесарево сечение, средний вес при рождении  $3120 \pm 110$  г., после рождения находились на искусственном вскармливании, что было связано с гипогалактией матери, отказом ребенка от

груди, отказом самой женщины от грудного вскармливания ребенка. Дети группы сравнения не имели врожденной патологии, средний возраст на момент исследования составил  $26 \pm 4$  мес., лиц мужского пола было 39 (53%), женского – 35 (47%) человек. Характер питания детей без ВИЧ-статуса в момент проведения исследования не отличался от основной группы. Дети были неорганизованны. Семьи в 78 % были полными. Социальный статус семей был схожий с основной группой: 27 (36 %) матерей и 30 (41 %) отцов у детей группы сравнения потребляли парентеральные наркотические средства; 80% родителей имели средне-профессиональное образование, 20% - высшее; 70 (95 %) семей группы сравнения имели постоянный среднегодовой доход, не превышающий двух прожиточных минимумов по региону.

Установлено, что в целом бифидобактерии были обнаружены у всех ВИЧ-инфицированных детей и 96% детей без ВИЧ-статуса. Количественные уровни были сходными и составили в среднем 9 (8; 10) lg КОЕ/г ( $U=0,29$ ;  $p=0,77$ ). У ВИЧ-инфицированных детей среди идентифицированных видов бифидобактерий доминировали *B. breve* (Рисунок 1), у детей без ВИЧ-статуса – *B. bifidum* (Рисунок 2).

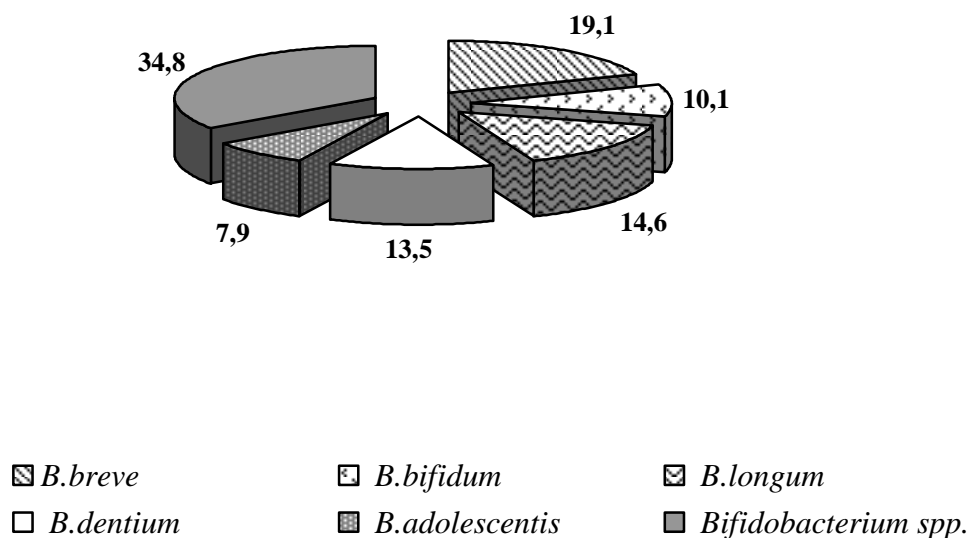
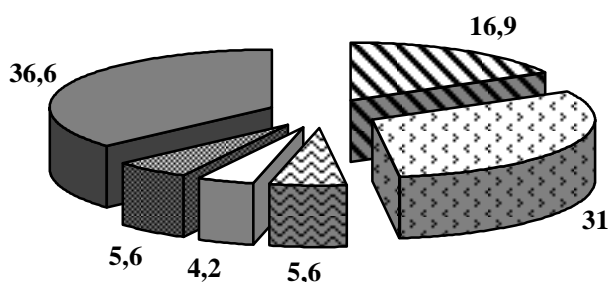


Рисунок 1 - Видовая структура бифидобактерий у ВИЧ-позитивных детей (в %)



■ *B. breve*                      □ *B. bifidum*                      ▨ *B. longum*  
 □ *B. dentium*                      ▩ *B. adolescentis*                      ■ *Bifidobacterium spp.*

Рисунок 2 - Видовая структура бифидобактерий у ВИЧ-негативных детей (в %)

Плотность колонизации слизистой кишечника ВИЧ-инфицированных *B. breve* была снижена до 9 (8; 10) lg КОЕ/г, а количественный уровень *B. bifidum* в кишечном микробиоценозе здоровых детей достигал 10 (9; 11) lg КОЕ/г. У детей группы сравнения *B. breve* были вторыми микросимбионтами в структуре бифидобактерий, а их количественный уровень был на один lg КОЕ/г выше, чем у детей с ВИЧ-статусом.

Второе ранговое место в структуре бифидофлоры при ВИЧ-инфекции занимали *B. longum*, третье – *B. dentium*, основным биотопом обитания которых считается полость рта. Уровень колонизации данными видами составил 9 (8; 10) lg КОЕ/г и 10 (8; 11) lg КОЕ/г соответственно.

У детей группы сравнения на третьей позиции в структуре бифидофлоры находились *B. longum* и *B. adolescentis*. Средняя геометрическая концентрация данных видов достигала 10 (8; 11) lg КОЕ/г и 9 (8; 10) lg КОЕ/г соответственно.

Среди анаэробных видов кишечных микросимбионтов у ВИЧ-инфицированных детей в 11,2% случаев выделяли бактерии рода *Propionibacterium spp.* с количественным уровнем 9 (8; 10) lg КОЕ/г, в 5,6% случаев *Eubacterium spp.* со средней геометрической концентрацией 10 (8; 11) lg КОЕ/г. У детей группы сравнения *Propionibacterium spp.* и *Eubacterium spp.* были

выделены только в 1,4% случаев. Учитывая, что данные анаэробные бактерии относят к облигатной микрофлоре кишечника, низкую частоту колонизации данными микросимбионтами можно объяснить включением данных микросимбионтов в состав биопленки, ассоциированной со слизистой, что требует использования в качестве материала пристеночной слизи.

У детей с ВИЧ-инфекцией была снижена частота колонизации слизистой представителями рода *Lactobacillus* до 77,5%, тогда как у детей группы сравнения они были обнаружены в 93,2% случаев. Количественный уровень данных микросимбионтов у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей составил 6 (6; 8) lg КОЕ/г ( $U=0,58$ ;  $p=0,56$ ).

Еще один из постоянных микросимбионтов кишечника – типичная кишечная палочка колонизировала слизистую 81% ВИЧ-позитивных детей и 97,3% ВИЧ-негативных детей ( $\chi^2=0,2$ ,  $df=1$ ,  $p=0,65$ ). У ВИЧ-инфицированных детей регистрируется большее количество *E. coli lac+*, чем у здоровых детей - 8 (6; 8) lg КОЕ/г против 7 (6; 8) lg КОЕ/г ( $U=1,22$ ;  $p=0,22$ ). Кроме этого, у ВИЧ-инфицированных детей регистрировали высокую частоту обнаружения других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, что согласуется с данными литературы. У ВИЧ-позитивных детей в 20,2% случаев в кишечном микросимбиоценозе регистрировали *E. coli lac-*, в 30,3% случаев – *E. coli hly+*. Количественные уровни кишечных палочек с измененными свойствами составили 8 (6; 8) lg КОЕ/г и 7 (6; 8) lg КОЕ/г соответственно. У ВИЧ-негативных детей частота колонизации данными микросимбионтами не превышала 4,1% и 22,9% соответственно, а количественные уровни были на один lg ниже и составили 7 (6; 7) lg КОЕ/г и 6 (5; 7) lg КОЕ/г соответственно ( $U=2,21$ ;  $p=0,03$ ).

Бактерии рода *Klebsiella* обнаруживали в кишечнике 33,7% детей с ВИЧ-инфекцией в количестве 8 (7; 9) lg КОЕ/г. Однако такую же частоту, численность клебсиелл регистрировали и в группе сравнения. Частота выделения клебсиелл у них была 37,8%, а средний уровень – 8 (7; 8) lg КОЕ/г ( $U=0,16$ ;  $p=0,88$ ). Клебсиеллы у ВИЧ-инфицированных в 90% случаев были отнесены к виду *K. pneumoniae* подвид *pneumoniae*, в 6,7% случаев - к *K. oxytoca* и в 3,3% случаев - к

*K. pneumoniae* подвид *ozaenae*. У детей группы сравнения также преобладал вид *K. pneumoniae* подвид *pneumoniae* (71,4%), но доля *K. pneumoniae* подвид *ozaenae* составила 25%. Несмотря на схожесть у детей структуры клебсиелл отмечали различия в уровнях колонизации данными бактериями. Количественное содержание *K. pneumoniae* у детей с ВИЧ-статусом был в 10 раз выше, чем у ВИЧ-негативных детей (9 (8; 10) и 8 (7; 8) lg КОЕ/г соответственно).

Микроорганизмы рода *Enterococcus* были представлены *E. faecalis* и *E. faecium*. Фекальные энтерококки обнаруживали у 91% детей с ВИЧ-инфекцией и 93,2% детей группы сравнения, количественный уровень данных бактерий составил 7 (6; 7) и 6 (6; 7) lg КОЕ/г соответственно ( $U=2,54$ ;  $p=0,01$ ). Частота обнаружения *E. faecium* у детей с ВИЧ-статусом была высокой и достигала 52,8%, тогда как в группе здоровых детей не превышала 33,7%. Количество *E. faecium* в образцах фекалий в сравниваемых группах не отличалось ( $U=0,76$ ;  $p=0,32$ ).

Распространенность стафилококков у ВИЧ-инфицированных детей составила 102,7 стафилококков на 100 детей. Это было обусловлено тем, что в 24,7% случаев у ребенка с ВИЧ-инфекцией в кишечнике обнаруживали по 2 и более видов стафилококков. У ВИЧ-негативных детей распространенность составила 77,6 штаммов на 100 детей ( $\chi^2=4,69$ ,  $df=1$ ,  $p=0,03$ ), так как выделяли не более одного вида данных микроорганизмов. При оценке частоты колонизации данными микроорганизмами было установлено, что стафилококки в сравниваемых группах были постоянными представителями микробиоценоза. Данные бактерии колонизировали кишечник 96,6% детей с ВИЧ-статусом с количественным уровнем 5 (3; 6) lg КОЕ/г. Частота обнаружения стафилококков в кишечном содержимом детей группы сравнения составила 87,8%. Содержание стафилококков у ВИЧ-негативных и ВИЧ-позитивных детей составило 5 (2; 5) lg КОЕ/г ( $U=0,05$ ;  $p=0,96$ ). Установлено, что при ВИЧ-инфекции регистрируется большее видовое разнообразие стафилококков. Так, у ВИЧ-инфицированных детей были выделены 9 видов, у детей группы сравнения – 6 видов стафилококков. В структуре стафилококков, не зависимо от ВИЧ-статуса, доминирующее положение занимали *S. aureus* (Рисунок 3).

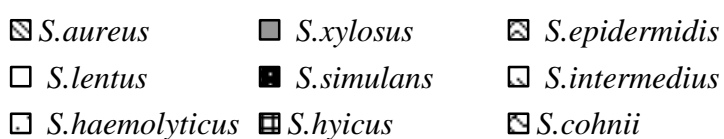
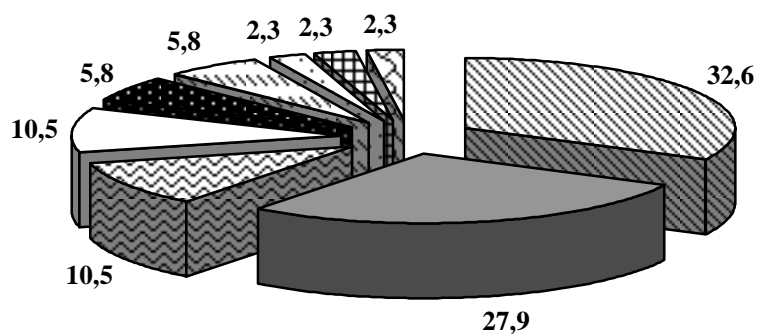


Рисунок 3 - Структура стафилококков у детей с ВИЧ-инфекцией (в %)

Второе место в структуре кокковой флоры у ВИЧ-инфицированных детей занимал *S. xylosus*, на третьем месте были *S. lentus* и *S. epidermidis*. Среди стафилококков от ВИЧ-отрицательных детей вторую позицию занимали *S. xylosus* и *S. epidermidis*, третью позицию - *S. intermedius* (Рисунок 4).

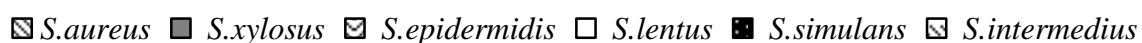
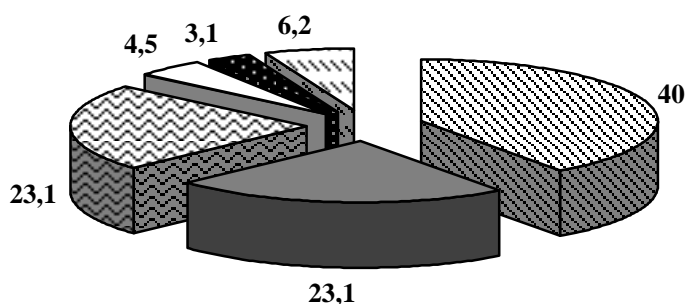


Рисунок 4 - Структура стафилококков у ВИЧ-негативных детей (в %)

Анализ количественного содержания различных видов стафилококков показал различия в сравниваемых группах титров *S. aureus* ( $U=1,84$ ;  $p=0,05$ ).

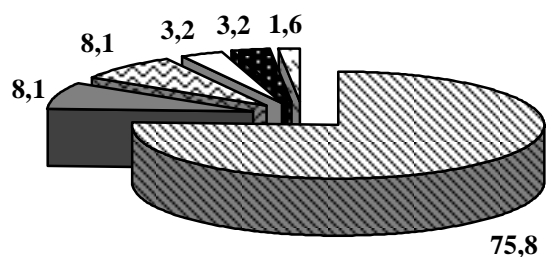


Более высокое количество золотистых стафилококков в фекальном микробиоценозе зарегистрировано у ВИЧ-негативных детей, оно составило 4 (3; 5) lg КОЕ/г против 2 (2; 3) lg КОЕ/г. Содержание эпидермальных стафилококков у ВИЧ-негативных детей достигало 6 (5; 7) lg КОЕ/г, у детей с ВИЧ-инфекцией их численность была ниже на 2 lg КОЕ/г. Также у детей с ВИЧ-статусом регистрировали более низкие титры *S. lentus* (4 (3; 5) lg КОЕ/г против 5 (4; 6) lg КОЕ/г). Таким образом, значимых отличий в частоте колонизации стафилококками кишечника у ВИЧ-инфицированных не выявлено. Более того, количественный уровень большинства видов стафилококков у ВИЧ-позитивных детей был ниже, чем у ВИЧ-негативных детей.

Кокковая флора детей сравниваемых групп включала также  $\beta$ -гемолитические *Streptococcus spp.* Невысокие частотные характеристики стрептококков позволили отнести их в группу добавочной микрофлоры. Частота колонизации представителями рода *Streptococcus* составила 3,4% в группе детей с ВИЧ-инфекцией и 6,8% у ВИЧ-негативных детей. Количественное содержание также не отличалось и составило 6 (4; 6) lg КОЕ/г соответственно ( $U=0,31$ ;  $p=0,76$ ).

В целом соотношение кокковых и палочковидных форм бактерий у ВИЧ-инфицированных детей составило 1 : 1,5 (227 : 333), у ВИЧ-негативных детей 1 : 1 (184 : 196). Это связано с увеличением у ВИЧ-инфицированных детей частоты обнаружения представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

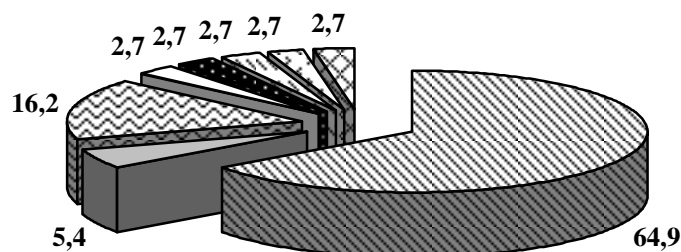
Кандидозы занимают лидирующую позицию среди оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных [8, 12, 91]. Кишечник является основным резервуаром грибов рода *Candida*. Грибы рода *Candida* колонизировали слизистую кишечника 69,7% ВИЧ-позитивных детей, причем с достаточно высоким количественным уровнем 5 (3; 6) lg КОЕ/г. В целом структура грибов рода *Candida* у ВИЧ-инфицированных детей включала 6 видов (Рисунок 5).



*C. albicans*
 *C. dubliniensis*
 *C. parapsilosis*  
 *C. zylanooides*
 *C. krusei*
 *C. lyopolitica*

Рисунок 5 - Структура грибов рода *Candida* у ВИЧ-позитивных детей (в %)

Частота обнаружения микромицетов в группе сравнения составила 58,1%, содержание 3 (3; 4) lg КОЕ/г ( $U=2,57$ ;  $p=0,01$ ). Грибы рода *Candida* были представлены 8 видами, а также неидентифицированными штаммами (Рисунок 6).



*C. albicans*
 *C. dubliniensis*
 *C. parapsilosis*
 *C. krusei*  
 *C. sake*
 *C. ciferii*
 *C. kefiri*
 *C. lusitaniae*

Рисунок 6 - Структура грибов рода *Candida* у ВИЧ-негативных детей (в %)

В группе ВИЧ-инфицированных отмечали более высокую распространенность носительства грибов *C. albicans*, которая достигала 52,8 на 100 ВИЧ-инфицированных. В группе детей без ВИЧ-статуса носительство данных

микросимбиотом было в 1,6 раза ниже. Плотность колонизации *C. albicans* в сравниваемых группах не отличалась и составила 5 (4; 6) lg КОЕ/г ( $U=0,54$ ;  $p=0,76$ ). Среди *non-albicans* видов у ВИЧ-инфицированных доминировали *C. dubliniensis* и *C. parapsilosis*. У ВИЧ-негативных детей - *C. parapsilosis*.

В составе кишечного микробиоценоза у ВИЧ-инфицированных детей обнаруживали случайных микросимбиотомов - аэробных бацилл и псевдомонад. *Bacillus spp.* регистрировали в 6,7% случаев, *Pseudomonas aeruginosa* у 2,2% детей с ВИЧ-статусом. В микробиоценозе кишечника у детей группы сравнения данных бактерий не обнаружили. Данные микроорганизмы являются сапрофитными. Основным местом обитания бацилл и псевдомонад является окружающая среда, поэтому нахождение их в составе кишечного микробиоценоза ВИЧ-инфицированных косвенно свидетельствует о микробиологических нарушениях.

Таким образом, у ВИЧ-инфицированных детей при сохранении высоких и соответствующих нормам количественных уровней бифидобактерий регистрируется снижение содержания лактобацилл, высокие уровни условно-патогенных энтеробактерий (*E. coli lac-*, *E. coli hly+*) ( $p=0,03$ ), *E. faecalis* ( $p=0,01$ ) и грибов рода *Candida* ( $p=0,01$ ). Регистрируется широкое видовое разнообразие стафилококков, однако их содержание ниже, чем у детей без ВИЧ-инфекции ( $p=0,05$ ).

### **2.3. Состояние кишечной микрофлоры у детей на разных стадиях ВИЧ-инфекции**

В мировой практике довольно часто при выставлении диагноза ВИЧ-инфекции пользуются классификацией CDC (1998 г.), которая учитывает клинические проявления и количество лимфоцитов. В связи с этим работы по исследованию микрофлоры ВИЧ-инфицированных демонстрируют зависимость состояния кишечной микрофлоры от уровня CD4+, т.е. у разных иммунных категорий ВИЧ-инфицированных [122, 143]. Данные о кишечном микробиоценозе пациентов на разной стадии ВИЧ-инфекции согласно Российской классификации по В. И. Покровскому с изм. (1989) отсутствуют. Если учесть, что в Российской

Федерации пользуются именно вышеуказанной классификацией, то данные о состоянии кишечного микробиоценоза на разной стадии заболевания являются актуальными и необходимыми для определения групп риска по развитию микрoэкологических нарушений и прогнозирования развития оппортунистических инфекций бактериальной и грибковой этиологии у данной категории пациентов.

Исследование проводилось на базе отделения капельных инфекций (№ 1) Государственного автономного учреждения здравоохранения Кемеровской области «Кемеровская областная клиническая инфекционная больница» (ГАУЗ КО «КОКИБ»), куда поступали ВИЧ-инфицированные дети с ОРВИ и пневмониями. Это были дети с выставленным и подтвержденным диагнозом ВИЧ-инфекция, в преобладающем большинстве случаев со 2 стадией – стадией первичных проявлений (76,4%). Распределение детей по стадиям ВИЧ-инфекции представлено в таблице 7.

Таблица 7 – Характеристика группы ВИЧ-инфицированных детей

Стадии ВИЧ-инфекции	Показатель (абс/в%)
2 А	4 (4,5%)
2 Б	50 (56,1%)
2 В	14 (15,7%)
3	13 (14,6%)
4	8 (8,9%)

В связи с тем, что группа пациентов с 2 А стадией (бессимптомная) была не многочисленна (4 человека или 4,5%), в работе не приводятся данные об их качественном и количественном составе кишечного микробиоценоза в связи с нерепрезентативностью группы. По данным литературы, стадия первичных проявлений, протекающая в форме острой инфекции (2 Б и 2 В) регистрируется в 50-90% случаев [8, 42], поэтому при анализе кишечной микрофлоры группа ВИЧ-инфицированных детей со стадией первичных проявлений была разделена на две подгруппы (2 Б и 2 В). Также представлены обобщенные данные о микрофлоре

детей, находящихся на стадии вторичных заболеваний (4 стадии) ВИЧ-инфекции, без деления на подгруппы по тяжести (4 А, 4 Б, 4 В).

У детей с 2 Б стадией регистрировали снижение частоты колонизации слизистой кишечника лактобациллами (74,5%) и типичными кишечными палочками (76,5%). При этом если количество лактобацилл было в пределах установленных значений норм 7 (6; 8) lg КОЕ/г, то уровень колонизации *E. coli lac+* превышал общепринятые нормы в 10 раз и составил 9 (8; 11) lg КОЕ/г. Это было связано с тем, что 27,5% детей с ВИЧ-инфекцией имели высокие титры типичных эшерихий (9 и более lg). Частота колонизации слизистой кишечника бифидобактериями и фекальными энтерококками была высокой и составила 98% и 90,2% соответственно. Среди бифидобактерий чаще обнаруживали *B. longum* (34,3%), *B. breve* (28,1%) *B. dentium* (28,1%). 39,2% детей с 2 Б стадией ВИЧ-инфекции имели сниженные титры бифидобактерий, поэтому средние показатели колонизации были ниже установленных норм – 9 (8; 10) lg КОЕ/г. Количественное содержание *E. faecalis* составило 7 (6; 7) lg КОЕ/г. У 45% детей данной группы с такими же уровнями регистрировали *E. faecium*.

Также у детей с 2 Б стадией ВИЧ-инфекции отмечали высокую частоту колонизации слизистой кишечника микроорганизмами рода *Staphylococcus* (96,1%) и представителями семейства *Enterobacteriaceae* (82,3%). Всего при данной стадии ВИЧ-инфекции было выделено 9 видов стафилококков (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. xylosum*, *S. intermedius*, *S. lentus*, *S. hyicus*, *S. haemolyticus*). Среди стафилококков наиболее часто слизистую колонизировали *S. aureus* (29,4%), *S. epidermidis* (15,7%), *S. xylosum* (15,7%), *S. simulans* (11,8%). Плотность колонизации данными видами стафилококков была высокой и составила в среднем 5 (3; 6) lg КОЕ/г. Частота обнаружения других видов стафилококков составила от 2 до 7,8%. Энтеробактерии включали клебсиелл, протеев и кишечных палочек с измененными биологическими свойствами. Частота колонизации клебсиеллами достигала 37,3%, гемолизинпродуцирующими кишечными палочками – 35,3%. Плотность колонизации данными бактериями составила 8 (6; 9) lg КОЕ/г и 7 (6; 8) КОЕ/г

соответственно. Если число лиц с лактозонегативными эшерихиями было не высоким (13,7%), то их количественные уровни достигали в среднем 9 (8; 9) lg КОЕ/г.

У 58,8% детей при 2 Б стадии ВИЧ-инфекции обнаруживали грибы рода *Candida*. Наибольшей была частота колонизации грибами *C.albicans* (52,9%), обнаруживали также *C.dublinskiensis*, *C. parapsilosis*, *C.zylanooides*, но частотные характеристики не превышали 6%. Количественное содержание *C.albicans* было высоким и составило 5 (3; 6) lg КОЕ/г.

Из случайной микрофлоры в кишечнике детей с 2 Б стадией регистрировали представителей рода *Actinomyces* (11,8%). Данные бактерии выделяли в высоких титрах – 9 (8; 11) lg КОЕ/г. В 7,8% случаев из кишечника были изолированы *Bacillus spp.*, их количественный уровень составил 7 (3; 8) КОЕ/г.

Таким образом, при 2 Б стадии ВИЧ-инфекции регистрировали снижение частоты колонизации слизистой доминантными микросимбионтами (лактобациллами, типичными кишечными палочками), а также дефицит бифидофлоры и высокие титры лактозопозитивных кишечных палочек. Отмечали высокую частоту и количественные уровни колонизации слизистой УПМ (стафилококками, энтеробактериями, грибами рода *Candida*).

При 2 В стадии ВИЧ-инфекции по сравнению с 2 Б стадией практически не изменяются частотные характеристики доминантной микрофлоры. Лактобациллы и типичные эшерихии обнаруживаются в кишечнике у 78,9% лиц. Бифидобактерии колонизируют слизистую кишечника в 100% случаев, *E. faecalis* – в 94,7%. Средняя плотность колонизации лактобациллами и фекальными энтерококками соответствовала общепринятым значениям нормы и не отличалась от аналогичного показателя в группе детей с 2 Б стадией ВИЧ-инфекции. При 2 В стадии содержание *Lactobacillus* составило 7 (4; 8) lg КОЕ/г, *E. faecalis* – 7 (6; 8) lg КОЕ/г. При данной стадии возрастает число лиц с дефицитом бифидобактерий до 73,4%, поэтому средняя плотность колонизации бифидофлорой снижается до 7 (7; 8) lg КОЕ/г. Среди бифидобактерий обнаруживали *B. dentium* (28,6%), *B. adolescentii* (21,4%), *B. breve* (21,4%). Если при 2 Б стадии типичные кишечные

палочки имели высокие количественные значения, то при 2 В стадии уровни колонизации снижаются до 7 (6; 9) lg КОЕ/г и соответствуют общепринятым значениям нормы [58].

В данной группе, так же, как и при стадии острой инфекции без вторичных заболеваний, отмечаются высокие показатели колонизации кишечника микроорганизмами рода *Staphylococcus* и представителями семейства *Enterobacteriaceae*. Клебсиелл обнаруживали в 31,6% случаев, *E. coli hly+* у 36,8% детей, *E. coli lac-* у 21,1% детей с 2 В стадией. Выделяли данных микроорганизмов в высоких титрах: *Klebsiella spp.* 7 (5; 8) lg КОЕ/г, *E. coli lac-* 8 (6; 8) lg КОЕ/г, *E. coli hly+* 7 (5; 8) lg КОЕ/г, что можно расценивать как предрасполагающий фактор для развития вторичных бактериальных инфекций.

Видовой состав стафилококков включал только трех представителей, т.е. при 2 В стадии снижается разнообразие кокковой флоры. *S. xyloso* колонизировал слизистую кишечника в 3,4 раза чаще ( $U=146$ ;  $p=0,001$ ), *S. aureus* – в 1,5 раза чаще ( $U=155$ ;  $p=0,001$ ), а *S. lentus* – в 5,4 раз чаще, чем при 2 Б стадии ВИЧ-инфекции ( $U=173$ ;  $p=0,0001$ ) (Рисунок 7).

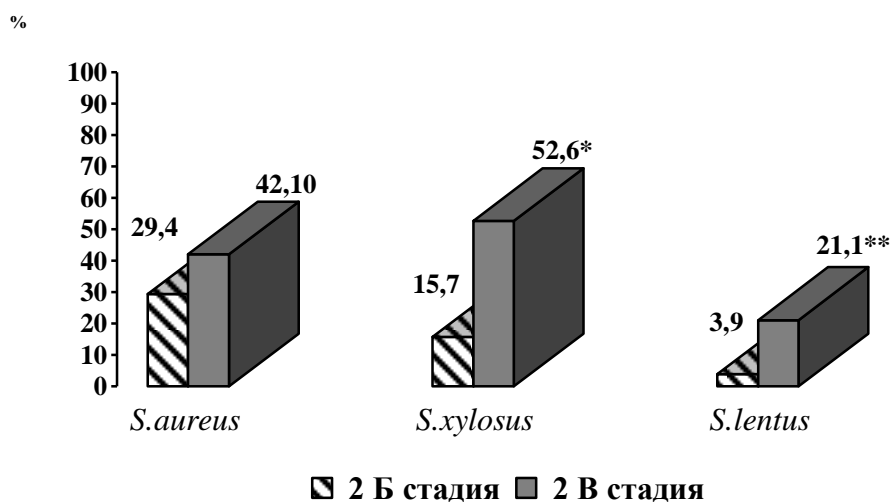


Рисунок 7 - Частота обнаружения стафилококков у детей с 2 Б и 2 В стадией ВИЧ-инфекции

Примечание: \* значимость различий  $p=0,05$ ; \*\* значимость различий  $p=0,01$

Содержание данных видов стафилококков у детей с 2 В стадией было таким же, как у детей с 2 Б стадией ВИЧ-инфекции ( $U=3,5$ ;  $p=0,74$ ).

Частота обнаружения грибов рода *Candida* при 2 В стадии заболевания была еще выше, чем на стадии 2 Б. Грибы выделяли в 89,3% случаев, в 68,4% это были грибы *C. albicans*. Среднее количество микромицетов в материале достигало 6 (4; 6) lg КОЕ/г. Полученные результаты согласуются с клиническими данными о распространенности кандидозов при данной стадии ВИЧ-инфекции и объясняют один из механизмов их развития, так как концентрация грибов у данной категории ВИЧ-инфицированных является этиологически значимой [5, 8, 105]. Случайная микрофлора кишечника в стадии 2 В была представлена *Actinomyces spp.* (частота колонизации 10,5%), *Bacillus spp.* (10,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,2%).

При анализе структуры степеней дисбиоза установлено, что при 2 Б стадии ВИЧ-инфекции II и III степени микрoэкологических нарушений имеют в структуре одинаковую долю (45,1% и 41,1% соответственно). При 2 В стадии частота микрoэкологических нарушений III степени возрастает в 1,7 раза ( $\chi^2=10,23$ ;  $df=2$ ;  $p=0,02$ ).

В итоге при 2 В стадии первичных проявлений ВИЧ-инфекции доминируют микрoэкологические нарушения кишечника III степени. Это обусловлено низкими количественными уровнями бифидобактерий, низкой частотой обнаружения лактобацилл и типичных кишечных палочек. Увеличивается в 1,5-5,4 раза частота обнаружения стафилококков и в 1,5 раза грибов рода *Candida*.

В 3 - субклинической стадии у пациентов с ВИЧ-инфекцией отмечают снижение темпов нарастания иммунодефицита за счет избыточного воспроизводства CD4+, а также снижение скорости репликации ВИЧ [58, 219]. Микрофлора кишечника по нашим данным у детей с этой стадией также «улучшается». В 53% регистрируется дисбиоз II степени, у 23,1% детей микрoэкологические нарушения соответствуют I степени. Частота колонизации слизистой лактобациллами и типичными кишечными палочками не изменяется и составляет 76,9%, их количественный уровень соответствует общепринятым значениям нормы и составляет 7 (6; 8) lg. В 100% случаев в кишечнике



обнаруживаются бифидобактерии и фекальные энтерококки. При этом количественный уровень бифидофлоры возрастает до 9 (7; 9) lg КОЕ/г ( $p=0,001$ ).

Частота обнаружения микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* при 3 стадии ВИЧ-инфекции не изменяется и составляет для клебсиелл 30,8%, лактозонегативных эшерихий 23,1%. При этом клебсиеллы обнаруживаются в высоких титрах – 8 (6; 8) КОЕ/г, т.е при 3 стадии ВИЧ-инфекции энтеробактерии продолжают оставаться маркерными для ВИЧ-инфекции микроорганизмами. Обращает внимание снижение в 2 раза частоты колонизации гемолизинпродуцирующими эшерихиями, так как они обнаружены только у 15,4% детей со средним уровнем колонизации в 10 раз меньше, чем на предыдущей стадии. По данным литературы, рост числа гемолитических форм микроорганизмов свидетельствует о снижении иммунологической реактивности [2], а так как при 3 стадии ВИЧ-инфекции происходит некоторое улучшение иммунологических показателей, то частота и количество гемолизинпродуцирующих эшерихий снижается.

В субклинической стадии ВИЧ-инфекции отмечали снижение содержания в кишечнике *S. lentus* и *S. xylosus* в 10 раз ( $p=0,05$ ), а *S. aureus* в 100 раз ( $p=0,001$ ). При этом, если частота колонизации слизистой *S. aureus* и *S. lentus* не изменялась, то *S. xylosus* регистрировали в 1,7 раза реже. Кроме того, возрастает видовое разнообразие стафилококков. В 23,1% случаев обнаруживаются *S. epidermidis*, в 15,4% *S. intermedius*.

У детей с 3 стадией ВИЧ-инфекции статистически значимо по отношению к 2 В стадии снижается частота выделения из кишечника грибов рода *Candida* ( $\chi^2=13,65$ ;  $df=1$ ;  $p=0,001$ ). Они обнаруживаются в 30,8% случаев, в 23,1% - это грибы *C. albicans*. При этом снижается и количество данных симбионтов с 6 (4; 6) lg КОЕ/г (2 В) до 3 (2; 4) lg КОЕ/г ( $U=2,56$ ,  $p=0,001$ ).

Таким образом, в 3 стадии ВИЧ-инфекции снижается глубина микрoэкологических нарушений кишечника, доминирует дисбиоз I - II степени. Отмечается нормализация количественного уровня бифидобактерий, снижение

частоты колонизации и количественных уровней гемолизинпродуцирующих эшерихий, стафилококков и грибов рода *Candida*.

В стадии вторичных заболеваний (4 стадия) у детей отмечается нарушение колонизации кишечника бифидобактериями, так как они были обнаружены только в 87,5% случаев. В связи с тем, что сниженные титры регистрировали у 75% детей, средняя плотность колонизации бифидобактериями не превышала  $9 (7; 9) \lg \text{КОЕ/г}$ . Лактобациллы также обнаруживали только у 87,5% детей, но их количественные уровни соответствовали возрастным значениям нормы  $8 (6; 8) \lg \text{КОЕ/г}$ . Типичные кишечные палочки колонизировали слизистую в 100% случаев, при этом у 38% детей титры данных бактерий были повышены, поэтому средний количественный уровень составил  $9 (7; 10) \lg \text{КОЕ/г}$ , что в 10 раз выше, установленных значений нормы.

У данной группы детей из энтеробактерий в кишечнике были обнаружены только *E. coli hly+* (37,5%) и *E. coli lac-* (37,5%). Их количественные уровни были высокими и составили  $8 (6; 9) \lg \text{КОЕ/г}$  и  $7 (5; 8) \lg \text{КОЕ/г}$  соответственно.

Сохраняется высокая частота колонизации слизистой кишечника *S. xylosum*, так как данный вид был обнаружен в 25% случаев, с такой же частотой выделяли *S. epidermidis*. Если при III стадии ВИЧ-инфекции количественный уровень *S. xylosum* был порядка  $4 (2; 5) \lg$ , то при IV стадии уровень колонизации возрастает до  $5 (3; 6) \lg \text{КОЕ/г}$ .

У 75% детей в стадии вторичных заболеваний в кишечнике обнаруживаются грибы рода *Candida*, возрастает их разнообразие. *C. albicans* колонизируют кишечник 50% детей, *C. dubliniensis* 25% лиц. Также при данной стадии обнаруживали *C. crusei*, *C. zylanooides*. Количественный уровень *C. albicans* в среднем составил  $4 (3; 5) \lg \text{КОЕ/г}$ .

Нужно отметить, что в 4 стадии ВИЧ-инфекции возрастает до 25% частота колонизации кишечника представителями рода *Actinomyces*. Их количественный уровень достигает  $7 (5; 8) \lg \text{КОЕ/г}$ , т.е. их концентрация предрасполагает к развитию актиномикоза, как варианта вторичного заболевания при ВИЧ-инфекции [50].

Нарушения микроэкологии при 4 стадии ВИЧ-инфекции в 50,5% случаев соответствовали II степени дисбиоза кишечника, в 37,5% случаев - III степени. Следовательно, по сравнению с субклинической стадией ВИЧ-инфекции, в стадии вторичных заболеваний нарастает число лиц с III степенью дисбиотических нарушений.

В итоге при 4 стадии ВИЧ-инфекции регистрируется рост числа микроэкологических нарушений III степени. Отмечается низкое содержание бифидобактерий, растет численность типичных кишечных палочек и условно-патогенных энтеробактерий. В 75% случаев в высоких титрах обнаруживаются грибы рода *Candida*. В 25% случаев кишечник колонизируют актиномицеты с количественными уровнями 7 и более lg.

Таким образом, дети с 2 и 4 стадией ВИЧ-инфекции являются группой риска по развитию оппортунистических инфекций бактериальной и грибковой этиологии. Это связано с высокой частотой обнаружения и содержанием УПМ в кишечном микробиоценозе. При этом, учитывая, что микрофлора на изменения иммунного статуса, обусловленные ВИЧ, реагирует раньше, чем появляются какие-либо клинические последствия микроэкологических нарушений, начинать коррекцию микрофлоры необходимо до формирования устойчивых патоценозов, зарегистрированных в 2 В и 4 стадии заболевания.

#### **2.4. Факторы вирулентности энтеробактерий и стафилококков у ВИЧ-инфицированных детей**

Эпидемиологические данные свидетельствуют, что среди ВИЧ-инфицированных пациентов отмечается высокая распространенность бактериальных пневмоний, которые являются причиной летального исхода последних [74, 88, 103, 117]. При этом, несомненно, ведущим этиологическим агентом является *Mycobacterium tuberculosis* [12, 24, 74]. Однако среди бактерий возбудителями высокой приоритетности являются также *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae* [50, 75]. Частота обнаружения *S. aureus* в мокроте от ВИЧ-инфицированных пациентов находится в пределах 8 - 10%, *Klebsiella spp.* 7,2 - 9%

[74, 76]. Стафилококки довольно часто вызывают у ВИЧ-инфицированных гнойные поражения кожи [88, 103], а энтеробактерии являются возбудителями мочевыводящих путей. Основным резервуаром этих микроорганизмов является кишечник [129]. Нами были изучены биологические свойства УПМ. Данные о дизайне исследования представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Видовой состав, численность культур и перечень биологических свойств, изученных у условно-патогенных бактерий

Бактерии	Группы		Всего
	ВИЧ+	ВИЧ-	
<i>S. aureus</i>	28	26	54
<i>S. xylosus</i>	24	15	39
<i>S. epidermidis</i>	9	15	24
<i>S. lentus</i>	9	3	12
<i>S. intermedius</i>	5	4	9
<i>S. simulans</i>	5	2	7
<i>S. haemolyticus</i>	2	-	2
<i>S. hyicus</i>	2	-	2
<i>S. cohnii</i>	2	-	2
<i>K. pneumoniae</i>	27	21	48
<i>K. oxytoca</i>	3	7	10
<i>E.coli lac-</i>	18	3	21
<i>E. coli hly+</i>	27	17	44
<b>Итого</b>	<b>161</b>	<b>113</b>	<b>274</b>
Перечень биологических свойств, изученных у УПМ	Специфическая адгезия, продукция гемолизинов, липазы, ДНКазы, распространенность антагонизма к другим микросимбионтам.		

Энтеробактерии у ВИЧ-инфицированных были представлены микроорганизмами рода *Klebsiella spp.*, *E. coli lac-*, *E. coli hly+*, *Proteus spp.* Статистически значимые отличия по способности энтеробактерий адгезироваться ( $U=0,67$ ,  $p=0,48$ ) отсутствовали. Энтеробактерии при ВИЧ-инфекции были средне- или низкоадгезивными (41,5% и 35,8% соответственно). Индексы адгезии микроорганизмов (ИАМ) составили 2,8 (2,2; 3,8) и 2,7 (2,3; 3,6) соответственно. Высокой адгезией обладали только 22,6% штаммов от детей с ВИЧ-статусом. Энтеробактерии от ВИЧ-негативных детей в 52,1% случаев были отнесены к среднеадгезивным культурам. Как и в группе ВИЧ-инфицированных, у здоровых детей низкой способностью к адгезии обладали 35,4% культур энтеробактерий. Только 12,5% штаммов являлись высокоадгезивными.

В фекальном микробном сообществе ВИЧ-инфицированных детей энтеробактерии в 98,1% случае вступали в ассоциации с микросимбионтами кишечника. При этом условно-патогенные энтеробактерии в 86,8% случаев проявляли нейтралισμό к микробам - ассоциантам. Антагонизм у представителей семейства *Enterobacteriaceae* составил 13,3 на 100 культур в группе ВИЧ-инфицированных и 14,6 на 100 культур в группе сравнения. В большинстве случаев условно-патогенные энтеробактерии вступали в антагонистические отношения с кокковой флорой. Таковых от пациентов с ВИЧ-статусом было 11,3% штаммов, от ВИЧ-негативных детей только 12,5%.

Факторы вирулентности энтеробактерий были представлены липазой и гемолизинами. У ВИЧ-инфицированных детей липазу продуцировали 13,2% штаммов, тогда как среди культур, выделенных от ВИЧ-негативных детей - 14,6% ( $\chi^2 = 0,76$ ,  $df=1$ ,  $p=0,67$ ). Уровень продуцируемой липазы оценивали по величине зоны гидролиза трибутирата вокруг колоний. Среднее значение липазной активности у культур от ВИЧ-инфицированных детей составило 7,7 (6,8; 8,1) мм. В группе сравнения зона гидролиза вокруг колоний энтеробактерий имела средние размеры равные 4,1 (3,6; 4,5) мм ( $U=0,25$ ;  $p=0,81$ ). Гемолиз эритроцитов давали 49,1% штаммов энтеробактерий от ВИЧ-позитивных и 35,4% от ВИЧ-негативных детей. Активность выделения гемолизина в сравниваемых группах

была сходной ( $U=0,26$ ,  $p=0,79$ ), она составила 3,6 (2,8; 4,3) мм и 4,1 (3,5; 4,6) мм соответственно.

Известно, что развитие вторичных бактериальных инфекций при иммунодефицитах обусловлено увеличением продукции факторов патогенности у бактерий [30, 87]. Поэтому представляет особый интерес изучение вирулентности у стафилококков, выделенных из кишечного микробиоценоза ВИЧ-позитивных детей. Выявлено, что способность к адгезии у стафилококков в сравниваемых группах была сходной ( $U=1,81$ ,  $p=0,07$ ). Средний индекс адгезии данных микроорганизмов, выделенных из кишечного биотопа ВИЧ-позитивных детей, составил 3,54 (2,72; 4,62), у детей без ВИЧ-статуса 3,16 (2,3; 4,1). Частота обнаружения высокоадгезивных штаммов в сравниваемых группах составила 34,7% и 33,3% соответственно. Среднюю адгезию имели 37,4% *Staphylococcus spp.* при ВИЧ-инфекции и 42,1% штаммов в группе детей без ВИЧ-статуса. Только 18,7% стафилококков при ВИЧ-инфекции характеризовались низкой адгезией, в группе сравнения таковых было 17,8%.

Частота продукции ДНКазы ( $\chi^2=0,02$ ,  $df=1$ ,  $p=0,89$ ) и гемолизина ( $\chi^2=2,8$ ,  $df=1$ ,  $p=0,09$ ) стафилококками была сходной. Гемолиз эритроцитов давали 91% стафилококков, выделенных от ВИЧ-позитивных детей и 89% штаммов от здоровых детей. 22,6% стафилококков от ВИЧ-позитивных детей синтезировали ДНКазу, от ВИЧ-негативных – 24,4% штаммов. У стафилококков выявлена разная частота секреции липазы ( $\chi^2=9,47$ ,  $df=1$ ,  $p=0,02$ ). 76% штаммов стафилококков от ВИЧ-инфицированных пациентов продуцировали липазу. В группе сравнения липазной активностью обладали 56% штаммов.

Интенсивность продукции ДНКазы и гемолизина оценивали по величине зон гидролиза ДНК и гемолиза вокруг колоний *Staphylococcus spp.* Установлено отсутствие отличий по интенсивности продукции данных факторов вирулентности. Средняя величина зон гемолитической активности стафилококков, выделенных от ВИЧ-инфицированных детей, составила 9,17 (8,8; 9,76) мм, у детей без ВИЧ-инфекции 6,02 (5,5; 6,2) мм ( $U=1,02$ ,  $p=0,31$ ). Стафилококки, выделенные от детей основной группы, продуцировали ДНКазу,

которая формировала зоны гидролиза нуклеиновой кислоты размером 9,82 (9,3; 10,2) мм. Зона гидролиза вокруг колоний стафилококков от ВИЧ-негативных детей составила в среднем 5,18 (4,9; 8,7) мм ( $U=6,09$ ;  $p=0,93$ ).

Количество выделяемой стафилококками липазы отличалось ( $U=2,56$ ,  $p=0,01$ ). Интенсивность продукции липазы у стафилококков, полученных от ВИЧ-инфицированных детей, составила 39,49 (37,5; 41,2) Е/л. В группе сравнения стафилококки выделяли липазу на уровне 18,69 (14,6; 20,1) Е/л. У детей с ВИЧ-статусом стафилококки преимущественно обладали низкой (60%) и средней липазной активностью (33,3%). Высокий уровень секреции липазы регистрировали у 6,7% культур. Доля штаммов с низким уровнем продукции данного фермента у стафилококков от ВИЧ-негативных детей достигала 84,6%, а 7,7% стафилококков обладали средней липазной активностью.

По данным литературы, липаза у стафилококков может выполнять роль не только фермента инвазии, но и фактора адгезии [8, 61]. Проведенный корреляционный анализ показал отсутствие связи между индексом адгезии (ИАМ) и продукцией липазы (Спирмена,  $\rho=0,14$ ;  $p=0,73$ ). Это подтверждают данные литературы о том, что индекс адгезии микроорганизмов отражает способность бактерий к лиганд-рецепторному взаимодействию с клетками макроорганизма, а липаза может опосредованно участвовать в адгезивном процессе [9]. Кинетические исследования продукции данного фермента показали, что синтез липазы на 30 минуте у штаммов с высокой адгезией был низким и составил 9,8 Е/л. При средней и низкой способности к адгезии стафилококки продуцировали липазу на уровне 25,6 и 23,6 Е/л соответственно ( $U=2,65$ ,  $p=0,01$ ). Прирост синтеза липазы на 31,5 Е/л выявлен у высокоадгезивных культур на 60 минуте опыта, а затем на 90 минуте её синтез снижался на 36,7 Е/л. У стафилококков со средней адгезией через 60 минут после начала опыта регистрировали уменьшение продукции липазы по сравнению с 30 минутой ( $\Delta_{cp}=-7,29$  Е/л). Затем вновь происходило увеличение ее синтеза до уровня, который отмечали на 30 минуте ( $\Delta_{cp}=+7,7$  Е/л). Установлено, что у низкоадгезивных стафилококков через 60 минут происходил рост продукции липазы в среднем на

45,03 Е/л. Таким образом, стафилококки с изначально высокими показателями специфической адгезии, основное количество липазы продуцируют на 60 минуте. У штаммов со средней и низкой адгезией уже на 30 минуте регистрируется высокая липазная активность. Данный феномен может рассматриваться как компенсаторный механизм, позволяющий микроорганизмам восполнить недостаток структурных факторов адгезии.

Установлено, что риск транслокации через слизистую кишечника бактерий-оппортунистов у ВИЧ-инфицированных детей выше, чем у лиц без ВИЧ-статуса. Так, риск транслокации энтеробактерий у ВИЧ-инфицированных с учетом уровня экспрессии липазы был в 1,9 выше, чем у ВИЧ-негативных детей. Стафилококки продуцировали два фермента, способствующих инвазии. Это ДНКаза и липаза. В связи с этим суммарный показатель относительного риска транслокации RR стафилококков у ВИЧ-позитивных детей составил 4, так как  $RR_{\text{ДНКаза}} = 1,9$  (95% ДИ 1,1-2,8) и  $RR_{\text{липаза}} = 2,1$  (95% ДИ 1,5-3,2).

Таким образом, более высокие уровни экспрессии факторов вирулентности УПМ у ВИЧ-инфицированных детей обуславливают высокие относительные риски транслокации микроорганизмов через слизистую кишечника.

## **2.5. Биологический профиль бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей, в зависимости от степени микробиологических нарушений**

Бифидобактерии являются активными регуляторами кишечного микробиоценоза [17, 53, 101, 126]. Они осуществляют модуляцию состава и численности факультативной микрофлоры кишечника не только за счет формирования антагонистических взаимоотношений с условно-патогенной и патогенной микрофлорой [73], но и за счет влияния на их свойства. Это реализуется за счет выделения экзометаболитов, подавляющих факторы персистенции условно-патогенной микрофлоры (УПМ), что повышает чувствительность этих бактерий к факторам естественной резистентности макроорганизма [52, 53]. У ВИЧ-инфицированных детей условно-патогенные микросимбионты нередко являются причиной вторичных бактериальных



инфекций [8, 56, 75, 85]. При этом практически отсутствуют данные о биологических свойствах бифидобактерий при ВИЧ-инфекции, что не позволяет эффективно проводить коррекцию микробиологических нарушений у данной категории пациентов и предупреждать развитие у них осложнений.

Оценка кишечного микробиоценоза по ОСТ «Протокол ведения больных. Дисбактериоз» [63] показала отсутствие в сравниваемых группах частоты развития различных степеней микробиологических нарушений ( $\chi^2=4,32$ ;  $df=2$ ;  $p=0,64$ ) (Таблица 9).

Таблица 9 – Частота развития микробиологических нарушений различной степени тяжести у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей (в %)

Группы детей	I степень	II степень	III степень
ВИЧ + (n=89)	14,6	41,5	43,8
ВИЧ – (n=74)	17,6	48,6	33,8

При I степени микробиологических нарушений у ВИЧ-инфицированных детей в 38,5% случаев бифидофлора была представлена *B. breve*, в 30,8% - *B. bifidum*, в 15,4% - *B. dentium*. У ВИЧ-негативных детей доминирующим видом был *B. bifidum*, что согласуется с многочисленными данными о ведущих видах бифидобактерий в кишечнике детей до 3 лет [2, 10, 102]. Доля *B. breve* у детей группы сравнения не превышала 15,3%, а *B. dentium* составила 7,7%. Разница видовой структуры бифидобактерий в группах была значима ( $\chi^2 = 8,5$ ;  $df=4$ ;  $p=0,002$ ). Уже при I степени микробиологических нарушений кишечника у ВИЧ-инфицированных детей наблюдаются низкие количественные уровни бифидобактерий. Различия в сравниваемых группах статистически значимы ( $U=2,54$ ,  $p=0,01$ ). У ВИЧ-инфицированных при I степени дисбиоза также регистрировали достоверно более высокие показатели содержания грибов рода *Candida* ( $U=2,57$ ,  $p=0,01$ ). Содержание в фекалиях других представителей облигатной и факультативной микрофлоры в сравниваемых группах не отличалось (Таблица 10).

Таблица 10 – Состояние микрофлоры при различных степенях микрoэкологическxх нарушений кишечника у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей, Me (LQ; UQ) (в lg КОЕ/г)

Микроорганизмы	I степень		II степень		III степень	
	ВИЧ -	ВИЧ +	ВИЧ -	ВИЧ +	ВИЧ -	ВИЧ +
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 (9; 11)	9* (8; 9)	9 (8; 10)	9 (9; 10)	9 (8; 10)	8* (8; 9)
<i>Lactobacillus spp.</i>	6 (6; 8)	8 (6; 8)	6 (6; 8)	7 (7; 8)	8 (6; 8)	6* (4; 8)
<i>E.coli lac+</i>	7 (6; 8)	8 (7; 9)	7 (6; 8)	8 (7; 9)	7 (6; 8)	6 (4; 8)
<i>E.coli lac-</i>	-	4 (4; 5)	4 (4; 5)	5 (5; 6)	7 (6; 7)	8 (7; 8)
<i>E.coli hly+</i>	4 (3; 5)	5 (4; 5)	5 (4; 6)	6 (5; 6)	7 (6; 7)	7 (7; 8)
<i>Klebsiella spp.</i>	4 (4; 5)	-	5 (4; 5)	6 (6; 7)	8 (8; 9)	8 (7; 8)
<i>E.faecalis</i>	7 (6; 7)	6 (6; 7)	6 (5; 6)	7 (6; 7)	6 (6; 7)	7 (6; 7)
<i>E.faecium</i>	6 (6; 7)	6 (5; 7)	6 (6; 7)	6 (6; 7)	6 (6; 7)	7 (6; 7)
<i>Staphylococcus spp.</i>	3 (2; 3)	3 (2; 3)	3 (1; 4)	4 (3; 5)	3 (1; 5)	4* (2; 5)
<i>Candida spp.</i>	2 (2; 3)	3* (3; 4)	4 (3; 4)	4 (3; 4)	4 (3; 5)	5* (4; 5)

Примечание: \* различия в группах ВИЧ+ и ВИЧ- детей при достигнутом уровне значимости  $p=0,05$

У детей с ВИЧ-статусом при I степени дисбиоза в 50% случаев выделяли монокультуры микроорганизмов рода *Staphylococcus*, в 15,4% случаев - грибы рода *Candida*. У детей ВИЧ-негативных монокультуры различных видов стафилококков при I степени микрoэкологическxх изменений встречались чаще (в

69,8% случаев), а грибы рода *Candida* с такой же частотой, что и у ВИЧ-позитивных детей (15,4%).

При II степени дисбиоза численность облигатных и факультативных микроорганизмов в сравниваемых группах детей не отличалась (Таблица 10). Выявлено, что у детей с ВИЧ-инфекцией доля *B. breve* в структуре микроорганизмов рода *Bifidobacterium* составила 34,6%, а *B. dentium* - 23,1%. По 15,4% приходилось на *B. longum* и *B. adolescentis*. В группе сравнения среди бифидобактерий также доминировали *B. breve* (45%), однако такую же долю в структуре занимали и *B. bifidum*. В состав кишечного микробиоценоза ВИЧ-негативных детей при II степени микрoэкологических нарушений входили *B. adolescentis*, их доля не превышала 10%. Снижение титров бифидобактерий регистрировали с одинаковой частотой как в группе ВИЧ-позитивных, так и в группе ВИЧ-негативных детей. Таковых было 62% и 63% соответственно. При II степени микрoэкологических нарушений у 97,3% детей обследованных детей формируются микробные ассоциации (Таблица 11).

Таблица 11 – Частота обнаружения монокультур и микробных ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов при II и III степенях микрoэкологических нарушений (в %)

Число участников ассоциаций	II степень нарушений		III степень нарушений	
	ВИЧ+ n=37	ВИЧ- n=36	ВИЧ+ n=39	ВИЧ- n=25
Монокультуры	2,7	2,8	-	-
2-х компонентные	21,6*	41,7	-	-
3-х компонентные	51,3	50	48,7	44
4-х компонентные	24,3**	5,6	30,8	48
5-ти компонентные	-	-	20,5**	8

Примечание: \* различия в группах ВИЧ+ и ВИЧ- детей, при достигнутом уровне значимости  $p=0,05$ ; \*\* различия в группах ВИЧ+ и ВИЧ- детей, при достигнутом уровне значимости  $p=0,01$ .

Независимо от ВИЧ-статуса в 61-68% случаев регистрируются бактериально-грибковые ассоциации. При оценке микробных ассоциаций по количеству входящих в них микросимбионтов, установлено, что у ВИЧ-инфицированных детей при II степени микрoэкологических нарушений статистически чаще формируются 4-х компонентные консорциумы из условно-патогенных микроорганизмов ( $\chi^2 = 2,4$ ;  $df=1$ ;  $p=0,03$ ). В состав 4-компонентных консорциумов входят *Candida spp.*+*Staphylococcus (coag-)*+ *Enterobacteriaceae*+ *Enterobacteriaceae*. Достоверно реже обнаруживаются 2-х компонентные микробные ассоциации ( $\chi^2=1,1$ ;  $df=1$ ;  $p=0,04$ ).

III степень микрoэкологических нарушений кишечника у ВИЧ-инфицированных детей характеризовалась увеличением числа лиц со сниженными титрами бифидобактерий (79,5%), лактобацилл (61,5%), поэтому у них в целом регистрировались достоверно низкие показатели интенсивности колонизации слизистой этими микроорганизмами (Таблица 10). Также у ВИЧ-позитивных детей отмечались достоверные более высокие количественные уровни микроорганизмов рода *Staphylococcus* ( $U=2,1$ ,  $p=0,04$ ) и грибов рода *Candida* ( $U=2,38$ ,  $p=0,02$ ). При III степени нарушений кишечной микрофлоры в микробиоценозе большинства ВИЧ-инфицированных детей обнаруживали *B. longum*, их доля в структуре достигала 40%. 30 % приходилось на *B. breve* и 20% на *B. dentium*. У ВИЧ-негативных детей в структуре бифидофлоры доминировали *B. bifidum* (56,3%), 18,7% приходилось на *B. dentium*. Одинаковые доли в структуре бифидобактерий ВИЧ-негативных детей имели *B. longum*, *B. breve* (по 12,5%). При III степени микрoэкологических нарушений у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей отмечали формирование многокомпонентных микробных ассоциаций, при этом уже не встречались 2-х компонентные ассоциации и появлялись микробные консорциумы, состоящие из 5 участников (Таблица 11). Если у детей с ВИЧ-инфекцией преобладали бактериально-грибковые микробные ассоциации (61,4%), то в группе лиц без ВИЧ-статуса в 52% случаев формировались бактериально-бактериальные ассоциации. Преобладающими в сравниваемых группах были 3-х и 4-х компонентные микробные ассоциации. У

ВИЧ-инфицированных детей в 2 раза чаще обнаруживали 5-ти компонентные микробные консорциумы УПМ ( $\chi^2 = 9,5$ ;  $df=1$ ;  $p=0,004$ ), включающие *Candida spp.*+*Staphylococcus (coag-)*+*Enterobacteriaceae*+*S.aureus*+*Enterococcus hly+*.

Были изучены биологические свойства бифидофлоры при разных степенях микроэкологических нарушений, объем и перечень изученных характеристик бифидобактерий представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Видовой состав, численность культур и перечень биологических свойств, исследованных у фекальных изолятов бифидобактерий

Бактерии	Группы		Всего
	ВИЧ+	ВИЧ-	
<i>B.breve</i>	17	12	29
<i>B.longum</i>	13	4	17
<i>B.dentium</i>	12	3	15
<i>B.bifidum</i>	9	22	31
<i>B.adolescentis</i>	7	4	11
<b>Итого</b>	<b>58</b>	<b>45</b>	<b>103</b>
Перечень изученных биологических свойств	Гидрофобность, специфическая адгезия, распространенность антагонизма, кислотообразование, антиоксидантная активность.		

Установлено, что при I степени микроэкологических нарушений у ВИЧ-инфицированных популяция бифидобактерий характеризовалась средними показателями гидрофобности  $H=51,3\%$  (40,3; 68,2) и специфической адгезии, ИАМ составил 2,64 (2,33; 3,25). У бифидобактерий, выделенных от детей группы сравнения, показатели, характеризующие адгезивный потенциал, были сходными ( $U=75,5$ ,  $p=0,48$ ). Гидрофобность в среднем составила  $H=56,7\%$  (43,2; 77,9), а ИАМ 3,17 (2,24; 4,17). При I степени микроэкологических нарушений штаммы бифидобактерий от ВИЧ-позитивных детей обладали средней кислотообразующей активностью -  $98,3^0$  Т (71,4; 127). Кислотообразование бифидобактерий от ВИЧ-негативных детей характеризовалось как высокое и

составило в среднем  $101^0$  Т (86; 122,6) ( $U=84$ ,  $p=0,87$ ). Антиоксидантная активность бифидобактерий у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей составила  $1,5 E_{aoa}$  (1,1; 1,7) и  $1,7 E_{aoa}$  (1,2; 1,7) соответственно ( $U=122$ ,  $p=0,98$ ). 64,3% бифидобактерий при ВИЧ-инфекции проявляли антагонизм к облигатным представителям кишечного микробиоценоза. Антагонистические отношения в 57,1% случаев формировались с *E. coli lac +*, в 7,2 % случаев с *E. faecalis*.

Частота формирования антагонизма в популяции бифидобактерий от ВИЧ-негативных детей с I степенью микрoэкологических изменений была выше и составила 72,7%, однако разница с основной группой была статистически не значима ( $\chi^2 =6,33$ ;  $df=1$ ;  $p=0,56$ ). Так же, как у ВИЧ-инфицированных, в 54,5% случаев формировались антагонистические отношения с облигатными представителями кишечного микросимбиоза – с *E. coli lac+* и *E. faecalis*. Однако в 18,2 % случаев у ВИЧ-негативных детей регистрировали антагонизм бифидобактерий к условно-патогенным коккам и представителям семейства *Enterobacteriaceae* ( $\chi^2 =2,5$ ;  $df=1$ ;  $p=0,02$ ). Даже при низкой частоте антагонизма бифидофлоры у ВИЧ-позитивных детей при I степени микрoэкологических нарушений условно-патогенные микроорганизмы не формировали ассоциаций, а обнаруживались в монокультурах.

Таким образом, при I степени микрoэкологических нарушений у ВИЧ-инфицированных детей доминирующими видами бифидобактерий являлись *B. breve*, *B. bifidum*, *B. dentium*. Регистрировались изменения количественного содержания бифидобактерий, биологические свойства (адгезия, гидрофобность, антиоксидантная активность, кислотообразование) которых не отличались от функциональных характеристик бифидофлоры здоровых детей. Условно-патогенные бактерии в микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей при нарушениях кишечной микрофлоры I степени (стафилококки и дрожжевые грибы рода *Candida*) выделялись в монокультурах.

При II степени нарушений кишечной микрофлоры у бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных детей снижалась гидрофобность клеточной поверхности. Популяционный показатель гидрофобности у них составил только 45,75% (33;

58,8). В группе ВИЧ-негативных детей гидрофобность клеток по сравнению с I степенью микрoэкологических нарушений практически не изменялась, составляла 58,15% (45,78; 88,58), что было статистически выше, чем в группе ВИЧ-инфицированных ( $U=303$ ,  $p=0,05$ ). У бифидобактерий от ВИЧ-позитивных детей снижалась способность к специфической адгезии до ИАМ=2,5 (2,0; 2,9). У детей без ВИЧ-статуса с усугублением микрoэкологических нарушений показатель специфической адгезии практически не изменялся и составлял 3,2 (2,9; 3,8). Индексы адгезии бифидобактерий в группе ВИЧ-негативных и ВИЧ-позитивных детей были достоверны ( $U=236$ ,  $p=0,00$ ). Происходило снижение антиоксидантных свойств в 1,9 раза, по сравнению с ВИЧ-негативными детьми ( $U=2,21$ ,  $p=0,02$ ). Антиоксидантная активность в сравниваемых группах составляла 0,8  $E_{aoa}$  (0,6; 1,0) и 1,5  $E_{aoa}$  (1,3; 1,6) соответственно. Несмотря на то, что у пациентов с ВИЧ-статусом при нарушениях кишечной микрофлоры II степени кислотообразование у бифидобактерий падало до  $67,3^0 T$  (53,0; 97,4), тем не менее, частота формирования антагонистических взаимоотношений сохранялась на уровне 68,9%. Это согласуется с данными литературы о том, что продукция органических кислот является важным, но не главным фактором антагонизма у бифидофлоры [19, 73]. При этом в 37,8% случаев бифидофлора у ВИЧ-инфицированных детей проявляла антагонизм к УПМ. Уровень кислотообразования у бифидобактерий, полученных от ВИЧ-отрицательных детей, отличался от группы с ВИЧ-инфекцией ( $U=239$ ,  $p=0,00$ ). Титруемая кислотность составила  $103^0 T$  (81; 125,5) и расценивалась как высокая. Так же как в группе ВИЧ-инфицированных в 70% случаев бифидобактерии проявляли антагонизм к кишечной микрофлоре, при этом в 50% случаев это был антагонизм по отношению к УПМ ( $\chi^2=3,06$ ;  $df=1$ ;  $p=0,08$ ).

Таким образом, характер микрoэкологических нарушений II степени у ВИЧ-инфицированных детей не отличается от таковых у детей без ВИЧ-статуса. Обнаруживают те же виды бифидобактерий, что и при I степени: *B. breve*, *B. dentium*. При этом выражена функциональная неполноценность бифидобактерий, у которых снижается гидрофобность, специфическая адгезия, антиоксидантные

свойства и кислотообразование. В антагонистические отношения с УПМ вступают только 38% бифидобактерий, поэтому у ВИЧ-положительных детей формируются многокомпонентные микробные консорциумы. Достоверно чаще в состав кишечного микробиоценоза у ВИЧ-инфицированных входят 4-х компонентные ассоциации УПМ.

Бифидобактерии, изолированные от ВИЧ-положительных детей при III степени микрoэкологических нарушений, в 58,9% случаев характеризовались как низкогидрофобные, значение  $H$  не превышало 22,7% (15,8; 46,6). При этом в группе сравнения гидрофобность бифидобактерий была в 2 раза выше и составляла 54,58% (36,85; 76,63), разница была статистически значима ( $U=146,5$ ,  $p=0,00$ ). Показатель специфической адгезии бифидобактерий в группе ВИЧ-положительных пациентов при III степени дисбиоза составил 2,4 (1,92; 3,69). Он не отличался от индекса адгезии бифидофлоры при нарушениях микрoэкологии кишечника II степени. Показатель лиганд-рецепторной адгезии *Bifidobacterium spp.* у ВИЧ-негативных детей составил 3,17 (2,24; 4,18) ( $U=189$ ,  $p=0,01$ ). При III степени у ВИЧ-инфицированных пациентов регистрировали дальнейшее снижение активности антиоксидантных систем бифидобактерий, которая не превышала в среднем 0,4  $E_{aoa}$  (0,3; 0,6). У штаммов, выделенных от ВИЧ-негативных детей, антиоксидантная активность составляла 0,9  $E_{aoa}$  (0,8; 1,1) ( $U=2,54$ ,  $p=0,01$ ). У ВИЧ-инфицированных детей при III степени микрoэкологических нарушений относительно II степени не изменялась способность бифидобактерий к кислотообразованию. Кислотность в среднем составила 66,3<sup>0</sup> T (48,9; 94,9). Показатель статистически значимо отличался только от показателя кислотности при I степени нарушений кишечной микрофлоры в группе ВИЧ-положительных пациентов ( $U=156$ ,  $p=0,02$ ). Кислотообразование бифидобактерий, изолированных от ВИЧ-негативных детей, было статистически выше 101,5<sup>0</sup> T (86,1; 122,6) ( $U=164,5$ ,  $p=0,01$ ). Обращает на себя внимание снижение у детей с ВИЧ-статусом при III степени микрoэкологических нарушений в 2 раза частоты антагонизма (до 33,3%) бифидофлоры по отношению к другим членам микробиоценоза ( $\chi^2=1,1$ ;  $df=1$ ;



$p=0,04$ ). При этом только в 12,8% случаев бифидофлора проявляла антагонизм к УПМ. У ВИЧ-негативных детей с III степенью микроэкологических нарушений кишечника, наоборот, происходило увеличение до 94% частоты антагонизма со стороны бифидофлоры. В 76,4% случаев антагонистические взаимоотношения формировались с УПМ ( $\chi^2=1,4$ ;  $df=1$ ;  $p=0,02$ ).

Таким образом, у ВИЧ-инфицированных детей с III степенью дисбиоза кишечника чаще выделяются *B. longum*, *B. breve* и *B. dentium*. Отмечается дефицит бифидобактерий, лактобацилл, высокие уровни стафилококков и грибов рода *Candida*. Бифидобактерии имеют выраженные изменения биологических свойств: гидрофобности, специфической адгезии, антиоксидантной защиты, кислотообразования. Снижается до 12% частота антагонизма, достоверно чаще встречаются 5-ти компонентные микробные консорциумы.

Далее был проведен корреляционный анализ между содержанием кишечных микросимбионтов и степенью микроэкологических нарушений (Таблица 13).

Таблица 13 – Направленность изменений количественного содержания кишечных микроорганизмов с увеличением степени дисбиоза кишечника (приведены только статистически значимые данные)

Группа	Микроорганизмы	$\rho$ (коэффициент корреляции Спирмена)	Вероятность (p)
ВИЧ + (n=89)	<i>Bifidobacterium spp.</i>	- 0,34	0,0017
	<i>E.coli lac+</i>	- 0,21	0,0491
	<i>Klebsiella spp.</i>	+0,25	0,0197
	<i>Staphylococcus spp.</i>	+0,32	0,003
ВИЧ– (n=74)	<i>Klebsiella spp.</i>	+ 0,45	0,0001
	<i>E.coli hly+</i>	+ 0,28	0, 0157
	<i>Staphylococcus spp.</i> + <i>S.aureus</i>	- 0,49	0,0252

Средней силы обратная корреляционная связь между количественным уровнем бифидобактерий и степенью микроэкологических нарушений у ВИЧ-

инфицированных свидетельствует о том, что с усугублением глубины микрoэкологических нарушений содержание бифидобактерий снижается, чего не наблюдается в группе здоровых детей. Это свидетельствует, что бифидобактерии у лиц без ВИЧ-статуса имеют выраженный адаптивный потенциал, поэтому включаются компенсаторные механизмы, которые направлены на стабилизацию кишечного микробного сообщества. При ВИЧ-инфекции таких механизмов нет. Как у ВИЧ-положительных, так и у ВИЧ-отрицательных детей имеется однонаправленная тенденция в отношении клебсиелл – существует прямая связь между уровнем микроорганизмов *Klebsiella spp.* и степенью микрoэкологических нарушений кишечника. У ВИЧ-инфицированных пациентов при прогрессировании микрoэкологических нарушений увеличивается также количественное содержание стафилококков. В исследовании не было обнаружено различий между количественным уровнем *E. coli lac+* у здоровых и ВИЧ-положительных пациентов. Более того, у ВИЧ-инфицированных детей между содержанием типичных кишечных палочек и степенью микрoэкологических нарушений регистрировали обратную слабую связь, т.е при увеличении степени нарушений кишечной микрофлоры постепенно снижалось содержание *E. coli lac+*.

### **ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ СТРУКТУРНО- ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БИФИДОБАКТЕРИЙ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ**

В последние годы достижения в исследовании кишечного микробиоценоза позволяют рассматривать его с точки зрения ассоциативного симбиоза [2, 17, 28]. Симбиотические отношения складываются как в системе «прокариоты-макроорганизм», так и в системе «прокариот-прокариот». Бифидобактерии являются доминантными микросимбионтами, которые способны регулировать весь микробиоценоз. При этом важной основой доминирования является не только их количественное содержание, но и функциональные характеристики [14, 18, 44, 96], позволяющие контролировать содоминантных бактерий, факультативную микрофлору и предупреждать колонизацию кишечника транзиторными микроорганизмами.

В предыдущей главе показано, что у ВИЧ-инфицированных детей частота обнаружения бифидобактерий была такой же, как в группе ВИЧ-негативных детей. Но при нарастании микрoэкологических нарушений снижается их количественный уровень, а также изменяются биологические свойства бифидофлоры, что ведет к формированию кишечных патoценозов с высокими количественными уровнями и многокомпонентными ассоциациями УПМ. Поэтому возникает необходимость исследования биологических свойств бифидофлоры и молекулярных основ их взаимодействия с ассоциативной микрофлорой. Это позволит определить механизмы микрoэкологических нарушений при ВИЧ-инфекции и оценить роль нормальной микрофлоры в патогенезе заболевания.

#### **3.1. Молекулярные механизмы гидрофобности бифидобактерий ВИЧ- инфицированных детей**

Самым первым механизмом, предотвращающим избыточную колонизацию слизистой кишечника условно-патогенными и патогенными микроорганизмами, является механическая защита слизистой, т.е. блокировка рецепторного

связывания бактерий-ассоциантов со слизистой желудочно-кишечного тракта. Выделяют два последовательных этапа взаимодействия бактерий со слизистой кишечника: неспецифический и специфический. Первый этап обратимый, так как микроорганизмы взаимодействуют со стенкой кишечника неспецифически, за счет поверхностных свойств. Он связан с физическими и химическими свойствами молекул, прежде всего с гидрофильностью/гидрофобностью [47, 210]. В настоящее время гидрофобность микробных поверхностей активно исследуется при взаимодействии бактерий с другими прокариотами, с иммунными клетками, с искусственными материалами, с тканями макроорганизма. Поэтому от гидрофобности бактерий зависит состояние различных микробиоценозов, а также взаимодействие бифидофлоры с факторами врожденной иммунной системы, т.е. с дендритными клетками и макрофагами.

Выявлены различия в гидрофобности бифидобактерий, изолированных из кишечника детей сравниваемых групп ( $U=583$ ,  $p=0,000$ ). При ВИЧ-инфекции большинство штаммов бифидобактерий обладали низкой гидрофобностью (Рисунок 8).

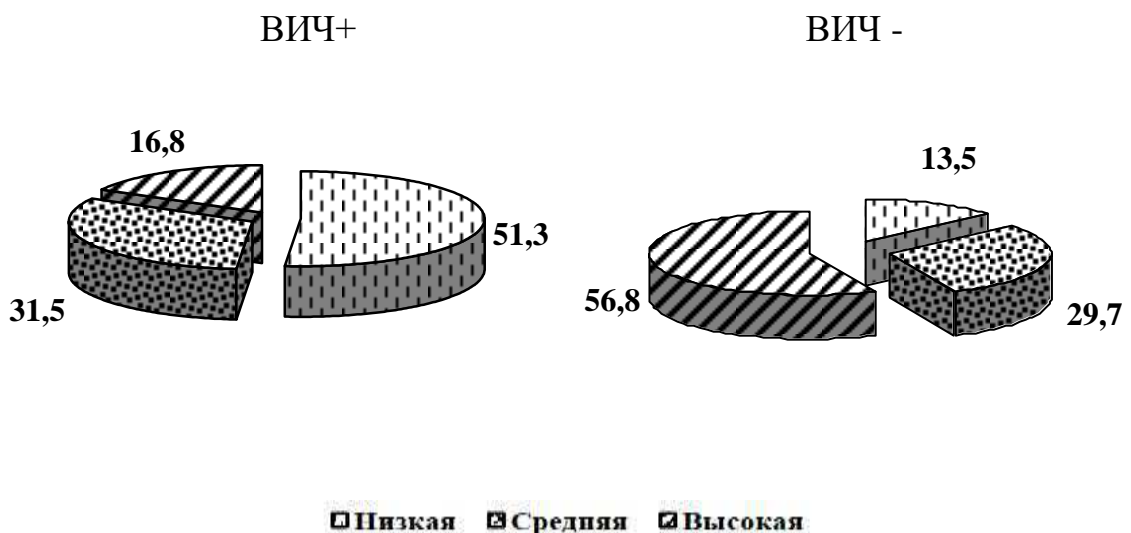


Рисунок 8 - Структура *Bifidobacterium spp.* у ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных детей по показателю гидрофобности (%)

Примечание: \*значимость различий  $p=0,001$

Гидрофобность в среднем составила 19,8 % (0; 48,8). Высокогидрофобные культуры выделяли чаще от ВИЧ-негативных детей, поэтому средний показатель

признака в популяции составил 59,3 % (43,4; 89,1). Высокогидрофобных штаммов у ВИЧ-инфицированных лиц было обнаружено только 16,8 %.

Гидрофобность бактерий связывают с жирными кислотами, входящими в состав липидов их плазматической мембраны, ЛТК и поверхностными липопротеинами [4, 89, 155]. На активность ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот, влияют внешние факторы [51, 110, 112]. Поэтому различия жирнокислотного состава у микроорганизмов могут возникать при изменениях в микросимбиозе, что влечет за собой модуляцию поверхностных свойств бактерий.

С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) был выделен поверхностный липопротеин Вор А. Значения удерживания стандарта указывают, что липопротеиновый комплекс выходил с колонки в интервале 5,14-5,19 минут. Выявлено преобладание в липидах насыщенных жирных кислот. У среднегидрофобного штамма регистрировали много липидов, которые содержали жирные кислоты с насыщенными алкильными цепями (Рисунок 9).

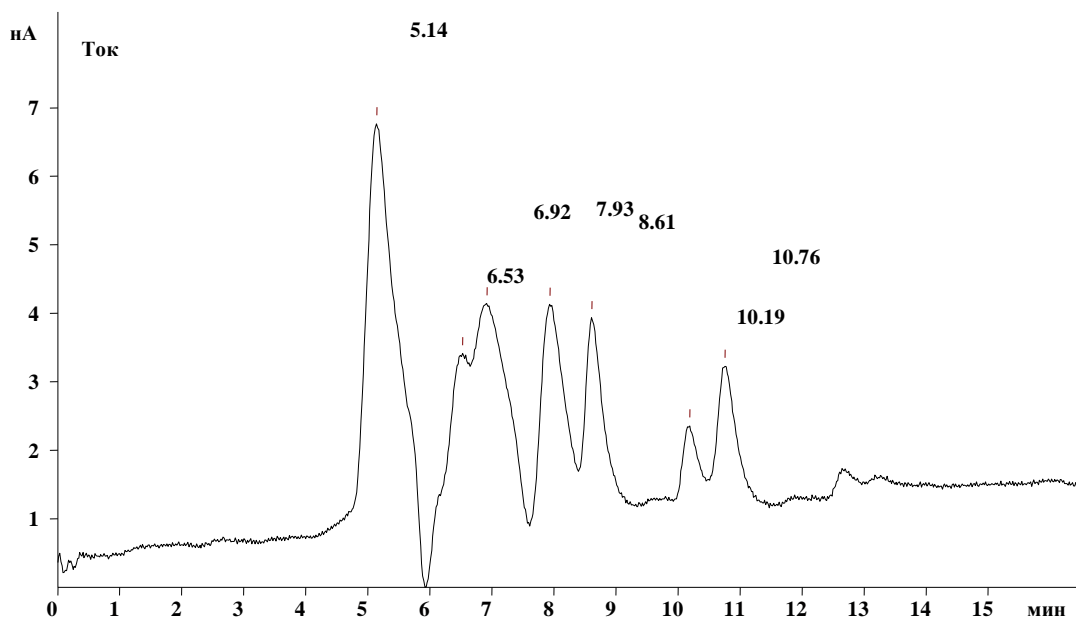


Рисунок 9 - Интегрированная хроматограмма поверхностных липопротеинов среднегидрофобного штамма бифидобактерий в ОФ ВЭЖХ

Их количество соответствует площади пика 239,3 нА\*сек. Компонент, выходящий с колонки на 13,38 минуте, обуславливает высокую гидрофобность штаммов (Рисунок 10).

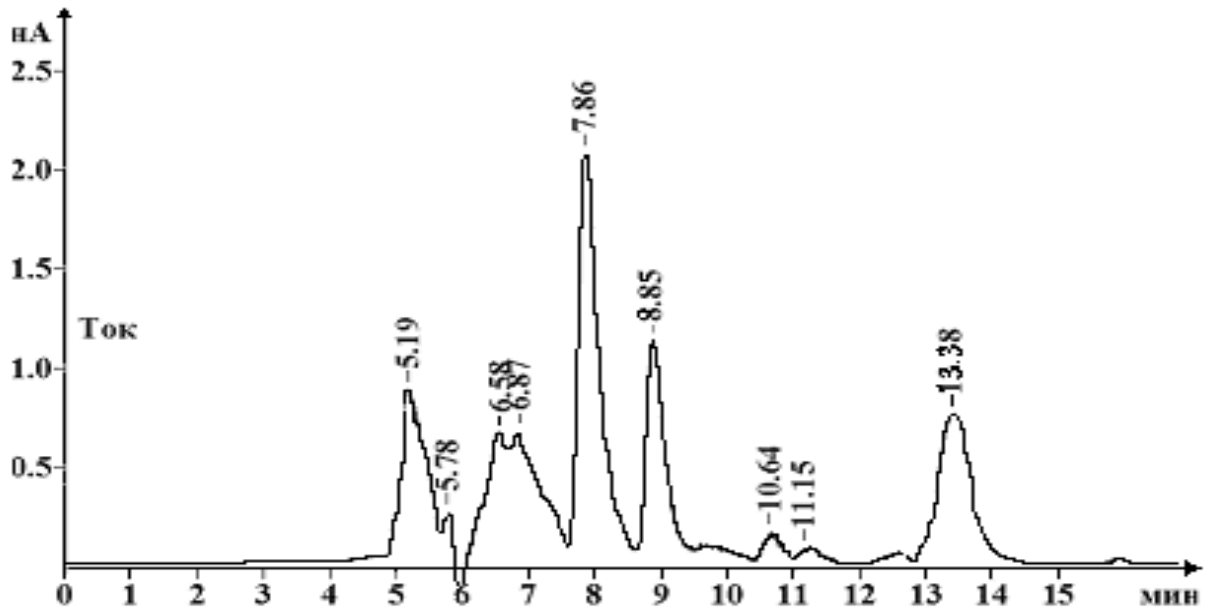


Рисунок 10 - Интегрированная хроматограмма поверхностных липопротеинов высокогидрофобного штамма бифидобактерий в ОФ ВЭЖХ

Его не обнаружено у штамма с низкой гидрофобностью. Кроме того, для данного штамма бифидобактерий характерна низкая селективность разделения компонентов (Рисунок 11).

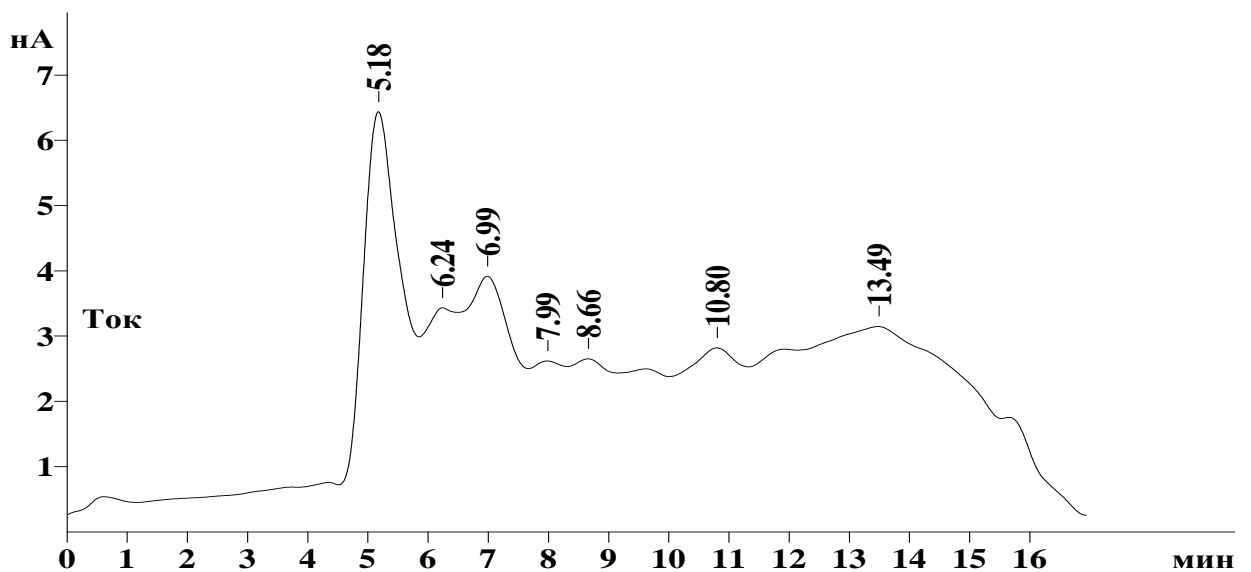


Рисунок 11 - Интегрированная хроматограмма поверхностных липопротеинов низкогидрофобного штамма бифидобактерий в ОФ ВЭЖХ

Это, вероятно, связано с низким содержанием у данного штамма омыляемых жиров и их производных, ведь они придают гидрофобность микробной клетке.

Большое количество липидов сосредоточено у бифидобактерий в цитоплазматической мембране и в ЛТК, поэтому далее мы провели исследование жирнокислотного состава данных структур, извлеченных из клеточных стенок бифидофлоры, выделенной от ВИЧ-инфицированных детей. В исследование были взяты бифидобактерии с разной гидрофобностью, но принадлежащих к одному виду – *B.bifidum*.

Наибольшее содержание жирных кислот регистрировали у высокогидрофобных культур бифидобактерий. Их было в 6,5 раз больше, чем у среднегидрофобных штаммов и в 1,8 раз больше, чем у культур с низкой гидрофобностью ( $\chi^2=16,5$ ;  $df=4$ ;  $p=0,01$ ). Насыщенные жирные кислоты были преобладающими в составе липидов или их производных у всех бифидобактерий. Доля предельных жирных кислот у бифидобактерий с высокой и низкой гидрофобностью составила 68,6% и 74,6% соответственно, тогда как у среднегидрофобных культур достигала 91,1%. Насыщенные жирные кислоты у бифидофлоры были представлены лауриновой (C12:0), миристиновой (C14:0), пентадекановой (C15:0), пальмитиновой (C16:0), гептадекановой (C17:0), стеариновой (C18:0), арахиновой (эйкозановой) (C20:0) кислотами. У бифидобактерий выявлены структурные особенности жирных кислот, связанные с наличием изоформ и разветвлений алкильных цепей. Обнаружены изопентадекановая (*iso*C15:0), изопальмитиновая (*iso*C16:0), а также 12-метил-тетрадекановая (12Me-C14:0), 13-метил-тетрадекановая (13Me-C14:0) кислоты. Ацикличность и разветвление углеродного скелета жирных кислот грампозитивных бактерий придает пластичность и текучесть их клеточной мембране, что рассматривают как адаптационный механизм у микроорганизмов [4, 89]. Ту же функцию выполняют ненасыщенные жирные кислоты. Наибольшая доля непредельных жирных кислот обнаружена у бифидобактерий с высокой (29,7%) и низкой гидрофобностью (25,3%) (Таблица 14).

Таблица 14 – Характеристика жирнокислотного состава клеточных стенок бифидобактерий с разной гидрофобностью у ВИЧ-инфицированных детей

№	Показатели	<i>B.bifidum</i> Высок- огидрофобные	<i>B.bifidum</i> Средне- гидрофобные	<i>B.bifidum</i> Низко- гидрофобные
<b>1</b>	<b>Техническая характеристика хроматографических данных</b>			
	Количество пиков	8	8	11
	Общая площадь пиков, нА	413,8	686,5	262,69
<b>2</b>	<b>Общие показатели жирнокислотного состава</b>			
	m жирных кислот на 0,01 г сухого остатка, мкг	61,3458	33,5960	19,5060
	m жирных кислот насыщенных, мкг	53,7406	50,1764	25,6234
	m жирных кислот ненасыщенных, мкг	23,4824	4,9192	8,7096
<b>3</b>	<b>Состав и количество жирных кислот (мкг)</b>			
C12:0	Лауриновая	1,4591	1,2316	0,4292
C14:0	Миристиновая	4,0175	1,6072	2,0592
C14:1	Миристолеиновая	1,9844	-	0,3259
isoC15:0	Изопентадекановая	0,3404	-	-
12Me- C14:0	12-метил-тетрадекановая	0,7003	-	0,2553
13Me- C14:0	13-метил-тетрадекановая	0,2626	-	-
C15:0	Пентадекановая	2,3735	0,9087	1,1355
C15:1	Пентадеценовая	1,0894	-	0,3803
isoC16:0	Изопальмитиновая	0,5544	20,405	0,2227
isoC16:1	Изогексадеценовая	0,7976	1,8024	0,2173
C16:0	Пальмитиновая	22,412	-	12,165
C16:1	Пальмитолеиновая	9,3093	-	2,9991
C16:2	Гексадекановая	0,4455	-	0,4455
C17:0	Гептадекановая	0,8852	0,5482	0,4555
C17:1	<i>n</i> -гептадеценовая	1,2937	-	0,2933
C18:0	Стеариновая	19,834	23,574	8,6661
C18:1	Олеиновая	6,3231	1,4493	2,6156
C18:2	Линолевая	2,5935	1,7475	1,3221
C20:0	Арахиновая	0,9827	1,9102	0,2308



У среднегидрофобных штаммов выявлено самое низкое содержание непредельных жирных кислот, их доля составила 8,9%. Мононенасыщенные жирные кислоты у бифидобактерий были представлены миристоолеиновой (C14:1), пентадеценовой (C15:1), пальмитолеиновой (C16:1), *n*-гептадеценовой (C17:1), олеиновой (C18:1) кислотами. Были детектированы также полиненасыщенные гексадекадиеновая (C16:2) и линолевая (C18:2) жирные кислоты.

Содержание изоформ, длинноцепочечных и метилированных жирных кислот у штаммов с разной гидрофобностью значимо отличалось ( $p=0,05$ ). Только у штаммов с высокой гидрофобностью выявлена изопентадекановая (*iso*C15:0) и 13-метил-тетрадекановая кислоты (13Me-C14:0). В 3 раза выше, чем у низкогидрофобных культур, было содержание 12-метил-тетрадекановой кислоты (12Me-C14:0). При средней гидрофобности выявлен высокий уровень изопальмитиновой (*iso*C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот (Рисунок 12).

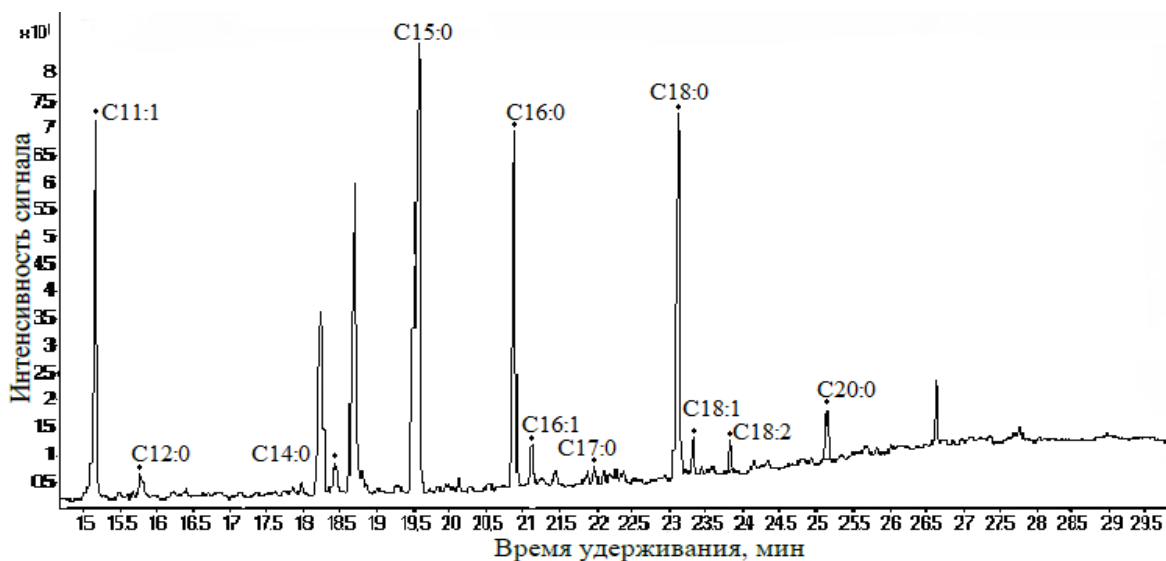


Рисунок 12 - Интегрированная хроматограмма ГХ-МС жирных кислот бифидобактерий со средней гидрофобностью

В составе липидов среднегидрофобного штамма не обнаружены такие мононенасыщенные жирные кислоты, как *n*-гептадеценовая (C17:1), пальмитолеиновая (C16:1), пентадеценовая (C15:1) и миристоолеиновая (C14:1). У них регистрировали только мононенасыщенную олеиновую (C18:1) кислоту.

Содержание изопальмитиновой (*iso*C16:0) кислоты у высоко- и низкогидрофобных культур было в 4 и 10 раз меньше, чем у среднегидрофобных. Стеариновая кислота (C18:0) с высокими уровнями была детектирована у высоко- и среднегидрофобных бифидобактерий.

У высокогидрофобных штаммов бифидобактерий регистрировали большое разнообразие ненасыщенных жирных кислот (Таблица 14). В наибольшем количестве у них обнаруживалась пальмитолеиновая кислота (C16:1). Полученные результаты согласуются с литературными данными, так как данная кислота входит в состав бактериальных мембран у представителей многих таксономических групп [89]. Также часто у бактерий регистрируют олеиновую (C18:1) кислоту, максимальное количество которой выявлено у бифидобактерий с высокой гидрофобностью. При низкой гидрофобности среди монопредельных кислот в наибольшем количестве присутствовали олеиновая (C18:1) и пальмитолеиновая (C16:1) кислоты.

У всех изученных культур бифидобактерий в клеточной стенке присутствовала линолевая (C18:2) кислота. Наибольшее ее содержание выявлено у высокогидрофобного штамма. В 2 раза меньше линолевой кислоты зарегистрировано в клеточной стенке бифидобактерий со средней гидрофобностью, меньше всего - у низкогидрофобного штамма (Таблица 14).

По результатам исследований выявлено, что у ВИЧ-инфицированных детей преобладают низкогидрофобные штаммы бифидобактерий. У них отмечается снижение содержания омыляемых жирных кислот в составе поверхностного липопротеина, а также общего содержания жирных кислот в составе липидов клеточной стенки. Несмотря на сходство состава ненасыщенных жирных кислот у низкогидрофобных штаммов и высокогидрофобных культур, их содержание было низким. Также в составе клеточной стенки культур с низкой гидрофобностью отсутствуют метилразветвленные жирные кислоты. Полученные результаты позволяют предположить нарушение у них механизмов межбактериального и бактериально-клеточного взаимодействия на уровне слизистой.

### 3.2. Молекулярные особенности липотейхоевых кислот у бифидобактерий при ВИЧ-инфекции

Особенности строения ЛТК обуславливают такие биологические свойства микроорганизмов, как адгезия, антигенность, иммуногенность [53, 114]. ЛТК состоят из фрагмента углеводной природы, повторяющихся единиц альдитол-фосфата и остатков жирных кислот. Они являются амфифильными соединениями, способными связываться с двухвалентными катионами. Благодаря ЛТК формируется общий заряд микробной поверхности, обеспечивающий взаимодействие бактерий с клетками иммунной системы, с питательными веществами, с эпителием кишечника. Взаимодействия ЛТК с клетками макроорганизма обычно предшествуют специфической лиганд-рецепторной адгезии бактерий.

Некоторые кишечные микросимбионты и их экзометаболиты могут изменять структуру клеточной стенки прокариот, в том числе и ЛТК. Поэтому есть предположение, что ЛТК бифидобактерий от здорового человека, пациента с ВИЧ-инфекцией и пробиотического штамма будут отличаться друг от друга. Для проверки данного предположения были изучены с помощью инфракрасной спектроскопии выделенные ЛТК бифидобактерий.

Для ЛТК штаммов, полученных от ВИЧ-инфицированных детей, характерно наличие полос, обусловленных асимметричными и симметричными валентными колебаниями метиленовых групп ( $2924\text{ см}^{-1}$  и  $2854\text{ см}^{-1}$  соответственно). Обнаружена полоса ( $1750\text{-}1735\text{ см}^{-1}$ ), обусловленная наличием фрагмента сложного эфира. Для пробиотического штамма *B. bifidum* 1 выявлена слабая по интенсивности полоса  $1710\text{ см}^{-1}$ . Известно, что положение полос зависит от электронных эффектов ближайших заместителей, наличия меж- и внутримолекулярных водородных связей и соединений с двойными связями. Присутствие ненасыщенных фрагментов в молекулах ЛТК ведет к смещению полос в диапазон низких частот. Данная особенность характерна для ИК - спектра ЛТК из штамма пробиотического происхождения. ИК - спектры исследуемых образцов характеризуются наличием полос в интервале  $1755\text{-}1690\text{ см}^{-1}$ ,

обусловленных валентными колебаниями фрагмента C=O. Наибольшую вариативность по данному показателю имеют хроматографические зоны ЛТК *B. bifidum* 1. Значения полос поглощения изменяются в интервале от 1742 см<sup>-1</sup> ( $R_f$  0,4) до 1712 см<sup>-1</sup>. В свою очередь, обнаружены полосы 1744 см<sup>-1</sup> и 1714 см<sup>-1</sup> у образца *B. breve*, который изолирован от ВИЧ-инфицированного ребенка. Вариативность значений связана с индуктивным эффектом, который формируют ненасыщенные фрагменты остатков жирных кислот. Они меняют поляризуемость молекул и частоту колебаний карбонильной группы. Следует отметить, что все хроматографические зоны ЛТК пробиотического штамма имеют сопоставимую спектральную характеристику. Только у образца *B. longum* отмечается наличие полосы 1275 см<sup>-1</sup> и соответствует она остаткам фосфорной кислоты с тремя электроотрицательными заместителями. Данная полоса регистрируется при значениях  $R_f$  0,05 и 0,93. Только у *B. breve* есть полоса 760 см<sup>-1</sup>, которая соответствует колебаниям фрагмента C-O-P. Она прослеживается, как в исходном образце ЛТК, так и в подвергнутом ТСХ. Эта полоса определена при значениях  $R_f=0,25$ ; 0,34; 0,97. Для ЛТК *B. bifidum* 1 свойственно наличие трех областей, обусловленных наличием фосфорсодержащих структур. В режиме ТСХ эти области характеризовались значениями  $R_f$  равными 0,41; 0,63; 0,92. Также эти хроматографические области содержат полосы 800 и 772 см<sup>-1</sup>. Образец *B. bifidum* 1 обладает отличительными спектральными характеристиками, что, по нашему мнению, обусловлено наличием пространственно близких структурных компонентов, с которыми P=O способны образовывать межмолекулярную или внутримолекулярную водородную связь. Значения  $R_f$  на пластинах ТСХ, изученных с применением ИК-спектроскопии, сопоставимы со значениями  $R_f$ , полученными после проявления пластин фосфорномолибденовой кислотой. Денситограмма хроматографических зон пластины ТСХ построена по наиболее информативным значениям - 1460 и 1022 см<sup>-1</sup>. Метиленовые и метильные группы алифатического фрагмента ЛТК успешно визуализируются при длине волны 1460 см<sup>-1</sup>. Полосы симметричного валентного колебания C-O-C структур, в том числе

соответствующие гликозилполиолам, прослеживаются при  $1022 \text{ см}^{-1}$  (Рисунок 13 а, б).

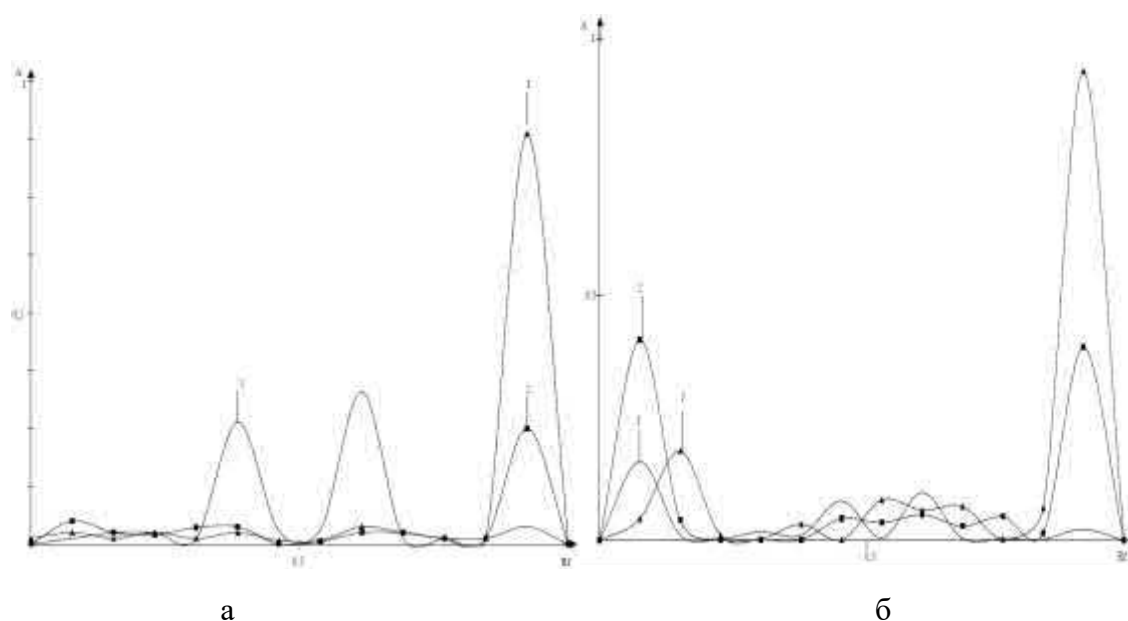


Рисунок 13 - Денситограмма ( $\nu, \text{см}^{-1}$ ) хроматографических зон образцов ЛТК по полосам: а)  $1460 \text{ см}^{-1}$ , б)  $1022 \text{ см}^{-1}$

Примечание: 1- *B. bifidum* 1; 2- *B. longum* (ВИЧ-); 3- *B. breve* (ВИЧ+)

Регистрируется вариабельность спектральных характеристик хроматографических зон. Особенности хроматографической подвижности, а также спектральные характеристики ЛТК связаны с отличиями в структуре данных кислот. В свою очередь установлена низкая вариативность спектральных характеристик ЛТК, полученных из хроматографических областей ТСХ *B. breve* от ВИЧ-инфицированного пациента. Так, полосы, обусловленные фосфорсодержащими компонентами, прослеживаются лишь в областях со значениями  $R_f$  0,8-0,9. Отсутствие полос поглощения в интервале  $1590\text{-}1530 \text{ см}^{-1}$  является специфичным только для данного штамма. У образца ЛТК *B. longum* в интервале значений  $R_f$  0,6-0,9 регистрируется полоса  $1585 \text{ см}^{-1}$ . Подобные структуры для ЛТК *B. bifidum* 1 регистрируются в интервале  $R_f$  0,3-0,95 с изменением значений поглощения по полосе  $1587\text{-}1547 \text{ см}^{-1}$ .

Сильное поглощение в интервале  $1650\text{-}1540 \text{ см}^{-1}$  обусловлено валентными колебаниями  $\text{C}=\text{O}$  карбонильной группы, находящейся в ионизированном

состоянии, а также плоскостными деформационными колебаниями фрагментов N-H. Очевидно, что наличие данной полосы поглощения на спектрах определено этерифицированными остатками жирных кислот. Вместе с тем, эти особенности специфичны для каждого образца, так как ЛТК имеют видовую и штаммовую вариабельность (Рисунок 14).

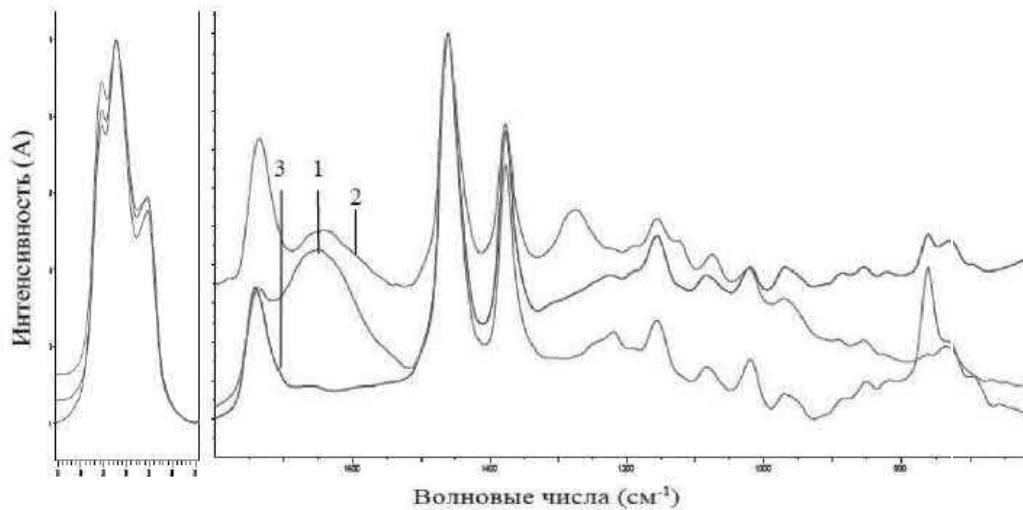


Рисунок 14 - ИК-ФТ образцов ЛТК после экстракции из хроматографической зоны с  $R_f$  0,95

Примечание: 1- *B. bifidum 1*; 2- *B. longum* (ВИЧ-); 3- *B. breve* (ВИЧ+)

Биологическую активность ЛТК связывают с аланиновым фрагментом и степенью насыщенности связей в жирных кислотах, входящих в состав данного полимера [206]. Именно строение, а точнее длина углеродного скелета ненасыщенных жирных кислот коррелирует с выраженным воспалением [94, 194]. У *B. breve*, полученного от ВИЧ-инфицированного ребенка, ЛТК характеризуется отсутствием области, которая характерна для диеновых фрагментов. Это, в свою очередь, может влиять на иммуностимулирующую активность данной культуры. ЛТК *B. bifidum 1* имеет широкую полосу поглощения с максимумом  $1635\text{ см}^{-1}$ , что указывает на полиеновые структуры. Такие характеристики штамма позволяют оказывать стимулирующее влияние на иммунную систему, что и является основой действия пробиотиков.

Таким образом, установлены отличия в спектральных и хроматографических характеристиках ЛТК у бифидобактерий различного происхождения. Для ЛТК пробиотического штамма *B. bifidum 1* характерно относительно высокое содержание остатков фосфорной кислоты и полиеновых фрагментов. В свою очередь структура ЛТК *B. breve* от пациента с ВИЧ-инфекцией отличается низким содержанием ненасыщенных фрагментов жирных кислот.

### **3.3. Аутоагрегация и специфическая адгезия бифидобактерий**

Аутоагрегация – уникальное свойство многих микроорганизмов, в том числе и бифидобактерий, обусловленное поверхностными белками, липидами и гликопротеинами [170]. Если у пробиотических штаммов данное свойство изучается с целью прогнозирования колонизации определенного отдела кишечника при приеме пробиотических препаратов, то аутоагрегация у доминирующих бактерий в составе кишечного микробиоценоза является показателем способности к образованию биопленок, а также к фиксации, нейтрализации и выведению патогенных бактерий из кишечника. Аутоагрегацию бифидобактерий обуславливают поверхностные белки [144, 170].

Установлено, что все бифидобактерии, не зависимо от ВИЧ-статуса обладали способностью к аутоагрегации. У бифидобактерий, полученных от детей с ВИЧ-инфекцией, показатель аутоагрегации составил  $A=34,41\%$  (25,4; 37,6), у штаммов от здоровых детей -  $A=39,65\%$  (32,2; 41,5) ( $U=1456$ ,  $p=0,112$ ).

Распределение штаммов по категориям, в зависимости от величины аутоагрегации, также не выявило различий в исследуемых группах ( $\chi^2=2,1$ ;  $df=3$ ;  $p=0,51$ ). Установлено, что 43,8% штаммов бифидобактерий при ВИЧ-инфекции имели среднюю аутоагрегацию, у ВИЧ-негативных детей таковых было 37,5% штаммов. По 37,5% бифидобактерий в группах проявляли высокую способность к аутоагрегации. Низкоагрегативными у детей без ВИЧ-статуса было 25% культур, с ВИЧ-инфекцией - 18,7%.

После деградации муцина протеолитическими ферментами бифидобактерии специфически взаимодействуют со слизистой кишечника, что обусловлено

пилеподобными структурами. Пили бифидобактерий имеют высокую аффинность к энтероцитам кишечника, поэтому адгезия необратима. Строение рецепторных комплексов энтероцитов похоже на строение гликопротеинов эритроцитов 0 (I) группы крови [13]. Средние показатели индекса адгезии микроорганизмов (ИАМ) в сравниваемых когортах отличались друг от друга ( $U=10,53$ ,  $p=0,000$ ). Так у ВИЧ-позитивных детей ИАМ составил 2,5 (2,1; 3,2), у детей без ВИЧ-статуса 3,2 (2,8; 4,2). Чаще из кишечника детей с ВИЧ-инфекцией выделяли штаммы, обладающие средней (41,4%) и низкой адгезией (39,6%). Высокоадгезивными были 19% культур. У ВИЧ-негативных детей бифидофлора в 38,3% была отнесена к среднеадгезивным бактериям, в 31,9% случаев к микроорганизмам, обладающим высокой адгезией. 29,8% штаммов, полученных от здоровых детей, были низкоадгезивными.

Корреляционный анализ выявил прямую средней силы связь между численностью и индексом адгезии бифидобактерий (Спирмена,  $\rho=0,52$ ;  $p=0,001$ ). Таким образом, чем выше ИАМ бифидобактерий, тем больше их титр. Так как 81% данных микроорганизмов у ВИЧ-инфицированных детей имели среднюю и низкую адгезию, их содержание в кишечном отделяемом составило 9 (8; 10) lg КОЕ/г. У детей группы сравнения 70,2% штаммов были высоко и среднеадгезивными. Это обуславливает такой же количественный уровень данных микросимбионтов в кишечном микробиоценозе ВИЧ-негативных детей 9 (8; 10) lg КОЕ/г, что и в группе с ВИЧ-инфекцией ( $U=15,29$ ,  $p=0,113$ ). Следует отметить, что с усугублением степени дисбиоза кишечника показатель адгезии у бифидофлоры ВИЧ-позитивных детей снижается. Это приводит к падению их численности в кишечнике, особенно при микрoэкологических нарушениях III степени.

Таким образом, отличия по специфической адгезии у бифидобактерий у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей позволяют предположить, что при ВИЧ-инфекции бифидобактерии характеризуются либо более низким уровнем экспрессии данных факторов, либо структурными изменениями морфологических структур, участвующих в адгезивном процессе.



### 3.4. Антиоксидантная активность бифидобактерий при ВИЧ-инфекции

Исследования последних лет свидетельствует о том, что микрoэкологические нарушения сопровождаются увеличением содержания в кишечнике токсических форм кислорода [21, 55, 82]. Существуют методики оценки степеней тяжести дисбиоза кишечника на основе определения количества продуктов перекисного окисления в копрофильтратах или на основе расчета антиоксидантных индексов и показателей [21, 22, 54]. Независимо от происхождения свободные радикалы повреждают белки, нуклеиновые кислоты и липиды микроорганизмов и человека. У бактерий есть большой набор биологически активных соединений, которые снижают интенсивность окислительных процессов [205]. Актуальным является изучение антиоксидантной активности бифидобактерий, выделенных от ВИЧ-инфицированных детей.

Описанные в литературе способы позволяют косвенно судить об антиоксидантных свойствах микроорганизмов, так как оценивается устойчивость бактерий к токсическим формам кислорода по приросту биомассы тестируемых культур. Разработанный способ предполагает оценку способности микроорганизмов ингибировать перекисное окисление липидов и/или блокировать фосфолипазы условно-патогенных бактерий. В работе в качестве окисляемой среды предлагается использовать раствор лецитина, перекисное окисление которого запускается добавлением к нему суспензии микроорганизмов-продуцентов фосфолипаз. Данные микроорганизмы могут быть выделены от конкретного пациента, при их отсутствии возможно использовать музейные штаммы стафилококков с фосфолипазной активностью. Таким образом, предложенный способ позволяет смоделировать естественное взаимодействие бифидобактерий с условно-патогенными микроорганизмами в кишечном микробиоценозе и оценить их способность противостоять фосфолипазам и перекисному окислению липидов.

Подготовка опытной культуры: из суточной культуры бактерий готовили взвесь в стерильном 0,9 % растворе NaCl. Стандартизировали по стандарту мутности MacFarland (№ 5), что соответствует  $1,5 \times 10^9$  бактериальных клеток в 1

мл. Ex tempore готовили 0,1% раствор лецитина. Для этого брали 10 мг гранулированного соевого лецитина и добавляли 10 мл бидистиллированной воды. Также готовили 1% раствор 2-ТБК. Брали 1 г 2-ТБК и количественно переносили в мерную колбу на 100 мл. Добавляли 50 мл ДМСО и 50 мл 96% этанола. В опытную чистую, сухую, обезжиренную пробирку помещали 0,5 мл 0,1% раствора лецитина, 0,3 мл бактериальной суспензии и 0,8 мл 0,79 М раствора аскорбиновой кислоты. Тщательно перемешивали.

Подготовка контролей: контроль 1 (эталонный антиоксидант), контроль 2 (образец с иницированным перекисным окислением без антиоксиданта), контроль 3 (собственное окисление 2-ТБК) готовили по методике, изложенной в разделе «Материалы и методы».

Инициация образования свободных радикалов: во все пробирки (опытная и три контроля) добавляли 0,8 мл 0,07 М FeSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (сульфат железа пятиводного). Пробирки термостатировали при температуре 42<sup>0</sup> С и встряхивании в течение 30 минут. После этого в опытные образцы и контроли добавляли 0,2 мл концентрированной ортофосфорной кислоты и 0,8 мл 1% раствора 2-ТБК. Далее смесь помещали на водяную баню (70<sup>0</sup> С) на 20 минут, с последующим охлаждением до + 4<sup>0</sup> С.

Получение бутанольной фазы: в охлажденную смесь добавляли н-бутанола в объеме 3 мл и тщательно перемешивании. Получали эмульсию, которую центрифугировали в течение 10 минут при 3000 g/m. Из разделившихся фаз с помощью автоматической пипетки аккуратно отделяли окрашенную бутанольную фазу, которую переносили в кварцевые кюветы (1x1). Спектрофотометрию осуществляли при длине волны 550 нм, используя в качестве кюветы сравнения кювету с н-бутанолом.

Антиоксидантную активность бифидобактерий оценивали в условных единицах антиоксидантной активности (E<sub>aoe</sub>), которые определяли по формуле:

$$E_{aoe} = -I_g \frac{(|I_A - I_B|) \cdot I_C}{I_E \cdot 10 \cdot I_D}$$

где:

$E_{\text{aoe}}$  – единицы антиоксидантной активности,

$I_A$  – световой поток (в единицах пропускания), который прошел через раствор исследуемого образца при длине волны 550 нм,

$I_B$  – световой поток (в единицах пропускания), который прошел через раствор питательной среды при длине волны 550 нм,

$I_C$  – световой поток (в единицах пропускания), который прошел через слой раствора в контроле с индуцированным окислением при длине волны 550 нм (контроль 2),

10 – коэффициент для перевода в единицы объема,

$I_E$  – молярный коэффициент триметинового комплекса в единицах пропускания  $0,413 \text{ ммоль} \cdot \text{см}^{-1}$ ,

$I_D$  – световой поток (в единицах пропускания), который прошел через слой раствора в контроле с известным антиоксидантом при длине волны 550 нм (контроль 1).

Антиоксидантные свойства бактерий считали высокими при значениях 3,5-2,9  $E_{\text{aoa}}$ , средними - при 2,8-2,0  $E_{\text{aoa}}$ , низкими - 1,9 и ниже  $E_{\text{aoa}}$ .

На разработанный количественный способ определения антиоксидантной активности микроорганизмов получен патент на изобретение РФ № 2465593 от 27.10.12 г.

При использовании разработанного способа установлено, что антиоксидантная активность бифидобактерий, изолированных из кишечника ВИЧ-инфицированных детей, была ниже, чем у детей без ВИЧ-статуса (Таблица 15).

Таблица 15 – Суммарная антиоксидантная активность бифидобактерий у детей в зависимости от ВИЧ-статуса

Группа	АОА ( $E_{\text{aoa}}$ ), представлена в виде Me (LQ; UQ)	Критерий Манна-Уитни (U), вероятность (p).
ВИЧ+ (n=20)	1,7 (0,98; 2,8)	U=3,55, p=0,004
ВИЧ- (n=25)	3,2 (1,5; 3,5)	

Примечание: n – количество исследованных штаммов бифидобактерий

Далее среди штаммов рода *Bifidobacterium*, изолированных от ВИЧ-инфицированных детей, оценили способность инактивировать токсические формы кислорода в зависимости от видовой принадлежности и проранжировали бифидобактерии по степени возрастания у них активности антиоксидантных систем. Установлено, что самую низкую антиоксидантную активность имели *B. dentium* ( $E_{aoa} = 1,02 (0,89; 1,3)$ ), далее несколько более высокую активность проявляли *B. bifidum* ( $E_{aoa} = 1,88 (1,5; 2,0)$ ) и *B. longum* ( $E_{aoa} = 1,89 (1,7; 1,97)$ ). *B. breve*, которые у ВИЧ-инфицированных детей встречаются в кишечном микробиоценозе с наибольшей частотой, имеют в среднем показатель антиоксидантной активности, равный 1,98 (1,57; 2,2). Самой высокой способностью инактивировать токсические формы кислорода обладали штаммы *B. adolescentis* ( $E_{aoa} = 2,57 (2,1; 2,7)$ ).

Бифидобактерии могут оказывать влияние на содержание кислорода в кишечном микробиоценозе [205], и от их антиоксидантной активности зависит содержание факультативных анаэробов. Поэтому была изучена способность экзометаболитов бифидобактерий и самих бактериальных клеток инактивировать токсические формы кислорода. Установлено, что в зависимости от видовой принадлежности у бифидобактерий доминируют разные системы инактивации свободных радикалов (Таблица 16).

Таблица 16 – Антиоксидантная активность экзометаболитов и клеточной массы бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей, Me (LQ; UQ)

Вид бифидобактерий	Антиоксидантная активность ( $E_{aoa}$ )	
	Экзометаболиты	Клеточная масса
<i>B. bifidum</i> (n=9)	0,3 (0,2; 0,5)	0,7 (0,4; 0,9)*
<i>B. breve</i> (n=15)	0,3 (0,1; 0,6)	2,1 (1,8; 2,8)**
<i>B. adolescentis</i> (n=5)	1,2 (0,8; 1,4)*	0,7 (0,6; 0,8)
<i>B. longum</i> (n=10)	0,9 (0,6; 1,3)	1,1 (0,98; 1,2)
<i>B. dentium</i> (n=6)	0,2 (0,2; 0,4)	0,2 (0,1; 0,5)

Примечание: \* значимость различий  $p=0,05$ ; \*\* значимость различий  $p=0,01$

Так, у *B. bifidum* и *B. breve* антиоксиданты клеточной стенки в 2 и 7 раз интенсивнее инактивировали токсические формы кислорода в реакции Фентона ( $U=2,56$ ,  $p=0,01$ ), ( $U=3,31$ ,  $p=0,002$ ). А у *B. adolescentis* большую антиоксидантную активность проявляли экзометаболиты ( $U=2,31$ ,  $p=0,03$ ). У *B. longum* разница в способности экзометаболитов и клеточной массы связывать токсические формы кислорода отсутствовала.

Таким образом, у ВИЧ-инфицированных детей ранжированный ряд бифидобактерий по степени убывания антиоксидантной активности штаммов выглядит следующим образом: *B. adolescentis* > *B. breve* > *B. longum* > *B. bifidum* > *B. dentium*. У *B. adolescentis* антиоксидантные свойства проявляют в большей степени экзометаболиты, тогда как у *B. breve* и *B. bifidum* сами клетки.

Установлена прямая, средней силы связь между уровнем непредельных жирных кислот у бифидобактерий и их антиоксидантной активностью (Спирмена,  $\rho = 0,55$ ;  $p=0,001$ ). Это свидетельствует о том, что чем больше ненасыщенных жирных кислот в составе стенки бифидобактерий, тем выше устойчивость данных штаммов к токсическим формам кислорода. Любое воздействие на жирнокислотный состав, в том числе фосфолипаз УПМ, будет изменять устойчивость бифидобактерий к перекисному окислению.

### **3.5. Распространенность и уровень экспрессии факторов антагонизма у бифидобактерий**

Бифидобактерии в кишечном микробиоценозе взаимодействуют со множеством микроорганизмов, формируя различные типы взаимоотношений с микросимбионтами [81, 126]. Наиболее привлекательным является изучение распространенности антагонистических межмикробных взаимодействий, так как антимикробная активность бифидобактерий, направленная против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, является естественным и физиологичным способом поддержания микрoэкологического равновесия в кишечном микробиоценозе. Особенно актуальным является исследование частоты и распространенности антагонизма у бифидобактерий, изолированных из

кишечника ВИЧ-инфицированных детей. Установлено, что частота антагонизма бифидобактерий от детей с ВИЧ-инфекцией по отношению к доминантным и ассоциативным микросимбионтам кишечника составила 69%. В группе ВИЧ-негативных детей данный показатель достигал 80,9% ( $\chi^2=13,3$ ;  $df=1$ ;  $p=0,03$ ).

60,2 на 100 культур бифидобактерий в группе ВИЧ-инфицированных и 68,3 на 100 культур в группе ВИЧ-негативных детей проявляли антагонизм к типичной кишечной палочке и энтерококкам ( $\chi^2=2,1$ ;  $df=1$ ;  $p=0,55$ ). Однако к условно-патогенным представителям микробиоценоза *Bifidobacterium spp.* при ВИЧ-инфекции проявляли антагонизм реже, так как распространенность составила 55,2 на 100 культур. У ВИЧ-негативных детей - 82,9 на 100 культур ( $\chi^2=9,47$ ;  $df=1$ ;  $p=0,02$ ).

Только 15% бифидобактерий от ВИЧ-позитивных детей проявляли антагонизм к *S. aureus*, что было в 2 раза ниже, чем у детей без ВИЧ-инфекции ( $p=0,04$ ). Они в 3 раза реже вступали в антагонизм с *Klebsiella spp.* (5% против 18,4,  $p=0,01$ ). Это согласуется с приведенными ранее данными о высокой частоте и уровнях колонизации данными микросимбионтами кишечника у ВИЧ-инфицированных детей.

Антимикробная активность бифидобактерий реализуется не только за счет механического блокирования рецепторов адгезии, коагрегации и выведения патогенных микроорганизмов из кишечника, но и за счет выделения веществ, которые прямо или опосредованно вызывают угнетение роста и размножения ассоциативных микросимбионтов. Как показали наши исследования, различий по экспрессии факторов аутоагрегации и показателю микробной обсемененности в исследуемых группах бифидобактерий не было. В связи с этим был проведен анализ способности бифидобактерий при ВИЧ-инфекции продуцировать вещества, которые обуславливают их антагонизм.

Наличие большого количества сахаролитических ферментов, которые до сих пор изучены не в полном объеме [140, 182, 201], и уникального метаболического шунта обуславливает продукцию бифидобактериями органических кислот, которые помимо положительного влияния на слизистую

кишечника [120], участия в «перекрестном питании» (cross-feeding), являются факторами антимикробной защиты кишечного биотопа и даже факторами вирулентности бифидобактерий [148, 182].

Средняя активность кислотообразования штаммов бифидобактерий, выделенных от ВИЧ-инфицированных детей, составила  $70^0$  Т (53,1; 102,8), от ВИЧ-негативных детей –  $96,5^0$  Т (73,5; 110) ( $U=12,05$ ,  $p=0,01$ ). Среди бифидобактерий в сравниваемых группах преобладали штаммы со средней активностью кислотообразования (53,4 %, 53,2 % соответственно). Обращает на себя внимание, что у ВИЧ-инфицированных детей частота обнаружения бифидобактерий с низкой кислотообразующей активностью в 6,5 раз выше, чем в группе сравнения (13,8 % против 2,1 % соответственно) ( $\chi^2=6,3$ ;  $df=1$ ;  $p=0,012$ ).

Кроме кислот, бифидобактерии продуцируют лизоцим, который также является прямым фактором антагонизма [6, 33]. Установлено, что 61,7% культур бифидобактерий, изолированных из кишечника ВИЧ-негативных детей, синтезировали лизоцим в титре 1:4, 8,5% штаммов – в титре 1:8, 6,4% - 1:16. Наибольший титр лизоцима у бифидофлоры при ВИЧ-инфекции составил 1:4. У 70,7% штаммов лизоцим был обнаружен только в исходном бульоне, где культивировался штамм. Таким образом, у бифидобактерий существует разница по уровню продуцируемого лизоцима ( $\chi^2=75,5$ ,  $df=5$ ;  $p=0,002$ ). Восполнение недостаточного количества лизоцима, вследствие низкой экспрессии этого признака бифидобактериями, может быть одной из мер при коррекции микробиологических нарушений у ВИЧ-инфицированных пациентов.

В итоге у бифидобактерий при ВИЧ-инфекции вследствие низкой продукции антибактериального фактора и высокой частоты обнаружения штаммов с низким кислотообразованием распространенность антагонизма по отношению к УПМ в 1,5 раза ниже, чем у ВИЧ-негативных детей. У ВИЧ-инфицированных детей статистически реже бифидофлора вступает в антагонистические взаимоотношения с микроорганизмами рода *Klebsiella spp.* и со *S. aureus*.

### 3.6. Влияние липаз стафилококков на состояние клеточной мембраны бифидобактерий *in vitro*

Широкое разнообразие жирных кислот и специфичность позволяет проводить родовую и даже видовую идентификацию микроорганизмов [3, 94, 110]. У бактерий жирные кислоты входят в состав фосфолипидов плазматической мембраны и определяют ее вязкость и текучесть [4, 221]. Эти физико-химические свойства влияют на транспорт веществ, на активность ферментов цитоплазматической мембраны, а также на рост и на размножение бактерий [4, 51, 170]. От состава фосфолипидов зависят гидрофобность микробной поверхности, адгезия, чувствительность к токсическим формам кислорода и антибиотикам [21, 47, 51, 55]. Любые факторы микросреды биотопа воздействуют на бактериальную цитоплазматическую мембрану. В ответ на эти воздействия изменяются метаболические реакции, поэтому формируется уникальный состав фосфолипидов [55, 110, 210]. Установлено, что при ВИЧ-инфекции стафилококки продуцируют большое количество липолитических ферментов, которые напрямую способны влиять на липидсодержащие структуры бактерий. В связи с этим представляет интерес изучение влияния фосфолипаз стафилококков на состав липидов клеточной стенки бифидобактерий. Липазы стафилококков выделяли из бульонных культур с помощью аффинной хроматографии и обрабатывали ими бифидобактерии. В работе были использованы культуры бифидобактерий от детей с ВИЧ-инфекцией, которые обладали разной гидрофобностью.

У культур с высокой гидрофобностью установлено преобладание в структуре липидов ненасыщенных жирных кислот. Их масса составила 119,3 мкг, при этом соотношение масс непредельных жирных кислот к предельным составило 2 : 1. При средней и низкой гидрофобности масса насыщенных жирных кислот была 46,6 мкг и 39,5 мкг соответственно. Соотношение масс непредельных к предельным кислотам составила 1 : 5 и 1 : 4 соответственно. У всех бифидобактерий среди непредельных жирных кислот была большая доля изомеров. У культур с высокой гидрофобностью на изомеры приходилось 73,2%,



при средней гидрофобности – 71,6%, при низкой гидрофобности - 70,1%. Масса длинноцепочечных ( $C_{16} - C_{22}$ ) жирных кислот у высокогидрофобных культур составила 189,3 мкг, у низкогидрофобных - 44,1 мкг, при средней гидрофобности - 28,4 мкг. Среднецепочечные жирные кислоты ( $C_{13} - C_{14}$ ) детектировали в количестве 12,4 мкг, 6,2 мкг и 2,5 мкг соответственно. У бифидобактерий также были обнаружены жирные кислоты с очень длинной алкильной цепью ( $C_{24}$ ), но их содержание не превышало 0,87 мкг у высокогидрофобных штаммов, 0,4 мкг у штаммов со средней гидрофобностью и 0,32 мкг у низкогидрофобных культур. Содержание жирных кислот с разнообразными алкильными цепями у *Bifidobacterium spp.* статистически значимо отличалось у штаммов с разной гидрофобностью ( $\chi^2=10,2$ ,  $df=4$ ,  $p=0,05$ ).

У бифидобактерий с высокой гидрофобностью в составе липидов выявлено высокое содержание олеиновой ( $C 18:1$ ), пальмитиновой ( $C 16:0$ ) и линолевой кислот ( $C 18:2$ ), масса которых составила 80,3 мкг, 53,9 мкг, 29,2 мкг соответственно. При средней и низкой гидрофобности преобладали предельные стеариновая ( $C 18:0$ ) и пальмитиновая ( $C 16:0$ ) кислоты. Их масса была 21,8 и 21,2 мкг, а также 11,9 и 18,8 мкг соответственно. У среднегидрофобных культур непредельной олеиновой кислоты ( $C 18:1$ ) было только 5,3 мкг, а масса линолевой ( $C 18:2$ ) не превышала 3,1 мкг. Такое же содержание (по 3,1 мкг) олеиновой ( $C 18:1$ ) и линолевой ( $C 18:2$ ) кислот регистрировали у низкогидрофобных бифидобактерий. Выявлено, что в составе фосфолипидов всех бифидобактерий есть жирные кислоты с метильными заместителями, которые влияют на текучесть мембраны. Их содержание у культур с высокой гидрофобностью было наибольшим, т.е в 4,1 раза выше, чем у среднегидрофобных и в 3 раза выше, чем у низкогидрофобных штаммов. Масса жирных кислот с метильными радикалами у низко- и среднегидрофобных штаммов составила 0,8 и 0,7 мкг соответственно. Таким образом, установлены различия в содержании жирных кислот у бифидобактерий с разной гидрофобностью ( $\chi^2=115,6$ ,  $df=18$ ,  $p=0,0003$ ).

Обработка *in vitro* бифидобактерий липазами золотистых стафилококков приводила к значимому изменению структуры жирных кислот у штаммов с

высокой гидрофобностью. Это говорит о различиях адаптации бактерий в зависимости от начального состояния клеточной стенки ( $\chi^2=121,3$ ,  $df=19$ ,  $p=0,0004$ ). Выявлено, что у культур с высокой гидрофобностью увеличивалось содержание предельных жирных кислот, поэтому изменялось соотношение масс непредельных и предельных жирных кислот (1 : 9). Регистрировали рост в 1,5 и в 4,6 раза уровня насыщенных пальмитиновой (C 16:0) и стеариновой (C 18:0) кислот. Снижалась в 10 раз масса олеиновой кислоты (C 18:1). Отмечали снижение разнообразия жирных кислот. В составе бактериальной мембраны уже не обнаруживали таких предельных длинноцепочечных жирных кислот, как тетракозановая (C 24:0), докозановая (C 22:0), эйкозановая (C 20:0) кислоты и непредельную докозеновую кислоту (C 22:1). В 1,5 раза снижалась масса жирных кислот со средней длиной цепи – тетрадеценовой (C 14:1), миристиновой (C 14:0), тридекановой (C 13:0).

Не изменялось после обработки липазами стафилококка содержание жирных кислот с разной степенью насыщенности связей у штаммов со средней гидрофобностью ( $\chi^2=27,2$ ,  $df=20$ ,  $p=0,6$ ). В мембранных липидах, как и прежде, в большинстве случаев (76%) обнаруживали насыщенные кислоты. Соотношение непредельных жирных кислот к массе предельных составило 1 : 3. Незначительно уменьшилось содержание пальмитиновой (C 16:0) и стеариновой (C18:0) кислот – до 19,8 мкг и 14,6 мкг соответственно. Масса линолевой (C 18:2) и олеиновой (C 18:1) кислот также не изменилась. Однако, у среднегидрофобных бифидобактерий увеличивалось разнообразие жирных кислот. Были обнаружены эйкозановая (C 20:0), докозановая (C 22:0) и тетракозановая (C 24:0) кислоты. Также увеличивалась в 2 раза масса жирных кислот с метильными заместителями.

Низкогидрофобные бифидобактерии характеризовались относительной устойчивостью мембраны к воздействию липаз стафилококков ( $\chi^2=30,5$ ,  $df=21$ ,  $p=0,6$ ). После контакта с липазами в составе фосфолипидов *Bifidobacterium spp.* с низкой гидрофобностью доминировали предельные жирные кислоты (81,3%). Их масса составила 32,5 мкг. Соотношение масс ненасыщенных и насыщенных жирных кислот (1 : 3) было таким же, как до воздействия липаз стафилококков.

Незначительно уменьшилось до 17,7 мкг и 9,9 мкг количество пальмитиновой (С 16:0) и стеариновой (С 18:0) кислот. Снизилась масса олеиновой (С 18:1) и линолевой (С 18:2) кислот (2,9 и 2,2 мкг соответственно). При этом увеличилась в 1,5 раза масса метилированных предельных жирных кислот.

Так как физическое состояние и химический состав мембраны влияют на свойства бактерий, была изучена аутоагрегация и специфическая адгезия бифидобактерий. До обработки бифидофлоры липазами *S.aureus* высокогидрофобные культуры имели высокую адгезию и аутоагрегацию. После воздействия липолитических ферментов – аутоагрегация у них уменьшилась в 2 раза ( $U=2,82$ ,  $p=0,001$ ), а гидрофобность в 1,5 раза ( $U=2,72$ ,  $p=0,02$ ). Незначительно изменился показатель адгезии, ИАМ составил 3,9 ( $U=0,43$ ,  $p=0,66$ ). Интактные средне- и низкогидрофобные бифидобактерии имели среднюю аутоагрегацию и низкую специфическую адгезию. После обработки липазами гидрофобность ( $U=1,35$ ,  $p=0,17$ ), аутоагрегация ( $U=0,72$ ,  $p=0,47$ ) и адгезивная способность культур статистически значимо не изменялись ( $U=0,33$ ,  $p=0,7$ ) (Таблица 17).

Таблица 17 – Биологические свойства бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей до и после воздействия липаз стафилококков, Me (LQ; UQ).

Наименование признака, ед.измерения	Высокогидрофобные штаммы n=11		Среднегидрофобные штаммы n=15		Низкогидрофобные штаммы n=13	
	До обработки липазами	После обработки липазами	До обработки липазами	После обработки липазами	До обработки липазами	После обработки липазами
Гидрофобность, в %	86,7 (76,7; 90,2)	56,2* (54,6; 57,2)	47,2 (45,6; 47,9)	45,4 (42,6; 46,2)	38,5 (37,8; 39,1)	36,7 (34,6; 37,1)
Аутоагрегация, в %	41,1 (40,3; 43,5)	20,6* (19,7; 23,3)	17,7 (15,6; 18,9)	13,8 (11,6; 15,2)	11,2 (9,6; 12,6)	12,8 (11,2; 13,4)
Индекс адгезии микроорганизмов, в Ед	4,2 (3,8; 4,5)	3,9 (3,7; 4,2)	1,1 (0,9; 1,4)	1,2 (1,0; 1,5)	2,2 (1,9; 2,4)	1,8 (1,5; 2,0)

Примечание: \* значимость различий биологических свойств бифидобактерий до и после действия липаз *S.aureus*  $p=0,05$

Таким образом, ригидность оболочки у средне- и низкокогидрофобных культур связана с высоким содержанием предельных жирных кислот в составе фосфолипидов плазматической мембраны. Это обуславливает устойчивость штаммов к действию фосфолипаз стафилококков. У культур с высокой гидрофобностью при действии липаз *Staphylococcus spp.* происходит изменение пластичности мембраны, что связано с уменьшением разнообразия и изменением соотношения масс непредельных и предельных жирных кислот. Это отражается на биологических свойствах штаммов – способности к аутоагрегации и адгезии. Полученные данные указывают также на разную адаптивную способность штаммов, которая определяется исходным состоянием клеточной мембраны бифидобактерий. Результаты позволяют проводить поиск и разработку способов модификации биологических свойств бифидобактерий для повышения эффективности коррекции дисбиозов кишечника у ВИЧ-инфицированных детей.

### **3.7. Оценка роли бифидобактерий в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей**

Доминирование – это способность микроорганизмов занимать высокое положение в иерархии и оказывать существенное влияние на биоценотические процессы и формирование микробиоценозов. Большое значение в формировании доминантности играет количественный уровень и функциональные характеристики микроорганизмов. Общеизвестно, что бифидобактерии являются доминантными микросимбионтами в кишечнике [2, 184, 213], о чем свидетельствуют их количественные уровни, которые в норме составляют 9 - 10 lg КОЕ/г. Так как одной из функций бифидобактерий является регулирование количественного уровня других микросимбионтов, то при определении доминантности необходимо учитывать не только популяционные уровни бифидофлоры, но и содержание УПМ. Руководствуясь тем, что при эубиозе разница в количественных уровнях бифидофлоры и УПМ составляет 6 - 5 lg КОЕ/г, была разработана шкала оценки категории доминантности бифидобактерий по отношению к УПМ (Таблица 18).

Таблица 18 – Шкала для оценки категории доминантности бифидобактерий

Разница титров бифидофлоры и УПМ	Категория микроорганизмов
6-5 lg КОЕ/г	Абсолютный доминант
4-2 lg КОЕ/г	Доминант
1 lg КОЕ/г и разницы нет	Субдоминант

Из функциональных характеристик бифидофлоры важно оценить колонизационный потенциал (специфическую адгезию, гидрофобность, аутоагрегацию), антагонизм, кислотообразование и способность инактивировать токсические формы кислорода. Каждому значению признака (высокое, среднее, низкое), интервалы которых оговариваются в каждой методике и являются общепринятыми, присваивается балл – от 1 до 3, с последующим суммированием результата и определением регуляторного потенциала (Таблица 19).

Таблица 19 – Шкала для оценки регуляторного потенциала бифидобактерий

Показатель	Значение	Балльная оценка (БО)
Гидрофобность (Н)	60 и более	3
	40-59	2
	39 и ниже	1
Адгезия (ИАМ)	4 и более	3
	2,51-3,9	2
	2,5 и ниже	1
Аутоагрегация (АА)	40 и более	3
	11-39	2
	10 и менее	1
Кислотообразование (К)	101 и выше	3
	51-100	2
	50 и менее	1
Антиоксидантная активность (АОА)	3,5-2,9	3
	2,8-2,0	2
	1,9 и менее	1
Антагонизм (Ант)	проявляют	3
	не проявляют	0

Таким образом, оценку регуляторного потенциала (РП) целесообразно проводить по формуле:

$$РП = БО_{Н} + БО_{ИАМ} + БО_{АА} + БО_{К} + БО_{АОА} + БО_{Ант} ,$$

где  $БО_{Н}$  – балльная оценка гидрофобности

$БО_{ИАМ}$  – балльная оценка индекса адгезии микроорганизмов

$БО_{АА}$  – балльная оценка аутоагрегации

$БО_{К}$  – балльная оценка кислотообразования

$БО_{АОА}$  – балльная оценка антиоксидантной активности

$БО_{Ант}$  – балльная оценка антагонизма

Интерпретацию результатов оценки регуляторного потенциала бифидобактерий следует вести согласно следующим показателям балльной оценки: 18 - 11 баллов – регуляторный потенциал высокий, 10 – 6 баллов – регуляторный потенциал сниженный, 5 и менее баллов – низкий.

Количественный уровень бифидобактерий в среднем составил  $9 \lg$  КОЕ/г. Условно-патогенные бактерии были представлены микроорганизмами рода *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, грибами рода *Candida*, а также кишечными палочками с измененными биологическими свойствами (лактозонегативными и гемолизинпродуцирующими). Средний уровень УПМ был равен  $7 \lg$  КОЕ/г. Так как разница в титрах между бифидобактериями и УПМ составляет  $2 \lg$ , то бифидобактерии можно отнести к группе доминантов. Оценка регулирующего потенциала представлена в таблице 20.

Таблица 20 – Оценка регуляторного потенциала бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей

Показатель	Среднее значение признака у бифидобактерий	Балльная оценка
Гидрофобность (Н)	19,8	1
Адгезия (ИАМ)	2,5	1
Аутоагрегация (АА)	34,4	1
Кислотообразование (К)	70	2
Антиоксидантная активность (АОА)	1,7	1
Антагонизм (Ант)	проявляют	3
<b>Регулирующий потенциал (РП)</b>	<b>9 баллов - сниженный</b>	

Таким образом, бифидобактерии в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей являются доминантными микросимбионтами со сниженным регуляторным потенциалом, что предопределяет необходимость коррекции не только их количественного уровня, но и биологических свойств.

## ГЛАВА 4. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИФИДОБАКТЕРИЙ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

В настоящее время у ВИЧ-инфицированных пациентов активно изучаются особенности метаболизма представителей различных таксономических групп, особенно белковый обмен [186, 209]. С одной стороны, это обусловлено необходимостью формирования патогенетически обоснованной системы по коррекции питания ВИЧ-инфицированных пациентов для нивелирования «Вастинг-синдрома». С другой стороны, сведения об активизации кинуренинового пути катаболизма триптофана при прогрессировании ВИЧ-инфекции, позволяют сделать предположение о влиянии кишечных бактерий на данный процесс и соответственно об участии микрофлоры в патогенезе ВИЧ-инфекции.

### 4.1. Активность метаболизма аминокислот бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей

Данный раздел работы посвящен исследованию аминокислотного состава супернатантов и клеточных лизатов бифидобактерий, выделенных из кишечника ВИЧ-инфицированных. Исследование состава аминокислот проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ по методике [78].

В целом можно говорить о более интенсивных метаболических процессах у бифидобактерий, полученных от ВИЧ-инфицированных детей, чем у бифидофлоры ВИЧ-негативных пациентов. Установлено, что количественное содержание аминокислот в бактериальном лизате при ВИЧ-инфекции было выше в 1,6 раза, чем в лизате бифидобактерий от ВИЧ-негативных детей - 1183,9 мкг и 762,2 мкг соответственно. В составе супернатантов *Bifidobacterium spp.*, которые были получены от ВИЧ-позитивных детей, аминокислот было в 3 раза больше (2413,7 мкг против 752,2 мкг), чем в группе сравнения ( $U=2,86$ ,  $p=0,001$ ).

Глицин в больших количествах обнаруживался в составе клеточного лизата бифидофлоры от ВИЧ-инфицированных пациентов, но данная аминокислота отсутствовала в составе супернатантов. У бифидобактерий от ВИЧ-негативных



детей глицин обнаруживали как в составе клеточного матрикса, так и в супернатантах. При этом у здоровых детей количественный уровень глицина в клетках был в 3,9 раза ниже, чем у ВИЧ-инфицированных (Таблица 21).

Таблица 21 – Содержание некоторых аминокислот в супернатантах и в лизатах бифидобактерий у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей, Ме (LQ; UQ)

Аминокислоты	ВИЧ + (n=23 штамма)		ВИЧ - (n=13 штаммов)	
	Среднее содержание в мкг на 1 г сухого вещества и 1 мл среды		Среднее содержание в мкг на 1 г сухого вещества и 1 мл среды	
	Лизат	Супернатант	Лизат	Супернатант
Аланин	10,6 (9,6; 11,2)	3,9 (3,5; 4,2)	0,01 (0; 0,2)	0,3 (0,1; 0,4)
Аспарагин	177,7 (170,6; 178,1)	119,2 (110,2; 121,3)	234 (230,4; 236)	137,2 (135,2; 138,2)
Аргинин	20,8 (19,0; 21,2)	12,5 (11,5; 13,5)	0,37 (0,2; 0,43)	2,2 (2,0; 2,3)
Валин	1,6 (1,5; 1,8)	7,5 (7,0; 8,0)	0,62 (0,58; 0,70)	0,2 (0,1; 0,4)
Гистидин	340,4 (316,3; 343,5)	0	31,4 (30,2; 32,4)	0
Глицин	2020 (1890; 2034)	0	512,3 (510,4; 513,7)	381,8 (356,2; 392,4)
Глутамин	134,3 (132,3; 135)	1143,9 (1140; 1145)	482,9 (480,3; 485,7)	0
Изолейцин	301,5 (300, 2; 304,4)	15,8 (13,9; 16,8)	333,2 (310,1; 336)	5,1 (4,6; 5,4)
Лейцин	34,4 (34,2; 36,7)	72,1 (68,2; 75,6)	40,5 (35,1; 41,2)	8,3 (7,7; 8,7)
Лизин	271,8 (263,3; 278,4)	542,4 (536,3; 548,2)	39,7 (34,5; 41,3)	15,6 (14,1; 16,5)
Метионин	118,6 (117,8; 119,9)	373,4 (370,4; 375,2)	0,27 (0,1; 0,37)	0,3 (0,2; 0,5)
Пролин	180,1 (176,6; 183,5)	263,8 (261,1; 265,8)	26,54 (25,2; 27,2)	22,3 (20,4; 23,1)
Серин	666,2 (660,1; 668,6)	6402 (6002; 6712)	614,8 (612,5; 615,3)	911,3 (909,3; 912)
Тирозин	2,3 (1,5; 2,4)	0,16 (0,1; 0,21)	0	0
Треонин	15,3 (14,2; 16,9)	12,5 (10,7; 13,2)	0,38 (0,32; 0,61)	0,97 (0,62; 1,12)
Триптофан	25,3 (22,8; 27,3)	62,2 (62,2; 64,8)	0,31 (0,11; 0,33)	4,4 (3,3; 4,9)
Фенилаланин	37,9 (36,1; 38,6)	46,5 (45,8; 47,2)	5,83 (5,1; 6,2)	3,9 (3,3; 4,3)
Цистеин	249,9 (245,3; 252)	605 (600,4; 606,5)	3,4 (3,0; 3,6)	1,7 (1,5; 1,9)
Кинуренин	54,4 (52,4; 55,1)	51,6 (50,3; 52,5)	215,5 (210; 217,1)	53,3 (52,4; 55,4)

Серин – заменимая гидроксиаминокислота, также как глицин, принимающая участие в синтезе иммуноглобулинов, обмене пуринов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на долю данной аминокислоты в составе экзометаболитов приходилось 68,7% от массы всех аминокислот, синтезируемых бифидобактериями у ВИЧ-инфицированных и 61,4% в группе ВИЧ-негативных детей. Серин определяли не только в супернатантах, но и в составе клеточных стенок бифидобактерий. Однако соотношение серина в лизате и в супернатантах бифидофлоры у ВИЧ-инфицированных составило 1:10, в группе ВИЧ-негативных детей 1:2.

Незаменимую для детей аминокислоту гистидин регистрировали только в составе гидролизата бифидобактерий как у детей с ВИЧ-статусом, так и без него. Количественное содержание данной аминокислоты было в 10 раз выше в составе клеточной массы бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных детей.

Содержание треонина в экзометаболитах было невысоким (Таблица 21) и сходным с содержанием в клеточной массе. Известно, что треонин необходим для синтеза серина, содержание которого было достаточно высоким как в клетках, так и в экзометаболитах бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных. В связи с этим полученные результаты по треонину согласуются с общей картиной интенсивного обмена этих аминокислот у бифидобактерий при ВИЧ-инфекции.

У бифидобактерий, выделенных от ВИЧ-позитивных детей, глутамин обнаруживали в большом количестве в супернатантах, нежели в клеточных лизатах (Таблица 21). Бифидобактерии при ВИЧ-инфекции отличались высокой активностью выделения пролина и лизина. В супернатантах бифидобактерий, выделенных от ВИЧ-негативных детей, содержание данных аминокислот было ниже в 12 и 35 раз соответственно. Фенилаланина в экзометаболитах бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных, по сравнению с пролином и лизином, было не высоким. Но если сравнивать содержание фенилаланина в супернатантах между группами, то у ВИЧ-инфицированных детей количество данной аминокислоты было в 12 раз выше, чем у ВИЧ-негативных детей. Необходимо отметить, что в составе клеточного гидролизата бифидобактерий ВИЧ-

позитивных детей пролина и лизина было в 1,5 – 2 раза меньше, чем в экзометаболитах. У ВИЧ-негативных детей в клеточной массе бифидобактерий наоборот лизина было больше в 2 раза, нежели в супернатантах. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что у ВИЧ-инфицированных детей бифидобактерии активно участвуют в синтезе лизина, пролина, фенилаланина, что подчеркивает симбиотические связи бифидофлоры с макроорганизмом, направленные на сохранение гомеостаза.

Бифидобактерии способны синтезировать лейцин и изолейцин - незаменимые аминокислоты, участвующие в белковом и углеводном обменах, поддерживающие нормальный уровень сахара крови, функционирование печени и образование гемоглобина. Установлено, что количество лейцина в супернатантах бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных детей было в 8,5 раз выше, чем у ВИЧ-негативных детей (Таблица 21). Лейцин обнаруживали также в составе лизата бактерий, при чем содержание данной аминокислоты у бифидобактерий, изолированных от ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных детей было сходным (Таблица 21). Изолейцин преимущественно в больших количествах содержался в составе клеточного матрикса. Содержание изолейцина в сравниваемых группах было сходным.

Цистеин – серосодержащая аминокислота, которая обладает антиоксидантной активностью. Установлено, что у штаммов от ВИЧ-инфицированных пациентов в супернатантах содержание цистеина в 2,5 раза больше, чем в клеточном лизате. Содержание цистеина в клетках у штаммов от ВИЧ-инфицированных было также значительно больше, чем от ВИЧ-отрицательных детей.

Самым важным в патогенезе ВИЧ-инфекции является обмен триптофана, вернее всего его усиленный распад и накопление продуктов кинуренинового пути расщепления триптофана, которые влияют на мукозальный иммунитет и способствуют прогрессированию ВИЧ-инфекции. В супернатантах и в клеточном лизате бифидобактерий, изолированных из кишечника ВИЧ-инфицированных детей, содержалось большое количество триптофана, по сравнению с группой

сравнения (Таблица 21). Кинуренин и его производные содержались в супернатантах и в лизате бактерий, изолированных из кишечника как ВИЧ-позитивных, так и ВИЧ-негативных детей. При этом у ВИЧ-инфицированных детей количество кинуренина в клетках и в супернатантах было практически одинаковым. Содержание кинуренина в экзометаболитах бифидобактерий здоровых детей не отличалось от аналогичного показателя при ВИЧ-инфекции. Однако, в составе клеточного лизата бифидобактерий у ВИЧ-отрицательных детей содержание кинуренина было в 4 раза больше, чем у ВИЧ-инфицированных (Таблица 21).

Следовательно, бифидофлора у ВИЧ-инфицированных детей характеризуется высокой активностью синтеза аминокислот, в том числе и триптофана. Показано участие бифидобактерий в кинурениновом пути расщепления триптофана. Снижение способности бифидобактерий при ВИЧ-инфекции депонировать кинуренин в клетках раскрывает дальнейшие перспективы исследований по определению факторов, влияющих на функциональные свойства бифидофлоры и активность ферментов метаболизма аминокислот, в том числе триптофана.

#### **4.2. Биологические эффекты экзометаболитов бифидобактерий, изолированных от ВИЧ-инфицированных детей**

В настоящее время накоплено много информации о способности бифидобактерий регулировать баланс про- и противовоспалительных цитокинов [1, 86, 94]. Это обусловлено не только специфическими компонентами клеточных стенок, но и синтезом экзополимеров, например гликопротеинов. Бифидобактерии существенно снижают уровень провоспалительных цитокинов IL-8, IFN- $\gamma$  и повышают уровень противовоспалительного пептида IL-10. [1, 22, 31]. Контроль цитокинового баланса бифидобактериями направлен не только на активацию эффекторов адаптивного иммунитета, формирование иммунологической толерантности к нормофлоре, но и на подавление воспалительных реакций. Эти эффекты зависят от видовой и штаммовой

специфичности бифидофлоры [19, 31]. Помимо участия в иммунорегуляции экзополимеры бифидобактерий могут являться основой для «кросс-фидинга», т.е. перекрестного питания, поэтому синтез таких молекул может рассматриваться как проявление метаболической активности бифидобактерий.

При ВИЧ-инфекции показано наличие хронической иммунной активации и выраженного воспалительного процесса на уровне слизистой кишечника [174, 154], что еще в большей степени повышает проницаемость кишечника и транслокацию микроорганизмов из кишечника в кровеносное русло [130]. В связи с этим возникает вопрос о биологической полноценности, выделяемых бифидобактериями экзометаболизмов при ВИЧ-инфекции. В связи с этим на модели животных мы изучили противовоспалительную активность экзометаболизмов белково-пептидной природы у бифидобактерий, изолированных из кишечника у ВИЧ-инфицированных детей. Результаты исследования приведены на рисунке 15.

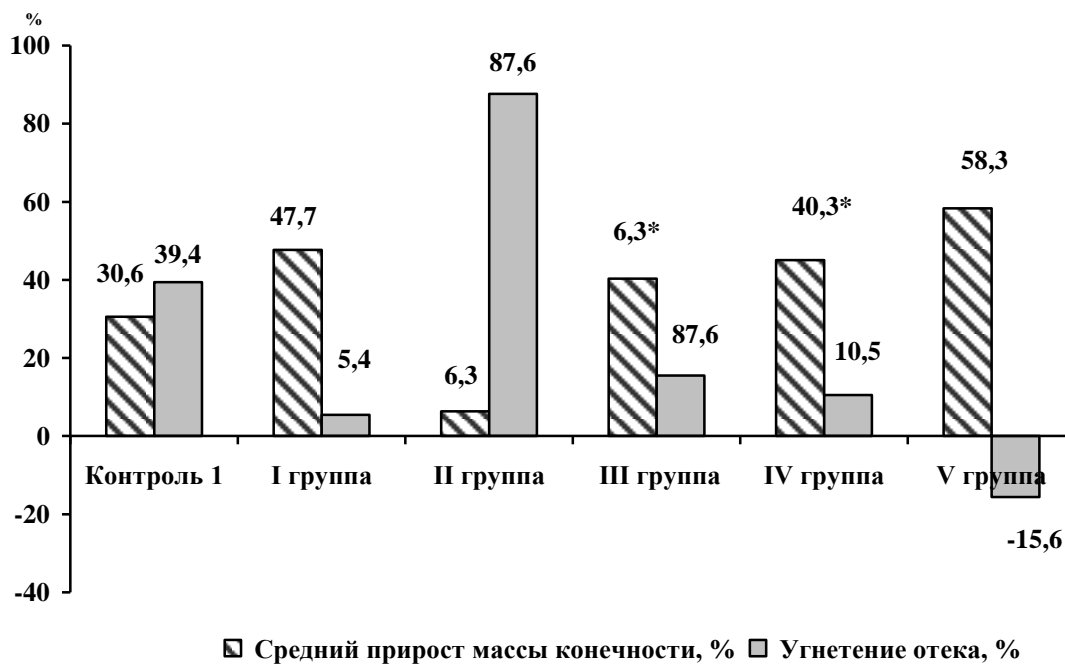


Рисунок 15 - Влияние экзометаболизмов бифидобактерий на развитие острого формалинового отека конечности лабораторных животных

Примечание: \*значимость различий с контрольной группой животных  $p=0,05$ , \*\* значимость различий с контрольной группой животных  $p=0,001$

Оценка влияния исследуемых образцов на развитие острого воспаления показала выраженное уменьшение флогогенного действия формалина на животных группы II, под влиянием экзометаболитов штамма 85 *Bifidobacterium spp.*, полученного от ребенка с 2 В стадией ВИЧ-инфекции, по сравнению с контрольной группой животных, получавших диклофенак натрия. Это говорит о высокой противовоспалительной активности данного штамма ( $U=2,7$ ,  $p=0,001$ ).

Наличие умеренной противовоспалительной активности отмечено в группе III, получавшей экзометаболиты *Bifidobacterium spp.* штамм 87, изолированный из кишечника ребенка с 4 Б стадией ВИЧ-инфекции ( $U=3,5$ ,  $p=0,05$ ). В группе животных V, наоборот, наблюдалось существенное увеличение воспалительного процесса, что может говорить о возможном наличии гистаминергического действия. Провоспалительная активность характерна для экзометаболитов *Bifidobacterium spp.* № 88, выделенного от ребенка с 2 А стадией ВИЧ-инфекции ( $U=2,3$ ,  $p=0,01$ ). Обращает на себя внимание, что противовоспалительная активность метаболитов бифидобактерий имеет штаммовую специфичность и не зависит от стадии ВИЧ-инфекции.

Довольно часто у ВИЧ-инфицированных пациентов регистрируют депрессивные состояния или наоборот возбуждение ЦНС [49]. Известно, что нормальная микрофлора, в том числе бифидобактерии являются активными продуцентами нейроактивных аминокислот, либо предшественников нейромедиаторов [60, 70]. В связи с этим возникает необходимость оценки психотропной активности экзометаболитов разных видов бифидобактерий. О наличии антидепрессивной активности экзометаболитов бифидобактерий у животных можно судить по статистически достоверному уменьшению длительности (времени) иммобилизации и латентного времени. Изменение количества поз отчаяния позволяет предположить наличие возбуждающего либо угнетающего действия на ЦНС.

Достоверное уменьшение суммы времени иммобилизации отмечено под влиянием экзометаболитов бифидобактерий в группах животных I, III и V, а значимое снижение латентного времени в группах II и III (Таблица 22).

Таблица 22 – Результаты исследования психотропной активности экзометаболитов бифидобактерий, М (SEM)

Группа	Среднее время иммобилизации (сек)	Среднее латентное время (сек)	Среднее количество поз отчаяния
Контроль	62,2 (3,5)	71,6 (3,8)	5,8 (1,1)
Группа животных I	48,1 (3,1)*	60,1 (3,5)	4,3 (0,9)
Группа животных II	73,7 (3,7)	32,9 (2,5)*	7,7 (1,3)*
Группа животных III	50,2 (3,3)*	44,9 (3,1)*	6,5 (1,2)
Группа животных IV	75,2 (3,7)	50,1 (3,3)	3,5 (0,7)
Группа животных V	31,4 (2,3)*	74,3 (3,8)	5,3 (1,3)

Примечание: \* значимость различий по отношению к контролю  $p=0,05$ .

Таким образом, наличие антидепрессивного действия отмечено только в группе животных III, которые получали экзометаболиты *Bifidobacterium spp.* штамм 87. Достоверное уменьшение среднего времени иммобилизации без достоверного изменения латентного времени в группах животных I и V позволяет говорить о возбуждении ЦНС. Это связано с использованием экзометаболитов *Bifidobacterium spp.* штамма 74, полученного от здорового ребенка и 88 от ВИЧ+ ребенка. При этом, их метаболиты оказывали однонаправленное возбуждающее действие на подопытных животных, не зависимо от того, есть или нет ВИЧ-статус у детей, или его нет. Значимое увеличение количества поз отчаяния и снижение латентного времени в группе животных II позволяет предположить наличие у конкретного штамма *Bifidobacterium spp.* № 85 выраженного седативного действия. Речь идет о штаммовой специфичности выделяемых экзометаболитов в связи с тем, что экзометаболиты *Bifidobacterium spp.* штамм 88, вообще не обладали психотропным действием на подопытных животных.

Ранее уже было показано, что бифидобактерии при ВИЧ-инфекции являются активными продуцентами различных аминокислот, в том числе нейроактивных (глицина) или/ и аминокислот, являющихся предшественниками нейромедиаторов: например, триптофана, который является предшественником серотонина, глутаминовой кислоты, которая превращается в гамма-аминомасляную кислоту и т.д. В связи с этим можно предположить, что различия

в психотропных эффектах экзометаболитов бифидобактерий связан с разным уровнем продуцируемых аминокислот.

Анализ содержания аминокислот в экзометаболитах проведен у штаммов *Bifidobacterium spp.* № 74 (возбуждение ЦНС), № 85 (седативный эффект), № 87 (антидепрессивный эффект) и у 88 штамма, экзометаболиты которого не обладали нейроактивным действием. Данные представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Содержание нейроактивных аминокислот и/или предшественников нейромедиаторов в экзометаболитах бифидобактерий

Штаммы <i>Bifidobacterium spp.</i>	Действие	Содержание нейроактивных аминокислот или предшественников нейромедиаторов в экзометаболитах (мкг/мл)				
		Аспарагин	Глутамин	Глицин	Триптофан	Фенил-аланин
74	Возбуждение ЦНС	29,2	1067,3	96	0,3	1,6
87	Антидепрессивное действие	34,6	86,3	0	0,67	0,48
85	Седативное действие	5,1	0	382	0	22,4
88	Без психотропного эффекта	42,4	0	0	1,9	2,8

Установлено, что штамм *Bifidobacterium spp.* № 85 продуцирует глицин в большом количестве. Видимо, седативное действие экзометаболитов данного штамма связано именно с глицином, так как для него характерен анистрессорный и успокаивающий эффект, за счет образования  $\gamma$ -аминомасляной кислоты.

Штамм бифидобактерий № 88 данную аминокислоту не продуцировал. Аспарагиновая кислота обладает антидепрессивным эффектом, улучшает настроение, но у штамма *Bifidobacterium spp.* № 87, содержание данной аминокислоты в экзометаболитах не отличалось от штамма, не оказывающего нейротропного действия. Однако, обращает внимание очень высокая продукция глутамина, который относится к «возбуждающим» аминокислотам. Среди нейрофизиологических эффектов данной аминокислоты отмечают наличие анистрессорного эффекта, что и проявилось в модели на животных. Штамм *Bifidobacterium spp.* № 74 продуцировал высокое количество глутамина. Данная



аминокислота оказывает возбуждающее действие на ЦНС, хотя продукция «тормозящего» глицина в экзометаболитах выше, чем в контроле.

Таким образом показано, что экзометаболиты бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей обладают биологической активностью со штаммовой специфичностью, эффект которых не зависит от наличия ВИЧ-статуса. Это предопределяет необходимость коррекции бифидофлоры при ВИЧ-инфекции и индивидуализацию выбора пробиотического штамма.

## **ГЛАВА 5. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ УПРАВЛЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЕЙ И БИОЛОГИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ БИФИДОБАКТЕРИЙ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ**

В настоящее время бифидосодержащие пробиотические препараты широко используются в схемах лечения многих нозологий [34, 45, 48]. И это не только заболевания желудочно-кишечного тракта инфекционной или функциональной природы, это гинекологические, хирургические, эндокринные, онкологические, аутоиммунные болезни [90, 137, 181].

Относительно недавно появились сообщения, что кишечная микрофлора при ВИЧ-инфекции может способствовать прогрессированию процесса [99, 130, 131, 219]. Поэтому появляются работы по исследованию способов коррекции микрoэкологических нарушений кишечника при ВИЧ-инфекции, направленные на сдерживание транслокации кишечной микрофлоры через слизистую кишечника и снижение риска развития оппортунистических инфекций. Кроме того, активно изучаются возможности применения пробиотических и симбиотических препаратов для нормализации мукозального иммунитета у пациентов с ВИЧ-статусом [98, 178, 191].

Существующие немногочисленные исследования по применению пробиотических бифидобактерий при ВИЧ-инфекции [128, 178, 180] демонстрируют противоречивые результаты. Однако, конечной точкой для оценки применения бифидосодержащих препаратов, являлся уровень CD4<sup>+</sup>, т.е. оценивались иммунокорректирующие свойства данных бактерий, а не их влияние на кишечный микробиоценоз.

Бифидобактерии характеризуются генетическим сродством к рецепторам макроорганизма, поэтому важно скорректировать «собственный для пациента» пул бифидофлоры. Как показали наши исследования, у ВИЧ-инфицированных детей изменяются биологические свойства бифидобактерий: уровень экспрессии факторов антагонизма, антиоксидантная активность, поверхностные свойства, обуславливающие контактные взаимодействия со слизистой кишечника и друг с

другом. По результатам исследования при ВИЧ-инфекции научно обоснованными являются два подхода к коррекции бифидофлоры (Рисунок 16).

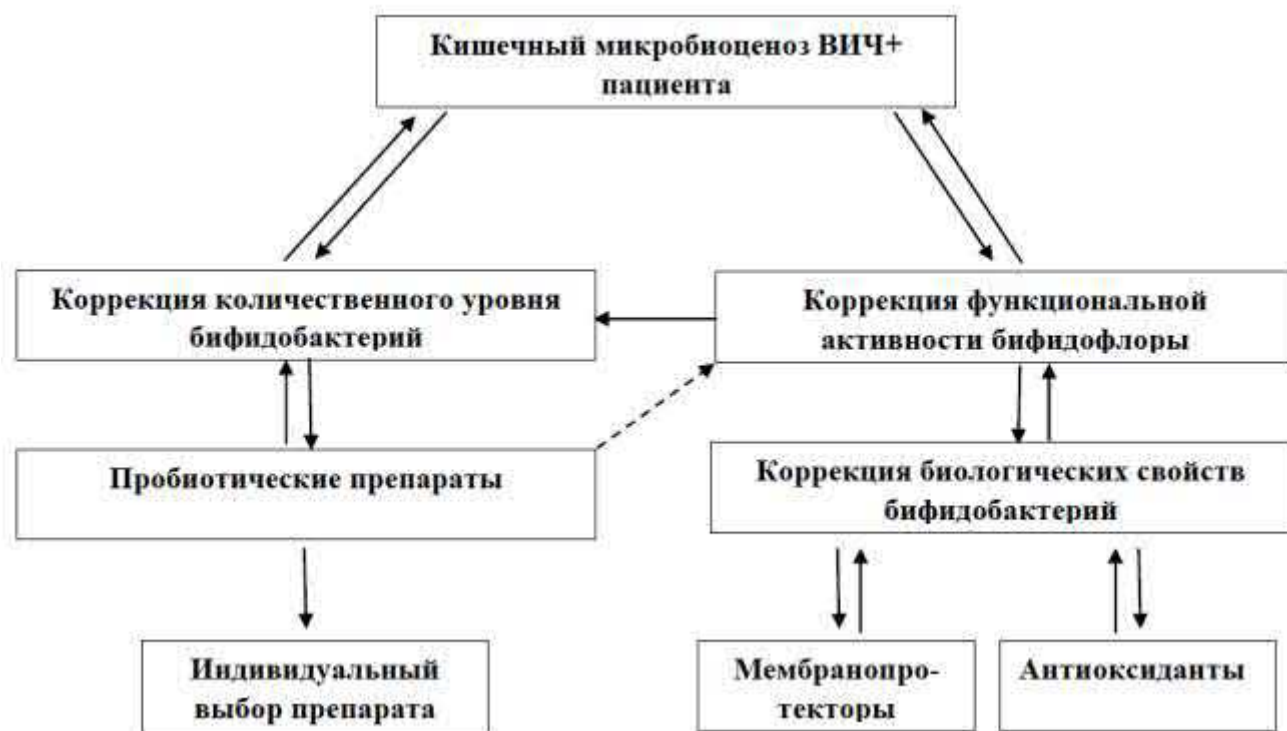


Рисунок 16 - Подходы в коррекции бифидофлоры у детей с ВИЧ-инфекцией

Первый подход связан с коррекцией количественного уровня бифидобактерий на основе использования индивидуально подобранных пробиотических препаратов. Второй подход предполагает нормализацию функциональных характеристик аутоштаммов бифидобактерий на основе коррекции состояния их клеточных мембран и антиоксидантной активности.

Корректировать количественное содержание бифидобактерий, за счет использования пробиотических препаратов, целесообразно тем категориям пациентов с ВИЧ-инфекцией, у которых регистрируются низкие количественные уровни бифидофлоры. Полученные данные свидетельствуют, что это дети со 2 и 4 стадией ВИЧ-инфекции. Основным ограничением этого подхода является бионесовместимость пробиотических штаммов и микрофлоры пациента. Однако, количественный уровень бифидобактерий у пациента может восстанавливаться при нормализации биологических свойств данных микросимбионтов, т.е. при

использовании второго подхода. Данный подход целесообразен при выявлении у ВИЧ-инфицированных детей бифидобактерий с измененными регуляторными свойствами. Выбор корректирующего подхода должен базироваться на результатах исследования бифидофлоры каждого конкретного пациента. Возможна сочетанная коррекция как количественного содержания, так и биологических характеристик бифидофлоры. Нормализация количественных и функциональных свойств бифидобактерий – это естественный способ биорегуляции кишечного микробиоценоза.

### **5.1. Технология выбора пробиотического штамма бифидобактерий для ВИЧ-инфицированных детей**

На современном фармацевтическом рынке России как лекарственные препараты зарегистрированы более 30 пробиотиков и симбиотиков, а как БАДы более 200 средств [108]. Не всегда, прием пробиотических препаратов приносит желаемый результат. В настоящее время существуют четкие критерии оценки качества и безопасности штаммов пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пробиотических препаратов [57, 64]. Однако, не нужно забывать, что особенности технологического процесса изготовления пробиотиков, их взаимодействие в составе консорциумов могут сказываться на функциональных свойствах штаммов, что также определяет результаты пробиотикотерапии.

Из всего многообразия средств мы выбрали 8 бифидосодержащих препаратов (моно- мультикомпонентные) и выделили из них чистые культуры бифидобактерий. В связи с тем, что для бактерий характерна штаммоспецифичность биологических свойств, а также на биологические свойства влияет технология производства, часть бифидобактерий, взятых в исследование относились к одному виду. При этом в мультикомпонентных бифидосодержащих пробиотиках исследовали весь консорциум бифидобактерий, без разделения их на виды. Пробиотические штаммы бифидобактерий

характеризовались средними показателями специфической адгезии, низкой или средней гидрофобностью (Таблица 24).

Таблица 24 – Функциональные характеристики пробиотических штаммов бифидобактерий

Препарат	Штаммы	Адгезия (ИАМ)	Гидрофобность (Н, %)	Кислотообразование (°Т)	Антагонизм к УПМ
«Линекс»®	<i>B. infantis</i>	2,8	25	98,9	<i>E.coli lac-</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>S.aureus</i>
«Линекс® форте»	<i>B. animalis subsp.lactis</i>	3,3	22	220	<i>S.xylosus</i> <i>S.epidermidis</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>C.albicans</i> <i>C.dublinsiensis</i>
«Пробио-Лог»®	<i>B. animalis subsp.lactis (BB-12)</i>	3,3	31	112,2	<i>K.pneumoniae</i> <i>C.albicans</i>
«Баксет форте»™	<i>B.bifidum PXN23</i> <i>B.longum PXN30</i> <i>B.breve PXN 25</i> <i>B.infantis PXN 27</i>	2,9	34	146,5	<i>E.coli Hly+</i> <i>S.xylosus</i> <i>S.aureus</i> <i>C.albicans</i>
«Баксет беби»®	<i>B.breve PXN 25</i> <i>B.infantis PXN 27</i> <i>B.longum PXN30</i>	3,2	25	185,8	<i>E.coli Hly+</i> <i>K.pneumoniae</i> <i>S.xylosus</i> <i>S.aureus</i>
«Максилак»®	<i>B.longum</i> <i>B.breve</i> <i>B.bifidum</i>	3,6	27	124,2	-
«Бифидумбактерин»™	<i>B.bifidum</i>	3,2	20,3	75	<i>E.coli lac-</i>
«Примадофилюс® бифидус»	<i>B.breve</i> <i>B.longum</i>	3,3	28,4	230,3	<i>E.coli lac+</i> <i>E.coly Hly+</i> <i>S.aureus</i> <i>S.epidermidis</i> <i>E.faecium</i> <i>C.albicans</i> <i>C.tropicalis</i>

Низкие показатели гидрофобности, вероятнее всего, связаны с технологическим процессом изготовления препаратов, т.е. с лиофилизацией, так как все препараты были в сухом виде. В связи с тем, что гидрофобность влияет на аутоагрегацию, определяющую возможность «выживания» бактерий в начальных отделах желудочно-кишечного тракта и колонизацию кишечника, то можно было бы предполагать низкую способность данных штаммов в формировании временного экзогенного микробиоценоза. Однако, все пробиотические штаммы, кроме «Бифидумбактерина»™ заключены в кишечнорастворимые капсулы, иногда даже мультирезистентные к различным воздействиям, которые защищают пробиотических бактерий от агрессивной среды в верхних отделах желудочно-кишечного тракта.

Различались штаммы и консорциумы по способности продуцировать органические кислоты. Кислотообразование регистрировали в пределах от 75 °Т до 230,3° Т, т.е. от низких значений до высоких. При этом не было зависимости уровня кислотообразования от количества видов бифидобактерий.

Штаммы и консорциумы обладали различным спектром антагонистической активности, которая характеризовалась антибактериальной и/или противогрибковой направленностью. Полученные данные о функциональных свойствах некоторых пробиотических бифидобактерий и их антагонизме позволяет выбрать наиболее подходящие штаммы для каждого конкретного пациента, с учетом характера микрoэкологических нарушений и биологических свойств аутофлоры.

Довольно часто при назначении живых штаммов микроорганизмов ВИЧ-инфицированным у специалистов возникают опасения по поводу транслокации бактерий в кровеносное русло, тем более что существуют данные о способности бифидобактерий вызывать септические состояния у недоношенных детей [138, 212]. Работы зарубежных исследователей свидетельствуют, что риски транслокации пробиотических микроорганизмов через кишечник у ВИЧ-инфицированных сводятся к нулю [212], тем не менее, мы считаем необходимым определить у них отсутствие факторов патогенности. Согласно *Bergey's Manual of*

Systematic Bacteriology 80% штаммов бифидобактерий продуцируют уреазу, поверхностные белки обладают протеолитической активностью [119], однако все штаммы пробиотических бифидобактерий, взятых в исследование, показали отсутствие уреазной, протеолитической, ДНКазной, липазной активностей. Таким образом, по продукции ферментов патогенности пробиотические штаммы бифидобактерий были безопасными.

Безопасность штаммов - это не только отсутствие факторов патогенности, это, прежде всего биосовместимость с собственной микрофлорой ВИЧ-инфицированных. Анализ результатов совместного культивирования штаммов бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных (n=58) и пробиотических бифидобактерий (n=16) показал наличие антагонистических отношений между пробиотическими и фекальными изолятами. В целом биосовместимость штаммов ВИЧ-позитивных детей с пробиотическими культурами не превышала 41%. При увеличении степени тяжести микробиологических нарушений кишечника биосовместимость бифидобактерий падала с 69,2% при I степени до 43,5% при II степени и до 42,9% при III степени ( $\chi^2 = 3,69$ ,  $df=2$ ,  $p=0,03$ ).

*Bifidobacterium spp.* от ВИЧ-инфицированных были биосовместимы в 69% случаев с бифидобактериями из препарата «Линекс»®, в 67,2% с культурами из препаратов «Бифидумбактерин»™ и «Линекс® форте». 65,5% штаммов были совместимы с микроорганизмами из консорциума «Примадофиллюс® бифидус». С бифидобактериями из препарата «Пробиолог»® «не конфликтовали» 62,1% штаммов от ВИЧ-инфицированных детей. Биосовместимость к «Максилак»® и «Баксет беби»® составила 58,6% и 56,9% соответственно. Низкую совместимость регистрировали с пробиотическими культурами из препарата «Баксет форте»™ (46,6%).

В целом для эмпирического выбора бифидосодержащих пробиотиков для ВИЧ-инфицированных пациентов без учета видовой принадлежности бифидобактерий можно опираться на следующий ранжированный по степени убывания биосовместимости ряд:

«Линекс»® - «Линекс® форте» или «Бифидумбактерин»™ - «Примадофилюс® бифидус» - «Пробиолог»® - «Максилак»® - «Баксет беби»® - «Баксет форте»™.

Далее для того, чтобы дать конкретные рекомендации по технологии индивидуального выбора пробиотического штамма для ВИЧ-инфицированных пациентов были проанализированы функциональные характеристики биосовместимых образцов. Данные представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Показатели функциональных характеристик биосовместимых фекальных изолятов от ВИЧ-позитивных детей и пробиотических бифидобактерий, M (LQ; UQ)

Группы микроорганизмов	Адгезия (ИАМ)	Гидрофобность (H, %)	Кислотообразование (° T)
Фекальные штаммы (n=24)	2,64 (2,33; 3,25)*	53,3 (41,3; 65,2)**	96,3 (74,4; 108)
Пробиотические штаммы (n=16)	2,2 (2,0; 3,5)	26,6 (23,3; 29,6)	149,1 (131; 150,4)*

Примечание: \* - достигнутый уровень значимости различий  $p=0,05$ , \*\* - достигнутый уровень значимости различий  $p=0,01$ .

Результаты исследований показывают, что биосовместимые штаммы бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных детей имели более высокие показатели специфической адгезии ( $p=0,05$ ) и гидрофобности ( $p=0,01$ ), чем пробиотические бифидобактерии. Это подтверждает данные о том, что доминирование бифидобактерий в кишечном микробиоценозе обусловлено не столько факторами прямого антагонизма, сколько функциональными характеристиками, обеспечивающими высокий количественный уровень и взаимодействие со слизистой. Поэтому появление в кишечном микробиоценозе экзогенных штаммов с более высокой экспрессией этих факторов ведет к конкурентным взаимоотношениям, которые расцениваются как бионесовместимость.

При этом кислотообразование у биосовместимых штаммов от ВИЧ-инфицированных детей было более низким, чем у пробиотических бифидобактерий ( $p=0,05$ ). Видимо, высокая продукция органических кислот фекальными изолятами бифидобактерий подавляет рост и развитие



пробиотических штаммов. При наличии нескольких биосовместимых пробиотических штаммов необходимо учитывать спектр антимикробной активности, так как у пациентов вегетируют разные УПМ.

Из технологических характеристик важной для эффективной пробиотикотерапии является способность штаммов в оптимальные сроки восстанавливаться из лиофилизированного состояния. Установлено, что быстрее всего начинают рост и размножение штаммы из монокомпонентных пробиотиков или содержащих 2-3 пробиотические культуры, например «Примадофилюс® бифидус» (через 3,5 часа), «Бифидумбактерин»™ (через 4 часа), «Линекс® форте» (через 4 часа). Более длительное время требуется для многокомпонентных бактериальных консорциумов – «Максилак»® (6 часов), «Баксет-форте»™ (6,5 часов), «Баксет-беби»® (5,5 часов). Это связано с конкурентными взаимодействиями бактерий внутри консорциумов, что удлиняет время появления первых признаков роста. Однако, в целом все штаммы восстанавливались в сроки, соответствующие физиологии пищеварения, что гарантирует «работу» пробиотических штаммов в кишечном микробиоценозе, до естественного выведения их из кишечника.

Таким образом, технология персонализированного выбора пробиотического препарата для ВИЧ-инфицированного ребенка предполагает:

1. выделение бифидобактерий из кишечного содержимого, их идентификацию, изучение биологических свойств бифидобактерий (гидрофобности, специфической адгезии, кислотообразования бифидобактерий, типа взаимоотношений с ассоциативными микросимбионтами) у конкретного пациента;
2. выбор пробиотических штаммов с учетом видового состава бифидофлоры пациента, с последующим исследованием их биологических свойств (тех же, что и у фекальных изолятов);
3. выбор пробиотических культур на основе полученных результатов, с учетом нарушенных функциональных характеристик фекальных бифидобактерий;

4. определение биосовместимости *in vitro* фекальных изолятов бифидобактерий и выбранных пробиотических штаммов.

На третьем этапе при выборе пробиотического штамма необходимо учитывать следующие обстоятельства: уровень экспрессии факторов адгезии и гидрофобности коммерческих бифидобактерий должен быть сходным или не должен превышать аналогичные характеристики у штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных детей, иначе будет реализовываться феномен «пробиотик против микрофлоры хозяина». Для нивелирования ситуации «микрофлора хозяина против пробиотического штамма» целесообразно использовать пробиотические штаммы, имеющие высокие показатели кислотообразования.

## **5.2. Средства и прикладные точки для модуляции биологических свойств и содержания бифидофлоры при ВИЧ-инфекции**

Согласно полученным данным распространенность и характер микробиологических нарушений кишечника у ВИЧ-инфицированных не отличается от аналогичных показателей у относительно здоровых детей без ВИЧ-статуса. При этом наблюдается не только снижение популяционного уровня бифидофлоры, но и изменение биологических свойств, которые играют ключевое значение в поддержании микробиологического равновесия в сложном микробном сообществе кишечника. У бифидобактерий при ВИЧ-инфекции уже при 2 степени микробиологических нарушений снижается в 2 раза антиоксидантная активность бифидобактерий, также снижается гидрофобность клеточной поверхности, что обусловлено изменением жирнокислотного состава клеточных стенок бактерий. При III степени микробиологических нарушений продолжают снижаться антиоксидантные свойства бифидофлоры, гидрофобность и страдает специфическая адгезия. Таким образом, первоочередными точками приложения внешнего модулирующего воздействия на бифидобактерии при ВИЧ-инфекции является антиоксидантная система и поверхностные свойства бактериальной клетки, которые и определяют гидрофобность штаммов. В связи с этим мы исследовали *in vitro* возможность использования для коррекции биологических

свойств бифидофлоры у ВИЧ-положительных пациентов веществ с антиоксидантными и мембранопротекторными свойствами, в частности этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС).

Установлено, что внесение этилметилгидроксипиридина сукцината в питательную среду не влияет на количественный уровень штаммов с антиоксидантной активностью равной или выше  $0,7 E_{aoa}$  (группа штаммов 2 и 3 соответственно), так как содержание бифидобактерий до и после внесения антиоксиданта не изменилось и составило 5 и 6 lg КОЕ/мл соответственно. При этом количественный уровень культур с антиоксидантным статусом  $0,3 E_{aoa}$  увеличивается в 10 раз, по сравнению с контролем, т.е. с 5 lg до 6 lg КОЕ/мл. (Рисунок 17).

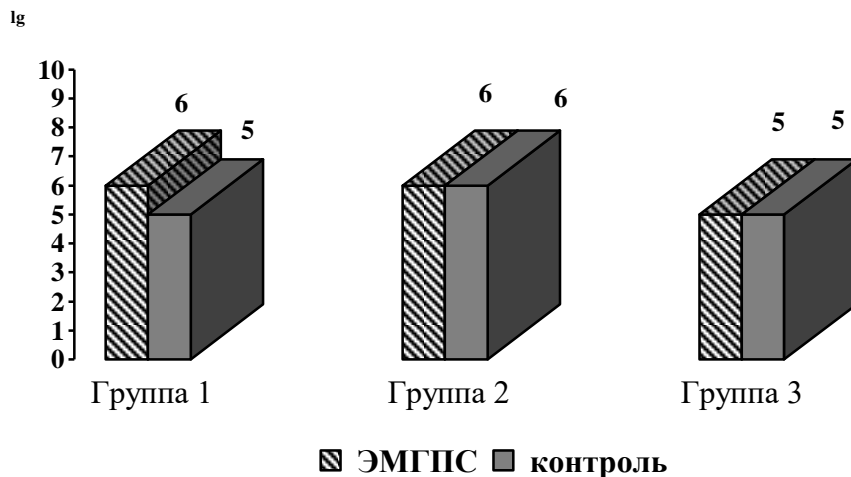


Рисунок 17 - Влияние ЭМГПС на количественный уровень бифидобактерий (lg КОЕ/г)

Введение в питательную среду этилметилгидроксипиридина сукцината, значительно снижает воздействие токсических форм кислорода на бифидобактерии со слабыми антиоксидантными свойствами и создает оптимальные условия для размножения их популяции.

Добавление в питательную среду этилметилгидроксипиридина сукцината изменяет также поверхностные свойства бактериальных клеток, так как препарат обладает мембранопротекторным действием. Так, установлено, что под влиянием

препарата у представителей рода *Bifidobacterium* с антиоксидантной активностью 1,1  $E_{aoa}$  (группа 3) в 1,8 раза, а у штаммов с  $AOA=0,3 E_{aoa}$  (группа 1) более чем 2 раза увеличивается гидрофобность клеточной поверхности (Таблица 26).

Таблица 26 – Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на биологические свойства бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей, Me (LQ; UQ)

Группы штаммов и AOA	Гидрофобность (в %)		Аутоагрегация (в %)		Общая масса ж.к. (мкг на 0,01 г сухого остатка)		Масса ненасыщенных ж.к. (мкг на 0,01 г сухого остатка)		Индекс адгезии микроорганизмов (ед)	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Группа 1 (n=5) $AOA=0,3 E_{aoa}$	18,3* (18; 18,5)	7,5 (6,8; 7,8)	41,2** (38,2; 44,2)	11,3 (8,7; 13,1)	26,1 (22,7; 28,7)	14,5 (10,5; 16,7)	8,7* (8,1; 9,3)	3,9 (3,4; 4,2)	2,5 (2,2; 2,7)	3,6 (3,1; 4,0)
Группа 2 (n=5) $AOA=0,7 E_{aoa}$	68,2 (64,5; 71,3)	55,5 (52,4; 57,1)	60,1 (57,7; 63,6)	62,4 (58,2; 65,1)	33,6 (30,4; 36,7)	30,4 (26,1; 34,3)	11,2 (8,2; 12,8)	10,9 (8,4; 12,1)	2,01* (1,9; 2,3)	4,2 (3,8; 4,4)
Группа 3 (n=5) $AOA=1,1 E_{aoa}$	58,4 (53,6; 59,3)	32,6 (28,1; 35,3)	53,5 (48,6; 57,1)	49,5 (44,3; 50,2)	32,8* (28,1; 34,5)	19,5 (16,5; 20,9)	10,7* (9,5; 11,2)	4,9 (4,1; 5,2)	1,02* (0,87; 1,2)	2,2 (1,8; 2,6)

Примечание: \*различия биологических свойств между опытом и контролем при достигнутом уровне значимости  $p=0,05$ ; \*\* различия биологических свойств между опытом и контролем при достигнутом уровне значимости  $p=0,001$ ;

При этом у изначально высокогидрофобных штаммов (группа 2) показатели текучести мембраны практически не изменяются. Увеличение гидрофобности бактериальной поверхности у культур 1 группы сопровождается ростом в 4 раза аутоагрегации штаммов. Опять же введение препарата не изменяет аутоагрегации у бифидобактерий второй и третьей групп, которые характеризовались изначально более высокими показателями признака. Таким образом, можно говорить об избирательности действия этилметилгидроксипиридина сукцината, которая определяется начальными свойствами штаммов. В основе изменения поверхностных свойств бифидобактерий лежит увеличение массы жирных кислот в клеточной стенке за счет роста массы ненасыщенных жирных кислот.

Если учесть, что ненасыщенные жирные кислоты проявляют антиоксидантные свойства, то применение этилметилгидроксипиридина

сукцината приведет к модуляции не только кристаллического состояния бактериальной мембраны, но и антиоксидантных возможностей бактерий.

Однако установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат статистически значимо снижает специфическую адгезию испытуемых штаммов (Таблица 26). После добавления в питательную среду этилметилгидроксипиридина сукцината происходит снижение способности к специфической адгезии у всех групп штаммов. При этом изменяется категория микроорганизмов по ИАМ и бактерии становятся низко- или неадгезивными. Так как, этилметилгидроксипиридина сукцинат снижает способность бифидобактерий к специфической адгезии, это предопределяет поиск средств, нивелирующих этот эффект.

Согласно литературным данным, лизоцим повышает адгезивные свойства бифидобактерий и обладает антибактериальной активностью в отношении УПМ [6, 33]. В связи с этим, были проведены опыты по оценке влияния лизоцима на адгезивные свойства бифидобактерий. Установлено, что при использовании лизоцима специфическая адгезия штаммов увеличивалась на 8,3% - 9,1%, разница была статистически не значима ( $p=0,72$ ) (Таблица 27).

Таблица 27 – Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС) и лизоцима на индекс адгезии бифидобактерий, Me (LQ; UQ)

Группы бифидобактерий	Контроль	Лизоцим	ЭМГПС+ лизоцим	P <sub>1-2</sub>	P <sub>1-3</sub>
Группа 1 (n=5)	3,6 (3,2; 3,9)	3,9 (3,4; 4,1)	3,0 (2,7; 3,2)	0,72	0,68
Группа 2 (n=5)	4,2 (4,0; 4,5)	4,1 (3,7; 4,3)	3,9 (3,6; 4,2)	0,91	0,87
Группа 3 (n=5)	2,2 (1,9; 2,4)	2,4 (1,9; 2,7)	1,97 (1,7; 2,01)	0,85	0,78

При совместном использовании этилметилгидроксипиридина сукцината и лизоцима специфическая адгезия бифидобактерий снижалась, но это изменение признака не достигало статистической значимости ( $p=0,68$ ), т.е. адгезивная активность бифидофлоры сохранялась практически на исходном уровне.

Таким образом, этилметилгидроксипиридина сукцинат у штаммов с низкими значениями гидрофобности и аутоагрегации модулирует бактериальную поверхность за счет стимуляции у бактерий синтеза ненасыщенных жирных кислот, однако снижает способность к лиганд-рецепторной адгезии. В связи с этим оптимальным будет использование этилметилгидроксипиридина сукцината совместно с лизоцимом, который сохраняет способность бифидобактерий к специфической адгезии практически на исходном уровне. Оптимизация жидкокристаллического состояния клеточной стенки у бифидобактерий сопровождается увеличением размножения последних и повышением их количественного уровня.

Нормализация количественного уровня бифидофлоры является также необходимым условием для сохранения доминирующих позиций данных бактерий в микробиоценозе при ВИЧ-инфекции. Низкая биосовместимость фекальных изолятов от ВИЧ-инфицированных детей и пробиотических штаммов делает проблематичным эмпирический выбор иммунобиологических препаратов на основе живых бактерий для данной категории пациентов. Поэтому очевидным является поиск средств, стимулирующих размножение бифидофлоры пациентов.

В естественных условиях бифидобактерии ассоциированы со слизистой кишечника и заключены в экзополисахаридный матрикс. В составе биопленок микроорганизмов обнаруживают внеклеточные нуклеиновые кислоты [104, 112]. Их рассматривают как аутоиндукторы в микробных сообществах, опосредующие «социальное поведение» микроорганизмов. Однако, чаще идет речь о внеклеточной РНК. Практически отсутствуют данные о возможности использования ДНК в качестве средства управления количественным уровнем микробного сообщества.

Был разработан способ выделения ДНК из пробиотических штаммов, в частности, из *B. bifidum* 791 с последующим изучением способности стимулировать *in vitro* размножение бифидобактерий, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов.

Пробиотический штамм *B. bifidum* 791 выращивается на жидкой Бифидум - среде (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). Культивирование проводится при 37° С в течение 48 ч, что позволяет получить биомассу с содержанием бактерий около 10<sup>8</sup> КОЕ/мл. Далее биомасса переносится в центрифужные пробирки и трехкратно отмывается от питательной среды гидрофосфатным буфером (рН=7,2), содержащим 0,14 М хлорида натрия, 0,03 М хлорида калия, 0,08 мМ гидрофосфата натрия, 0,02 М дигидрофосфата натрия.

На всех этапах осуществляется центрифугирование при ускорении 5 тыс/об.мин, с последующим ресуспендированием бактериальной культуры в буферной системе. Взвесь подвергается ультразвуковому облучению (частота 40 кГц) в течение 30 мин, с последующим центрифугированием при 5 тыс.об/мин. Процедура ультразвуковой обработки бактериальной взвеси осуществляется трижды.

Супернатанты подвергаются хроматографированию на сорбенте - поперечно-перешитой Сефарозе-CL4В. Элюция ДНК проводится с использованием изотонического раствора. Выделенная нуклеиновая кислота спектрофотометрируется в диапазоне длин волн  $\lambda=265-285$  нм для определения ее чистоты и концентрации.

Для оценки *in vitro* влияния выделенной нуклеиновой кислоты на *Bifidobacterium spp.* были использованы штаммы бифидобактерий, изолированные из кишечника ВИЧ-инфицированных детей, выращенные на плотной селективной питательной среде. В стерильные пробирки разливали жидкую Бифидум-среду (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) - 9,5; 8 и 7 мл, добавляя 0,5 мл, 2 мл и 3 мл раствора ДНК соответственно. В 0,5 мл раствора содержалось 35,38 мкг/мл, в 2 мл - 141,5 мкг/мл, в 3 мл - 212,25 мкг/мл ДНК. Четвертая пробирка была контрольной с 10 мл жидкой среды без раствора ДНК. В пробирки вносили по 1 колонии *Bifidobacterium spp.* от пациентов и инкубировали 24 часа при 37° С. Далее содержимое пробирок титруется от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-9</sup> КОЕ/г с последующим высевом на плотную Бифидум-среду (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск). После инкубации

при 37° С в анаэробных условиях в течение 48 часов, подсчитывали число выросших колоний из наибольших разведений. Результат выражали в КОЕ/мл.

Раствор, содержащий 35,38 мкг/мл ДНК, не обладал бифидогенным эффектом, так как количественный уровень испытуемых штаммов не отличался от контроля (без добавления ДНК) ( $p=0,61$ ). Концентрация ДНК 141,5 – 212,25 мкг/мл стимулировала рост и размножение штаммов № 87 и № 88, так как их содержание было в 10 раз выше, чем в контроле ( $p=0,03$ ). Однако, раствор ДНК не влиял на количественный уровень штамма № 85, так как данные по количественному уровню бифидобактерий в опытных пробирках не отличались от контроля ( $p=0,64$ ) (Таблица 28).

Таблица 28 – Количественный уровень, бифидобактерий и условно-патогенных микроорганизмов при культивировании с раствором ДНК (КОЕ/мл)

Микроорга- низмы	Контроль (без раствора ДНК)	Концентрация раствора ДНК (мкг/мл)		
		35,38	141,5	212,25
	КОЕ/мл	КОЕ/мл	КОЕ/мл	КОЕ/мл
<i>Bifidobacterium</i> № 85	$2,5 \times 10^9$	$3 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
<i>Bifidobacterium</i> № 87	$2,5 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$5,5 \times 10^{10}$	$5,5 \times 10^{10}$
<i>Bifidobacterium</i> № 88	$3 \times 10^9$	$4 \times 10^9$	$2,5 \times 10^{10}$	$3 \times 10^{10}$
<i>E. coli lac-</i>	$2 \times 10^8$	$2 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$2 \times 10^8$
<i>S. aureus</i>	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$
<i>C. albicans</i>	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$
<i>E. faecalis</i>	$2 \times 10^9$	$1 \times 10^9$	$2 \times 10^9$	$1 \times 10^9$

Оценка влияния раствора ДНК на условно-патогенные микроорганизмы показала, что выделенный компонент не влияет на количество *E. coli lac-*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis*, так как титры бактерий, зарегистрированные после соинкубирования с ДНК бифидофлоры, не отличались от контроля и составили 8 lg КОЕ/г ( $p=0,73$ ).

На разработанный способ получения бифидогенного фактора получен патент на изобретение РФ № 2553513 от 20.06.2015.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Об изменениях кишечной микрофлоры при ВИЧ-инфекции впервые сообщил А. Gori et al. в 2008 году, при этом уже тогда высказывались предположения об участии микробиоты кишечника в патогенезе заболевания [145]. На сегодняшний день известно, что использование вирусом слизистой кишечника как сайта для репликации ведет уже на стадии инкубации к изменениям кишечного микробиоценоза у ВИЧ-инфицированных пациентов [164]. При этом даже АРТ не восстанавливает нормобиоценоз кишечника у данной категории пациентов [131]. Нарушения в составе кишечной микрофлоры нередко сопровождаются развитием бактериальных оппортунистических инфекций, которые являются фатальными для пациентов на поздних стадиях ВИЧ-инфекции [32, 77, 88]. Кроме того, исследования последних лет свидетельствуют об участии кишечных бактерий в хронической иммунной активации и прогрессировании процесса, вследствие транслокации через слизистую [69, 122, 171]. Есть работы, демонстрирующие участие фекальных микроорганизмов в кинурениновом пути обмена триптофана, продукты распада которого угнетают мукозальный иммунитет ВИЧ-инфицированных [139, 186]. Поэтому, определение роли бифидобактерий, с учетом их свойств в функционировании кишечного микробиома ВИЧ-инфицированных, в обменных процессах аминокислот, является актуальным для оптимизации технологии и инструментов биокоррекции кишечных нарушений, снижающих риски развития вторичных бактериальных инфекций и прогрессирование заболевания.

Цель исследования - определение особенностей жизнедеятельности представителей рода *Bifidobacterium* на основе изучения их функциональных характеристик при взаимодействии с кишечной условно-патогенной микрофлорой у ВИЧ-инфицированных детей.

Программа и план исследования предусматривали изучение структурно-функциональных характеристик бифидобактерий при формировании микробиологических нарушений различной степени тяжести у ВИЧ-инфицированных детей. Для этого с использованием бактериологических, физико-

химических, хроматографических, спектральных методов было запланировано исследование поверхностных свойств клеточных стенок бифидобактерий, их метаболической и антагонистической активности, определение свойств бифидофлоры и микробов-ассоциантов при взаимодействии друг с другом. На животных моделях исследовали противовоспалительную и психотропную активность экзометаболитов бифидобактерий. Также проводили исследование функциональных и технологических характеристик пробиотических штаммов бифидобактерий, их биосовместимости *in vitro* с микрофлорой ВИЧ-инфицированных детей. Оценивали *in vitro* возможности модуляции свойств бифидофлоры при ВИЧ-инфекции с последующей разработкой рекомендаций по коррекции микрoэкологических нарушений у ВИЧ-инфицированных детей.

Материалами служили результаты 163 бактериологических исследований отделяемого кишечника, 852 результата исследования биологических свойств бифидобактерий и УПМ. Для оценки микробиоценозов изучены образцы фекалий 89 ВИЧ-инфицированных детей и 74 лиц группы сравнения. Выделены 1150 кишечных микросимбионтов, идентифицированы до рода 238, до вида 912 культур. Изучены биологические свойства 103 идентифицированных видов бифидобактерий, 16 пробиотических штаммов бифидобактерий, 274 штаммов условно-патогенных бактерий.

При изучении биологических свойств бифидобактерий проведено исследование гидрофобности, аутоагрегации, специфической адгезии, уровня лизоцим- и кислотообразования, распространенности антагонизма по отношению к УПМ, активности антиоксидантных систем и участие бифидобактерий в обмене аминокислот. Определены особенности жирнокислотного состава клеточных стенок, хроматографические особенности липотейхоевых кислот и поверхностных белков бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных. Исследованы частота и уровень экспрессии факторов адгезии, инвазии и токсинообразования стафилококков и энтеробактерий при ВИЧ-инфекции, оценено влияние липаз стафилококков на клеточные мембраны бифидобактерий.

В настоящем исследовании использованы микробиологические (бактериологические, биологические), физико-химические, статистические методы. Для статистического анализа использовали программно-методический комплекс анализа данных IBM SPSS Statistics / PS IMAGO.

С точки зрения экологического подхода по результатам наших исследований микрофлора у ВИЧ-инфицированных детей по индексам Маргалефа и Менхиника не отличалась от микрофлоры детей без ВИЧ-статуса. Большинство же исследователей наоборот свидетельствуют об уменьшении при ВИЧ-инфекции разнообразия фекальной микробиоты, по сравнению с когортой здоровых людей [111, 144, 152]. По моему мнению, данные индексы более наглядны для оценки микробиома, когда с помощью молекулярно-генетических методов получают большой массив информации о качественном составе микрофлоры. При этом у ВИЧ-позитивных детей индекс Симпсона, который учитывает количественное содержание микроорганизмов, был достоверно ниже ( $D=0,33$ ), чем у ВИЧ-негативных детей ( $D=5,1$ ) ( $p=0,001$ ). Это свидетельствует о том, что количественное содержание доминирующей и ассоциативной микрофлоры при ВИЧ-инфекции выравнивается (доминирующей снижается, а ассоциативной повышается). Действительно, соотношение общего количества факультативных анаэробов к облигатным анаэробам у ВИЧ-инфицированных составило 1 : 23, тогда как в группе ВИЧ-негативных детей 1 : 76, т.е. в целом можно судить о снижении количества облигатно-анаэробных бактерий и увеличении титров факультативных анаэробов. Кроме того, индекс Симпсона указывает на то, что кишечная экологическая система у ВИЧ-инфицированных пациентов вследствие ее «выравненности» менее пластична, что предопределяет сложности в коррекции ВИЧ-ассоциированных изменений микрофлоры. Предположение о формировании стойкого патocenоза, который «не реагирует» на воздействие высказывает и Serrano-Villar et al. после неудачных попыток коррекции в течение 6 недель кишечного микробиоценоза ВИЧ-инфицированных пациентов с помощью пребиотика [193].

Оценка кишечного микробиоценоза у ВИЧ-инфицированных детей показала отсутствие в целом различий частоты обнаружения бифидобактерий, по сравнению с группой контроля. Содержание бифидофлоры в среднем составило 9 (8; 10) lg КОЕ/г ( $U=0,29$ ;  $p=0,77$ ). Однако, средние показатели индекса адгезии микроорганизмов (ИАМ) в сравниваемых группах статистически значимо отличались друг от друга ( $U=10,53$ ,  $p=0,0001$ ). Так, ИАМ бифидофлоры у детей с ВИЧ-инфекцией был 2,5 (2,1; 3,2), у относительно здоровых детей группы - 3,2 (2,8; 4,2). Чаще у ВИЧ-позитивных пациентов выделяли бифидобактерии со средней (41,4%) или низкой (39,6%) адгезией. Установлено, что чем выше адгезивная способность бифидобактерий, тем большей численности они достигают (Спирмена,  $\rho=0,52$ ;  $p=0,001$ ). Так как большая часть бифидобактерий у детей с ВИЧ-инфекцией обладали средней и низкой адгезией, их количество в кишечнике снижалось, особенно при усугублении дисбиоза. Таким образом, отличия по специфической адгезии у бифидобактерий у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей позволяют предположить, что при ВИЧ-инфекции бифидобактерии характеризуются либо более низким уровнем экспрессии данных факторов, либо морфологическими изменениями структур, участвующих в адгезивном процессе. При ВИЧ-инфекции у бифидофлоры также отмечали изменение гидрофобности клеточной поверхности, так как данный показатель в популяции бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных была в 3 раза ниже, чем в группе сравнения ( $U=583$ ,  $p=0,0001$ ). Гидрофобность клеточной поверхности определяет бактериально-клеточные и бактериально-бактериальные взаимодействия [168, 175], ее снижение, по некоторым данным, коррелирует со снижением адаптивного потенциала микроорганизмов [109, 146]. Это позволяет говорить, что у ВИЧ-инфицированных детей бифидофлора характеризуется нарушением неспецифической и лиганд-рецепторной адгезии. Нарушения этих свойств у бифидобактерий могут сказываться на взаимодействиях бактерий с клетками иммунной системы, с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами и с друг с другом. Оценка влияния бифидобактерий на мукозальный иммунитет при ВИЧ-инфекции за счет изменения гидрофобности

раскрывает перспективы для дальнейших исследований. Тогда как оценка межбактериальных взаимодействий по показателям аутоагрегации бифидобактерий показала отсутствие в исследуемых группах отличий ( $U=1456$ ,  $p=0,112$ ), так как средние показатели аутоагрегации для бифидофлоры от ВИЧ-инфицированных детей составили  $A=34,41\%$ , для бифидобактерий детей группы сравнения -  $A=39,65\%$ . Это свидетельствует о наличии более сложного механизма взаимодействия клеточных бактериальных поверхностей, нежели только проявления Ван-дер-ваальсовых сил.

Многочисленные исследования демонстрируют увеличение при ВИЧ-инфекции удельного веса и высокую плотность колонизации слизистой представителями семейства *Enterobacteriaceae* [131, 164]. Более того, С. Monaco et al. показали, что *E. coli* способна потенцировать репликацию вируса на клеточных культурах [169]. Наши исследования также демонстрируют, что количественный уровень типичных кишечных палочек у ВИЧ-позитивных детей, хоть и не превышал общепринятые значения нормы, но был выше, чем в группе сравнения в 10 раз и составил  $8 (6; 8) \lg \text{КОЕ/г}$ . У 20,2% детей при ВИЧ-инфекции обнаруживали *E. coli lac-*, у 30,3% - *E. coli Hly+*. Количественные уровни кишечных палочек с измененными свойствами составили  $8 (6; 8) \lg \text{КОЕ/г}$  и  $7 (6; 8) \lg \text{КОЕ/г}$  соответственно, что было выше, чем в группе детей без ВИЧ-статуса ( $U=2,21$ ;  $p=0,03$ ).

Стафилококки – это ведущие этиологические агенты у ВИЧ-инфицированных в развитии вторичных заболеваний органов дыхания, кожи и ее придатков [8, 74, 88], тем не менее, ряд авторов свидетельствует о снижении их количественных уровней в кишечном микробиоценозе у ВИЧ-инфицированных пациентов [174, 164]. Нами установлено, что распространенность носительства стафилококков достигала 102,7 на 100 ВИЧ-инфицированных детей, что было обусловлено выделением 2 и более видов данных бактерий. При этом количественные уровни стафилококков в сравниваемых группах не отличались и достигали  $5 \lg \text{КОЕ/г}$  ( $U=0,05$ ;  $p=0,96$ ). В целом соотношение кокковых и палочковидных форм бактерий у ВИЧ-инфицированных детей составило 1 : 1,5, у

ВИЧ-негативных детей 1 : 1. Таким образом, высокое количественное содержание представителей семейства *Enterobacteriaceae* является маркерным признаком кишечного микробиоценоза при ВИЧ-инфекции.

Наиболее вероятной основой для формирования «энтеробактериально-стафилококкового» типа микробиоценоза при ВИЧ-инфекции является ослабление регулирующего влияния со стороны бифидофлоры. Только 69% культур бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных проявляли антагонизм к факультативно-анаэробной микрофлоре кишечника. В группе сравнения таковых было в 1,5 раза больше. Бифидофлора у ВИЧ-позитивных детей в 2 раза реже вступала в антагонистические взаимоотношения к *S. aureus* и в 3 раза реже с *Klebsiella spp.* При этом распространенность антагонизма бифидофлоры ВИЧ-позитивных детей по отношению к типичной кишечной палочке и с измененными биологическими свойствами, количественные уровни которых достигали высоких значений, не отличались от группы сравнения. Таким образом, высокие количественные уровни энтеробактерий у ВИЧ-инфицированных формируются при сохранении антагонизма со стороны бифидофлоры.

Кислотообразование является одним из факторов антагонизма у бифидобактерий [176, 205]. Снижение кислотно-основного равновесия кишечника изменяет активность ферментов УППМ и в целом их метаболическую активность. При этом создаются благоприятные условия для функционирования других анаэробных бактерий *Propionibacterium spp.*, *Eubacterium spp.* [121, 136]. Следует заметить, что от ВИЧ-инфицированных детей в 6,5 раз чаще выделяются бифидобактерии с низкой кислотообразующей активностью ( $U=12,05$ ,  $p=0,01$ ). Также при ВИЧ-инфекции отмечали снижение способности бифидобактерий к продукции лизоцима. Максимальный титр продуцируемого лизоцима составил 1:4. Чаще лизоцим регистрировали только в исходной культуральной жидкости. Хотя лизоцим преимущественно действует на грамположительных микросимбионтов, тем не менее, его количество определяет в целом активность бифидофлоры и активность иммунной системы [6].

Частота микрoэкологичеcких нарушений кишечника с учетом степени тяжести у ВИЧ-инфицированных детей не отличалась от аналогичного показателя в группе ВИЧ-негативных детей ( $\chi^2=4,32$ ;  $df=2$ ;  $p=0,64$ ). Чаще всего в сравниваемых группах регистрировали дисбиоз кишечника II (41,5-48,6%) степени и III (33,8-43,3%) степени. У детей с ВИЧ-статусом уже при I степени кишечного дисбиоза отмечали снижение титров бифидобактерий до 9 (8; 9) lg КОЕ/г. В группе ВИЧ-негативных пациентов численность бифидофлоры была выше и достигала 10 (9; 11) lg КОЕ/г ( $U=2,54$ ,  $p=0,01$ ). Бифидобактерии от ВИЧ-положительных детей по адгезии, гидрофобности, антиоксидантным свойствам, кислотообразованию не отличались от бифидофлоры детей без ВИЧ-статуса. Однако, уже при начальной стадии микрoэкологичеcких нарушений бифидобактерии при ВИЧ-инфекции не проявляли антагонизма по отношению к УПМ. Видимо поэтому количественные уровни грибов рода *Candida* были достоверно выше, чем в группе сравнения ( $U=2,57$ ,  $p=0,01$ ).

При II степени микрoэкологичеcких нарушений показатели количественных уровней облигатной и факультативной микрофлоры в сравниваемых группах не отличались. Однако регистрировали изменения биологических свойств бифидофлоры у ВИЧ-инфицированных детей. У бифидобактерий от ВИЧ-позитивных детей, по сравнению с ВИЧ-негативными пациентами, отмечали статистически более низкие показатели гидрофобности клеточной поверхности, адгезивной и кислотообразующей способности, антиоксидантных свойств штаммов. Несмотря на то, что частота формирования антагонизма в сравниваемых группах бифидобактерий не отличалась, тем не менее, бифидофлора у ВИЧ-позитивных детей в 1,5 раза реже вступала в антагонистические взаимоотношения с УПМ. Поэтому при II степени микрoэкологичеcких нарушений у ВИЧ-инфицированных детей статистически чаще формируются 4-х компонентные консорциумы из условно-патогенных микроорганизмов ( $\chi^2 =2,4$ ;  $df=1$ ;  $p=0,03$ ) и достоверно реже обнаруживаются 2-х компонентные микробные ассоциации ( $\chi^2=1,1$ ;  $df=1$ ;  $p=0,04$ ).

III степень микрoэкологическxх нарушений кишечника у ВИЧ-инфицированных детей сопровождалась увеличением числа лиц со сниженными титрами бифидобактерий (79,5%), лактобацилл (61,5%), поэтому у них в целом регистрировались достоверно низкие показатели интенсивности колонизации слизистой этими микроорганизмами – 8 и 6 lg КОЕ/г соответственно. Также у них отмечали достоверные более высокие количественные уровни микроорганизмов рода *Staphylococcus* ( $U=2,1$ ,  $p=0,04$ ) и грибов рода *Candida* ( $U=2,38$ ,  $p=0,02$ ). Изменялись и биологические свойства бифидофлоры. Бифидобактерии у ВИЧ-инфицированных имели низкую гидрофобность, тогда как в группе ВИЧ-негативных гидрофобность была в 2 раза выше ( $U=146,5$ ,  $p=0,00$ ). Статистически значимые различия также наблюдали в отношении показателей кислотообразования ( $U=164,5$ ,  $p=0,01$ ) и антиоксидантной защиты ( $U=2,54$ ,  $p=0,01$ ). При этом у бифидобактерий в группе ВИЧ-негативных детей гидрофобность, специфическая адгезия, кислотообразование при III степени дисбиоза не изменялись, а частота антагонизма даже возрастала с 70 до 94%. Вероятнее всего это является проявлением процесса саморегуляции кишечного микробиоценоза, который реализуется путем компенсаторного повышения активности доминантных микросимбионтов. При ВИЧ-инфекции включение компенсаторных механизмов, направленных на стабилизацию микробиоценоза, не наблюдается. Частота антагонизма бифидофлоры снижалась в 2 раза, по сравнению со II степенью дисбиоза ( $\chi^2=1,1$ ;  $df=1$ ;  $p=0,04$ ) и только 12,8% штаммов бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных проявляли антагонизм по отношению к УПМ. Таким образом, у ВИЧ-инфицированных детей при III степени микрoэкологическxх нарушений создаются благоприятные условия для формирования многокомпонентных микробных ассоциаций, что связано с низким количественным уровнем бифидобактерий, изменением их биологических свойств и низкой частотой антагонизма по отношению к УПМ. При этом у ВИЧ-позитивных детей преобладали бактериально-грибковые микробные ассоциации (61,4%), у лиц без ВИЧ-статуса в 52% случаев формировались бактериально-бактериальные ассоциации. Также у ВИЧ-инфицированных в 5 раз чаще



обнаруживали пятикомпонентные микробные консорциумы УПМ ( $\chi^2 = 9,5$ ;  $df=1$ ;  $p=0,004$ ).

Установлена разная частота формирования микрoэкологических нарушений кишечника у пациентов с учетом стадии ВИЧ-инфекции. Уже при 2 Б стадии ВИЧ-инфекции в 45,1% и в 41,1% случаев у пациентов регистрируются II и III степени дисбиоза. При 2 В стадии частота микрoэкологических нарушений III степени возрастает в 1,7 раза и составляет уже 68,4%. Интересными являются данные по микрофлоре у пациентов с 3 стадией ВИЧ-инфекции. Микрофлора кишечника, по нашим данным, в этой стадии «улучшается». В большинстве случаев на 3 стадии ВИЧ-инфекции регистрировали дисбиоз II степени (53%), у 23,1% детей микрoэкологические нарушения соответствовали I степени. По данным литературы, в этот период протекания ВИЧ-инфекции отмечают снижение темпов нарастания иммунодефицита за счет избыточного воспроизводства клеток CD4+, а также снижение скорости репликации ВИЧ [58, 91]. В связи с тем, что микрофлора чутко реагирует на любые изменения иммунного статуса, поэтому «улучшение» иммунологических показателей у ВИЧ-инфицированных пациентов приводит к оптимизации кишечного микробиоценоза. В этот период у ВИЧ-позитивных детей отмечали увеличение титров и частоты колонизации слизистой бифидобактериями, снижение частоты колонизации и количественных уровней гемолизинпродуцирующих эшерихий, стафилококков и грибов рода *Candida*. Однако, при 4 стадии ВИЧ-инфекции снова возрастает до 50,5% частота дисбиотических нарушений кишечника II степени, до 37,5% - III степени. Таким образом, дети со 2 и 4 стадией ВИЧ-инфекции являются группой риска по развитию оппортунистических инфекций бактериальной и грибковой этиологии, что связано с высокой частотой колонизации и количественными уровнями УПМ в кишечном микробиоценозе.

Изменение, в первую очередь, поверхностных свойств бифидобактерий в микробиоценозе ВИЧ-инфицированных предопределяет необходимость исследования молекулярных основ гидрофобности штаммов. Установлено, что у низкогидрофобных культур бифидобактерий, которые преобладают у ВИЧ-

инфицированных детей, отмечается низкое содержание в составе поверхностных липопротеинов омыляемых жиров и их производных. В составе мембран у таких культур регистрируется снижение в 2 раза, по сравнению с высоко и среднегидрофобными штаммами, общего содержания жирных кислот, отсутствие или снижение количества метилразветвленных жирных кислот и снижение в 3 раза содержания ненасыщенных жирных кислот. Кроме того, ЛТК бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных детей, а точнее липидный компонент данного полимера, не имеет в своем составе ненасыщенных жирных кислот, что также сказывается на гидрофобности штаммов. Поэтому клеточная стенка бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных характеризуется как «жесткая», ригидная структура. А от ее физико-химического состояния зависят рост и размножение бифидобактерий, обмен и транспорт веществ, чувствительность к токсинам и ферментам УПМ [4, 112, 114].

В настоящее время кишечный микробиоценоз рассматривают с точки зрения симбиологии, где все участники симбиоза активно взаимодействуют друг с другом [17, 215]. В связи с этим изменение биологических свойств бифидобактерий при разных степенях дисбиоза необходимо рассматривать с точки зрения их взаимодействия с микробами-ассоциантами. Нужно отметить, что, по нашим данным, в 64% случаев в состав ассоциаций у ВИЧ-инфицированных входят грибы рода *Candida*, в 68% случаев – представители семейства *Enterobacteriaceae* и в 84% случаев микроорганизмы рода *Staphylococcus*. В большей степени на жирнокислотный состав клеточной поверхности будут влиять ферменты микроорганизмов из группы липаз. Все вышеназванные УПМ продуцируют липазы, но наибольшее количество данных ферментов синтезируют стафилококки. Липазная активность у стафилококков, полученных от ВИЧ-позитивных детей, составила 39,49 Е/л, в группе сравнения *Staphylococcus spp.* выделяли липазу на уровне 18,69 Е/л ( $U=2,56$ ,  $p=0,01$ ). Установлено, что липазу особенно активно выделяют стафилококки, имеющие низкую или среднюю способность к лиганд-рецепторной адгезии. Они используют липазу для восполнения недостатка структурных адгезинов.

Учитывая высокую распространенность стафилококков в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей и высокие показатели синтеза, воздействие липаз на бифидофлору будет наблюдаться у большинства ВИЧ-инфицированных пациентов. В связи с этим, мы провели исследование по оценке *in vitro* воздействия липаз *S. aureus* на клеточные стенки бифидобактерий.

Установлено, что чувствительность разных видов бифидобактерий к липазам стафилококков и реакция на это воздействие отличались. Так клеточная мембрана интактных культур со средней и низкой гидрофобностью характеризовалась преобладанием насыщенных жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой). У среднегидрофобных штаммов длинноцепочечных жирных кислот ( $C_{16} - C_{22}$ ) было в 4 раза меньше, чем у высокогидрофобных бифидобактерий. Все это говорит о «жесткости» мембраны и низкой ее гидрофобности. Однако, рассматривать данный факт только с точки зрения негативных последствий для макро- микроорганизма нельзя, так как, этот вариант жидкокристаллического состояния клеточной мембраны может способствовать устойчивости бактерий к воздействию мембранных токсинов и ферментов, выделяемых УПМ. У высокогидрофобного штамма в составе мембраны преобладали ненасыщенные жирные кислоты (олеиновая, линолевая), при чем в 73,2% случаев это были изоформы жирных кислот, что обуславливает пластичность и текучесть клеточной мембраны. Различия в количестве жирных кислот у бифидобактерий с разной гидрофобностью были значимы ( $\chi^2=115,6$ ,  $df=18$ ,  $p=0,0003$ ). Установлено, что после контакта бифидобактерий с липазами стафилококков структура жирных кислот изменялась только у высокогидрофобных культур, которые характеризовались наличием пластичной клеточной мембраны ( $\chi^2=121,3$ ,  $df=19$ ,  $p=0,0004$ ). Это демонстрирует гомеофазовую адаптацию штаммов, которая является реакцией на неблагоприятное воздействие со стороны микробов-ассоциантов. У бифидобактерий снижается разнообразие жирных кислот, чаще определяются предельные жирные кислоты. В составе липидов увеличивается в 4,6 раз содержание стеариновой ( $C 18:0$ ), в 1,5 раза пальмитиновой ( $C 16:0$ ) кислот, уменьшается в 10 раз масса непредельной олеиновой кислоты ( $C 18:1$ ). У

средне- и низкогидрофобных бифидобактерий мембрана отличалась устойчивостью к липазам *S. aureus*, так как изменения в составе жирных кислот после обработки данными ферментами отсутствовали ( $\chi^2=30,5$ ,  $df=21$ ,  $p=0,6$ ). Учитывая доказанное участие нормофлоры в различных видах обмена, в том числе в обмене липидов [89, 205], полученные данные о состоянии жирнокислотного состава клеточных стенок бифидобактерий являются перспективными для дальнейшей работы с целью уточнения механизмов развития «Вастинг-синдрома» и атеросклероза у ВИЧ-инфицированных. Однако, полученные результаты также позволяют объяснить изменение биологических свойств бифидобактерий при различных степенях дисбиоза и высокой частоте вегетирования УПМ. До взаимодействия с липазами золотистых стафилококков высокогидрофобные культуры характеризовались высокой адгезивной активностью и высокой способностью к аутоагрегации. После воздействия липолитических ферментов в 2 раза снизилась аутоагрегация и в 1,5 раза гидрофобность клеточной поверхности. Более устойчивы к воздействию липаз были культуры, имеющие средние показатели гидрофобности и аутоагрегации. Вследствие низкого содержания ненасыщенных и длинноцепочечных жирных кислот нивелируется мишень для воздействия липаз стафилококков. Поэтому после обработки средне- и низкогидрофобных культур экзометаболитами стафилококка аутоагрегация ( $U=0,71$ ,  $p=0,47$ ) и гидрофобность культур статистически значимо не изменялись ( $U=1,36$ ,  $p=0,17$ ). Из вышесказанного следует два практических вывода. Для поддержания оптимального состояния поверхностных свойств бифидобактерий необходимо проводить селективную деконтаминацию кишечника, направленную на удаление или снижение количества продуцентов липаз. Использование средств, влияющих на поверхностные свойства бифидобактерий, целесообразно только после проведения селективной деконтаминации.

Выделяемые токсины, ферменты УПМ воздействуют не только на микробную популяцию, точкой их приложения могут быть ткани макроорганизма. Действительно, литературные данные свидетельствуют о том,

что условно-патогенная флора кишечника в 10% случаев становится причиной возникновения вторичных бактериальных инфекций [8, 165]. В связи с этим, данные о распространенности и уровнях экспрессии факторов вирулентности бактерий при ВИЧ-инфекции необходимы для оценки рисков развития у них оппортунистических инфекций. Исследования не выявили различий в распространенности и уровнях экспрессии таких факторов вирулентности энтеробактерий и стафилококков как специфическая адгезия, продукция гемолизина, ДНКазы. Однако, установлено, что у ВИЧ-позитивных детей стафилококки в 76% случаев продуцируют липазы. Уровень экспрессии липаз стафилококками при ВИЧ-инфекции был в 2 раза выше, чем у ВИЧ-негативных детей ( $U=2,56$ ,  $p=0,01$ ). Стафилококки продуцировали в большом количестве не только липазу, но и ДНКазу. В связи с этим относительный риск транслокации стафилококков у ВИЧ-позитивных детей составил суммарно 4 ( $RR_{\text{ДНКазы}}=1,9$  и  $RR_{\text{липаза}}=2,1$ ), т.е. в 4 раза выше, чем в группе детей без ВИЧ-статуса.

Метаболизм нормальной микрофлоры кишечника является важной частью различных видов обмена веществ человека [43, 68, 120, 201]. В связи с этим любые изменения в метаболизме микрофлоры ведут к развитию у человека дисметаболического синдрома, который лежит в основе таких заболеваний как сахарный диабет, ожирение, атеросклероз [67, 107, 179]. У ВИЧ-инфицированных людей снижение массы тела и нарушение в различных видах обмена является типичным проявлением заболевания, особенно в 4 стадии ВИЧ-инфекции. Немногочисленные исследования микрофлоры у ВИЧ-инфицированных демонстрируют изменение в 173 генах, отвечающих за энергетический метаболизм и обмен аминокислот [132, 193]. По данным литературы, у кишечной микробиоты при ВИЧ-инфекции снижено количество активных генов, ответственных за обмен серина, глицина, гистидина, треонина, а также фенилаланина, пролина, лизина [193]. Изучение особенностей аминокислотного обмена у бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей было целью данного этапа работы.

В целом исследования показали, что метаболическая активность бифидофлоры у ВИЧ-инфицированных детей была выше, чем у детей без ВИЧ-статуса. Количественное содержание аминокислот в гидролизате бифидофлоры от ВИЧ-инфицированных было в 1,6 раза больше ( $U=2,4$ ,  $p=0,04$ ), а в составе экзометаболитов в 3 раза больше, чем у детей группы сравнения ( $U=2,86$ ,  $p=0,001$ ). Если принимать во внимание данные о снижении в целом метаболической активности микрофлоры у ВИЧ-инфицированных пациентов, то можно говорить, что бифидофлора «пытается урегулировать» дисметаболические процессы, в частности обмен аминокислот.

Проведенные исследования показали, что у бифидобактерий при ВИЧ-инфекции снижен обмен глицина, что согласуется с литературными данными о снижении числа генов и ферментов обмена данной аминокислоты. Дело в том, что глицин был обнаружен только в составе клеток бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных, но данная аминокислота отсутствовала в составе экзометаболитов, т.е. синтеза в окружающую среду не происходило. Глицин является аминокислотой, участвующей в построении пентаглициновых мостиков пептидогликана у грамположительных бактерий. Видимо, поэтому она обнаружена в клеточном гидролизате бифидобактерий как ВИЧ-позитивных, так и ВИЧ-негативных пациентов. Но если в группе ВИЧ-отрицательных детей глицин в равных количествах регистрировали как в клеточном гидролизате, так и в экзометаболитах бифидобактерий, то в экзометаболитах у ВИЧ-позитивных детей глицин отсутствовал.

Отмечали активное участие бифидофлоры ВИЧ-инфицированных в обмене серина. Его содержание в экзометаболитах составляло 68% от массы аминокислот, продуцируемых бифидобактериями при ВИЧ-инфекции. Высокие показатели продукции серина обуславливают высокие его соотношения в клетках и в экзометаболитах бифидофлоры у ВИЧ-инфицированных (1:10), по сравнению с бифидобактериями от ВИЧ-негативных детей (1:2). Возможно, такая активная продукция серина бифидобактериями является компенсаторной реакцией на снижение интенсивности обмена белков у ВИЧ-инфицированных пациентов, а

белки это и ферменты, и иммуноглобулины. Кроме того, если учитывать снижение у бактерий числа генов энергетического обмена, то образование из серина пировиноградной кислоты, которая распадается в цикле трикарбоновых кислот, будет способствовать поддержанию синтеза высокоэнергетических соединений. Содержание треонина как в клетках, так и в экзометаболитах не превышало 3,5 мкг/мл, однако уровень продукции треонина бифидобактериями от ВИЧ-негативных детей был в 7 раз ниже. Таким образом, полученные данные указывают на значительный вклад бифидобактерий в поддержание обмена серина и треонина у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Анализируя метаболиты кишечной микрофлоры, S. Serrano-Villar et al. показали наличие низких количеств пролина, фенилаланина и лизина в копрофильтратах ВИЧ-инфицированных [193]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что бифидобактерии при ВИЧ-инфекции характеризуются высокой активностью выделения данных аминокислот, так как в составе экзометаболитов содержание фенилаланина и пролина было в 6 раз выше, а лизина в 18 раз выше, чем у ВИЧ-негативных детей. Также при ВИЧ-инфекции был повышен метаболизм серосодержащей аминокислоты цистеина. Именно с ней связывают антиоксидантную активность бифидобактерий. Установлено, что в экзометаболитах бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных пациентов содержание цистеина было в 2 раза больше, чем в клеточном гидролизате. Это согласуется с данными о том, что экзометаболиты некоторых видов бифидобактерий обладают более выраженными антиоксидантными свойствами, чем клеточный гидролизат. При этом количество цистеина в клетках и в экзометаболитах бифидобактерий от ВИЧ-позитивных детей было выше, чем в группе сравнения, у которых цистеин регистрировали в следовых количествах.

Бифидобактерии у ВИЧ-инфицированных являются также активными продуцентами триптофана. В экзометаболитах бифидобактерий, изолированных из кишечника ВИЧ-инфицированных детей, содержалось в 7 раз выше триптофана, а в клеточном гидролизате - в 6 раз выше триптофана, чем в группе сравнения. По данным литературы, у ВИЧ-инфицированных пациентов

регистрируют усиленный распад триптофана по кинурениновому пути, за счет фермента ИДО-1, продуцируемого макрофагами и дендритными клетками [130, 139, 154]. Поэтому можно предположить, что высокие уровни синтеза триптофана бифидобактериями у ВИЧ-инфицированных направлены на восполнение его недостатка. В литературе существуют предположения, что кишечные бактерии могут влиять на количество продуктов распада триптофана в кишечнике, тем самым, уменьшая или усиливая их влияние на слизистую оболочку и на иммунную систему ВИЧ-инфицированных. Это связывают с наличием у микроорганизмов генов, кодирующих гомологи ферментов кинуренинового пути [171]. Наши исследования показали, что как в клеточном гидролизате, так и в экзометаболитах бифидобактерий содержались кинуренин и его производные, что свидетельствует о том, что бифидобактерии участвуют в катаболизме триптофана. При этом у ВИЧ-инфицированных детей количество кинуренина в клетках и в экзометаболитах было практически одинаковым. Содержание кинуренина в экзометаболитах бифидобактерий здоровых детей не отличалось от аналогичного показателя при ВИЧ-инфекции. Однако, в составе клеточного гидролизата бифидобактерий у ВИЧ-отрицательных детей содержание кинуренина было в 4 раза больше, чем у ВИЧ-инфицированных. Можно сделать вывод, что бифидобактерии у ВИЧ-инфицированных активно продуцируют триптофан, восполняя его недостаток, связанный с активизацией его распада. В то же время способность бифидобактерий при ВИЧ-инфекции влиять на уровень кинуренина в кишечнике путем накопления его в клетках снижена, что раскрывает дальнейшие перспективы по изучению роли бифидофлоры в патогенезе ВИЧ-инфекции, которые должны быть направлены на определение механизмов нарушений аккумуляции кинуренина в самих бифидобактериях. С другой стороны, это делает актуальным поиск штаммов и разработку пробиотиков специально для ВИЧ-инфицированных пациентов на основе штаммов бифидобактерий, обладающих способностью накапливать токсические продукты распада триптофана по кинурениновому пути.



Активное участие бифидобактерий в синтезе аминокислот, в том числе - нейроактивных и/или предшественников нейромедиаторов позволяет объяснить некоторые механизмы формирования психологических особенностей ВИЧ-инфицированных пациентов. Показано, что экзометаболиты штамма, продуцирующего большое количество глицина, оказывали выраженный седативный эффект. Штамм, продуцирующий большое количество глутаминовой кислоты, обладал «антистрессорным» эффектом. Штамм бифидобактерий с высокой продукцией глутаминна, вызывал выраженное возбуждающее действие на ЦНС животных.

О высокой метаболической активности бифидобактерий при ВИЧ-инфекции свидетельствует выделение экзометаболитов, которые опосредуют противовоспалительный эффект. Бифидофлора у ВИЧ-инфицированных детей оказывает от умеренного до превосходящего диклофенак противовоспалительное действие. При этом противовоспалительная активность метаболитов бифидобактерий имеет штаммовую специфичность и не зависит от стадии ВИЧ-инфекции и вида микроорганизмов.

Таким образом, результаты исследований показывают, что нормализация количественных и функциональных характеристик бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных пациентов необходима для:

- снижения количественных уровней УПМ и экспрессии факторов вирулентности, т.е. для снижения рисков развития оппортунистических инфекций;
- нормализации мукозального иммунитета у пациентов с ВИЧ-статусом, что связано с возможностью накопления продуктов обмена триптофана в клеточной массе бифидобактерий, для снижения темпов прогрессирования заболевания;
- нивелирования дисметаболического синдрома, обусловленного снижением числа генов энергетического и аминокислотного обмена у микробиоты в целом.

Нормализация количественных уровней бифидофлоры требуется на всех стадиях ВИЧ-инфекции, но прежде всего у лиц с 2 В стадией ВИЧ-инфекции, так как у них отмечается наиболее выраженный дефицит бифидофлоры.

Нормализацию количественного содержания чаще всего проводят с помощью экзогенных коммерческих штаммов. При этом важной задачей является нивелировать у ВИЧ-инфицированных эффектов «пробиотик против микрофлоры хозяина» или «микрофлора хозяина против пробиотика». Были исследованы биологические свойства (аналогичные тем, которые определяли у фекальных изолятов) пробиотических штаммов бифидобактерий, выделенных из коммерческих биопрепаратов. Установлено, что они характеризовались средними показателями специфической адгезии, низкой или средней гидрофобностью. Кислотообразование регистрировали от низких до высоких значений ( $75^0$  Т -  $230,3^0$  Т). Штаммы и консорциумы обладали различным спектром антагонистической активности, которая характеризовалась антибактериальной и/или противогрибковой направленностью. Все коммерческие штаммы бифидобактерий не обладали уреазной, протеолитической, ДНКазной и липазной активностью, т.е. были безопасными с точки зрения возможной транслокации через слизистую. Полученные данные о функциональных и антагонистических свойствах некоторых пробиотических бифидобактерий важны для оптимизации выбора пробиотиков для ВИЧ-инфицированных. Однако, оценка свойств биосовместимых штаммов показала, что уровень экспрессии факторов адгезии и гидрофобности у коммерческих штаммов должен быть сходным или не должен превышать аналогичные характеристики у штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных. Тогда будет устранен эффект «пробиотик против микрофлоры». Для нивелирования ситуации «микрофлора против пробиотического штамма» целесообразно использовать пробиотические штаммы, имеющие высокие показатели кислотообразования.

Показано, что у ВИЧ-инфицированных детей отмечается не только снижение популяционного уровня бифидофлоры, но и изменение поверхностных и антиоксидантных свойств клеток при их взаимодействии с условно-патогенными микроорганизмами. В связи с этим определены группы веществ для коррекции биологических свойств бифидобактерий – это антиоксиданты и мембранопротекторы. Эти свойства одновременно сочетает в себе

этилметилгидроксипиридин сукцинат. При добавлении данного антиоксиданта в питательную среду с культурами бифидобактерий, имеющими низкую активность противокислородной защиты, происходит инактивация токсических форм кислорода, что обеспечивает оптимальные условия для роста и размножения бифидобактерий и они достигают более высокого количественного уровня, чем в среде без антиоксиданта. Кроме того, этилметилгидроксипиридина сукцинат модулирует поверхностные свойства бифидобактерий, что обусловлено наличием у него защитного действия на липиды клеточных мембран и возможности влияния на вязкость мембранных структур. У испытуемых штаммов бифидобактерий в клеточной стенке увеличивается в 2 раза общее содержание и масса ненасыщенных жирных кислот. Очевидно, что препарат стимулирует анаэробный путь синтеза ненасыщенных жирных кислот у бифидобактерий, что связано с активизацией специфических мембранных ферментов при пониженном парциальном давлении кислорода [89]. В итоге увеличивается в 2 раза гидрофобность клеточной поверхности бифидофлоры, которая является показателем неспецифической адгезии бактерий. Кроме того, в 4 раза увеличивается аутоагрегация и создаются благоприятные предпосылки для восстановления бактериальной биопленки на слизистой кишечника при ВИЧ-инфекции.

При всех благоприятных эффектах этилметилгидроксипиридина сукцинат оказывает побочное действие на бифидобактерии, он снижает специфическую адгезию штаммов. Это обусловлено его неконкурентным связыванием с поверхностными белковыми структурами бактериальной клетки.

По данным литературы, лизоцим оказывает бифидогенный эффект, который реализуется за счет стимуляции адгезии у бифидобактерий [3]. Добавление в питательную среду лизоцима действительно увеличивает специфическую адгезию штаммов, но не более чем на 10%. При этом механизм активации адгезивных факторов под влиянием лизоцима до сих пор не ясен. Однако, установлено, что добавление лизоцима к этилметилгидроксипиридину сукцинату позволяет нивелировать эффект снижения лиганд-рецепторной адгезии бифидобактерий,

которое наблюдалось при использовании антиоксиданта с мембранопротекторными свойствами в моновиде.

Таким образом, модуляция поверхностных свойств бифидобактерий при ВИЧ-инфекции позволяет восстановить популяционный уровень бифидобактерий и оптимизировать межбактериальные взаимодействия посредством изменения гидрофобности. В качестве инструментов для коррекции целесообразно использовать средства, обладающие антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами.

Использование этилметилгидроксипиридина сукцината у штаммов с низкими значениями гидрофобности и аутоагрегации способствует снижению вязкости мембраны за счет стимуляции у бактерий синтеза ненасыщенных жирных кислот. Антиоксидантные свойства этилметилгидроксипиридина сукцината также обеспечивают снижение токсического действия активных форм кислорода на клеточные стенки бифидобактерий.

**Резюме:** Исследование показало, что при ВИЧ-инфекции происходит формирование специфического биофилья бифидобактерий, характеризующегося снижением их регулирующего воздействия на толстокишечный микробиоценоз. В результате нарушения у бифидобактерий аутоагрегации, адгезивных свойств, продукции органических кислот и лизоцима, антиоксидантных свойств в кишечном микробиоценозе формируются многокомпонентные ассоциации условно-патогенной микрофлоры, включающие стафилококков, энтеробактерий, грибов рода *Candida*. Микробы-ассоцианты обладают высоким уровнем продукции факторов инвазии. Это обуславливает у ВИЧ-инфицированных пациентов, с одной стороны, повышение рисков транслокации кишечной микрофлоры через слизистую, с другой стороны, изменение жирнокислотного состава мембран и поверхностных свойств бифидофлоры.

Выявлен существенный вклад бифидобактерий в поддержании метаболизма аминокислот у ВИЧ-инфицированных детей. Патогенетически важным при ВИЧ-инфекции является участие бифидобактерий в продукции

триптофана и его катаболизме по кинурениновому пути. Штаммы бифидобактерий, изолированные из кишечного микробиоценоза ВИЧ-инфицированных детей, характеризуются высоким уровнем продукции триптофана и низкой аккумуляцией кинуренина в составе клеток. Характер действия экзометаболитов бифидобактерий определяется видовой и штаммовой специфичностью.

Рекомендованы подходы в коррекции кишечного микробиоценоза у ВИЧ-инфицированных детей, основанные на персонифицированном выборе пробиотических штаммов для восстановления количественного содержания бифидобактерий и/или модуляции их биологических свойств. В качестве средств, корректирующих биофиль бифидобактерий, предложены мембранопротекторы и антиоксиданты. Полученные результаты исследований дают основание сделать выводы и дать рекомендации, реализация которых на практике позволит улучшить качество жизни ВИЧ-инфицированных пациентов.

**ВЫВОДЫ:**

1. Кишечный микробиоценоз ВИЧ-инфицированных детей характеризуется низкой частотой обнаружения и уровнями лактобацилл (77,5% и 6 (6; 8) lg КОЕ/г), высокой частотой и численностью *E.coli lac*- (20,2%, 8 (6; 8) lg КОЕ/г), *E.coli hly*+ (30,3%, 7 (6; 8) lg КОЕ/г) и *Candida spp.* (69,7%, 5 (3; 6) lg КОЕ/г) при содержании бифидобактерий 9 (8; 10) lg КОЕ/г. У 25% ВИЧ-инфицированных детей в кишечнике обнаруживаются два и более видов стафилококков. Группами риска по возникновению микрoэкологических нарушений кишечника III степени являются дети со 2 и 4 стадиями ВИЧ-инфекции.
2. Бифидобактерии у ВИЧ-инфицированных детей имеют низкую адгезию (ИАМ=2,5,  $p=0,001$ ), гидрофобность ( $H=19,8\%$ ,  $p=0,0001$ ), кислотообразование ( $70^0$  T,  $p=0,01$ ), антиоксидантную активность (АОА=1,7,  $p=0,004$ ), что свидетельствует о формировании специфического био профиля бифидофлоры. При II и III степенях дисбиоза кишечника функциональная недостаточность бифидофлоры нарастает и сопровождается формированием четырех- ( $p=0,03$ ) и пятикомпонентных ( $p=0,004$ ) микробных ассоциаций у 24,3% и 20,5% детей соответственно.
3. При кишечном дисбиозе у ВИЧ-инфицированных детей только 69% бифидобактерий формируют антагонистический тип связей, в 31% случаев они проявляют нейтрализм к кишечным микросимбионтам, что ведет к росту содержания условно-патогенной микрофлоры. Статистически реже бифидобактерии проявляют антагонизм к *S. aureus* и ( $p=0,04$ ), к *K. pneumoniae* ( $p=0,01$ ), поэтому у ВИЧ-инфицированных детей доминирует энтеробактериально-стафилококковый тип микробных ассоциаций.
4. Продуцентами липаз в кишечнике ВИЧ-инфицированных детей являются 13,2% энтеробактерий ( $p=0,67$ ) и 76% стафилококков ( $p=0,02$ ), ДНКазу синтезируют 22,7% *Staphylococcus spp.* ( $p=0,89$ ). Высокий уровень продукции факторов инвазии условно-патогенными микроорганизмами обуславливает относительно высокие риски транслокации бактерий через

слизистую кишечника RR=1,9 (95% ДИ=1,1-2,8) - 2,1 (95% ДИ=1,5-3,2), что дополняет сведения о вкладе кишечной микрофлоры в развитие вторичных инфекций у пациентов с ВИЧ-статусом.

5. Под влиянием липаз стафилококков у бифидобактерий в клеточной стенке в 7 раз снижается содержание непредельных жирных кислот, в 1,5 раза – жирных кислот со средней длиной цепи, снижается разнообразие жирнокислотного состава липидов, что приводит к уменьшению в 2 раза аутоагрегации ( $p=0,001$ ), в 1,5 раза гидрофобности ( $p=0,02$ ) и предопределяет необходимость проведения селективной деконтаминации условно-патогенных микроорганизмов для уменьшения интенсивности их воздействия на бифидобактерии.
6. Активность синтеза аминокислот бифидобактериями у ВИЧ-инфицированных детей в 2,4 раза выше, чем в группе сравнения ( $p=0,001$ ). Бифидобактерии характеризуются активной продукцией серина, пролина, лизина, фенилаланина, что демонстрирует симбиотические связи бифидофлоры с макроорганизмом и определяет необходимость поддержания их численности у ВИЧ-позитивных пациентов. *Bifidobacterium spp.* продуцируют триптофан и участвуют в его катаболизме по кинурениновому пути, что позволяет рассматривать их как микросимбионтов, влияющих на течение ВИЧ-инфекции.
7. Обоснованы два направления коррекции бифидофлоры у ВИЧ-инфицированных детей, направленные на восстановление содержания бифидобактерий на основе индивидуального подбора биосовместимых пробиотических штаммов и устранение у бифидобактерий функциональной недостаточности, обусловленной изменением поверхностных свойств и антиоксидантной активности. В качестве средств для коррекции биологических свойств бифидобактерий целесообразно использовать препараты с антиоксидантным и мембранопротекторным действием.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При изучении микробиоценоза кишечника у ВИЧ-инфицированных пациентов рекомендуется исследование количественного содержания бифидобактерий и уровня активности биологических факторов, определяющих их колонизационную и антагонистическую способность (гидрофобность, специфическую адгезию, аутоагрегацию, кислотообразование, антиоксидантную активность, антагонизм), что позволяет определить тактику и средства коррекции микробиологических нарушений у данной категории пациентов.
2. При выделении из кишечного микробиоценоза детей со 2 и 4 стадией ВИЧ-инфекции стафилококков целесообразно определять уровень продукции липаз, что позволит оценить риск транслокации кишечной микрофлоры через слизистую кишечника и прогнозировать направления изменений поверхностных свойств и жирнокислотный состав клеточных стенок бифидобактерий. Селективная деконтаминация условно-патогенных бактерий может рассматриваться как способ нивелирования функциональной недостаточности бифидобактерий, так как устраняет действие на них липаз условно-патогенных микроорганизмов.
3. Индивидуальный выбор пробиотического препарата для ВИЧ-инфицированного ребенка предполагает: выделение бифидобактерий и других представителей кишечного биотопа, идентификацию микробов, изучение биологических свойств бифидобактерий (гидрофобности, специфической адгезии, кислотообразования, типа взаимоотношений с условно-патогенными бактериями) у конкретного пациента; выбор пробиотических штаммов с учетом видового состава бифидофлоры пациента, с последующим исследованием его биологических свойств (тех же, что и у фекальных изолятов); выбор пробиотических культур на основе полученных результатов с учетом нарушенных функциональных характеристик фекальных бифидобактерий; определение биосовместимости



*in vitro* фекальных изолятов бифидобактерий и выбранных пробиотических штаммов.

4. Для устранения возможности реализации феномена «пробиотик против микрофлоры хозяина» уровень экспрессии факторов адгезии и гидрофобности коммерческих бифидобактерий не должен превышать аналогичные характеристики у штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных детей. Для нивелирования ситуации «микрофлора хозяина против пробиотического штамма» целесообразно использовать пробиотические штаммы, имеющие более высокие показатели кислотообразования, чем у бифидобактерий пациента.
5. Биомишенями внешнего модулирующего воздействия на бифидобактерии при ВИЧ-инфекции являются антиоксидантная система и поверхностные свойства бактериальной клетки. В связи с этим в схемах коррекции микрoэкологических нарушений у ВИЧ-инфицированных целесообразно использовать антиоксиданты и мембранопротекторы. Данный подход можно использовать как универсальный для нормализации микробиоценоза при других патологических состояниях.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Необходим анализ генетических детерминант и биологических свойств разнообразных видов бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных пациентов с разным статусом – иммунологических «молчунов», «элитных контроллеров», долгосрочных «неответчиков» для определения микробных факторов, влияющих на течение ВИЧ-инфекции.

Перспективны исследования особенностей углеводного обмена у бифидобактерий при ВИЧ-инфекции в зависимости от типа микробиоценоза и стадии заболевания для поиска пребиотических компонентов и разработки препаратов и БАДов для коррекции микрофлоры ВИЧ-инфицированных.

Необходимы продольные исследования для оценки способности разных видов пробиотических бифидобактерий снижать темпы прогрессирования ВИЧ-инфекции. Требуется разработка схем и определение длительности приема пробиотиков при ВИЧ-инфекции с последующей оценкой эффективности пробиотикотерапии у пациентов с разными стадиями ВИЧ-инфекции. Также необходимо проводить поиск новых штаммов бифидобактерий, способных накапливать кинуренин и снижать его содержание в кишечнике, что может быть основой для создания пробиотических препаратов для ВИЧ-инфицированных пациентов.

Целесообразен дальнейший поиск средств и методов модуляции биологических свойств доминантных микросимбионтов, как способ управления всем кишечным микробиоценозом у ВИЧ-инфицированных.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АРТ	– антиретровирусная терапия
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГОС	– галактоолигосахариды
ГХ-МС	– газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
ДК	– дендритная клетка
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДПК	– двенадцатиперстная кишка
ИДО-1	– индоламин-2,3-диоксигеназа 1
ИК-ФТ	– инфракрасный Фурье-спектрометр
ИНФ	– интерфероны
ЛПС	– липополисахарид
ЛТК	– липотейхоевые кислоты
МДК	– миеломные дендритные клетки
ОРВИ	– острые респираторные вирусные инфекции
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СКВ	– системная красная волчанка
СРК	– синдром раздраженного кишечника
УПМ	– условно-патогенная микрофлора
ТСХ	– тонкослойная хроматография
ФОС	– фруктоолигосахариды
х.ч.	– химически чистый
ЦНС	– центральная нервная система
CD	– Cluster of differentiation, кластер дифференцировки
CDAD	– Clostridium difficile associated diarrhea, Clostridium difficile – ассоциированная диарея
CDC	– Centers for Disease Control and Prevention, Центры по контролю и профилактике заболеваний
CSH	– Cell surface hydrophobicity, гидрофобность поверхности клеток
FOXP3	– Forkhead box P3, разъединяющий белок-коробка 3
IL	– Interleukin, интерлейкин
RR	– Relative risk, относительный риск
SEM	– Standart error of the mean, стандартная ошибка среднего
SIV	– Simian immunodeficiency viruses, вирусы иммунодефицита обезьян
TGF- $\beta$	– Transforming growth factor beta, трансформирующий фактор роста бета
Th	– T-helper, T-помощник
TLR	– Toll- like receptor, Толл-подобный рецептор
Treg	– regulatory T-cell, регуляторные T-лимфоциты

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аверина, О.В. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы / О. В. Аверина, В. Н. Даниленко // Микробиология. – 2017. – № 1 (86). – С. 5-24.
2. Алешкин, В. А. Микробиоценоз кишечника / В. А. Алешкин, А. В. Алешкин, С. С. Афанасьев, А. В. Караулов, Е. А. Воропаева, М. С. Афанасьев, Ю. В. Несвижский, Е. О. Рубальский // Вопр. диетологии. – 2015. – № 4 (5). – С. 15–52.
3. Алешкин, В. А. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника: Федеральные клинические рекомендации / В. А. Алешкин, Е. П. Селькова А. М. Затевалов, А. Ю. Миронов, А. Л. Волчецкий, Н. В. Гудова – Нижний Новгород, 2015. – 36 с.
4. Андриюков, Б. Г. Жирные кислоты как объект исследования температурных адаптационных стратегий микроорганизмов-психрофилов / Б. Г. Андриюков, Л. М. Сомова, Н. Ф. Тимченко // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2015. – № 3 (61). – С. 43–49.
5. Андриющенко, С. В. Генетическая характеристика адаптивного потенциала бифидобактерий биотопа дистального отдела кишечника / С. В. Андриющенко, Е. В. Иванова, Н. Б. Перунова, О. В. Бухарин, А. В. Бекпергенова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 4. – С. 4–11.
6. Андриющенко, С. В. Молекулярные механизмы взаимодействия бактерий с лизоцимом и их роль в микробиоценозе / С. В. Андриющенко, Н. Б. Перунова, О. В. Бухарин // Успехи современной биологии. – 2015. – № 5 (135). – С. 453–463.
7. Ардатская, М. Д. Метаболиты микрофлоры различных биотопов при заболеваниях бронхолегочной системы / М. Д. Ардатская, В. В. Шевцов, А. Н. Жакот, И. Н. Феданков, С. Д. Митрохин, А. Ю. Миронов, Е. В. Пономарева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – № 3 (103). – С. 46–54.
8. Ашурова, Р. Ш. Бактериальные и грибковые оппортунистические инфекции у ВИЧ-позитивных детей / Р. Ш. Ашурова, Н. М. Ходжаева, Н. С. Джураева, А.М. Салимов // Вестн. Академии медицинских наук Таджикистана. – 2016. – № 4. – С.

109–119.

9. Безродный, С. Л. Кишечная микробиота как источник новых биомаркеров старения / С. Л. Безродный, Б. А. Шендеров // Вестн. восстановительной медицины. – 2015. – № 2 (66). – С. 40–47.
10. Беляева, И. А. Онтогенез и дизонтогенез микробиоты кишечника у детей раннего возраста: триггерный механизм нарушений детского здоровья / И. А. Беляева, Е. П. Бомбардинова, М. Д. Митиш, Т. В. Потехина, Н. А. Харитоновна // Вопр. детской педиатрии. – 2017. – № 1 (16). – С. 29–38.
11. Бовбель, И. Э. Современные представления о микробиоте кишечника и возможности эффективного применения пробиотиков в практике врача-педиатра / И. Э. Бовбель // Медицинские новости. – 2017. – № 2 (269). – С. 25–31.
12. Боровицкий, В. С. Структура грибкового поражения впервые выявленного туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией, в лечебном учреждении Федеральной службы исполнения наказаний (ФСИН) / В. С. Боровицкий, К. И. Аксенова // Пробл. медицинской микологии. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 45.
13. Брилис, В. И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис, Т. А. Брилине, Х. П. Ленцнер // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.
14. Булатова, Е. М. Особенности видового состава бифидобактерий кишечной микробиоты и профиль микробного метаболизма у детей первого полугодия жизни, рожденных естественным и оперативным путем / Е. М. Булатова, А. М. Шабалов, Н. М. Богданова, А. И. Шилов, Э. Г. Оганесян, Н. С. Курицина // Педиатр. – 2018. – № 1 (18). – С. 11–16.
15. Бухарин, О. В. Метаболический профиль бифидофлоры при различных микрoэкологических состояниях биотопa толстого кишечника человека / О. В. Бухарин, Е. В. Иванова, Н. Б. Перунова, И. Н. Чайникова, С. В. Андрющенко // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 1. – С. 3–11.
16. Бухарин, О. В. Регуляция иммунного гомеостаза кишечника человека метаболитами бифидобактерий в условиях микробного распознавания / О. В.

Бухарин, Е. В. Иванова, Н. Б. Перунова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 3. – С. 12–18.

17. Бухарин, О. В. Роль ассоциативного симбиоза в инфекционной патологии / О. В. Бухарин // Вестн. РАМН. – 2010. – № 6. – С. 26–30.

18. Бухарин, О. В. Роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза человека / О. В. Бухарин, Е. В. Иванова, Н. Б. Перунова, И. Н. Чайникова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. – № 6. – С. 98–104.

19. Бухарин, О. В. Штаммоспецифичность белкового профиля представителей рода *Bifidobacterium* / О. В. Бухарин, Т. Ф. Степанова, Н. Б. Перунова, Е. В. Иванова, С. В. Андрющенко, Л. В. Катаева // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. – № 2. – С. 3–9.

20. Власов, А. А. Взаимосвязь содержания маркеров бифидобактерий с уровнем омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в крови больных хронической сердечной недостаточностью / А. А. Власов, С. П. Саликова, В. Б. Гриневич, О. В. Быстрова, Г. А. Осипов, М. И. Шперлинг // Медицинский академический журнал. – 2017. - № 4 (17). – С. 51–52.

21. Гапон, М. Н. Выявление степени микрoэкологических нарушений кишечника на основе расчета локального антиоксидантного индекса / М. Н. Гапон, Л. Н. Терновская // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 2. – С. 80–84.

22. Гапон, М. Н. Состояние микробиоценоза толстой кишки и местных метаболических процессов при коррекции экспериментального дисбактериоза жидкой и сухой формами бифидумбактрина / М. Н. Гапон, Л. Н. Терновская, О. В. Денисенко // Кубанский научный медицинский вестн. – 2014. – № 1 (143). – С. 67–70.

23. Гольшко, В. С. Частота и характеристика сердечно-сосудистых заболеваний у ВИЧ-инфицированных пациентов (по данным аутопсии) / В. С. Гольшко, В. А. Снежицкий, Н. В. Матиевская, Н. И. Прокопчик // Клиническая медицина. – 2017. – № 10 (95). – С. 928–934.

24. Горобченко, Е. Н. Коррекция бактериальными препаратами дисбиотических изменений кишечника ВИЧ-инфицированных / Е. Н. Горобченко, А. Г. Дьяченко, Е. М. Савинова, Т. В. Майстат // Туберкулез, легочные болезни, ВИЧ-инфекция. – 2016. – № 3 (26). – С. 58–63.
25. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – Санкт-Петербург, - 2010. – 48 с.
26. Жиленкова, О. Г. Видовой состав бифидофлоры желудочно-кишечного тракта у детей / О. Г. Жиленкова, О. Л. Воронина, А. М. Амерханова, А. В. Караулов, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин, М. С. Афанасьев, А. В. Алешкин, Ю. В. Несвижский, Л. В. Феклисова, Е. Р. Мескина // Астраханский медицинский журнал. – 2014. - № 1 (9). – С. 49-55.
27. Жиленкова, О. Г. Масс-спектрометрический анализ микробных метаболитов как экспрессный прием оценки состояния природных микробиоценозов в медицинской и санитарно-гигиенической практике / О. Г. Жиленкова, О. В. Быстрова, Г. А. Осипов, Б. А. Шендеров // Лабораторная служба. – 2016. – № 3 (5). – С. 43.
28. Иванова, Е. И. Микробные ассоциации кишечного биотопа у детей первого года жизни с функциональными нарушениями пищеварения / Е. И. Иванова // Журн. инфектологии. – 2016. – № 3 (8). – С. 69–70.
29. Ивашкин, В. Т. Микробиом человека в приложении к клинической практике / В. Т. Ивашкин // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2017. – № 6 (27). – С. 4–13.
30. Ильин, В. К. Аутопробиотики как средство профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний у человека в искусственной среде обитания / В. К. Ильин, А. Н. Суворов, Н. В. Кирюхина, Н. А. Усанова, Л. В. Старкова, В. В. Бояринцев, А. Б. Карасева // Вестн. РАМН. – 2013. – № 2. – С. 56–61.
31. Калюжин, О. В. Безопасность и физиологичность действия пробиотиков как средств иммунокоррекции / О. В. Калюжин // Рос. аллергологический журн. – 2013. – № 3. – С. 45–56.

32. Каминский, В. В. Связь нарушений микробиома ВИЧ-инфицированных беременных с течением ВИЧ при ассоциации с герпесвирусной инфекцией / В. В. Каминский, Т. Н. Аношина // Репродуктивное здоровье. – 2016. – № 5. – С. 607–614.
33. Караулов, А. В. Микрофлора, колонизационная резистентность слизистых и мукозальный иммунитет / А. В. Караулов, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин, Е. А. Воропаева, М. С. Афанасьев, Ю. В. Несвижский, А. В. Алешкин, В. А. Метельская, О. Г. Гречишникова, А. Л. Байракова, Е. А. Егорова, Ю. Н. Урбан, И. В. Евсегнеева // Иммунология. – 2015. – № 5 (36). – С. 290–295.
34. Кафарская, Л. И. Практика педиатра: роль пробиотиков в нормализации баланса микробиоты кишечника у детей / Л. И. Кафарская, А. Н. Шкопоров, А. В. Чаплин, А. П. Пикина, Б. А. Ефимов // Вопросы детской диетологии. – 2016. – № 3. – С. 22–28.
35. Керимли, Ф. И. Микробиота кишечника при ВИЧ-инфекции / Ф. И. Керимли, Ю. И. Воробьева, А. Е. Козлов, Е. П. Ляпина // Бюл. медицинских Интернет-конференций. – 2017. – № 6 (7). – С. 1013.
36. Клименко, А. И. Современные подходы к математическому и компьютерному моделированию в микробиологии / А. И. Клименко, З. С. Мустафин, А. Д. Чеканцев, Р. К. Зудин, Ю. Г. Матушкин, С. А. Лашин // Вавиловский журн. генетики и селекции. – 2015. – № 6 (19). – С. 745–752.
37. Козлов, В. А. Триптофан и Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) в патогенезе иммунокомпрометированных заболеваний / В. А. Козлов, Д. В. Демина // Медицинская иммунология. – 2017. – № 3 (19). – С. 225–240.
38. Колпакова, Н. В. Клинико-anamнестические и иммунологические показатели у ВИЧ-инфицированных больных с гастроэнтерологической патологией / Н. В. Колпакова, А. А. Курмангулов, А. А. Мельников, Н. А. Уварова, Ю. А. Петрова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2018. – № 1 (10). – С. 78–83.
39. Корниенко, Е. А. Метаболическое действие микробиоты и метабиотики / Е. А. Корниенко // РМЖ. – 2016. – № 18 (24). – С. 1196–1201.



40. Костюк, С. А. Молекулярно-генетические методы в мониторинге микробных сообществ кишечника / С. А. Костюк // Медицинские новости. – 2017. – № 1 (268). – С. 62–65.
41. Куклева, Л. М. Активатор плазминогена – многофункциональный белок возбудителя чумы / Л. М. Куклева, А. В. Бойко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 3. – С. 13–20.
42. Ладная, Н. Н. ВИЧ-инфекция у женщин и детей в Российской Федерации в 2013 г. / Н. Н. Ладная, Е. В. Соколова, О. И. Тушина, Н. В. Козырева, В. В. Покровский // Дети и ВИЧ: проблемы и перспективы : материалы науч.-практ. конф. – СПб., 2014. – С. 3–6.
43. Лахтин, М. В. Лектиновые ферменты – регуляторы метаболизма / М. В. Лахтин, В. М. Лахтин, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин // Проблемы научной мысли. – 2017. – № 1 (11). – С. 71–90.
44. Лахтин, М. В. Лектины в терапии / М. В. Лахтин, В. М. Лахтин, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев, В. Ф. Корсун // Проблемы научной мысли. – 2017. – № 2 (10). – С. 77–84.
45. Лахтин, М. В. Пробиотики против грибковых инфекций: вклад пробиотических лективных / М. В. Лахтин, В. М. Лахтин, С. С. Афанасьев // Успехи медицинской микологии. – 2018. - Т.18. – С. 153-157.
46. Лахтин, М. В. Фундаментальные аспекты и прикладные принципы лектиновых систем на примере микробиоценозных симбиотических штаммов и консорциумов / М. В. Лахтин, В. М. Лахтин, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев // Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – № 2 (114). – С. 80–84.
47. Леонов, В. В. Связь показателя гидрофобности микробных клеток с их биопленкообразующей способностью / В. В. Леонов, Н. А. Курлович, Т. Н. Соколова // Биофизика. – 2014. – № 6 (59). – С. 1131–1134.
48. Леонтьева, Н. И. Клинико-лабораторная эффективность споробактерина у больных острыми кишечными инфекциями и хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта, ассоциированными с дисбактериозом кишечника / Н. И. Леонтьева, И. Т. Щербаков, Н. М. Грачева, А. И. Соловьева, В. С. Филиппов

// Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2016. – № 1-2. – С. 19.

49. Луфт, В. М. Глутамин и его производные в коррекции метаболических нарушений к ВИЧ-инфицированным пациентам / В. М. Луфт, А. В. Дмитриев, Н. В. Сизова, Н. А. Беляков // Медицинский академический журн. – 2015. – № 2 (15). – С. 15–27.

50. Луцкая, И. К. Проявления ВИЧ-инфекции в челюстно-лицевой области у детей / И. К. Луцкая, О. Г. Зиновенко, В. А. Андреева // Современная стоматология. – 2016. – № 2 (63). – С. 36–40.

51. Льюнг, Ю. Г. Влияние пониженной температуры на биodeградацию гексадекана бактериями - нефтеструкторами *Rhodococcus* sp. X5, продуцирующими гликолипидные биологические поверхностно-активные вещества / Ю. Г. Льюнг, И. А. Нечаева, О. Н. Пономарева, Х. З. Ву, В. А. Арляпов, И. Ф. Пунтус, А. Е. Филонов // Биотехнология. – 2017. – № 6 (33). – С. 49–56.

52. Марков, А. А. Возможность применения экзометаболитов *Bifidobacterium bifidum* в травматологии и ортопедии для предотвращения первичной контаминации и биопленкообразования на поверхности имплантов с синтетическим биоактивным кальций-фосфатным минеральным покрытием / А. А. Марков, Т. Х. Тимохина, Н. Б. Перунова, Я. И. Паромова // Медицинский альманах. – 2018. – № 3 (54). – С. 128–130.

53. Марков, А. А. Регулирующее влияние экзометаболитов *Bifidobacterium bifidum* на пролиферативную активность условно-патогенных микроорганизмов / А. А. Марков, Т. Х. Тимохина, Н. Б. Перунова, Я. И. Паромова // Вестн. Смоленской государственной медицинской академии. – 2018. – № 1 (17). – С. 56–62.

54. Медведева, О. А. Состояние микробиоценоза толстого кишечника и прооксидантно-антиоксидантного баланса колоноцитов в условиях экспериментального дисбиоза и профилактики мексидолом / О. А. Медведева, В. А. Королев, Ю. А. Авдеева // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. – 2017. – № 5 (254). – С. 134–140.

55. Милентьева, И. С. Изучение процесса перекисного окисления липидов в модельной системе микроорганизмов / И. С. Милентьева, С. А. Сухих, Л. А. Астахова, В. В. Райс // Science Time. – 2015. – № 5 (17). – С. 272–276.
56. Мокина, Т. В. Вторичный нейроСПИД / Т. В. Мокина, Ю. И. Павлов, М. Ю. Молчанова, Т. В. Карпова // Клиническая фармакология и терапия. – 2016. – № 2 (25). – С. 72–75.
57. МУ 2.3.2.2789-10. «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке, безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов». – М., 2011. – 105 с.
58. Нигматова, Л. М. Влияние уровня CD 4 – лимфоцитов на течение ВИЧ-инфекции / Л. М. Нигматова, А. А. Бийкузиева // Авиценна. – 2017. – № 7. – С. 36–39.
59. Нурузова, З. А. Изменчивость кишечной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных больных / З. А. Нурузова, Ф. Ш. Хасанов, С. К. Ганиева // Биология и интегративная медицина. – 2016. – № 4. – С. 15–18.
60. Олескин, А. В. Заквасочные культуры лактобацилл – продуценты нейромедиаторов: биогенных аминов и аминокислот / А. В. Олескин, О. Г. Жиленкова, Б. А. Шендеров, А. М. Амерханова, В. С. Кудрин, П. М. Клодт // Молочная промышленность. – 2014. – № 9. – С. 42–43.
61. Олисова, О. Ю. Микрофлора кишечника при себорейном дерматите / О. Ю. Олисова, М. И. Давидович // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2014. – № 1. – С. 43–46.
62. Осипова, Е. Д. Особенности течения инфекционного эндокардита у ВИЧ-инфицированных пациентов, диагностика и лечение / Е. Д. Осипова, А. О. Осипов, О. В. Полянкина, Е. Е. Мартынова, А. Г. Мухамедьянов, В. А. Лещенко, Э. А. Сафронова, В. А. Елисеев // Научный альманах. – 2017. – № 5-3 (31). – С. 206–214.
63. ОСТ 91500.11.0004-2003. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. – Введ. 2003-06-09. – М.: Московская медицинская академия имени

И.М. Сеченова Минздрава России, 2003. – 74 с.

64. ОФС 1.7.2.0009-15. Определение специфической активности пробиотиков. – Введ. 2015-10-29. - М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. – 24 с.

65. Панова, Н. И. Этиологическая структура возбудителей сепсиса у пациентов с онкологической патологией / Н. И. Панова, И. Б. Лысенко, В. В. Дмитриева, О. Ю. Куцевалова, Т. А. Зыкова // Пробл. медицинской микологии. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 102.

66. Платонова, А. Г. Хромато-масс-спектрометрическое исследование микробных жирных кислот в биологических жидкостях человека и их клиническая значимость / А. Г. Платонова, Г. А. Осипов, Н. Б. Бойко, Н.В. Кириллова, Г. Г. Родионов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – № 12 (60). – С. 46–55.

67. Плотникова, Е. Ю. Микробный пейзаж кишечника и метаболический синдром – что общего? / Е. Ю. Плотникова // Вестн. клуба панкреатологов. – 2016. – № 2 (31). – С. 63–72.

68. Плотникова, Е. Ю. Связь микробного пейзажа кишечника с метаболическим синдромом / Е. Ю. Плотникова, О. А. Краснов // Фарматека. – 2015. – № 15 (308). – С. 11–20.

69. Подопригора, Г. И. Бактериальная транслокация из кишечника: микробиологические, иммунологические и патофизиологические аспекты / Г. И. Подопригора, Л. И. Кафарская, Н. А. Байнов, А. Н. Шкопоров // Вестник РАМН. – 2015. – № 6 (70). – С. 640–650.

70. Полякова, С. И. Пищевая непереносимость и кишечная микробиота у детей с расстройствами аутистического характера / С. И. Полякова, Н. Ю. Коровина, А. В. Чаплин, Б. А. Ефимов, К. Мамедова, П. В. Шумилов, А. М. Савилова, Д. В. Ребриков // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2018. – № 2 (97). – С. 187–193.

71. Приказ Минздрава соцразвития РФ от 23.08.2010 № 708 н «Об утверждении Правил лабораторной практики» (зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 №

18713). – 2010. – 22 с.

72. Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника : МР- №10-11/31: метод. рекомендации. – М., 1986. – 18 с.

73. Прокопенко, К. М. Антагонистические взаимодействия условно-патогенных микроорганизмов с лакто- и бифидобактериями, входящими в состав пробиотиков / К. М. Прокопенко, Л. П. Кнышова, А. С. Тимофеева // Наука и мир. – 2015. – № 6 (22). – С. 110–112.

74. Пузырева, Л. В. Анализ инфекций нижних дыхательных путей с исследованием микробного пейзажа материала у ВИЧ-инфицированных пациентов / Л. В. Пузырева, Л. А. Родькина, А. В. Мордык, В. Д. Конченко, Л. М. Далабаева // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 1. – С. 76–84.

75. Пузырева, Л. В. Сепсис у ВИЧ-инфицированных пациентов / Л. В. Пузырева, В. Д. Конченко, Л. М. Далабаева // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 3 (7). – С. 251–258.

76. Рассохин, В. В. ВИЧ, коинфекции и сопутствующие заболевания / В. В. Рассохин, А. С. Бобрешова, Н. В. Коновалова, С. В. Огурцова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2016. – Т. 8, №2. – С. 96–99.

77. Рассохин, В. В. Злокачественные опухоли при ВИЧ-инфекции. Эпидемиология, патогенез, формы опухолей. Часть 1 / В. В. Рассохин, А. В. Некрасова, Н. Б. Михайлова. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2017. – № 1 (9). – С. 7–21.

78. Руденко, А. О. Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот / А. О. Руденко, Л. А. Карцова, С. И. Снарский // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – № 2 (10). – С. 223-230.

79. Руженцова, Т. А. Роль пробиотиков в формировании иммунитета / Т. А. Руженцова // Лечащий врач. – 2018. – № 4. – С. 27.

80. Салгина, А. В. Влияние ассоциаций бифидобактерий и пропионибактерий на биологические свойства *E. coli* / А. В. Салгина, О. И. Рахматуллина // Успехи современной науки и образования. – 2016. – № 12 (7). – С. 213–217.
81. Салгина, А. В. Характеристика персистентного потенциала облигатно-анаэробных бактерий при зубиозе и дисбиозе кишечника / А. В. Салгина, О. И. Рахматуллина, Н. Б. Перунова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2016. – № 5 (61). – С. 167–169.
82. Селиверстов, П. В. Роль кишечного дисбиоза и ее экзометаболитов в развитии, течении и профилактике неалкогольной жировой болезни печени / П. В. Селиверстов, С. И. Ситкин, В. Г. Радченко // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2018. – № 2. – С. 95–96.
83. Сичинава, И. В. Исследование эффективности симбиотика Нормобакт в профилактике дисбиоза у детей при эрадикационной антихеликобактерной терапии / И. В. Сичинава, А. В. Горелов // Фарматека. – 2015. – № 11 (304). – С. 58–62.
84. Сторожаков, Г. И. *Bifidobacterium*, как возможная причина развития сепсиса у пациента с циррозом печени / Сторожаков, А. Г. Цветкова, Л. Ю. Ильченко, Н.Н. Мерзликина, И.Г. Федоров, Н. В. Петренко // Архивь внутренней медицины. – 2015. – № 4 (24). – С. 54–61.
85. Сундукова, К. А. Проявления ВИЧ-инфекции в полости рта у детей / К. А. Сундукова, Л. П. Кисельникова, М. М. Гаджикулиева // Российский медицинский журнал. – 2016. – № 6 (22). – С. 329–331.
86. Тераевич, А. С. Влияние пробиотиков на клеточный и гуморальный иммунитет / А. С. Тераевич, Е. Н. Закрепина // Электронный научный журн. – 2016. – № 7 (10). – С. 23–27.
87. Тетерина, Л. А. Дисбиоз кишечника. Значение нормальной микробиоты кишечника в организме человека / Л. А. Тетерина, Е. М. Приходько, П. В. Селиверстов, С. И. Ситкин, Л. С. Орешко, В. П. Добрица, В. Г. Радченко // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2016. – № 1-2. – С. 15–18.
88. Тимербулатов, В. М. Гнойно-септические осложнения ВИЧ-

инфицированных больных / В. М. Тимербулатов, В. М. Сиваев, Ш. В. Тимербулатов, М. В. Тимербулатов, Д. А. Валишин // Медицинский вестн. Башкортостана. – 2017. – № 6 (12). – С. 15–21.

89. Титов, В. Н. Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина / В. Н. Титов, Д. М. Лисицын. – М. –Тверь : ООО «Издательство «Триада», 2006. – 672 с.

90. Ткаченко, Е. И. Клиническая и микробиологическая оценка эффективности использования индивидуально подобранных пробиотиков у пациентов с метаболическим синдромом и нарушенным микробиоценозом кишечника / Е. И. Ткаченко, В. В. Закревский, Д. В. Копчак, Е. А. Оришак, Л. Ю. Нилова // Профилактическая и клиническая медицина. – 2016. – № 1 (58). – С. 60–66.

91. Тобокалова, С. Т. Клинические особенности ВИЧ-инфекции у детей. Ранняя диагностика ВИЧ-ассоциированных заболеваний у детей / С. Т. Тобокалова, Б. Р. Абдыраева, Э. Б. Нарматова, М. М. Бугубаева // Дети и ВИЧ: проблемы и перспективы: материалы науч.-практ. конф. – СПб., 2014. – С. 134–140.

92. Трашкова, Т. М. Влияние карбоновых кислот на пролиферативную активность бактерий нормофлоры / Т. М. Трашкова // Знание. – 2016. – № 2-1 (31). – С. 40–47.

93. Ушакова, Н. А. Механизмы влияния пробиотиков на симбионтное пищеварение / Н. А. Ушакова, Р. В. Некрасов, И. В. Правдин, Сверчкова Н. В., Э. И. Коломиец, Д. С. Павлов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2015. – № 5. – С. 468–476.

94. Федорова, И. А. Иммуногенные свойства пробиотического компонента микробиоты желудочно-кишечного тракта человека / И. А. Федорова, В. Н. Даниленко // Успехи современной биологии. – 2014. – № 2 (134). – С. 99–110.

95. Функ, И. А. Биотехнологический потенциал бифидобактерий / И. А. Функ, А. Н. Иркитова // Acta Biologica Sibirica. – 2016. – Т. 2, № 4. – С. 67–79.

96. Хамагаева, И. С. Влияние омега-3 и омега-6 жирных кислот на метаболизм бифидобактерий / И. С. Хамагаева, Н. А. Замбалова, Л. В. Буянтуева // Вестн. ВСГУТУ. – 2014. – № 2. – С. 72–78.

97. Харченко, Н. В. Новые подходы для выделения штаммов бифидобактерий,

их молекулярная диагностика и оценка пробиотического потенциала / Н. В. Харченко, Т. А. Чердынцева, А. И. Нетрусов // Микробиология. – 2015. – № 3 (84). – С. 352.

98. Хасанов, Ф. Ш. Эффект биокоррекции у ВИЧ-инфицированных пациентов с дисфункцией желудочно-кишечного тракта / Ф. Ш. Хасанов, З. А. Нурузова, Г. Х. Ернаева // Биология и интегративная медицина. – 2017. – № 4. – С. 95–109.

99. Хасанова, Г. Р. Роль микробной транслокации в развитии анемии хронического заболевания у больных ВИЧ-инфекцией / Г. Р. Хасанова, О. И. Биккинина, В. А. Анохин // Практическая медицина. – 2014. – № 5 (81). – С. 122–126.

100. Хисматуллина, Ю. Р. Проблема системной организации в биологии / Ю. Р. Хисматуллина // Вестн. Российского государственного аграрного заочного университета. – 2013. – № 14 (19). – С. 93–96.

101. Чаплин, А. В. Изучение видового разнообразия бактерий рода *Bifidobacterium* кишечной микрофлоры с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии / А. В. Чаплин, А. Г. Бржозовский, Т. В. Парфёнова, Л. И. Кафарская, Н. Н. Володин, А. Н. Шкопоров, Е. Н. Ильина, Б. А. Ефимов // Вестн. РАМН. – 2015. – № 4 (70). – С. 435–440.

102. Чубарова, А. И. Опыт применения препарата комбинации пробиотических штаммов бифидо- и лактобактерий у недоношенных новорожденных в отделениях реанимации и интенсивной терапии для новорожденных / А. И. Чубарова, Г. Р. Шаряфетдинова // Вопр. детской диетологии. – 2017. – № 4 (15). – С. 5–13.

103. Шахгильдян, В. И. Структура вторичных заболеваний и современные подходы к их лабораторной диагностике у больных с ВИЧ-инфекцией / В. И. Шахгильдян, М. С. Ядрихинская, А. П. Сафонова, Т. Н. Сафонова, Э. А. Домонова, О. Ю. Шипулина, М. В. Альварес - Фигероа, Е. А. Долгова, О. А. Тишкевич // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2015. – № 1. – С. 24–30.

104. Шендеров, Б. А. Метабиотики – новая технология профилактики и лечения



заболеваний, связанных с микрoэкологическими нарушениями в организме человека / Б. А. Шендеров, Е. И. Ткаченко, Л. Б. Лазебник, М. Д. Ардатская, А. В. Сеница, М. М. Захарченко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – № 3 (151). – С. 83–92.

105. Шендеров, Б. А. Мишени и эффекты короткоцепочечных жирных кислот / Б. А. Шендеров // Современная медицинская наука. – 2013. – № 1. – С. 21–50.

106. Щербаков, И. Т. Состояние слизистой оболочки толстой кишки у больных острыми кишечными инфекциями до и после лечения пробиотиками (гистологическое и морфометрическое исследование) / И. Т. Щербаков, Н. И. Леонтьева, Н. М. Грачева, В. С. Филиппов, А. И. Соловьева // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2016. – № 1-2 (11). – С. 39.

107. Щербакова, М. Ю. Роль микробиоты кишечника в развитии ожирения в возрастном аспекте / М. Ю. Щербакова, А. В. Власова, Т. А. Роживанова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – № 2 (114). – С. 11–16.

108. Энциклопедия лекарств 2018. РЛС. Вып. 26 / под ред. Г. Л. Вышковского. – М. : «Веданта», 2017. – 1384 с.

109. Явников, Н. В. Определение адгезивных свойств лакто- и бифидобактерий / Н. В. Явников // Инновации в АПК: проблемы и перспективы. – 2017. – № 4 (16). – С. 218–220.

110. Януцевич, Е. А. Мембранные липиды и углеводы цитозоля у *Aspergillus niger* в условиях осмотического, окислительного и холодового воздействий / Е. А. Януцевич, О. А. Данилова, Н. В. Гроза, В. М. Терешина // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 1. – С. 283–292.

111. Altamimi, M. Effect of oligosaccharides on the adhesion of gut bacteria to human HT-29 cell / M. Altamimi, O. Abdelhay, R. A. Rastall // Anaerobe. – 2016. – Vol. 39. – P. 136–142.

112. Ambalam, P. Bile enhances cell surface hydrophobicity and biofilm formation of *Bifidobacteria* / P. Ambalam, K. K. Kondepudi, I. Nilsson, T. Wadström, A. Ljungh // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2014. – Vol. 172 (4). – P. 1970–1981.

113. Amorim, G. C.  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  resonance assignments of PpdD, a type IV pilin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* / G. C. Amorim, D. A. Cisneros, M. Delepierre, O. Francetic // Biomolecular NMR Assignment. – 2014. – Vol. 8 (1). – P. 43 – 46.
114. Andriantsoanirina, V. *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve* isolates from preterm and full-term neonates: comparison of cell surface properties / V. Andriantsoanirina, A. C. Teolis, L. X. Xin, M. J. Butel, J. Aires // Anaerobe. – 2014. – Vol. 28. – P. 212–215.
115. Arboleya, S. Gene-trait matching across the *Bifidobacterium longum* pan-genom reveals considerable diversity in carbohydrate catabolism among human infant strains / S. Arboleya, F. Bottacini, M. O’Connell-Motherway, C. A. Ryan, R. P. Ross, D. van Sinderen, C. Stanton // BMC Genomics. – 2018. – Vol. 19. – P. 33–49.
116. Atarashi, K. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells / K. Atarashi, T. Tanoue, M. Ando, N. Kamada, Y. Nagano, S. Narushima, W. Suda, A. Imaoka, H. Setoyama, T. Nagamori, E. Ishikawa, T. Shima, T. Hara, S. Kado, T. Jinnohara, H. Ohno, T. Kondo, K. Toyooka, E. Watanabe, S. Yokoyama, S. Tokoro, H. Mori, Y. Noguchi, H. Morita, I.I. Ivanov, T. Sugiyama, G. Nuñez, J.G. Camp, M. Hattori, Y. Umesaki, K. Honda // Cell. – 2015. – Vol. 163 (2). – P. 367–380.
117. Back-Brito, G. N. *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* oral isolates from Brazilian HIV-positive patients. Correlation with CD4 cell counts and viral load / G. N. Back-Brito, V. N. R. Ackhar, S.M. R. Querido, S. S. F. Santos, A.O. Jorge, S. Reis Ade, C.Y. Koga-Ito // Arch. Oral Biology. – 2011. – Vol. 56 (10). – P. 1041–1046.
118. Badawy, A.A. Hypothesis kynurenic and quinolinic acids: the main players of the kynurenine pathway and opponents in inflammatory disease / A. A. Badawy // Medical Hypotheses. – 2018. – Vol. 118. – P. 129–138.
119. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology : 2nd ed. / W. B. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer et al. – New York : Springer-Verlag, 2012. – Vol. 5, parts A and B. – 2031 p.
120. Bondue, P. Genome of *Bifidobacteria* and carbohydrate metabolism / P. Bondue,

- V. Delcenserie // Korean J. Food Science of Animal Resources. – 2015. – Vol. 35, N 1. – P. 1–9.
121. Bottacini, F. Diversity, ecology and intestinal function of *Bifidobacteria* / F. Bottacini, M. Ventura, D. van Sinderen, M. O'Connell Motherway // Microbial Cell Factories. – 2014. – Vol. 13 (1). – P. 4–19.
122. Boulougoura, A. HIV infection and immune activation: the role of coinfections / A. Boulougoura, I. Sereti // Current Opinion HIV AIDS. – 2016. – Vol. 11. – P. 191–200.
123. Burgener, A. HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis / A. Burgener, I. McGowan, N. R. Klatt // Current Opinion in Immunology. – 2015. – Vol. 36. – P. 22–30.
124. Caballero, S. Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine / S. Caballero, E. Pamer // Annual Review Immunology. – 2015. – Vol. 33. – P. 227–256.
125. Cao, W. Antiretroviral therapy in primary HIV-infection: influences on immune activation and gut mucosal barrier dysfunction / W. Cao, V. Mehraj, K. Vyboh, T. Li, J. P. Routy // AIDS Review. – 2015. – Vol. 17. – P. 135–146.
126. Cha, S. K. Transfer RNA modification and infection – implications for pathogenicity and host responses / S. K. Cha, L. P. Sarin // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms. – 2018. – Vol. 1861. – P. 419–432.
127. Chen, B. Integration of microbiome and epigenom to decipher the pathogenesis of autoimmune diseases / B. Chen, L. Sun, X. Zhang // J. Autoimmunity. – 2017. – Vol. 14. – P. 31–42.
128. Cooper, P. Early benefits of a starter formula enriched in prebiotics and probiotics on the gut microbiota of healthy infants born to HIV+ mothers: a randomized double-blind controlled trial / P. Cooper, K. D. Bolton, S. Velaphi, N. de Groot, S. Emady-Azar, S. Pecquet, P. Steenhout // Clinical Medicine Insights: Pediatrics. – 2016. – Vol. 10. – P. 119–130.
129. Duarte, S. M. B. Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: a prospective pilot study / S.

- M. B. Duarte, J. T. Stefano, L. Miele, F. R. Ponziani, M. Souza-Basqueira, L. S. R. R. Okada, F. G. de Barros Costa, K. Toda, D. F. C. Mazo, E. C. Sabino, F. J. Carrilho, A. Gasbarrini, C.P. Oliveira // Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. - 2018. - Vol. 28 (issue 4). - P. 369 -384.
130. Dillon, S.M. The gut microbiome and HIV- pathogenesis: a two-way street / S.M. Dillon, D. N. Frank, C. C. Wilson // AIDS. – 2016. – Vol. 30. – P. 2737–2751.
131. Dinh, D. Intestinal microbiota, microbial translocation and systemic inflammation in chronic HIV infection / D. Dinh, G. Volpe, C. Duffalo, S. Bhalchandra, A. K. Tai, A. V. Kane, C.A. Wanke, H. D. Ward // J. Infection Diseases. – 2015. – Vol. 211. – P. 19–27.
132. Dubourg, G. Impact of HIV on the human gut microbiota: challenges and perspectives / G. Duborg // Human Microbiome J. – 2016. – Vol. 2. – P. 3–9.
133. Dubourg, G. Microbiome of HIV-infected people / G. Duborg // Microbial Pathogenesis. – 2017. – Vol. 106. – P. 85–93.
134. Eberhardt, K.A. *Helicobacter pylori* coinfection is associated with decreased markers of immune activation in ART-naive HIV-positive and in HIV-negative individuals in Ghana / K. A. Eberhardt, F. S. Sarfo, A. Dompok, E. O. Kuffour, C. Geldmacher, M. Soltau, M. Schachscheider, J. F. Drexler, A. M. Eis-Hübinger, D. Häussinger, G. Bedu-Addo, R. O. Phillips, B. Norman, G. D. Burchard, T. Feldt // Clinical Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 61 (10). – P. 1615–1623.
135. Egan, M. Staying alive: growth and survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* under in vitro and in vivo conditions / M. Egan, F. Bottacini, M. O'Connell Motherway, P. G. Casey, R. Morrissey, S. Melgar, J. M. Faurie, C. Chervaux, T. Smokvina, D. van Sinderen // Appl Microbiol Biotechnol. - 2018. - Vol. 102 (24). - P. 10645-10663.
136. Egan, M. Cross-feeding by *Bifidobacterium breve* UCC2003 during co-cultivation with *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in a mucin-based medium / M. Egan, M. Motherway, M. Kilcoyne M. Kane, L. Joshi, M. Ventura, D. van Sinderen // BMC Microbiology. – 2014. – Vol. 14. – P. 282–296.
137. Elkfoury, K. A. *Bifidobacterial*-derived lipoproteins inhibit infection with

Coxsackievirus B4 in vitro / K. A. Elkfoury, M. B. Romond, A. Scuotto, E. K. Alidjinou, F. Dabboussi, M. Hamze, I. Engelmann, F. Sane, D. Hober // *Int. J. Antimicrobial Agents*. – 2017. – Vol. 50 (2). – P. 177–185.

138. Esaiassen, E. *Bifidobacterium* bacteremia: clinical characteristics and a genomic approach to assess pathogenicity / E. Esaiassen, E. Hjerde, J. P. Cavanagh G. S. Simonsen, C. Klingenberg // *J. Clin. Microbiol.* – 2017. – Vol. 55 (issue 7). – P. 2234–2248.

139. Favre, D. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of Th 17 to regulatory T cells in HIV disease / D. Favre, J. Mold, P. W. Hunt, B. Kanwar, P. Loke, L. Seu, J. D. Barbour, M.M. Lowe, A. Jayawardene, F. Aweeka, Y. Huang, D. C. Douek, J. M. Brenchley, J. N. Martin, F. M. Hecht, S. G. Deeks, J. M. McCune // *Science Translational Medicine*. – 2010. – Vol. 2. – P. 32–36.

140. Florindo, R. N. Structural and biochemical characterization of GH3  $\beta$ -glucosidase from the probiotic bacteria *Bifidobacterium adolescentis* / R. N. Florindo, V. P. Souza, L. R. Manzine, C. M. Camilo, S. R. Marana, I. Polikarpov, A. S. Nascimento // *Biochimie*. – 2018. – Vol. 148. – P. 107–115.

141. Foroni, E. Genetic analysis and morphological identification of pilus-like structures in members of the genus *Bifidobacterium* / E. Foroni, F. Serafini, D. Amidani, F. Turrone, F. He, F. Bottacini, M. O'Connell Motherway, A. Viappiani, Z. Zhang, C. Rivetti, D. van Sinderen, M. Ventura // *Microbial Cell Factories*. – 2011. – Vol. 10 (Suppl 1). – P. 16–29.

142. Gleinser, M. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein Bop A / M. Gleinser, V. Grimm, D. Zhurina J. Yuan, C. U. Riedel // *Microbial Cell Factories*. – 2012. – Vol. 11 (80). – P. 1–14.

143. Goedert, J. J. Effects of HIV, immune deficiency, and confounding on the distal gut microbiota / J. J. Goedert // *EBioMedicine*. – 2016. – Vol. 5. – P. 14–15.

144. Gonzalez-Rodriguez, I. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation / I. Gonzalez-Rodriguez, B. Sanchez, L. Ruiz, F. Turrone, M. Ventura, P. Ruas-Madiedo, M. Gueimonde, A. Margolles //

- Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 78 (11). – P. 3992–3998.
145. Gori, A. Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis / A. Gori, C. Tincati, G. Rizzardini, C. Torti, T. Quirino, M. Haarman, K. Ben Amor, J. van Schaik, A. Vriesema, J. Knol, G. Marchetti, G. Welling, M. Cleric // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – P. 757–758.
146. Guglielmetti, S. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells / S. Guglielmetti, I. Tamagnini, D. Mora, M. Minuzzo, A. Scarafoni, S. Arioli, J. Hellman, M. Karp, C. Parini // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 15 (74). – P. 4695–4702.
147. Hearps, A.C. Vaginal lactic acid elicits an anti-inflammatory response from human cervicovaginal epithelial cells and inhibits production of pro-inflammatory mediators associated with HIV acquisition / A. C. Hearps, D. Tyssen, D. Srbinovski, L. Bayigga, D.J.D. Diaz, M. Aldunate, R.A. Cone, R. Gugasyan, D.J. Anderson, G. Tachedjian // Mucosal Immunology. – 2017. – Vol. 17. – P. 1–11.
148. Henne, K. Aciduric microbial taxa including *Scardovia wiggisiae* and *Bifidobacterium spp.* in caries and caries free subjects / K. Henne, A. Rheinberg, B. Melzer-Krick, G. Conrads // Anaerobe. – 2015. – Vol. 35 (part A). – P. 60–65.
149. Hensley-McBain, T. Effects of fecal microbial transplantation on microbiome and immunity in simian immunodeficiency virus-infected macaques / T. Hensley-McBain, A. Zevin, J. Manuzak, E. Smith, J. Gile, C. Miller, B. Agricola, M. Katze, R. K. Reeves, C. S. Kraft, S. Langevin, N. R. Klatt // J. Virology. – 2016. – Vol. 10 (90). – P. 4981–4989.
150. Hsue, P.Y. Mechanisms of cardiovascular disease in setting of HIV-infection / P. Y. Hsue // Canadian Journal of Cardiology. – 2019. – Vol. 35 (issue 3). – P. 238–248.
151. Hughes, K. R. *Bifidobacterium breve* reduces apoptotic epithelial cell shedding in an exopolysaccharide and MyD88-dependent manner / K. R. Hughes, L. C. Harnisch, C. Alcon-Giner, S. Mitra, C. J. Wright, J. Ketskemety, D. Sinderen, A. J. Watson, L. J. Hall // Open Biology. – 2017. – Vol. 7. – P. 1–12.
152. Hunt, P. W. Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation

- predict mortality in treated HIV infection / P. W. Hunt, E. Sinclair, B. Rodriguez, Shive C., B. Clagett, N. Funderburg, J. Robinson, Y. Huang, L. Epling, J. N. Martin, S. G. Deeks, C. L. Meinert, M. L. Van Natta, D. A. Jabs, M. M. Lederman // *J. Infect. Diseases.* – 2014. – Vol. 210. – P. 1228–1238.
153. Imai, K. Effect of microbial coinfection with HIV-1 and butyric acid-producing anaerobic bacteria on AIDS progression / K. Imai, K. Ochiai // *J. Oral Biosciences.* – 2013. – Vol. 55. – P. 55–60.
154. Jenabian, M. Immunosuppressive tryptophan catabolism and gut mucosal dysfunction following early HIV infection / M. Jenabian, M. El-Far, K. Vyboh, I. Kema, C. T. Costiniuk, R. Thomas, J. G. Baril, R. LeBlanc, C. Kanagaratham, D. Radzioch, O. Allam, A. Ahmad, B. Lebouché, C. Tremblay, P. Ancuta, J. P. Routy // *J. Infection Disease.* – 2015. – Vol. 3 (212). – P. 355–366.
155. Kainulainen, V. BopA does not have a major role in the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to intestinal epithelial cells, extracellular matrix proteins, and mucus / V. Kainulainen, J. Reunanen, K. Hiippala S. Guglielmetti, S. Vesterlund, A. Palva, R. Satokari // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2013. – Vol. 79 (22). – P. 6989–6997.
156. Kang, H. J. Probiotics as an Immune Modulator / H. J. Kang, S. H. Im // *J. Nutrit. Science and Vitaminology.* – 2015. – Vol. 61. – P. 103-105.
157. Kang, M. Microbiome and colorectal cancer: Unraveling host-microbiota interactions in colitis-associated colorectal cancer development / M. Kang, A. Martin // *Seminars in Immunology.* – 2017. – Vol. 32. – P. 3–13.
158. Kumar, M. Gut microbiota dysbiosis is associated with malnutrition and reduced plasma amino acid levels: lessons from genome-scale metabolic modeling / M. Kumar, B. Ji, P. Babaei, P. Das, D. Lappa, G. Ramakrishnan, T. E. Fox, R. Haque, W. A. Petri, F. Bäckhed, J. Nielsen // *Metabolic Engineering.* – 2018. – Vol. 49. – P. 128–142.
159. Kutikhin, A. G. Infectious agents and cancer / A. G. Kutikhin, A. E. Yuzhalin, E. B. Brusina. – Germany: Springer, 2013. – 116 p.
160. Lambotte, O. Preservation of T-Helper Type 17 Cells in Idiopathic CD4+ Lymphopenia: A New Perspective Relevant to HIV Infection? / O. Lambotte, C.

Bourgeois // *J. Infect. Diseases.* – 2015. – Vol. 212. – P. 1531–1533.

161. Levast, B. The role of IL-10 in microbiome-associated immune modulation and disease tolerance / B. Levast, Z. Li, J. Madrenas // *Cytokine.* – 2015. – Vol. 75 (2). – P. 291–301.

162. Ling, Z. Alterations in the fecal microbiota of patients with HIV-1 infection: an observational study in a Chinese population / Z. Ling, C. Jin, T. Xie, Y. Cheng, L. Li, N. Wu // *Scientific Reports.* – 2016. – Vol. 6. – P. 1–12.

163. Liu, J. Among older adults, age-related changes in the stool microbiome differ by HIV-1 serostatus / J. Liu, R. Johnson, S. Dillon, M. Kroehl, D. N. Frank, Y. E. Tuncil, X. Zhang, D. Ir, Ch. E. Robertson, Sh. Seifert, J. Higgins, B. Hamaker, C. C. Wilson, K. M. Erlandson // *EBioMedicine.* – 2019. – Vol. 40. – P. 583-594.

164. Lozupone, C. A. HIV-induced alteration in gut microbiota: driving factors, consequences and effects of antiretroviral therapy / C. A. Lozupone, M. Rhodes, C. Neff, A.P. Fontenot, T.B. Campbell, B.E. Palmer // *Gut Microbes.* – 2014. – Vol. 4 (5). – P. 562–570.

165. Ma, W. An analysis of human microbe–disease associations / W. Ma, L. Zhang, P. Zeng, C. Huang, J. Li, B. Geng, J. Yang, W. Kong, X. Zhou, Q. Cui // *Briefings in Bioinformatics.* – 2017. – Vol. 18 (1). – P. 85–97.

166. Martinez, F.A. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review / F.A. Martinez, E.M. Balciunas, A. Converti, P.D. Cotter, O.R.P. de Souza // *Biotechnology Advances.* – 2013. – Vol. 31 (4). – P. 482 - 488.

167. McHardy, I. H. HIV infection is associated with compositional and functional shifts in the rectal mucosal microbiota / I. H. McHardy, X. Li, M. Tong, P. Ruegger, J. Jacobs, J. Borneman, P. Anton, J. Braun // *Microbiome.* – 2013. – Vol. 1 (1). – P. 26.

168. Milani, C. The sortase-dependent fimbriome of the genus *Bifidobacterium*: extracellular structures with potential to modulate microbe-host dialogue / C. Milani, M. Mangifesta, L. Mancabelli, G.A. Lugli, W. Mancino, A. Viappiani, A. Faccini, D. van Sinderen, M. Ventura, F. Turrone // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2017. – Vol. 83 (19). – P. 1–16.

169. Monaco, C.L. Altered virome and bacterial microbiome in Human



immunodeficiency virus-associated acquired immunodeficiency syndrome / C. L. Monaco, D. B. Gootenberg, G. Zhao, S. A. Handley, M. S. Ghebremichael, E. S. Lim, A. Lankowski, M. T. Baldrige, C. B. Wilen, M. Flagg, J. M. Norman, B. C. Keller, J. M. Luévano, D. Wang, Y. Boum, J. N. Martin, P. W. Hunt, D. R. Bangsberg, M. J. Siedner, D. S. Kwon, H. W. Virgin // *Cell Host and Microbe*. – 2016. – Vol. 19. – P. 311–322.

170. Muda, K. Aggregation and surface hydrophobicity of selected microorganisms due to the effect substrate, PH and temperature / K. Muda, A. Aris, M. R. Salim, Z. Ibrahim, M. C. M. Loosdrecht, M. Z. Nawahwi, A. C. Affam // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2014. – Vol. 93. – P. 202–209.

171. Mudd, J. C. Gut mucosal barrier dysfunction, microbial dysbiosis, and their role in HIV-1 disease progression / J. C. Mudd, J. M. Brechley // *J. Infect. Diseases*. – 2016. – Vol. 214 (suppl 2). – P. 58–66.

172. Neff, C.P. Fecal microbiota composition drives immune activation in HIV-infected individuals / C. P. Neff, O. Krueger, K. Xiong S. Arif, N. Nusbacher, J. M. Schneider, A. W. Cunningham, A. Armstrong, S. Li, M. D. McCarter, T. B. Campbell, C. A. Lozupone, B. E. Palmer // *EBioMedicine*. – 2018. – Vol. 30. – P. 192–202.

173. Noguera-Julian, M. Gut microbiota linked to sexual preference and HIV infection / M. Noguera-Julian, M. Rocafort, Y. Guillén, J. Rivera, M. Casadellà, P. Nowak, F. Hildebrand, G. Zeller, M. Parera, R. Bellido, C. Rodríguez, J. Carrillo, B. Mothe, J. Coll, I. Bravo, C. Estany, C. Herrero, J. Saz, G. Sirera, A. Torrela, J. Navarro, M. Crespo, C. Brander, E. Negro, J. Blanco, F. Guarner, M. L. Calle, P. Bork, A. Sönnnerborg, B. Clotet, R. Paredes // *EBioMedicine*. – 2016. – Vol. 5. – P. 135–146.

174. Nowak, P. Gut microbiota diversity predicts immune status in HIV-1 infection / P. Nowak, M. Troseid, E. Avershina, B. Barqasho, U. Neogi, K. Holm, J. R. Hov, K. Noyan, J. Vesterbacka, J. Svärd, K. Rudi, A. Sönnnerborg // *AIDS*. – 2015. – Vol. 18 (29). – P. 2409–2418.

175. Nquyen, K.A. Burden, determinants, and pharmacological management of hypertension in HIV-positive patients and population: a systematic narrative review / K. A. Nquyen, N. Peer, E. S. Mills, A. P. Kengne // *AIDS Review*. – 2015. – Vol. 17. – P.

83–95.

176. O’Callaghan, A. *Bifidobacteria* and their role as members of the human gut microbiota / A. O’Callaghan, D. van Sinderen // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 925.

177. Paquin-Proulx, D. *Bacteroides* are associated with GALT iNK T cell function and reduction of microbial translocation in HIV-1 infection / D. Paquin-Proulx, C. Ching, I. Vujkovic-Cvijin, D. Fadrosch, L. Loh, Y. Huang, M. Somsouk, S. V. Lynch, P. W. Hunt, D. F. Nixon, D. SenGupta // *Mucosal Immunology*. – 2017. – Vol. 10. – P. 69–78.

178. Patel, A. R. Immunomodulatory effects of probiotics in the treatment of human immunodeficiency virus (HIV) infection / A. R. Patel, N. P. Shaha, J. B. Prajapatia // *Biomedicine and Preventive Nutrition*. – 2014. – Vol. 4. – P. 81–84.

179. Peng, J. Interaction between gut microbiome and cardiovascular disease / J. Peng, X. Xiao, M. Hu, X. Zhang // *Life Sciences*. – 2018. – Vol. 215. – P. 153–157.

180. Perez-Santiago, J. Gut *Lactobacillales* are associated with higher CD4 and less microbial translocation during HIV infection / J. Perez-Santiago, S. Gianella, M. Massanella, C. A. Spina, M. Y. Karris, S. R. Var, D. Patel, P. S. Jordan, J. A. Young, S. J. Little, D. D. Richman, D. M. Smith // *AIDS*. – 2013. – Vol. 12 (27). – P. 1921–1931.

181. Raygan, F. The effects of probiotic supplementation on metabolic status in type 2 diabetic patients with coronary heart disease / F. Raygan, Z. Rezavandi, F. Bahmani, V. Ostadmohammadi, M. A. Mansournia, M. Tajabadi-Ebrahimi, S. Borzabadi, Z. Asemi // *Diabetology and Metabolic Syndrome*. – 2018. – Vol. 10. – P. 51–58.

182. Rios-Covian, D. Interactions between *Bifidobacterium* and *Bacteroides* species in cofermentations are affected by carbon sources, including exopolysaccharides produced by *Bifidobacteria* / D. Rios-Covian, S. Arbolea, A. M. Hernandez-Barranco, J. R. Alvarez-Buylla, P. Ruas-Madiedo, M. Gueimonde, C. G. de los Reyes-Gavilan // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – Vol. 79, N 23. – P. 7518–7524.

183. Riviere, A. *Bifidobacteria* and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human / A. Riviere, M. Selak, D. Latin F. Leroy, L. De Vuyst // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1–21.

184. Rivière, A. Complementary mechanisms for degradation of inulin-type fructans and arabinoxylan oligosaccharides among bifidobacterial strains suggest bacterial cooperation / A. Rivière, M. Selak, A. Geirnaert, P. Van den Abbeele, L. De Vuyst // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2018. - Vol. 84 (issue 9). - P. 1-16.
185. Rivière, A. Mutual cross-feeding interactions between *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCC2705 and *Eubacterium rectale* ATCC 33656 explain the bifidogenic and butyrogenic effects of arabinoxylan oligosaccharides / A. Rivière, M. Gagnon, S. Weckx, D. Roy, L. De Vuyst // *Academic Emergency Medicine.* - 2015. - Vol. 81. - P. 7767–7781.
186. Routy, J. P. Clinical relevance of kynurenine pathway in HIV/AIDS: an immune checkpoint at the crossroad of metabolism and inflammation / J. P. Routy, V. Hehraj, K. Vyboh, W. Cao, I. Kema, M. A. Jenabian // *AIDS Review.* - 2015. - Vol. 17. - P. 96–106.
187. Sampson, T. R. Control of brain development, function and behavior by the microbiome / T. R. Sampson, S. K. Mazmanian // *Cell Host Microbe.* - 2015. - Vol. 5 (17). - P. 565–576.
188. Santos, A. Effectiveness of nutritional treatment and synbiotic use on gastrointestinal symptoms reduction in HIV-infected patients: randomized clinical trial / A. Santos, E. A. Silveria, M. O. Falco, M. W. Nery, M. D. Turchi // *Clinical Nutrition.* - 2017. - Vol. 36 (3). - P. 680 - 685.
189. Sarcar, A. *Bifidobacteria* – insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action / A. Sarcar, S. Mandal // *Microbiol. Research.* - 2016. - Vol. 192. - P. 159–171.
190. Schmid, J. Microbial exopolysaccharides: from genes to applications / J. Schmid, J. Farina, B. Rehm V. Sieber // *Frontiers in Microbiology.* - 2016. - Vol. 7. - P. 1–3.
191. Schunter, M. Randomized pilot trial of a symbiotic dietary supplement in chronic HIV-1 infection / M. Schunter, H. Chu, T. L. Hayes D. McConnell, S. S. Crawford, P. A. Luciw, S. Bengmark, D. M. Asmuth, J. Brown, C. L. Bevins, B. L. Shacklett, J. W. Critchfield // *Complementary and Alternative Medicine.* - 2012. - Vol. 12. - P. 84.
192. Scutto, A. In silico mining and characterization of bifidobacterial lipoprotein

with CHAP domain secreted in an aggregated form / A. Scuotto, P. C. Romond, S. Djourie, M. Alric, M. B. Romond // *Int. J. Biol. Macromolecul.* – 2016. – Vol. 82. – P. 653–662.

193. Serrano-Villar, S. Gut bacteria metabolism impacts immune recovery in HIV-infected individuals / S. Serrano-Villar, D. Rojo, M. Martínez-Martínez, S. Deusch, J. F. Vázquez-Castellanos, R. Bargiela, T. Sainz, M. Vera, S. Moreno, V. Estrada, M. J. Gosalbes, A. Latorre, J. Seifert, C. Barbas, A. Moya, M. Ferrer // *EBioMedicine.* – 2016. – Vol. 8. – P. 203–216.

194. Sharikova, L. *Lactobacillus acidophilus* La 5 and *Bifidobacterium lactis* Bb 12 cell surface hydrophobicity and survival of the cells under adverse environmental conditions / L. Sharikova, M. Grube, M. Gayare, L. Auzina, P. Zikmanis // *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 40 (issue 1). – P. 85–93.

195. Shen, Z. H. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation / Z. H. Shen, Ch. Zhu, Y. Quan Z. Y. Yang, S. Wu, W. W. Luo, B. Tan, X. Y. Wang // *World J. Gastroenterol.* – 2018. – Vol. 1, N 24. – P. 5–14.

196. Shimada, Y.  $\alpha$ -*N*-Acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* specifically hydrolyzes  $\alpha$ -linked *N*-acetylglucosamine at nonreducing terminus of *O*-glycan on gastric mucin / Y. Shimada, Y. Watanabe, T. Wakinaka, Y. Funeno, M. Kubota, T. Chaiwangsri, S. Kurihara, K. Yamamoto, T. Katayama, H. Ashida // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2015. – Vol. 99 (9). – P. 3941 – 3948.

197. Sinha, A. Association of gut microbiota dependent metabolites and atherosclerosis in HIV / A. Sinha, Y. Ma, R. Scherzer S. Hur, S. Deeks, P. Ganz, P. Hsue // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2016. – Vol. 67 (13), N 2. – P. 2240.

198. Spurbeck, R.R. A moonlighting enolase from *Lactobacillus gasseri* does not require enzymatic activity to inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells / R. R. Spurbeck, P. T. Harris, K. Raghunathan D. N. Arvidson, C. G. Arvidson // *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* – 2015. – Vol. 7 (3). – P. 193–202.

199. Stiksrud, S. Reduced levels of D-dimer and changes in gut microbiota composition after probiotic intervention in HIV-infected individuals on stable ART / S.

- Stiksrud, P. Nowak, F. C. Nwosu, D. Kvale, A. Thalme, A. Sonnerborg, P. M. Ueland, K. Holm, S. E. Birkeland, A. E. Dahm, P. M. Sandset, K. Rudi, J. R. Hov, A.M. Dyrholm-Riise, M. Troseid // *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2015. – Vol. 4 (70). – P. 329–337.
200. Surendran, N. M. Antivirulence properties of probiotics in combating microbial pathogenesis / N. M. Surendran, M. A. Amalaradjou, K. Venkitanarayanan // *Advances in Applied Microbiology*. – 2017. – Vol. 98. – P. 1- 29.
201. Tabasco, R. Competition mechanisms of lactic acid bacteria and bifidobacteria: fermentative metabolism and colonization / R. Tabasco, P. F. de Palencia, J. Fontecha, C. Peláez, T. Requena // *LWT-Food Science and Technology*. – 2014. – Vol. 55 (2). – P. 680–684.
202. Tahoun, A. Capsular polysaccharide inhibits adhesion of *Bifidobacterium longum* 105-A to enterocyte-like Caco-2 cells and phagocytosis by macrophages / A. Tahoun, H. Masutani, H. El-Sharkawy, T. Gillespie, R. P. Honda, K. Kuwata, M. Inagaki, T. Yabe, I. Nomura, T. Suzuki // *Gut Pathogens*. – 2017. – Vol. 9. – P. 1–17.
203. Tanca, A. Potential and active functions in the gut microbiota of a healthy human cohort / A. Tanca, M. Abbondio, A. Palomba, C. Fraumene, V. Manghina, F. Cucca, E. Fiorillo, S. Uzzau // *Microbiome*. – 2017. – Vol. 5. – P. 79 – 94.
204. Tian, P. *Bifidobacterium* with the role of 5-hydroxytryptophan synthesis regulation alleviates the symptom of depression and related microbiota dysbiosis / P. Tian, G. Wang, J. Zhao, H. Zhang, W. Chen // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2019. – Vol. 66. – P. 43-51.
205. Turrone, F. *Bifidobacteria* and their role in the human gut microbiota / F. Turrone, D. Berry, M. Ventura // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 2148.
206. Turrone, F. *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 modulates the host innate immune response / F. Turrone, V. Taverniti, P. Ruas-Madiedo, S. Duranti, S. Guglielmetti, G.A. Lugli, L. Gioiosa, P. Palanza, A. Margolles, D. Sinderen, M. Ventura // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – Vol. 2 (80). – P. 730–740.
207. Vazquez-Gutierrez, P. The extracellular proteome of two *Bifidobacterium* species reveals different adaptation strategies to low iron conditions / P. Vazquez-Gutierrez,

- M. J. A. Stevens, P. Gehrig, S. Barkow-Oesterreicher, C. Lacroix, C. Chassard // *BMC Genomics*. – 2017. – Vol. 18. – P. 41–52.
208. Vinusha, K.S. Proteomic studies on lactic acid bacteria: a review / K. S. Vinusha, K. Deepika, T. S. Johnson, G. K. Agrawal, R. Rakwal // *Biochemistry and Biophysics Report*. – 2018. – Vol. 14. – P. 140–148.
209. Vujkovic-Cvijin, I. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism / I. Vujkovic-Cvijin, R. M. Dunham, S. Iwai, M. C. Maher, R. G. Albright, M. J. Broadhurst, R. D. Hernandez, M. M. Lederman, Y. Huang, M. Somsouk, S. G. Deeks, P. W. Hunt, S. V. Lynch, J. M. McCune // *Science Translation Medicine*. – 2013. – Vol. 5 (193). – P. 1–12.
210. Wang, L. Q. Influence of cell surface properties on adhesion ability of bifidobacteria / L. Q. Wang, X. C. Meng, B. R. Zhang // *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 26. – P. 1999–2007.
211. Wei, X. Proteomic analysis of the interaction of *Bifidobacterium longum* NCC2705 with the intestine cells Caco-2 and identification of plasminogens receptor / X. Wei, X. Yan, X. Chen, Z. Yang, H. Li, D. Zou, X. He, S. Wang, Q. Cui, W. Liu, D. Zhurina, X. Wang, X. Zhao, L. Huang, M. Zeng, Q. Ye, C. U. Riedel, J. Yuan // *J. Proteomics*. – 2014. – Vol. 108. – P. 89–98.
212. Wilson, N. L. A systematic review of probiotics as a potential intervention to restore gut health in HIV-infection / N. L. Wilson, L. D. Moneyham, A. W. Alexandrov // *J. Association Nurses in AIDS care*. – 2013. – Vol. 19, issue 2. – P. 98–111.
213. Wong, Ch. B. Beneficial effects of *Bifidobacterium longum* susp. *longum* BB536 on human health: modulation of gut microbiome as the principal action / Ch. B. Wong, T. Odamaki, J. Xiao // *Journal of Functional Foods*. – 2019. – Vol. 506-519.
214. Yahfoufi, N. Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation / N. Yahfoufi, J. F. Mallet, E. Graham C. Matar // *Current Opinion in Food Science*. – 2018. – Vol. 20. – P. 82–91.
215. Yamada, C. Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum* / C. Yamada, A. Gotoh, M. Sakanaka, M. Hattie, K.A. Stubbs, A. Katayama-Ikegami, J.

- Hirose, S. Kurihara, T. Arakawa, M. Kitaoka, S. Okuda, T. Katayama, S. Fushinobu // Cell Chemical Biology. – 2017. – Vol. 24 (4). – P. 515–524.
216. Yang, L. HIV-induced immunosuppression is associated with colonization of the proximal gut by environmental bacteria / L. Yang, M. Poles, G. S. Fisch, Y. Ma, C. Nossa, J.A. Phelan, Z. Pei // AIDS. – 2016. – Vol. 1 (30). – P. 19–29.
217. Yilmaz, C. Determination of tryptophan derivatives in kynurenine pathway in fermented foods using liquid chromatography tandem mass spectrometry / C. Yilmaz, V. Gokmem // Food Chemistry. – 2018. – Vol. 243. – P. 420–427.
218. Yu, G. Anal microbiota profiles in HIV-positive and HIV-negative MSM / D. Fadrosch, B. Ma, J. Ravel, J. J. Goedert // AIDS. – 2014. – Vol. 5 (28). – P. 753–760.
219. Zevina, A.S. Microbial translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation / A. S. Zevina, L. McKinnon, A. Burgener, N. R. Klatt // Current Opinion HIV AIDS. – 2016. – Vol. 11. – P. 182–190.
220. Zhang, H. The identification of six novel proteins with fibronectin or collagen type I binding activity from *Streptococcus suis* serotype 2 / H. Zhang, J. Zheng, L. Yi, Z. Ma, H. Fan, C. Lu // J. Microbiol. – 2014. – Vol. 52 (11). – P. 963–969.
221. Zhou, M. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: a mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways / M. Zhou, B. Yan, J. W.C. Wong, Y. Zhang // Bioresource Technology. – 2018. – Vol. 248, part A. – P. 68 – 78.
222. Zhu, D. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* KLDS 2.0603, a probiotic strain with digestive tract resistance and adhesion to the intestinal epithelial cells / D. Zhu, Y. Sun, G. C. Huo, L. Yang, F. Liu, A. Li, X. C. Meng // J. Biotechnology. – 2016. – Vol. 220. – P. 49–50.
223. Zhu, D. Identification of surface-associated proteins of *Bifidobacterium animalis* KLDS 2.0603 by enzymatic shaving / D. Zhu, Y. Sun, F. Liu, A. Li, L. Yang, X. C. Meng // J. Dairy Science. – 2016. – Vol. 99 (issue 7). – P. 5155–5172.
224. Zilberman-Schapira, G. The gut microbiome in human immunodeficiency virus infection / G. Zilberman-Schapira, N. Zmora, S. Itav, S. Bashiardes, H. Elinav, E. Elinav // BMC Medicine. – 2016. – Vol. 14. – P. 83–94.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Я, (ФИО респондента) \_\_\_\_\_

Я, являюсь законным представителем несовершеннолетнего (ФИО) \_\_\_\_\_

Возраст ребенка \_\_\_\_\_

Настоящим подтверждаю свое добровольное согласие принять участие в анкетировании кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии.

Мне разъяснены цель, задачи, методика исследования. Я согласен (а) ответить на все вопросы

Дата заполнения \_\_\_\_\_

Подпись \_\_\_\_\_

### 1. Социально-демографическая информация о родителях

1.1	Сколько Вам полных лет?			
1.2	Какое у Вас образование?	Неполное среднее		
		Среднее		
		Средне-специальное		
		Высшее		
1.3	Семейное положение	Замужем		
		Незамужем		
		Гражданский брак		
		Вдова		
		Другое		
1.4	Какое образование у отца ребенка?	Неполное среднее		
		Среднее		
		Средне-специальное		
		Высшее		
1.4	Какой в семье доход на одного члена семьи?	Один прожиточный минимум		
		Два прожиточных минимума		
		Три прожиточных минимума		
		Другое		
1.5	Употребляли ли Вы наркотические средства во время беременности?	Да		
		Нет		
1.6	Употребляете ли сейчас наркотические средства?	Да		
		Нет		
1.7	Употреблял ли наркотические средства отец ребенка?	Да		
		Нет		
		Не знаю		
1.8	Употребляет ли наркотические средства отец ребенка в настоящее время?	Да		
		Нет		
		Не знаю		



**2. Характер вскармливания ребенка**

2.1	Кормили ли Вы ребенка грудью?	Да		
		Нет		
2.2	По какой причине Вы не кормили ребенка грудью?	Отсутствие молока		
		Отказ ребенка		
		Медикаментозное прекращение лактации		
		Сама не пожелала		
		Другое		
2.3	Какие детские смеси Вы использовали? (перечислить названия)			

**3. Частота употребления продуктов в настоящее время**

№	Продукт	Частота употребления продукта	Ответ	
3.1.	Молоко/кефир	Один раз в день		
		Несколько раз в неделю		
		Один раз в неделю		
		Один раз в месяц		
		Никогда		
3.2.	Творог	Один раз в день		
		Несколько раз в неделю		
		Один раз в неделю		
		Один раз в месяц		
		Никогда		
3.3	Мясо (говядина, свинина, птица)	Один раз в день		
		Несколько раз в неделю		
		Один раз в неделю		
		Один раз в месяц		
		Никогда		
3.4	Колбаса/сосиски	Один раз в день		
		Несколько раз в неделю		
		Один раз в неделю		
		Один раз в месяц		
		Никогда		
3.5	Рыба	Один раз в день		
		Несколько раз в неделю		
		Один раз в неделю		
		Один раз в месяц		

		Никогда		
3.6	Макароны, крупы	Один раз в день		
		Несколько раз в неделю		
		Один раз в неделю		
		Один раз в месяц		
		Никогда		
3.7	Овощи (кроме картофеля)	Один раз в день		
		Несколько раз в неделю		
		Один раз в неделю		
		Один раз в месяц		
		Никогда		
3.8	Сладости (конфеты, кондитерские изделия, варенье)	Один раз в день		
		Несколько раз в неделю		
		Один раз в неделю		
		Один раз в месяц		
		Никогда		
3.9	Фрукты, ягоды	Один раз в день		
		Несколько раз в неделю		
		Один раз в неделю		
		Один раз в месяц		
		Никогда		