

На правах рукописи

ЗАХАРОВА

Юлия Викторовна

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

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Кемерово - 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук,
доцент

Леванова Людмила Александровна

Официальные оппоненты:

Червинец Вячеслав Михайлович - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий кафедрой

Перунова Наталья Борисовна - доктор медицинских наук, профессор Российской академии наук, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, лаборатория биомониторинга и внутриклеточного симбиоза, ведущий научный сотрудник (с исполнением обязанностей заведующего лабораторией)

Ипполитов Евгений Валерьевич – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, профессор

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Курский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2019 г. в «__» часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Bottacini F. et al. 2014; Алешкин В.А. и др., 2015; Бухарин О.В. и др., 2015, 2017; Arbolea S. et al., 2018). Представители рода *Bifidobacterium* относятся к доминирующей микрофлоре кишечника, которые формируют сложные межмикробные связи и вступающие в различные типы взаимоотношений с другими представителями кишечного микробиоценоза (Караулов А.В. и др., 2015; Turroni F., 2017; Булатова А.М. и др., 2018). 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 представителей рода *Bifidobacterium* (Tabasco R. et al., 2014; Bondue P. et al., 2015, Zhu D. et al., 2016; Riviere A. et al., 2018). Бифидобактерии путем прямого или опосредованного воздействия модулируют факторы персистенции, поверхностные свойства, биопленкообразующую активность, а также количественное содержание факультативной кишечной микрофлоры (Прокопенко К.М. и др., 2015; Марков А.А. и др., 2018). Продукты обмена веществ бифидобактерий используются в качестве субстрата представителями кишечного микробиоценоза, что является вариантом «перекрестного питания» и регулирования микробиоценоза (Riviere A. et al., 2015; O'Callaghan A. et al., 2016; Milani C. et al., 2017). Таким образом, бифидобактерий рассматривают как естественных биорегуляторов 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 вируса иммунодефицита человека (Lozurone C.A. et al. 2014; Nowak P. et al., 2015). Кроме того, ингибирующее действие на микробиоту кишечника оказывают антиретровирусные препараты, потенцируя развитие микрoэкологических нарушений (Gori A. et al., 2008). Нарушается структура микробиоценоза, отмечается изменение метаболизма микрофлоры при ВИЧ-инфекции. Снижается способность кишечных бактерий синтезировать некоторые аминокислоты, отмечают снижение экспрессии 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 (Dillona S.M. et al., 2016; Козлов В.А. и др., 2017; Yilmaz S. et al., 2018). Микрофлора, попадая в кровоток, способствует развитию хронической иммунной дисфункции, растут риски развития смерти у ВИЧ-инфицированных (Hunt P.W. et al., 2014; Burgener A. et al., 2015), в связи с этим очевидна необходимость коррекции у них микрофлоры кишечника. Однако имеются противоречивые данные по использованию пробиотических бифидобактерий у ВИЧ-позитивных пациентов (Gori A. et al., 2008; Stiksrud S. et al., 2015). Обусловлено это недостаточностью данных о роли бифидобактерий в регулировании кишечного микробиоценоза при ВИЧ-инфекции и о их 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 (Dillona S. M. et al. 2016). Увеличивается количественный уровень представителей рода *Prevotella* (Dinh D. et al., 2015), снижается уровень *Bacteroides spp.* (Paquin-Proulx D. et al., 2017). Данные микроорганизмы играют ключевую роль в поддержании адаптивного иммунитета, индуцируя превращение CD4⁺ 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 (Monaco C.L. et al., 2016). Большинство исследователей отмечают у ВИЧ-инфицированных увеличение удельного веса протеобактерий (Goedert J. J. et al., 2016; Dillona S. M. et al. 2016; Duborg G., 2017). У нелеченных и прошедших курс антиретровирусной терапии ВИЧ-инфицированных пациентов увеличивается содержание не только индигенных и условно-патогенных представителей энтеробактерий рода *Escherichia*, *Klebsiella*, но также отмечается рост частоты колонизации слизистой патогенными микроорганизмами родов *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.* (Lozupone C. A. et al., 2014; Нурузова З. А. и др., 2017). В экспериментах *in vitro* установлено, что *Escherichia coli* индуцирует увеличение репликации ВИЧ-1 (Monaco C.L. et al., 2016). Уровень липополисахарида энтеробактерий в кровотоке ВИЧ-инфицированных коррелирует со смертностью пациентов и с развитием у них гипертонии (Nguyen K.A. et al., 2015). Секвенирование содержимого кишечника ВИЧ-инфицированных свидетельствуют об изменениях микробиома, которые сохраняются даже при краткосрочных курсах антиретровирусной терапии (Lozupone C. A. et al., 2014; Goedert J. J., 2016; Neff C. P. et al., 2018).

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 (Dillona S. M. et al. 2016; Yilmaz C. et al., 2018). При этом у ВИЧ-инфицированных пациентов в кишечнике накапливаются продукты кинуренинового пути окисления триптофана, тогда как у здоровых людей данные продукты не регистрируются (Dillona S. M. et al. 2016). Продукты катаболизма триптофана подавляют Т-клеточный ответ при аутоиммунных заболеваниях, отторжении трансплантата, вирусных инфекциях, а при ВИЧ-инфекции способствуют прогрессированию заболевания (Козлов В. А. и др., 2017; Abdulla A., et al., 2018). Обнаружено, что более 140 родов микроорганизмов имеют отношение к метаболизму триптофана (Vujkovic-Cvijin I. et al., 2013). 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 (Duborg G., 2016).

Очевидно, что пациенты с ВИЧ-инфекцией нуждаются в коррекции микрoэкологических нарушений кишечника. Однако в 39 рандомизированных контролируемых исследованиях влияния пробиотикотерапии на течение ВИЧ-инфекции и возможность бактериальной транслокации получены противоречивые результаты – от положительного эффекта до его отсутствия (Stiksrud S. et al., 2015). На основе мета-анализа однозначно было доказано отсутствие рисков развития сепсиса, что позволило

говорить о пробиотиках, как о перспективных средствах при лечении ВИЧ-инфекции (Patel A. R. et al., 2014).

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, направленные на изучение механизмов взаимодействий бифидобактерий с другими представителями кишечного сообщества, для определения принципов и средств 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 микробиологических 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. Беляева» 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. Беляева» 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, этап обработки полученной информации, анализ полученных данных, этап разработки практических рекомендаций. В работе использованы микробиологические (бактериологические, биологические), физико-химические (хроматографические, спектральные) и статистические методы исследования.

Штаммы микроорганизмов, экспериментальные животные, коммерческие препараты

В работе использованы 2 коллекционных штамма бифидобактерий из Государственной коллекции нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.

Габричевского Роспотребнадзора, 1 штамм из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ, 16 пробиотических культур, выделенных из коммерческих препаратов и биологически активных добавок.

Исследование эффектов белково-пептидных комплексов, выделенных из супернатантов бифидобактерий, осуществляли на мышах имбредной линии BALB/c (6-8 недель, масса тела 18-20 г). Эксперименты на животных велись с соблюдением норм биоэтики (протокол комитета по этике № 166/к от 27.01.2016).

В опытах были использованы следующие коммерческие препараты: диклофенак натрия, этилметилгидроксипиридина сукцинат (торговое название «Мексидол»®).

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.

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

Исследованы образцы фекалий от 89 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. Группу сравнения составили 74 ребенка без ВИЧ-статуса. Исследование вели в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта исследования» (1964 г. с поправками от 2013 г.). 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, готовили разведения от 10^{-1} до 10^{-9} и засеивали на селективные или дифференциально-диагностические среды.

Микробиологические методы исследования

Выделение бифидобактерий из фекалий и определение их количественного содержания осуществляли методом серийных разведений с использованием Бифидум-среды (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посевы культивировали в анаэробной атмосфере в анаэроштатах (BVL, США) при температуре 37°C в течение двух суток. Принадлежность к роду *Bifidobacterium* оценивали по наличию специфического фермента фруктозо-6-фосфат фосфокетолазы (Ф-6-ФФК), который определяли по Scardovi (1986). Также принадлежность к роду определяли по биохимическим свойствам с помощью тест-системы API 20 A (bioMérieux, Франция). Идентификацию микроорганизмов рода *Bifidobacterium* проводили с помощью коммерческих тест-систем АНАЭРО-TEST 23 (Lachema diagnostica s.r.o., Чехия), API 20 A (bioMérieux, Франция).

Выделение пробиотических бифидобактерий проводили из лекарственных препаратов и БАДов: Линекс® (Словения), Линекс® форте (Германия), ПробиоЛог® (Франция), Бак Сет форте™ (Великобритания), Бак Сет беби® (Великобритания), Максилак® (Польша), Бифидумбактерин™ (Россия), Примадофиллус® Бифидус (США).

Идентификацию микроорганизмов рода *Bifidobacterium* проводили по биохимическим свойствам с использованием коммерческих тест-систем АНАЭРО-TEST 23 (Lachema diagnostica s.r.o., Чехия), API 20 A (bioMerieux, Франция).

Изоляцию кишечных микросимбионтов осуществляли с использованием селективных и дифференциально-диагностических питательных сред. Энтеробактерии выделяли на среде Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), энтерококки на Энтерококкагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), стафилококки на желточно-солевом агаре, лактобациллы, пропионибактерии, актиномицеты, бактероиды на среде MRS (HIMEDIA, Индия). Гемофилов 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 кишечных 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* 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», Россия),

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

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

Изучение биологических свойств микроорганизмов. Изучены биологические свойства 119 культур бифидобактерий и 274 культур условно-патогенных микроорганизмов. Изучение показателей специфической адгезии бифидофлоры проводили по В. И. Брилису (1986), антагонизм, кислотообразование исследовали согласно ОФС 1.7.2.0009-15: Общая фармакопейная статья. «Определение специфической активности пробиотиков» (М., 2015). Антиоксидантная активность штаммов изучена по оригинальной авторской методике «Способ количественного определения антиоксидантной активности микроорганизмов» (патент на изобретение РФ № 2465593 от 27.10.2012 г.). Продукцию лизоцима исследовали полуколичественным методом по З. В. Ермольевой и И. С. Буяновской (1946), биосовместимость кишечных и пробиотических бифидобактерий по Н. А. Глушановой (1999). Исследование гемолитической активности микроорганизмов проводили на МПА с добавлением 5% взвеси эритроцитов человека. Изучение способности УПМ продуцировать липазу и ДНКазу определяли на Tributyrin Agar Base without Tributyrin (HIMEDIA, Индия) и DNA Base Agar (HIMEDIA, Индия) соответственно. Количественную характеристику липазной активности изучали спектрофотометрическим методом с использованием набора «LIPASA liquicolor» (HUMAN, Германия) на приборе СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия). Выделение липаз стафилококков проводили с помощью аффинного сорбента на основе Toyopearl HW-55 с иммобилизованным дициловым фрагментом.

Оценку альфа-разнообразия - разнообразия внутри сообщества микроорганизмов осуществляли по R. Whittaker (1972) с использованием индекса разнообразия кишечного микробиоценоза Маргалефа (Mg), Менхиника (Mn) и по индексу Симпсона (D).

Постоянство микробных видов в кишечном микробиоценозе оценивали по Р. Дажо (1975) в модификации Ю. Одум (1986).

Супернатанты бифидобактерий получали центрифугированием бульонной культуры при 3000 gm в течение 20 минут. Выделение белково-пептидных комплексов из супернатантов проводили на Сефадексе G 100, с последующим осаждением ацетоном (х.ч). Психотропную активность исследовали по тесту отчаяния по R. D. Porsolt (1977), противовоспалительную активность экзометаболитов бифидобактерий изучали в модели «острое формалиновое воспаление лапы» крыс по Г. Я. Шварц (2000).

Физико-химические методы исследования

Изучение гидрофобности клеточных стенок бактерий проводили по M. Rosenberg et al. (1980) с модификациями L-Q. Wang et al. (2010). Изучение аутоагрегации бифидобактерий по Del Re et al. (2000).

Изучение строения липотейхоевых кислот бифидобактерий осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ИК-спектроскопией с Фурье преобразованием (ИК-ФТ). ИК-ФТ выполнена на приборе ФСМ-1202 (Инфраспек, Россия). Определение жирнокислотного состава клеточных стенок бифидобактерий проведено методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) на хроматомасс-спектрометре Agilent 7000B (Германия). Исследование аминокислот, синтезируемых бифидобактериями, выполнено методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ-ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence, (Япония) с диодно-матричным детектированием.

Статистические методы исследования

На начальном этапе статистической обработки полученной информации для создания базы данных применяли программы Microsoft Office Excel 2003 (лицензионное соглашение 74017-640-0000106-57177). 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 перцентилями (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 χ^2). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена использовали для анализа связей между адгезией и содержанием микроорганизмов, а также между адгезией и липазной активностью. Сравнение вероятности развития оппортунистических инфекций в сравниваемых группах проводили по величине относительного риска (RR – relative risk).

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 хроматографические (ВЭЖХ, ГХ-МС, тонкослойную хроматографию) и спектральные методы исследования (спектроскопическая фотометрия и инфракрасная спектроскопия). Эксперименты на животных велись с соблюдением норм биоэтики (протокол комитета по этике № 166/к от 27.01.2016 г.).

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 осуществляли 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 ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава РФ 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).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 36 печатных работ, в том числе 17 публикаций в изданиях, включенных в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК, 5 – в рецензируемых журналах, 9 – в материалах конференций, 2 патента на изобретение РФ, 3 - методические рекомендации.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертационной работы изложены на 218 страницах, иллюстрированы 28 таблицами, 17 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 224 источника, из которых 110 отечественных, 114 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика кишечного микробиоценоза ВИЧ-инфицированных детей

Обследовано 89 детей с ВИЧ-инфекцией, средний возраст которых составил 24 ± 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 ± 94 г. Дети на момент исследования имели преимущественно мясо-молочный рацион питания. 71 ребенок (79,8%) получал стандартную (базовую) терапию при ВИЧ-инфекции – два нуклеозидных ингибитора обратной транскриптазы + один нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы или один ингибитор протеазы. Дети были неорганизованны. Семьи в 73% были полными. Все дети с ВИЧ-статусом при включении в основную группу были обследованы на гельминтоз. Те, 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 ± 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 ± 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.

У ВИЧ-инфицированных детей отсутствовали статистически значимые отличия по содержанию микроорганизмов, по числу таксонов и по индексам разнообразия Маргалефа и Менхиника (Таблица 1).

Таблица 1 – 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 $p=0,001$

Данные индексы не учитывают обилие отдельных таксонов. Однако количественный уровень отдельных культивируемых симбионтов учтен индексом Симпсона. Он свидетельствует о значимых отличиях в выравненности таксонов

кишечного микробиоценоза ВИЧ-инфицированных детей и детей группы сравнения. Чем меньше показатель, тем выше выравненность 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. 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 выявлено снижение содержания облигатно-анаэробных бактерий и увеличение факультативных анаэробов.

Установлено, что 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 ($U=0,29$; $p=0,77$). Среди анаэробных микроорганизмов 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 средним содержанием 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 обнаружения представителей рода *Lactobacillus* до 77,5%, тогда как у детей группы сравнения они были обнаружены в 93,2% случаев. Содержание данных микросимбионтов у ВИЧ-положительных и ВИЧ-негативных детей было снижено и составило 6 (6; 8) lg КОЕ/г ($U=0,58$; $p=0,56$).

Типичную кишечную палочку выделяли из кишечного содержимого у 81% ВИЧ-положительных детей и 97,3% ВИЧ-негативных детей ($\chi^2=0,2$, $df=1$, $p=0,65$). В 20,2% случаев в кишечном микросимбиоценозе ВИЧ-положительных детей обнаруживали кишечные палочки со слабыми ферментативными свойствами, в 30,3% случаев – *E. coli hly+*. У ВИЧ-негативных детей частота обнаружения *E. coli lac-* составила 4,1% ($\chi^2=148$, $df=1$, $p=0,001$), *E. coli hly+* достигала 22,9% ($\chi^2=0,7$, $df=1$, $p=0,8$). Количественные уровни кишечных палочек с измененными свойствами в основной группе составили 8 (6; 8) lg КОЕ/г и 7 (6; 8) lg КОЕ/г соответственно, а у ВИЧ-негативных детей были на один lg ниже - 7 (6; 7) lg КОЕ/г и 6 (5; 7) lg КОЕ/г соответственно ($U=2,21$; $p=0,03$). Микроорганизмы рода *Klebsiella* обнаружены в кишечнике 33,7% детей с ВИЧ-инфекцией в количестве 8 (7; 9) lg КОЕ/г. Однако, практически такие же показатели регистрировали и в группе сравнения. Частота выделения клебсиелл составила 37,8%, а их концентрация – 8 (7; 8) lg КОЕ/г ($U=0,16$; $p=0,88$). Фекальные энтерококки обнаруживали у 91% детей с ВИЧ-инфекцией и 93,2% детей группы сравнения, количественное содержание данных бактерий составило 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 ($U=0,76$; $p=0,32$).

У ВИЧ-инфицированных зарегистрирована высокая распространенность микроорганизмов рода *Staphylococcus* (102,7 стафилококков на 100 детей), так как в 24,7% случаев у одного ребенка выделяли по 2 и более видов стафилококков. В группе сравнения распространенность была ниже и составляла 77,6 штаммов на 100 детей ($\chi^2=4,69$, $df=1$, $p=0,03$), что было связано с выделением преимущественно одного вида

стафилококка. Количественный уровень *Staphylococcus spp.* у ВИЧ-положительных детей составил 5 (2; 5) lg КОЕ/г (U=0,05; p=0,96). При ВИЧ-инфекции регистрировали 9 видов (Рисунок 1), у детей группы сравнения – 6 видов стафилококков.

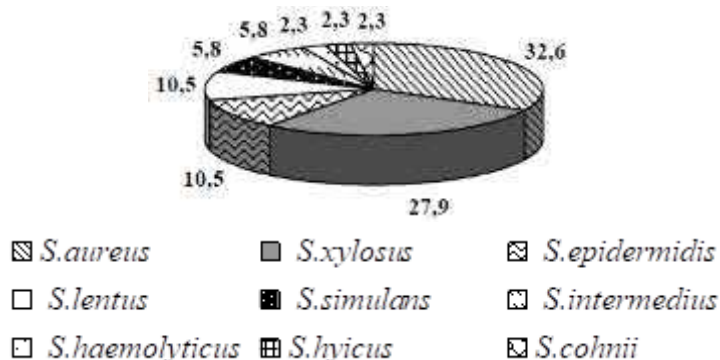


Рисунок 1 - Структура стафилококков у ВИЧ-положительных детей (%)

В структуре стафилококков, независимо от ВИЧ-статуса, доминировали *S. aureus*. Второе место 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 2).

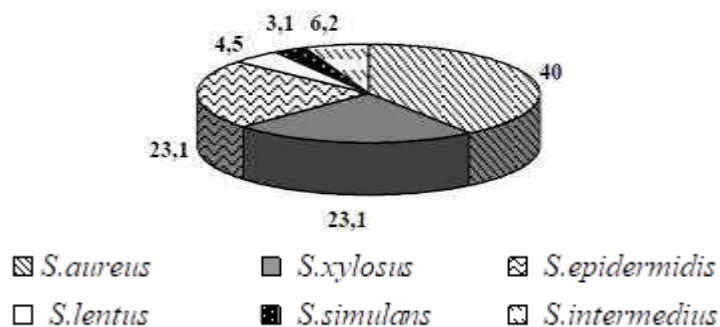


Рисунок 2 - Структура стафилококков у ВИЧ-негативных детей (%)

Кишечник является основным резервуаром грибов рода *Candida*. Установлено наличие значимых отличий по содержанию данных микромицетов у ВИЧ-инфицированных детей. Грибы рода *Candida* были выделены из кишечного содержимого 69,7% ВИЧ-положительных детей с уровнем равным 5 (3; 6) lg КОЕ/г. В группе сравнения данные показатели составили 58,1% и 3 (3; 4) lg КОЕ/г соответственно (U=2,57; p=0,01). В целом у ВИЧ-инфицированных детей грибы рода *Candida* были представлены 6 видами, у детей без ВИЧ-статуса – 8 видами и неидентифицированными до вида штаммами. Распространенность грибов *Candida albicans* у ВИЧ-инфицированных детей достигала 52,8 на 100 ВИЧ-инфицированных, в группе детей без ВИЧ-статуса была в 1,6 раза ниже. Количественный уровень *C. albicans* в сравниваемых группах не отличался и составил 5 (4; 6) lg КОЕ/г (U=0,54; p=0,76). Среди *non-albicans* видов у ВИЧ-инфицированных детей доминировали *C. dubliniensis* и *C. parapsilosis*, у ВИЧ-негативных - *C. parapsilosis*.

Таким образом, у ВИЧ-позитивных детей при сохранении высоких и соответствующих нормам количественных уровней бифидобактерий регистрируется снижение содержания лактобацилл, повышение содержания эшерихий с измененными биологическими свойствами (*E. coli lac-*, *E. coli hly+*) ($p=0,03$) и грибов рода *Candida* ($p=0,01$). У 25% пациентов в кишечнике обнаруживаются по два и более видов стафилококков.

Для выявления групп риска по развитию глубоких микробиологических нарушений изучено состояние кишечного микробиоценоза у ВИЧ-инфицированных детей с разными стадиями заболевания (по В. И. Покровскому с изм., 1989). Так как группа пациентов с 2 А стадией (бессимптомная) была немногочисленна (4 человека или 4,5%), данные о состоянии кишечного микробиоценоза, в связи с не репрезентативностью группы, не приводятся.

У пациентов со 2 Б стадией ВИЧ-инфекции регистрировали снижение в кишечном микросимбиозе частоты обнаружения лактобацилл и типичных кишечных палочек (74,5% и 76,5% соответственно), содержание эшерихий было высоким и составило 9 (8; 11) lg КОЕ/г. Отмечали высокую частоту и количественный уровень УПМ (стафилококков, энтеробактерий, грибов рода *Candida*). При анализе структуры степеней дисбактериоза установлены одинаковые доли лиц со II и III степенями микробиологических нарушений кишечника (45,1% и 41,1% соответственно).

При 2 В стадии ВИЧ-инфекции, по сравнению с 2 Б стадией, практически не изменялась частота и содержание лактобацилл, энтерококков. Увеличивалось до 73,4% число лиц с дефицитом бифидобактерий, поэтому численность *Bifidobacterium spp.* составила 7 (7; 8) lg КОЕ/г. Содержание типичной кишечной палочки снижалось до 7 (6; 9) lg КОЕ/г. Отмечали высокие количественные уровни микроорганизмов рода *Staphylococcus spp.* и представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Частота обнаружения грибов составила 89,3%, в 68,4% случаев это были грибы *C. albicans*. Средний количественный уровень данных микросимбионтов достигал 6 (4; 6) lg КОЕ/г. Частота микробиологических нарушений III степени при 2 В стадии возрастала в 1,7 раза и достигала 68,4% ($\chi^2=10,23$; $df=2$; $p=0,02$).

В 3 (субклинической) стадии ВИЧ-инфекции регистрировали менее выраженные качественные и количественные изменения кишечного микробиоценоза, по сравнению с другими группами. Снижалась до 23,9% доля лиц с III степенью микробиологических нарушений кишечника, у большей части детей была I - II степени дисбиоза. Отмечали увеличение содержания бифидобактерий, снижение частоты обнаружения гемолизинпродуцирующих эшерихий с 36,8% до 15,4%, а также снижение их количественных уровней. Регистрировали снижение содержания в кишечнике *S. lentus* и *S. xylosum* в 10 раз ($p=0,05$), а *S. aureus* в 100 раз ($p=0,001$). Частота обнаружения грибов рода *Candida* уменьшалась в 3 раза (до 23,1%) ($\chi^2=13,65$; $df=1$; $p=0,001$), их количественный уровень снижался на 3 lg КОЕ/г ($U=2,56$, $p=0,001$).

В 4 стадии ВИЧ-инфекции регистрировали рост частоты микробиологических нарушений II степени до 50,5%, III степени до 37,5%. Отмечали снижение частоты обнаружения бифидобактерий до 87,5%, рост содержания типичных кишечных палочек и условно-патогенных энтеробактерий. В 87,5% случаев с высокими диагностическими титрами обнаруживали грибы рода *Candida*. В 25% случаев из кишечного содержимого выделяли актиномицетов с количественными уровнями 7 и более lg.

Таким образом, у детей со 2 и 4 стадией ВИЧ-инфекции в кишечном микробиоценозе регистрируются высокая частота обнаружения и численность УПМ.

Это может вносить вклад в развитие оппортунистических инфекций бактериальной и грибковой этиологии у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Литературные данные свидетельствуют, что среди ВИЧ-инфицированных пациентов отмечается высокая распространенность бактериальных пневмоний и гнойных поражений кожи стафилококковой этиологии (Шахгильдян В.И. и др., 2015; Пузырева Л.В. и др., 2018), энтеробактерии являются возбудителями инфекций мочевыводящих путей (Л. В. Пузырева и др., 2017; Тимербулатов В. М. и др., 2017). Возникновение вторичных бактериальных инфекций связывают с высокой частотой экспрессии факторов вирулентности условно-патогенной микрофлорой на фоне иммунодефицита. Исследования показали, что в сравниваемых группах отсутствовали статистически значимые отличия по адгезивной активности энтеробактерий ($U=0,68$, $p=0,49$). В группе ВИЧ-положительных детей липазной активностью обладали 13,2% штаммов энтеробактерий, у ВИЧ-негативных детей таковых было 14,6% ($\chi^2=0,76$, $df=1$, $p=0,67$). Уровень экспрессии энтеробактериями липазы и гемолизина в сравниваемых группах не различался ($U=0,25$; $p=0,81$) и ($U=0,26$, $p=0,79$).

Отсутствовали отличия по адгезивной активности стафилококков ($U=1,81$, $p=0,07$). Среднее значение ИАМ у ВИЧ-положительных детей составило 3,54 (2,72; 4,62), у ВИЧ-негативных - 3,16 (2,3; 4,1). Также стафилококки не отличались по частоте и уровню экспрессии гемолизина ($\chi^2=2,8$, $df=1$, $p=0,09$) и ДНКазы ($\chi^2=0,02$, $df=1$, $p=0,89$). Гемолиз эритроцитов давали 91% *Staphylococcus spp.*, выделенных от ВИЧ-положительных детей и 89% штаммов от здоровых детей. 22,6% стафилококков у детей с ВИЧ-статусом синтезировали ДНКазу, у ВИЧ-негативных – 24,4% штаммов. Отличия наблюдались в частоте продукции липазы ($\chi^2=9,47$, $df=1$, $p=0,02$). Липазной активностью обладали 76% стафилококков в группе ВИЧ-инфицированных и 56% штаммов в группе сравнения. Количественная оценка липазной активности стафилококков также показала статистически значимые отличия по данному признаку ($U=2,56$, $p=0,01$). Средний уровень липазы, продуцируемой стафилококками у детей с ВИЧ-инфекцией, составил 39,49 (37,5; 41,2) Е/л, тогда как в группе сравнения данный показатель не превышал 18,69 (14,6; 20,1) Е/л.

Более высокие уровни экспрессии факторов вирулентности УПМ у детей с ВИЧ-инфекцией обуславливают высокие риски транслокации этих бактерий через слизистую кишечника. Так у ВИЧ-инфицированных детей риск транслокации энтеробактерий был в 1,9 выше, чем у ВИЧ-негативных детей. Стафилококки продуцировали два фермента инвазии - это ДНКазу и липазу. В связи с этим RR транслокации стафилококков у ВИЧ-положительных детей составил суммарно 4, так как $RR_{\text{ДНКазы}}=1,9$ (95% ДИ 1,1-2,8) и $RR_{\text{липаза}}=2,1$ (95% ДИ 1,5-3,2).

В целом частота развития дисбиоза кишечника в сравниваемых группах не отличалась. У детей чаще регистрировали нарушения микроэкологии кишечника II (41,5% у ВИЧ+ и 48,6% у ВИЧ- детей) и III степени (33,8% у ВИЧ+ и 43,3% у ВИЧ- детей) ($\chi^2=4,32$; $df=2$; $p=0,64$). Изменения в кишечном микробиоценозе в сравниваемых группах имели сходный характер – отмечали снижение частоты обнаружения и содержания индигенной микрофлоры, увеличение разнообразия и количественных уровней условно-патогенных микросимбионтов. Несмотря на сходство характера микроэкологических нарушений у ВИЧ-положительных и ВИЧ-негативных детей, представляет интерес вопрос о том, каким образом изменяется функциональная активность бифидобактерий в этих условиях. Под функциональной активностью мы понимали биологические свойства, позволяющие бифидобактериям поддерживать колонизационную резистентность и регулировать содержание условно-патогенных

микроорганизмов. Колонизирующую способность бифидофлоры оценивали по показателям гидрофобности и специфической адгезии. Регулирующее влияние бифидобактерий на численность факультативной микрофлоры оценивали по их кислотообразованию и антагонистической активности.

Установлено, что при I степени микробиологических нарушений у ВИЧ-инфицированных детей 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 дисбиоза кишечника бифидобактерии от ВИЧ-положительных детей обладали средней кислотообразующей активностью - $98,3^0 T$ (71,4; 127). У ВИЧ-негативных детей кислотообразование бифидобактерий характеризовалось как высокое и составило в среднем $101^0 T$ (86; 122,6) ($U=84$, $p=0,87$). 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 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 них регистрировали антагонизм бифидобактерий к условно-патогенным коккам и представителям семейства *Enterobacteriaceae* ($\chi^2 =2,5$; $df=1$; $p=0,02$). У ВИЧ-положительных детей при I степени микробиологических нарушений условно-патогенные микроорганизмы обнаруживались в монокультурах.

При II степени нарушений кишечной микрофлоры у бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей снижалась гидрофобность клеточной поверхности. Популяционный показатель гидрофобности у них составил 45,7% (33; 58,8) (Рисунок 3).

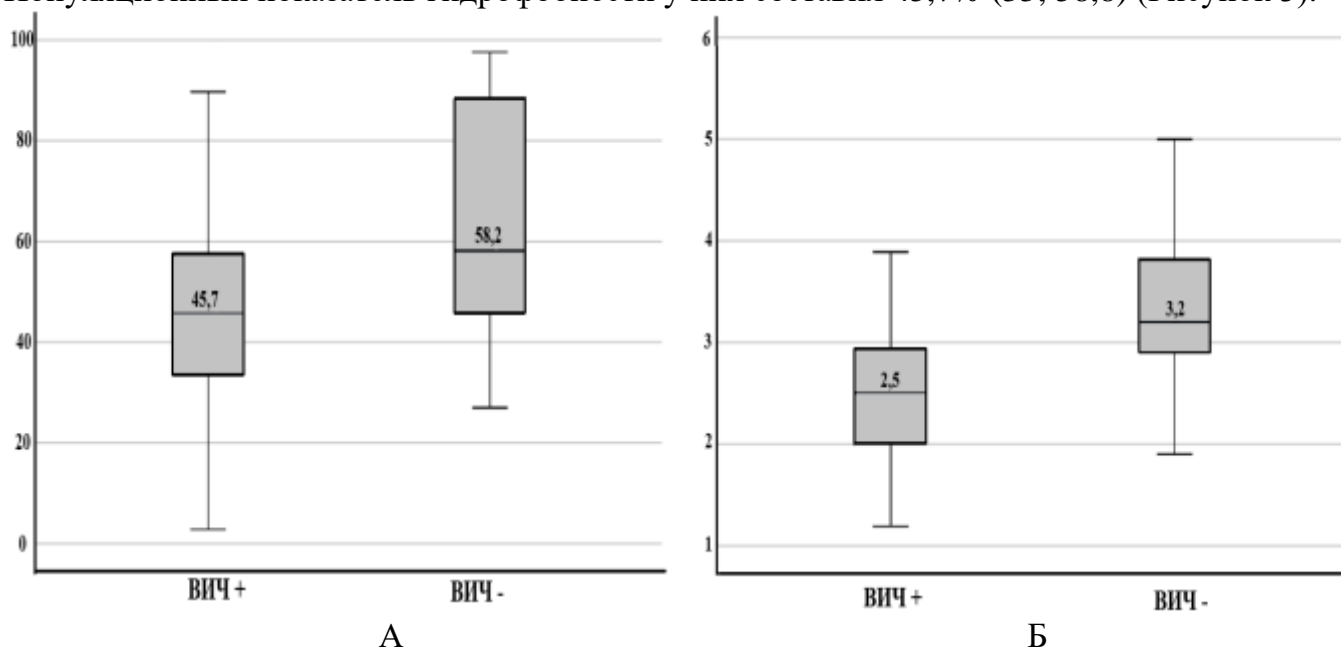


Рисунок 3 – Биологические свойства бифидобактерий у ВИЧ-положительных и ВИЧ-негативных детей при II степени дисбиоза кишечника

Примечание: А – гидрофобность (%); Б – специфическая адгезия (ИАМ)

В группе ВИЧ-негативных детей гидрофобность клеток практически не изменялась, она составляла 58,2% (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 - ИАМ составил 2,5 (2,0; 2,9). У детей без ВИЧ-статуса с усугублением микрoэкологических нарушений показатель специфической адгезии был выше и составлял 3,2 (2,9; 3,8). Индексы адгезии бифидобактерий в группе ВИЧ-негативных и ВИЧ-позитивных детей значимо отличались ($U=236$, $p=0,0001$) (Рисунок 3). Несмотря на то, что у пациентов с ВИЧ-статусом при II степени дисбиоза кислотообразование у бифидобактерий падало до $67,3^0$ Т (53,0; 97,4), тем не менее, частота формирования антагонистических взаимоотношений сохранялась на уровне 68,9%. При этом в 37,8% случаев бифидофлора проявляла антагонизм к условно-патогенным бактериям. 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 Т (81; 125,5) и расценивалась как высокая. В 70% случаев бифидобактерии проявляли антагонизм к кишечной микрофлоре, при этом в 50% случаев это был антагонизм по отношению к УПМ ($\chi^2 = 3,06$; $df=1$; $p=0,08$). У ВИЧ-инфицированных детей при II степени микрoэкологических нарушений на фоне изменений биологических свойств бифидобактерий статистически чаще формировались 4-х компонентные консорциумы из условно-патогенных микросимбионтов ($\chi^2 = 2,4$; $df=1$; $p=0,03$). В состав 4-компонентных консорциумов входили следующие микроорганизмы: *Candida spp.*, *Staphylococcus spp.* (*coag-*) и два условно-патогенных представителя семейства *Enterobacteriaceae*. Достоверно реже обнаруживались 2-х компонентные микробные ассоциации ($\chi^2=1,1$; $df=1$; $p=0,04$).

При III степени микрoэкологических нарушений бифидобактерии, изолированные от ВИЧ-позитивных детей, в 58,9% случаев характеризовались как низкогидрофобные, значение Н не превышало 22,7% (15,8; 46,6) (Рисунок 4).

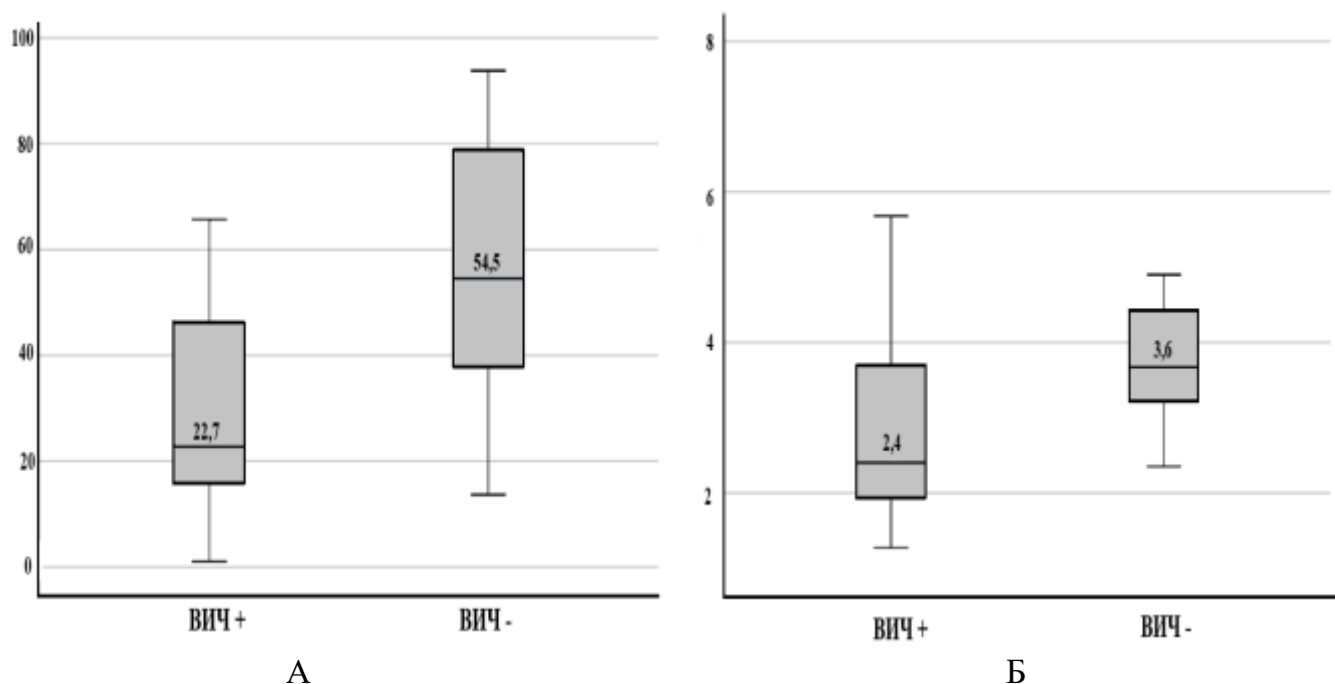


Рисунок 4 – Биологические свойства бифидобактерий у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей при III степени дисбиоза кишечника

Примечание: А – гидрофобность (%); Б – специфическая адгезия (ИАМ)

При этом в группе сравнения гидрофобность бифидобактерий была в 2 раза выше и составляла 54,6% (36,85; 76,63) ($U=146,5$, $p=0,001$). Показатель специфической адгезии у бифидобактерий ВИЧ-положительных пациентов был 2,4 (1,92; 3,69). У *Bifidobacterium spp.* ВИЧ-негативных детей показатель лиганд-рецепторной адгезии составил 3,6 (2,24; 4,18) ($U=189$, $p=0,01$) (Рисунок 4).

Кислотообразование бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей при III степени микробиологических нарушений относительно II степени не изменялось. Титруемая кислотность в среднем составила $66,3^0$ Т (48,9; 94,9). Показатель статистически значимо отличался только от показателя кислотности при I степени нарушений кишечной микрофлоры ($U=156$, $p=0,02$). У ВИЧ-негативных детей кислотообразование бифидобактерий было статистически выше $101,5^0$ Т (86,1; 122,6) ($U=164,5$, $p=0,01$). Обращает на себя внимание снижение у детей с ВИЧ-статусом при III степени микробиологических 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 условно-патогенным микроорганизмам. У ВИЧ-негативных детей, наоборот, происходило увеличение до 94% частоты антагонизма со стороны бифидофлоры, что можно рассматривать как адаптационный механизм, направленный на стабилизацию кишечного микробиоценоза. В 76,4% случаев антагонистические взаимоотношения формировались с условно-патогенными бактериями ($\chi^2=1,4$; $df=1$; $p=0,02$). В итоге у ВИЧ-положительных детей при III степени дисбиоза кишечника нарастают нарушения адгезии и антагонизма бифидобактерий, что предрасполагает к формированию многокомпонентных микробных ассоциаций. Видимо поэтому, у них в 2 раза чаще обнаруживаются 5-ти компонентные микробные консорциумы ($\chi^2=9,5$; $df=1$; $p=0,004$), включающие *Candida spp.+Staphylococcus spp.* (coag-)+*Enterobacteriaceae+S.aureus+Enterococcus spp.* (hly+). При этом у ВИЧ-положительных детей преобладали бактериально-грибковые (61,4%), у лиц без ВИЧ-статуса - бактериально-бактериальные (52%) микробные сожительства.

Таким образом, у ВИЧ-положительных детей при увеличении степени дисбиоза изменяется функциональная активность бифидобактерий - снижается гидрофобность клеточной поверхности, специфическая адгезия и кислотообразующая активность, снижается антагонизм, что способствует формированию многокомпонентных микробных ассоциаций условно-патогенных микросимбионтов.

Молекулярные основы структурно-функциональных характеристик бифидобактерий при ВИЧ-инфекции

Предыдущий этап работы показал, что у ВИЧ-инфицированных детей частота обнаружения бифидобактерий была такой же, как в группе ВИЧ-негативных детей. При нарастании микробиологических нарушений снижается их количественный уровень, а также изменяются биологические свойства, что ведет к формированию многокомпонентных ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов. Поэтому возникает необходимость исследования молекулярных основ взаимодействия бифидобактерий с ассоциативной микрофлорой, что позволит определить механизмы микробиологических нарушений при ВИЧ-инфекции и основные направления коррекции кишечного микробиоценоза у данной категории пациентов.

Самым первым механизмом, предотвращающим избыточную колонизацию слизистой кишечника условно-патогенными и патогенными микроорганизмами, является механическая защита слизистой. Выделяют два последовательных этапа

взаимодействия бактерий со слизистой кишечника: неспецифический и специфический. Первый этап взаимодействия обратимый и обусловлен физическими и химическими свойствами молекул, прежде всего гидрофильностью/гидрофобностью (Леонов В. В. и др., 2014; Wang L. et al., 2010). Установлены статистически значимые различия гидрофобности бифидофлоры, выделенной от ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных детей ($U=583$, $p=0,001$). Гидрофобность бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных в среднем составила 19,8% (0; 48,8), у ВИЧ-отрицательных детей - 59,3% (43,4; 89,1). Среди бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей преобладали низкогидрофобные штаммы (Рисунок 5).

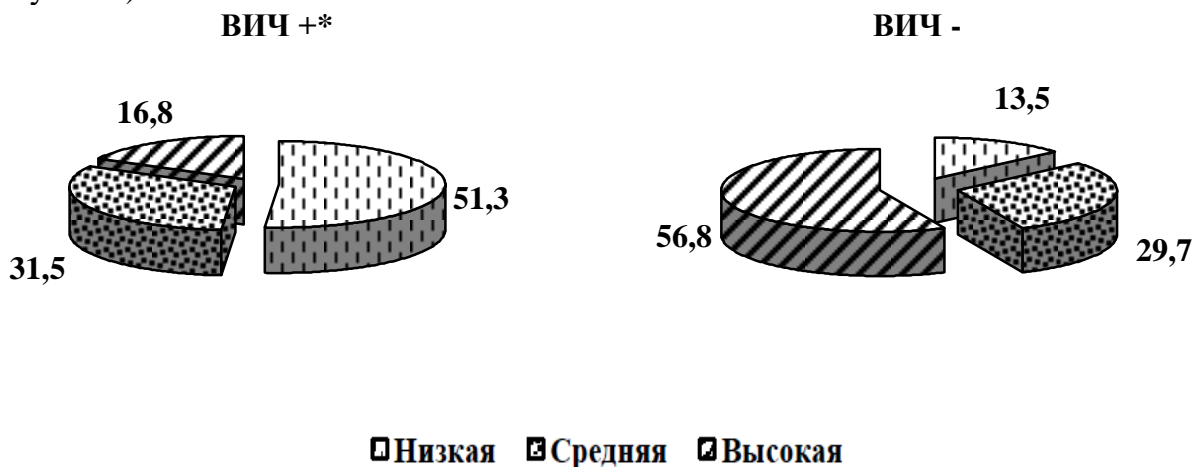


Рисунок 5 - Структура *Bifidobacterium spp.* у ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных детей по показателю гидрофобности (%)

Примечание: *значимость различий между группами $p=0,001$ ($\chi^2=17,67$, $df=2$)

Основной задачей данного этапа работы являлось определение молекулярных основ низкой гидрофобности бифидобактерий у ВИЧ-положительных детей. Большое количество липидов сосредоточено у бактерий в цитоплазматической мембране и в ЛТК, поэтому у бифидофлоры ВИЧ-инфицированных детей было проведено исследование жирнокислотного состава клеточных стенок. На основе ГХ-МС анализа установлено, что больше всего жирных кислот было 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 ($\chi^2=16,5$; $df=4$; $p=0,01$). В составе липидов у всех бифидобактерий преобладали насыщенные жирные кислоты. Доля предельных жирных кислот у бифидобактерий с высокой и низкой гидрофобностью составила 68,6% и 74,6% соответственно, тогда как у среднегидрофобных достигала 91,1%. У культур с разной гидрофобностью отмечали статистически значимые различия по содержанию изоформ, метилированных и длинноцепочечных жирных кислот, т.е. тех форм, которые определяют жидкокристаллическое состояние мембраны ($p=0,05$). Установлено, что только у высокогидрофобных штаммов присутствовала изопентадекановая (*isoC15:0*), 13-метил-тетрадекановая кислоты (13Me-C14:0), а содержание 12-метил-тетрадекановой кислоты (12Me-C14:0) было в 3 раза выше, чем у низкогидрофобных *Bifidobacterium spp.*

У среднегидрофобных бифидобактерий отмечали высокое содержание изопальмитиновой (*isoC16:0*) и стеариновой (C18:0) кислот. У них отсутствовали мононенасыщенные жирные кислоты - миристоолеиновая (C14:1), пентадеценивая (C15:1), пальмитолеиновая (C16:1), н-гептадеценивая (C17:1). При высокой и низкой гидрофобности количество изопальмитиновой (*isoC16:0*) кислоты было в 4 и 10 раз

меньше соответственно, чем при средней гидрофобности. Содержание стеариновой кислоты (C18:0) у высокогидрофобных культур было таким же, как у штаммов со средней гидрофобностью. При высокой гидрофобности клеточной стенки регистрировали все вышеуказанные ненасыщенные жирные кислоты, в наибольшем количестве среди них содержалась пальмитолеиновая кислота (C16:1). Максимальное количество полиненасыщенной линолевой (C18:2) кислоты регистрировали у культур с высокой гидрофобностью, в 2 раза меньше - у среднегидрофобных штаммов, меньше всего данной кислоты было обнаружено у низкогидрофобных бифидобактерий.

Особенности строения ЛТК обуславливают такие биологические свойства микроорганизмов, как адгезия, антигенность, иммуногенность. 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. С помощью инфракрасной спектроскопии установлено, что бифидобактерии от ВИЧ-инфицированных детей имеют молекулярные особенности, связанные с жирнокислотной областью молекулы данного полимера. По данным ИК-спектроскопии в них практически отсутствует область, характерная для диеновых фрагментов, о чем свидетельствует отсутствие полосы поглощения около 1650 см^{-1} (Рисунок 6).

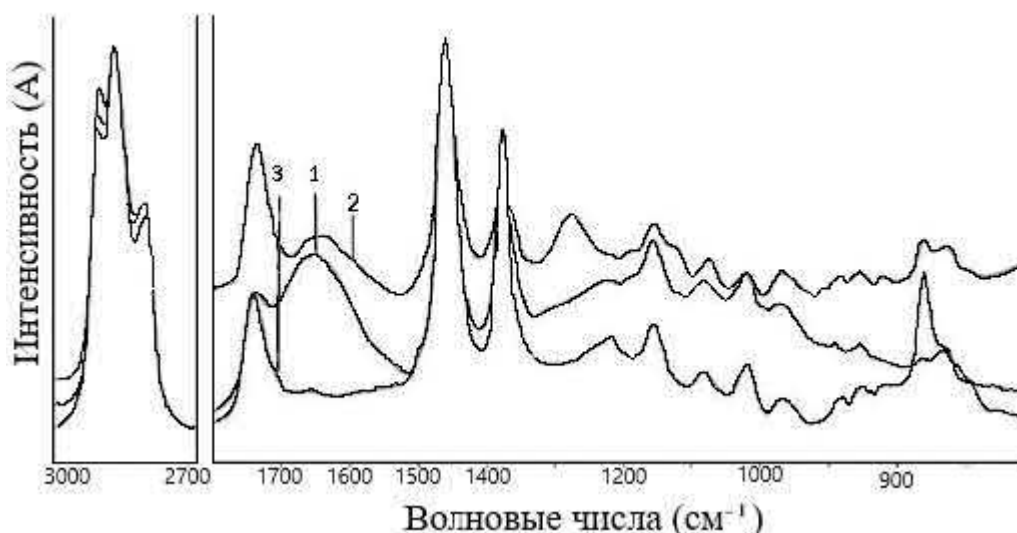


Рисунок 6 – Инфракрасная спектроскопия образцов ЛТК после экстракции из хроматографической зоны с R_f 0,95

Примечание: 1- *Bifidobacterim spp.* (пробиотический); 2- *Bifidobacterium spp.* (ВИЧ-); 3- *Bifidobacterium spp.* (ВИЧ+)

ЛТК *Bifidobacterium spp.* пробиотического происхождения имеет широкую полосу поглощения с максимумом 1635 см^{-1} , что указывает на полиеновые структуры. Такие характеристики штамма позволяют оказывать стимулирующее влияние на иммунную систему, что и является основой действия пробиотиков.

Липидсодержащие структуры, помимо ЛТК и цитоплазматической мембраны, обнаружены у бифидобактерий в составе поверхностного липопротеина Вор А (Kainulainen, V. et al., 2013). Для выделения поверхностного липопротеина и его изомеров была использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ алкильные фрагменты жирных кислот имеют специфический порядок элюции. Первыми элюируются структуры с ненасыщенными

фрагментами и длинными углеродными цепями, а далее более короткие фрагменты или/и с двойными связями. Липопротеиновый комплекс и его изоформы, исходя из значений стандарта, выходил с колонки в интервале с 5,14 до 15 минуты. В липидах выявлено преобладание насыщенных жирных кислот. У среднегидрофобного штамма регистрировали много липидов, которые содержали жирные кислоты с насыщенными алкильными цепями. Их количество соответствует площади пика 239,3 нА*сек, выходящего на 5,14 минуте (Рисунок 7).

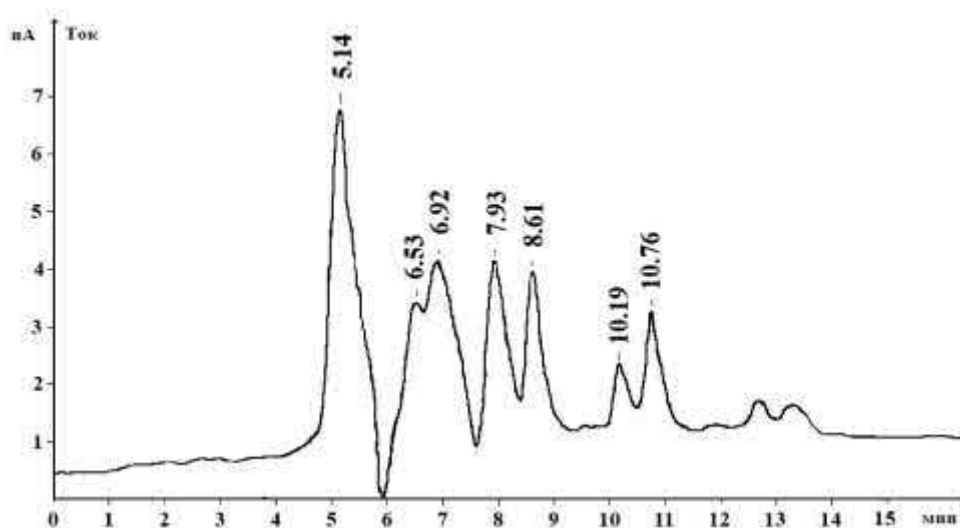


Рисунок 7 - Интегрированная хроматограмма поверхностных липопротеинов среднегидрофобного штамма бифидобактерий в ОФ ВЭЖХ

У высокогидрофобного штамма насыщенных жирных кислот было меньше, о чем свидетельствует пик на 5,19 минуте. Площадь пика составила 37,5 нА*сек. Высокая гидрофобность штамма связана с компонентом, выходящим с колонки на 13,38 минуте и содержащим двойные связи (Рисунок 8).

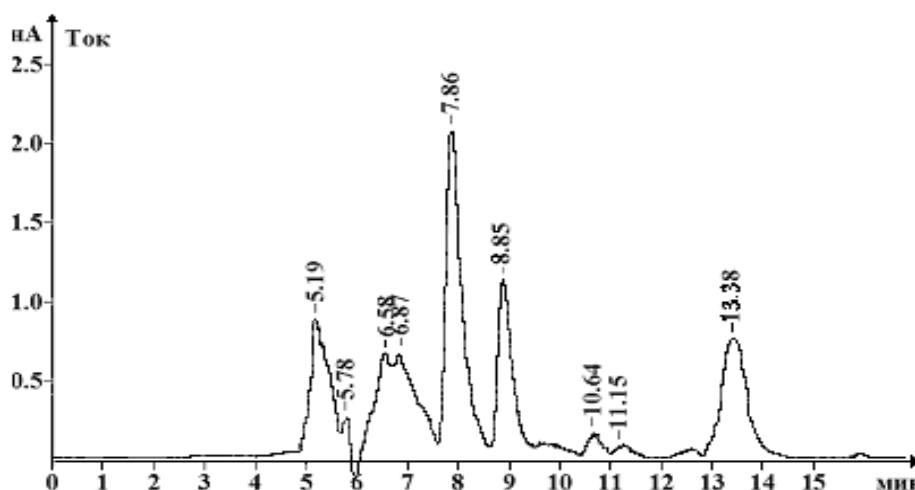


Рисунок 8 - Интегрированная хроматограмма поверхностных липопротеинов высокогидрофобного штамма бифидобактерий в ОФ ВЭЖХ

Данный компонент не регистрировался у низкогидрофобного штамма. Более того, низкогидрофобный штамм бифидобактерий характеризовался слабой селективностью разделяемых компонентов, что, видимо, связано с низким содержанием в структуре мембраны омыляемых жиров и их производных (Рисунок 9).

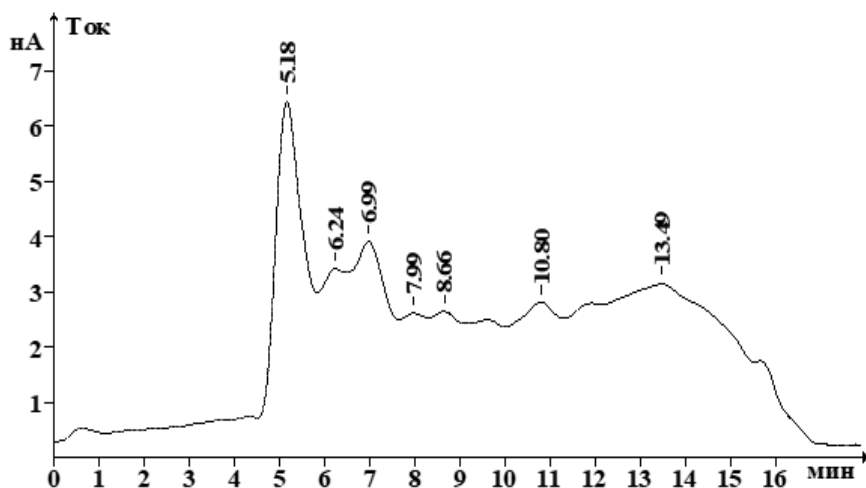


Рисунок 9 - Интегрированная хроматограмма поверхностных липопротеинов низкогидрофобного штамма бифидобактерий в ОФ ВЭЖХ

В итоге проведенных исследований установлено, что у ВИЧ-инфицированных детей преобладают низкогидрофобные штаммы бифидобактерий. В целом, у таких культур отмечается снижение в составе поверхностного липопротеина содержания омыляемых жирных кислот, в составе липидов клеточной стенки - общего содержания жирных кислот и отсутствие метилразветвленных фрагментов.

Аутоагрегация у доминирующих бактерий в кишечном микробиоценозе характеризует способность к образованию биопленок, к фиксации, нейтрализации и выведению патогенных бактерий из кишечника. Установлено, что все бифидобактерии, выделенные от детей сравниваемых групп, 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 ($\chi^2=2,1$; $df=3$; $p=0,51$).

После неспецифического взаимодействия бифидофлоры со слизистой кишечника происходит лиганд-рецепторная адгезия. Средние показатели индекса адгезии микроорганизмов (ИАМ) в сравниваемых группах статистически значимо отличались друг от друга ($U=10,53$, $p=0,0001$). Так индекс адгезии бифидофлоры у ВИЧ-позитивных детей составил 2,5 (2,1; 3,2), у детей группы сравнения 3,2 (2,8; 4,2). В большинстве случаев бифидобактерии, полученные из кишечника детей с ВИЧ-инфекцией, были отнесены к средне (41,4%) и низкоадгезиным (39,6%) культурам. Высокой адгезией обладали только 19% штаммов.

Установлено наличие средней прямой корреляционной связи между показателем специфической адгезии и количественным содержанием бифидобактерий в кишечнике (Спирмена, $\rho=0,52$; $p=0,001$). Иначе говоря, чем выше показатель специфической адгезии, тем более высокого количественного уровня достигает бифидофлора. 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 до $8 (8; 9) \lg \text{КОЕ/г}$.

Таким образом, отличия по специфической адгезии у бифидобактерий позволяют предположить, что у ВИЧ-инфицированных лиц бифидобактерии характеризуются либо

более низким уровнем экспрессии данных факторов, либо изменениями структур, участвующих в адгезивном процессе.

Дисбиоз кишечника, независимо от его природы сопровождается увеличением содержания в кишечнике токсических форм кислорода (Гапон М. Н. и др., 2016; Медведева О. А. и др., 2017). Антиоксидантными системами обладают многие микросимбионты, в том числе и бифидобактерии. 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 (Милентьева И.С. и др., 2015; Гапон М. Н. и др., 2016).

Нами был разработан способ оценки 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. 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 бифидофлоры заключалась в том, что из суточной культуры бактерий готовили взвесь в стерильном 0,9 % растворе NaCl. Стандартизировали по стандарту мутности MacFarland (№ 5). *Ex tempore* готовили 0,1% раствор лецитина, 1% раствор тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Смешивали ТБК, диметилсульфоксид (ДМСО) и 96% этанол. В другую пробирку помещали раствор лецитина, бактериальную суспензию и аскорбиновую кислоту. Использовали 3 контроля: контроль 1 (эталонный антиоксидант), контроль 2 (образец с иницированным перекисным окислением без антиоксиданта), контроль 3 (собственное окисление ТБК). Добавлением сульфата железа пятиводного иницировали образование свободных радикалов. Пробирки термостатировали при температуре 42⁰ С и встряхивании в течение 30 минут. После этого в опытные образцы и контроли добавляли ортофосфорную кислоту и ТБК. Смесь помещали на водяную баню (70⁰ С) на 20 минут, с последующим охлаждением до + 4⁰ С. Получали бутанольную фазу, которую подвергали спектрофотометрии.

Антиоксидантную активность бифидобактерий оценивали в условных единицах антиоксидантной активности (E_{aoe}), 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_{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 ммоль*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_{a0a} , средними - при 2,8-2,0 E_{a0a} , низкими - 1,9 и ниже E_{a0a} .

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

При использовании данного способа установлено, что антиоксидантная активность бифидобактерий, изолированных из кишечника ВИЧ-инфицированных детей, была ниже (1,7 (0,98; 2,8) E_{a0a} , чем у детей без ВИЧ-статуса 3,2 (1,5; 3,5) ($U=3,55$, $p=0,004$). Выраженное изменение антиоксидантных свойств *Bifidobacterium spp.* у детей с ВИЧ-статусом регистрировали при увеличении степени кишечных микрoэкологических нарушений (Рисунок 10).

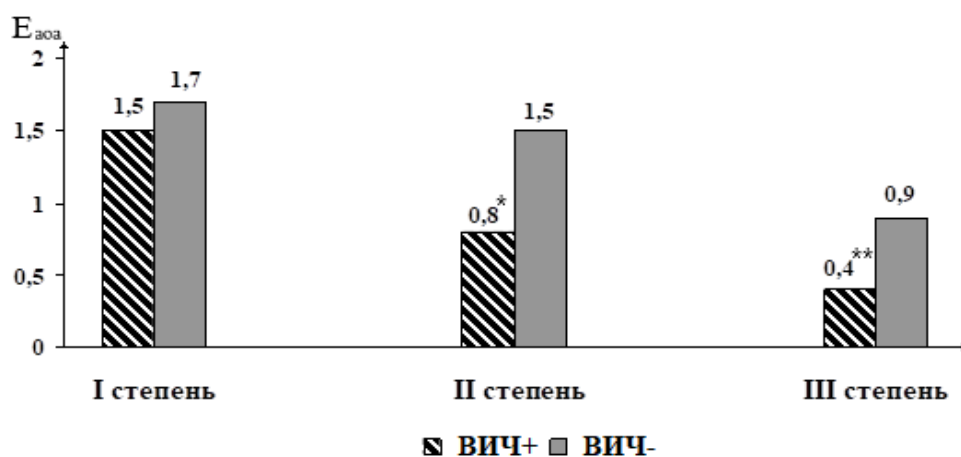


Рисунок 10 - Антиоксидантная активность бифидобактерий у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных детей при различных степенях дисбиоза кишечника (в E_{a0a})

Примечание: *значимость различий между штаммами у ВИЧ+ и ВИЧ- детей $p=0,05$; ** значимость различий между штаммами у ВИЧ+ и ВИЧ- детей $p=0,01$

Корреляционный анализ позволил установить прямую, средней силы связь между содержанием ненасыщенных жирных кислот в клеточной стенке бифидобактерий и антиоксидантной активностью клеточного матрикса (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. Поэтому любое воздействие на клеточную стенку бактерий, в том числе фосфолипаз ассоциативных микросимбионтов, будет изменять устойчивость бифидобактерий к перекисному окислению.

Бифидобактерии в кишечном микробиоценозе взаимодействуют со множеством микроорганизмов, формируя различные типы взаимоотношений (Салгина А.В. и др., 2016; Марков А.А. и др., 2018). 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 кишечнике. Установлено, что 69% бифидобактерий от детей с ВИЧ-инфекцией проявляли антагонизм к ассоциативным микросимбионтам кишечника. В группе ВИЧ-негативных детей данный показатель составил 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 ($\chi^2=2,1$; $df=1$; $p=0,55$). По отношению к условно-патогенным представителям микробиоценоза *Bifidobacterium spp.* при ВИЧ-инфекции антагонизм проявляли 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 ВИЧ-позитивных детей проявляли антимикробную активность 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 количественных уровнях стафилококков и клебсиелл 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 угнетают рост и размножение ассоциативных микросимбионтов. Наличие большого количества сахаролитических ферментов у бифидобактерий обуславливает продукцию органических кислот, которые являются факторами антимикробной защиты кишечного биотопа. Кислообразование у бифидобактерий, выделенных от ВИЧ-инфицированных детей, составило 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 была в 6,5 раз выше, чем в группе сравнения (13,8 % против 2,1 % соответственно) ($\chi^2=6,3$; $df=1$; $p=0,012$).

Помимо органических кислот, мощным прямым фактором антагонизма бифидобактерий является лизоцим. 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 исходной среде, 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.

Таким образом, у бифидобактерий при ВИЧ-инфекции, вследствие низкой продукции антибактериального фактора и органических кислот, распространенность антагонизма к условно-патогенным микроорганизмам в 1,5 раза ниже, чем у ВИЧ-негативных детей. У ВИЧ-позитивных детей бифидофлора статистически реже проявляет антагонизм к микроорганизмам рода *Klebsiella spp.* и к *S. aureus*.

У ВИЧ-инфицированных пациентов стафилококки являются активными продуцентами липаз – ферментов, которые напрямую способны влиять на липидсодержащие структуры бактерий. В связи с этим представляет интерес изучение влияния фосфолипаз стафилококков на клеточные стенки бифидобактерий для оценки роли факторов вирулентности ассоциативной микрофлоры в формировании специфического биофилья бифидобактерий у детей с ВИЧ-статусом. Липазы стафилококков выделяли из бульонных культур с помощью аффинной хроматографии и обрабатывали ими бифидобактерии, обладающие различной гидрофобностью.

Оценка жирнокислотного состояния клеточных стенок бифидобактерий показала, что у высокогидрофобных интактных культур преобладали ненасыщенные жирные

кислоты, при этом соотношение масс ненасыщенных жирных кислот к насыщенным составило 2 : 1. У средне- и низкогидрофобных штаммов в составе фосфолипидов доминировали насыщенные жирные кислоты, а соотношение масс ненасыщенных к насыщенным кислотам составило 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%. Как и у большинства микроорганизмов, жирные кислоты бифидобактерий были представлены длинноцепочечными ($C_{16} - C_{22}$) и среднецепочечными жирными кислотами ($C_{13} - C_{14}$). Только у высокогидрофобных штаммов были обнаружены жирные кислоты с очень длинной алкильной цепью (C_{24}). Содержание у *Bifidobacterium spp.* с разной гидрофобностью жирных кислот с разнообразными алкильными цепями статистически значимо отличалось ($\chi^2=10,2$, $df=4$, $p=0,05$).

Установлено, что в составе липидов всех бифидобактерий присутствовали метилированные жирные кислоты, которые увеличивают текучесть мембраны. Однако, у высокогидрофобных культур содержание разветвленных жирных кислот было 4,1 раза выше, чем у среднегидрофобных и в 3 раза выше, чем у низкогидрофобных штаммов. Различия в количественном содержании жирных кислот у бифидобактерий разных видов были статистически значимы ($\chi^2=115,6$, $df=18$, $p=0,0003$).

Обработка *in vitro* бифидобактерий липазами *S.aureus* приводила к значимому изменению структуры жирных кислот у штаммов с высокой гидрофобностью. Это говорит об адаптационных различиях у 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 кислот. Отмечали снижение разнообразия жирных кислот. В составе бактериальной мембраны уже не обнаруживали предельных длинноцепочечных жирных кислот, в 1,5 раза снижалась масса жирных кислот со средней длиной цепи.

У штаммов со средней гидрофобностью после обработки липазами стафилококка содержание жирных кислот с разной степенью насыщенности связей не изменялось ($\chi^2=27,2$, $df=20$, $p=0,6$). В мембранных липидах, как и прежде, в большинстве случаев (76%) обнаруживали насыщенные кислоты. Соотношение непредельных жирных кислот к массе предельных составило 1 : 3. При этом у среднегидрофобных бифидобактерий увеличивалось разнообразие жирных кислот.

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%). Соотношение масс ненасыщенных и насыщенных жирных кислот осталось таким же, как до воздействия липаз стафилококков (1 : 3). 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 уменьшалась в 2 раза ($U=2,82$, $p=0,001$), а гидрофобность в 1,5 раза ($U=2,72$, $p=0,02$) (Таблица 2).

Таблица 2 – 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* $p=0,05$

Незначительно изменялся 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 ($U=0,33$, $p=0,7$), так как низкое содержание ненасыщенных и длинноцепочечных жирных кислот нивелирует у них мишень для воздействия липаз стафилококков (Таблица 2).

Таким образом, ригидность оболочки у средне- и низкогидрофобных культур связана с высоким содержанием предельных жирных кислот. 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 на разную адаптивную способность штаммов, которая определяется исходным состоянием клеточной мембраны бифидобактерий, что позволяет объяснить изменение биологических свойств *Bifidobacterium spp.* при высоком содержании продуцентов липаз.

Метаболическая активность бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей

Данный раздел работы посвящен исследованию аминокислотного состава экзометаболитов и клеточных лизатов бифидобактерий, выделенных из кишечника ВИЧ-инфицированных, что связано с упоминанием в литературе данных о снижении биосинтетической функции кишечной микробиоты (Duborg G., 2016, Dillona S.M. et al. 2016) и об участии кишечных бактерий в кинурениновом пути катаболизма триптофана при прогрессировании ВИЧ-инфекции. Исследование состава аминокислот проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

По результатам проведенных исследований можно говорить об активном участии бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей в процессах метаболизма аминокислот.

Так, общее содержание аминокислот в гидролизате бифидофлоры от ВИЧ-инфицированных было в 1,6 раза больше (1193,9 мкг/г против 762,2 мкг/г) ($U=2,4$, $p=0,04$), а в составе экзометаболитов в 3 раза больше (2414,8 мкг/мл против 758,4 мкг/мл), чем у бифидобактерий ВИЧ-негативных детей ($U=2,86$, $p=0,001$).

Глицин в больших количествах обнаруживался в составе клеточного лизата бифидофлоры ВИЧ-инфицированных пациентов, но данная аминокислота отсутствовала в составе экзометаболитов. У бифидобактерий ВИЧ-негативных детей глицин регистрировали как в составе клеточного матрикса, так и в экзометаболитах. При этом у здоровых детей количество глицина в клеточном лизате было в 3,9 раза ниже, чем у ВИЧ-инфицированных (Таблица 3).

Таблица 3 – Содержание некоторых аминокислот в экзометаболитах 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	Экзометаболиты	Лизат	Экзометаболиты
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)
Лизин	271,1 (265,3; 278,5)	545,4 (544,3; 546,7)	39,8 (37,5; 41,3)	15,5 (14,8; 15,9)
Пролин	180,1 (176,6; 183,5)	263,8 (261,1; 265,8)	26,5 (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)
Треонин	15,2 (14,1; 16,9)	12,6 (11,8; 13,2)	0,4 (0,3; 0,6)	0,98 (0,6; 1,1)
Триптофан	25 (23,8; 26,2)	63,2 (62,4; 64,4)	0,29 (0,1; 0,32)	4,5 (3,8; 4,9)
Фенилаланин	37,9 (36,1; 38,6)	46,5 (45,8; 47,2)	5,8 (5,1; 6,2)	3,9 (3,3; 4,3)
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 определяли не только в экзометаболитах, но и в составе лизатов бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей, соотношение составило 1:10, в группе ВИЧ-негативных детей 1:2. Гистидин регистрировали только в составе клеток бифидобактерий как у детей с ВИЧ-статусом, так и без него. Количественное содержание данной аминокислоты в составе клеточной массы бифидобактерий от ВИЧ-инфицированных детей было в 10 раз выше (Таблица 3).

Содержание треонина в экзометаболитах было невысоким и сходным с его содержанием в клеточном лизате. 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. Бифидобактерии у ВИЧ-инфицированных детей также характеризуются высокой активностью выделения пролина и лизина. В

экзометаболитах 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 (Таблица 3).

Самым важным в патогенезе ВИЧ-инфекции является обмен триптофана, вернее его усиленный распад и накопление продуктов кинуренинового пути расщепления данной аминокислоты, которые влияют на мукозальный иммунитет и способствуют прогрессированию ВИЧ-инфекции (Jenabian M. et al., 2015; Routy J.P. et al., 2015; Yilmaz S. et al., 2018). В экзометаболитах и в клеточном лизате бифидобактерий, изолированных из кишечника ВИЧ-инфицированных детей, содержалось большое количество триптофана, по сравнению с группой сравнения (Таблица 3). По данным литературы, у ВИЧ-инфицированных пациентов регистрируют усиленный распад триптофана, за счет индоламин-2,3-диоксигеназы 1, продуцируемой макрофагами и дендритными клетками (Dinh et al., 2015; Favre D. et al., 2010). Поэтому можно предположить, что высокие уровни синтеза триптофана бифидобактериями у ВИЧ-инфицированных направлены на восполнение его недостатка. Кинуренин и его производные содержались в экзометаболитах 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 экзометаболитах было практически одинаковым. У ВИЧ-отрицательных детей, в составе клеточного лизата содержание кинуренина было в 4 раза больше, чем у ВИЧ-позитивных (Таблица 3). Следовательно, бифидофлора у детей с ВИЧ-статусом 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.

При ВИЧ-инфекции на уровне слизистой развивается выраженный воспалительный процесс, что повышает проницаемость стенки кишечника (Nowak, et al., 2015; Routy, J. P. et al., 2015). Бифидобактерии способны регулировать баланс про- и противовоспалительных цитокинов (Федорова И.А. и др., 2014; Бухарин О.В. и др., 2015; Тераевич А.С. и др., 2016). В связи с тем, что у бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей установлено изменение биологических свойств, определяющих их доминирование в кишечном микробиоценозе, возникает вопрос о биологической полноценности, выделяемых бифидобактериями экзометаболитов, в контексте предупреждения развития воспаления слизистой кишечника. На модели животных мы изучили противовоспалительную активность экзометаболитов белково-пептидной природы бифидобактерий, изолированных из кишечника у ВИЧ-инфицированных детей с разными стадиями заболевания. Установлено выраженное уменьшение флогогенного действия формалина на животных II группы, под влиянием экзометаболитов *Bifidobacterium spp.*, полученной от ребенка с 2 В стадией ВИЧ-инфекции, по сравнению с контрольной группой животных, получавших диклофенак натрия ($U=2,7$, $p=0,001$). Наличие умеренной противовоспалительной активности отмечено в группе животных III, получавшей экзометаболиты бифидобактерий, изолированных из кишечника ребенка с 4 Б стадией ВИЧ-инфекции ($U=3,5$, $p=0,05$) (Рисунок 11).

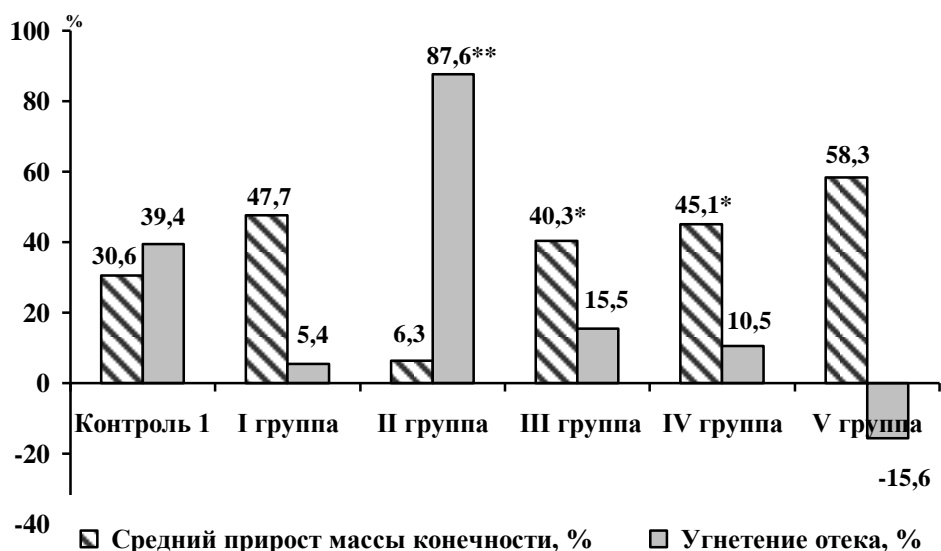


Рисунок 11 - Влияние экзометаболитов бифидобактерий на развитие острого формалинового отека конечности лабораторных животных

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

В группе животных V, наоборот, наблюдалось существенное увеличение воспалительного процесса, что может говорить о возможном наличии гистаминергического действия экзометаболитов. Такой эффект давали продукты метаболизма *Bifidobacterium spp.*, выделенного от ребенка с 2 А стадией ВИЧ-инфекции ($U=2,3$, $p=0,01$) (Рисунок 11).

Довольно часто у ВИЧ-инфицированных пациентов регистрируют депрессивные состояния или наоборот возбуждение ЦНС (Луфт В.М. и др., 2015). Бифидобактерии являются активными продуцентами нейроактивных аминокислот, либо предшественников нейромедиаторов (Олескин А.В. и др., 2014; Полякова С.И. и др., 2018), поэтому на животных была изучена психотропная активность экзометаболитов бифидобактерий, изолированных из кишечника ВИЧ-инфицированных пациентов. Установлено наличие антидепрессивного, седативного и возбуждающего действия экзометаболитов бифидобактерий. Разные психотропные эффекты были связаны с особенностью аминокислотного состава экзометаболитов. 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 антистрессорный и успокаивающий эффект, за счет образования гамма-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, который не оказывал психотропного действия. Однако, обращает внимание очень высокая продукция глутамина, который относится к «возбуждающим» аминокислотам. Среди нейрофизиологических эффектов данной аминокислоты отмечают наличие антистрессорного эффекта, что и проявилось в поведении животных. Штамм *Bifidobacterium spp.* № 74 продуцировал высокое количество глутамина. Данная аминокислота оказывает возбуждающее действие на ЦНС, хотя продукция

«тормозящего» глицина в экзометаболитах у этого штамма было выше, чем в контроле. (Таблица 4).

Таблица 4 – Содержание нейроактивных аминокислот и/или предшественников нейромедиаторов в экзометаболитах бифидобактерий

Номер штамма <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

Таким образом показано, что экзометаболиты бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей обладают биологической активностью со штаммовой специфичностью. Данные по активному участию бифидобактерий в синтезе аминокислот, в том числе - нейроактивных и/или предшественников нейромедиаторов предопределяет необходимость коррекции бифидофлоры при ВИЧ-инфекции и индивидуализацию выбора пробиотического штамма.

Фундаментальные и прикладные аспекты управления популяцией и биологическими свойствами бифидобактерий при ВИЧ-инфекции

Опираясь на результаты исследований содержания и свойств бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей, обоснованными являются два подхода в коррекции бифидофлоры у данной категории пациентов. Первый подход связан с коррекцией количественного уровня бифидобактерий на основе использования индивидуально подобранных пробиотических препаратов. Корректировать количественное содержание бифидобактерий, за счет использования пробиотических препаратов, целесообразно тем категориям пациентов с ВИЧ-инфекцией, у которых регистрируются низкие количественные уровни бифидофлоры. Основным ограничением этого подхода является несовместимость пробиотических штаммов и микрофлоры пациента. Исследования показали, что биосовместимость штаммов ВИЧ-позитивных детей с пробиотическими культурами не превышала 41%. При увеличении степени тяжести дисбиоза кишечника биосовместимость бифидобактерий падала с 69,2% при I степени до 43,5% при II степени и до 42,9% при III степени ($\chi^2=3,69$, $df=2$, $p=0,03$). По результатам исследования биосовместимости фекальных изолятов бифидобактерий детей с ВИЧ-статусом с 8 пробиотическими препаратами установлено, что для эмпирического выбора бифидосодержащих пробиотиков для данной категории пациентов можно опираться на следующий ранжированный по степени убывания биосовместимости ряд: «Линекс»® - «Линекс® форте» или «Бифидумбактерин»TM - «Примадофиллюс® бифидус» - «Пробиолог»® - «Максилак»® - «Баксет беби»® - «Баксет форте»TM.

Количественный уровень бифидобактерий у пациента может восстанавливаться при нормализации биологических свойств данных микросимбионтов, составляющих их адгезивный и регулирующий потенциал, т.е. при использовании второго подхода. Данный подход оптимален при выявлении у пациентов бифидобактерий с измененными биологическими свойствами. Он предполагает нормализацию функциональных характеристик бифидобактерий на основе коррекции состояния их клеточных мембран и антиоксидантных свойств (Рисунок 12).

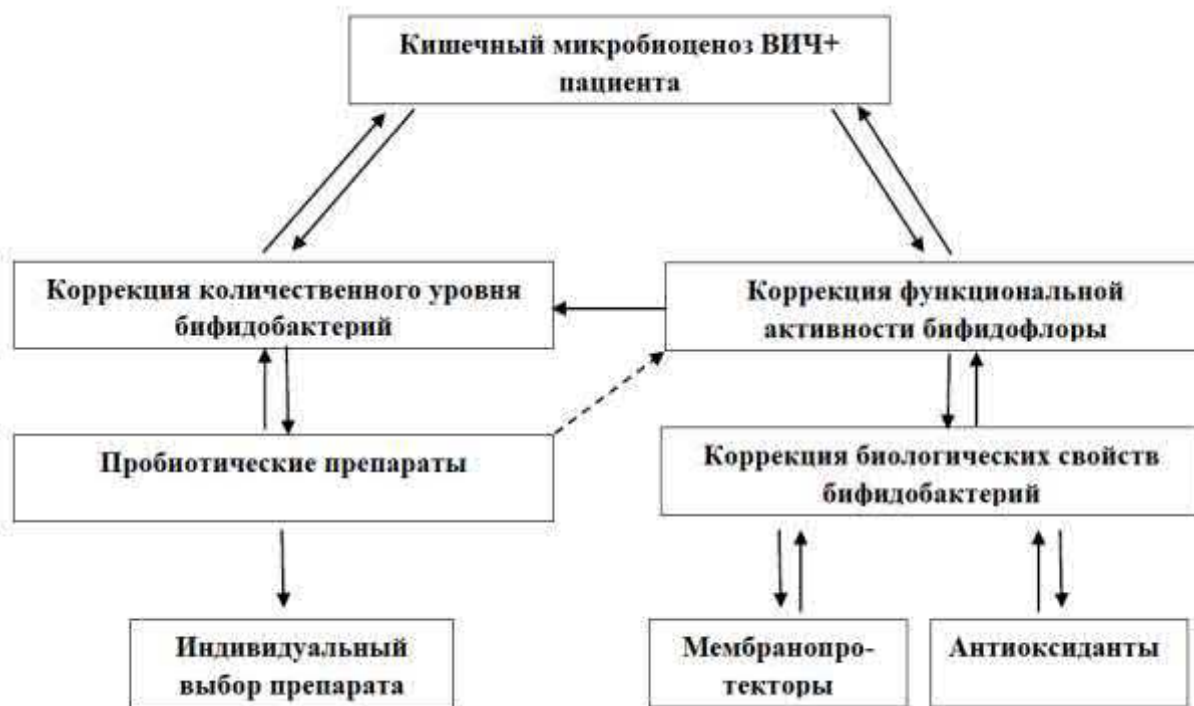


Рисунок 12 - Подходы в коррекции бифидофлоры у детей с ВИЧ-инфекцией

Выбор подхода в коррекции должен базироваться на результатах исследования бифидофлоры каждого конкретного пациента. Возможна сочетанная коррекция количественного содержания и биологических характеристик бифидофлоры.

При реализации первого подхода технология персонифицированного выбора пробиотического препарата для ВИЧ-инфицированного ребенка предполагает:

1. выделение бифидобактерий и других представителей кишечного биотопа из кишечного содержимого, их идентификацию, изучение биологических свойств бифидобактерий (гидрофобности, специфической адгезии, кислотообразования, 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 свойств фекальных бифидобактерий;
4. определение *in vitro* биосовместимости фекальных изолятов бифидобактерий и выбранных пробиотических штаммов. При наличии нескольких биосовместимых пробиотических штаммов необходимо учитывать их спектр антимикробной активности, так как у пациентов выделяются разные условно-патогенные бактерии.

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. При этом кислотообразование у биосовместимых штаммов от ВИЧ-инфицированных детей было более низким, чем у пробиотических бифидобактерий ($p=0,05$) (Таблица 5).

Таблица 5 – Показатели функциональных характеристик биосовместимых фекальных изолятов от ВИЧ-позитивных детей и пробиотических бифидобактерий М (LQ; UQ)

Группы микроорганизмов	Адгезия (ИАМ)	Гидрофобность (Н, %)	Кислотообразование ($^{\circ}$ 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 $p=0,01$

Нормализация количественного уровня бифидофлоры является необходимым условием для сохранения доминирующих позиций данных бактерий в микробиоценозе при ВИЧ-инфекции. Низкая биосовместимость микрофлоры ВИЧ-инфицированных с пробиотическими штаммами делает проблематичным эмпирический выбор пробиотических препаратов для данной категории пациентов. Поэтому очевидным является поиск средств, стимулирующих размножение бифидофлоры пациентов. Был разработан способ выделения ДНК из пробиотических штаммов, в частности, из *B. bifidum* 791 с последующим изучением способности стимулировать *in vitro* размножение фекальных бифидобактерий. Разработанный способ включает следующие этапы: 1 – выращивание пробиотического штамма на жидкой питательной среде с последующим отмыванием бактериальной массы от компонентов среды и ресуспендированием; 2 – ультразвуковое воздействие на отмытые бактерии и выделение ДНК с помощью хроматографического метода на Сефарозе CL4В; 3 – определение чистоты и концентрации ДНК с помощью спектрофотометрии.

Для оценки *in vitro* влияния выделенной нуклеиновой кислоты на *Bifidobacterium spp.* были использованы штаммы бифидобактерий, изолированные из кишечника ВИЧ-инфицированных детей. Установлено, что 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 бифидобактерий ($p=0,03$), но не влияла на количество *E.coli lac-*, *S. aureus*, *C.albicans*, *E.faecalis*, что свидетельствует о бифидогенном эффекте выделенного компонента.

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

Исследования свойств бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей показали, что при II и III степени микробиологических нарушений снижается антиоксидантная активность бифидобактерий, гидрофобность клеточной поверхности, что обусловлено изменением жирнокислотного состава клеточных стенок бактерий. Таким образом, биомембранами для воздействия на биологические свойства бифидобактерии при ВИЧ-инфекции является антиоксидантная система и поверхностные свойства бактериальной клетки, играющие ключевую роль в адгезии и колонизации. В связи с этим

заключительный этап исследования предполагал поиск средств, влияющих на функциональную активность бифидофлоры. *In vitro* была изучена возможность использования для коррекции биологических свойств бифидофлоры ВИЧ-положительных пациентов веществ с антиоксидантными и мембранопротекторными свойствами. Этилметилгидроксипиридина сукцинат (торговое название «Мексидол»®) относится к фармакологической группе антиоксидантов, обладающий также выраженными мембранопротекторными свойствами. Сочетание двух фармакологических эффектов и явилось основой выбора данного препарата в качестве модулятора биологических свойств бифидобактерий.

Исследование проведено на 15 штаммах *Bifidobacterium spp.*, которые были разделены на 3 группы. Группа 1 включала штаммы, среднее значение антиоксидантной активности которых составило 0,3 E_{aoa} , группа 2 - 0,7 E_{aoa} , группа 3- 1,1 E_{aoa} . Установлено, что внесение этилметилгидроксипиридина сукцината в питательную среду не влияет на количественный уровень штаммов с антиоксидантной активностью равной или выше 0,7 E_{aoa} , так как содержание бифидобактерий до и после внесения препарата не изменилось и составило 5 и 6 lg КОЕ/мл соответственно. При этом содержание бифидобактерий 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. Введение в питательную среду этилметилгидроксипиридина сукцината снижает воздействие токсических форм кислорода на бифидобактерии 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 антиоксидантным статусом равным 0,3 E_{aoa} (группа 1) более чем 2 раза увеличивается гидрофобность клеточной поверхности (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на биологические свойства бифидобактерий ВИЧ-инфицированных детей. Ме (LQ; UQ)

Группы штаммо в и АОА	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) АОА=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) АОА=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) АОА=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. Но введение препарата не изменяет аутоагрегации у бифидобактерий 2 и 3 групп, которые характеризовались изначально более высокими показателями признака. Поэтому можно говорить об избирательности действия этилметилгидроксипиридина сукцината, которая определяется свойствами бактериальной поверхности. В основе изменения поверхностных свойств бифидобактерий лежит увеличение массы жирных кислот в клеточной стенке за счет роста массы ненасыщенных жирных кислот. Однако установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат статистически значимо снижает специфическую адгезию испытуемых штаммов (Таблица 6). Известно, что лизоцим повышает адгезивные свойства бифидобактерий и обладает антибактериальной активностью в отношении условно-патогенных микроорганизмов. 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 ($p=0,72$). 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.

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 нейтралισμό 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. Биомешинями внешнего модулирующего воздействия на бифидобактерии при ВИЧ-инфекции являются антиоксидантная система и поверхностные свойства бактериальной клетки. В связи с этим в схемах коррекции микроэкологических 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 пробиотических 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Захарова, Ю. В.** Влияние адгезивной активности бактерий на их количественное содержание в кишечнике у ВИЧ-инфицированных детей / **Ю. В. Захарова, А. А. Марковская** // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 7. – С. 61–63.
2. **Захарова, Ю. В.** Биологические свойства доминантных и ассоциативных микросимбионтов кишечника у ВИЧ-инфицированных детей / **Ю. В. Захарова, А. С. Сухих, А. А. Марковская** // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 11 (3). – С. 503–507.
3. **Захарова, Ю. В.** Механизмы формирования симбиотических ассоциаций кишечника у ВИЧ-инфицированных детей / **Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова** // *Мать и дитя в Кузбассе*. – 2012. – № 2. – С. 22–26.
4. **Микробиоценоз и биологические свойства микрофлоры кишечника у ВИЧ-инфицированных детей / Ю. В. Захарова, А. В. Караулов, А. А. Марковская, Л. А. Леванова, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин, М. С. Афанасьев** // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. – 2012. – № 3. – С. 48–55.
5. **Захарова, Ю. В.** Характеристика биологических свойств отдельных представителей кишечной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных детей / **Ю. В. Захарова, А. А. Марковская, Л. А. Леванова** // *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. – 2012. – № 2. – С. 148–151.
6. **Марковская, А. А.** Роль бактериально-грибковых ассоциаций в формировании микробиоценоза кишечника у ВИЧ-инфицированных детей / **А. А. Марковская, Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова** // *Многопрофильная больница: проблемы и решения* : сб. тр. XVI Всерос. науч.-практ. конф. – Ленинск-Кузнецкий, 2012. – С. 305–306.
7. **Марковская, А. А.** Ассоциативный симбиоз микробиоты кишечника у ВИЧ-инфицированных детей / **А. А. Марковская, Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова** // *Проблемы медицинской микологии*. – 2012. – № 2 (14). – С. 108–109.
8. **Захарова, Ю. В.** Профилактика оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных детей / **Ю. В. Захарова, А. А. Марковская, Л. А. Леванова** // *Медицина в Кузбассе*. – 2013. – № 2. – С. 42–47.
9. **Характеристика бифидобактерий в микробиоценозе кишечника ВИЧ-инфицированных детей / Ю. В. Захарова, А. А. Марковская, Л. А. Леванова, А. В. Караулов, С. С. Афанасьев, А. В. Алешкин, М. С. Афанасьев** // *Астраханский медицинский журнал*. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 48–54.
10. **Захарова, Ю. В.** Свойства бифидобактерий при ВИЧ-инфекции / **Ю. В. Захарова** // *Медицина в Кузбассе*. – 2013. – № 3. – С. 31–35.
11. **Биологические свойства стафилококков, выделенных от ВИЧ-инфицированных детей / Л. А. Леванова, Ю. В. Захарова, Л. Ю. Отдушкина, А. А. Марковская** // *Проблемы медицинской микологии*. – 2014. – Т. 16, № 2. – С. 98.

12. Захарова, Ю. В. Характеристика бифидобактерий при ВИЧ–инфекции / Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова // Дети и ВИЧ: проблемы и перспективы : материалы науч.–практ. конф. с междунар. участием. – Санкт-Петербург, 2014. – С. 243–245.
13. Захарова, Ю. В. Характеристика структуры и биологических свойств стафилококков, выделенных от детей с ВИЧ–инфекцией / Ю. В. Захарова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 5. – С. 3–7.
14. Плотникова, Е. Ю. Место пробиотиков в профилактике и лечении антибиотик–ассоциированной диарей / Е. Ю. Плотникова, Ю. В. Захарова // Терапевтический архив. – 2015. – № 5. – С. 127–131.
15. Захарова, Ю. В. Хроматографический анализ жирных кислот клеточных стенок бифидобактерий с различной гидрофобностью / Ю. В. Захарова, А. С. Сухих // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2015. – Т. 15, № 6. – С. 776–783.
16. Захарова, Ю. В. Состояние микробиоценоза кишечника у ВИЧ–инфицированных детей / Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова // Медицина в Кузбассе. – 2015. – № 4. – С. 29–33.
17. Сухих, А. С. Инновационный способ получения аутопробиотика / А. С. Сухих, Ю. В. Захарова, Е. Ю. Плотникова // 42-я Научная сессия ЦНИИГ «Принципы доказательной медицины в клиническую практику» : сб. тез. – Москва, 2016. – С. 8–9.
18. Леванова, Л. А. Принципы выбора пробиотических препаратов при ВИЧ–инфекции / Л. А. Леванова, Ю. В. Захарова // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 87.
19. Захарова, Ю. В. Факторы адгезии бифидобактерий / Ю. В. Захарова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 5. – С. 80–87.
20. Плотникова, Е. Ю. Что общего между функциональной диспепсией и синдромом избыточного бактериального роста / Е. Ю. Плотникова, Ю. В. Захарова, Т. Ю. Грачева // Лечащий врач. – 2016. – № 8. – С. 6–13.
21. Синдром раздраженного кишечника и его связь с кишечной микрофлорой / Е. Ю. Плотникова, Ю. В. Захарова, А. С. Сухих, Т. Ю. Грачева // Медицинский совет. – 2017. – № 5. – С. 85–92.
22. Захарова, Ю. В. Механизмы резистентности бифидобактерий к липолитическим ферментам *Staphylococcus aureus* / Ю. В. Захарова, Л. Ю. Отдушкина, Л. А. Леванова // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2017. – Т. 2, № 1. – С. 6–13.
23. Сухих, А. С. Особенности строения липотейхоевых кислот бифидобактерий по данным ТСХ и ИК–ФТ / А. С. Сухих, Ю. В. Захарова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17, № 5. – С. 764–771.
24. Захарова, Ю. В. Бактериальный микробиом кишечника ВИЧ–инфицированных людей / Ю. В. Захарова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 2. – С. 102–109.
25. Захарова, Ю. В. Ассоциации условно–патогенных микросимбионтов кишечника у ВИЧ–инфицированных детей / Ю. В. Захарова // Многопрофильная больница: проблемы и решения : материалы XXI Всерос. науч.–практ. конф., посвящ. 25–

- летию Центра охраны здоровья шахтеров. – Ленинск–Кузнецкий, 2018. – С. 187-188.
26. Леванова, Л. А. Дисбиоз кишечника как фактор развития оппортунистических инфекций при ВИЧ–инфекции / Л. А. Леванова, Ю. В. Захарова, А. А. Марковская // Проблемы медицинской микологии. – 2018. – № 2 (20). – С. 87.
27. Захарова, Ю. В. Влияние фосфолипаз грибов *Candida albicans* на клеточную стенку и биологические свойства бифидобактерий / Ю. В. Захарова // Успехи медицинской микологии. – 2018. – Т. 18. – С. 77-80.
28. Sukhikh, A. S. Criteria for standartization of probiotic components in functional food products / A. S. Sukhikh, Yu. V. Zakharova, A. E. Yuzhalin, A. T. Vucov, T. V. Kotova, V. M. Poznyacovkiy // Foods and Raw Materials. – 2018. – N 2. – P. 457-466
29. Захарова, Ю. В. Коррекция биологических свойств бифидобактерий, выделенных от ВИЧ–инфицированных детей / Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова, А. С. Сухих // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2018. – № 4. – С. 44-50.
30. Захарова, Ю. В. Аминокислотный состав экзометаболитов и клеточных гидролизатов бифидобактерий у ВИЧ-инфицированных детей / Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова, Ю. С. Федорова, А. С. Сухих // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2019. – Т. 4, № 1. – С. 15-21.
31. Захарова, Ю. В. Характеристика биологических свойств бифидобактерий при микрoэкологических нарушениях кишечника у ВИЧ-инфицированных детей / Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова, Т. А. Штернис, А. С. Сухих, А. А. Марковская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 3. – С. 3–9.

Изобретения

32. Патент 2465593 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/483. Способ количественного определения антиоксидантной активности микроорганизмов / А. С. Сухих, Ю. В. Захарова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО КемГМА Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Сухих А. С. (RU). – № 2011127872/15; заявл. 06.07.2011; опубл. 27.10.2012, Бюл. № 30 – 6 с.
33. Патент 2553513 Российская Федерация, МПК С 07 Н 21/04. Способ получения бифидогенного фактора / А. С. Сухих, Ю. В. Захарова, А. Н. Волков; заявитель и патентообладатель Сухих А. С., Захарова Ю. В., Волков А. Н. (RU). – № 2013123078; заявл. 20.05.2013; опубл. 20.06.2015, Бюл. № 17 – 8 с.

Методические рекомендации

34. Методы исследования биологических свойств микроорганизмов: методические рекомендации: утверждены начальником Департамента охраны здоровья населения Кемеровской области 2.07.2013 г. / Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова. – К.: Кемеровская государственная медицинская академия, 2013. – 55 с.
35. Бифидобактерии: выделение, идентификация, изучение биологических свойств: методические рекомендации: утверждены начальником Департамента охраны здоровья населения Кемеровской области 3.11.2017 г. / Ю. В. Захарова. – К.: Кемеровский государственный медицинский университет, 2017. – 74 с.

36. Исследование микрофлоры кишечника у ВИЧ-инфицированных детей. Коррекция микробиологических нарушений: методические рекомендации: утверждены и.о. начальника Департамента охраны здоровья населения Кемеровской области 9.11.2018 г. / Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова, А. А. Марковская – К.: Кемеровский государственный медицинский университет, 2018. – 51 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАД	– биологически активная добавка
ВААРТ	– высокоактивная антиретровирусная терапия
ВАК	– высшая аттестационная комиссия
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГАУЗ	– государственное автономное учреждение здравоохранения
ГБУЗ	– государственное бюджетное учреждение здравоохранения
ГХ-МС	– газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
ИАМ	– индекс адгезии микроорганизмов
ИК- спектроскопия	– инфракрасная спектроскопия
ИФА	– иммуноферментный анализ
КО	– Кемеровская область
КОЕ/г	– колониеобразующие единицы на 1 грамм
ЛТК	– липотейхоевые кислоты
МПА	– мясо-пептонный агар
МР	– методические рекомендации
ОФ	– обращенная фаза
⁰ Т	– градусов Тернера
ТСХ	– тонкослойная хроматография
УПМ	– условно-патогенные микроорганизмы
ФГБОУ ВО	– федеральное государственное бюджетное общеобразовательное учреждение высшего образования
ЦНИЛ	– центральная научно-исследовательская лаборатория
LQ	– lower quartile – 25-й процентиль
Me	– mediana - медиана
UQ	– upper quartile – 75-й процентиль
SEM	– standard error of the mean – стандартная ошибка
R _f	– retention factor – фактор удерживания
RR	– relative risk – относительный риск