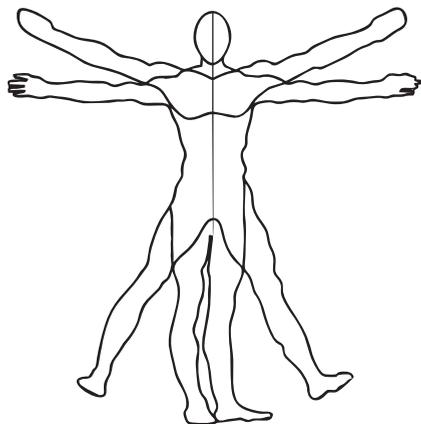


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Челябинский государственный университет»

Метаорганизм. Стресс и адаптация

Коллективная монография

Под редакцией доктора медицинских наук,
профессора А. Л. Бурмистровой



Челябинск
Издательство Челябинского государственного университета
2019

УДК 579
ББК Р264
М540

Печатается по решению редакционно-издательского совета
Челябинского государственного университета

Р е ц е н з е н т ы:

О. А. Свитич, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН,
директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
имени И. И. Мечникова»;

И. А. Кофиади, доктор биологических наук, профессор РАН,
заведующий лабораторией молекулярной иммуногенетики
ФГБУ «Государственный научный центр Институт иммунологии» ФМБА России

Метаорганизм. Стресс и адаптация : коллектив. моногр. / под ред.
М540 д-ра мед. наук, проф. А. Л. Бурмировой. — Челябинск : Изд-во Челяб. гос.
ун-та, 2019. — 239 с.

ISBN 978-5-7271-1608-1

Представлены материалы научно-исследовательских работ преподавателей кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета, которые выполнены в рамках междисциплинарных исследований, объединённых общим подходом к оценке организма человека как сложной комплексной биологической конструкции — метаорганизма.

Такая система презентует себя в качестве беспрецедентного симбиоза эукариот и прокариот на клеточном (в том числе внутриклеточном: геномном, метаболическом, сигнальном) и популяционном уровнях, демонстрирует комплексность развития и функций, что определяет упругость/пластичность системы, её высокие адаптационные способности, выживание и здоровье социумов двух царств.

Книга может быть использована в качестве учебным пособием для студентов (бакалавров, магистрантов, аспирантов) биомедицинских направлений подготовки и быть интересна биологам, медикам — специалистам в области микробиологии, иммунологии, популяционной генетики.

УДК 579.6
ББК Р264

Издается в авторской редакции.

Авторский коллектив

Бурмистрова Александра Леонидовна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета.

Бахарева Лариса Израильевна — кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета, заведующая бактериологической лабораторией Городской клинической больницы № 6.

Беляева Светлана Валерьевна — кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета, биолог лаборатории иммунологических исследований клинико-диагностического отдела Челябинской областной станции переливания крови.

Брюхин Геннадий Васильевич — доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Вавилов Михаил Николаевич — биолог лаборатории иммунологических исследований клинико-диагностического отдела Челябинской областной станции переливания крови.

Евдокимов Александр Викторович — кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета.

Нохрин Денис Юрьевич — кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета, старший научный сотрудник ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр УрО РАН».

Самышкина Наталья Евгеньевна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета.

Сташкевич Дарья Сергеевна — кандидат биологических наук, декан биологического факультета Челябинского государственного университета.

Суслова Татьяна Александровна — кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета, заведующий отделом молекулярно-биологической диагностики ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови».

Тимофеева Арина Вячеславовна — ассистент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета.

Филиппова Юлия Юрьевна — кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета.

Хайдаршина Наиля Эмильевна — кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета.

Хромова Елена Борисовна — кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета, начальник отдела контроля качества ООО «НПФ Материя Медика Холдинг».

Список сокращений

- АБ — антибиотик
АБР — антибиотикорезистентность
АКТГ — адренкортикотропный гормон
АМР — антимикробные соединения
АМФ — аминокликозидмодифицирующие ферменты
БАВ — биологически активные вещества
БЛРС — бета-лактамазы расширенного спектра
ВВК — вульвовагинальный кандидоз
ВКГ — вес корреляционного графа
ГГА — гипоталамо-гипофизарно-адреналовый
ДИ — доверительный интервал
ЖКТ — желудочно-кишечный тракт
КА — корреляционная адаптометрия
ЛПК — лейкоциты периферической крови
ЛПС — липополисахарид
МБЛ — металло-бета-лактамазы
МПК — минимальная подавляющая концентрация
НВЛ — нейтрофильные внеклеточные ловушки
НГОБ — неферментирующие грамотрицательные бактерии
НСТ-тест — тест с нитросиним тетразолием
НЯК — неспецифический язвенный колит
ПАБК — парааминобензойная кислота
ПСБ — пенициллинсвязывающие белки
РАС — расстройства аутистического спектра
САК — средняя абсолютная корреляция
СРК — синдром раздражённого кишечника
ТРД — типично-развивающиеся дети
цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат
ЦНС — центральная нервная система
ЧО — Челябинская область
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭНС — энтеральная нервная система

- AIC (Akaike Information Criterion)* — информационный критерий Акаике
- CCL20 (chemokine (C–C motif) ligand 20)* — хемокиновый лиганд 20 (CC-мотив)
- CLR (C-type lectin-like receptors)* — C-тип лектин-подобный рецептор
- CST (community state types)* — тип микробного сообщества
- G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)* — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- gf (gene frequency)* — частота гена
- GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)* — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- HE4 (human epididymis protein 4)* — человеческий эпидидимальный протеин 4
- hf (haplotype frequency)* — частота гаплотипа
- IFN (interferon)* — интерферон
- IL (interleukin)* — интерлейкин
- IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist)* — рецепторный антагонист IL-1R
- iNOS (inducible nitric oxide synthase)* — индуцибельная синтаза оксида азота
- MET (monocyte extracellular traps)* — моноцитарные экстраклеточные ловушки
- NETs (neutrophil extracellular traps)* — нейтрофильные экстраклеточные ловушки
- PRR (pattern-recognition receptor)* — паттерн-распознающий рецептор
- RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)* — регулируемый при активации, нормальной Т-клеткой экспрессируемый и секретируемый хемокин
- SLPI (secretory leukocyte peptidase inhibitor)* — ингибитор секреторной лейкоцитарной пептидазы
- SNP (Single Nucleotide Polymorphism)* — однонуклеотидный полиморфизм
- TLR (Toll-like receptor)* — Toll-подобный рецептор, толл-подобный рецептор
- TNF (tumor necrosis factor)* — фактор некроза опухолей

Благодарности

Я чрезвычайно благодарна за поддержку и понимание всем коллегам, кто прямо или косвенно прошёл вместе со мной путь создания биологического факультета в Челябинском государственном университете:

Аклееву Александру Васильевичу — д-ру мед. наук, профессору, заслуженному деятелю науки РФ, директору ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, директору сотрудничающего центра ВОЗ, лауреату премии правительства РФ, официальному представителю РФ в Научном комитете по действию атомной радиации ООН, члену Российской научной комиссии по радиационной защите. С 1998 г. по настоящее время Александр Васильевич — заведующий кафедрой радиационной биологии биологического факультета ЧелГУ;

Ячменеву Владиславу Анатольевичу — канд. геогр. наук, зам. начальника Управления аграрной политики, экологии и природопользования Законодательного собрания Челябинской области, действительному государственному советнику Челябинской области I класса, члену Общественного совета по формированию экологической политики при губернаторе Челябинской области, заместителю председателя Межведомственного совета по формированию экологической культуры населения Челябинской области. С 1998 г. по настоящее время Владислав Анатольевич — заведующий кафедрой биоэкологии биологического факультета ЧелГУ;

Брюхину Геннадью Васильевичу — д-ру мед. наук, профессору, заведующему кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета. С 1998 г. и по настоящее время Геннадий Васильевич — профессор кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ЧелГУ;

Шестопалову Сергею Степановичу — д-ру мед. наук, профессору, главному врачу Городской клинической больницы № 6 с 1996 по 2009 г.;

Бахаревой Ларисе Израильевне — канд-ту мед. наук, доценту, заведующей бактериологической лабораторией Городской клинической больницы № 6. С 1998 г. и по настоящее время Лариса Израильевна — доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ЧелГУ;

Сусловой Татьяне Александровне — канд-ту мед. наук, доценту, заведующей отделом молекулярно-биологической диагностики ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови». С 1998 г. и по настоящее время Татьяна Александровна — доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ЧелГУ

и многим другим — всем преподавателям и сотрудникам, кто работал и работает на факультете! Факультет не мог бы состояться без сильной команды, которая начала свой путь с идеи и воплотила её в жизнь, — факультет существует и развивается.

Особая благодарность:

Долгушину Илье Ильичу — академику РАН, д-ру мед. наук, профессору, заслуженному деятелю науки РФ, ректору Южно-Уральского государственного медицинского университета с 2005 по 2016 г., президенту Южно-Уральского государственного медицинского университета с 2016 г.;

Бухарину Олегу Валерьевичу — академику РАН, заслуженному деятелю науки РФ, профессору, д-ру мед. наук, создателю и руководителю Оренбургской школы микробиологов, основателю и долголетнему директору Института клеточного и внутриклеточного симбиоза, Председателю научного центра Уральского отделения РАН — за блестящие научные дискуссии по вопросам симбиоза, что нашло отражение в настоящей работе.

Мелеховой Ольге Петровне — д-ру биол. наук, доценту, с. н. с., зам. председателя УМС по биологии Федерального Учебно-Методического объединения «Биологические науки», ответственному секретарю ФУМО «Биологические науки» — за разумение науки построения факультета, консультации и советы.

Наши выпускники работают и продолжают учиться в различных точках России — от Калининграда до Петропавловска-Камчатского, различных городах ближнего и дальнего зарубежья (Германия, Франция, США, Китай). Факультету и всем нашим студентам мы посвящаем эту работу.

А. Л. Бурмистрова,
доктор медицинских наук, профессор,
декан биологического факультета
Челябинского государственного университета
(1998–2018 гг.)

Оглавление

ПРЕДИСЛОВИЕ	11
ВВЕДЕНИЕ. МИКРОБНЫЕ АССОЦИАЦИИ — ИНТЕГРАЛ ВСЕХ ЭУКАРИОТ (А. Л. Бурмистрова)	15
ГЛАВА 1. АНТИБИОТИКИ — ФАКТОР СЕЛЕКЦИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ (Н. Э. Хайдаршина, Л. И. Бахарева)	31
1.1. Антимикробные соединения — токсические стрессоры прокариот ...	34
1.2. Адаптивный ответ бактерий на негативный эффект антибиотиков ...	39
1.3. Роль человека в формировании и распространении антибиотикостойчивых бактерий	49
1.4. Характеристика антибиотикорезистентности штаммов <i>E. coli</i> и <i>K. pneumoniae</i> , выделенных от стационарных и внегоспитальных больных	56
Заключение	60
ГЛАВА 2. АДАПТАЦИЯ К СТРЕССОРАМ. ЗАЩИТНЫЕ СТРАТЕГИИ ПРОТИВ МИКРОБОВ — РЕЗИСТЕНТНОСТЬ/ТОЛЕРАНТНОСТЬ КАК БИОЛОГИЧЕСКОЕ СВОЙСТВО.	63
2.1. Модель взаимодействия хозяина и патогена как ответ на стресс макроорганизма при оппортунистических кандидозах (Н. Е. Самышкина)	65
2.2. Вариации микробной сигнатуры тонкого кишечника при психофизической адаптации людей пожилого возраста (Ю. Ю. Филиппова)	83
2.3. Микробные паттерны тонкого кишечника детей с расстройствами аутистического спектра в контексте наличия или отсутствия социальной адаптации (А. Л. Бурмистрова, Ю. Ю. Филиппова, А. В. Тимофеева)	93
2.4. Микроорганизмы как фактор селекции человеческих популяций (на примере генов TLR) (А. В. Евдокимов)	106
2.5. Селекция человеческих популяций микробами (на примере популяционных различий HLA I, II класса) (Т. А. Суслова, М. Н. Вавилов, Е. Б. Хромова)	120
2.6. Генетический полиморфизм системы цитокинов при дезадаптации человека на примере воспалительных заболеваний кишечника (Д. С. Сташкевич, С. В. Беляева)	140
2.7. Морфофункциональная характеристика клеточных элементов системы мононуклеарных фагоцитов потомства матерей с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы (Г. В. Брюхин)	155

ГЛАВА 3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ АДАПТОМЕТРИЯ И СТРЕСС: ВОПРОСЫ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА (на примере оценки взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при психофизической адаптации людей пожилого возраста) (Д. Ю. Нохрин, Ю. Ю. Филиппова)	171
3.1. Стандартный подход к расчёту веса корреляционного графа и пути его модификации	175
3.2. Интервальная оценка веса корреляционного графа	179
3.3. Проблемы интервального оценивания	186
3.4. Проверка данных на выбросы в корреляционной адаптометрии	188
3.5. Выборочные сравнения в корреляционной адаптометрии	189
3.6. Результаты оценки взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при психофизической адаптации людей пожилого возраста методом корреляционной адаптометрии	194
Заключение	195
Приложение к главе 3. Расчеты по корреляционной адаптометрии в программно-статистической среде <i>R</i>	196
ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ИСТОЧНИКИ.	202
METAORGANISM. STRESS AND ADAPTATION (SYNOPSIS)	231

Предисловие

Данная книга подготовлена и выпущена в честь 20-летия биологического факультета и 21 года кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии, которая была создана в 1997 г. и стала базовой для открытия факультета, включающего ещё две выпускающие кафедры: радиационной биологии и биоэкологии.

Здесь представлены работы преподавателей кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии, отражающие результаты их исследований (проведённых в последние 10 лет) и их научные интересы. В связи с разнообразием тем статей мы объединили их в рамках одного направления — метаорганизм, как сложная интегрированная система, включающая множество клеток и генов, метаболических образов и информационных сигналов двух партнёров — эукариота-человек и прокариота-микробов. Поведение каждого из партнёров определяется эволюционной историей, историей своей жизни и жизни метаорганизма, как целого, являющегося примером адаптации организмов на молекулярном, клеточном уровнях, а также уровнях организма и популяций.

Приводим краткое содержание глав.

Микробные ассоциации — интеграл всех эукариот (*введение*). Здесь представлен анализ данных, позволяющих рассматривать метаорганизм в качестве интегрального комплекса, включающего сообщество множества клеток и генов, метаболических образов и информационных сигналов, различных форм жизни — макроскопической (эукариотической) — человек, и микроскопической (прокариотической). Оба партнёра живут сложной социальной жизнью, каждый в своём сенсорном мире, и развивают различные формы интеллигентных процессов, а следовательно, демонстрирует свой стиль жизни — внутри микробного сообщества («микроб-микроб») и между партнёрами — «микроб-хозяин».

Так как стресс есть жизнь, авторами представлен современный взгляд на ключевые аспекты клеточного и воспалительного стресс-ответов, необходимых для индукции адаптации к стрессору. Кроме того, обсуждаются два вида защитных стратегий, обеспечивающих выживаемость хозяина с последующим восстановлением гомеостаза — резистентность и толерантность.

В заключении приведены данные, позволяющие по-новому взглянуть на коровый принцип современной биологии, объединяющий концепцию индивидуальности с концепцией конгруэнтности. Несмотря на новые omics-технологии, мы до настоящего времени стоим перед «загадкой Сфинкса» — что же такое метаорганизм, имеет ли симбиоз границы, или это форма жизни, или это сама жизнь.

Глава 1. Антибиотики — фактор селекции антибиотикорезистентных штаммов условно-патогенных бактерий. Начало книги с этой темы определяется

драматическим распространением и разнообразием антибиотикорезистентных патогенов и симбионтов, что не только существенно снижает эффективность практически всех существующих классов антибиотиков (АБ), но и чрезвычайно затрудняет создание новых препаратов. Вероятно, наши трудности являются отражением нашего недостаточного понимания пластичности генетического аппарата бактерий, фенотипической (негенотипической) изменчивости, физиологии клеточного стресс-ответа и моды действия антибиотиков, т. е. молекулярных механизмов, с помощью которых АБ индуцируют клеточную смерть или ингибцию роста бактерий.

Глава 2. Адаптация к стрессорам. Защитные стратегии против микробов — резистентность/толерантность как биологическое свойство. Глава включает семь разделов, каждый из которых представлен результатами исследований, не связанных единой тематикой и отражающих научные интересы каждого автора, но объединённых одним научным направлением — «стресс-ответ-защитные стратегии — гомеостаз» — от клетки до популяции.

2.1. Модель взаимодействия хозяина и патогена как ответ на стресс макроорганизма при оппортунистических кандидозах. Автором представлены результаты оценки взаимодействия в условиях *in vitro* лейкоцитов хозяина (женщин с диагнозами: острый вульвовагинальный кандидоз (ВВК); хронический ВВК с редкими рецидивами; хронический ВВК с частыми рецидивами) и клинических изолятов *C. albicans*. Установлены различия в защитном ответе (микоцидном и иммуномодулирующем) клеток врождённой иммунной системы больных женщин в отношении дрожжевых форм *C. albicans* в зависимости от диагноза, отражающего переключение защитного ответа от толерантности к иммунопатологии.

2.2. Вариации микробной сигнатуры тонкого кишечника при психофизической адаптации людей пожилого возраста. Речь идёт о естественном мультифакторном феномене — старении. В настоящее время высказана точка зрения, что психофизическая дезадаптация у людей пожилого возраста может быть связана с нарушением толерантности (уровень целого организма) к инфекции.

2.3. Микробные паттерны тонкого кишечника детей с расстройствами аутистического спектра в контексте наличия или отсутствия социальной адаптации. Проведена оценка ассамблей микробов различных фило типов/родов/видов, организующих паттерны микробных сообществ тонкого кишечника типично развивающихся детей (ТРД) и детей с расстройствами аутистического спектра (РАС) в контексте наличия/отсутствия социальной адаптации. Установлены различия в микробных ассамблеях, создающих паттерны микробных сообществ: ТРД и детей с РАС с различной степенью выраженности социальной адаптации: социальная адаптация присутствует/отсутствует, адаптация/регресс (слабый социальный контакт).

2.4. Микроорганизмы как фактор селекции человеческих популяций (на примере генов TLR). Авторы демонстрируют, как толерантные свойства могут фиксиро-

ваться в популяции хозяина, так как находятся под позитивной селекцией, что обеспечивает организму, при взаимодействии с патогенными микробами, более лёгкое течение и выживаемость.

2.5. *Селекция человеческих популяций микробами (на примере популяционных различий HLA I, II класса)*. Представлены результаты многолетнего исследования научной группы по оценке давления естественного отбора на генетическую область HLA различных популяций Челябинской области (далее — ЧО): русских, башкир, татар, нагайбаков. Система HLA обладает максимальным генетическим разнообразием из всех известных генетических систем, и вариабельность её генов напрямую связана с исходом многих заболеваний — резистентность/иммунопатология.

2.6. *Генетический полиморфизм системы цитокинов при дезадаптации человека на примере воспалительных заболеваний кишечника*. В настоящее время принята точка зрения, что общим свойством различных патологических состояний макроорганизма являются локальные изменения микробиоты внутри кишечника: деструктурирование микробного сообщества, оккупация новых ниш, часто тесно ассоциированных с эпителием кишечника, изменение поведения бактерий (повышение конкуренции) и транслокация бактерий из кишечной трубки вглубь, где они способны вызвать активацию врождённого иммунного ответа. Такие события сопровождаются подъёмом в циркуляции провоспалительных цитокинов — IL-1, IL-6, TNF- α . Весь этот патогенетический набор характерен для воспалительных заболеваний кишечника, часто являющихся маркёром иммунопатологии.

2.7. *Морфофункциональная характеристика клеточных элементов системы мононуклеарных фагоцитов потомства матерей с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы*. В заключение главы 2 мы приводим результаты многолетней совместной научной работы двух вузов — ЧелГУ и ЮУГМУ, выполненных под руководством заведующего кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ЮУГМУ и профессора кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ЧелГУ, профессора Г. В. Брюхина. В этих исследованиях получены уникальные данные, раскрывающие стресс-ответ, адаптацию и пластичность резидентного макрофага в течение жизни двух родственных популяций — матери и потомства, при действии различных стрессоров на беременную самку (поражения печени различного генеза) и при оценке гомеостаза резидентных макрофагов потомков в условиях воздействия *in vitro* активаторов клетки.

Глава 3. *Корреляционная адаптометрия и стресс: вопросы статистического анализа (на примере оценки взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при психофизической адаптации людей пожилого возраста)*. Представлено статистическое сопровождение метода корреляционной адаптометрии, позволяющего изучать формирование связей в биологических системах и их изменение при действии экстремальных и прочих стрессирующих факторов. Считаем, что это ещё один путь среди многих к системной оценке метаорганизма.

*Сквозь волшебный прибор Левенгука
На поверхности капли воды
Обнаружила наша наука
Удивительной жизни следы.
Государство смертей и рождений,
Нескончаемой цепи звено...
Но для бездн, где летят метеоры,
Ни большого, ни малого нет,
И равно беспредельны просторы
Для микробов, людей и планет.*

Н. Заболоцкий, 1948

Большинство биологических систем на Земле живёт сложной социальной жизнью и презентует себя в качестве социумов — от микробов до человека. Организм человека является примером интеграции двух социальных систем — социума разнообразных эукариотических клеток и генов, принадлежащих хозяину, и мультивидового сообщества микроорганизмов (количество клеток у которого на порядок больше, чем у хозяина, и в 150–250 раз больше генов), демонстрирующих социальные отношения высокой комплексности (Collins et al., 2012).

Поведение каждого из партнёров опирается на информационные сети, включающие сигнальные молекулы в качестве языка общения в решении огромного количества задач каждого из социумов и между ними, среди которых главными выступают жизнь и воспроизводство каждого и в целом уникальной конструкции — человек как метаорганизм. Однако существование биологических систем любого уровня протекает в условиях динамического окружения, для которого характерны периоды наличия/отсутствия стрессоров, и эти условия в ходе эволюции сформировали у животных две формы поведения: безопасный период (вне действия стрессоров — регенерация, размножение, накопление энергии); опасный — траты энергии и реализация различных форм защиты — «борьба/отступление»; «замороженное поведение» или «притвориться мёртвым», которые контролируются гормонами на уровне организма (Kültz, 2005). Эти периоды являются примером адаптации организмов на молекулярном, клеточном, физиологическом и поведенческом уровнях каждого из двух партнёров симбиоза. Совершенно очевидно, что для сохранения метаорганизма как целого необходим баланс адаптации партнёров, существующих в различных сенсорных мирах — хозяин-эукариот и микробное сообщество-прокариоты. А так как взаимоотношения между хозяином и его микробным сообществом носят запутанный характер, особенно в вопросах выгоды/пользы такого сожительства для каждого из партнёров, что определяет состояние здоровья/болезни каждого из них и всей системы в целом, гомеостаз симбиоза предложено рассматривать с помощью оценки вклада партнёров друг в друга — микроб для хозяина, хозяин для микроба, микроб для микроба (Mushegian, Ebert, 2016; Ebert, 2013).

Начнём с оси «микроб-хозяин». Хорошо известно, что микробное сообщество кишечника человека неоднородно и одновременно включает резидентов, ассоциированных с хозяином, и транзитных посетителей (с разными временными периодами нахождения на/или внутри организма хозяина), которые составляют большую часть микробного сообщества и успешно проживают вне организма человека/животного (например, *E. coli*) (Mushegian, Ebert, 2016; Ebert, 2013). Количество резидентов невелико и ограничено фактом обязательных трансмиссий — вертикальной (мать-плод, ранний постнатальный период) и горизонтальных (через прямой контакт — поцелуй, груминг и т. п.), так как их выживаемость вне хозяина практически отсутствует. Однако независимо от путей передачи большинство симбионтов способны проявлять по отношению к хозяину пользу или вред, а так как каждая часть сообщества демонстрирует свой альтернативный стиль жизни как друг с другом, так и с хозяином — временным или постоянным, то соответственно оценить пользу, функциональную выгоду для хозяина каждой составляющей (резиденты/транзиты) чрезвычайно сложно, не говоря уже об индивидуальных членах. И это не удивительно, так как микробное сообщество кишечника содержит триллионы микробов (Schneider, Ayres, 2008) и от сотен до тысяч взаимодействующих видов и штаммов (Johnson, Foster, 2018), которые образуют под контролем хозяина малые микробные ансамбли на малых пространствах (кишечника), напоминающие заплатки или островки, сформированные на основе фундаментальных процессов экологии, таких как: дисперсия, локальная диверсификация, селекция средой окружения и экологический дрейф (Costello et al., 2012).

В результате сайт-специфические компартменты кишечника презентуют себя в качестве малых экологических сообществ внутри большого экологического сообщества — экосистемы дигестивного тракта, где они проживают (Mushegian, Ebert, 2016). Жизнь микробов внутри сайт-специфических сообществ-биоплёнок отражена в основных линиях поведения их членов — конкуренции и кооперации. Конкуренция за ресурсы выступает ключевой детерминантой биологической функции (Foster et al., 2017; Walter, Ley, 2011), так как разнообразие и доступность ресурсов, поставляемых хозяином, обеспечивает доминирование различных микробных видов (штаммов) и метаболических типов при распределении по различным нишам кишечника (биогеография), это снижает конкурентную борьбу (Nadell et al., 2016) и запускает колонизационную резистентность (КР), способную защитить нишу от инвазии штаммами, менее адаптированными к таким условиям (Foster et al., 2017; Kitano, Oda, 2006). Социальная жизнь микроорганизмов выглядит непростой, и борьба за существование породила множество механизмов для конкуренции друг с другом, таких как убийство других видов с помощью токсинов или при прямом контакте (контакт-зависимый антагонизм) с помощью токсических эффекторных протеинов, вводимых клеткой-донором (убийца) в клетки-мишени (жертва) с использованием VI типа секреторной системы (функционального аналога структуры

бактериофага) — «введение шприцем» (Basler et al., 2013). Контакт-зависимый антагонизм является, как подчёркивают авторы (Wexler et al., 2016), генеральным свойством, определяющим межбактериальные взаимодействия в микробном сообществе кишечника.

Многие микробы, чтобы остаться конкурентными внутри сообщества, в котором они широко распространены, используют кооперативные свойства:

- горизонтальный перенос генов (конъюгация, трансформация, трансдукция) для создания общего генного пула различных популяций, гарантирующего доступность использования коллективной памяти (Foster et al., 2017; McInerney et al., 2017);

- электрическая коммуникация — некоторые бактерии демонстрируют ответы на электрические сигналы для облегчения координированного популяционно-базового поведения (Liu et al., 2015);

- система экспорта — экстраклеточные РНК и экстрацеллюлярные везикулы (ЭКВ), транспортирующие липиды, компоненты клеточной стенки и другие углеводороды, протеины и сигнальные молекулы, маленькие метаболиты, ДНК и РНК, разнообразные по репертуару: рРНК, тРНК, мРНК, маленькие РНК и короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (*crRNAs* — *CRISPRRNA clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), входящие в *CRISPR-Cas* системы адаптивной иммунной защиты бактерий и архей. Авторы подчёркивают, что ЭКВ не только представляют консервативный механизм для экспорта РНК (определён у бактерий, архей, эукариотических микроорганизмов), но и конститутивно важны при оценке коммуникаций внутри и между царств с акцентом на взаимодействие коммуникаций в системах «микроб-микроб» и «хозяин-микроб» (Tsatsaronis et al., 2018).

Но и кооперативное поведение имеет у бактерий ряд нюансов, которые вписаны в различные формы феномена адаптации на стресс — «дремоты». Наиболее распространённая форма сопровождается низкой метаболической активностью при практически полном отсутствии деления персистирующих жизнеспособных некультивируемых бактерий, что позволяет демонстрировать высокую толерантность (Lewis, 2007). Другая форма феномена характерна для процесса споруляции, при котором на основе клеточно-клеточной коммуникации проходит канибалический путь. На этом пути клетки, «думающие о споруляции», начинают секрецию летальных факторов, успешно захватываемых ближайшими соседями, что приводит их к гибели. Питательные вещества из погибших клеток используются для пропитания тех, кто встанет на путь споруляции (например, *B. subtilis*) (Dwyer et al., 2009). Хорошо известна и ещё одна особая форма феномена «дремота», в которую микробы входят без изменения специализированных клеточных структур (без резистентных мутаций). Такая форма обеспечивает выживание персистентных клеток при лечении антибиотиками (АБ) (Lewis, 2010; Lewis, 2007).

Таким образом, хозяин является местом экспозиции множества мультивидовых микробных сообществ, поэтому оценка комплексной оси взаимодействий: «микроб-микроб», «хозяин-микроб» чаще всего даёт непредсказуемый результат (Mushegian, Ebert, 2016). Авторы предполагают, что очень трудно описать выгоду для хозяина каждой функции каждого микроорганизма, так как она может зависеть от других микроб-обусловленных функций, и встреча их на одной территории может вызвать между эффектами различных генов сайт-специфического сообщества либо конфликт, либо синергизм. Возможны и другие ситуации, когда единственная благоприятная для хозяина функция является результатом комбинированных активностей множества бактериальных видов (Mushegian, Ebert, 2016; Foster et al., 2017) либо польза для хозяина обеспечивается побочными продуктами функций, которые развёртываются в соответствии с целями микробов, но не предназначены для блага хозяина. К этой категории можно отнести охрану симбиозов, основанную на функциях вторичного метаболизма, таких как детоксикация тяжёлых металлов или токсинов растений, продукция защитных компонентов против других микробов, а также некоторых компонентов метаболизма, обслуживающих рост и деление микроорганизмов. Эти функции выгодны для хозяина, хотя это является результатом простого совпадения (Johnson, Foster, 2018; Mushegian, Ebert, 2016, Eberl, 2018).

В последние годы большое внимание уделяется таким побочным микробным продуктам, как короткоцепочечные жирные кислоты *SCFA* — *short-chain fatty acids* (бутират, пропионат, ацетат), которые обладают широким спектром воздействия на хозяина:

1) влияют на моторику кишечника, что негативно сказывается на конкурентной способности определённых видов бактерий (Johnson, Foster, 2018);

2) обеспечивают интегральную целостность и энергетический потенциал эпителия кишечника, выступающих гарантией физиологической проницаемости кишечника;

3) оказывают влияние на созревание, дифференцировку и функциональную готовность клеток иммунной системы, модулируют локальный и системный иммунные ответы, в т. ч. инициируя формирование локальных супрессорных полей в местах проживания. Как отмечают Johnson, Foster (2018) и Mushegian, Ebert (2016), сайт-специфические микробиото-обусловленные преобразования иммунной и кишечной нервной систем могут определить настроение и поведение хозяина, так как обе системы тесно связаны между собой, образуя в ходе эволюции человека анцестральные иммуно-нейроэндокринные регуляторные сети организма (метаорганизма). В свете сказанного можно предположить, что некоторые эффекты влияния микробиоты на хозяина могут быть отражением локальных сайт-специфических воздействий в месте её проживания, а не глобальных манипуляций фенотипами хозяина (Johnson, Foster, 2018; Foster et al., 2017), для которых трудно найти доказательства и объяснения.

Интересно, что SCFA и некоторые нейротрансмиттеры (в т. ч. GABA — γ -амино-бутировая кислота), известные как компоненты организма человека (животных), продуцируют свободно живущие бактерии (грибы) вне тесной связи с организмом человека. Авторы Mushegian, Ebert (2016) приходят к выводу, что вездесущность бактерий, их метаболитов и сигнальных молекул в пространстве Земли может означать, что бактерии являются генеральным свойством любого окружения, к которому приспособлены их настоящие физиологические функции, а следовательно, и организма человека/млекопитающих. Они обладают способностью к конструкции ниш, проводя модификацию и селекцию важных компонентов их локального окружения, включая химические питательные градиенты, развитие, созревание/дифференцировку иммунной системы (врождённой и адаптивной) и т. д. (Day et al., 2003). Далее авторы продолжают: через конструкцию ниш организмы (микробы) не только влияют на характер своего мира, но также частично детерминируют различные виды селективных прессов, которые воздействуют на них и их потомков, и делают они это не в случайной манере. Развитие гармоничного соответствия между организмами и окружением является продуктом обоюдных взаимодействующих процессов натуральной селекции и конструкции ниш.

Таким образом, анализ литературных данных акцентирует на том, что каждый хозяин является индивидуальным домом для населяющих его микробных сообществ, носителем экосистем (малых и больших), и оценка комплексной оси: «хозяин для микроба — микроб для хозяина — микроб для микроба», показывает, что она биполярна/мультиполярна и динамична, и выделить направление взаимодействий во времени и пространстве в настоящее время проблематично. Обычно вопрос «хозяин для фитнеса микробов» рассматривается с позиций обеспечения микробного сообщества питанием за счёт диеты хозяина и предоставления свободных от конкуренции мест для расселения, а если говорить о кишечнике — теплом, влагой, относительным постоянством условий (Mushegian, Ebert, 2016). Однако даже в этом примере необходимо сразу обозначить биполярность фитнеса микробного сообщества, которое само выступает ключевой детерминантой регуляции метаболизма хозяина, включая сбор энергии и создание запасов жира. Например, тонкий кишечник обеспечивает более 90 % всей энергии, абсорбированной из пищи, так как его микробы являются главными ферментёрами углеводов, жиров и белков (El Aidy et al., 2013; El Aidy et al., 2015; Walter, Ley, 2011).

В итоге оба партнёра (хозяин и его микробное сообщество) вынужденно стремятся к балансу отношений, обеспечивающих здоровье системы — метаорганизма. Организация таких отношений проходит при участии и под непосредственным руководством главного потребителя микробных информационных сигналов — иммунной системы, которая и сама находится под «пристальным вниманием» микробов (Бурмистрова, 1997). Речь идёт о функциональной оси — «триумvirате»: микробиота — кишечный эпителий — кишечно-ассоциированная иммунная

система, стартующем уже в пренатальном периоде при трансфере к плоду метаболитов микробиоты кишечника матери — биоинформационных молекулярных сигнатур, включающих широкий ассортимент инструкций по аранжировке и функции раннего постнатального иммунитета, сопряжённого с развитием эпителия кишечника, а также по композиции и распределению микробных сообществ кишечника (Shulzhenko et al., 2011; Gomez de Agüero et al., 2016; Eberl, 2018).

Такого рода инструктаж предусматривает подготовку неонатального врождённого иммунитета к постнатальному периоду — «микробному цунами», обеспечивая успешную колонизацию микробиоты, поддержанную вскармливанием её олигосахаридами грудного молока матери (Perez et al., 2011), и функциональной осью — «триумвиратом». Эти события имеют огромное значение для последующей жизни организма, так как именно в ранний постнатальный период происходит модификация эпигенетического кода генов иммунного ответа, вовлечённых в иммунный импринтинг, которая инициирована микробами и миелоидными клетками хозяина (Eberl, 2018; Gomez de Agüero et al., 2016). В последние 10 лет представлен ряд доказательств об уникальной её роли в строительстве симбиоза «хозяин-микробное» сообщество кишечника. Приведём некоторые из них:

1. Эпителиальные клетки кишечника дифференцированно экспрессируют рецепторы врождённой иммунной системы Toll-подобные рецепторы (TLR), которые узнают и связывают структурные компоненты бактериальных клеток, в результате, индуцируя каскад информационных сигналов, в том числе цитокинов, хемокинов, ансамбля адгезивных молекул на самом эпителии, играющих важную роль в балансе отношений хозяина со своей микробиотой (Eberl, 2018; Gomez de Agüero et al., 2016) и лежащих в основе стратегии толерантности. Комбинация таких сигналов — «epimune» инструктирует, в соответствии с контекстом окружения (Swamy et al., 2010), иммунную систему о необходимости проявления иммунной компетенции в рамках физиологических ответов без выхода на иммунопатологию.

2. Клетки Гоблет (специализированные эпителиальные клетки) не только связаны с поддержанием барьерных свойств эпителия через продукцию слизи, но и секрецией антимикробных протеинов, хемокинов и цитокинов, заявляя себя участниками врождённого иммунитета, и даже способны индуцировать адаптивные ответы при формировании гоблет-клетко-ассоциированного пассажа антигенов, поступающих из кишечной трубки к антиген-презентирующим клеткам собственной пластинки слизистой (*lamina propria*) (Knoop, Newberry, 2018).

3. «Триумвират» не может превратиться в бифункциональную ось в условиях гомеостаза. В присутствии микробиоты, когда иммунная система функционирует оптимально, кишечный эпителий занимается своей собственной функцией. Однако при дисфункции иммунной системы (гуморальной составляющей — секреторного иммуноглобулина А, sIgA) эпителий берет на себя отсутствующие (нарушенные) иммунные функции ценой утраты собственного метаболизма. Так, в отсутствии

В-лимфоцитов и секреторного IgA, но в присутствии микробиоты кишечный эпителий животных начинает «съедать» свои собственные защитные механизмы, активируя гены врождённого иммунного ответа на расход своего метаболизма (Shulzhenko et al., 2011). Авторы пришли к заключению о наличии у тканей своей собственной защиты.

4. Интимная связь микробов и гуморального иммунного ответа продолжается. Оппортунистическая бактерия *Alcaligenes* выбрала для своего проживания пейеровы бляшки и изолированные лимфоидные фолликулы (внутри них) кишечника, привлекая для создания своей ниши В-лимфоциты и sIgA слизистых, отсутствие которых приводит к снижению её количества. Она практически вездесуща, присутствует в почве, свежей воде, сточных водах, морских системах, клиническом материале от больных и в испражнениях здоровых людей (Obata et al., 2010).

Связь микробиоты и гуморального иммунного ответа представляется вполне закономерной, так как большой и разнообразный репертуар антител (АТ) (к чужеродным и своим антигенам — ауто-АГ) обладает высокой информационной ёмкостью (Quintana et al., 2006) и включён в глобальную сеть системы регуляции. Репертуар постнатальных АТ разнообразен и представлен моновалентными специфическими АТ, выступающими маркёром встречи с чужеродными антигенами и готовности к ответу на встречу с будущими специфическими патогенами, и ауто-АТ, контролирующими внутренний гомеостаз, определяя во многом интеграцию иммунной и нейроэндокринных систем в здоровье и болезни (Бурмистрова, 1997).

Поток новых данных о взаимоотношениях «микробиота-хозяин» инициирует пересмотр многих точек зрения в области микробиологии и симбиоза живых систем.

В 2017 г. был представлен анализ недавних исследований по детекции липополисахарида (ЛПС) через царства жизни (Kagan, 2017). Продемонстрировано, что единственный липид (фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат) — большой компонент наружной мембраны грамотрицательных клеток, не имеет личного рецептора, а связывается с сетом разнообразных рецепторов (узнающих ЛПС): Toll-подобных рецепторов, G-протеин-связывающих рецепторов, интегринов, рецептор-подобных киназ и каспаз для регуляции многих ЛПС-ответов, включая эндоцитоз, фагоцитоз, воспаление и пиропитоз. Родственные механизмы детекции ЛПС присутствуют у млекопитающих (таких как мыши и человек), растений, беспозвоночных и примитивных одноклеточных эукариот (Kagan, 2017).

Ж. С. Каган подчёркивает: очень удивительно, что мультиклеточные организмы, несмотря на разнообразие характеристик и стилей жизни, демонстрируют одно общее фундаментальное свойство — узнать и организовать защиту от потенциально инфекционных микроорганизмов, представляющих угрозу для жизни. Если говорить о нашем интересе в защите самих себя, надо вспомнить, что все мультиклеточные организмы стоят перед лицом угроз бактериальных инфекций. И только через изучение всех организмов, нашего партнёрства с ними, можно

достигнуть широкого системного понимания о путях оптимизации иммунной защиты человека.

Жизнь всех живых систем наполнена стрессорами. Чтобы поддержать свой гомеостаз на всех уровнях — индивидуальных клеток, внутри тканевых компартментов, на уровне целого организма (системный гомеостаз) (Chovatiya, Medzhitov, 2014), необходимо включать защитные реакции на повреждения макромолекул — стресс-ответ, если говорить о клетке. Клеточный стресс-ответ (КСО) является универсальным механизмом экстраординарной физиологической/патофизиологической значимости (Kültz, 2003, 2005). Ключевые аспекты клеточного стресс-ответа включают различные стресс-протеины (минимальный стресс-протеом), осуществляющие сенсинг повреждений мембранных липидов, протеинов и ДНК; изменений редокс-потенциала и его регуляции; контроля клеточного цикла; стабилизации и репарации макромолекул; контроля энергии метаболизма. КСО характерен для всех клеток, и протеины, вовлечённые в ключевые аспекты КСО, консервативны у всех организмов (Kültz, 2005).

Если говорить о тканевом гомеостазе, многие вопросы не достаточно ясны. Наиболее изученной областью является оценка его при действии инфекции и при травматическом повреждении. Сенсорами таких событий выступают резидентные иммунные клетки (особенно макрофаги и тучные клетки), которые могут мониторировать и контролировать тканевой гомеостаз не только при инфекции и поражении, но и в ходе более общих изменений нормального тканевого гомеостаза (гипоксия, метаболический стресс и т. д.) (Chovatiya, Medzhitov, 2014). Когда гомеостатическая способность не успешна, для поддержания динамических параметров гомеостаза привлекается стресс-ответ. Если стресс-ответ не достаточен для защиты гомеостаза, стартует воспалительный ответ, который отличается от классического острого воспалительного ответа, так как не сопровождается образованием экссудата и рекрутированием нейтрофилов (Chovatiya, Medzhitov, 2014). Оба ответа — стресс-ответ и воспалительный, необходимы для элиминации стрессора (источника пертурбации), индукции адаптации к стрессору (запуску программ экспрессии генов, контролирующих клеточный гомеостаз) и обязательного возврата системы в состояние гомеостаза (Kültz, 2003, 2005).

В ходе эволюции хозяин приобрёл два вида защитных стратегий, обеспечивающих выживаемость с последующим восстановлением гомеостаза, — резистентность и толерантность.

Резистентность является значимой функцией иммунной системы (врождённой и адаптивной), которая должна узнать и удалить микробы, привлекая к процессу пути микробного киллинга. Её характерной чертой является способность к ограничению патогенной нагрузки (когда резистентность увеличивается, уровень патогена снижается) (Ayres, Schneider, 2008; Medzhitov et al., 2012; Ayres, 2016). И хотя эффективность такой защиты высока и тесно связана с иммунной памятью, она

имеет высокую стоимость для хозяина, так как процесс деструкции и удаления патогена сопровождается неизбежным (в большей или меньшей степени) повреждением тканей хозяина на арене действий и (или) дезорганизацией их нормальной функции (Medzhitov et al., 2012; Soares et al., 2014).

Негативная сторона иммунной защиты, отражающаяся на фитнесе хозяина, получила название — иммунопатология, выраженность и продолжительность которой позитивно коррелирует с величиной иммунного ответа. Хорошо известно, что физиологический иммунный ответ — «нормо-ответ», базируется на балансе двух процессов — эффективное удаление патогена/ приемлемый уровень иммунопатологической реакции, но если уровень последней превышает «нормо-ответ» (т. е. становится выше допустимого), то она включается в симптомы инфекционной патологии (Medzhitov et al., 2012). Совершенно очевидно, что оба ответа — физиологический и иммунопатологический, могут быть причиной тканевого повреждения, так как инициируют ансамбль различных механизмов — прямое разрушение инфицированных клеток-свидетелей (соседей по несчастью), и (или) нарушение их гомеостаза и функции (Soares et al., 2014, Medzhitov et al., 2012, Ayres, Schneider, 2008).

С точки зрения эволюционных процессов резистентность, защищая хозяина, оказывает негативное влияние на микробный фитнес и ведёт к ко-эволюции антагонистических отношений хозяина и микробных популяций (Svensson, Råberg, 2010, Ayres, 2016, Ayres, Schneider, 2008). Так, негативное воздействие (селективный пресс) микробов на популяции хозяев приводит к селекции у последних адаптивных защитных стратегий, которые оказывают обратный эффект, т. е. селективный пресс на популяцию микробов, инициируя создание ими новых защитных стратегий (Ayres, 2016). Такие ко-эволюционные отношения препятствуют закреплению внутри популяции хозяина резистентных свойств, и эволюция резистентных механизмов хозяина продолжается (динамический процесс) (Schneider, Ayres, 2008; Soares et al., 2014).

Толерантность определяется как защитная стратегия, способная свести к минимуму повреждения, которые возникают в ходе взаимодействия с микробами (снизить тяжесть инфекционного заболевания), без негативного влияния на количество микробов (Ayres, 2016). Автор подчёркивает, что толерантность выступает инициатором здоровья (и фитнеса) хозяина и одновременно оказывает нейтрально/ позитивное влияние на фитнес микробов, что создаёт благоприятные условия для коэволюции взаимодействий «хозяин-микроб» и является базовым отличием от резистентности (Ayres, 2016). Изучение двух защитных стратегий показало, что они генетически детерминированы, и свойства их в основном отражают наличие изолированных, отличных механизмов, которые регулируются отдельно друг от друга. Так, при оценке эффектов эндотоксиновой толерантности на экспрессию генов под контролем сигналов TLR установлено два класса генов, экспрессия

которых запускается TLR-4: один, индуцирующий продукцию провоспалительных цитокинов, «молчал» в толерантных макрофагах, а другой не «молчал», а активировал антимикробные гены в толерантных клетках (Ayres, Schneider, 2008).

С эволюционной точки зрения, в отличие от резистентности, толерантные свойства могут фиксироваться в популяции (в т. ч. за счёт мутаций) хозяина, так как находятся под позитивной селекцией, и механизмы, увеличивающие толерантность, не ведут к развитию высоко резистентных патогенов (Little et al., 2010; Ayres, Schneider, 2008; Råberg et al., 2007, Svensson, Raberg, 2010).

Отвлечёмся от патогенов. Мы имеем множество «встреч и расставаний» и сложных взаимоотношений с нашими микробными симбионтами, которые могут быть лучшим примером механизмов толерантности, и в то же время они владеют патогенным потенциалом, способным «вспыхнуть» при снижении толерантности в условиях дезорганизации базовых свойств макроорганизма либо его микробного сообщества, для которого выступают мощным стрессором не только антибиотики, используемые нами, но и недостаток у макроорганизма воды, пищи, инфицирование его патогенами, развитие патологических метаболических процессов, а также психосоциальных стрессов. В настоящее время принята точка зрения, что общим свойством различных патологических состояний макроорганизма является локализация изменений микробиоты внутри кишечника (Ayres, 2016): деструктурирование микробного сообщества, оккупация новых ниш, часто тесно ассоциированных с эпителием кишечника, изменение поведения бактерий (повышение конкуренции) и транслокация бактерий из кишечной трубки вглубь (Bailey et al., 2011), где они способны вызвать активацию врождённого иммунного ответа (Kin et al., 2009). Такие события сопровождаются подъёмом в циркуляции провоспалительных цитокинов — IL-6, TNF- α (Bailey et al., 2011).

Весь этот патогенетический набор характерен для воспалительных заболеваний кишечника, сопровождающихся (показано в эксперименте) эрозией слизи и локализацией микробиоты в тесной ассоциации с эпителиальной поверхностью кишечника, т. е. извращённой локализацией (новые ниши), что потенцирует заболевание. Однако такое поведение микробиоты может презентовать «кооперативную микробную толерантность», когда инициируется выбор запрограммированной особой микробной сигнатуры с целью индукции толерантной защиты для возврата к гомеостазу (Ayres, 2016). Узнавание этой микробиоты TLRs приводит к индукции факторов цитопротекции и тканевой репарации, что позволяет восстановить интегративную целостность барьера (RaKoff-Nahouim et al., 2004).

Таким образом, оккупация новой ниши особой микробиотой может иметь большое значение для индукции механизмов репарации, кодируемых хозяином для запуска толерантности (Ayres, 2016). Эта новая точка зрения, отличная от представлений, что экстракишечная пространственная релокализация кишечной микробиоты может быть только результатом патогенных взаимодействий с хозяином,

получила подтверждение, что оккупация мутуалистами экстраклеточных ниш способна выступить инициатором толерантной защиты хозяина (Schieber et al., 2015). Необходимо отметить, что изучение феномена толерантности у животных находится в начале пути, поэтому весь спектр механизмов, участвующих в её формировании, не известен.

Предполагают, что формирование защиты в форме толерантности при взаимодействии «хозяин-микробиота» можно определить четырьмя механизмами: репарация, регуляция воспаления, нейтрализация токсинов и метаболический гомеостаз (Auges, 2016). Такие механизмы имеют древние корни. Считают, что КСО и ответ на повреждение возникли у анцестральных форм жизни, обеспечивая им выживаемость в тяжёлых условиях окружения (Lopez-Mauroy et al., 2008), и в ходе эволюции были объединены для обеспечения защиты хозяина от инфекции (Kültz, 2003, 2005). Эти анцестральные адаптивные ответы предшествовали формированию высокоэффективных механизмов, обеспечивающих резистентность хозяина, обладающих выраженным потенциалом повреждения собственных тканей, но имеющих высокую стоимость (Kültz, 2003, Soares et al., 2014).

С эволюционных точек зрения КСО представляет исключительно важное событие для врождённых свойств пластичности и здоровья/гомеостаза клеточной организации. Он позволяет клеткам быть более толерантными к периодически возникающим повреждающим воздействиям экстремального окружения и создаёт условия для медленных, стрессор-специфических адаптаций к материальному миру (Kültz, 2003). Вернёмся к психосоциальному стрессу — к механизмам регуляции системного провоспалительного потенциала при хроническом воздействии тяжёлых жизненных обстоятельств, таких как социальная изоляция, социальная депривация в ранней жизни, социальные невзгоды в поздней жизни и т. д. Все эти неблагоприятные условия, как установлено (Poweell et al., 2013), ассоциируются с увеличенным риском развития заболеваний и стресс-обусловленным увеличением экспрессии провоспалительных генов (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α). Биологические механизмы такого эффекта связаны со способностью симпатической нервной системы (СНС) при активации изменять мобилизацию гемопоэтических стволовых клеток, усиливать продукцию незрелых, провоспалительных моноцитов через β -адренорецепторы и миелоидный фактор роста ГМ-КСФ (Powell et al., 2013). Более того, стресс-индуцированная активация СНС (с привлечением β -адренорецепторов) оказывает влияние на моторику и секрецию кишечника, что может инициировать изменение структуры микробного сообщества с последующим повышением реактивности врождённой иммунной системы и снижением толерантности (Bailey et al., 2011).

Некоторые авторы отмечают, что концепция толерантности может не только применяться для многих заболеваний, но и выступать маркёром старения организма (Medzhitov et al., 2012). Персоны старого возраста демонстрируют

компрометированный иммунный ответ на патогены, и в то же время для них характерен повышенный воспалительный ответ на различные события, даже вне инфекционной составляющей. Высказано предположение, что пожилые/старые люди имеют выраженное снижение толерантности к патогенам за счёт снижения тканевого гомеостаза и репаративных способностей, хотя объяснений для этого феномена недостаточно. К сожалению, результат таких изменений проявляется в высокой частоте осложнений и смертности.

*Nihil ideo quoniam natumst in corpora, ut uti possemus, sed quod natumst id procreat usum.**

Тит Лукреций Кар, I в. до н. э.

(из Л. Маргелис)

Завершая наш обзор, мы хотели бы остановиться ещё раз на дискуссионных вопросах в современных исследованиях, касающихся существования комплексных и переменных отношений между макроскопическими и микроскопическими формами жизни, в т. ч. «хозяин — его микробное сообщество». Новые технологии (геномика, транскриптомика, метаболомика и т. д.), без сомнения, изменили наше представление об «индивидууме», симбиоз стал коровым принципом современной биологии и объединил концепцию индивидуальности с концепцией конгруэнтности (Gilbert, 2012). Однако многие вопросы остаются за рамками понимания и требуют новых технологий и новых подходов в изучении партнёров живых систем, прежде всего математического моделирования в системной биологии.

Для изучения открыты следующие вопросы.

Шкала микробного разнообразия гораздо выше, чем мы можем себе представить, и существуют трудности в разделении линий — вид/штамм (McFall-Ngai, 2007, 2008).

Не описано в полной мере (нет чёткого определения структуры и функции) хозяин-ассоциированное микробное сообщество, так как оно находится в постоянном (возможно, интимном) контакте с транзитными представителями (пища, вода, воздух), носителями информации о внешнем мире, при передаче которой возможно изменение активности резидентов, их биохимической программы, а следовательно, и сигнального потока внутри метаорганизма (Бурмистрова, 1997; McFall-Ngai, 2007, 2008).

Отсутствуют объяснения о выборе и адаптации некоторых микроорганизмов к уникальным нишам хозяина и о функциональной роли такой колонизации (Маргелис, 1983; McFall-Ngai, 2008).

* Ничто не возникает в теле для того, чтобы мы могли воспользоваться этим: напротив, тому, что возникло, находится применение.

Кишечно-ассоциированные лимфоидные ткани являются потенциальным местом проживания комменсальных бактерий: *Alcaligenes spp.*, *Achromobacter spp.*, *Bordetella spp.* и *Ochrobactrum spp.* (лимфоидно-ткане-резидентные комменсалы), которые, как предполагают, модулируют иммунную систему хозяина в ткане-специфической манере и награждают протективными эффектами в контексте тканевого повреждения, возможно, речь идёт о стратегии толерантности (Füng et al., 2016).

Тимус человека — функциональная ниша для вирус-специфических плазматических клеток. Тимус детей раннего постнатального возраста выступает значимым резервуаром (в периваскулярном пространстве) вирус-антиген-реактивных плазматических клеток, которые с большой долей вероятности являются сенсорами не только вирусов, но и других инфекционных агентов, путешествующих в крови (Nuñez et al., 2016).

Микробиом мозга человека. Определены (идентифицированы по морфологическим критериям) бактерии в различных регионах мозга людей (без признаков воспаления): субстанции нигра, гиппокампе, префронтальном кортексе, редко в стриатум. Расположены внутриклеточно — в астроцитах, дендритах, соме глиальных клеток. Районы обогащения — вокруг миелиновых аксонов и внутри них (Robert et al., 2018).

Таким образом, результаты исследований каждую минуту убеждают нас, что наши партнёры — симбиотические бактерии являются интегральной частью нашего метаорганизма, в котором отсутствуют барьерные ткани, нет привилегированных мест, и он не может быть стерильным на любом этапе своего развития и в любом компартменте.

И мы должны с большим уважением относиться к своим партнёрам, имеющим анцестральный опыт в симбиотической жизни с хозяевами различных царств, стоящих на различных ступенях эволюции. Бактерии умны, обладают «минимальной микробной интеллигентностью» и большим жизненным опытом, демонстрируют как индивидуальные клеточный сенсинг и поведение, так и коллективный сбор информации, включая коллективный сенсинг (Ben-Jacob, 2008). Они обрабатывают полученную информацию, принимают решение, распределяют задания, обладают коллективной памятью, что позволяет им учиться на последних опытах, запасать новую информацию, изменять поведение (при первой встрече с АБ) и даже манипулировать экстраклеточным окружением (Steinert, 2014; Marijuan et al., 2010).

Итак, изучение такой мультивидовой интегративной системы как метаорганизм представляется на сегодня сложной задачей. В своих исследованиях в последние годы мы опирались на два пути. Первый основан на определении сигнальных молекул бактериальных сообществ тонкого кишечника в системном биологическом поле (кровь/сыворотка) в контексте физического/когнитивного/психического здоровья персон и их возраста. В основу метода заложены данные об определении в жидкостях тела (кровь, пот, моча) метаболических сигнатур, выделенных

из ассоциированных с хозяином микробных сообществ (особенно тех, которые проживают в кишечнике) (Nicholson et al., 2005, 2012). У человека как питательные продукты, так и метаболические продукты наших микробных симбионтов, биохимические компоненты их клеток, в т. ч. клеточных стенок, доставляются к клеткам и тканям циркуляторной системой (McFall-Ngai, 2008).

И не вызывает сомнения факт, что физиология каждого партнёра и каждой клетки, которые обслуживаются циркуляторной системой, были сформированы коэволюцией хозяина и его микробных симбионтов (McFall-Ngai, 2008; Маргелис, 1983). Возможно, обмен информацией изначально являлся основой симбиоза, так как зародился, как можно предполагать, в недрах симбиотического хищничества — захвата чужого генетического материала при утрате или недостатке своего (Бурмистрова, 1997). Второй путь стартовал в наших исследованиях два года назад и не был направлен на оценку структуры и функции микробных симбионтов хозяина, но, как нам представляется, может быть успешно применён. Это метод пептидных микрочипов, названный «иммуносигнатура», основанный на принципе оценки индивидуальных глобальных паттернов антител, способных связываться с огромным набором (в нашем исследовании 124 000) синтезированных пептидов со случайными аминокислотными последовательностями, которые, как считают, копируют миметики природных антигенов, аутоантигенов и нео-антигенов собственного организма, возникающих в процессе эпигенетических событий, инициаторами которых способно выступать микробное сообщество кишечника метаорганизма (Филиппова, 2019).

Истина — это величайшая ветреница. Никогда не следует слишком страстно её домогаться, ибо она чаще и охотнее отвечает на холодное равнодушие. Она часто ускользает, будучи почти уже пойманной, и в то же время приходит сама, чтобы отдаться терпеливому ожиданию. Она неожиданно возвращается после прощальных слов разлуки, но остаётся жестокой и неумолимой к своему вечно-пылкому обожателю.

Поль де Крюи

В условиях окружающей среды прокариоты находятся в состоянии периодического воздействия неблагоприятных эффектов. Экстремальное воздействие этих факторов стимулирует формирование адаптационного ответа. Механизм и степень проявления этого ответа будет зависеть от типа и интенсивности стрессора.

В условиях макроорганизма такие экологические стрессы, как термический, водный, осмотический и некоторые другие, маловероятны. Реальное значение для патогенной и непатогенной микробиоты, циркулирующей в макроорганизме, отводится токсическому стрессу, вызванному воздействием антимикробных соединений, которые имеют основное значение в этиотропной терапии инфекционных процессов.

Первые синтетические соединения, ингибирующие рост микроорганизмов, были обнаружены и описаны более 100 лет назад. К настоящему времени известно более 14000 наименований этих веществ. Около 200 из них применяются в медицине и ветеринарии для получения антимикробных лекарственных препаратов. По спектру биологического действия их условно делят на пять групп — антибактериальные, противотуберкулёзные, противопротозойные, противовирусные и противогрибковые (Маянский, 2006).

Нередко эти группы объединяют понятием «антибиотики». С биологической точки зрения под термином «антибиотик» понимают специфические продукты жизнедеятельности (вторичные метаболиты) или их синтетические модификации, которые обладают следующими важными свойствами:

- вырабатываются разными организмами (бактерии, грибы, водоросли, растения, животные);
- имеют специфическую мишень приложения, отсутствующую в клетках млекопитающих;
- действуют в низких концентрациях;
- накапливаются внутри клетки или выделяются в окружающую среду;
- эффективны в отношении определённых групп микроорганизмов (вирусы, бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли, протозоа);
- избирательно задерживают рост или полностью подавляют чувствительные организмы (Маянский, 2006; Рациональная..., 2003; Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Эта глава описывает только антибактериальные препараты. Выбор именно этой группы объясняется следующими факторами: большое число представленных в ней соединений; разнообразие механизмов действия и формирующейся устойчивости у бактерий; исторически более раннее начало применения в лечении инфекционных заболеваний (Рациональная..., 2002) и, как следствие, широта и острота проблемы устойчивости микроорганизмов к данным препаратам.

В задачи нашего изыскания входило определение частоты распространения антибиотикорезистентных штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* в популяциях амбулаторных и стационарных пациентов г. Челябинска и установление механизмов их устойчивости.

1.1. Антимикробные соединения — токсические стрессоры прокариот

У прокариот известны четыре механизма стрессового воздействия антимикробных соединений (рис. 1.1).

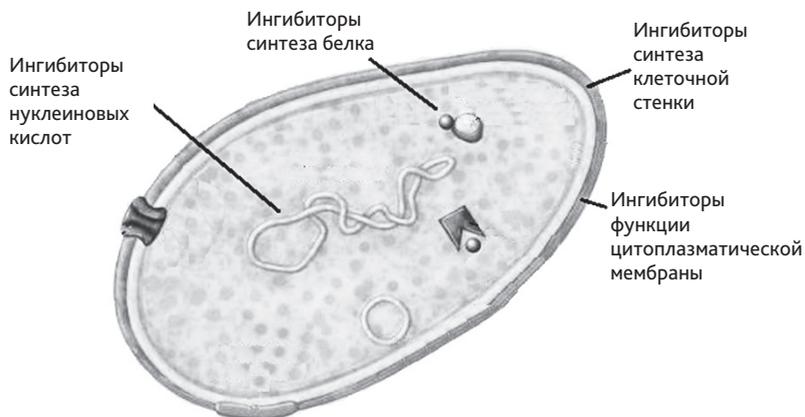


Рис. 1.1. Схематическое строение бактериальной клетки и мишеней действия для антимикробных соединений

1.1.1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки (пептидогликана)

К данным ингибиторам относят препараты групп бета-лактамов, гликопептидов, а также бацитрацин и циклосерин. Клеточная стенка — идеальная мишень для высокоизбирательного антибактериального эффекта. Это объясняется тем, что она является структурой, которая придаёт механическую прочность бактерии, и в то же время отсутствует в эукариотических клетках, а следовательно, не имеет метаболических путей её биосинтеза.

Этот гетерополимер построен из параллельных полисахаридных цепей, которые состоят из чередующихся аминасахаров (N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты), однотипных боковых тетрапептидов, связанных с N-ацетилмурамовой кислотой, и межпептидных мостиков, состоящих из нескольких аминокислот (Маянский, 2006).

Ингибирование продукции пептидогликана происходит на одном из трех этапов его биосинтеза. На первом, когда идёт образование в цитоплазме гликопептидных субъединиц с последующим их транспортом в цитоплазматическую мембрану, активны бацитрацин и циклосерин. В ходе второго этапа происходит объединение субъединиц в гликопептидные цепи и их доставка на внешнюю поверхность мембраны. Присоединение молекул гликопептидов к субъединицам приводит к нарушению процесса полимеризации. На третьем этапе синтеза пептидогликана идёт сшивание пептидогликановых цепей межпептидными связями с образованием пептидогликанового каркаса. Данный процесс ингибируется бета-лактамами. Они необратимо связываются с ферментами транспептидазами и карбоксипептидазами, которые участвуют в образовании поперечных сшивок. Другое название ферментов-мишеней — пенициллинсвязывающие белки (ПСБ) (Маянский, 2006; Рациональная..., 2003; Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Антипептидогликановые антибиотики действуют бактерицидно, вызывая лизис бактерий. Но они лишь обеспечивают старт процесса разрушения, а вот завершение реализуется собственными ферментами бактерий — аутолизинами. Их физиологическая функция состоит в контролируемом расщеплении пептидогликана при делении бактериальной клетки. Антибиотики снимают этот контроль, провоцируя саморазрушение клеточной стенки и разрыв цитоплазматической мембраны. Без такой «поддержки» препараты не повреждают пептидогликан, а лишь блокируют его синтез. В этом отношении их принципиальное отличие от антипептидогликановых ферментов — мурамидаз, действующих по типу лизоцима. Бактериальные аутолизины принадлежат к этой категории (Маянский, 2006).

1.1.2. Ингибиторы синтеза белка

В эту группу ингибиторов входят аминогликозиды, тетрациклины, макролиды, линкозамиды, линезолид, фузидиевая кислота, хлорамфеникол. Синтез белка, в основе которого лежит трансляция матричной РНК (мРНК) на рибосомах, — многоступенчатый процесс, где задействовано множество ферментов и структурных субъединиц. По ряду признаков белоксинтезирующий аппарат прокариот отличается от эукариотических клеток: бактериальные рибосомы состоят из меньших по размеру 30S и 50S субъединиц, в отличие от 40S и 60S у эукариот; имеют более мелкие молекулы РНК; включают меньше белков. Принципиально, что эти различия находят количественное выражение, определяя селективность мишеней рибосомального цикла для антибактериальных воздействий (Маянский, 2006).

Аминогликозиды необратимо связываются с 30S-субъединицей рибосомы. Убивают бактерии, вызывая образование функционально непригодных (неспособных к диссоциации-реассоциации) 70S-рибосом, а также извращая считывание информации с матричной РНК (мРНК). Тетрациклины обратимо связываются с 30S-субъединицей рибосомы, обратимо блокируя присоединение к рибосомам инициаторной аминоацил-транспортной РНК (формилметионил-тРНК). Глицилциклины, препараты, близкие по своему химическому строению и механизму действия тетрациклинам, инактивируют трансляцию белка за счёт связывания с 30S-субъединицей рибосомы и блокируют проникновение молекул аминоацил-тРНК на А-сайт рибосомы, что препятствует включению аминокислотных остатков в растущие пептидные цепи. Оксазолидиноны необратимо связываются с 30S и 50S субъединицей рибосомы, что нарушает образование 70S-комплекса и блокирует соединение рибосомы, мРНК и стартового тРНК-АК-комплекса. Этот каскад влечёт за собой угнетение трансляции, нарушение формирования пептидной цепи и угнетение синтеза белка в бактериальной клетке. Макролиды, хлорамфеникол, линкозамиды обратимо соединяются с 50S субъединицей вблизи сайта, фиксирующего аминоацил-тРНК. Это обрывает элонгацию (удлинение) пептидных цепей.

В отличие от аминогликозидов и тетрациклинов, блокирующих синтез белка в момент его зарождения, здесь прерывается уже начавшийся цикл. После удаления антибиотика процесс возобновляется, т. е. эффект бактериостатичен. Фузидиевая кислота ведёт к обратимой инактивации фермента (транслоказы или фактора элонгации G), который обеспечивает передвижение рибосомы по мРНК, т. е. рибосома не передвигается по мРНК, аминокислота не встраивается в пептидную цепь, синтез белка прекращается (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

1.1.3. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот

Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот обладают в той или иной мере способностью связываться с ДНК любого происхождения (бактериального, вирусного, растительного, животного). Поэтому такие препараты заметно токсичнее. В зависимости от степени токсичности данных препаратов их применяют в инфектологии (наиболее нетоксичные), в онкологии (обладающие токсичностью) или в немедицинских целях (высокотоксичные).

Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, используемые в инфектологии, это препараты, дискриминирующие тот или иной этап синтеза нуклеиновых кислот. Сульфаниламиды блокируют синтез предшественников пурин-пиримидиновых оснований. Они встраиваются в биохимические пути синтеза фолиевой кислоты как аналоги промежуточных продуктов, тем самым приводят к получению продуктов, непригодных для синтеза пуринов и пиримидинов. Триметаприм также действует на этапе синтеза фолиевой кислоты, при этом подавляет активность фермента дигидрофолатредуктазы. Эффект хинолонов связан с инактивацией ДНК-гиразы и топоизомеразы IV — ферментов, обеспечивающих суперспирализацию («упаковку», конформационные изменения) бактериальной хромосомы. Без этого ДНК не помещается в клетках, что делает их нежизнеспособными. Рифампицины вызывают инактивацию РНК-полимеразы, блокируя процесс транскрипции.

Перечисленные препараты являются малотоксичными, что связано с их низкой аффинностью к аналогичным ферментам высших клеток (Маянский, 2006; Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

1.1.4. Ингибиторы функции наружной цитоплазматической мембраны

К данным ингибиторам относят небольшое число клинически значимых препаратов — полимиксины, грамицидин, тироцидин, полиены и азолы, а также антимикробные соединения, не применяемые в инфектологии, — альбомидин, аскозин, эндомицин и др. Грамицидин, тироцидин и полимиксины — это циклические полипептиды, лизируют клетки только грамотрицательных бактерий, действуя как катионные детергенты, т. е. повреждают фосфолипидный матрикс клеточных мембран. Избирательная активность этих препаратов весьма низка из-за общности строения мембран у бактерий и высших организмов (Маянский, 2006).

Мембранотропностью также обладают полиены и азолы, которые используются в терапии грибковых заболеваний. Они повреждают мембраны, связываясь со стерольными группировками. Азолы являются менее токсичными препаратами,

в сравнении с полиенами, так как взаимодействуют со специфическими мишенями — молекулами эргостерола, которые находятся только в цитоплазматической мембране эукариотических клеток грибов, но не млекопитающих (Маянский, 2006).

1.1.5. Другие эффекты, возникающие в ходе воздействия антимикробных соединений

Наше современное понимание молекулярных механизмов, с помощью которых антибиотики индуцируют гибель клеток (бактерицидные препараты) или ингибируют рост (бактериостатические препараты), продолжает расширяться за пределы двоичных представлений о взаимодействии молекулы антимикробного вещества с мишенью и торможении основной функции (Mack et al., 2018).

Основным воздействием антибиотиков является скомпрометированный синтез основных макромолекул. Это описано в предыдущих подразделах. Между тем существенный вклад в понимание косвенных эффектов (активация стрессового ответа и адаптивные метаболические реакции) и вторичных (модифицированные регуляторные и сетевые взаимодействия) стало возможным благодаря активному развитию таких современных направлений биологии, как геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика. Эти и ряд других научных направлений нередко объединяют в один термин «омикс-технологии». Они позволяют анализировать первичные структуры генома, экспрессии генов в них, выявлять уровни регуляции и взаимосвязи между ними (Mack et al., 2018).

Данные последних лет свидетельствуют о том, что механизм стрессового воздействия антимикробных соединений гораздо сложнее, чем просто взаимодействие антибиотик-мишень. Так, в ходе анализа экспрессии генов у *M. tuberculosis*, обработанной изониазидом, обнаруживали замедление индукции алкилгидропероксидредуктазы; исследование по влиянию отдельных препаратов фторхинолонов и бета-лактамов на клетки *E. coli* и *K. pneumoniae* показало активное образование токсических продуктов кислорода, которые и вызывали гибель клеток. Изучение влияния карбапенемов на клетки *K. pneumoniae* в составе биоплёнок показало, что имипенем не только взаимодействовал с мишенью — пенициллинсвязывающими белками, но и влиял на регуляцию биосинтеза ацетил-СоА в цикле трикарбоновых кислот и генов супероксиддисмутазы; а меропенем и дорипенем к тому же ингибировали образование биоплёнок.

Методы транскриптомики позволили обнаружить у культур *E. coli*, резистентных к фторхинолонам, усиление экспрессии ферментов цикла трикарбоновых кислот и ферментов защиты от токсических продуктов кислорода (Mack et al., 2018). Эти и другие описанные результаты экспериментов убедительно доказывают, что ги-

бель бактериальных клеток при воздействии антибиотиков объясняется не только прямыми эффектами воздействия на мишень.

1.2. Адаптивный ответ бактерий на негативный эффект антибиотиков

С микробиологической точки зрения под резистентностью понимают свойство микроорганизмов сохранять способность к пролиферации при концентрации антибактериального препарата, подавляющих рост основной части его популяции или большинства видов других микроорганизмов (Сидоренко, 1998).

С точки зрения возможности наследственной передачи адаптивного механизма (нечувствительности к антибактериальным соединениям) различают негенетически и генетически обусловленную резистентность. Первый вариант устойчивости реализуется при снижении метаболической активности персистирующих клеток или уменьшении общего числа клеточных лигандов (например, у Л-форм бактерий). Такие механизмы существенно защищают отдельные клетки от воздействия антимикробных препаратов, но не позволяют генетически закрепить это свойство и передать его потомкам или ассоциантам (Евдокимов, Черненькая, 2013; Lewis, 2010; Walters и др., 2003).

Генетически обусловленная резистентность кодируется в геноме микроорганизмов. Гены могут локализоваться в хромосоме или плаزمиде; могут присутствовать у всех штаммов вида или только у отдельных популяций. В связи с этим различают природную устойчивость, которая является постоянным генетическим признаком вида и встречается у 100 % штаммов, и приобретённую нечувствительность, возникающую в результате мутаций или приобретения генов (Петров, Бердникова, 2004).

Приоритет в распространении устойчивости отводится генетическим мобильным элементам. Плазмиды несут гены адаптации, которые повышают экологическую пластичность бактерий, позволяя приспосабливаться к необычным условиям и выживать в экстремальных ситуациях. Многие из таких генов относятся к транспозонам — подвижным (прыгающим) генам. Они охотно переходят из репликона в репликон (например, из плазмиды в плазмиду, из хромосомы в плазмиду и т. д.) и вместе с мобильностью самих плазмид обеспечивают быстрое распространение генов внутри популяций, видов и даже между разными видами бактерий (Маянский, 2006).

По биохимическому механизму различают пять типов формирующейся устойчивости к антибактериальным препаратам (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007; Петров, Бердникова, 2004); они изображены на рис. 1.2.

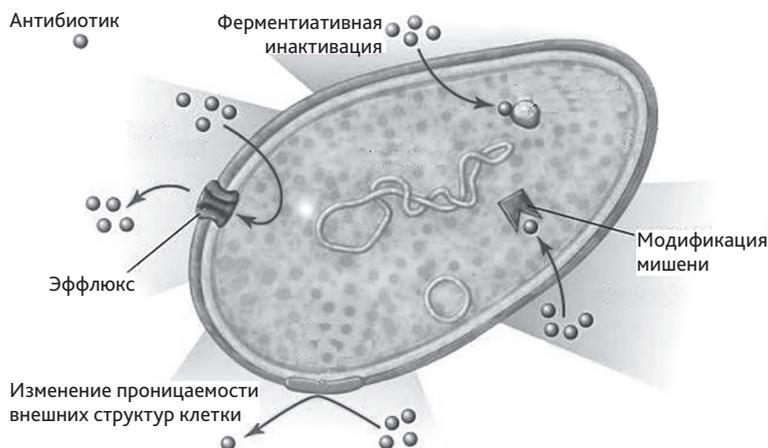


Рис. 1.2. Биохимические механизмы адаптивного ответа на воздействие антимикробных соединений

1.2.1. Адаптивный ответ, связанный с ферментативной инактивацией антибиотика

Этот механизм устойчивости микроорганизмов обусловлен синтезом ферментов, которые инактивируют молекулу антибиотика, в результате чего препарат теряет свою активность. Примерами ферментов являются: β -лактамазы, аминогликозидмодифицирующие ферменты (АМФ), хлорамфеникол-ацетилтрансфераза, ферменты, инактивирующие макролиды и линкозамиды.

Бета-лактамазы. Наиболее распространённым механизмом устойчивости бактерий к бета-лактамам является их инактивация ферментами бета-лактамазы (Эйдельштейн, 2001). К настоящему времени у разных видов микроорганизмов описано более 500 вариантов этих соединений. Ниже представлены свойства тех ферментов, которые имеют важное практическое значение.

Молекулярная структура, т. е. пространственная структура активного центра фермента. Известны четыре молекулярных класса бета-лактамаз; внутри каждого класса собраны ферменты с общими свойствами и выраженной гомологией. Считается, что бета-лактамазы классов А, С и Д эволюционировали из бактериальных пенициллинсвязывающих белков в почвенных экосистемах в результате селектив-

ного прессинга β -лактамных антибиотиков, продуцируемых некоторыми микроорганизмами. Бета-лактамазы этих классов относятся к ферментам «серинового» типа (по аминокислоте, находящейся в активном центре фермента). Ферменты класса В относятся к металлоферментам, поскольку кофермент в них содержит атом Zn (Сидоренко, 2002; Козлов и др., 2018).

Субстратная специфичность — это способность гидролизовать определённые группы бета-лактамов. Данный признак и чувствительность к ингибиторам лежат в основе функциональной классификации Bush, Jacoby, Medeiros (Эйдельштейн, 2001).

Чувствительность к ингибиторам. К ингибиторам относятся вещества бета-лактамной природы с минимальной собственной антибактериальной активностью из-за низкой аффинности к ПСБ, но способные необратимо связываться бета-лактамазами, т. е. ингибировать их активность. Благодаря способности подавлять активность некоторых бета-лактамаз ингибиторы в ряде случаев защищают от гидролиза чувствительные к ним антибиотики. В клинической практике используются три ингибитора: клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам (Эйдельштейн, 2001; Сидоренко, 2002), а также совсем недавно зарегистрированный препарат — авибактам (Козлов и др., 2018).

Действие ферментов на вне- и внутриклеточном уровне. У грамотрицательных бактерий бета-лактамазы локализуются в периплазматическом пространстве, между наружной и внутренней мембранами, а у грамположительных они свободно диффундируют в окружающую среду (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Локализация кодирующих генов и характер их экспрессии. Размещение генов в плазмидной или хромосомной бактериальной ДНК определяет эпидемиологию резистентности. При плазмидной локализации генов происходит быстрое внутри- и межвидовое распространение резистентности, при хромосомной — наблюдают распространение резистентного клона. Конститутивная продукция хромосомных бета-лактамаз осуществляется с постоянной скоростью. В этом случае профиль природной чувствительности определяется как спектром активности ферментов, так и уровнем их продукции. При индуцибельном синтезе бета-лактамаз — количество синтезируемого фермента резко возрастает после контакта с антибиотиками, которые являются индукторами и расщепляются бета-лактамазами. При этом штаммы-продуценты обладают природной резистентностью к тем препаратам, которые вызывают индукцию и расщепляются бета-лактамазами. Слабые индукторы, а также стабильные (не расщепляемые данным ферментом) препараты сохраняют активность в отношении «индуцибельных» штаммов (Сидоренко, 2002).

Резистентность за счёт синтеза бета-лактамаз встречается у большинства клинически значимых микроорганизмов, важным исключением являются представители *Streptococcus spp.* (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007). Бета-лактамазы, синтезируемые всеми штаммами вида, называются природными (синонимы — первичные, хромосомные, видоспецифические). Они кодируются в хромосоме и определяют профиль

природной устойчивости каждого вида бактерий. Приобретённые бета-лактамазы (синонимы — вторичные) продуцируются за счёт получения дополнительных генов.

Природные бета-лактамазы энтеробактерий встречаются у подавляющего большинства видов семейства *Enterobacteriaceae*, кроме *Salmonella spp.* и *Proteus mirabilis*. Они различаются по химическому составу и характеру экспрессии. Ферменты представлены в двух классах — С (известные как AmpC, или цефалоспорины, продуцируются индуцибельно большинством видов энтеробактерий, за исключением *E. coli* и *Shigella spp.*) и класса А (синтезируются конститутивно или индуцибельно) (Эйдельштейн, 2001).

Природная резистентность *P. aeruginosa* к бета-лактамам в основном связана с продукцией индуцибельной хромосомной цефалоспорины (AmpC), которая по спектру активности напоминает AmpC энтеробактерий. Частичная или полная депрессия AmpC часто является причиной резистентности к карбокси-, уреидопенициллинам и их комбинации с ингибитором, цефалоспорином 1–3-го поколений. Выявлены также конститутивно экспрессируемая оксациллиназа (ОХА-50) и родственные ферменты, обладающих низкой аффинностью к карбапенемам (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Большинство представителей рода *Acinetobacter* характеризуются наличием индуцибельных хромосомных цефалоспоринов АВА-1 (*A baumannii*), ОХА-51 и ОХА-69 (класса D). Высокий уровень продукции ОХА-51 и ОХА-69 может являться причиной устойчивости некоторых штаммов к карбапенемам (Определение чувствительности..., 2015).

Приобретённые бета-лактамазы энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб) представлены во всех четырёх молекулярных классах. Ферменты имеют различное клиническое и эпидемическое значение у разных видов бактерий. Так, бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) класса А энтеробактерий объединяют большое число бактериальных ферментов, которые отличаются способностью расщеплять пенициллины, цефалоспорины 1–4-го поколений, азтреонам, проявляют чувствительность к ингибиторам. «Классические» БЛРС являются производными плазмидо-кодируемых пенициллиназ TEM-1, TEM-2, SHV-1 (функциональная группа 2b) и отличаются единичными аминокислотными заменами, расширяющими спектр ферментативной активности. Широко распространены в большинстве стран мира. Наиболее частыми видами, у которых встречаются такие БЛРС, являются *Klebsiella spp.* и *E. coli*. К БЛРС относятся также ферменты других генетических групп класса А, среди которых наибольшее значение имеют CTX-M бета-лактамазы (2be), большинство которых более активны в отношении цефотаксима и цефтриаксона, чем цефтазидима. Встречаются у разных видов энтеробактерий, но сальмонеллы, продуцирующие эти ферменты, представляют особую проблему (так как цефотаксим и цефтриаксон традиционно используются для лечения тяжёлого сальмонеллёза) (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Характерную для БЛРС активность могут проявлять плазмидные β -лактамазы класса D (2d), в частности производные OXA-10 (PSE2), которые в меньшей степени подавляются клавулановой кислотой и распространены в основном у *P. aeruginosa*.

Распространение устойчивости к карбапенемам, связанное с продукцией приобретённых карбапенемаз — важная современная проблема антибиотикорезистентности клинически значимых грамотрицательных бактерий (Тапальский, Петренев, 2017; Nordmann et al., 2011). Карбапенемазы — это бета-лактамазы, гидролизующие пенициллины, в большинстве случаев цефалоспорины и в той или иной степени карбапенемы и монобактамы (последние не гидролизуются металло- β -лактамазами) (Руководство EUCAST..., 2013). Распространёнными и клинически важными являются сериновые карбапенемазы, кодируемые генами blaKPC и GES (молекулярный класс A); металло-бета-лактамазы (молекулярный класс B), VIM, IMP, NDM, и реже встречающиеся SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, TMB; отдельные OXA (молекулярный класс D) подгруппы OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-55, OXA-48, OXA-50, OXA-60, OXA-62 (Тапальский и др., 2012).

Аминогликозидмодифицирующие ферменты. Основным механизмом устойчивости к аминогликозидам является их ферментативная инактивация путём модификации антибиотика. Модифицированные молекулы теряют способность связываться с рибосомами и подавлять биосинтез белка. Модификация осуществляется аминогликозидмодифицирующими ферментами: ацетилтрансферазами, присоединяющими молекулу уксусной кислоты; фосфотрансферазами — молекулу фосфорной кислоты; аденилтрансферазами — молекулу нуклеотида. Известно более 50 вариантов этих ферментов, которые характеризуются более или менее уникальным субстратным профилем. Гены ферментов локализуются, как правило, на плазидах, что приводит к быстрому внутри- и межвидовому распространению устойчивости. Примерами широко распространённых АМФ среди грамположительных бактерий являются APH (3')–III с субстратным профилем канамицин, неомицин, амикацин. AAC (6')–APH (2') — гентамицин, тобрамицин, нетилмецин, амикацин и др.; для грамотрицательных — ANT (2'') — канамицин, гентамицин, тобрамицин и др. (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

На практике среди грамотрицательных бактерий могут встречаться практически все комбинации устойчивости к отдельным аминогликозидам. Это связано с разнообразием субстратных профилей отдельных ферментов и возможностью наличия у бактерии одновременно нескольких генов АМФ (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Ферменты, инактивирующие макролиды и линкозамиды. Ферменты, инактивирующие макролиды и линкозамиды, описаны среди грамположительных и грамотрицательных бактерий. Отдельные соединения отличаются широким субстратным профилем (макролидфосфотрансферазы *E. coli* и *Staphylococcus spp.*), другие инактивируют только отдельные препараты (эритромицинэстеразы энтеробактерий, линкомицинацетилтрансферазы стафилококков и энтерококков).

Распространение и клиническое значение ферментов, инактивирующих макролидные антибиотики, невелико (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

1.2.2. Адаптивный ответ, связанный с изменением проницаемости внешних структур бактерий

Степень проникновения лекарственных препаратов детерминирована природой клеточной стенки. У грамположительных бактерий большинство антибиотиков легко попадают внутрь клетки, так как пептидогликан не является существенной преградой для диффузии молекул. У грамотрицательных бактерий клеточная оболочка имеет сложное строение и является барьером для многих соединений. Транспорт антибиотиков через внешнюю мембрану к чувствительным мишеням у таких микроорганизмов осуществляется через воронкообразные белковые структуры, получившие название «порины» или «пориновые каналы». В результате мутации возможна полная или частичная утрата поринов, приводящая к снижению чувствительности к отдельным антибактериальным препаратам (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007). Такой механизм встречается в отношении отдельных классов бета-лактамов и аминогликозидов практически у всех грамотрицательных бактерий, гораздо реже — у грамположительных. Нередко он сочетается с другими механизмами.

Резистентность к карбапенемам. Клинически значима приобретённая устойчивость к отдельным препаратам группы карбапенемов у *P. aeruginosa*, которая обусловлена угнетением синтеза поринов OprD на фоне повышенной экспрессии AmpC (Чеботарь и др., 2017). Для *P. aeruginosa* описано 64 пориновых структуры — трансмембранных каналов, обеспечивающих поступление специфических субстратов внутрь бактериальной клетки; шесть из них (OprF, OprK, OprF, OprO, OprD, OprD) транспортируют беталактамы.

Устойчивость к аминогликозидам. В отношении аминогликозидов механизм устойчивости, связанный с изменением проницаемости внешних структур бактерий, обуславливает не только приобретённый характер, но и природный. Это связано с особенностями проникновения молекул антибиотиков — их доставка внутрь клетки осуществляется респираторными хинонами (Рациональная..., 2003). Этим объясняется природная устойчивость анаэробов и факультативных аэробов в условиях анаэробноза, у которых структуры переноса молекул аминогликозидов отсутствуют или выключены. Практически важным фактом является природная устойчивость к аминогликозидам стрептококков и энтерококков, связанная с преимущественно анаэробным метаболизмом этих бактерий (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Мутации, приводящие к изменению структуры липополисахарида у *E. coli* и *P. aeruginosa*, могут обусловить значительное повышение устойчивости к аминогликозидам. У некоторых штаммов *P. aeruginosa* и других грамотрицательных бактерий устойчивость может быть связана с мутациями в системе цитохром-респираторных хинонов или уменьшением синтеза компонентов электронно-транспортной цепи (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

1.2.3. Адаптивный ответ, связанный с активным выведением антибиотика из клетки (эффлюкс)

Это механизм, обусловленный синтезом повышенного количества транспортных белков, выводящих препараты из цитоплазмы бактерий (Петров, Бердникова, 2004).

Такая форма резистентности встречается в отношении отдельных классов бета-лактамов, фторхинолонов, аминогликозидов, макролидов и линкозамидов, тетрациклинов, чаще в сочетании с другими механизмами.

Резистентность к карбапенемам — частый случай устойчивости *P. aeruginosa* за счёт синтеза дополнительных транспортных систем (MexABOprM) (Чеботарь и др., 2017; Quale et al., 2006). За выведение беталактамов отвечают системы семейства RND (от англ. «resistancenodulationdivision») — MexABOprM, MexCDOprJ, MexXY. Но важное практическое значение отводится специфичности MexABOprM, которая обеспечивает удаление из клеток меропенема, но не имипенема (Wolter, Lister, 2013).

Устойчивость к фторхинолонам за счёт синтеза дополнительных белков чаще регистрируется у нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa*. Данный механизм реализуется в результате мутаций в генах репрессоров, регулирующих экспрессию систем эффлюкса MexABOprM, MexCDOprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM (Tomas et al., 2010; Henrichfreise et al., 2007). В отличие от других представителей семейства RND, экспрессия которых регулируется репрессорами, система эффлюкса MexEFOprN экспрессируется при участии активатора транскрипции MexT. У чувствительных к фторхинолонам изолятов *P. aeruginosa* MexEFOprN не функционирует вследствие мутаций в гене данного активатора, характерных для диких штаммов *P. aeruginosa*. При реверсии мутаций в гене mexT активируется экспрессия MexEFOprN, и изолят становится резистентным. У таких «реверсированных» изолятов дополнительно возникает устойчивость к карбапенемам, но не за счёт работы системы эффлюкса, а путём MexTопосредованного угнетения экспрессии гена порина OprD (Чеботарь и др., 2017).

Эффлюксзависимое выведение аминогликозидов из клетки также реализуется системой MexXYOprM. Как и в предыдущем примере, она активно продуцируется при наличии мутаций в гене репрессора MexZ, регулирующего её экспрессию.

Кроме того, мутации в гене *parR*, кодирующего двухкомпонентную регуляторную систему, влияющую на экспрессию многих генов резистентности у *P. aeruginosa*, в том числе ген *mexXY*. Именно возникновением мутаций в гене *parR* объясняют экспрессию *mexXY* при отсутствии мутаций в гене *mexZ* (Muller et al., 2010).

Активное выведение макролидов и линкозамидов осуществляют несколько транспортных систем. Основное клиническое значение имеет система выведения, кодируемая *mef*-геном, распространённая среди *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и многих других грамположительных бактерий. Соответствующий белок-транспортёр выводит 14- и 15-членные макролиды и обеспечивает невысокий уровень резистентности. Линкозамиды и 16-членные макролиды сохраняют активность. Гены *mef* локализованы на хромосомах в составе конъюгативных элементов, что обеспечивает достаточно эффективное внутри- и межвидовое распространение. У стафило- и энтерококков активное выведение макролидов, но не линкозамидов, осуществляют транспортные системы другого типа, кодируемые генами *msr*. Существуют также транспортные системы, осуществляющие избирательное выведение некоторых препаратов (например, линкомицина) (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Резистентность к тетрациклинам за счёт синтеза дополнительных белков является наиболее распространённым механизмом устойчивости к этой группе препаратов, встречается среди грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Детерминанты резистентности обычно локализованы на плазидах, грамотрицательные бактерии содержат гены *tetA* — *tetE* гены, грамположительные — *tetK*, *tetL* (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

1.2.4. Адаптивный ответ, связанный с модификацией мишени действия

Важной особенностью всех антибиотиков является возможность их связывания с определённым компонентом бактериальной клетки — мишенью действия. Это приводит к нарушению нормального функционирования компонента, инактивации биохимических процессов и в конечном итоге гибели клетки. В результате отдельных мутаций происходят модификации структуры мишени, что обуславливает невозможность связывания молекулы лекарственного препарата с соответствующим лигандом (Петров, Бердникова, 2004). Такой механизм устойчивости встречается в отношении бета-лактамов, аминогликозидов, фторхинолонов, макролидов и линкозамидов, гликопептидов, сульфаниламидов, полимиксинов.

Формирование устойчивости к бета-лактамам происходит при изменении в структуре ферментов, синтезирующих пептидогликан — транспептидазах и карбоксипептидазах, которые ещё называют пенициллинсвязывающими белками (ПСБ).

Реальное клиническое значение такой механизм имеет у стафилококков (*S. aureus* и коагулазонегативных), так как обеспечивает им устойчивость ко всем препаратам бета-лактамовой группы. Он обусловлен появлением у микроорганизмов дополнительного белка ПСБ2а. (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007), который кодируется геном *mecA* в составе стафилококковой хромосомной кассеты *mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec* — SCC*mec*). Основными компонентами *mec*-комплекса являются: *mecA*, структурный ген, кодирующий синтез дополнительного пенициллинсвязывающего белка — ПСБ2а; *mecI* и *mecR1* — регуляторные элементы, контролирующие транскрипцию *mecA*, а также *mec*-ассоциированная ДНК (Сидоренко, 2003; Boutibaa et al., 2004; Страчунский и др., 2005)

Устойчивость пневмококков обусловлена появлением в генах, кодирующих ПСБ, чужеродной ДНК, происхождение которой связывают с зелеными стрептококками. Значительная часть штаммов, устойчивых к пенициллину, сохраняет чувствительность к цефалоспорином 3 поколения и карбапенемам. Устойчивость энтерококков наблюдается чаще у *E. faecium* и обусловлена увеличением синтеза ПСБ5. В результате наблюдается повышение минимальной подавляющей концентрации (МПК) всех β -лактамов. Среди грамотрицательных бактерий устойчивость, связанная с модификацией ПСБ встречается редко. Определённое значение этот механизм устойчивости имеет у *H. influenzae* и *N. gonorrhoeae*. Микроорганизмы, проявляют устойчивость не только к природным и полусинтетическим пенициллинам, но и к ингибиторозащищённым препаратам (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Устойчивость к аминогликозидам объясняют модификацией основной мишени этих препаратов — 30S субъединицы бактериальной рибосомы. Резистентность к стрептомицину наиболее высока, поскольку он связывается с единственным сайтом на 30S субъединице рибосомы. Все другие соединения этой группы вступают во множественные связи с сайтами рибосом, и существенное повышение МПК наблюдается редко. Примером являются некоторые штаммы *M. tuberculosis* и *E. faecalis*, хотя значимость такого механизма несущественна (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Ведущим механизмом устойчивости к фторхинолонам является модификация ДНК-гиразы и топоизомеразы IV. Для хинолонов основой формирования резистентности являются мутации в генах *gyrA* и *parC*. В результате мутаций в этих генах происходит замена аминокислот в молекулах фермента. Частота возникновения мутаций мало зависит от воздействия хинолонов, однако формирование устойчивых штаммов возможно лишь в результате селекции на фоне действия препаратов. В отличие от хинолонов фторхинолоны обладают приблизительно одинаковым сродством к обоим топоизомеразам, следовательно, в наименьшей степени способствуют селекции устойчивости. Это связано с тем, что для формирования устойчивого штамма мутации должны произойти одновременно в генах обоих

ферментов, вероятность же двойной мутации существенно ниже, чем одиночных (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Устойчивость к макролидам и линкозамидам. Основной мишенью действия макролидов и линкозамидов является 50S субъединица бактериальной рибосомы. У большинства бактерий устойчивость возникает в результате её метилирования. Известно около 20 генов (*erm* — *erythromycin ribosome methylation*), кодирующих фермент метилазу, они ассоциированы с транспозонами и могут локализоваться на плазидах и хромосомах. Метилазы широко распространены среди многих аэробных и анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Для стафилококков описано два варианта синтеза метилазы — конститутивный и индуцибельный, которые обуславливают резистентность ко всем препаратам обеих групп, либо только к 14- и 15-членным макролидам и чувствительность к 16-членным макролидам и линкозамидам (Страчунский, 2005). У *H. pylori*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *Propionibacterium spp.* известен механизм модификации мишени в 23S-субъединице рРНК, что снижает сродство к макролидам и линкозамидам, формирует клинически значимую перекрёстную устойчивость ко всем препаратам (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Механизм устойчивости к гликопептидам наиболее детально изучен у энтерококков, он связан с синтезом бактериями модифицированной боковой полипептидной цепи. Известны 6 фенотипов устойчивости: А, В, С, D, Е, G. Для фенотипа А характерен высокий уровень устойчивости к ванкомицину и тейкопланину, для В — варибельная резистентность к ванкомицину и чувствительность к тейкопланину. Фенотип С характерен для *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* и *E. flavescens*, проявляющих природно низкий уровень устойчивости к ванкомицину. Фенотипы D, Е, G описаны у единичных штаммов (Сидоренко, 2003; Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Устойчивость к триметоприму может являться результатом приобретения генов дигидрофолатредуктазы, нечувствительной (или малочувствительной) к ингибции, а устойчивость к сульфаниламидам — генов дигидроптеоратсинтетазы. Известно несколько типов каждого из устойчивых ферментов, но их происхождение не совсем ясно. Гены ферментов, устойчивых к ингибированию, часто находятся в составе подвижных генетических элементов (транспозонов) в ассоциации с генами, детерминирующими устойчивость к другим антибиотикам. Устойчивость может также сформироваться в результате мутаций в генах указанных ферментов (Сидоренко, Эйдельштейн, 2007).

Резистентность к полимиксину. Модификация мишени действия — основной механизм нечувствительности *P. aeruginosa* к полимиксинам (колистин и полимиксину В). Антибактериальное действие полимиксинов основано на электростатическом связывании положительно заряженной полипептидной части антибиотика и отрицательно заряженного липополисахарида (ЛПС) наружной мембраны, а также на взаимодействии «липидного хвоста» полимиксина и жирных

кислот липида А. Связываясь с ЛПС, антибиотик вытесняет мембраностабилизирующие ионы магния и кальция, которые соединяют соседние молекулы липида А и укрепляют наружную мембрану. Это нарушает барьерную функцию наружной мембраны, что ведёт к потере периплазматических белков и поступлению в периплазматическое пространство веществ, для которых клеточная стенка ранее была непроницаема, в том числе и полимиксина (Чеботарь и др., 2017; Trimble et al., 2016; Lu et al., 2014).

1.2.5. Адаптивный ответ, связанный с формированием метаболического «шунта»

Парааминобензойная кислота (ПАБК) и структурно сходные с ней соединения и биосубстраты (продукты гидролиза новокаина, метионина, пептона, пуриновых и пиримидиновых оснований, фолиевой кислоты, продукты распада белков, гнойное отделяемое), являются антагонистами сульфаниламидов. В соответствующих концентрациях ПАБК или её аналоги используются бактериальными клетками, что приводит к ингибированию активности этих антимикробных препаратов (Рациональная..., 2003).

1.3. Роль человека в формировании и распространении антибиотикоустойчивых бактерий

1.3.1. Эволюция резистентности

С момента начала применения пеницилина как лекарственного препарата стало известно об образовании и распространении резистентных бактерий (Виноградова и др., 2013). Однако это свойство — способность противостоять губительному действию антибиотических веществ, появилась значительно раньше. Согласно наиболее популярной теории о происхождении антибиотикорезистентности,

она возникла у микроорганизмов сразу после появления способности продуцировать антимикробные соединения, т. е. более 3,5 млрд лет назад (Martinez, 2009). Кластеры генов биосинтеза эритромицина, стрептомицина, ванкомицина и, следовательно, генов устойчивости к этим веществам возникли многие миллионы лет назад (Baltz, 2005), сериновые бета-лактамазы появились более двух миллиардов лет назад, ещё до разделения бактерий на грамположительные и грамотрицательные (Hall, Barlow, 2004; Garau et al., 2005).

У продуцентов антибиотиков данное свойство вырабатывалось по мере формирования путей биосинтеза этих соединений как система защиты от этих продуктов, функция которых заключалась в участии в конкурентной борьбе и передачи сигналов. Изменения происходили на генном и, соответственно, ферментном уровне — для этого стали использоваться белки с различными метаболическими и другими функциями. В результате эволюции генов возникла система ферментов, обеспечивающая устойчивость продуцентов к антибиотикам. У непродуцентов в процессе эволюции также появлялись и накапливались гены резистентности к антимикробным соединениям. Однако учёные считают, что основная их функция не была связана с антибиотикоустойчивостью. Описывают как минимум два источника генов резистентности — это собственно микроорганизмы-продуценты антимикробных соединений и мутации в геноме непродуцентов. А вот клинические изоляты получили гены через общих предшественников из состава обеих групп (продуцентов и непродуцентов антибиотиков) (Виноградова и др., 2013).

Историю эволюции генов устойчивости принято подразделять на «доантибиотический период» и период после открытия и начала широкого использования антибиотиков (Виноградова и др., 2013). В «доантибиотический период» эволюция генов резистентности шла под воздействием селективных факторов (в том числе токсических и антимикробных веществ), присутствовавших в окружающей среде и в относительно низких концентрациях. В этот период формировалась природная устойчивость микроорганизмов в экосистемах. С момента открытия антибиотиков началось сильное селективное давление этих веществ в разных экологических нишах, что было обусловлено интенсивным использованием антибиотиков во многих областях практической деятельности человека. В результате селективного давления происходит мобилизация генов устойчивости из природных резервуаров и их быстрое распространение среди микроорганизмов из разных экологических ниш. Основную роль в распространении устойчивости в этот период играют процессы горизонтального переноса генов и участие в них мобильных генетических элементов (Виноградова и др., 2013).

Селективное давление антибиотиков в «антибиотическую эпоху» имеет определяющее значение, однако есть ряд и других факторов, способствующих сохранению и распространению генов устойчивости в микробных популяциях. Гены устойчивости, имеющиеся у непродуцирующих микроорганизмов, могли и не селекци-

онируются именно антибиотиками, поскольку эти гены участвуют во многих процессах жизнедеятельности клетки — биосинтезе, сигнальном трафике и др. Гены, которые помимо прямой «защиты» выполняют и другие функции, могли селекционироваться не по устойчивости, а по иным функциям. Этот процесс может происходить в среде, условно называемой свободной от антибиотиков. Эволюционный процесс селекции гена, выполняющего функцию, отличающуюся от той, по которой он был первоначально отселекционирован, известен под названием «эксаптация» (Alonso et al., 2001).

Существует мнение о принципиальном различии в динамике соотношения чувствительных и устойчивых микроорганизмов в клинической среде и в природных условиях. Так, в клинике с 70-х гг. XX в. наблюдалось быстрое нарастание доли устойчивых бактерий, между тем в почве соотношение чувствительных и устойчивых бактерий сохранялось неизменным в течение тысяч лет и до настоящего времени, т. е. происходит сосуществование этих популяций без нарушения баланса между ними. Предложено несколько механизмов, которые могут действовать в природных условиях, контролируя распространение устойчивости (Chait et al., 2012).

1.3.2. Отрасли деятельности человека, влияющие на формирование устойчивости

Длительное активное применение антибактериальных препаратов в медицине, ветеринарии, растениеводстве, в пищевой промышленности привело к селекции резистентных культур и увеличению их концентрации в десятки раз (Стратегия..., 2017). Одним из важных источников штаммов микроорганизмов, устойчивых к антибактериальным препаратам, является клиническая практика (Сидоренко, 2002). В результате неадекватная терапия, т. е. неправильный выбор препарата для лечения соответствующей инфекции, неверное дозирование лекарственного средства и подбора срока приёма, приводит к селекции штаммов с признаками антибиотикостойчивости (Глобальная стратегия ВОЗ..., 2001).

Другим источником формирования нечувствительности к антибиотикам является животноводство. Антимикробные препараты для сельскохозяйственных и домашних животных применяются не только для лечения болезней, но также с целью профилактики и стимулирования роста. Во многих странах эти соединения используют у животных в ещё больших масштабах, чем у людей. Это обуславливает селекцию бактерий с детерминантами резистентности, которые могут быть переданы людям при употреблении пищевых продуктов, либо при непосредственном контакте с животными, либо через объекты окружающей среды. К тому же торговля

сельскохозяйственными животными и пищевыми продуктами животного происхождения, реализуемая в глобальных масштабах, это дополнительный фактор в распространении устойчивости к антибиотикам даже в тех странах, которые находятся далеко от территорий, где возникла данная проблема (Борьба с устойчивостью..., 2011). Применение антибиотиков в сельском хозяйстве изменяет состав и функциональные свойства микрофлоры в природных местах обитания (почвы, подземные воды) в сторону увеличения антибиотикоустойчивости микробного сообщества (Виноградова и др., 2013).

В последнее время направление исследований от изучения устойчивости патогенных и условно-патогенных микроорганизмов закономерно перешло к исследованиям устойчивости микробиоты, обитающей в окружающей среде. Интенсивными исследованиями последних лет гены устойчивости к антибиотикам обнаружены в самых разных природных биотопах, в разнообразных экологических нишах, находящихся в различных почвенно-климатических зонах. В связи с этим в научную литературу было введено понятие глобальной резистомы — совокупность всех генов резистентности к антибиотикам в геномах всех микроорганизмов — патогенных и непатогенных, живущих в природных условиях в самых разнообразных биотопах. В составе резистомы было предложено рассматривать в том числе потенциальные гены устойчивости, которые кодируют белки умеренной антибиотикоустойчивости или определяют аффинность к антибиотикам (Виноградова и др., 2013).

Исследование устойчивости к антибиотикам у патогенных микроорганизмов напрямую связано с фундаментальными исследованиями устойчивости к антибиотикам тех микроорганизмов, которые населяют разнообразные экологические ниши в природных местах обитания. Решение важнейшей проблемы медицины — контроля за возникновением и распространением устойчивости к антибиотикам во многом зависит от всестороннего изучения глобальной резистомы на популяционном и молекулярном уровнях. Это может открыть новые подходы для контроля за распространением устойчивости к антибиотикам (Виноградова и др., 2013).

1.3.3. Значимость проблемы антибиотикоустойчивых микроорганизмов

На международном уровне проблема антибиотикорезистентности впервые была озвучена в 2001 г. Тогда в свет вышел документ, подготовленный Всемирной организацией здравоохранения, — «Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам» (2001). В нем говорится: «Случаи смерти от острых респираторных инфекций, диарейных заболеваний, кори, СПИДа, малярии и туберкулёза составляют более 85 % от уровня смертности от инфекций

во всем мире. Устойчивость к препаратам первого ряда у большинства патогенных микроорганизмов, вызывающих эти заболевания, колеблется от нуля до почти 100 %. В дополнение к этому существует значительная глобальная проблема устойчивых инфекций, приобретаемых в стационаре...». В 2011 г. ВОЗ выбрала устойчивость к противомикробным препаратам в качестве главной проблемы глобального здравоохранения*. Был разработан Европейский стратегический план действий по проблеме устойчивости к антибиотикам (Борьба с устойчивостью..., 2011).

В сентябре 2017 г. распоряжением Правительства РФ утверждена «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г.». Устойчивость влечёт расходование денежных, жизненных средств, потерю жизней и угрожает снижением эффективности программ обеспечения здравоохранения. Недавно она была описана как угроза глобальной стабильности и национальной безопасности (Стратегия предупреждения..., 2017). Увеличение концентрации антибиотикорезистентных популяций микроорганизмов обусловило снижение эффективности мероприятий по профилактике и лечению инфекционных заболеваний человека, животных и растений. Возникающие при этом нарушения взаимодействия в системе «хозяин-микроорганизм» приводят к нарушению качественного и количественного состава нормальной микробиоты человека. Наличие в госпитальных условиях искусственного механизма передачи возбудителя, ассоциированного с инвазивными манипуляциями, приводит к связи не только с экзогенным заражением, но и с эндогенным возбудителем — собственной микрофлорой, которая может транслоцироваться не только в другой биотоп хозяина, но и на объекты внешней среды. При этом формируются полирезистентные госпитальные штаммы (Стратегия предупреждения..., 2017).

Закономерным этапом в рамках мероприятий по профилактике распространения антибиотикоустойчивости было выделение в особую группу самых проблемных в клинике микроорганизмов. Это произошло 27 февраля 2017 г., когда ВОЗ опубликовала список 12 видов патогенных бактерий, устойчивых к действию антибиотиков. В него были включены виды, представляющие наибольшую угрозу для здоровья человека. В основе отбора была заложена их способность вызывать летальность, формировать антибиотикорезистентность в течение последних 10 лет, склонность к эпидемическому распространению.

К приоритетной группе отнесены бактерии с множественной лекарственной устойчивостью, которые представляют серьёзную опасность для стационарных пациентов, в том числе больных, получающих терапию с использованием инвазивных устройств. Это группа с критическим уровнем опасности, в которую входят *A. baumannii* и *P. aeruginosa* MBL, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* ESBL et MBL. Они могут вызывать тяжёлые инфекции с высоким риском летального исхода.

* Глобальный сайт ВОЗ. — URL: <http://www.who.int/world-health-day/2011/ru/>

У этих бактерий сформировалась устойчивость к действию широкого ряда антибиотиков, включая цефалоспорины и карбапенемы.

Вторая группа включает микроорганизмы с высоким уровнем опасности — это виды с растущей лекарственной устойчивостью, которые чаще встречаются у амбулаторных пациентов: *S. aureus* MRSA et VRSA, *E. faecium* VRE, *Salmonella spp.* R к ципрофлоксацину; *N. gonorrhoeae* R к ципрофлоксацину и цефалоспорином 3-го поколения, *Campylobacter spp.* R к фторхинолонам, *H. pylori* R к кларитромицину.

Третья группа содержит виды со средним уровнем приоритетности, которые характеризуются растущей лекарственной устойчивостью к фторхинолонам и вызывают более распространённые заболевания: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Shigella spp.*

Человек играет лишь косвенную роль в формировании антибиотикоустойчивых популяций микроорганизмов. Антропогенный фактор повлиял на интродукцию детерминат устойчивости в состав клинических микроценозов и ускорение их распространения. Это стало возможным в результате активного применения антимикробных соединений с целью терапии в медицине и ветеринарии; с целью профилактики и ускорения роста молодняка — в птицеводстве, животноводстве, рыбоводстве; с целью увеличения сроков хранения продуктов в пищевой индустрии. Наиболее опасными с точки зрения способности вызывать летальный исход инфекционного процесса, формировать антибиотикорезистентность и склонность к эпидемическому распространению являются следующие виды и группы микроорганизмов:

1) *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* МБЛ-продуцирующие; *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* БЛРС-синтезирующие;

2) *S. aureus* метициллин- и ванкомицин-устойчивые, *E. faecium* ванкомицин-резистентные, *Salmonella spp.* ципрофлоксацин-устойчивые; *N. gonorrhoeae*, резистентные к ципрофлоксацину и цефалоспорином III поколения, *Campylobacter spp.* фторхинолон-устойчивые, *H. pylori* кларитромицин-устойчивый;

3) *S. pneumoniae* пенициллин-устойчивые, *H. influenzae* ампициллин-резистентные, *Shigella spp.* фторхинолон-нечувствительные.

В ходе собственных исследований нами были изучены особенности распространения антибиотикоустойчивости среди изолятов, вызывающих инфекции у амбулаторных и стационарных пациентов. Работы были выполнены нами в учебной лаборатории микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет» в период с июля 2016 по июнь 2018 г. Были изучены 165 штаммов *E. coli* и 147 изолятов *K. pneumoniae*, полученные от стационарных и амбулаторных пациентов. Все культуры выделены из клинического материала в этиологически значимом титре. Группу стационарных больных составили пациенты ожогового центра в возрасте 16–54 лет, имеющие поверхностные термические ожоги разной локализации без поражения дыха-

тельных путей II–III степени площадью 12–40 %. В группу амбулаторных больных были включены пациенты с инфекцией верхних отделов мочевых путей лёгкой и средней тяжести: мужчины и небеременные женщины в возрасте 18–75 лет, не принимавшие антибиотики последние три месяца.

Посев материала производили количественным методом. Гемокультуры получали с помощью анализатора BacT/Alert 3D60 (BioMerieux, Франция). Идентификацию культур выполняли, используя тест-системы производства «LaChema» (Чехия). Антибиотикочувствительность определяли диско-диффузионным методом согласно методическим рекомендациям (Определение чувствительности..., 2015). Антибиотикорезистентность, связанную с синтезом БЛРС, устанавливали фенотипическим тестом «Метод двойных дисков» (Определение чувствительности..., 2004). Продукцию МБЛ выявляли фенотипически методом «двойных дисков с ЭДТА» (Шевченко и др., 2007). Детекцию других карбапенемаз выполняли с помощью метода SIM (Wonkeun и др., 2016). Постановку теста на конъюгативную активность плазмид, кодирующих детерминанты антибиотикоустойчивости, выполняли методом изучения переноса генов по Кёртис в модификации Степановой (Степанова, 2005). Генотипирование антибиотикорезистентных штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* выполняли методом ПЦР real-time с помощью амплификатора Icycler IQ5 («BioRad», США) и наборов для детекции резистентности («Литех», Россия).

В ходе статистического анализа рассчитывали долю резистентных штаммов (в %), которую снабжали 95 % доверительными интервалами (95% ДИ), вычисленными методом Джеффриса (Ausvet..., 2018). Для сравнения собственных данных с данными по РФ из базы данных интернет-платформы мониторинга антибиотикорезистентности AMRmap (Кузьменков и др., 2017) делали сопоставимую выборку, сводили частоты в таблицу сопряжённости 2×2 и анализировали критерием хи-квадрат. Для слабонасыщенных таблиц (имелись ячейки со значениями ≤5) P-значение рассчитывали рандомизационным критерием Монте-Карло ($n = 99999$). Статистически значимыми стали различия при $P \leq 0,05$. Расчёты выполнены в пакете PAST (version 3.20, (Hammer et al., 2001)).

1.4. Характеристика антибиотикорезистентности штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, выделенных от стационарных и внегоспитальных больных

1.4.1. Стационарные пациенты

За исследуемый период нами собраны и изучены 44 культуры *E. coli* и 123 изолята *K. pneumoniae*, которые составляли 3,6 и 10,1 % от общего числа штаммов условно-патогенных возбудителей, выделенных из клинического материала от больных отделений хирургического профиля. Полученные нами результаты отличаются от данных интернет-платформы AMRmap — системы мониторинга основных возбудителей и их антибиотикорезистентности в РФ (Кузьменко и др., 2017), в соответствии с которыми частота встречаемости *E. coli* в отделениях хирургического профиля в Российской Федерации составляет 10,4 %, *K. pneumoniae* — 13,8 % (AMRmap, 2018).

Escherichia coli. Резистентные к антимикробным препаратам штаммы *E. coli* обнаруживались с высокой частотой встречаемости к ампициллину, цефалоспорином III–IV поколения, амикацину и ципрофлоксацину. Наши результаты в основном аналогичны данным по Российской Федерации, полученным в ходе многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2014 г., (Сухорукова и др., 2017) и данных интернет-платформы AMRmap за период 2016–2018 гг. Однако частота распространения штаммов *E. coli*, устойчивых к ампициллину, у нас достоверно ниже (табл. 1.1). Изучение механизмов устойчивости к этому препарату в рамках нашего исследования не выполнялось, так как ампициллин уже давно не используется в терапии тяжёлых инфекций стационарных пациентов (он применяется лишь для мониторинга антибиотикочувствительности). Между тем сниженную частоту встречаемости ампициллин-резистентных изолятов кишечной палочки, циркулирующих в нашем регионе, теоретически можно объяснить способностью продуцировать бета-лактамазы и их специфическим субстратным профилем.

В ходе выяснения причин устойчивости исследованных штаммов *E. coli* к цефалоспорином III–IV поколения (цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму) с помощью фенотипического тестирования установлена способность продукции ферментов —

Таблица 1.1

Антибиотикорезистентность клинических изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae*, выделенных от стационарных больных отделения хирургического профиля. Доля резистентных штаммов, % [95% ДИ]

Препарат	РФ ¹ (n = 62)	Собственные данные (n = 44)	Значимость различий
<i>E. coli</i>			
Ампициллин	87,1	70,5 [56,0; 82,3]	$\chi^2_{[1]} = 4,49; P = 0,034$
Цефотаксим	75,8	61,4 [46,6; 74,7]	$\chi^2_{[1]} = 2,55; P = 0,110$
Цефепим	72,6	70,5 [56,0; 82,3]	$\chi^2_{[1]} = 0,06; P = 0,811$
Цефтазидим	72,6	65,9 [51,2; 78,6]	$\chi^2_{[1]} = 0,54; P = 0,461$
Ципрофлоксацин	66,1	61,4 [46,6; 74,7]	$\chi^2_{[1]} = 0,25; P = 0,614$
Амикацин	16,1	22,7 [12,3; 36,6]	$\chi^2_{[1]} = 0,73; P = 0,392$
Эртапенем	8,1	6,8 [2,0; 17,1]	$\chi^2_{[1]} = 0,06; P > 0,999$
Имипенем	3,2	2,3 [0,2; 10,1]	$\chi^2_{[1]} = 0,09; P > 0,999$
Меропенем	1,6	2,3 [0,2; 10,1]	$\chi^2_{[1]} = 0,06; P > 0,999$
<i>K. pneumoniae</i>			
Препарат	РФ ² (n = 104)	Собственные данные (n = 44)	Значимость различий
Амоксициллин-клавуланат	91,4	59,1 [44,4; 72,7]	$\chi^2_{[1]} = 21,6; P < 0,001$
Цефтазидим	90,4	88,6 [76,9; 95,5]	$\chi^2_{[1]} = 0,10; P = 0,770$
Цефотаксим	89,4	88,6 [76,9; 95,5]	$\chi^2_{[1]} = 0,02; P > 0,999$
Цефепим	87,5	88,6 [76,9; 95,5]	$\chi^2_{[1]} = 0,04; P > 0,999$
Ципрофлоксацин	86,5	77,3 [63,4; 87,7]	$\chi^2_{[1]} = 1,95; P = 0,162$
Эртапенем	51,0	70,5 [56,0; 82,3]	$\chi^2_{[1]} = 4,79; P = 0,031$
Амикацин	32,7	72,7 [58,4; 84,1]	$\chi^2_{[1]} = 20,1; P < 0,001$
Меропенем	23,1	40,9 [27,3; 55,6]	$\chi^2_{[1]} = 4,83; P = 0,031$
Имипенем	19,2	40,9 [27,3; 55,6]	$\chi^2_{[1]} = 7,61; P = 0,006$

Примечание. Здесь и далее препараты ранжированы в порядке снижения доли резистентных штаммов по РФ. Выборка из базы данных: 1 — (AMRmap, 2018a), 2 — (AMRmap, 2018b).

бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). В нашем исследовании обнаружено 65 % продуцентов БЛРС. Данный механизм антибиотикорезистентности является одним из актуальных по клинической и эпидемиологической значимости, так как приводит к отсутствию клинического эффекта в ходе антибиотикотерапии любым препаратом из трёх групп бета-лактамов — пенициллинов, цефалоспоринов и монобактамов (Петров, Бердникова, 2004).

Частота встречаемости резистентности к карбапенемам у исследованных штаммов *E. coli* была закономерно низка и не превышала 7 %. Высокая активность этих антибактериальных средств объясняется сравнительно недавним введением их в терапевтическую практику и нечастым назначением вследствие их высокой стоимости. В нашем эксперименте при использовании фенотипического метода не выявлено способности продуцировать карбапенемазы. Это свидетельствует о том, что вероятной причиной резистентности местных изолятов являются эпидемически малозначимые приобретённые механизмы: синтез дополнительных белков, которые транспортируют молекулу антибиотика из цитоплазмы наружу, или снижение проницаемости клеточной стенки. Между тем глобальной мировой проблемой является быстро распространяющаяся резистентность представителей семейства *Enterobacteriaceae*, связанная с синтезом карбапенемаз (Козлов и др., 2018). По результатам многоцентрового исследования 2013–2014 гг. (Сухорукова и др., 2017), карбапенемазо-продуцирующие штаммы *E. coli* встречаются с частотой 3,4 %. Приобретение генов данных ферментов обеспечивает микроорганизму нечувствительность ко всем препаратам из групп пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов, а в ряде случаев и монобактамов, что исключает возможность использования в качестве эмпирической терапии любого бета-лактама.

Klebsiella pneumoniae. Антибиотикорезистентные штаммы *K. pneumoniae* обнаруживались с высокой частотой встречаемости в отношении всех использованных препаратов. Устойчивость исследованных изолятов *K. pneumoniae* к цефалоспорином III–IV поколения (цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму), обусловленная синтезом БЛРС, фенотипически обнаружена у 31 %. Остальные изоляты клебсиелл, нечувствительные к цефалоспорином, вероятно, проявляли резистентность, связанную с гиперпродукцией природных бета-лактамаз бактерий этого вида.

Важным с точки зрения эпидемиологии является факт выявления в декабре 2017 г. в клиническом материале от больных ожогового отделения карбапенем-резистентных клебсиелл. Фенотипически было установлено, что их устойчивость связана с продукцией металло-бета-лактамаз (МБЛ). За период января-июля 2018 г. удельный вес *K. pneumoniae*, синтезирующих МБЛ, увеличился до 70 %. В ходе молекулярно-генетического типирования в геномах 87 (70,7 %) штаммов *K. pneumoniae* были обнаружены детерминанты устойчивости к карбапенемам: у 75 (61,0 %) культур выявлена устойчивость, связанная с продукцией карбапенемаз типа NDM, у 12 (9,8 %) изолятов — фермент OXA-48. Резистентность, связанная с синтезом этих

ферментов, а также в сочетании с продукцией БЛРС обеспечивает микроорганизму нечувствительность ко всем бета-лактамам.

В сравнении с федеральными данными по антибиотикочувствительности местные штаммы *K. pneumoniae* достоверно реже проявляют устойчивость к амоксициллин-клавуланату, что можно объяснить особенностями субстратного профиля природных бета-лактамаз этого вида.

1.4.2. Внегоспитальные пациенты

За исследуемый период были собраны и изучены 121 культура *E. coli* и 24 изолята *K. pneumoniae*, которые составляли 51,5 и 10,2 % от общего числа штаммов возбудителей, выделенных из клинического материала от амбулаторных больных с инфекциями органов мочевыводящего тракта. Полученные нами результаты несколько отличаются от данных интернет-платформы AMRmap. Так, в Российской Федерации частота встречаемости *E. coli* при инфекциях органов мочевого тракта составляет 63,3 %, *K. pneumoniae* — 20,2 %.

Escherichia coli. Ведущий возбудитель инфекционных процессов мочевыводящего тракта *E. coli* был устойчив к ампициллину, цефотаксиму, цефтазидиму. Культур, резистентных к карбапенемам, не обнаружено. Наши данные достоверно ниже частоты распространения резистентности к ципрофлоксацину по России (табл. 1.2). Такие различия в полученных данных в отношении ципрофлоксацина, возможно, связаны с низкой частотой назначения этого препарата в качестве эмпирической терапии при инфекциях мочевыводящего тракта в различных регионах России.

Таблица 1.2

Антибиотикорезистентность клинических изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae*, выделенных от амбулаторных больных. Доля резистентных штаммов, % [95% ДИ]

Препарат	РФ ³ (n = 138)	Собственные данные (n = 44)	Значимость различий
<i>E. coli</i>			
Ампициллин	63,0	63,6 [48,9; 76,6]	$\chi^2_{[1]} = 0,01; P = 0,943$
Ципрофлоксацин	53,6	31,8 [19,6; 46,4]	$\chi^2_{[1]} = 6,35; P = 0,012$
Цефотаксим	33,3	18,2 [9,0; 31,4]	$\chi^2_{[1]} = 3,67; P = 0,055$
Цефтазидим	31,2	22,7 [12,3; 36,6]	$\chi^2_{[1]} = 1,15; P = 0,284$
Имипенем	0,7	0,0 [0,0; 5,5]	$\chi^2_{[1]} = 0,32; P > 0,999$
Меропенем	0	0,0 [0,0; 5,5]	$\chi^2_{[1]} = 0,00; P > 0,999$

Окончание табл. 1.2

<i>K. pneumoniae</i>			
Препарат	РФ ⁴ (n = 44)	Собственные данные (n = 44)	Значимость различий
Амоксициллин-клавуланат	54,6	22,7 [12,3; 36,6]	$\chi^2_{[1]} = 9,39; P = 0,002$
Ципрофлоксацин	54,6	27,3 [15,9; 41,6]	$\chi^2_{[1]} = 6,77; P = 0,009$
Цефотаксим	52,3	25,0 [14,1; 39,1]	$\chi^2_{[1]} = 6,90; P = 0,009$
Цефтазидим	50,0	25,0 [14,1; 39,1]	$\chi^2_{[1]} = 5,87; P = 0,015$
Меропенем	2,3	0,0 [0,0; 5,5]	$\chi^2_{[1]} = 1,01; P > 0,999$
Имипенем	0	0,0 [0,0; 5,5]	$\chi^2_{[1]} = 0,00; P > 0,999$

Примечание. Выборка из базы данных: ³ — (AMRmap, 2018в), ⁴ — (AMRmap, 2018 г).

Резистентность, обусловленная продукцией БЛРС, зарегистрирована у 22 % штаммов. В ходе молекулярно-генетического типирования в геномах этих культур были обнаружены детерминанты бета-лактамаз СТХ-М типа.

***Klebsiella pneumoniae*.** У штаммов *K. pneumoniae* выявлена устойчивость к амоксициллин-клавуланату, цефотаксиму, цефтазидиму, ципрофлоксацину. Основным механизмом резистентности к пенициллинам и цефалоспорином являлась продукция БЛРС, которую наблюдали у 25 % изолятов. Частота встречаемости устойчивых изолятов была достоверно ниже в сравнении результатами многоцентровых исследований (Сухорукова и др., 2017). Такие различия в распространении антибиотикоустойчивости связаны с особенностями амбулаторного потребления антимикробных препаратов для системного применения в нашем регионе (Рачина и др., 2008).

Все исследованные культуры клебсиелл были чувствительны к карбапенемам.

Заключение

Антибиотикорезистентность как адаптивный механизм защиты в экстремальных условиях существования возникла у микробиоты сразу после появления способности продуцировать антимикробные соединения (вероятно, более 3,5 млрд лет назад). Гены устойчивости к антибиотикам в составе плазмид и транспозонов являются генами адаптации, которые повышают экологическую пластичность бактерий и приспособляемость к необычным условиям. Они обнаружены в разных природных биотопах и экологических нишах, находящихся в различных почвенно-климатических зонах. Глобальный резистом характеризует совокупность генов

антибиотикорезистентности как патогенных, так и непатогенных микроорганизмов.

Антибиотикоустойчивость обеспечивается одним или сочетанием нескольких из пяти биохимических механизмов: ферментативная инактивация антибиотика, изменение проницаемости внешних структур бактерий, активное выведение антибиотика из клетки (эффлюкс), модификация мишени действия, формирование метаболического шунта.

Человек имеет лишь косвенную роль в формировании антибиотикоустойчивых популяций микроорганизмов. Антропогенный фактор повлиял на интродукцию детерминант устойчивости в состав клинических микроценозов и ускорение их распространения. Это стало возможным в результате активного применения антимикробных соединений с целью терапии в медицине и ветеринарии; с целью профилактики и ускорения роста молодняка — в птицеводстве, животноводстве, рыбоводстве; с целью увеличения сроков хранения продуктов в пищевой индустрии. Наиболее опасными с точки зрения способности вызывать летальный исход инфекционного процесса, формировать антибиотикорезистентность и склонность к эпидемическому распространению являются следующие микроорганизмы: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*; *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *Salmonella* и *Shigella spp.*; *S. aureus*; *E. faecium*; *N. gonorrhoeae*; *Campylobacter spp.*; *H. pylori*; *S. pneumoniae*; *H. influenzae*.

В ходе собственных исследований нами было выделено и изучено 165 культур *E. coli* и 147 изолятов *K. pneumoniae*. У штаммов, выделенных от госпитальных пациентов, уровень резистентности в отношении клинически важных антимикробных препаратов был закономерно выше, в сравнении с культурами от амбулаторных больных. В декабре 2017 г. от больных отделения хирургического профиля начали выделяться устойчивые к карбапенемам штаммы *K. pneumoniae*, резистентность которых обеспечивалась синтезом металлобеталактамаз типа NDM и OXA-48. Частота выявления МБЛ-продуцирующих штаммов составила 70 %.

Резистентность к препаратам, применяемым в амбулаторной практике против *E. coli* и *K. pneumoniae*, достаточно низка и не превышает 35 % (кроме ампициллина). Устойчивость, обусловленная продукцией БЛРС, зарегистрирована у 22 % штаммов *E. coli* и 25 % *K. pneumoniae*. Молекулярно-генетический анализ показал, что устойчивость исследованных штаммов связана с продукцией бета-лактамаз типа СТХ-М.

2.1. Модель взаимодействия хозяина и патогена как ответ на стресс макроорганизма при оппортунистических кандидозах

Худой мир лучше доброй ссоры.

Русская пословица

Вагинальная микробиота человека уникальна среди приматов и других млекопитающих преобладанием *Lactobacillus spp.*, которые обычно составляют более 70 % резидентных бактерий, тогда как у других млекопитающих доля лактобацилл составляет менее 1 % (Miller et al., 2016). Доминирование лактобактерий в вагинальной микробиоте эволюционно связано с репродуктивным здоровьем женщины и опосредованно низким вагинальным pH $\leq 4,5$ (в отличие от других млекопитающих, не относящихся к человеку, у которых диапазон pH равен 5,4–7,8) и защитным характером продуктов *Lactobacillus spp.*, таких как молочная кислота и бактериоцины (van de Wijgert et al., 2014; Smith, Ravel, 2017). Лактобациллы связываются с поверхностью вагинальных эпителиальных клеток, ингибируют связывание других бактерий с эпителием, питаются запасами гликогена в эпителии и производят молочную кислоту, которая убивает или ингибирует рост многих других бактерий. Следует отметить, что молочная кислота также производится эпителиальными клетками под контролем эстрогенов и диффундирует из клеток в вагинальный просвет. Молочная кислота стимулирует аутофагию — основной, сохранённый в эволюции, механизм выживания клеток, благодаря которому поддерживается внутриклеточный гомеостаз и клиренс внутриклеточных микроорганизмов в цитоплазме эпителиальных клеток (старые или дефектные митохондрии, дисфункциональные белки, а также внутриклеточные бактерии, вирусы, простейшие и их компоненты секвестрируются в аутофагосому и подвергаются деградации ферментами лизосом) (Witkin, Linhares, 2017).

Вагинальная слизистая человека выстлана многослойным плоским эпителием, верхний слой которого отслаивается в вагинальный просвет примерно каждые 4 ч. Эта десквамация эпителия, как и присутствие на эпителиальных клетках муцина, выполняет защитную функцию, так как микроорганизмы, недавно попавшие во влагалище и прилипшие к этому верхнему слою эпителиальных клеток, не могут долго оставаться связанными с эпителием. Вагинальные эпителиаль-

ные клетки являются активными компонентами врождённого антимикробного иммунитета слизистых, способны обнаруживать присутствие патогенов через PRRs-рецепторы (TLRs, CLRs) (Moyes, Naglik, 2011) и могут быть стимулированы для высвобождения в вагинальный просвет ряда антимикробных пептидов, включая SLPI, HE4, человеческий дефензин 5 (HD5), человеческие β -дефензины 1 и 2 (HBD1, HBD2), кателицидины и лактоферрин (Anderson [et al.], 2014; Witkin, 2015). Эпителиоциты секретируют провоспалительные цитокины, которые рекрутируют фагоцитарные клетки для выхода в эпителиальные слои и в вагинальный просвет и активируют фагоциты для захвата микробных патогенов (Witkin, 2015). Напротив, *Lactobacillus spp.* не только не стимулируют высвобождение провоспалительных медиаторов из вагинальных эпителиальных клеток, но и ингибируют их высвобождение. Таким образом, молочная кислота и доминирование лактобактерий содействуют антимикробной защите вагинального тракта без индуцирования иммуноопосредованного воспаления (Witkin, Linhares, 2017).

Состав вагинальной микробиоты «относительно прост» на уровне рода по сравнению с микробными сообществами кишечника и ротовой полости (например, вагинальная микробиота включает 112 родов, тогда как кишечная и ротовая, соответственно, 673 и 275 родов резидентных микроорганизмов), но имеет более высокое разнообразие видов *Lactobacillus spp.* (van de Wijgert et al., 2014). Кишечник и, в меньшей степени, ротовая полость служат для вагинальной микробиоты экстравагинальными резервуарами бактерий и грибов *Candida spp.* (van de Wijgert et al., 2014; Marrazzo et al., 2012). Состав вагинальной микробиоты у женщин носит динамичный характер: с одной стороны, состояние микробного сообщества подвержено ежедневным колебаниям, с другой стороны, возможны переходы между пятью основными типами микробных сообществ (CST), а длительность пребывания в каждом из типов сообществ может варьироваться индивидуально (Smith, Ravel, 2017).

В четырёх из этих типов состояния микробного сообщества преобладают *Lactobacillus crispatus* (CST-I), *Lactobacillus iners* (CST-III), *Lactobacillus gasseri* (CST-II) или *Lactobacillus jensenii* (CST-V), но один, CST-IV, определяется потерей *Lactobacillus spp.* и состоит из полимикробной смеси строгих и факультативных анаэробов, композиционно сходных с полимикробным состоянием, известным как бактериальный вагиноз (полибактериальный дисбиоз) (van de Wijgert et al., 2014; Smith, Ravel, 2017; Turovskiy et al., 2011). Напротив, вагинальная колонизация грибами *Candida spp.* чаще встречается у женщин, в вагинальной микробиоте которых преобладают *Lactobacillus spp.*, чем у женщин с бактериальным вагинозом (van de Wijgert et al., 2014). Основные изменения в физиологии влагалища и микробиоты в течение жизни женщины в значительной степени определяются переходными периодами, такими как половое созревание, беременность и менопауза, в то время как ежедневные колебания микробного состава с большей вероятностью являются

результатом повседневной жизнедеятельности и образа жизни женщины. В некоторых случаях изменения вагинальной микробиоты связаны с менструальным циклом или сексуальным поведением, но в других случаях они, по-видимому, обусловлены неизвестными факторами (Smith, Ravel, 2017).

Одной из гипотез развития бактериального вагиноза считается образование полимикробной биоплёнки (van de Wijert et al., 2014). Этот образ жизни является особенно важной бактериальной адаптацией для роста как части сидячего сообщества, которое имитирует интегрированный многоклеточный организм со своим собственным циклом развития, совместным поведением среди видов и координированным управлением с использованием сигнальных молекул, определяющих чувство кворума для связи между составляющими (Peuyala, Ebersole, 2013). Внеклеточная матрица, окружающая бактерии в биоплёнке, ингибирует проникновение молочной кислоты, естественных противомикробных соединений и антибиотиков (van de Wijert et al., 2014; Peuyala, Ebersole, 2013).

Большинство инфекций, вызванных грибами *Candida albicans*, также связаны с биоплёнкой (De Cremer et al., 2015). Присутствие гифальных форм *C. albicans* является характерной чертой и важным структурным компонентом биоплёнки, обеспечивающим трёхмерную архитектуру для дрожжевых клеток, псевдогрибов и других таксономических единиц (в полимикробной биоплёнке) (Xie et al., 2012; Uppuluri et al., 2018; Nett et al., 2015; Nobile, Johnson, 2015). Гипотеза биоплёнки может также объяснить рост *Candida spp.*, когда присутствуют только свободноживущие или диспергированные из биоплёнки бактерии и обнажаются эпителиальные клетки хозяина: *Candida* должны прикрепляться к эпителиальным вагинальным клеткам, чтобы обеспечить их инвазию (van de Wijert et al., 2014). Важной особенностью зрелой биоплёнки, образованной *C. albicans*, является устойчивость к лейкоцитарному киллингу (Xie et al., 2012) и противогрибковым препаратам (De Cremer et al., 2015), а также стабильность заключённых во внеклеточный матрикс клеточных элементов и структурных компонентов от лизированных клеток хозяина (эпителиальные клетки, урогенитальные нейтрофилы, эритроциты) и белков хозяина (гемоглобин, миелопероксидаза, С-реактивный белок и алармин S100-A9) (Nett et al., 2015). Биоплёнки *C. albicans* защищают патоген от иммунных атак хозяина, уклоняются от убийства нейтрофилами и не вызывают образования активных форм кислорода, хотя нейтрофилы сохраняют жизнеспособность и функциональный активационный потенциал (Xie et al., 2012; Mayer et al., 2013). Напротив, бактерии в биоплёнках демонстрируют инфекционный курс, который обычно сопровождается устойчивым гипервоспалительным ответом хозяина, причём бактерии биоплёнки используют воспалительный плазменный экссудат в качестве питания (Peuyala, Ebersole, 2013).

Существует тонкий баланс между комменсальным и патогенным состоянием *C. albicans*, об этом свидетельствует большое количество защитных механизмов им-

мунной системы и механизмов уклонения *C. albicans*. Грибы *C. albicans* разработали большое количество стратегий для уклонения или подрыва противомикробных защитных реакций иммунной системы хозяина, эти стратегии могут позволить грибу контролировать иммунную атаку хозяина, пересекать тканевые барьеры и распространяться в организме человека (Dühning et al., 2015). Первоначальное взаимодействие *C. albicans* с иммунной системой человека происходит на уровне эпителиальных клеток слизистой оболочки, которые действуют как физические барьеры. Грибы *C. albicans* способны вторгаться в эпителиальные ткани двумя путями: через индуцированный эндоцитоз и активной пенетрацией (Mech et al., 2014).

Пассивное поглощение *C. albicans* путём эндоцитоза представляет собой процесс, управляемый хозяином, опосредованный поверхностными белками *C. albicans* (Als3, Hgc1, Hwp1), которые связываются с E-кадгерином эпителия (Wilson et al., 2009; Mayer et al., 2013). Активное проникновение, с другой стороны, не зависит от хозяина, а является исключительно атрибутом патогена и включает физическое давление, наносимое продвигающимся концом гифа, тигмотропизм, секрецию внеклеточных гидролаз (Saps), фосфолипазы группы В (Plb), протеиназы и липазы (Lip) (Wilson et al., 2009; Mayer et al., 2013). Эпителиальные клетки не только обеспечивают физический барьер, но также играют активную, интегральную роль в защите слизистой оболочки от *C. albicans* путём различения комменсальной и патогенной формы гриба, и продукции цитокинов с провоспалительным профилем, таких как интерлейкин 1 α / β (IL-1 α / β), IL-6, G-CSF, GM-CSF, TNF- α и хемокины RANTES, IL-8 и CCL20 (Moyes, Naglik, 2011).

Секреция провоспалительных молекул приводит к рекрутингу и активации фагоцитарных клеток, особенно нейтрофилов, которые наиболее эффективно контролируют и защищают вагинальную слизистую от *Candida*-инфекции, убивая клетки *C. albicans* внутриклеточно и внеклеточно. Грибы *C. albicans*, с другой стороны, разработали несколько механизмов для контроля и уклонения от антимикробной активности локальных и вновь пришедших фагоцитарных клеток (Dühning et al., 2015). Как только *C. albicans* фагоцитируется клетками врождённой иммунной системы, клеточная стенка *C. albicans* способна адаптироваться к значительным изменениям окружающего pH благодаря белкам Phr1 и Phr2. Кроме того, *C. albicans* модулирует внеклеточный pH, активно подщелачивая окружающую среду (Mayer et al., 2013). *C. albicans* может выделять аммиак, полученный при разложении аминокислот, для повышения pH, что имеет особое значение после фагоцитоза, поскольку приводит к нейтрализации фагосомного pH, способствует гифальному морфогенезу и тем самым способствует выходу патогена из фагоцита (Vylkova, Lorenz, 2014). Фагоциты могут эффективно глотать дрожжевые клетки и короткие гифы *C. albicans*. Соответственно, стратегия естественного уклонения грибов *C. albicans* состоит в том, чтобы сформировать длинные гифы, потому что они не могут быть фагоцитированы по простым геометрическим причинам.

Фагоцитирующие клетки, в частности нейтрофилы, полагаются на ряд антимикробных эффекторных механизмов, включая окислительный взрыв, фагоцитоз, внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs), высвобождение ферментов гранул при дегрануляции и антимикробных пептидов для уничтожения гриба, а также выделение провоспалительных цитокинов для рекрутирования и активации иммунных клеток. Однако усиление провоспалительной активности фагоцитирующих клеток может происходить без эффективного ограничения роста *C. albicans* (Dühning et al., 2015).

В вагинальном тракте представители микробиоты существуют в тонко настроенных мутуалистических отношениях с хозяином и обеспечивают первую линию защиты от колонизации оппортунистическими патогенами, оказывая влияние на репродуктивную физиологию хозяина, но и физиология хозяина может влиять на состав и функцию влагалищной микробиоты (Smith, Ravel, 2017). Воздействие стрессовых стимулов активирует физиологические процессы организма хозяина, направленные на поддержание гомеостаза, и приводит к изменению состава микробных сообществ (Bailey et al., 2011; Galley, Bailey, 2014). Например, рядом исследователей показано, что под воздействием психосоциального стресса уменьшается состав кишечных микробных сообществ, в частности бактерии рода *Lactobacillus* (Bailey et al., 2011; Galley, Bailey, 2014), а микробиота кишечника увеличивает уровни циркулирующих провоспалительных цитокинов, внося вклад в индуцированную стрессом иммуномодуляцию и нейробиологические последствия (Bailey et al., 2011; Gur, Bailey, 2016).

Изученные влияния стресса на состав микробиоты почти исключительно ограничиваются кишечником. Однако эмоциональный стресс индуцирует дисбиоз вагинальной микробиоты у беременных мышей, значительно уменьшает количество лактобактерий в вагинальной микробиоте и усиливает воспаление (Jašarević et al., 2015). Поскольку воздействие стрессора меняет общую структуру микробиоты и индуцирует бактериальную транслокацию, а продукты микробиоты необходимы для праймирования врождённого иммунитета, можно предположить, что микробиота является важным компонентом стресс-индуцированного повышения активности последнего (Bailey et al., 2011). Особый интерес представляет микоцидный ответ клеток врождённого иммунитета на *C. albicans* как наиболее распространённый комменсальный и оппортунистический грибковый патоген слизистых оболочек репродуктивного тракта женщин.

Для оценки взаимодействия клеток хозяина и грибкового патогена в условиях *in vitro* создавалась модель «адгезированные лейкоциты человека — живые бластоконидии *C. albicans*». В данной экспериментальной модели в пределах 1-часового временного промежутка (через 0, 15, 60 мин) оценивали показатели, характеризующие немедленную эффекторную фазу микоцидного ответа лейкоцитов периферической крови (ЛПК) здоровых и больных вульвовагинальным

кандидозом (ВВК) в отношении клинического изолята грибов *C. albicans* (Самышкина, 2008):

1) показатели фагоцитарной реакции ЛПК (нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов) — оценивали активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, индекс адгезии, индекс поглощения;

2) выживаемость (в %) во внеклеточной среде культивирования непоглощённых фагоцитами грибов *C. albicans* — оценивали количественными посевами среды на агар Сабуро (инкубация 48 ч при 37 °С), исходя из того, что одна выросшая колония грибов соответствует одной живой бластоконидии *C. albicans*;

3) цитокинопродукцию — оценивали уровень TNF- α , IL-8, IFN- γ , IL-1Ra в супернатантах внеклеточной среды культивирования методом твердофазного иммуноферментного анализа (тест-системы ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Используемый в эксперименте клинический вагинальный изолят грибов *C. albicans* (живая суточная культура) был выделен при микробиологическом исследовании отделяемого заднего свода влагалища небеременной женщины репродуктивного возраста с ВВК.

Лейкоциты, используемые для создания экспериментальной модели, получали из венозной крови клинически здоровых женщин ($n = 21$, средний возраст $39,8 \pm 2,75$ лет) и больных вульвовагинальным кандидозом ($n = 55$, средний возраст $30,5 \pm 1,28$ лет), из них:

- 14 женщин — с острой формой (дебют) ВВК (средний возраст $25,2 \pm 1,43$ лет, длительность заболевания до двух месяцев);
- 25 женщин — с хронической формой ВВК с редкими рецидивами (средний возраст $31,4 \pm 2,09$ лет, длительность заболевания более 6 месяцев, не более трёх рецидивов в течение года);
- 16 женщин — с хронической формой ВВК с частыми рецидивами (средний возраст $30,6 \pm 1,35$ лет, рецидивирующее течение хронического ВВК при наличии четырёх и более клинически выраженных рецидивов в течение года, длительность заболевания от 6 месяцев до 10 лет).

В ходе статистического анализа использовали методы описательной статистики и выборочных сравнений. Для всех количественных показателей рассчитывали среднее значение и его стандартную ошибку ($M \pm m$), для качественных — относительную частоту (в %). Сравнения групп по количественным признакам проводили с помощью критерия Манна — Уитни, по качественным признакам — критерием хи-квадрат, а в случае слабонасыщенных таблиц сопряжённости (имелись абсолютные частоты 5 и менее) — рандомизационным критерием Монте-Карло ($n = 99999$). Расчёты выполнены в пакете PAST (version 3.19; (Hammer et al., 2001)). Различия считали значимыми при $P \leq 0,05$, незначимыми — при $P > 0,10$.

2.1.1. Микоцидный ответ лейкоцитов здоровых и больных вульвовагинальным кандидозом на грибы клинического изолята *C. albicans*

Учитывая значимость клеточных компартментов врождённой иммунной системы, в частности, полиморфноядерных лейкоцитов, дендритных клеток, тканевых макрофагов и моноцитов в защите вагинальной слизистой от патогена *Candida* (Patin et al., 2018; van de Veerdonk et al., 2015; Dühring et al., 2015), мы обратили наше внимание на раннюю, быструю эффекторную фазу микоцидного ответа клеток воспаления (в течение первого часа), которая включает фагоцитоз, формирование NETs и секреторную дегрануляцию микробицидных продуктов и различных медиаторов, в том числе цитокинов и хемокинов (van de Veerdonk et al., 2015; Toth et al., 2017; Moyes, Naglik, 2011; Dühring et al., 2015). В условиях *in vitro* в экспериментальной модели «адгезированные лейкоциты человека — живые бластоконидии *C. albicans*» оценивались показатели немедленной эффекторной реакции микоцидного ответа ЛПК при встрече с антигенами живых грибов *C. albicans*, а именно — фагоцитоз и его этапы (показатели фагоцитарной реакции лейкоцитов), дегрануляция (опосредовано через оценку киллинговых свойств экстраклеточной среды ЛПК в отношении живых грибов, т. е. через оценку выживаемости непоглощённых фагоцитами грибов в экстраклеточной среде культивирования лейкоцитов), и цитокиновый ответ этих клеток на встречу с антигеном (содержание основных цитокинов с про- и противовоспалительным эффектом в супернатантах среды культивирования).

При взаимодействии грибов клинического вагинального изолята *C. albicans* с человеческими ЛПК здоровых женщин-доноров обнаружено, что в отношении *C. albicans* наиболее эффективным механизмом убийства является внеклеточный киллинг (Самышкина, 2008). Вероятно, благодаря тесным эволюционным связям и жёсткому селективному отбору клинический изолят *C. albicans* приобрёл способность легко адаптироваться к жизни в условиях физиологических экстримов хозяина, а если это так, то стратегия возбудителя должна строиться на включении механизмов, обеспечивающих наименьший воспалительный потенциал в месте инвазии при встрече с клетками врожденного иммунитета и гуморальными факторами хозяина. Однако работами многих авторов показана как иммуномодулирующая способность грибов *C. albicans* или их антигенов индуцировать продукцию множества провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, GM-CSF, IFN- γ), так и иммуносупрессирующая способность маннана, большого гликопротеина микотической клеточной стенки, подавлять воспалительный ответ, приводя к экспрессии генов IL-4, IL-5, IL-1Ra и IL-10 (Romany et al., 2002; van de Veerdonk et al., 2015; Toth et al., 2017; Moyes, Naglik, 2011; Dühring et al., 2015; Sobel, 2016).

Для создания модели использовали ЛПК — моноциты и гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы) периферической крови человека, являющиеся иммунорегуляторными клетками и активными продуцентами цитокинов, в частности, IFN- γ , TNF- α , IL-8, IL-1Ra. Лейкоцитарную взвесь получали из цельной крови, а затем лейкоциты адгезировались на стекле в условиях взаимодействия всех клеток и плазменных факторов периферической крови в течение одного часа инкубации. Получение адгезированных ЛПК, несомненно, являлось фактором праймирования, т. е. неспецифической стимуляции лейкоцитов, приводящим в состояние повышенной готовности и к увеличению активности каждой функции клетки на действие нового стимула — контакт с живыми грибами *C. albicans*. Адгезия в общем и связывание интегринов в частности является одним из законов клеточной биологии — поведение клетки контролируется интегриновыми и неинтегриновыми рецепторами. Контроль над полномасштабной активацией нейтрофила при инфекции или повреждении осуществляется двумя сигналами: через сигнал, поступивший от связывания интегринов с белками внеклеточного матрикса на клеточных или неклеточных поверхностях, и через сигнал, переданный с поверхностных клеточных паттерн-распознающих рецепторов (PRRs), рецепторов для воспалительных факторов, цитокинов и хемокинов (Patin et al., 2018; van de Veerdonk et al., 2015; Moyes, Naglik, 2011).

Живые *C. albicans* способны защищать себя от фагоцитоза, пенетрируя клеточные мембраны фагоцита прорастающими гифами, а также экспрессируя поверхностные молекулы адгезии и инвазивные биомолекулы, которые оказывают влияние на фагоцитировавшие их клетки, повреждая или подавляя метаболизм кислородного взрыва и секрецию перекиси водорода (Vommanavar et al., 2017). Инактивация *C. albicans* прогреванием культуры грибов исключает их влияние на лиганд-рецепторные взаимодействия с клетками хозяина и немедленную эффекторную реакцию фагоцитов, поэтому в экспериментальной модели были использованы живые бластоконидии клинического вагинального изолята *C. albicans*.

Способность вызывать инфекции у человека тесно ассоциирована со способностью иммунной системы различать комменсальные и патогенные формы *C. albicans*, к которым относятся избыточный рост, образование биоплёнки, способность к инвазии, фенотипическому переключению (Vommanavar et al., 2017, Sobel, 2016). Как член нормальной микрофлоры *C. albicans* присутствует на коже и слизистых оболочках верхних дыхательных путей, ротовой полости, желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), женских половых путей и находится в ожидании изменения, в некотором аспекте, физиологии врождённого иммунитета хозяина, который обычно подавляет рост и инвазию *C. albicans* (Vommanavar et al., 2017). Изменения в гомеостазе хозяина, например, изменения pH слизистой, пищевого поведения и ограничение доступности питательных веществ, применение противомикробной химиотерапии и цитостатиков, коинфекция,

полибактериальный дисбиоз, могут способствовать количественному увеличению, проявлению вирулентности у *C. albicans* и приводить к качественному переходу от комменсала к патогену, инициирующего иммунные реакции хозяина (Dühning et al., 2015).

При сравнительном анализе показателей фагоцитарной реакции ЛПК здоровых и больных ВВК установлены различия по индексам поглощения — грибы клинического вагинального изолята *C. albicans* поглощаются почти в два раза достоверно хуже нейтрофилами больных ВВК на 15-й минуте контакта, и в полтора раза достоверно хуже нейтрофилами и моноцитами больных ВВК на 60-й минуте по сравнению с фагоцитами здоровых лиц (рис. 2.1.1).

Выживаемость непоглощённых грибов в среде культивирования с фагоцитами больных ВВК статистически значимо ниже и на 15-й, и на 60-й минуте по сравнению с ЛПК здоровых и не изменяется за время инкубации (рис. 2.1.2). Следовательно, киллинг непоглощённых фагоцитами грибов клинического вагинального изолята *C. albicans* происходит внеклеточно (в среде культивирования) в ходе развития немедленной эффекторной фазы микоцидного ответа ЛПК больных ВВК (с 15 по 60 мин), и эффективность его достоверно выше по сравнению с внеклеточным киллингом грибов лейкоцитами здоровых лиц.

При сравнении уровней цитокинов в супернатантах экстраклеточной среды лейкоцитов здоровых и больных ВВК наблюдались значимые различия, регистрируемые уже через 15 мин контакта (табл. 2.1.1). Уровень провоспалительных цитокинов TNF-α и IFN-γ в супернатантах ЛПК больных ВВК был в 3 раза достоверно выше, чем уровень здоровых. Уровень противовоспалительного цитокина IL-1Ra

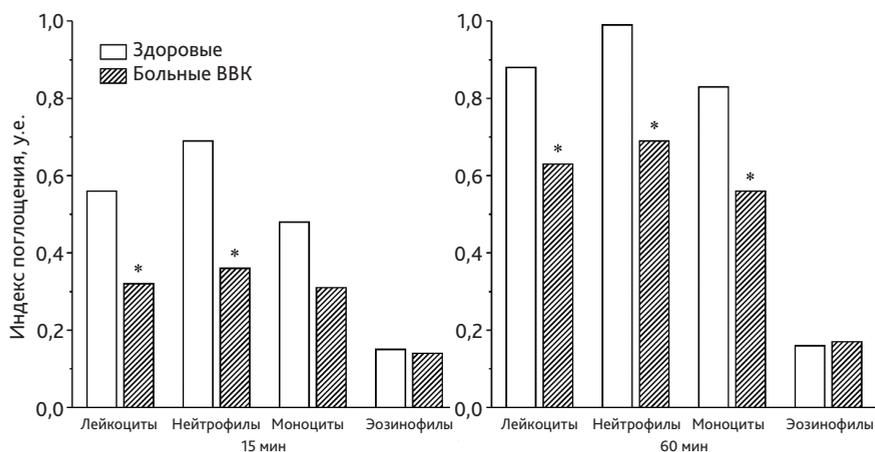


Рис. 2.1.1. Показатели фагоцитарной реакции (индекс поглощения) ЛПК здоровых и больных ВВК на разных сроках инкубации. * $P \leq 0,05$

Таблица 2.1.1

Уровень цитокинов в образцах экстраклеточной среды ЛПК здоровых и больных ВВК при стимуляции клиническим изолятом *S. albicans* ($M \pm m$, пг/мл)

Цитокин	Время, мин	Группа сравнения (n = 36)	Больные ВВК (n = 78)	Значимость различий
TNF- α	0	0,96 \pm 0,361 <i>f</i> = 33 %	3,42 \pm 0,268 <i>f</i> = 5 %	$\chi^2_{[1]} P < 0,001$ $P = 16,24; P < 0,001$
	15	1,46 \pm 0,192 <i>f</i> = 36 %	3,63 \pm 0,250 <i>f</i> = 6 %	$\chi^2_{[1]} P < 0,001$ $P = 16,34; P < 0,001$
	60	1,68 \pm 0,246 <i>f</i> = 39 %	4,20 \pm 0,327 <i>f</i> = 4 %	$\chi^2_{[1]} P < 0,001$ $P = 23,84; P < 0,001$
IL-8	0	52,8 \pm 14,98	53,6 \pm 8,85	$P = 0,967$
	15	55,6 \pm 10,16	56,9 \pm 7,03	$P = 0,912$
	60	125,4 \pm 16,97	137,9 \pm 14,91	$P = 0,583$
IFN- γ	0	26,3 \pm 2,81	102,4 \pm 12,05	$P < 0,001$
	15	27,3 \pm 2,11	104,8 \pm 14,02	$P < 0,001$
	60	29,9 \pm 3,50	101,1 \pm 14,29	$P < 0,001$
IL-1Ra	0	89,5 \pm 10,67 <i>f</i> = 3 %	93,7 \pm 8,76 <i>f</i> = 21 %	$\chi^2_{[1]} P = 0,954$ $P = 6,11; P = 0,014$
	15	100,0 \pm 13,95 <i>f</i> = 3 %	96,5 \pm 8,84 <i>f</i> = 22 %	$\chi^2_{[1]} P = 0,831$ $P = 6,70; P = 0,010$
	60	142,5 \pm 20,31 <i>f</i> = 0 %	126,1 \pm 9,44 <i>f</i> = 17 %	$\chi^2_{[1]} P = 0,467$ $P = 6,77; P = 0,010$

Примечание. *f* — доля образцов со следовым уровнем цитокина в экстраклеточной среде ЛПК; жирным шрифтом отмечены статистически значимые различия с показателями здоровых лиц.

в культуральной среде лейкоцитов больных ВВК и здоровых статистически не различался, однако среди больных было статистически значимо больше образцов экстраклеточной среды со следовыми концентрациями IL-1Ra (неопределяемыми используемой тест-системой). Исходя из полученных данных, можно предположить, что в экстраклеточной среде ЛПК больных ВВК при культивировании с живыми *S. albicans* формируется выраженный провоспалительный цитокиновый потенциал по сравнению с клетками здоровых лиц.

Таким образом, усиленный экстраклеточный киллинг грибов лейкоцитами больных ВВК по сравнению с лейкоцитами здоровых лиц, возможно, свидетельствует о повышенной реактивности ЛПК, обеспечивающей немедленный ответ на *S. albicans*, в виде выброса микоцидных продуктов и секреции БАВ, в том числе цитокинов и хемокинов. В результате, в экстраклеточной среде лейкоцитов формируется выраженный провоспалительный цитокиновый потенциал (значимо более высокий уровень IFN- γ и TNF- α по сравнению с ЛПК здоровых доноров).

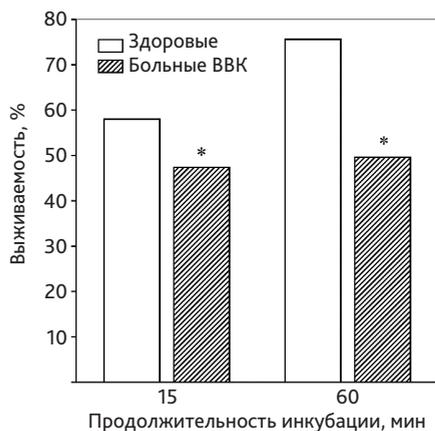


Рис. 2.1.2. Выживаемость непоглощенных фагоцитами грибов *C. albicans* в среде культивирования ЛПК здоровых и больных ВВК. * $P \leq 0,05$

2.1.2. Характер микоцидного ответа лейкоцитов больных в зависимости от клинической формы ВВК

Динамическая среда взаимоотношений «хозяин-микробиота» постоянно развивается, чтобы помочь поддерживать защитную комменсальную микробную экологию, одновременно сводя к минимуму потенциал оппортунистических патогенов (Peuyala, Ebersole, 2013). Острый симптоматический ВВК следует за распадом этих отношений и влечёт за собой либо вызванный рост клеток *Candida*, либо изменение в защитных механизмах хозяина, которые действуют, чтобы поддерживать низкое количество дрожжевых клеток и в то же время преднамеренно снижать иммунный воспалительный ответ слизистой оболочки, направленный при допущении наличия небольшого количества дрожжей. Повышенная частота вагинальной колонизации *Candida* представляет собой начальную фазу восприимчивости к рецидивирующему ВВК, и причины могут быть генетическими (Hammad et al., 2018; Jaeger et al., 2013; Al Rushood et al., 2013), биологическими или поведенческими (Sobel, 2016).

Сравнительный анализ показателей немедленной эффекторной реакции микоцидного ответа ЛПК больных в зависимости от клинической формы ВВК (острая форма ВВК и хронические формы ВВК с редкими и частыми рецидивами) обнаружил, что наиболее значимые различия между группами сравнения отмечаются на 15-й минуте культивирования лейкоцитов с грибами клинического изолята *C. albicans*.

Микоцидный ответ ЛПК больных с дебютом инфекции (острая форма ВВК) характеризуется следующим:

1) достоверно низкий индекс поглощения грибов фагоцитами по сравнению с показателями групп сравнения через 15 мин инкубации (рис. 2.1.3);

2) выживаемость непоглощённых грибов *C. albicans* соответствует здоровому контролю и достоверно выше показателей больных с частыми рецидивами хронического ВВК на 15-й минуте, но снижается к 60-й минуте и становится равной показателям групп сравнения больных (рис. 2.1.4);

3) уровни провоспалительных цитокинов TNF-α и IFN-γ достоверно выше, а противовоспалительного цитокина IL-1Ra достоверно ниже в супернатантах экстраклеточной среды по сравнению с уровнями групп сравнения (табл. 2.1.2), следовательно, дебют инфекции (острая форма ВВК) характеризуется высоким провоспалительным цитокиновым потенциалом внеклеточной среды.

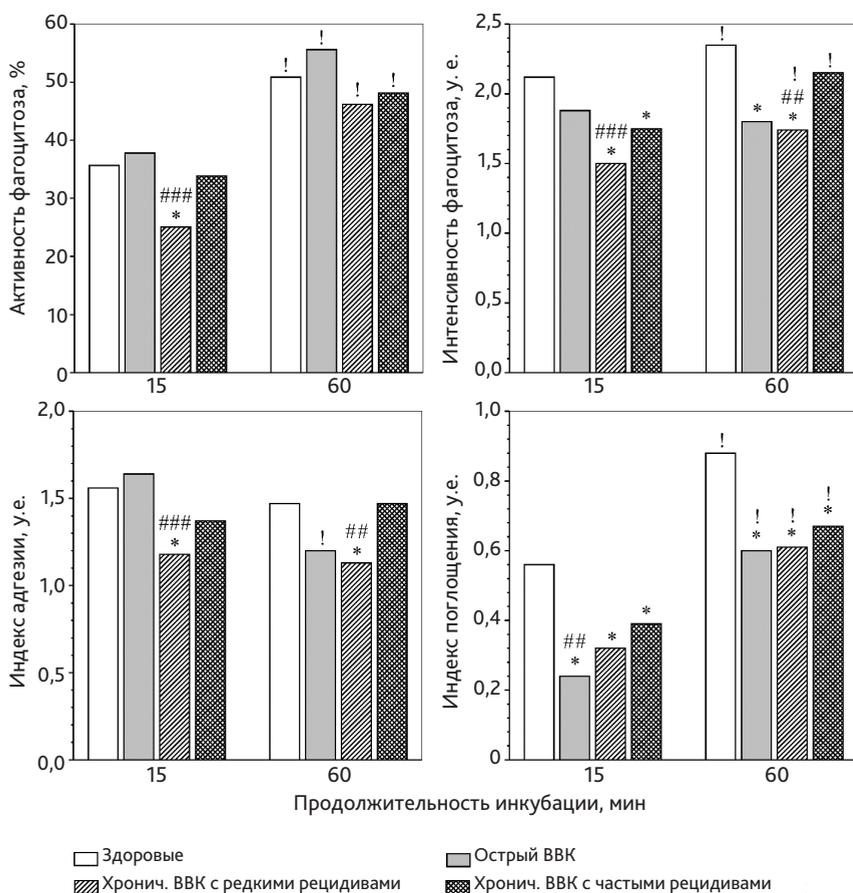


Рис. 2.1.3. Показатели общей фагоцитарной реакции ЛПК больных в зависимости от клинической формы вульвовагинального кандидоза. Различия значимы ($P \leq 0,05$) при сравнении с группой: * Здоровые, # Острый ВВК, ## Хронич. ВВК с частыми рецидивами; ! — при сравнении со значениями 15 мин

Таблица 2.1.2

**Уровень цитокинов в образцах экстраклеточной среды ЛПК
больных разными клиническими формами ВВК
при 15-минутной стимуляции клиническим изолятом *S. albicans* (M±m, пг/мл)**

Показатель	Группа сравнения (n = 36)	Острый ВВК (n = 10)	Хронический ВВК	
			с редкими рецидивами (n = 38)	с частыми рецидивами (n = 30)
	1	2	3	4
TNF-α	1,46 ± 0,192	6,12 ± 0,658 <i>P</i> ₂₋₁ < 0,001	3,23 ± 0,287 <i>P</i> ₃₋₁ < 0,001 <i>P</i> ₃₋₂ < 0,01	3,25 ± 0,403 <i>P</i> ₄₋₁ < 0,001 <i>P</i> ₄₋₂ < 0,01 <i>P</i> ₄₋₃ = 0,967
	<i>f</i> = 36 %	<i>f</i> = 0 % $\chi^2_{[1]} = 5,03$; <i>P</i> ₂₋₁ = 0,025	<i>f</i> = 5 % $\chi^2_{[1]} = 10,89$; <i>P</i> ₃₋₁ < 0,001	<i>f</i> = 10 % $\chi^2_{[1]} = 6,08$; <i>P</i> ₄₋₁ = 0,014
IL-8	55,6 ± 10,16	85,9 ± 34,35 <i>P</i> ₂₋₁ = 0,431	56,6 ± 8,46 <i>P</i> ₃₋₁ = 0,939 <i>P</i> ₃₋₂ = 0,442	51,5 ± 11,17 <i>P</i> ₄₋₁ = 0,788 <i>P</i> ₄₋₂ = 0,378 <i>P</i> ₄₋₃ = 0,718
IFN-γ	27,3 ± 2,11	243,8 ± 31,18 <i>P</i> ₂₋₁ < 0,001	76,9 ± 17,80 <i>P</i> ₃₋₁ < 0,01 <i>P</i> ₃₋₂ < 0,001	93,9 ± 21,98 <i>P</i> ₄₋₁ < 0,01 <i>P</i> ₄₋₂ < 0,001 <i>P</i> ₄₋₃ = 0,549
IL-1Ra	100,0 ± 13,95	47,5 ± 10,78 <i>P</i> ₂₋₁ = 0,022	112,0 ± 13,71 <i>P</i> ₃₋₁ = 0,543 <i>P</i> ₃₋₂ < 0,01	80,6 ± 10,28 <i>P</i> ₄₋₁ = 0,266 <i>P</i> ₄₋₂ = 0,099 <i>P</i> ₄₋₃ = 0,072
	<i>f</i> = 3 %	<i>f</i> = 80 % $\chi^2_{[1]} = 29,66$; <i>P</i> ₂₋₁ < 0,001	<i>f</i> = 13 % $\chi^2_{[1]} = 2,67$; <i>P</i> ₃₋₁ = 0,103	<i>f</i> = 13 % $\chi^2_{[1]} = 2,60$; <i>P</i> ₄₋₁ = 0,107
			$\chi^2_{[1]} = 17,91$; <i>P</i> ₃₋₂ < 0,001	$\chi^2_{[1]} = 15,87$; <i>P</i> ₄₋₂ < 0,001

Примечание. *f* — доля образцов со следовым уровнем цитокина в экстраклеточной среде ЛПК; жирным шрифтом отмечены статистически значимые различия с показателями здоровых.

Микоцидный ответ ЛПК больных хроническим ВВК с редкими эпизодами рецидивов:

1) все показатели 15-минутной фагоцитарной реакции ЛПК, кроме индекса поглощения, значимо отличаются низкими значениями по сравнению с показателями групп сравнения (рис. 2.1.3);

2) выживаемость непоглощённых грибов *S. albicans* достоверно ниже контроля, но выше показателей больных хроническим часто рецидивирующим ВВК на 15-й минуте, и не изменяется во времени с 15-й по 60-ю минуту контакта (рис. 2.1.4);

3) уровни цитокинов TNF- α и IFN- γ достоверно ниже уровней больных острым ВВК, но выше контроля, а уровень IL-1Ra равен контролю, но достоверно выше уровня больных острым ВВК (табл. 2.1.2), т. е. по сравнению с больными острой формой ВВК наблюдается слабый провоспалительный цитокиновый потенциал экстраклеточной среды.

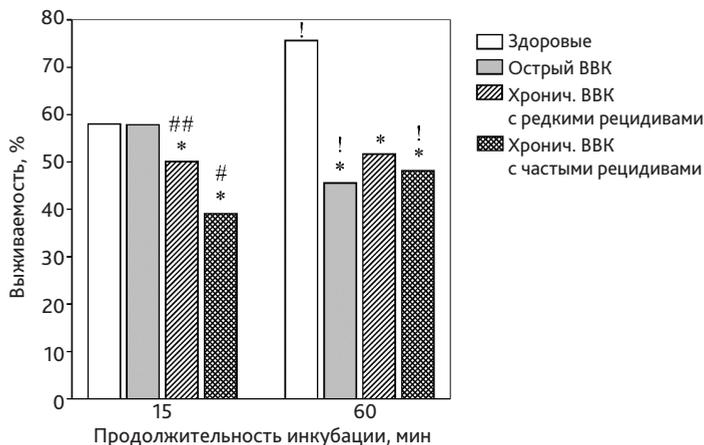


Рис. 2.1.4. Выживаемость непоглоченных фагоцитами грибов в среде культивирования ЛПК больных разными клиническими формами ВВК. Различия значимы ($P \leq 0,05$) при сравнении с группой: * Здоровые, # Острый ВВК, ## Хронич. ВВК с частыми рецидивами; ! при сравнении со значениями 15 мин

Микоцидный ответ ЛПК больных хроническим рецидивирующим ВВК с частыми эпизодами рецидивов характеризуется следующим:

1) достоверно высокий на 15-й минуте индекс поглощения по сравнению с аналогичными показателями групп сравнения больных (рис. 2.1.3) за счёт высокой поглотительной активности моноцитов наравне с нейтрофилами. Но обнаруживались различия в поглотительной способности моноцитов и нейтрофилов относительно здорового контроля — индекс поглощения грибов моноцитами был равен контролю, а индекс поглощения нейтрофилами статистически значимо ниже контроля (данные не приводятся);

2) выживаемость непоглочённых фагоцитами грибов достоверно ниже показателей групп сравнения на 15-й минуте, но к 60-й минуте контакта возрастает и становится равной показателям групп сравнения больных (рис. 2.1.4);

3) уровни TNF- α и IFN- γ достоверно выше контроля, равны уровням больных хроническим ВВК с редкими рецидивами, но ниже уровней больных острым ВВК, а уровень IL-1Ra равен контролю и достоверно выше уровня больных острым ВВК (табл. 2.1.2), т. е. по сравнению с больными острой формой ВВК наблюдается

слабовыраженный провоспалительный цитокиновый потенциал экстраклеточной среды.

Дрожжеподобные диморфные грибы *C. albicans* могут расти, размножаться и сосуществовать в виде комменсала на человеческом хозяине или внутри него в течение длительного времени, в гармонии с другими членами микробиоты. Дисбиотические процессы с изменением качественного и количественного состава микробиоты потенцируют патогенные свойства всех участников локального микробного сообщества, и они из комменсалов превращаются в активные патогены, инициирующие иммунные реакции хозяина.

Так, добавление дополнительного стимулирующего фактора в виде сопутствующей микст-инфекции (бактериальные ассоцианты в этиологически значимых титрах) при дебюте вагинального кандидоза сопровождается снижением провоспалительного цитокинового потенциала экстраклеточной среды ЛПК по сравнению с кандидозной моноинфекцией: значимо снижен уровень IFN- γ и повышен IL-1Ra (рис. 2.1.5, а). Напротив, наличие сопутствующих вагинальных бактериальных ассоциантов в этиологически значимых титрах при хроническом ВВК с редкими эпизодами рецидивов обнаруживает различия цитокинового профиля внеклеточной среды по сравнению с имеющими кандидозную моноинфекцию: значимо повышены уровни TNF- α , IFN- γ и снижен уровень IL-1Ra (рис. 2.1.5, б). Так же и при хроническом ВВК с частыми эпизодами рецидивов сопутствующая микст-инфекция обнаруживает различия цитокинового профиля внеклеточной среды — уровни TNF- α и IFN- γ в среде культивирования ЛПК имеют тенденцию к увеличению ($0,05 < P \leq 0,10$), а уровень IL-1Ra значимо ниже по сравнению с имеющими моноинфекцию (данные не представлены). Следовательно, присоединение сопутствующей бактериальной микст-инфекции у больных хроническим ВВК с редкими и частыми эпизодами рецидивов сопровождалось повышением провоспалительного цитокинового потенциала экстраклеточной среды ЛПК по сравнению с кандидозной моноинфекцией.

Таким образом, исходя из полученных данных, дебют инфекции (острая форма вульвовагинального кандидоза) характеризуется высоким провоспалительным цитокиновым потенциалом внеклеточной среды. Развитие острой воспалительной реакции у больных острой формой (дебют) ВВК, возможно, обусловлено встречей с большой дозой и/или вирулентным штаммом *Candida spp.* Каждый патоген характеризуется определённой степенью вирулентности или способностью вызывать заболевание у данного хозяина. Вирулентность представляет собой сложную функцию, которая имеет, по крайней мере, две компоненты.

С одной стороны, вирулентность может отражать способность патогена вызывать прямое повреждение ткани (за счёт выделения токсинов и других факторов патогенности, тканевого тропизма, высокой скорости роста возбудителя). С другой стороны, вирулентность определяется восприимчивостью (или толерантностью) хозяина к повреждению, которое может быть вызвано как самим патогеном, так

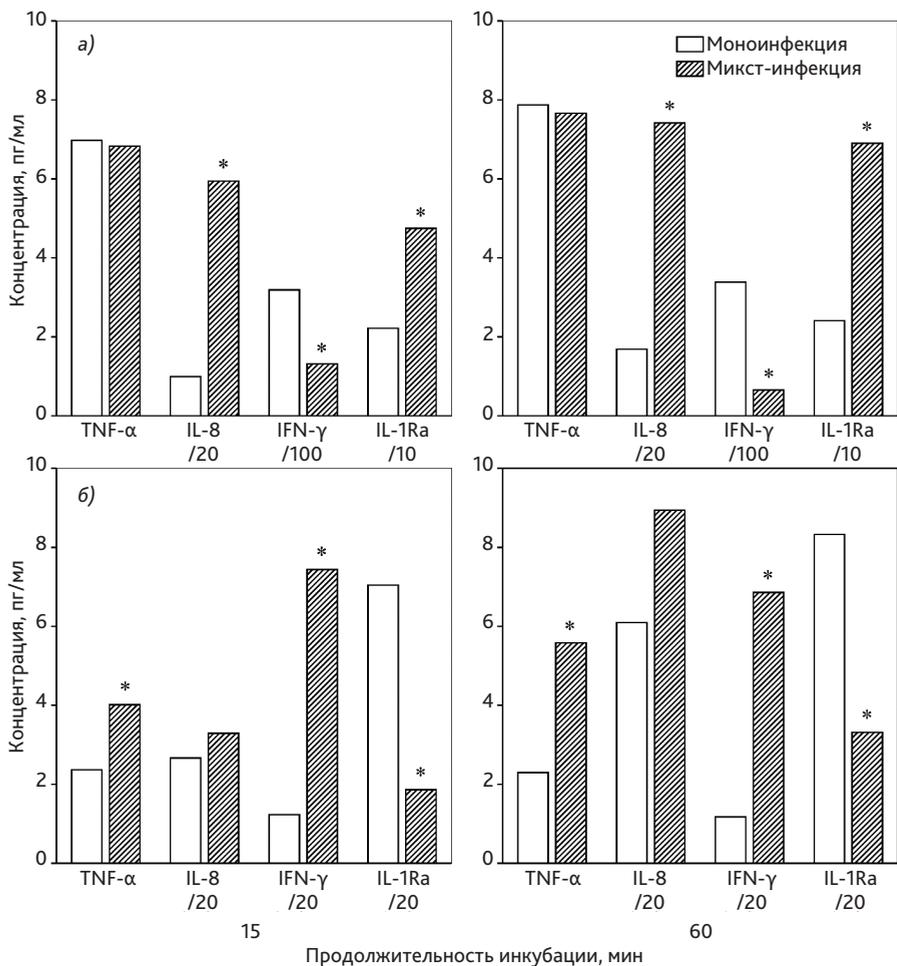


Рис. 2.1.5. Сравнение уровней цитокинов в супернатантах экстрацеллюлярной среды ЛПК при наличии кандидозной моноинфекции и сопутствующих бактериальных ассоциантах: а) острая форма ВБК, б) хронический ВБК с редкими рецидивами. * $P \leq 0,05$

и вызванным им иммунным ответом, следствием которого неизбежно становится иммунопатология. Поскольку вирулентность является функцией как патогена, так и хозяина, эволюция вирулентности может отражать изменения, которые являются специфичными для патогена либо специфичными для хозяина. Таким образом, патоген может стать более вирулентным у новых видов хозяина, и это, скорее всего, отражает разницу в толерантности хозяина, поскольку характеристики патогенных свойств остаются неизменными (Medzhitov et al., 2012).

Повторные эпизоды инфекции (хронические формы ВБК с редкими и частыми рецидивами) протекают на фоне слабо выраженного провоспалительного

цитокинового потенциала среды по сравнению с дебютом инфекции. Анализ полученных данных позволяет предположить, что для хронической формы ВВК с редкими рецидивами характерен невысокий потенциал общей микоцидной активности, включающей не только цитокины, но и микробицидные факторы, уровень которых во внеклеточной среде определяется активностью таких процессов, как дегрануляция нейтрофилов, эозинофилов и секреция моноцитов. О недостаточной активности этих клеток может свидетельствовать снижение всех показателей фагоцитарной реакции при наличии положительной динамики поглощения грибов. Такая инертность и низкая реактивность раннего воспалительного ответа клеток врождённого иммунитета, а также достаточно высокие концентрации противовоспалительного цитокина IL-1Ra (на одном уровне со здоровыми) в экстраклеточной среде, вероятно, обеспечивают персистенцию хронического воспалительного специфического ответа и поддерживают состояние равновесного паразитизма, что, возможно, сопровождается селекцией устойчивых штаммов грибов и/или сменой возбудителей на виды *Candida non-albicans*.

Исходя из полученных данных, для хронической формы ВВК с частыми рецидивами характерен слабовыраженный провоспалительный цитокиновый потенциал экстраклеточной среды по сравнению с острой формой ВВК. Особенностью немедленной эффекторной реакции ЛПК больных данной группы является ранняя агрессивность экстраклеточной среды (на 15-й минуте), о чем свидетельствует высокий индекс поглощения грибов *C. albicans* и низкая выживаемость непоглощённых грибов во внеклеточной среде в данный промежуток времени по сравнению с группами сравнения больных. Чрезмерно быстрая ответная реакция ЛПК, вероятно, не особенно продуктивна, так как нами показано, что к 60-й минуте выживаемость грибов повышается, а цитокиновый потенциал среды не изменяется и остаётся слабо провоспалительным. Развитие такой непродуктивной реакции обусловлено, возможно, низким порогом возбудимости полиморфно-ядерных гранулоцитов на антигены грибов рода *Candida*. Моноциты больных данной группы, поглощая бластоконидии *C. albicans* на одном уровне со здоровыми клетками, становятся, возможно, своего рода резервуаром для выживания и ускользания грибов от экстраклеточного киллинга. Защитная роль моноцитов/макрофагов при кандидозной инфекции противоречива. Макрофаги повреждают или непосредственно убивают *C. albicans*, используя комбинацию окислительных и неокислительных микробицидных механизмов, включая продукцию антимикробных пептидов и деградирующих ферментов, генерацию кислородных радикалов и синтазы оксида азота (iNOS), фагоцитоз и образование макрофагальных внеклеточных ловушек (NET). Во время фагоцитоза макрофаги легко глотают круглую дрожжевую форму *C. albicans*, а также относительно короткие гифальные нити. Однако грибковый патоген *C. albicans* разработал несколько стратегий

защиты, позволяющих сбежать из макрофага со значительным цитостатическим эффектом на иммунную клетку. Клетки *C. albicans* в состоянии произвести гифы в фаголизосоме дендритных клеток и макрофагов, позволяющие грибу в некоторых случаях убивать и выходить из этих фагоцитов. Некоторые макрофаги в состоянии противостоять напряжению удлинения гифальных нитей *C. albicans* без очевидной потери клеточной целостности. В других макрофагах, однако, формирование гифы *C. albicans* может спровоцировать, например, пироптоз — индуцирующий воспаление, провоспалительный запрограммированный путь смерти клеток, который приводит к лизису макрофагов и производству IL-1 β и IL-18, позволяя *C. albicans* ускользнуть из враждебной среды фагоцита. В начале фагоцитоза большая часть лизиса макрофагов опосредуется пироптозом, поздняя, вторая фаза убийства макрофагов, независима и отлична от пироптоза, инициируется *C. albicans* и зависит от надёжного образования гиф (Dühning et al., 2015). Последующее прорастание гиф и выход грибов *C. albicans* через клеточную мембрану моноцита/макрофага вызывают, даже в низкой дозе, очередное развитие воспалительной реакции со стороны нейтрофилов, находящихся в состоянии высокой реактивности. Такой дисбаланс иммунорегуляторных взаимоотношений между нейтрофилами и моноцитами, как мы можем предполагать, приводит к рецидивирующему характеру течения ВВК в данной группе больных.

Заключение

Гомеостаз между *C. albicans* и организмом хозяина удерживается врождённой иммунной системой человека и нормальной бактериальной флорой на поверхностях слизистой оболочки и эпителиальных слоях. Существует тонкий баланс между комменсальным и патогенным состоянием *C. albicans*. Однако изменения в среде хозяина могут превращать комменсальные факторы в атрибуты вирулентности, когда условия благоприятствуют патогенности. Как комменсал, так и вторгающийся патоген *C. albicans* сталкивается со стрессорами среды хозяина. Эти источники стресса включают изменения в доступности питательных веществ, рН-стресс, осмолярность, температуру и атаку клеток иммунной системы. Однако *C. albicans* способны к быстрому изменению экспрессии генов, регулирующих напряжение стрессовых путей, которые позволяют им быстро реагировать на изменения экологических стимулов (Dühning et al., 2015). *C. albicans* являются диплоидными полиморфными дрожжеподобными грибами, которые могут легко переключаться между дрожжевой, гифальной и псевдогифальной формой роста и обратно. Как дрожжевые, так и гифальные формы гриба необходимы для формирования полимикробной биоплёнки, проявления вирулентности, а также

выбора стратегии уклонения *C. albicans* от защитных механизмов иммунной системы. После вторжения в ткани хозяев *C. albicans* встречает раннюю линию защиты — врождённую иммунную систему. Эта линия защиты хозяина, в основном, полагается на действия гуморального компонента, антимикробные пептиды и клеточный ответ, опосредованный фагоцитами, особенно нейтрофилами и макрофагами (Dühring et al., 2015). Врождённая иммунная система поддерживает гомеостаз хозяина, распознавая и очищая модифицированные или повреждённые клетки хозяина, атакует и ограничивает рост инвазивных микробов без развития воспалительных реакций. Однако собственные атакующие механизмы хозяина, такие как окислительный стресс, реактивность нейтрофильных гранулоцитов, воспалительный потенциал среды, не должны превышать верхние пределы, иначе это, в свою очередь, может дать шанс *C. albicans* в его стратегии уклонения (Dühring et al., 2015).

2.2. Вариации микробной сигнатуры тонкого кишечника при психофизической адаптации людей пожилого возраста

Каждый стресс оставляет неизгладимый шрам, и организм платит за выживание после стрессовой ситуации, становясь немного старше.

Ганс Селье

Старение — это естественный мультифакторный феномен, характеризующийся накоплением дегенеративных нарушений, которые могут подорвать адаптационные возможности организма, вызвав изменения в эндокринной, вегетативной нервной и иммунной системах (Wagner et al., 2016). Такие изменения могут проявляться в виде биомаркёров, а именно, дисбаланса про/противовоспалительных цитокинов на локальном и системном уровнях и дисрегуляции нейрогормонов и нейротрансмиттеров, характеризующих гомеостаз гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (ГГА-оси) и симпато-адреналовой медуллярной системы (Skuse, Gallagher, 2008; Porges, 2007).

В последние годы рядом исследователей подчёркивается сходство между биологией старения и биологией стресса. Все живые организмы испытывают хронологическое старение, но скорость биологического старения принципиально «эластична» и модулируется генами, экологическим окружением (прежде всего — стрессовыми воздействиями) и их взаимодействием (Epel, Lithgow, 2014). Известно, что острый кратковременный стресс может усилить клеточные реакции, что в конечном итоге может способствовать долголетию. Напротив, длительный хронический стресс приводит к устойчивому повышению уровня глюкокортикоидов в циркуляции, что может представлять серьёзный риск для здоровья, включая гипертонию и атрофию гиппокампа. Потеря объёма гиппокампа, хорошо документированная при нормальном и патологическом старении, приводит, в свою очередь, к нарушениям в функционировании ГГА-оси, что может стать причиной возраст-ассоциированных заболеваний, включая тревогу, депрессию и когнитивные нарушения (Gupta, Morley, 2014).

В настоящее время человек рассматривается как «метаорганизм» в результате тесных симбиотических отношений с кишечной микробиотой. Это позволяет более целостно взглянуть на процесс старения, в котором необходимо учитывать динамику взаимодействия между окружающей средой, кишечной микробиотой и организмом человека (прежде всего, нейроэндокринной и иммунной системами). Связанные с возрастом физиологические изменения в ЖКТ, а также изменение образа жизни, пищевого поведения и функциональности иммунной системы хозяина неизбежно влияют на экосистему кишечной микробиоты (Biagi et al., 2012). С другой стороны, кишечная микробиота способна влиять практически на все функции организма, в том числе выступать в качестве модулятора пластичности мозга, его когнитивных функций и в целом поведения персоны в ходе старения (Leung, Thuret, 2015).

В свете сказанного нами была проведена оценка вариаций микробной сигнатуры тонкого кишечника у людей пожилого возраста с разным уровнем психофизической адаптации.

В исследование было включено 42 чел. пожилого возраста, проживающих в Челябинском геронтологическом центре. Средний возраст обследованных составил 79 ± 5 лет. Всем пожилым людям врачами-клиницистами центра был проведён мониторинг когнитивных нарушений с использованием шкалы «Mini Mental State Examination» и классификацией стадий дисциркуляторной энцефалопатии по Н. Н. Яхно с соавт. (2005), а также физического состояния с помощью индекса Бартел (Barthel Index of Activities of Daily Living, 1993). По результатам оценки психофизического статуса все обследованные были разделены на две группы: 20 чел. с высоким уровнем психофизической адаптации (умеренными когнитивными расстройствами и незначительными физическими нарушениями) — группа «Активное долголетие» и 22 чел. с выраженной психофизической дезадапта-

цией, преимущественно проявляющейся сосудистой деменцией и физической несостоятельностью — группа «Милосердие». Пожилые люди обеих групп имели одинаковые возраст-ассоциированные заболевания: кардиоваскулярные, бронхо-лёгочные, заболевания ЖКТ и опорно-двигательного аппарата. Из исследования были исключены индивидуумы с ожирением, онкологическими заболеваниями, болезнью Паркинсона и Альцгеймера, врождёнными нарушениями центральной нервной системы. Группу сравнения составили случайным образом отобранные 19 штатных доноров крови Челябинской областной станции переливания крови — группа «Доноры». Средний возраст — 39 ± 4 года. Исследование было одобрено этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016).

Для изучения сигнатуры (структуры и количественного состава) микробного сообщества тонкого кишечника определяли специфические химические маркёры микроорганизмов (жирные кислоты, альдегиды, спирты и стерины) непосредственно в периферической крови с помощью метода газовой хроматографии — масс-спектрометрии микробных маркеров (ГХ–МСММ) (Osipov et al., 2009). Согласно современным представлениям, значительная часть метаболитов, циркулирующих в крови млекопитающих, является метаболитами микробного сообщества кишечника (Holzer, Farzi, 2014). Метод детектирования микроорганизмов по маркерным жирным кислотам сходен с генетическим анализом, поскольку состав жирных кислот детерминирован в ДНК. Это обстоятельство определяет возможность родового или видового анализа инфекций и дисбиозов на преобладающем фоне биологической жидкости непосредственно в клиническом материале (Larsson, 1994). В Российской Федерации метод ГХ–МСММ имеет разрешение к применению в качестве медицинской технологии (Разрешение ФС 2010/038 от 24.02.2010). Он был успешно применён для выявления этиологического агента при септических осложнениях после хирургических операций, при пиелонефритах и вагинитах, атопическом дерматите и синдроме раздражённого кишечника (Федосова и др., 2010; Осипов, Родионов, 2013). Нами данный метод был использован ранее для определения микробного социума ротовой полости у здоровых детей (Бурмистрова и др., 2018).

Материалом для исследования служили образцы цельной крови с K_3 -ЭДТА доноров и пожилых людей. Отбор проб и расчёт результатов проводили, как описано Г. А. Осиповым (Osipov et al., 2009): 40 микролитров крови высушивали при добавлении равного по объёму количества метанола и подвергали кислому метанолизу в 1М HCl в метаноле в течение 1 ч при 80 °C. На этой стадии происходило освобождение жирных кислот и альдегидов из сложных липидов микроорганизмов и других клеток и жидкостей в виде метиловых эфиров и диметилацеталей. Эти компоненты двукратно экстрагировали 200 мкл гексана, высушивали и обрабатывали в течение 15 мин при 80 °C 20 мкл N, O-бис (триметилсилил)-трифторацетамидом для получения триметилсилильных эфиров окси-кислот и стиролов.

Полученную смесь эфиров вводили в инжектор газового хроматографа Маэстро GX 7820 (ООО «Интерлаб», Россия) с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 (США). Образец был хроматографически разделён на капиллярной колонке HP-5ms Hewlett-Packard. Условия хроматографического разделения: начальная температура — 130 °С, выдержка при начальной температуре — 0,5 мин, нагрев — со скоростью 70 °С/мин до 320 °С, выдержка при конечной температуре — 6 мин; режим селективных ионов; газ-носитель — гелий, поток — 1,2 мл/мин в режиме без деления потока. В результате проведённых исследований получали хроматограммы жирных кислот и других продуктов жизнедеятельности микробных сообществ тонкого кишечника, которые были соотнесены с соответствующим типом и количеством микроорганизмов с помощью программы, разработанной для GX–МСММ. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты. Чувствительность метода составляет 10⁴ КОЕ/мл. Основные роды/виды микроорганизмов, включённые в исследование, представлены в табл. 2.2.1.

Таблица 2.2.1

**Основные таксоны микроорганизмов,
идентифицируемые с помощью метода GX–МСММ**

Филотип <i>Firmicutes</i>	Филотип <i>Actinobacteria</i>	Филотип <i>Fusobacteria</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Actinomyces spp.</i>	<i>Fusobacterium spp.</i>
<i>Blautia coccoides</i>	<i>Actinomyces viscosus</i>	
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	Филотип <i>Bacteroidetes</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Clostridium propionicum</i>	<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Porphyromonas spp.</i>
<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Mycobacterium spp.</i>	<i>Prevotella spp.</i>
<i>Clostridium spp.</i> (эпунна <i>C. tetani</i>)	<i>Nocardia spp.</i>	
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	Филотип <i>Proteobacteria</i>
<i>Eubacterium spp.</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Alcaligenes spp.</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>Campylobacter mucosalis</i>
<i>Ruminococcus spp.</i>	<i>Propionibacterium jensenii</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudonocardia spp.</i>	<i>Kingella spp.</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Rhodococcus spp.</i>	<i>Moraxella spp.</i>
<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Streptomyces spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus mutans</i>		

В ходе статистического анализа данных использовали порядковые статистики и критерии: для оценки центральной тенденции — расчёт медиан и 25–75 процентилей, для оценки значимости межгрупповых различий — критерий Манна — Уитни. Для обнаружения структуры микробного сообщества вычисляли парные коэффициенты корреляции τ Кендалла. Различия считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$. Расчёты выполнены в пакете KyPlot (version 5.0.3 (Yoshioka, 2002)).

2.2.1. Видовое разнообразие микробиоты тонкого кишечника у пожилых людей с разной степенью психофизической адаптации

Изучение количественного состава (разнообразия) микробиоты тонкого кишечника на основе определения специфических липидных маркеров микроорганизмов в периферической крови показало, что в тонком кишечнике молодых людей группы «Доноры» преобладали бактерии фило типа *Firmicutes*, а именно кластеры клостридий и группа *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*, а также микроорганизмы фило типа *Actinobacteria*, 2/3 из которых составлял род *Bifidobacterium*. Представители фило типов *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Fusobacteria* были представлены менее чем 1 % всех определённых нами микроорганизмов (рис. 2.2.1).

Для пожилых людей был характерен дефицит общего числа изученных микроорганизмов в тонком кишечнике по сравнению с аналогичным показателем молодых индивидуумов, достигая статистической значимости для группы людей с выраженной психофизической дезадаптацией ($2,75 \times 10^9$ КОЕ/мл, $2,33 \times 10^9$ КОЕ/мл, $2,30 \times 10^9$ КОЕ/мл для групп «Доноры», «Активное долголетие», «Милосердие» соответственно). Данный дефицит был обусловлен снижением количества микроорганизмов рода *Bifidobacterium* (фило тип *Actinobacteria*), и клостридий I, XI и XIVa кластеров (фило тип *Firmicutes*) (см. рис. 2.2.1). Несмотря на общее снижение числа бактерий в тонком кишечнике, количество микроорганизмов фило типов *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* и *Proteobacteria* наоборот, было повышено у пожилых людей, по сравнению с аналогичными показателями молодых доноров, достигая статистической значимости в группе «Активное долголетие» (см. рис. 2.2.1).

Микробная сигнатура тонкого кишечника пожилых людей с разным уровнем психофизической адаптации отличалась изменениями только в количестве бактерий фило типа *Fusobacteria*, которое было значимо снижено у индивидуумов с выраженной когнитивной и физической дезадаптацией (группа «Милосердие», см. рис. 2.2.1).

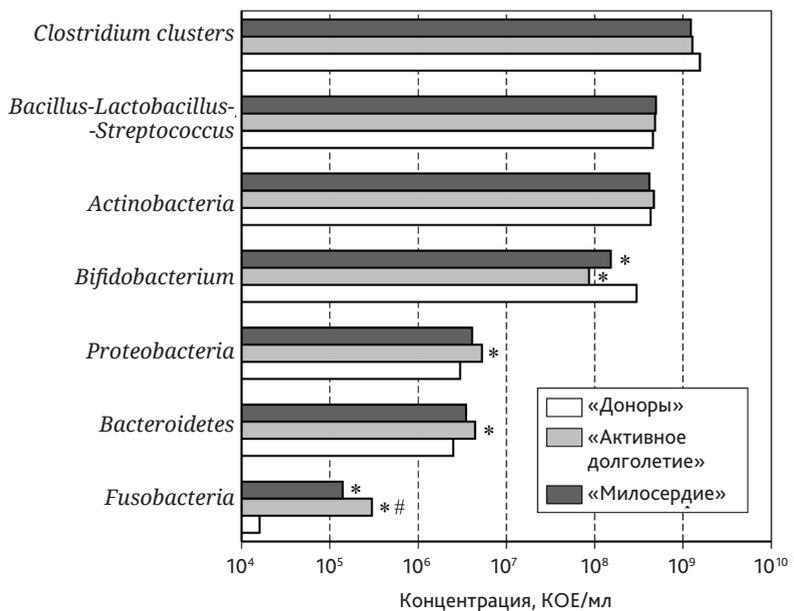


Рис. 2.2.1. Количественный состав микробного сообщества тонкого кишечника молодых и пожилых людей с разным уровнем психофизической дезадаптации. Различия статистически значимы ($P \leq 0,05$): * — между группами доноров и людей пожилого возраста; # — между группами пожилых людей групп «Активное долголетие» и «Милосердие»

Таким образом, анализ разнообразия микробного сообщества с помощью метода ГХ — МСММ показал, что преобладающими микроорганизмами тонкого кишечника, независимо от возраста, являлись бактерии фило типа *Firmicutes*, представленные в основном кластерами *Clostridium* и *Streptococcus spp.*, что согласуется с данными ряда авторов (Boijink et al., 2007; El Aidy et al., 2015; Zoetendal et al., 2012). С возрастом в тонкой кишке, как и в толстом кишечнике (Saraswati, Sitaraman, 2014; Hollister et al., 2014), меняется соотношение представителей фило типов *Bacteroidetes/Firmicutes* в сторону увеличения числа бактерий фило типа *Bacteroidetes* и значимо уменьшается число основных представителей пробиотических штаммов — микроорганизмов рода *Bifidobacterium*. Снижение количества микроорганизмов крупных таксонов в тонком кишечнике пожилых людей может косвенно свидетельствовать об увеличении числа представителей мелких таксонов бактерий (т. е. микробного разнообразия). Согласно данным Катарини Койт с соавт. (Coyte et al., 2015), высокое видовое разнообразие приводит к нестабильности микробной экосистемы. Такая неустойчивость микробного сообщества тонкого кишечника, в свою очередь, может находить отражение в изменении его структуры у людей пожилого возраста.

2.2.2. Структура сообщества микробиоты тонкого кишечника у пожилых людей с разным уровнем психофизической адаптации

В табл. 2.2.2 и на рис. 2.2.2 отражена структура корреляционных связей внутри сообщества микроорганизмов тонкого кишечника у молодых индивидуумов и у пожилых людей с наличием/отсутствием психофизической адаптации. В каждой из исследуемых групп обнаружена своя уникальная композиция микробиоты. В группе доноров наибольшее количество значимых корреляционных связей было характерно для бактерий кластеров *Clostridium*, которые имели три отрицательные корреляции с микроорганизмами флотипов *Bacteroidetes* (представленным родом *Prevotella*), *Proteobacteria* и *Fusobacteria*. Флотип *Fusobacteria*, в свою очередь, образовывал три положительные корреляции с бактериями флотипа *Proteobacteria*, *Prevotella spp.* и *Bifidobacterium spp.* Группа *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* не была вовлечена в корреляционные взаимодействия с другими микроорганизмами (табл. 2.2.2, рис. 2.2.2, а).

Таблица 2.2.2

Структура парных корреляционных связей в сообществе бактерий тонкого кишечника у пожилых людей с разным уровнем психофизической адаптации. Коэффициент корреляции τ Кендалла; оценка статистической значимости P

Пары таксонов	«Доноры» ($n = 19$)		«Активное долголетие» ($n = 20$)		«Милосердие» ($n = 24$)	
	τ	P	τ	P	τ	P
<i>Bacteroidetes & Clostridium clusters</i>	-0,401	0,016	0,405	<0,001	-0,284	0,071
<i>Bacteroidetes & Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i>	-0,012	0,944	0,463	<0,001	-0,014	0,927
<i>Bacteroidetes & Bifidobacterium spp.</i>	0,165	0,323	-0,055	0,620	-0,309	0,050
<i>Bacteroidetes & Actinobacteria</i>	-0,071	0,672	0,443	<0,001	0,352	0,026
<i>Bacteroidetes & Proteobacteria</i>	0,244	0,144	0,584	<0,001	0,491	0,002
<i>Bacteroidetes & Fusobacterium</i>	0,367	0,028	0,531	<0,001	0,262	0,097
<i>Clostridium clusters & Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i>	0,216	0,196	0,563	<0,001	0,190	0,227
<i>Clostridium clusters & Bifidobacterium spp.</i>	-0,310	0,064	0,140	0,208	-0,062	0,694
<i>Clostridium clusters & Actinobacteria</i>	0,111	0,506	0,695	<0,001	-0,238	0,131
<i>Clostridium clusters & Proteobacteria</i>	-0,472	0,005	0,596	<0,001	-0,173	0,272
<i>Clostridium clusters & Fusobacterium</i>	-0,353	0,035	0,635	<0,001	-0,140	0,374

Окончание табл. 2.2.2

Пары таксонов	«Доноры» (n = 19)		«Активное долголетие» (n = 20)		«Милосердие» (n = 24)	
	τ	<i>P</i>	τ	<i>P</i>	τ	<i>P</i>
<i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> & <i>Bifidobacterium spp.</i>	-0,018	0,916	-0,003	0,981	-0,453	0,004
<i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> & <i>Actinobacteria</i>	0,240	0,151	0,560	<0,001	0,076	0,629
<i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> & <i>Proteobacteria</i>	-0,012	0,944	0,536	<0,001	0,250	0,113
<i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> & <i>Fusobacterium</i>	0,177	0,291	0,552	<0,001	-0,065	0,682
<i>Bifidobacterium spp.</i> & <i>Actinobacteria</i>	-0,029	0,861	0,186	0,095	-0,110	0,486
<i>Bifidobacterium spp.</i> & <i>Proteobacteria</i>	0,260	0,120	0,138	0,217	-0,361	0,022
<i>Bifidobacterium spp.</i> & <i>Fusobacterium</i>	0,397	0,017	0,198	0,075	-0,329	0,037
<i>Actinobacteria</i> & <i>Proteobacteria</i>	0,071	0,672	0,640	<0,001	0,269	0,088
<i>Actinobacteria</i> & <i>Fusobacterium</i>	-0,088	0,597	0,654	<0,001	-0,032	0,838
<i>Proteobacteria</i> & <i>Fusobacterium</i>	0,423	0,011	0,568	<0,001	-0,005	0,972

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые ($P \leq 0,05$) коэффициенты корреляции.

У людей пожилого возраста с высоким уровнем психофизической адаптации («Активное долголетие») микроорганизмы всех пяти основных флотипов тонкого кишечника образовывали значимые положительные корреляционные связи друг с другом. Из общей корреляционной структуры был полностью исключён только род *Bifidobacterium* (табл. 2.2.2, рис. 2.2.2, б).

Основными бактериями тонкого кишечника, образующими статистически значимые корреляции у пожилых людей с выраженной психофизической дезадаптацией (группа «Милосердие»), были *Bifidobacterium spp.*, которые имели четыре отрицательные ассоциации со всеми флотипами микроорганизмов, кроме флотипа *Actinobacteria*. Кроме того, две значимые положительные связи были выявлены у бактерий флотипа *Bacteroidetes* с микроорганизмами флотипов *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Сообщество микроорганизмов тонкого кишечника пожилых людей группы «Милосердие» характеризовалось полным исключением из корреляционной структуры кластеров *Clostridium* (см. табл. 2.2.2, рис. 2.2.2, в).

Полученные нами результаты показывают, что структура сообщества микроорганизмов тонкого кишечника молодых индивидуумов (основанная на оценке парных коэффициентов корреляции) обладает высокой стабильностью. Эта стабильность обеспечивается небольшим числом (6 из 21) слабых взаимодействий между микроорганизмами разных флотипов, с преобладанием конкурентных отношений (три отрицательные связи) над их кооперацией, что позволяет ор-

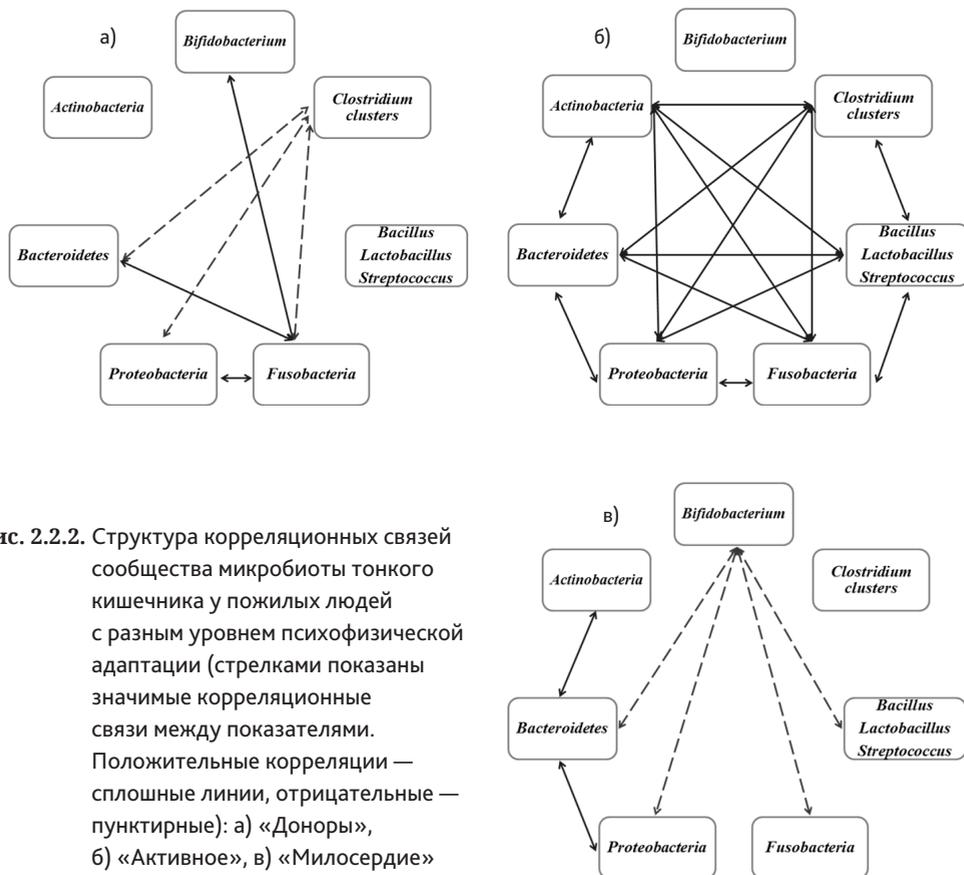


Рис. 2.2.2. Структура корреляционных связей сообщества микробиоты тонкого кишечника у пожилых людей с разным уровнем психофизической адаптации (стрелками показаны значимые корреляционные связи между показателями. Положительные корреляции — сплошные линии, отрицательные — пунктирные): а) «Доноры», б) «Активное», в) «Милосердие»

ганизму человека посредством иммунной системы осуществлять контроль над численностью бактерий. Такая стабильность микробного сообщества считается определяющей для здоровья и благополучия организма человека, поскольку она обеспечивает поддержание численности полезных симбионтов и выполняемых ими функций в течение длительного времени (Coyle et al., 2015).

У пожилых людей, наряду с изменением численности микроорганизмов, нами обнаружена существенная перестройка корреляционных связей в структуре сообщества тонкого кишечника. Для индивидуумов группы «Активное долголетие» характерна максимальная степень кооперации между основными членами микробного сообщества тонкого кишечника (15 из 21 положительных корреляционных взаимодействий средней силы), что приводит к неустойчивости (разупорядоченности) системы. Это может быть связано с ослаблением регуляторных функций организма хозяина, прежде всего, с нейроэндокринными изменениями (хронический стресс) (Gupta, Morley, 2014), иммунными нарушениями (наличие хронического низкоградуированного воспаления) (Franceschi, Campisi, 2014)

и изменением диеты (ухудшение количества и качества пищи, а, следовательно, и питательных веществ, предоставляемых симбионтам) (Coyle et al., 2015). Однако такое расширение сотрудничества внутри сообщества бактерий приводит к повышению метаболической эффективности работы микроорганизмов, и, как мы полагаем, может служить одним из механизмов адаптации к изменениям, происходящим в экологической нише — организме человека, в процессе старения. Такие изменения, наряду с поддержанием относительного баланса нейроэндокринной и иммунной систем (Филиппова, Бурмистрова, 2017), позволяют пожилым людям группы «Активное долголетие» поддерживать высокий уровень психофизической адаптации к условиям окружения.

Структура микробного сообщества тонкого кишечника у людей пожилого возраста со значительными нарушениями в психофизической адаптации (группа «Милосердие»), в отличие от таковой у индивидуумов группы «Активное долголетие», несмотря на высокое видовое разнообразие, обнаруживает большую степень устойчивости. Как и сообщество микроорганизмов группы молодых доноров, она характеризуется небольшим числом (6 из 21) слабых взаимодействий между бактериями разных фило типов, с преобладанием конкурентных отношений (четыре отрицательные связи) над их кооперацией, тем не менее основу взаимодействий составляют отрицательные связи рода *Bifidobacterium*. Такая перестройка сообщества: резкое снижение числа и усиление конкурентных отношений *Bifidobacterium spp.*, которые являются основными пробиотиками и играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза тонкого кишечника, вырабатывая вещества, обладающие противомикробной и противовоспалительной активностью (Бухарин и др., 2014; Rai, Vai, 2015), может быть связана со снижением толерантности организма к патогенам и выступать в качестве маркера психофизической дезадаптации у людей пожилого возраста.

Таким образом, сигнатура микробного сообщества тонкого кишечника характеризуется изменениями как количества и видового состава микробиоты, так и ее структуры, и наряду с нарушениями работы иммунной и нейроэндокринной систем может отражать состояние психофизической дезадаптации у пожилых людей.

2.3. Микробные паттерны тонкого кишечника детей с расстройствами аутистического спектра в контексте наличия или отсутствия социальной адаптации

Природа отвечает «нет» на большинство задаваемых ей вопросов и лишь изредка от неё можно услышать более обнадеживающее «может быть».

А. Эйнштейн

С позиции современной биологии организм человека является интегральной композицией множества клеток и генов, метаболических образов и информационных сигнальных сетей различных форм жизни — макроскопической (эукариотической) и микроскопической (прокариотической), шкала разнообразия которой чрезвычайно высока, и такая система носит название «метаорганизм». Оба партнёра живут сложной социальной жизнью, и для сохранения метаорганизма как целого необходима адаптация партнёров/баланс отношений на молекулярном, клеточном, физиологическом, поведенческом и психосоциальном уровнях. Изучение такой мультивидовой системы, как метаорганизм, таит много трудностей, так как взаимоотношения между хозяином и его микробным сообществом носят запутанный характер не только в вопросах выгоды/пользы микробного социума (представленного в кишечнике триллионами микробов) для хозяина (Бухарин и др., 2006; Ayres, Shneider, 2008), но и в связи с неоднородностью этого социума, так как он состоит из двух составляющих. Одна — человек-ассоциированный микробный социум (резиденты), незначительный по количеству, для которого характерна вертикальная (мать-плод) и горизонтальная (прямой контакт — поцелуй, груминг) трансмиссии. Другая составляющая — транзитные микробы представляют большую часть микробного сообщества, демонстрируют выраженное динамическое разнообразие, относятся к космополитам (успешно устраивающим свою жизнь вне хозяина) и используют горизонтальную трансмиссию (пища, вода, воздух и т. д.) (Mushegian, Ebert, 2016).

Исходя из результатов современных исследований, можно предположить наличие у резидентов и вертикальной трансмиссии — отправка месседжей генетических сигнатур через организм беременной матери к плоду, в плаценту, которая, как убеждает ряд доказательств, является «гаванью» уникального низкообогатённого микробиома (Aagaard et al., 2014). Не исключено, что такие послания

содержат программу заселения кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани комменсалами — *Alcaligenes spp.*, *Achromobacter spp.*, *Bordetella spp.*, *Ochrobactrum spp.*, которые не только модулируют иммунную систему хозяина, но и выступают индукторами тканевой толерантности (Füng et al., 2016).

Интерес к плаценте не случаен. Это уникальный орган, обеспечивающий обмен между матерью и плодом кислородом, питательными веществами, антителами, гормонами и являющийся источником иммуномодулирующих сигналов, контролирующих рабочие программы иммунной системы и физиологии матери в контексте вынашивания и защиты плода (Sood et al., 2006). Более того, недавно показано, что регуляцией физиологии и поведения матери занимается фетальный геном через плаценту, которая как эндокринный орган продуцирует гормоны, действующие на гипоталамус матери, включая ряд жизненно важных для плода программ: супрессии сексуального поведения, изменения пищевого поведения, подготовки мозга к обслуживанию ребёнка после его рождения, в т. ч. активации экспрессии генов, отвечающих за синтез окситоцина и его рецепторов (Broad, Keverne, 2011). Как оказалось, плацента и фетальный гипоталамус синхронизированы в своём развитии, что обусловлено эволюционными селективными процессами (Broad, Keverne, 2011). Более того, Bonnín с соавт. продемонстрировали новые материнско-плацентарно-фетальные взаимодействия, направленные на производство серотонина, регулирующего процесс нейроразвития (развитие фетального мозга) и влияющего на пролонгированное ментальное здоровье потомства. Суть процесса: организм матери поставляет прекурсор, а плацента метаболизирует его (Bonnín et al., 2011).

Так как жизнь любого живого существа протекает в условиях наличия/отсутствия стрессоров, то и организм беременной женщины не является исключением (чаще всего речь идёт об инфекциях и психосоциальных конфликтах). Действия стрессоров, прежде всего, нарушают фетальную толерантность, что приводит к мертворождению или преждевременным родам, следствием которых являются незрелые новорождённые с высоким риском больших и малых дефицитов, таких как церебральный паралич, замедленное развитие речи и когнитивных способностей, проявления моторных и визуальных отклонений, психосоциальных и поведенческих нарушений (Soleimani et al., 2014). Не исключено, что эти дефициты ассоциированы с дезорганизацией плацентарного микробиома, которая может привести к контрастированию регуляторных сетей (плода, матери и между ними), предназначенных для осуществления функций в контексте с резидентной микробиотой, в результате могут возникнуть нео-адаптивные сигнальные пути.

Реальность таких свершений, как нам представляется, велика, так как первые критические события для нормального развития мозга: нейруляция, кортикальный нейрогенез, нейрогенез гиппокампа, формирование астроцитов и старт глиогенеза проходят в «объятиях» плацентарного микробиома (Бурмистрова и др., 2018; Borre et al., 2014; Gilbert et al., 2012).

Некоторые исследователи заостряют внимание на изменениях гомеостаза беременной женщины, плода и новорождённого при воздействии на них психосоциальных стрессоров: у плода наблюдается подъем уровней стресс-гормонов (Sandman, 2012), в ранний постнатальный период — повышение метилирования гена глюкокортикоидного рецептора, которое ассоциируется с увеличением ответов гипоталамо-гипофизарно-адреналовой (ГТА) оси на неблагоприятные воздействия. Ряд авторов сообщает о наличии связи между изменением экспрессии мозг-выделенного нейротрофического фактора в префронтальном кортексе и экспозицией к негативным факторам в ранний постнатальный период (Roth et al., 2009). Таким образом, влияние матери на фетальное и раннее постнатальное нейроразвитие определяет успех адаптации детей к различным стрессорам в ходе последующей жизни (Sandman, 2012).

В последние годы к одной из патологий, вызывающих огромный интерес и озабоченность специалистов в области клинической психиатрии, иммунологии, микробиологии, физиологии мозга и т. д., относятся расстройства аутистического спектра (РАС). В соответствии с классической точкой зрения РАС относят к нарушениям пре- и постнатального нейроразвития, с набором характерных симптомов: снижение прямого зрительного контакта, экспрессии эмоций на лице и жестикуляции, замедлением развития речи (Lai et al., 2014; Baron-Cohen, Belmonte, 2005). Эти дефициты формируют основные клинические коровые домены: трудности социальной коммуникации, искажённые социальные взаимодействия, ограниченные и (или) повторяющиеся поведение и интересы (DiCicco-Bloom et al., 2006), которые коморбидны со множеством других заболеваний, среди которых нарушения со стороны ЖКТ, в т. ч. изменения структуры микробного сообщества кишечника, наблюдаются у 75–90 % детей (Mazefsky, 2014).

В результате для детей с РАС характерна гетерогенность клинической симптоматики, и прежде всего, из-за недостаточности симптомов в каждом домене, что, как подчёркивает Baron-Cohen (2017), позволяет думать о РАС как об обобщённом диагнозе, включающем детей с замедленной траекторией нейроразвития и лимитированной психосоциальной адаптацией, а также детей с функциональными нарушениями и заболеваниями центральной нервной системы.

Это не удивительно, так как этиология РАС сегодня далека от понимания, и среди предлагаемых теорий нарушений нейроразвития наиболее значимыми представляются следующие:

- 1) пренатальные события — тяжёлый стресс матери во время беременности, психосоциальный или инфекционной природы;
- 2) постнатальные воздействия неблагоприятных событий, особенно в течение первых двух лет жизни (в основном речь идёт о психосоциальном стрессе — депривации);
- 3) модификация эпигенетического кода генов иммунной и нервной системы плода, инициированная микробиотой матери, возможно, в ассоциации с микробиотой

плаценты, в оси взаимодействия «мать-плацента-плод» в пренатальном периоде, и/или в раннем постнатальном периоде — модификация эпигенетического кода иммунных генов, вовлечённых в иммунный импринтинг микробиотой и моноцитами матери (Eberl, 2018; Perez et al., 2007).

Таким образом, перед специалистами различных профилей стоит задача разработки диагностических критериев (с использованием современных технологий), позволяющих провести дискриминацию группового диагноза РАС в персонифицированный, что позволит структурировать и индивидуализировать подходы к коррекции состояния детей, входящих в группу РАС.

Цель исследования — оценить паттерны микробных сообществ тонкого кишечника детей с РАС в контексте наличия/отсутствия социальной адаптации.

Было обследовано 94 ребёнка в возрасте от 3 до 12 лет. Основную группу составили 55 детей с РАС (46 мальчиков и 9 девочек), поступивших на реабилитацию в социально-реабилитационный центр «Здоровье» в период с июня 2016 г. по январь 2018 г. На основании обследования врача-психиатра, данных клинического анамнеза и анкетирования родителей детям с РАС были поставлены следующие диагнозы по МКБ-10: F84.0 (детский аутизм), F84.1 (атипичный аутизм), F83.1 (задержка психо-речевого развития с аутистически подобным поведением). Все дети, участвующие в исследовании, в ходе фетальной/пренатальной жизни и в процессе рождения находились под большим или меньшим давлением факторов риска, способным оказывать негативное влияние на нейроразвитие: гипоксия — пренатальная или в процессе родов; инфекция беременной матери (инфекция/воспаление); хроническая плацентарная недостаточность; преждевременные срочные роды (незрелый плод). В основе деления детей с РАС на группы нами было положено наличие/отсутствие у них социальной адаптации, базовыми признаками которой считали: возможность установления и поддержания зрительного контакта, узнавание мамы, отклик на имя, выполнение просьб и инструкций взрослого, адаптация в новых условиях, интерес к сверстникам, а также наличие или отсутствие регресса — одномоментной или пролонгированной утраты уже приобретённых навыков в раннем детстве (возраст от 1 до 3 лет). В результате дети с РАС были разделены на три группы: 1) «С социальным контактом» — СК — дети, имеющие высокий уровень социальной адаптации ($n = 14$); 2) «Без социального контакта» — БСК — дети с нарушенным социальным поведением ($n = 15$); 3) «Регресс» — дети с регрессом ($n = 26$).

Группу сравнения составили 39 детей с типичным нейроразвитием (типично развивающиеся дети — ТРД, 31 мальчик и 8 девочек) соответствующего возраста. Обязательными условиями включения в исследование было заполнение информированного согласия родителями обследуемого. Работа была одобрена этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016).

Для изучения структуры и количественного состава микробиоты тонкого кишечника определяли специфические структурные биохимические маркёры микро-

организмов (жирные кислоты, альдегиды, спирты и стерины) в периферической крови с помощью метода газовой хроматографии масс-спектрометрии микробных маркеров (ГХ–МСММ), предложенного Г. А. Осиповым (2009). Данный метод имеет разрешение к применению на территории Российской Федерации в качестве медицинской технологии (Разрешение ФС 2010/038 от 24.02.2010). Представители микробного сообщества тонкого кишечника, детектируемые методом ГХ–МСММ, представлены в табл. 2.2.1 настоящей монографии.

В ходе статистического анализа полученных данных использованы методы описательной статистики, выборочных сравнений и многомерный анализ. Для показателей количественного состава микробиоты рассчитывали медианы и квартили, которые выражали в ед. $\times 10^5$ КОЕ/мл. Сравнения четырёх выборок проводили методом Краскела — Уоллиса, а апостериорные попарные сравнения — методом Данна. Для выявления особенностей микробного сообщества тонкого кишечника в группах детей использовали линейный канонический дискриминантный анализ (Факторный..., 1989), проведённый на рангах (Copover, Iman, 1981). Расчёты и графические построения выполнены в пакетах PAST (v. 3.20 (Hammer et al., 2001)) и KuPlot (v. 5.0.3 (Yoshioka, 2002)). Во всех случаях статистически значимыми считали эффекты при $P \leq 0,05$, незначимыми — при $P > 0,10$.

2.3.1. Количественный состав микробиоты тонкого кишечника у детей с РАС с наличием/отсутствием социальной адаптации

На первом этапе работы мы оценили количественные изменения видового состава микроорганизмов у детей с диагнозом РАС по сравнению с ТРД.

Показано, что у ТРД и детей с РАС (группы СК, «Регресс» и БСК) в составе микробного сообщества тонкого кишечника присутствовали 34 представителя основных филоотипов бактерий (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*), грибов (*Ascomycota*) и вирусы семейства *Herpesviridae*, детектируемые с помощью метода ГХ–МСММ (табл. 2.3.1).

Основу видового разнообразия для всех групп детей, независимо от состояния здоровья/нарушения (РАС), составляли представители филоотипов *Firmicutes* и *Actinobacteria*, которые доминировали над всеми остальными исследуемыми филоотипами. Однако 11 показателей, характеризующих все изученные филоотипы тонкого кишечника, кроме *Fusobacteria*, имели статистически значимые различия между детьми группы ТРД и одной (СК или «Регресс») или несколькими (СК/БСК/«Регресс») группами детей с диагнозом РАС (см. табл. 2.3.1). Наиболее существенные

Таблица 2.3.1

**Количественный состав микробиоты тонкого кишечника
типично развивающихся детей и детей с РАС. Медиана (квартили),
ед.×10⁵ КОЕ/мл**

Микроорганизм	ТРД (n = 39)	Дети с РАС		
		СК (n = 14)	«Регресс» (n = 26)	БСК (n = 15)
Филотип <i>Firmicutes</i>				
<i>Eubacterium spp.</i>	9019 (8074–10664)	7481 (5870–8363)*	7875 (6444–9098)*	8906 (5858–10241)
<i>Clostridium</i> (<i>zppynna tetani</i>)	209 (164–416)	218 (136–285)	273 (180–337)	219 (116–492)
<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	6 (5–7)	5 (4–6)*	5 (5–6)*	5 (4–6)*
<i>Clostridium</i> <i>ramosum</i>	1544 (1233–2026)	1590 (1499–2320)	2029 (1336–2538)*	2103 (1634–2565)*
<i>Ruminococcus spp.</i>	222 (155–302)	450 (302–670)*	411 (293–496)*	322 (188–566)*
<i>Lactobacillus spp.</i>	2790 (2388–3243)	2598 (2069–2844)	2930 (2294–3507)	2713 (2412–3123)
<i>Streptococcus spp.</i>	11 (7–15)	12 (10–20)	12 (7–19)	15 (8–25)
<i>Streptococcus mutans</i>	225 (195–261)	224 (215–268)	259 (190–280)	266 (185–302)
<i>Enterococcus spp.</i>	42 (34–54)	43 (36–51)	47 (35–53)	41 (35–55)
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	272 (207–329)	319 (261–426)*	377 (249–407)*	277 (208–468)
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	1 (0–4)	1 (0–1)	1 (0–1)	1 (0–4)
Филотип <i>Bacteroidetes</i>				
<i>Prevotella spp.</i>	23 (21–25)	20* (17–23)	23* (21–25)	21 (19–26)
Филотип <i>Actinobacteria</i>				
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2940 (2294–3657)	2842 (2093–3624)	3446 (2375–3965)	3161 (2574–3604)
<i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i>	1028 (796–1414)	1189 (976–1529)	1213 (1004–1699)	1021 (575–1684)
<i>Propionibacterium</i> <i>jensenii</i>	25 (0–61)	40 (0–65)	5 (0–47)	0 (0–45)
<i>Propionibacterium</i> <i>acnes</i>	56 (28–71)	49 (32–61)	44 (21–59)	44 (22–65)
<i>Actinomyces viscosus</i>	497 (441–561)	492 (435–570)	569 (488–658)*#	531 (490–610)
<i>Rhodococcus spp.</i>	20 (17–23)	19 (14–23)	27 (22–34)*#	22 (14–26)§
<i>Nocardia spp.</i>	202 (117–314)	197 (122–342)	244 (130–389)	227 (126–331)

Окончание табл. 2.3.1

Микроорганизм	ТРД (n = 39)	Дети с РАС		
		СК (n = 14)	«Регресс» (n = 26)	БСК (n = 15)
<i>Nocardia asteroides</i>	214 (180–270)	178 (144–223)	182 (131–293)	223 (130–276)
<i>Pseudonocardia spp.</i>	2 (2–2)	2 (1–2)	2 (2–3)	2 (1–3)
<i>Corynebacterium spp.</i>	8 (0–25)	9 (0–75)	7 (0–39)	0 (0–48)
<i>Eggerthella lenta</i>	208 (161–257)	258 (210–287)	221 (183–308)	194 (143–272)
<i>Streptomyces spp.</i>	68 (37–108)	70 (44–151)	74,5 (34–140)	65 (46–135)
Филотип <i>Proteobacteria</i>				
<i>Kingella spp.</i>	19 (13–28)	25 (19–44)*	26 (20–36)*	24 (20–42)*
<i>Moraxella spp.</i>	3 (2–3)	3 (2–5)	3 (2–5)	3 (3–5)
<i>Alcaligenes spp.</i>	10 (9–11)	10 (9–11)	10 (9–11)	10 (9–11)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (1–1)	1 (1–1)	1 (1–1)	1 (1–1)
Филотип <i>Fusobacteria</i>				
<i>Fusobacterium spp.</i>	2 (2–2)	2 (1–2)	2 (2–3)	2 (1–3)
Филотип <i>Ascomycota</i>				
<i>Candida spp.</i>	156 (93–199)	200 (139–247)	191 (136–246)	171 (128–261)
<i>Aspergillus spp.</i>	42 (35–49)	32 (25–35)*	33 (26–37)*	33 (28–44)*
<i>Herpesviridae</i>				
<i>Herpes spp. (Simplexvirus)</i>	177 (163–200)	178 (163–232)	199 (161–286)	190 (161–234)
Цитомегаловирус (ЦМВ)	16 (14–19)	19 (16–22)	22 (17–29)*	19 (16–34)*
Вирус Эпштейна — Барр (ВЭБ)	8 (6–10)	10 (8–35)	8 (6–13)	12 (10–14)

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые ($P < 0,05$) различия в апостериорных сравнениях методом Данна между: * — ТРД и группами РАС; # — СК и «Регресс», СК и БСК; \$ — «Регресс» и БСК.

изменения количественного состава микроорганизмов тонкого кишечника у детей с РАС по сравнению с ТРД наблюдались в кластерах кластридий (филотип *Firmicutes*): значительно снижалось количество бактерий рода *Eubacterium* (кластеры IV/XIVa/XVI) и вида *C. perfringens* (кластер I) и повышалось число микроорганизмов рода

Ruminococcus (кластер XIVa) и вида *C. ramosum* (кластер XVIII). Кроме того, среди представителей *Firmicutes* в группах детей с РАС — СК и «Регресс» было повышено количество микроорганизмов вида *S. aureus* по сравнению с аналогичным показателем группы ТРД (см. табл. 2.3.1).

На фоне перестройки видового состава фило типа *Firmicutes* у детей с РАС с наличием социальной адаптации (СК) снижалось количество микроорганизмов фило типа *Bacteroidetes*, представленного *Prevotella spp.*, по сравнению с ТРД (см. табл. 2.3.1).

Изменения количественного состава фило типа *Actinobacteria* были незначительными и характеризовались существенным увеличением числа микроорганизмов рода *Rhodococcus* и вида *Actinomyces viscosus* в группе детей «Регресс» по сравнению с ТРД. Кроме того, у детей с РАС, независимо от социальной адаптации, в тонком кишечнике были значимо повышены представители *Kingella spp.* (фило тип *Proteobacteria*) и снижено число грибов *Aspergillus spp.* Среди вирусов в группах «Регресс» и БСК был повышен уровень цитомегаловируса (ЦМВ) по сравнению с аналогичным показателем ТРД (см. табл. 2.3.1).

При сравнении видового состава микроорганизмов тонкого кишечника между группами детей с диагнозом РАС различия обнаружены только для трёх родов/видов бактерий: *Prevotella*, *Actinomyces viscosus*, которые были повышены в группе «Регресс» по сравнению с группой СК и *Rhodococcus*, повышенного у детей с регрессом по сравнению с остальными группами детей с РАС (табл. 2.3.1).

Таким образом, количественный состав сообщества микроорганизмов тонкого кишечника у детей с РАС показывал существенные вариации по сравнению с таковым у ТРД, но практически не отличался в группах детей с РАС с наличием (СК) и отсутствием (БСК, «Регресс») социальной адаптации. И это, в принципе, неудивительно, так как, хотя особые виды и функции представителей микробного сообщества выглядят индивидуальными, ассамблеи видов построены на схожести по функциональным профилям, похоже, стабильным во времени (Dorrestein et al., 2014). Поиск таких ассамблей видов в сообществе микроорганизмов тонкого кишечника, может позволить выявить особенности групп детей с РАС в контексте наличия/отсутствия социальной адаптации. Поэтому на втором этапе работы нами были изучена структура микробного сообщества тонкого кишечника.

2.3.2. Структура микробиоты тонкого кишечника у детей с РАС с наличием/отсутствием социальной адаптации

Для оценки ассамблеи микробов различных видов и родов, формирующих паттерны микробных сообществ, ассоциированных с группами детей: ТРД и с диагнозом РАС, мы использовали многомерную технику — канонический дискриминантный

анализ. Его результаты оказались высоко статистически значимыми ($\lambda_{\text{УИЛКСа}} = 0,062$; $F_{(102; 171)} = 2,56$; $P < 0,001$) и представлены в табл. 2.3.2 и на рис. 2.3.1.

Таблица 2.3.2

Результаты канонического дискриминантного анализа для разделения групп детей по показателям микробиоты тонкого кишечника

Микроорганизмы/ показатели модели	Факторная структура			Оценка значимости <i>P</i>
	Ось 1	Ось 2	Ось 3	
Филотип <i>Firmicutes</i>				
<i>Eubacterium spp.</i>	0,162	-0,056	-0,084	0,630
<i>Clostridium spp. (группа C. tetani)</i>	0,008	-0,151	0,080	0,104
<i>Clostridium perfringens</i>	0,169	-0,169	0,115	0,002
<i>Clostridium ramosum</i>	-0,113	-0,065	-0,250	0,276
<i>Ruminococcus spp.</i>	-0,301	-0,035	-0,011	< 0,001
<i>Lactobacillus spp.</i>	0,031	-0,198	-0,028	0,136
<i>Streptococcus spp.</i>	-0,037	0,094	-0,121	0,426
<i>Streptococcus mutans</i>	-0,084	-0,088	-0,141	0,547
<i>Enterococcus spp.</i>	-0,001	-0,046	-0,016	0,754
<i>Staphylococcus aureus</i>	-0,146	-0,048	0,083	0,648
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,109	-0,027	-0,101	0,816
Филотип <i>Bacteroidetes</i>				
<i>Prevotella spp.</i>	0,090	-0,266	0,034	0,444
Филотип <i>Actinobacteria</i>				
<i>Bifidobacterium spp.</i>	-0,054	-0,093	-0,103	0,626
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	-0,059	-0,023	0,065	0,121
<i>Propionibacterium jensenii</i>	0,045	0,134	0,240	0,010
<i>Propionibacterium acnes</i>	0,061	0,069	-0,005	0,167
<i>Actinomyces viscosus</i>	-0,105	-0,262	-0,085	0,247
<i>Rhodococcus spp.</i>	-0,120	-0,420	0,069	0,022
<i>Nocardia spp.</i>	-0,035	-0,091	0,002	0,388
<i>Nocardia asteroides</i>	0,075	-0,035	-0,118	0,128
<i>Pseudonocardia spp.</i>	-0,007	-0,205	-0,033	0,374
<i>Corynebacterium spp.</i>	-0,049	0,008	0,106	0,646
<i>Eggerthella lenta</i>	-0,077	0,077	0,161	0,096
<i>Streptomyces spp.</i>	-0,031	0,005	0,014	0,814
Филотип <i>Proteobacteria</i>				
<i>Kingella spp.</i>	-0,179	-0,021	-0,069	0,043
<i>Moraxella spp./Acinetobacter spp.</i>	0,076	-0,148	0,016	0,064

Окончание табл. 2.3.2

Микроорганизмы/ показатели модели	Факторная структура			Оценка значимости <i>P</i>
	Ось 1	Ось 2	Ось 3	
<i>Alcaligenes spp.</i>	-0,021	-0,010	0,015	0,329
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,040	0,119	0,147	0,848
Филотип <i>Fusobacteria</i>				
<i>Fusobacterium spp.</i>	0,048	-0,130	0,018	0,066
Филотип <i>Ascomycota</i>				
<i>Candida spp.</i>	-0,127	-0,016	-0,002	0,098
<i>Aspergillus spp.</i>	0,246	-0,068	0,044	0,017
<i>Herpesviridae</i>				
<i>Herpes spp.</i>	-0,079	-0,071	0,022	0,056
Цитомегаловирус	-0,157	-0,127	-0,141	0,529
Эпштейна — Барр вирус	-0,062	0,190	-0,271	0,064
Собственное число	4,568	0,886	0,524	—
Доля объясняемой дисперсии, %	76,4	14,8	8,8	—
Каноническая корреляция	0,906	0,685	0,586	—
Статистическая значимость оси	$\chi^2_{(102)} = 205,2$ $P \ll 0,001$	$\chi^2_{(102)} = 78,1$ $P = 0,146$	$\chi^2_{(102)} = 31,2$; $P = 0,508$	—

Примечание. Выделены статистически значимые и близкие к ним *P*-значения ($P \leq 0,10$).

Как видно из таблицы, 34 представителя основных филотипов микроорганизмов тонкого кишечника образовывали три паттерна (оси) взаимосвязанных показателей, которые объясняли всю (100 %) межгрупповую и внутригрупповую изменчивость. Третья ось вносила минимальный вклад (8,8 %) в долю объясняемой дисперсии, поэтому мы рассматривали только первые две оси.

Наглядно представить полученные результаты позволяет ординационная диаграмма (рис. 2.3.1), на которой векторы нагрузок показателей расположены на одном поле с групповыми центроидами и индивидуальными метками детей разделяемых групп. Факторная структура табл. 2.3.2 показывает направление и силу корреляции показателя с осью, а вектор нагрузки показателя на рис. 2.3.1 является произведением стандартного отклонения показателя на значение корреляции и почти пропорционален последней.

Из рис. 2.3.1 видно, что первая каноническая ось позволила разделить группы ТРД и детей с РАС. Сравнение расположения групповых центроидов показало, что от группы ТРД высоко статистически значимо отличались все три группы детей с РАС: СК ($F_{(34; 57)} = 4,93$; $P \ll 0,001$), БСК ($F_{(34; 57)} = 2,78$; $P < 0,001$) и «Регресс» ($F_{(34; 57)} = 5,93$; $P \ll 0,001$). Наибольший вклад в эту ось (модуль значения силы корреляции $> 0,100$)

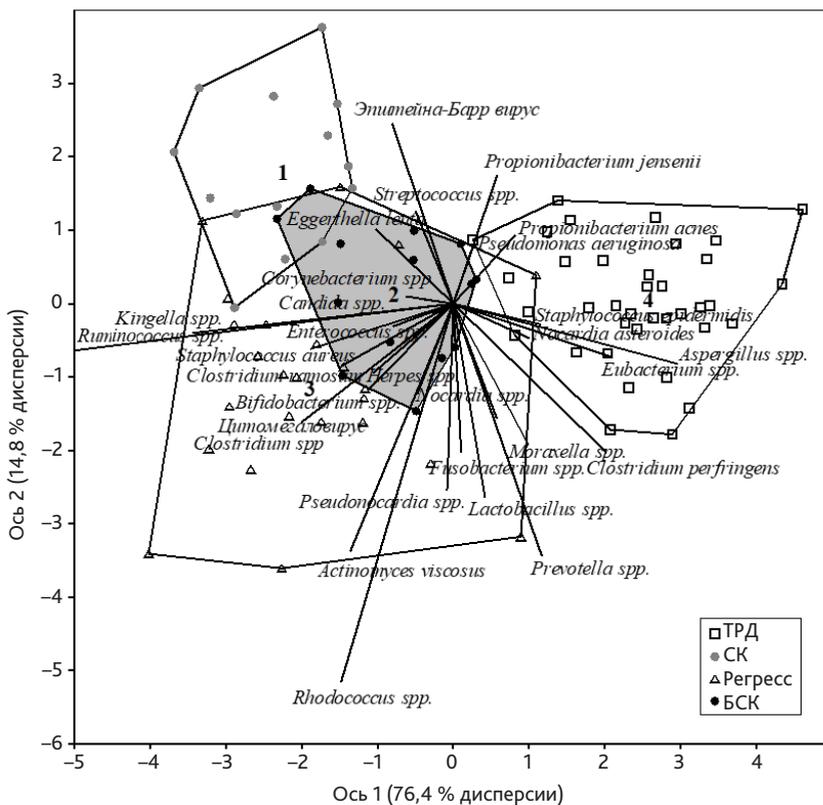


Рис. 2.3.1. Группы детей (символы) и микроорганизмы (векторы) в пространстве двух первых канонических осей дискриминантного анализа. Центриды групп обозначены цифрами (1–4)

вносили показатели 10 из 11 микроорганизмов тонкого кишечника, которые имели статистически значимые различия между ТРД и детьми с РАС в тесте Краскела — Уоллиса (кроме *Prevotella spp.*), а также *Candida spp.* и *S. epidermidis* (см. табл. 2.3.1, табл. 2.3.2). Паттерн микроорганизмов первой оси включал представителей фило типа *Firmicutes* — *Eubacterium spp.*, *C. perfringens*, *S. epidermidis*, грибы *Aspergillus spp.* (преобладали в группе ТРД), которым были противопоставлены: *Clostridium ramosum*, *Ruminococcus spp.* и *S. aureus* (филотип *Firmicutes*); *Actinomyces viscosus* и *Rhodococcus spp.* (филотип *Actinobacteria*), протеобактерии рода *Kingella*, а также грибы рода *Candida* и ЦМВ, повышенные у детей с диагнозом РАС, независимо от группы — СК, БСК, «Регресс» (см. табл. 2.3.2, рис. 2.3.1). Таким образом, у детей с РАС (независимо от наличия/отсутствия социальной адаптации) был определён свой функциональный профиль, описываемый ассамблеей определённых представителей микроорганизмов тонкого кишечника, среди которых доминирующее влияние имели филотипы *Actinobacteria* и *Proteobacteria*.

Вторая ось разделяла преимущественно подгруппы детей с РАС, однако различия групп были менее выражены, и только крайние на рис. 2.3.1 группы СК и «Регресс» имели тенденцию к различиям ($F_{(34;57)} = 1,50$; $P = 0,087$). При этом групповые полигоны групп «Регресс» и БСК практически полностью перекрывались. Полигон группы СК смещён в область положительных значений этой оси (верхний левый угол) относительно двух других групп детей с РАС. Судя по направлениям векторов микроорганизмов, включённых в модель, группа СК характеризовалась самыми низкими значениями почти всех микроорганизмов (выделяется полным отсутствием векторов), а группа «Регресс», наоборот, самыми высокими (см. рис. 2.3.1). Наибольший вклад во вторую ось вносил паттерн из 13 микроорганизмов, среди которых статистически значимыми были показатели бактерий: *C. perfringens*, *Rhodococcus spp.*, *Moraxella spp.* и *Fusobacterium spp* (преобладали в группе «Регресс»), противопоставленные виду *Propionibacterium jensenii* (повышенному в группе СК) (см. табл. 2.3.2, рис. 2.3.1).

Данные, полученные в результате канонического дискриминационного анализа, позволили сделать следующие выводы: ТРД-паттерн включает ассамблею различных микробов со значимым представительством *Firmicutes* — *Eubacterium spp.*, *C. perfringens*, *S. epidermidis*, несколько меньшим *Actinobacteria* — *P. jensenii*, *P. acnes* и низкой презентацией *Bacteroidetes* — *Prevotella spp.* Кроме того, ассамблея микробного сообщества включала грибы рода *Aspergillus* с заметной экспозицией себя. Все эти микроорганизмы не относятся к хозяин-ассоциированной микробиоте и широко используются для проживания окружающую среду. В организме хозяина проживают на пограничных поверхностях между внешним миром и средой организма, и возможно, как мы считаем, являются маркёром здоровья, так как презентация их патогенности лимитирована рядом факторов — толерантностью клеток эпителия кишечника, норморезистентностью иммунной системы слизистых и ассамблеями микробов в сообществе, демонстрирующую колонизационную резистентность.

Для группы детей РАС характерны следующие особенности:

- группа СК — микробный паттерн презентует общность по ряду представителей, участвующих в ассамблеях, формирующих паттерны каждой из трёх групп детей: СК, БСК, «Регресс», но не демонстрирующих значимого представительства, что, вероятно, отражает их равновесную функциональную активность и/или однообразие/лимитирование диеты;
- БСК — практически вся ассамблея микробного сообщества включена в микробный паттерн группы детей с регрессом. Отличительной особенностью данного паттерна выступает значительное количество корреляций между микробными представителями ассамблеи без значимого количественного превосходства;
- группа «Регресс» — имеет, как считает ряд авторов, особые пути и механизмы развития (Ferguson et al., 2016). Около 25–35 % детей около 1 года

демонстрируют раннее развитие — запас слов, социальные навыки, моторную активность, которые достигают плато в течение нескольких месяцев, а затем последовательно ступенчато теряют приобретённый опыт (DiCiccio-Bloom et al., 2006). В последующем многие навыки возвращаются, хотя не достигают прежнего уровня (Бурмистрова и др., 2018). В свете этих данных группа «Регресс», вероятно, является гетерогенной, включающей детей из группы СК и БСК. Для этой группы характерна насыщенность корреляционными связями с выраженным доминированием различных представителей, таких как *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *C. perfringens*, *Prevotella spp.*, *A. viscosus*, *Rhodococcus spp.*, *Pseudonocardia spp.*, *Moraxella spp.*, *Fusobacterium spp.*, ЦМВ, такой характер доминирования может свидетельствовать о неустойчивой ассамблее микробов, высокой конкуренции, динамической смене представительства, т. е. о «хаосе» взаимоотношений, предшествующем установлению порядка на новом уровне — «порядок из хаоса» (Пригожин, Стенгерс, 1986), т. е. формированию новой микробной ассамблеи для нового паттерна.

Заключение

Таким образом, можно предположить, что ассамблеи микробов различных видов и родов определяют функциональный профиль, формируемых ими паттернов микробных сообществ детей с различными уровнями социальной адаптации — ТРД и детей с РАС. Между детьми с РАС, имеющими различную степень выраженности социальной адаптации, обращают на себя внимание две группы — с наличием социальной адаптации (СК) и гетерогенная группа — «Регресс» (слабый социальный контакт/отсутствие его), которые демонстрируют альтернативные по количеству корреляционных связей паттерны микробных сообществ тонкого кишечника. Группа СК — минимальное количество, без доминирующей роли представителей различных родов/видов, что, возможно, свидетельствует о функциональной незрелости/пассивности микробных ассамблей. Группа «Регресс» — насыщенность корреляционными связями с выраженным доминированием различных представителей, что, как можно предположить, демонстрирует неустойчивость ассамблеи микробов, т. е. «хаос» взаимоотношений, предшествующий установлению порядка на новом уровне — «порядок из хаоса». Такой подход позволяет рассматривать микробные паттерны не только как диагностический признак, хотя показаны чёткие различия между ТРД и детьми с РАС, но как патогенетические особенности детей с РАС, с различным уровнем базового симптома — недостаточности социальной адаптации.

2.4. Микроорганизмы как фактор селекции человеческих популяций (на примере генов TLR)

*Tempora mutantur, et nos mutamur in illis.**

Латинский афоризм

В течение всего периода своего развития человечество постоянно находилось в тесном контакте с возбудителями инфекционных заболеваний, являвшимися главной причиной смертности (Barreiro, 2010). Микроорганизмы, таким образом, представляют собой один из важнейших факторов естественного отбора, формирующего генетическое разнообразие в человеческих популяциях (Casals, 2011; Daub, 2013). Взаимодействие макроорганизма хозяина с микроорганизмами в рамках адаптации может быть разделено на два процесса: резистентность и толерантность. Резистентность означает снижение нагрузки микроорганизмов, что в случае патогенов выражается в повышении выживаемости макроорганизма. Толерантность означает расширение нормы реакции макроорганизма, т. е. нагрузка микроорганизмов может повышаться без острой патофизиологической реакции со стороны организма хозяина. Хотя эти два процесса имеют общий адаптивный характер, в ходе коэволюции макро- и микроорганизмов резистентность и толерантность имеют неодинаковую динамику. Поскольку резистентность усиливает свойства макроорганизма по эрадикации патогена и снижает выживаемость последнего, у микроорганизма адаптивно развивается ответная резистентность, т. е. повышается вирулентность. Подобное продолжается неоднократно. Таким образом, резистентность как адаптивная реакция является неустойчивой в эволюционной перспективе. Толерантность, напротив, является нейтральной или слабо-положительной по отношению к патогену, и поэтому, увеличивая выживаемость макроорганизма, не вызывает ответной резистентности. Эти два направления адаптации в зависимости от конкретного случая могут быть связаны друг с другом или разделены. Так, например, в отношении клеточных толл-подобных рецепторов (TLR), участвующих в начальных этапах узнавания микроорганизмов, установлено, что резистентность и толерантность связаны и реализуются через одну и ту же сигнальную систему: выбор в сторону того или другого направления определяется полиморфными вариантами рецептора (Auyes, 2008).

Толл-подобные рецепторы являются семейством клеточных мембранных рецепторов, универсально распространённых среди позвоночных. Отдельные

* Времена меняются, и мы меняемся с ними.

представители семейства TLR могут входить в состав как цитоплазматических мембран, так и внутрицитоплазматических эндосом и выполняют функцию детекции молекул микробного происхождения. Являясь частью врождённой иммунной системы, TLR, в отличие от рецепторов адаптивного иммунитета, способны распознавать не уникальные антигенные эпитопы, а набор эволюционно консервативных, широко представленных у разных таксонов микроорганизмов молекулярных структур — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) (Botos, 2011; Means, 2000). В результате связывания PAMP с соответствующим TLR происходит инициация цепи внутриклеточной передачи сигнала посредством молекул-адаптеров и киназ, что приводит к повышению экспрессии ряда генов провоспалительных цитокинов (Takeuchi, 2010; Vandenberg, 2012). Обособленное место среди TLR занимает TLR10. Вплоть до последнего времени не были известны лиганды, механизмы активации и функциональные эффекты TLR10. Сравнительно недавно стали появляться исследования, свидетельствующие о наличии противовоспалительной функции данного рецептора (Guan, 2010; Oosting, 2014). Согласно этим исследованиям, рецепторный участок TLR10 имеет структуру, сходную с таковой для TLR1, что позволяет рассматривать лиганды TLR1 (триацелированные липопептиды) в качестве лигандов и для TLR10 (Guan, 2010). Но механизм проведения внутриклеточного сигнала у TLR10 кардинально отличается от TLR1 и приводит к снижению провоспалительной активности. Предполагается, что такое функциональное действие TLR10 может осуществляться тремя разными путями. Во-первых, за счёт конкурентного связывания TLR10 с лигандами для TLR1 снижается активация последнего, что приводит к снижению выработки провоспалительных цитокинов. Во-вторых, с TLR10 связан внутриклеточный механизм, блокирующий проведение «провоспалительного» сигнала от TLR1 и TLR6. Кроме того, TLR10 обладает отдельным внутриклеточным путём активации (Акт-зависимый путь), приводящим к усилению экспрессии генов противовоспалительных цитокинов (IL1-Ra) (Oosting, 2014). В настоящее время вопрос о значении TLR10 в развитии иммунного ответа все ещё активно обсуждается. Вероятно, что TLR10 выполняет функцию модулятора провоспалительного ответа, развивающегося в ходе связывания молекул TLR1 и TLR6 с их лигандами (Laayouni, 2014).

Гены TLR характеризуются полиморфизмом, обусловленным в основном одонуклеотидными (точковыми) заменами. По данным международных полногеномных исследований, в области генов TLR обнаруживается более 400 точковых замен, из которых около сотни приходится на несинонимичные, приводящие к аминокислотным заменам в молекулах рецепторов TLR (Barreiro, 2009). Полиморфизм генов TLR определяет их генетическое разнообразие, т. е. существование различных аллельных вариантов в человеческих популяциях. Помимо мутаций, возникающих в генах TLR, ещё одним источником полиморфизма генов TLR являются генетические варианты, полученные в результате процесса архаичной

интрогрессии. Архаичная интрогрессия имела место около 50 тысяч лет назад на территории Европы и Восточной Азии и заключалась в передаче определённых сочетаний генетических вариантов в ходе интербридинга между архаичными людьми (денисовцы, неандертальцы) и людьми современного физиологического типа (Abi-Rached, 2011; Dannemann, 2016). В ходе своего расселения по территории Евразии люди современного типа оказались в новых экологических условиях, обусловленных в числе прочего новым микробным окружением. При расселении эти люди пересекали области проживания архаичных людей, обитавших здесь на протяжении тысяч лет и поэтому адаптированных к местным условиям (Lazaridis, 2014; Mendez, 2013). В ходе гибридизации между разными популяциями *Homo sapiens* происходила передача паттернов генов, обеспечивавших комплексную адаптацию к условиям обитания в Евразии (адаптивная интрогрессия). Таким образом, в популяциях людей современного типа появлялись аллельные варианты, предпрошедшие естественный отбор в составе геномов популяций архаичных людей. К числу генов с наибольшим влиянием адаптивной интрогрессии в геноме относятся гены подсемейства TLR1: TLR10, TLR1 и TLR6.

На протяжении долгого времени считалось, что единственным видом селекции, действующим на гены TLR, является негативный тип естественного отбора, приводящий к снижению частоты вновь возникающих мутаций, вплоть до полного их удаления из популяции. Ряд исследований показал, что для системы генов TLR существуют примеры действия позитивного отбора, связанного с увеличением частоты возникающих или существующих мутаций, имеющих адаптивное значение (Laayouni, 2014; Barreiro, 2009; Casanova, 2011; Georgel, 2009). Согласно полногеномным исследованиям, наиболее интенсивно положительный отбор происходил в генном кластере, состоящем из генов TLR10, TLR1 и TLR6. Эти гены объединены не только пространственно (тесно расположены на 4-й хромосоме), но и функционально: кодируемые ими рецепторы позволяют «узнавать» липопептиды — мембранные компоненты бактерий. Оценка встречаемости однонуклеотидных замен в кластере TLR10–TLR1–TLR6 в популяциях разного происхождения выявила следы строгой позитивной селекции, выражающиеся в наличии неравновесно сцепленных гаплотипов, присутствующих с разной частотой в азиатских и европейских популяциях (Barreiro, 2009). Наиболее характерным гаплотипом (встречается с частотой до 40 %) для популяций азиатского происхождения является гаплотип, определяемый тремя однонуклеотидными заменами в гене TLR10: 721A>C, 1105A>C и 2323A>G. Эти генетические варианты являются несинонимичными, т. е. приводят к аминокислотным заменам в рецепторном участке молекулы рецептора TLR10 и, как продемонстрировано в ряде исследований, вызывают ослабление функциональной активности этого рецептора (Oosting, 2014; Mikacenic, 2013). Гаплотип, обнаруживаемый с высокой частотой среди европейского населения (относительная частота достигает 30 %), характеризуется тремя несинонимичными однонуклеотидными

заменами: две в гене TLR1–1805T>G (замена изолейцина на серин в положении 602 молекулы рецептора — I602S) и 743G>A (вызывает аминокислотную замену серина на аспарагин в положении 248 молекулы рецептора TLR1) — и одна в гене TLR6–745C>T (замена пролина на серин в положении 249 рецептора TLR6).

Все эти три варианта связаны со снижением функциональной активности рецепторов TLR1 и TLR6, при этом наибольший эффект имеет аминокислотный вариант 602S в молекуле TLR1: эта замена затрагивает трансмембранный домен молекулы, вызывая значительное снижение эффективности встраивания синтезированных молекул рецептора в цитоплазматическую мембрану. Такая функциональная недостаточность приводит к снижению выработки провоспалительных цитокинов при ответе на инфекцию до 60 % (Hawn, 2007; Johnson, 2007). Высокая частота встречаемости среди европейских популяций гаплотипов из точковых замен, ассоциированных со снижением провоспалительного ответа, позволяет предполагать, что снижение активности воспалительных реакций могло создавать адаптивное преимущество для европейцев в определённых условиях в прошлом. Предполагается, что такие условия могли сложиться во время эпидемий высоковирулентных инфекций на европейской территории. Вероятнее всего, инфекцией, создавшей селективное давление, стала чума (Laayouni, 2014). Во время самой масштабной эпидемии чумы в XIV в. («Чёрная смерть») по ряду причин (высокая плотность населения, появление возбудителя в несвойственных для него экологических условиях) в Европе создались напряжённые эпидемические условия, в которых смертность среди населения достигала 50 %. Подробное изучение антигенной структуры *Yersinia pestis* и *Y. pseudotuberculosis* (предковый вид для возбудителя чумы) показало, что антиген LcrV (антиген V) этих видов способен взаимодействовать с рецепторами подсемейства TLR1, что приводит к их активации (Laayouni, 2014; Абрамов, 2011). Предполагается, что для носителей гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6, обеспечивавших ослабленный провоспалительный ответ, благодаря снижению риска развития острой септической реакции, вероятность выживаемости в жёстких условиях эпидемий чумы в Европе повышалась (Casanova, 2011). Таким образом, реализация стратегии толерантности под сильным селективным давлением отбора привела к резкому увеличению доли определённых гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6 среди населения Европы (Ayres, 2008).

Южный Урал, в частности территория ЧО, в исторической перспективе являлся своеобразным перекрёстком, на котором встречались пути миграции народов, имеющих различное происхождение (Виноградов, 1991). На сегодняшний день в ЧО проживают представители европейских, тюркских, финно-угорских популяций (Итоги ВПН, 2010). Предки этих популяций проживали в прошлом на различных территориях, характеризовавшихся разными геоклиматическими условиями, разной микробной нагрузкой, а значит, разным давлением инфекционного отбора. В результате популяции обладают уникальными паттернами генов

иммунной системы, включая гены TLR. С целью определения вариантов кластера TLR10–TLR1–TLR6 нами были исследованы основные популяции, проживающие в ЧО: русские, имеющие европейское происхождение, автохтонные башкиры и татары, чья история формирования включала несколько раундов миграции из Азии в Европу и обратно. Дополнительно была изучена популяция нагайбаков — малой народности, имеющей татарское происхождение, но развивавшейся значительное время изолированно.

Иммуногенетическое типирование проведено среди доноров ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови» различного этнического происхождения. В исследование были включены случайно выбранные неродственные лица, постоянно проживающие на территории ЧО. Принадлежность к определённой этнической группе определяли в соответствии с официальными документами и данными генеалогического анамнеза в трёх поколениях. По генам TLR типировано 167 русских, 110 татар, 152 башкира и 114 нагайбаков.

Материалом для исследования послужила венозная кровь, взятая в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Выделение ДНК из образцов цельной крови проводили с помощью реагентов «Protrans DNA Box 500» (Германия) и «Синтол К-Сорб-100» (Россия) согласно инструкциям производителей. Однонуклеотидные замены в генах TLR определяли методом полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфическими праймерами (Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction, PCR-SSP), а также в ходе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).

Дополнительно из открытой базы данных «1000 genomes» (A global..., 2015) была взята информация по распределению трёхлокусных гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6 в 12 евразийских популяциях: пяти популяциях европейского происхождения (финны, британцы, европейцы смешанного северо-западного происхождения, иберийцы, тосканцы) и семи — азиатского (японцы, китайцы Хань, китайцы Дай, вьетнамцы, бенгальцы, пенджабцы, гуджаратцы).

Статистическую обработку результатов проводили по следующей схеме.

1. Расчёт относительных частот аллелей TLR (*gf*) прямым подсчётом.
2. Определение соответствия наблюдаемого распределения аллелей равновесию Харди — Вайнберга.
3. Расчёт относительных частот трёхлокусных гаплотипов TLR (*hf*) и определение гаметной фазы методом максимизации ожидания (*Expectation — Maximization Algorithm*).
4. Вычисление коэффициента неравновесного сцепления D' , определяющего силу сцепления между отдельными локусами трёхлокусных гаплотипов TLR10 — TLR1–TLR6.

Пункты 2–4 выполняли с помощью программы Arlequin (version 3.5 (Arlequin..., 2018)).

5. Расчёт 95 % доверительных интервалов для gf и hf по методу Клоппера — Пирсона.

6. Иерархический кластерный анализ (*Hierarchical Cluster Analysis*) и анализ главных компонент (*Principal Component Analysis*) по частотам трёхлокусных гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6 в популяциях русских, башкир, татар и нагайбаков ЧО и в 12 евразийских популяциях. Из рассмотрения были исключены редкие гаплотипы с частотой во всех популяциях меньше 0,03. В качестве метода кластеризации был использован метод Уорда.

Пункты 5 и 6 выполняли в программе PAST (version 3.14 (Hammer et al., 2001)).

2.4.1. Распределение аллелей и трёхлокусных гаплотипов TLR в популяциях ЧО

Все изученные локусы TLR в популяциях находились в соответствии с равновесием по Харди — Вайнбергу.

На первом этапе исследования была проведена оценка относительных частот аллелей и трёхлокусных гаплотипов по генам TLR10, TLR1 и TLR6 в изученных популяциях ЧО, а также в 12 мировых евразийских популяциях. Данные по частотам представлены в табл. 2.4.1 и 2.4.2 соответственно.

Относительные частоты аллелей и гаплотипов по генам TLR в популяции русских ЧО в целом соответствуют значениям, характерным для северо-западных европейских популяций. Аллель с заменой 721*С гена TLR10 в популяции русских ЧО ($gf = 0,362$) встречается относительно евразийских популяций редко, что характерно также для популяций европейцев смешанного северо-западного происхождения, британцев и финнов. Аллель с заменой 1805*G локуса TLR1 в популяции русских ЧО обнаруживается с очень высокой для однонуклеотидного полиморфизма частотой ($gf = 0,763$), наиболее близкие значения отмечаются для популяции британцев. Относительная частота аллеля с заменой 745*Т гена TLR6 в популяции русских ($gf = 0,380$) является одной из самых высоких среди евразийских популяций, но несколько уступает аналогичным значениям в европейских популяциях северо-западного происхождения.

Два самых частых для русских ЧО трёхлокусных гаплотипа 721*А-1805*G-745*Т ($hf = 0,362$) и 721*А-1805*G-745*С ($hf = 0,240$) являются распространёнными и для других европейских популяций северо-западного и южного происхождения. Ещё один частый гаплотип 721*С-1805*Т-745*С ($hf = 0,198$) в популяции русских ЧО обнаруживается приблизительно в 2 раза реже, чем в популяциях тосканцев и иберийцев, а гаплотип 721*С-1805*G-745*С почти в 5 раз чаще встречается в популяции русских ЧО ($hf = 0,150$) в сравнении с популяциями Южной Европы. При этом для

Таблица 2.4.1

**Встречаемость аллелей генов толл-подобных рецепторов
в четырех популяциях ЧО и 12 евразийских.
Относительная частота *gf* [95% ДИ]**

Популяция	Количество человек	TLR10_721*С	TLR1_1805*G	TLR6_745*Т
Русские ЧО	167	0,362 [0,311; 0,416]	0,763 [0,714; 0,808]	0,380 [0,328; 0,435]
Башкиры ЧО	152	0,500 [0,442; 0,558]	0,316 [0,264; 0,371]	0,161 [0,122; 0,207]
Нагайбаки ЧО	114	0,443 [0,377; 0,510]	0,557 [0,490; 0,623]	0,298 [0,240; 0,362]
Татары ЧО	110	0,445 [0,379; 0,514]	0,591 [0,523; 0,657]	0,286 [0,228; 0,351]
Британцы	91	0,324 [0,257; 0,397]	0,764 [0,695; 0,823]	0,450 [0,377; 0,526]
Европейцы (С-3)	99	0,348 [0,282; 0,419]	0,773 [0,708; 0,829]	0,485 [0,413; 0,557]
Финны	99	0,369 [0,301; 0,440]	0,828 [0,768; 0,878]	0,424 [0,354; 0,496]
Иберийцы	107	0,486 [0,417; 0,555]	0,500 [0,431; 0,569]	0,355 [0,291; 0,423]
Тосканцы	107	0,444 [0,376; 0,513]	0,533 [0,463; 0,601]	0,341 [0,278; 0,409]
Бенгальцы	86	0,529 [0,452; 0,605]	0,064 [0,032; 0,112]	0,017 [0,004; 0,050]
Гуджаратцы	103	0,573 [0,502; 0,641]	0,082 [0,049; 0,129]	0,029 [0,011; 0,062]
Пенджабцы	96	0,547 [0,474; 0,619]	0,104 [0,065; 0,156]	0,036 [0,015; 0,074]
Китайцы Дай	93	0,430 [0,358; 0,505]	0,000 [0,000; 0,020]	0,000 [0,000; 0,020]
Китайцы Хань	103	0,626 [0,556; 0,692]	0,019 [0,005; 0,049]	0,000 [0,000; 0,018]
Вьетнамцы	99	0,460 [0,389; 0,532]	0,000 [0,000; 0,018]	0,000 [0,000; 0,018]
Японцы	104	0,731 [0,665; 0,790]	0,005 [0,000; 0,026]	0,000 [0,000; 0,018]

европейских популяций северо-западного происхождения (европейцев Северо-Запада, британцев, финнов) характерны частоты гаплотипов 721*С-1805*G-745*С и 721*С-1805*Т-745*С, близкие к аналогичным значениям для русских ЧО.

Согласно исследованиям генов кластера TLR10–TLR1–TLR6, однонуклеотидные замены 1805*G и 745*Т в генах TLR1 и TLR6, соответственно, вызывают снижение экспрессии генов провоспалительных цитокинов в результате взаимодействия рецепторов с соответствующими микробными лигандами, что приводит к ослаблению провоспалительного иммунного ответа. Аллель 721*А гена TLR10 (предковый аллель без замены), как продемонстрировано в ряде исследований, связан

Таблица 2.4.2

**Встречаемость наиболее распространённых трёхлокусных гаплотипов
TLR10–TLR1–TLR6 в четырёх популяциях ЧО и 12 евразийских.
Относительная частота *hf* [95% ДИ]**

Популяция	ATC	AGC	AGT	CTC	CGC
Русские ЧО	0,033 [0,017; 0,058]	0,240 [0,195; 0,289]	0,362 [0,311; 0,416]	0,198 [0,156; 0,244]	0,150 [0,113; 0,193]
Башкиры ЧО	0,240 [0,193; 0,292]	0,115 [0,082; 0,156]	0,135 [0,099; 0,178]	0,428 [0,371; 0,485]	0,056 [0,033; 0,088]
Нагайбаки ЧО	0,132 [0,091; 0,182]	0,145 [0,102; 0,197]	0,276 [0,219; 0,339]	0,307 [0,248; 0,371]	0,118 [0,080; 0,168]
Татары ЧО	0,095 [0,060; 0,142]	0,195 [0,145; 0,254]	0,250 [0,194; 0,313]	0,295 [0,236; 0,360]	0,127 [0,086; 0,179]
Британцы	0,022 [0,006; 0,055]	0,220 [0,162; 0,287]	0,434 [0,361; 0,509]	0,209 [0,152; 0,275]	0,099 [0,060; 0,152]
Европейцы (С-3)	0,005 [0,000; 0,028]	0,187 [0,135; 0,248]	0,455 [0,384; 0,527]	0,217 [0,162; 0,281]	0,106 [0,067; 0,158]
Финны	0,010 [0,001; 0,036]	0,212 [0,157; 0,276]	0,409 [0,340; 0,481]	0,162 [0,113; 0,220]	0,192 [0,140; 0,254]
Иберийцы	0,042 [0,019; 0,078]	0,131 [0,089; 0,184]	0,336 [0,273; 0,404]	0,453 [0,385; 0,523]	0,019 [0,005; 0,047]
Тосканцы	0,065 [0,036; 0,107]	0,182 [0,133; 0,241]	0,299 [0,239; 0,365]	0,379 [0,313; 0,447]	0,033 [0,013; 0,066]
Бенгальцы	0,407 [0,333; 0,484]	0,052 [0,024; 0,097]	0,006 [0,000; 0,032]	0,517 [0,440; 0,594]	0,006 [0,000; 0,032]
Гуджа-ратцы	0,359 [0,294; 0,429]	0,048 [0,024; 0,087]	0,015 [0,003; 0,042]	0,553 [0,483; 0,623]	0,010 [0,001; 0,035]
Пенджабцы	0,344 [0,277; 0,416]	0,083 [0,048; 0,132]	0,021 [0,006; 0,052]	0,536 [0,463; 0,609]	0,000 [0,000; 0,019]
Китайцы Дай	0,570 [0,492; 0,645]	0,000 [0,000; 0,020]	0,000 [0,000; 0,020]	0,430 [0,358; 0,505]	0,000 [0,000; 0,020]
Китайцы Хань	0,354 [0,289; 0,424]	0,020 [0,005; 0,049]	0,000 [0,000; 0,018]	0,626 [0,556; 0,692]	0,000 [0,000; 0,018]
Вьетнамцы	0,540 [0,468; 0,611]	0,000 [0,000; 0,018]	0,000 [0,000; 0,018]	0,460 [0,389; 0,532]	0,000 [0,000; 0,018]
Японцы	0,264 [0,206; 0,330]	0,005 [0,000; 0,026]	0,000 [0,000; 0,018]	0,731 [0,665; 0,790]	0,000 [0,000; 0,018]

с преимущественно противовоспалительной модуляцией иммунного ответа (Adib-Conquy, 2014). Таким образом, представляется вероятным, что гаплотипы 721*A-1805*G-745*T и, в меньшей степени, 721*A-1805*G-745*C, встречающиеся с высокой частотой в европейских популяциях и популяции русских ЧО, способствуют развитию в определённых условиях невысокого провоспалительного ответа, т. е. являются «гипоотвечающими».

Башкиры ЧО характеризуются относительными частотами аллелей и гаплотипов по генам TLR, имеющими значения, промежуточные по отношению к популяциям азиатского и европейского происхождения. Частота аллеля 721*C гена TLR10

в популяции башкир является средней в сравнении с мировыми евразийскими популяциями: для восточно-азиатских популяций (японцы) характерны в 1,5 раза более высокие значения, а для европейских популяций (британцы, финны) — в 1,5 раза более низкие. Частоты аллеля 721*С, сопоставимые с башкирской популяцией, обнаружены в южно-европейских популяциях (иберийцы, тосканцы), а также популяциях Южной и Юго-Восточной Азии (вьетнамцы, бенгальцы, гуджаратцы, пенджабцы). Аллель 1805*G гена TLR1 встречается в популяции башкир ЧО с частотой ($gf = 0,316$), более чем в 3 раза превышающей соответствующие значения в восточно-азиатских популяциях, но уступающей более чем в 2 раза аллельным частотам северо-западных европейских популяций и популяции русских ЧО.

В ходе сравнения башкир ЧО с евразийскими популяциями по частоте аллеля 745*Т гена TLR6 обнаружено, что для популяций европейского происхождения характерна вдвое большая частота аллеля 745*Т, в то время как в популяциях Восточной и Юго-Восточной Азии аллель 745*Т выявляется в 5 и более раз реже, чем среди башкир. Наиболее частый среди башкир трёхлокусный гаплотип 721*С-1805*Т-745*С ($hf = 0,428$) является распространённым в самых различных популяциях, как южно-европейских (тосканцы, иберийцы), так и юго-восточных азиатских (китайцы Дай, вьетнамцы). Находящийся на втором месте по частоте встречаемости среди башкир гаплотип 721*А-1805*Т-745*С ($hf = 0,240$) для европейских популяций является сравнительно редким, а в азиатских наблюдается с большей частотой (в среднем в 2 раза чаще). Третий по частоте в популяции башкир ЧО гаплотип 721*А-1805*G-745*Т ($hf = 0,135$) в популяциях европейского происхождения находится в числе преобладающих, в то время как практически полностью отсутствует в популяциях азиатского происхождения.

Для популяций татар и нагайбаков характерны близкие значения относительных частот аллелей и гаплотипов TLR. Стоит отметить, что частота аллеля 1805*G гена TLR1 в популяции татар несколько выше по сравнению с нагайбаками. Отдельные аллели TLR сближают эти две популяции как с южно-европейскими популяциями, так и популяциями Юго-Восточной Азии. По частотам аллеля 721*С гена TLR10 татары и нагайбаки близки к популяциям иберийцев и тосканцев, а также к популяциям вьетнамцев и китайцев Дай. В отношении аллелей 1805*G гена TLR1 и аллеля 745*Т гена TLR6 отмечается наибольшее сходство татар и нагайбаков с популяциями иберийцев и тосканцев, в то же время в этих двух популяциях аллель 745*Т встречается несколько чаще. Для популяций татар и нагайбаков характерно наличие двух наиболее частых трёхлокусных гаплотипов с близкими частотами встречаемости: 721*С-1805*Т-745*С ($hf = 0,295$ и $hf = 0,307$, соответственно) и 721*А-1805*G-745*Т ($hf = 0,250$ и $hf = 0,276$, соответственно). Сходные значения для этих гаплотипов наблюдаются в популяциях Южной Европы — иберийцев и особенно тосканцев. Следующий по распространённости среди татар и нагайбаков гаплотип 721*А-1805*G-745*С ($hf = 0,195$ и $hf = 0,145$, соответственно) со сходными

частотами наблюдается в популяциях Юга Европы и смешанной популяции европейцев Северо-Запада. Частоты гаплотипа 721*A-1805*T-745*C ($h_f = 0,095$ и $h_f = 0,132$) в популяции татар и нагайбаков ЧО превышают аналогичные значения для европейских популяций более чем в 1,5 раза, в то время как в популяции башкир и южно-азиатских популяциях данный гаплотип обнаруживается в 2 и более раз чаще. В целом, относительные частоты аллелей и трёхлокусных гаплотипов TLR в популяциях татар и нагайбаков ЧО в наибольшей степени соответствуют аналогичным показателям для южно-европейских популяций. При сравнении популяций татар и нагайбаков ЧО друг с другом различия в частотах гаплотипов незначительны и выражаются, главным образом, в повышенной частоте гаплотипа 721*A-1805*G-745*C в популяции татар.

2.4.2. Неравновесное сцепление между локусами гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6 в популяциях ЧО

На втором этапе исследования были рассчитаны коэффициенты неравновесного сцепления D' для трёх пар локусов гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6. Во всех популяциях ЧО обнаружено статистически значимое ($P < 0,001$) неравновесное сцепление по всем локусам для гаплотипа 721*A-1805*G-745*T. При этом для русских ЧО характерны высокие значения коэффициента сцепления ($D' > 0,7$) для всех локусов, а среди башкир, татар и нагайбаков ЧО для пары локусов TLR10 и TLR1 коэффициент значительно меньше ($D' = 0,583$, $D' = 0,519$ и $D' = 0,449$ соответственно). Среди мировых евразийских популяций гаплотип 721*A-1805*G-745*T неравновесно сцеплен только в популяциях европейского происхождения (финны, европейцы Северо-Запада, британцы, тосканцы, иберийцы) с высокими коэффициентами сцепления ($D' > 0,7$). Согласно функциональным исследованиям, гаплотип 721*A-1805*G-745*T ассоциирован с пониженным провоспалительным ответом («гипоотвечающий гаплотип»), а неравновесное сцепление между локусами гаплотипа является следствием давления положительного отбора, действовавшего во время эпидемий чумы на территории Европы (Barreiro, 2009). Наличие неравновесно сцепленного «европейского» гаплотипа в популяциях башкир, татар и нагайбаков ЧО, по-видимому, связано с влиянием европейского компонента в процессе формирования этих популяций.

2.4.3. Многомерный анализ распределения распространённых гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6 в популяциях ЧО

На основании распределения в популяциях наиболее распространенных трёхлокусных гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6 ($hf > 0,030$) был проведён кластерный анализ и анализ главных компонент (рис. 2.4.1 и 2.4.2). Результаты кластерного анализа отображены также на ординационной диаграмме анализа главных компонент: точки популяций одного кластера объединены в заштрихованную область.

Согласно полученной дендрограмме (см. рис. 2.4.1), изученные популяции образуют четыре кластера. Первый кластер составляют популяции Северо-Западной Европы (финны, смешанная популяция европейцев Северо-Запада, британцы) и популяция русских ЧО. Внутри первого кластера русские ЧО примыкают к популяции финнов, что соответствует данным по истории формирования русской популяции, связанного с влиянием финно-угорского генетического компонента (Балановская, 2007). Наиболее близко к первому кластеру примыкает второй, включающий южно-европейские популяции тосканцев и иберийцев, а также популяции татар и нагайбаков ЧО. Внутри этого кластера наиболее близко друг

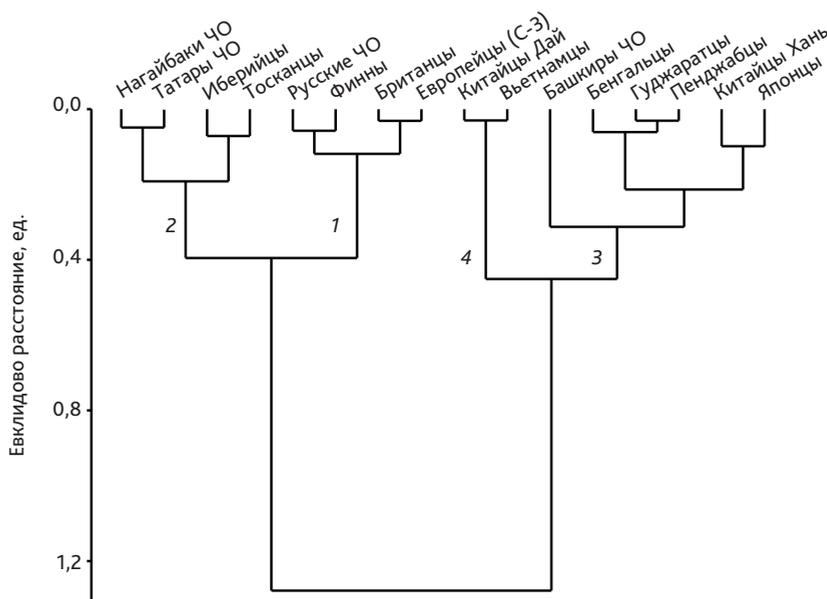


Рис. 2.4.1. Дендрограмма сходства четырех популяций Челябинской области и 12 евразийских по частотам наиболее распространенных трехлокусных гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6

к другу располагаются популяции нагайбаков и татар. Самый крупный третий кластер представлен башкирами ЧО и азиатскими популяциями южного (пенджабцы, гуджаратцы, бенгальцы) и восточного происхождения (китайцы Хань, японцы). При этом популяция башкир занимает характерное положение в кластере: башкиры отделены от прочих популяций в самом основании кластера и располагаются обособленно (Евдокимов, 2016). Отдельный кластер формируют юго-восточные азиатские популяции китайцев Дай и вьетнамцев.

Как видно из рис. 2.4.2, две первые компоненты позволяют объяснить около 100 % (95,4 %) наблюдаемой изменчивости между популяциями, при этом преобладающая часть информативности приходится на долю компоненты 1 (87,4 %). Направление, определяемое этой осью, соответствует географическому направлению

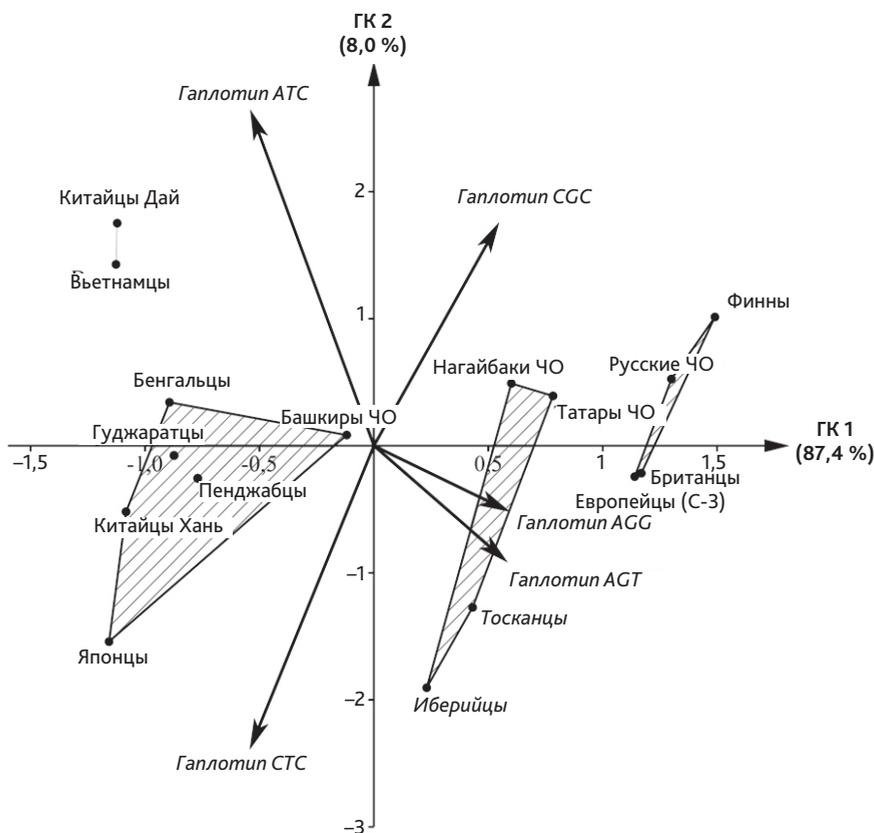


Рис. 2.4.2. Популяции ЧО и 12 евразийских популяций в пространстве двух первых главных компонент, выделенных по частотам встречаемости наиболее распространенных трехлокусных гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6. Отдельные кластеры популяций показаны штриховкой

с Юго-Востока на Северо-Запад. Таким образом, кластеры популяций могут быть охарактеризованы следующим образом.

1. «Северо-западный европейский кластер», состоящий из популяции русских ЧО, смешанной европейской популяции северо-западного происхождения, популяций финнов и британцев. С формированием «Северо-западного европейского кластера» в наибольшей степени связаны гаплотипы, несущие «гипоответчающую» замену 1805T > G в гене TLR1: 721*A-1805*G-745*T, 721*A-1805*G-745*С и 721*С-1805*G-745*С. Подобное положение русских ЧО на ординационной диаграмме, определённое исходя из частот трёхлокусных гаплотипов по генам TLR, согласуется с результатами анализа генетического разнообразия русских по другим системам генов. В соответствии с частотным распределением в евразийских популяциях гаплотипов митохондриальной ДНК и Y-хромосомы, а также аллельных вариантов генов системы HLA I типа популяция русских приближается к популяциям Европы, в особенности имеющим западное происхождение (Балановская, 2007; Чернова, 2014).

Расположение популяции русских ЧО на графике вблизи от европейских популяций указывает на относительно недавнее заселение русскими территории Южного Урала после этапов позитивной селекции, обусловленных эпидемиями чумы на территории Европы (Евдокимов, 2016).

2. «Южно-европейский кластер», состоящий из популяций татар и нагайбаков ЧО, а также популяций иберийцев и тосканцев. Среди гаплотипов TLR наиболее значимыми для этого кластера, как и для «Северо-западного европейского кластера», являются 721*A-1805*G-745*T и гаплотип 721*A-1805*G-745*С, но гаплотип 721*С-1805*G-745*С встречается реже, а гаплотип 721*С-1805*T-745*С — чаще в сравнении с первым кластером. Согласно ординационной диаграмме, внутри кластера татары в сравнении с остальными популяциями располагаются наиболее близко к «Северо-западному европейскому кластеру», отличаясь от популяций Южной Европы более высокой частотой гаплотипа 721*A-1805*T-745*С (Евдокимов, 2017). Такое расположение татар на диаграмме отражает сложную историю формирования этой популяции. Согласно исследованиям по различным генетическим системам, для татар характерно преобладание европейского компонента в генотипах. При этом нагайбаки, происходящие от татар и близкие им генетически, на диаграмме расположены на некотором отдалении от татар, поскольку обладают своими особенностями в распределении гаплотипов (в частности, более низкой частотой гаплотипа 721*A-1805*G-745*С), отражающими изолированный характер развития этой популяции (Чернова, 2014).

3. «Северо-азиатский кластер», представленный популяциями башкир ЧО, а также гуджаратцев, пенджабцев, бенгальцев, китайцев Хань и японцев. На образование этого кластера наибольшее влияние оказал гаплотип 721*С-1805*T-745*С. Башкиры ЧО располагаются на границе кластера рядом с южно-европейскими популяциями. Такое их расположение на диаграмме сходно с полученными ранее

результатами анализа генотипов башкир по генам системы HLA I типа (Чернова, 2014). Положение башкир на ординационной диаграмме на границе своего кластера, вблизи от европейских популяций обусловлено особенностями географического положения, занимаемого башкирами во время своего формирования: автохтонная для территории Южного Урала популяция башкир подвергалась генетическому влиянию со стороны народов, мигрировавших как с Запада, так и с Востока. Согласно данным по генетическому разнообразию мтДНК, башкиры характеризуются приблизительно равными долями европейских и азиатских гаплотипов в своём генофонде (Лобов, 2009).

4. «Южно-азиатский» кластер, состоящий из вьетнамцев и китайцев Дай. Формирование этого кластера связано с высокими частотами гаплотипа 721*A-1805*T-745*C.

Заключение

Таким образом, все популяции ЧО несут в генах TLR следы положительного инфекционного отбора, имевшего место на территории Европы. Данный отбор приводил к повышению выживаемости в популяции среди носителей сочетания аллелей TLR, связанных со сниженным провоспалительным ответом. В условиях частых эпидемий чумы, происходивших в Европе, когда острая патофизиологическая реакция приводила к гибели, сниженный провоспалительный ответ обеспечивал развитие толерантности по отношению к инфекционному стрессу. Толерантность, являясь более стабильной как тип адаптации, привела к закреплению вновь появившихся гаплотипов TLR, что проявляется в наличии неравновесного сцепления в таких гаплотипах. Встречаемость этих гаплотипов в отдельных популяциях различается, что отражает процессы миграции предков этих популяций и другие неадаптивные эволюционные процессы.

Дальнейшее подробное изучение механизмов, лежащих в основе толерантности макроорганизма к инфекционному стрессу, включающее, помимо генов иммунитета, и другие гены (гены энергетического метаболизма), позволит разработать высокоэффективные методы профилактики и лечения инфекционных заболеваний, новые методы коррекции аутоиммунных состояний. Особенно перспективно в этом отношении изучение механизмов толерантности, поскольку толерантность, в отличие от резистентности, не вызывает ответной резистентной реакции у патогена, а значит, не будет требоваться частая смена методики лечения (как в случае с антибиотиками).

2.5. Селекция человеческих популяций микробами (на примере популяционных различий HLA I, II класса)

В своё время прошлое тоже было современностью. Значит, видимое постоянство современности — обман, сама она ничем не отличается от истории. Все хвалёное настоящее — лишь момент, тут же становящийся прошлым, а вернуть сегодняшнее утро ничуть не легче, чем эпоху пунических или Наполеоновских войн. И, как это ни парадоксально, именно современность мнима, а история реальна.

Л. Гумилёв «От Руси до России»

Система HLA обладает максимальным генетическим разнообразием из всех известных генетических систем. Существует чрезвычайно большое количество аллелей HLA, известно более чем 12 000 для аллелей класса I и более 4000 для класса II (подробности см. в (Immuno Polymorphism..., 2018)). Это обусловлено ее основной функцией — презентацией антигенов Т-лимфоцитам с последующей активацией механизмов адаптивного иммунитета для элиминации патогена. Наибольшее генетическое разнообразие отмечается в участках, кодирующих антигенсвязывающий карман молекулы HLA. Высокополиморфная система HLA подстроена под крайнюю степень разнообразия патогенов микробного и аутопроисхождения. С другой стороны, такое множество белковых продуктов HLA необходимо для их взаимодействия с рецепторами другой полиморфной системы — естественных киллеров, что необходимо для воспроизведения механизмов адаптивного иммунитета. Некоторые аллели HLA связаны с большей чувствительностью к тому или иному заболеванию, другие, наоборот, с устойчивостью. Тот факт, что существуют аллели, придающие устойчивость к болезням, является неотъемлемым доказательством прошлого и текущего естественного отбора в генах HLA.

Такое влияние внешней среды как стресс, микробное окружение, заболеваемость, др. вместе с генетическими событиями в хромосомах (генетический дрейф, неравноценное сцепление) приводит в действие механизмы естественного отбора, которые действуют в популяциях в течение продолжительного времени на определённых территориях. Доказано, что гены HLA испытывают балансирующий естественный отбор в пользу гетерозигот. Гетерозиготы по HLA обладают эволюционным преимуществом перед гомозиготами по причине более широкого репертуара рецепторов к патогенам.

Таким образом, давление естественного отбора на генетическую область HLA приводит к тому, что в популяции устанавливаются определённые частотные характеристики аллельных вариантов генов и гаплотипов HLA, включая расширенные гаплотипы, в состав которых входят аллели и SNP, картированные в областях, выходящих за рамки HLA генов. Иммуногенетические показатели системы HLA, установленные в различных популяциях, такие как частота генов и гаплотипов, неравновесное сцепление — все это является неотъемлемой характеристикой популяции и позволяет в дальнейшем проводить научно-исследовательские работы, направленные на поиск ассоциаций HLA с заболеваниями.

Такие работы начали проводиться с 1980–90-х гг., когда все основные варианты HLA были протестированы с целью поиска генов, связанных с резистентностью или восприимчивостью к инфекционным заболеваниям. Эти исследования выявили большое количество ассоциаций с инфекционными заболеваниями; некоторые из наиболее изученных — проказа, малярия, хронический вирусный гепатит и далее в 90-е гг. — ВИЧ/СПИД (Blackwell et al., 2009). Однако эти ранние исследования имели определённые ограничения: размеры исследуемых когорт были небольшими, гены-кандидаты исследовались выборочно и не в полногеномном формате — все это не всегда позволяло точно отделить гены, непосредственно ассоциированные с заболеванием, от генов, имеющих более высокочастотные характеристики из-за высокого сцепления с интересующими генами.

Последующее развитие геномных методов исследования, в том числе полногеномных, выполненных с помощью метода NGS (*Next Generation Sequencing*), привело к взрывному увеличению количества данных. Миллионы генетических маркеров теперь могут быть легко определены в чрезвычайно больших обследуемых выборках, позволяя проводить исследования по связям генов или генных областей с развитием и течением различных заболеваний. Полногеномный поиск ассоциаций (*Genome-wide association study, GWA-study, GWAS*) приносит важный вклад в наше понимание того, как генетическая вариабельность генов HLA связана с ответом на патогены.

Недавнее исследование GWAS подтвердило, что вариабельность генов HLA напрямую связана с исходом многих инфекционных заболеваний. К ним относятся ВИЧ (Fellay et al., 2007), лепра (Zhang et al., 2009), гепатит (Kamatani et al., 2009) и туберкулёз (Sveinbjornsson et al., 2016). Другие исследователи (Tian et al., 2016) показали связь генов HLA как с вирусными (ветряная оспа, герпес, мононуклеоз, свинка, кожные папилломы), так и с бактериальными инфекциями (ЛОР-инфекции). Создавая точные карты по всему региону HLA, метод GWAS позволяет идентифицировать ассоциации в более узкой, конкретной области генома. Так, было показано, что несколько ассоциаций включают сайты с регулирующей функцией. Например, прогрессия СПИДа связана с 5'-UTR-регулятивным вариантом HLA-C (Kulkarni et al., 2011), а рецидив гепатита В связан с вариацией на 3'-UTR-сайте,

который модулирует экспрессию -DPB1 (Thomas et al., 2012). С эволюционной точки зрения это указывает на то, что селекция на генах HLA не ограничивается структурными доменами, участвующими в связывании пептидов, но также включает регуляторные варианты. И, наконец, полногеномные исследования позволяют точно определять последовательность аминокислот, кодируемых аллелями HLA, и, таким образом, проводить изучение ассоциации на молекулярном уровне, идентифицируя специфические изменения белка, которые связаны с устойчивостью или восприимчивостью к болезням (Nishida et al., 2016; Tian et al., 2016). Ещё больший прогресс достигнут при использовании метода GWAS в изучении генетических ассоциаций с аутоиммунными заболеваниями. Образцы десятков тысяч людей регулярно анализируются, а обширные ассоциации с регионом MHC или специфическими генами HLA постоянно устанавливаются в различных популяциях с такими заболеваниями, как диабет, артрит, целиакия, системная красная волчанка, анкилозирующий спондилоартрит, рассеянный склероз, псориаз и болезнь Крона (Meuer et al., 2018).

Селекция HLA под воздействием внешней среды может затрагивать любые аллели в различных этнических группах. Это объясняется отличиями в образе жизни, питании, микробном окружении, пр., поэтому все исследования, касающиеся ассоциаций HLA с заболеваниями и патологическими состояниями, должны проводиться в адекватных когортах. В данном разделе приводятся данные многолетнего исследования кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ЧелГУ по популяционному разнообразию системы HLA в различных этнических группах, проживающих в настоящее время на одной территории. Представляются основные закономерности распределения генов и гаплотипов HLA в различных этнических группах (русские, татары, башкиры), заселивших территорию ЧО в различные временные промежутки.

2.5.1. Этногенез основных популяций, проживающих в Челябинской области

На территории современной ЧО зарегистрировано несколько этносов. Согласно историческим данным, аутохтонным, образовавшимся около 2 тыс. лет назад и постоянно проживающим здесь населением, является башкирское население. Кроме них, на территории области обосновались иные национальности: татары, казахи, нагайбаки — те этнические группы, которые в своём историческом происхождении были скотоводческими племенами. Русские, заселившие этот край более 300 лет назад, были переселенцами из Европейской части России. Они имели многовековой земледельческий жизненный уклад. Различия в питании

и в микробном окружении могли явиться факторами внешней среды, которые оказывали давление, и в процессе естественного отбора приводили к образованию устойчивых гаплотипов HLA или исчезновению некоторых генов HLA в популяции. С целью сравнения иммуногенетического профиля HLA были исследованы основные популяции, проживающие на сегодняшний день в ЧО: русские — как представители восточно-славянского этноса, а также неславянское население ЧО — башкиры и татары.

Русские — основной этнос Российской Федерации, численность которого составляет 115,89 млн чел., или около 80 % населения страны (Всероссийская перепись..., 2010). Согласно официальным историческим данным, ЧО область заселялась русскими с конца XVII в. До этого времени край не входил в состав Российской империи, назывался Зауральская Башкирия, основным населением которого были степные кочевники: башкиры и казахи. Заселение русскими Оренбургской губернии, в которую входила сегодняшняя ЧО, продолжилось в XVIII в. с царской экспедиции И. К. Кириллова. Челябинская крепость была построена в 1736 г. и заселена крестьянами и казаками, преимущественно выходцами из Зауралья, Поморья, Прикамья и со Средней Волги (Самигулов, 2005). С конца XIX в., после окончания строительства Самаро-Златоустовской железной дороги, именно через Челябинск проходила миграция населения из европейской части России в Сибирь для освоения новых земель. За этот период через Челябинск мигрировало около 4 млн чел., а население города увеличилось к 1917 г. до 60 тыс. чел. В XX в., после индустриализации, строительства новых заводов, а также эвакуации ряда предприятий из центральной части Советского Союза во время Великой Отечественной войны, усилилась миграция населения в Челябинск (Самигулов, 2005). Сейчас в городе насчитывается 936 тыс. русских, что составляет 86 % населения (Всероссийская перепись..., 2010).

Таким образом, формирование русской этнической группы ЧО происходило из потомков переселенцев из европейской части России в течение последних 300 лет (10–12 поколений). Русские — восточно-славянский этнос, самый многочисленный народ Европы, антропологически относится к европеоидному типу (Балановская, Балановский, 2007).

Башкиры — единственный этнос, становление которого происходило на территории ЧО на протяжении трех последних тысячелетий. В 1–2 тыс. до н. э. индоиранские племена, соединившись с мигрировавшими монголоидными и финно-угорскими, образовали древние башкирские племена. В формировании башкирского этноса в более поздние времена принимали также участие кочевые татаро-монгольские племена и славянские народы Центральной и Восточной Европы. Уже к 13-му столетию башкиры сложились в самостоятельный этнос и с тех пор проживают на территории Башкортостана и ЧО. Антропологически башкиры относятся к уральской расе — переходной между европеоидами и монголоидами (Балановская, Балановский, 2007). Лингвистически — к тюркской ветви Алтайской языковой семьи.

Татары — тюркская по происхождению этническая группа, является вторым по численности этносом России. По данным переписи 2010 г., они составляют 3,72 % населения страны, что соответствует 5310,6 тыс. чел. Татары, проживающие в РФ, делятся на три основные этнотерриториальные группы (субэтноты) — волго-уральские, сибирские и астраханские. Татарское население проживает во всех регионах России, но больше всего в её европейской части.

Этногенез волгоуральских татар до сих пор точно не установлен; в настоящее время имеется три теории, объясняющие происхождение татар: болгаро-татарская, татаро-монгольская и тюркско-татарская. Болгаро-татарская подразумевает, что предками современных татар были жители Великой Булгарии — болгары IX в. н. э. Татаро-монгольская теория утверждает, что предками современных татар были монгольские завоеватели периода Золотой Орды, которые, смешавшись с кипчаками, и дали начало татарскому этносу. Третья теория — тюрко-татарская, предполагает, что татары образовались с участием волжских болгар и других тюркских племён, проживавших веками на территории Волжского бассейна и Прикамья. Особый субэтнос волго-уральских татар России представляют татары-мишари. Мишари — этническая группа татар, имеющая свой субдиалект татарского языка. Она складывалась на территории центра России (междуречье рек Цны и Мокши), в их этногенезе большую роль играли потомки Золотой Орды, мещерские племена, относившиеся к финно-уграм, уртасы, болгары. Мишари впоследствии мигрировали в район Поволжья и Приуралья. Татары говорят на татарском языке, представляющем кыпчакскую подгруппу тюркской группы алтайской языковой семьи, антропологически представлены четырьмя основными типами: понтийским, светлым европеоидным, сублапоноидным (волго-камским) и монголоидным (Балановская, Балановский, 2007).

В ЧО проживают 180913 тыс. татар (перепись населения 2010 г.) Численность татар, проживающих в ЧО, находится на третьем месте после Республики Татарстан (2012 тыс. чел.) и Республики Башкортостан (1009 тыс. чел.) (Всероссийская перепись..., 2010). В ЧО татары живут преимущественно в северных и северо-западных районах. Первые исторические указания о поселении татар в регионе относятся к началу XVII в.: описаны первые поселения татар-мишар (д. Усть-Багаряк и Караболка). Их количество увеличилось с развитием экспедиции царского правительства под руководством И. К. Кириллова. Служилые мишари (до XX в. их называли «мещеряки») и ясачные татары, являясь военным сословием, с середины XVIII в. были переселены в район деревень Муслумово, Курманово, Кунашак, где они проживают до нашего времени (Елисеева и др., 1965).

2.5.2. Иммуногенетический профиль (HLA) основных популяций, проживающих в Челябинской области

Иммуногенетическое типирование HLA было проведено среди потенциально здоровых доноров стволовых клеток ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови» различного этнического происхождения. В исследование вошли неродственные, случайно выбранные люди, постоянно проживающие на территории ЧО. Принадлежность к определённой этнической группе определяли по официальным документам и данным генеалогического анамнеза в трёх поколениях. Всего обследовано: русских — 1352, татар — 252, башкир — 272 чел.

В качестве материала для исследования использовали венозную кровь, взятую в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Выделение ДНК из представленных образцов проводили с использованием реагентов «Protrans DNA Box 500» (Германия) согласно инструкции производителя. Генотипирование выполнено методом PCR-SSP (Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction) с использованием наборов «Protrans», а также коллекцией праймеров, предложенных С. Darke и соавт. (Darke et al., 1998).

Для иммуногенетической оценки были использованы следующие статистические критерии:

- генная частота (gf) — доля определённого аллельного семейства среди всех аллельных семейств в исследуемой популяции;
- абсолютная частота положительных индивидуумов (f) — количество человек, носителей анализируемого аллеля;
- абсолютная частота гомозиготных индивидуумов (f_{hom}), частота гаплотипа (hf) — доля определённого гаплотипа среди всех гаплотипов в исследуемой популяции.

Соответствие наблюдаемого распределения аллельных семейств равновесию Харди — Вайнберга, оценку пятилокусных гаплотипов HLA (HLA: A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*) и определение гаметной фазы методом максимизации ожидания (*Expectation — Maximization algorithm*) рассчитывали в программе Arlequin (version 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010)). Различия по частотам встречаемости аллелей и гаплотипов проводили с помощью критерия хи-квадрат Пирсона, во всех случаях различия считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$, незначимыми — при $P > 0,10$.

Расчёт генетических расстояний проводили методом Нея, а построение дендрограммы — методом максимального правдоподобия в программе PHYLIP (version 3.68 (PHYLIP, 2018)). Материалом для расчётов послужили генетические частоты HLA-A*, HLA-B*, HLA-DRB1* в трёх популяциях, проживающих в ЧО (русские, башкиры, татары), а также в 20 мировых популяциях (Allele Frequency..., 2015). Анализ

главных компонент (*Principal Component Analysis, PCA*) проводили с использованием программы PAST (version 2.17 (Hammer et al., 2001)). Материалом для построения ординационной диаграммы послужили генетические частоты HLA-A*, HLA-B*, HLA-DRB1* в трёх популяциях ЧО области (русские, башкиры, татары) и в 42 мировых популяциях, представленных в мировой базе данных Allele Frequency (Allele Frequency..., 2015).

Результаты представлены в табл. 2.5.1 и 2.5.2. Все изученные локусы трёх популяций находятся в соответствии с равновесием по Харди — Вайнбергу.

Таблица 2.5.1

Частота встречаемости генов HLA -A*, -B*, -C*, -DRB1*, -DQB1* в популяциях русских, татар и башкир ЧО.

Абсолютная частота положительных индивидуумов f (чел.), гомозиготных индивидуумов f_{hom} (чел.) и относительная частота гена gf (%)

Аллельное семейство ¹	Русские (n = 1352)			Татары (n = 252)			Башкиры (n = 272)		
	f	f_{hom}	gf	f	f_{hom}	gf	f	f_{hom}	gf
A*01	278	29	11,35	60	3	12,50	46	1	8,60
A*02	662	122	28,99	125	20	28,77	145	29	32,00
A*03	402	36	16,20*	53	7	11,91	44	4	8,80*
A*11	153	8	5,95	37	0	7,34	33	0	6,10
A*23	62	2	2,37	6	0	1,19	8	1	1,70
A*24	270	10	10,36	47	3	9,92#	82	7	16,40*
A*25	122	3	4,62	14	0	2,78	6	1	1,30*
A*26	132	2	4,96	29	1	5,95	26	0	4,80
A*29	32	1	1,22	10	0	1,98#	2	0	0,40
A*30	47	0	1,74	15	0	2,98	13	0	2,40
A*31	71	0	2,63	16	1	3,37	29	0	5,30*
A*32	74	3	2,85	13	0	2,58	8	0	1,50
A*33	75	0	2,77	15	0	2,98	21	0	3,90
A*34	1	0	0,04	0	0	0,00	0	0	0,00
A*66	13	0	0,48	3	0	0,60	0	0	0,00
A*68	88	2	3,33*	26	0	5,16	37	1	7,00*
A*69	3	0	0,11	0	0	0,00	0	0	0,00
A*74	1	0	0,04	0	0	0,00	0	0	0,00
B*07	319	30	12,91	49	2	10,12	45	2	8,60*
B*08	170	6	6,51	29	0	5,75	25	1	4,80
B*13	169	1	6,29	41	2	8,53#	80	8	16,20*
B*14	80	0	2,96*	4	0	0,79	3	0	0,60*
B*15	149	3	5,62	18	0	3,57	27	0	5,00

Продолжение табл. 2.5.1

Аллельное семейство ¹	Русские (n = 1352)			Татары (n = 252)			Башкиры (n = 272)		
	<i>f</i>	<i>f</i> _{hom}	<i>gf</i>	<i>f</i>	<i>f</i> _{hom}	<i>gf</i>	<i>f</i>	<i>f</i> _{hom}	<i>gf</i>
B*18	191	4	7,21	27	0	5,36 [#]	13	0	2,40 [*]
B*27	130	4	4,96	25	3	5,56	18	1	3,50
B*35	286	15	11,13	52	2	10,71	50	3	9,70
B*37	24	0	0,89 [*]	10	0	1,98	5	0	0,90
B*38	105	2	3,96	22	0	4,37	15	0	2,80
B*39	78	0	2,89	15	0	2,98 [#]	5	0	0,90 [*]
B*40	135	4	5,14	23	0	4,56 [#]	44	3	8,60 [*]
B*41	67	0	2,48	17	0	3,37 [#]	6	0	1,10
B*42	1	0	0,04	0	0	0,00	0	0	0,00
B*44	263	16	10,32	39	0	7,74 [#]	18	0	3,30 [*]
B*45	8	0	0,30	2	0	0,40	0	0	0,00
B*46	2	0	0,07 [*]	5	0	0,99	8	0	1,50 [*]
B*47	5	0	0,19	0	0	0,00	0	0	0,00
B*48	20	0	0,74 [*]	11	0	2,18 [#]	30	1	5,70 [*]
B*49	57	0	2,11	11	1	2,38	12	0	2,20
B*50	30	0	1,11 [*]	19	0	3,77	17	0	3,10 [*]
B*51	106	0	3,92	26	0	5,16	39	0	7,20 [*]
B*52	57	0	2,11	9	0	1,79	9	0	1,70
B*53	3	0	0,11	2	0	0,40	0	0	0,00
B*54	0	0	0,00 [*]	2	0	0,40	5	0	0,90 [*]
B*55	27	2	1,07	6	0	1,19	5	0	0,90
B*56	33	1	1,26	3	0	0,60	2	0	0,40
B*57	69	1	2,59	15	0	2,98	15	1	2,90
B*58	30	0	1,11 [*]	11	0	2,18	22	0	4,00 [*]
B*73	1	0	0,04	1	0	0,20	5	1	1,10 [*]
C*01	115	7	4,51	30	4	6,75	34	3	6,80 [*]
C*02	154	7	5,95	19	1	3,97	16	0	2,90 [*]
C*03	252	19	10,02	42	1	8,53 [#]	94	14	19,90 [*]
C*04	323	31	13,09	52	6	11,51 [#]	30	2	5,90 [*]
C*05	125	6	4,85	17	1	3,57	9	0	1,70 [*]
C*06	300	15	11,65 [*]	82	8	17,86	108	17	23,00 [*]
C*07	643	107	27,74 [*]	97	18	22,82	89	10	18,20 [*]
C*08	97	2	3,66	15	0	2,98 [#]	32	1	6,10 [*]
C*12	311	24	12,39	60	1	12,10 [#]	36	0	6,60 [*]
C*14	22	0	0,81	5	0	0,99	5	0	0,90
C*15	46	0	1,70 [*]	16	0	3,18 [#]	34	2	6,60 [*]

Окончание табл. 2.5.1

Аллельное семейство ¹	Русские (n = 1352)			Татары (n = 252)			Башкиры (n = 272)		
	<i>f</i>	<i>f</i> _{hom}	<i>gf</i>	<i>f</i>	<i>f</i> _{hom}	<i>gf</i>	<i>f</i>	<i>f</i> _{hom}	<i>gf</i>
C*16	36	0	1,33	11	1	2,38	4	1	0,90
C*17	58	1	2,18	16	1	3,37 [#]	3	0	0,60 [*]
C*18	2	0	0,07	0	0	0,00	0	0	0,00
DRB1*01	352	29	14,09	55	3	11,51 [#]	31	1	5,90 [*]
DRB1*03	226	14	8,88	41	0	8,14	40	3	7,90
DRB1*04	271	13	10,50	58	0	11,51	54	3	10,50
DRB1*07	345	25	13,68 [*]	84	6	17,86	110	13	22,60 [*]
DRB1*08	84	1	3,14	10	0	1,98	23	1	4,40
DRB1*09	40	1	1,52 [*]	15	0	2,98	14	0	2,60
DRB1*10	30	0	1,11	10	0	1,98	6	0	1,10
DRB1*11	293	18	11,50 [*]	37	3	7,94	28	1	5,30 [*]
DRB1*12	66	2	2,52	14	0	2,78 [#]	35	0	6,40 [*]
DRB1*13	332	29	13,35	65	4	13,69	68	9	14,20
DRB1*14	48	0	1,78	15	0	2,98 [#]	33	2	6,40 [*]
DRB1*15	346	25	13,72	62	2	12,70	55	3	10,70
DRB1*16	112	2	4,22	20	0	3,97	11	0	2,00 [*]
DQB1*02	464	47	18,90 [*]	105	14	23,61	133	21	28,30 [*]
DQB1*03	763	132	33,10	135	19	30,56	135	25	29,40 [*]
DQB1*04	77	1	2,89	14	0	2,78	19	0	3,50
DQB1*05	527	67	21,97	96	8	20,64 [#]	75	6	14,90 [*]
DQB1*06	561	65	23,15	105	8	22,42	112	17	23,70

Примечание. Не обнаружены аллельные семейства: A*36, A*43, A*80, B*59, B*67, B*78, B*81, B*82, B*83. Различия между частотами генов статистически значимы по критерию хи-квадрат ($P \leq 0,05$) для: * — русских и татар, # — татар и башкир & — русских и башкир.

Таблица 2.5.2

Частота встречаемости гаплотипов HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 в популяциях русских, татар и башкир ЧО. Абсолютная частота содержащих аллели индивидуумов *f* (чел.) и относительная частота гаплотипов *hf* (%)

Гаплотипы HLA-A/B/C/DRB1/DQB1	Русские (n = 1352)		Татары (n = 252)		Башкиры (n = 272)	
	<i>f</i>	<i>hf</i>	<i>f</i>	<i>hf</i>	<i>f</i>	<i>hf</i>
A*03 B*35 C*04 DRB1*01 DQB1*05	75	2,77	13	2,58	3	0,55
A*11 B*35 C*04 DRB1*01 DQB1*05	25	0,93	4	0,79	—	—
A*33 B*14 C*08 DRB1*01 DQB1*05	30	1,11	—	—	—	—
A*01 B*08 C*07 DRB1*03 DQB1*02	112	4,14	14	2,78	17	3,12
A*33 B*58 C*03 DRB1*03 DQB1*02	13	0,48	2	0,40	3	0,55

Окончание табл. 2.5.2

Гаплотипы HLA-A/B/C/DRB1/DQB1	Русские (n = 1352)		Татары (n = 252)		Башкиры (n = 272)	
	f	hf	f	hf	f	hf
A*02 B*15 C*03 DRB1*04 DQB1*03	26	0,96	1	0,20	–	–
A*02 B*44 C*05 DRB1*04 DQB1*03	20	0,74	–	–	–	–
A*02 B*13 C*06 DRB1*07 DQB1*02	44	1,63	16	3,17	33	6,07
A*24 B*13 C*06 DRB1*07 DQB1*02	14	0,52	3	0,60	13	2,39
A*30 B*13 C*06 DRB1*07 DQB1*02	24	0,89	7	1,39	3	0,55
A*68 B*13 C*06 DRB1*07 DQB1*02	9	0,33	4	0,79	8	1,47
A*02 B*50 C*06 DRB1*07 DQB1*02	8	0,30	10	1,98	10	1,84
A*02 B*57 C*06 DRB1*07 DQB1*03	12	0,44	4	0,79	8	1,47
A*02 B*48 C*08 DRB1*07 DQB1*02	–	–	–	–	9	1,65
A*24 B*40 C*03 DRB1*08 DQB1*03	–	–	–	–	3	0,55
A*02 B*35 C*03 DRB1*08 DQB1*04	2	0,07	–	–	4	0,74
A*02 B*48 C*08 DRB1*09 DQB1*03	5	0,19	–	–	3	0,55
A*24 B*13 C*03 DRB1*12 DQB1*03	–	–	–	–	3	0,55
A*02 B*44 C*05 DRB1*12 DQB1*03	15	0,56	1	0,20	1	0,18
A*24 B*48 C*08 DRB1*12 DQB1*03	1	0,04	1	0,20	4	0,74
A*02 B*48 C*08 DRB1*12 DQB1*03	1	0,04	1	0,20	3	0,55
A*02 B*13 C*06 DRB1*13 DQB1*06	–	–	3	0,60	9	1,65
A*02 B*38 C*12 DRB1*13 DQB1*06	19	0,70	3	0,60	4	0,74
A*26 B*38 C*12 DRB1*13 DQB1*06	25	0,93	4	0,79	0	0,00
A*68 B*51 C*15 DRB1*13 DQB1*06	1	0,04	1	0,20	8	1,47
A*02 B*41 C*17 DRB1*13 DQB1*03	26	0,96	4	0,79	1	0,18
A*02 B*46 C*01 DRB1*14 DQB1*05	2	0,07	3	0,60	6	1,10
A*02 B*35 C*04 DRB1*14 DQB1*05	4	0,15	1	0,20	6	1,10
A*03 B*07 C*07 DRB1*15 DQB1*06	79	2,92	8	1,59	13	2,39
A*02 B*07 C*07 DRB1*15 DQB1*06	33	1,22	5	0,99	1	0,18
A*24 B*07 C*07 DRB1*15 DQB1*06	23	0,85	2	0,40	8	1,47
A*25 B*18 C*12 DRB1*15 DQB1*06	38	1,41	6	1,19	2	0,37
A*01 B*52 C*12 DRB1*15 DQB1*06	19	0,70	–	–	–	–
A*02 B*27 C*02 DRB1*16 DQB1*05	13	0,48	3	0,60	–	–
A*02 B*44 C*02 DRB1*16 DQB1*05	2	0,07	2	0,40	4	0,74
A*26 B*39 C*12 DRB1*16 DQB1*05	–	–	5	0,99	–	–

2.5.2.1. Иммуногенетический профиль (HLA) популяции русских

Представленные данные свидетельствуют о том, что в популяции русских ЧО в локусе HLA-A* обнаружено 15 аллельных семейств, наиболее частыми из которых являются A*01, *02 и *03. Более редкими, с частотой менее 0,03, являются аллели A*23, *29, *30, *32, *33, *66, *68, *69, *74. Не обнаружены A*34, *43, *80 — ($gf = 0$). В локусе HLA-B* самыми частыми аллельными семействами являются: B*07, *35 и *44. Семь из 26 аллельных семейств данного локуса встречаются значительно реже с частотой менее $gf < 0,01$ (B*37, *42, *45, *46, *47, *48, *53, *55, *73). Не определены в исследуемой популяции ($gf = 0$) следующие аллельные семейства HLA: B*54, *59, *67, *78, *81, *82, *83. В локусе HLA-C — максимальные частоты отмечены для C*03, *04, *06, *07, *12, низкая частота ($gf < 0,03$) определена в аллельных семействах — C*08, *15, *16, *17, *18. Среди генов II класса HLA в локусе HLA-DRB1* наиболее распространёнными аллельными вариантами оказались DRB1*01, *04, *07, *11, *13 и *15, частота каждого из них превысила 0,10. Редкими были отмечены аллельные семейства DRB1*09, *10, *12, *14, *16. В локусе DQB1* аллельные семейства DQB1*02, *03, *05, *06 представлены с наибольшей частотой, в то время как частота DQB1*04 минимальна и составляет всего $gf = 0,029$.

В табл. 2.5.2 представлены частоты некоторых гаплотипов HLA: A*-B*-C*-DRB1*-DQB1* в популяции русских ЧО. Высокая частота встречаемости гаплотипов может быть объяснена как широким распространением генов, в них входящих, так генетическим сцеплением между аллелями различных локусов. Это могло происходить за счёт низкого числа рекомбинаций в этом геномном пространстве и сохраняться при различных событиях — как демографических (миграция, смешение различных популяций), так и воздействия факторов внешней среды, оказывающих влияние на балансирующий естественный отбор в популяции в течение многих поколений.

Оценивая иммуногенетический профиль популяции русских ЧО по частоте генов, гаплотипов и силе неравновесного сцепления между некоторыми аллелями локусов HLA, можно утверждать, что русские ЧО практически идентичны русским, проживающим в других регионах России, а также европейским популяциям, проживающим на территории Европы (Евсеева и др., 2001; Suslova et al., 2012; Ricco et al., 2013; Allele Frequency..., 2015). Максимальное распространение в исследованной популяции имеет типичный европейский гаплотип A*01-B*08-DRB1*03 (АН 8.1), показывающий высокое сцепление в каждой паре генов. Аллельные семейства, входящие в этот гаплотип, также являются наиболее распространёнными в популяции. Второй по частоте встречаемости гаплотип A*03-B*07-DRB1*15 (АН 7.3) имеет частоту 2,9% у русских ЧО. Пары генов в этом гаплотипе имеют меньшую силу сцепления D' , особенно в парах A*03-B*07 ($D' = 34$) и B*07-DRB1*15 ($D' = 43$). Возможно, именно этим объясняется тот факт, в популяции с частотой, близкой к 1%, появляются гаплотипы A*02-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06, A*24-B*07-C*07-

DRB1*15-DQB1*06, в которых вместо слабо сцепленного A*03 определяется иной аллельный вариант в локусе A* и гаплотипы A*03-B*07-C*07-DRB1*01-DQB1*05 или A*03-B*07-C*07-DRB1*13-DQB1*06 ($hf = 0,5\%$) с иными, чем в анцестральном гаплотипе AN 7.3, генами HLA II класса. Гаплотип AN 7.3 более распространён в северной Европе (Ricco et al., 2013). А его меньшая стабильность в популяции русских ЧО по сравнению с AN 8.1 может быть объяснена его более ранним происхождением в ходе эволюции.

Третье место по распространённости у русских ЧО занимает гаплотип A*03-B*35-DRB1*01 (AN 35.3) ($hf = 2,77\%$). Он является самым распространённым в финно-угорских популяциях (финны, саамы России, Швеции, татары, чувашы России) (Евсеева и др., 2001; Allele Frequency..., 2015).

На 4-м месте по распространённости у русских ЧО находится гаплотип A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02. Гаплотипы A*25-B*18-C*12-DRB1*15-DQB1*06 и A*02-B*41-C*17-DRB1*13-DQB1*03 отличаются высокой сцепленностью в парах генов и встречаются в изучаемой популяции с частотой около 1%. Интересно отметить, что типичные европейские гаплотипы, включающие B*44, а именно, A*02-B*44-C*16-DRB1*07-DQB1*02 и A*23-B*44-C*04-DRB1*07-DQB1*02 находятся среди наиболее распространенных у русских, что подтверждает их генетическую общность с европейцами.

При оценке частот некоторых типичных азиатских и монголоидных гаплотипов у русских ЧО следует отметить, что их частота не превышает аналогичные показатели в европейских популяциях (Ricco et al., 2013; Allele Frequency..., 2015). Это верно в отношении гаплотипов A*33-B*14-C*08-DRB1*01-DQB1*05, A*33-B*58-C*03-DRB1*03-DQB1*02 и A*02-B*50-C*06-DRB1*07-DQB1*02 — частота каждого из них составляет соответственно ($hf = 1,11; 0,48$ и $0,30$) и частотных характеристик аллельных семейств, включённых в эти гаплотипы — A*33, B*50, *58. Генетическая удалённость исследуемой популяции от популяций Азии подтверждает ещё тот факт, что у русских ЧО встречаются с минимальной частотой и другие аллельные семейства, более характерные для азиатских популяций, такие как B*48, *53, DRB1*09, *12, *14. Кроме того, у русских ЧО всего лишь в единичных случаях определяются такие типичные азиатские аллели, как: B*46, аллельное семейство, характерное для китайских и тайваньских популяций; B*54, более распространённый в Японии и Монголии; а также B*42, встречающийся в Северной Африке и Южной Америке (Allele Frequency..., 2015).

Таким образом, иммуногенетический анализ популяции русских позволяет сделать утверждение, что русские ЧО являются типичной европейской популяцией с небольшими особенностями, отражающими вклад в этногенезе финно-угорских племён (A*03, B*35, DRB1*01), а также возможное влияние кочевых азиатских народов (B*13 и DRB1*07), ранее населявших данную территорию.

2.5.2.2. Иммуногенетический профиль (HLA) популяции башкир Челябинской области

В популяции башкир ЧО в локусе А с различной частотой определено 14 из 18 известных генов. Не встречались ($gf = 0$) специфичности HLA-A*34, *43, *66, *69, *74. Наиболее распространён в данной популяции вариант гена A*02, его частота составляет $gf = 0,32$ что несколько выше, чем во многих европеоидных и монголоидных популяциях России. 0,20–0,30 (Евсеева и др., 2001; Johansson et al., 2008; Suslova et al., 2012; Ricco et al., 2013; Чернова, 2014). Вторым по частоте встречаемости в локусе HLA-A у башкир, проживающих в ЧО, определён A*24 ($gf = 0,16$). Данный вариант гена более характерен для азиатских популяций, чем для европеоидных. У башкир он определяется достоверно выше, чем у русских Санкт-Петербурга, Кирова, Самары, но достоверно ниже, чем у многих монголоидных популяций России: бурят, тувинцев, якутов, а также ненцев, саамов, оставаясь на одном уровне с аналогичным показателем у казахов и чувашей (Arnaiz-Villena et al., 2003; Kuganov, 2014). Частота типичного европейского варианта гена A*01 у башкир немного снижена по сравнению с русскими, также как и у бурят, тувинцев, чувашей, но в меньшей степени, чем у ненцев и саамов (Евсеева и др., 2001; Arnaiz-Villena et al., 2003). Частота встречаемости специфичности A*68 у башкир составляет 0,07, что достоверно и в несколько раз превышает этот показатель у европейских и монголоидных народностей России.

Отличительной особенностью распределения аллелей локуса В у башкир, проживающих в ЧО, является высокая частота встречаемости В*13 ($gf = 0,16$). Этот показатель в несколько раз и достоверно выше, чем в любой европейской или монголоидной популяции России (0,02–0,04) (Евсеева и др., 2001; Arnaiz-Villena et al., 2003; Сулова и др., 2011; Allele Frequency..., 2015). Сопоставима такая высокая частота встречаемости гена В*13 только с популяциями парси Пакистана (зороастрийцев), частота В*13 в которой составляет $gf = 0,143$, и северных китайцев с $gf = 0,095$, но не монголов. Ближе всего частоты этого варианта гена отмечаются в России среди панмиктического населения городов Кирова и Ростова на Дону (Bubnova et al., 2008). Вторым по частоте встречаемости в локусе В в башкирской популяции отмечается ген В*51 ($gf = 0,072$). Частоты этого гена максимальны (более 0,20) в популяциях, расположенных на широтах 30N–45N (соответствующих историческому Шёлковому пути), например у турок, народностей Ирана, Саудовской Аравии (Allele Frequency..., 2015). У русских его частота не превышает $gf = 0,039$. Частоты варианта гена В*51 у башкир сопоставима с казахами и несколько выше, чем у бурят и тувинцев.

Широко распространён в башкирской популяции вариант аллельного семейства HLA В*40 ($gf = 0,086$), занимающий 3-е место по частоте встречаемости. В*40 — вариант гена, характерный для азиатских популяций и встречающийся

в монголоидных популяциях с частотой $gf = 0,12-0,18$. В европейских популяциях он встречается намного реже $gf = 0,03-0,07$. У башкир ЧО В*40 достоверно ниже, чем у бурятов и якутов и не отличается от таковой у русских и чувашей (Arnaiz-Villena et al., 2003; Suslova, 2012).

На 4-м месте по частоте встречаемости в башкирской популяции отмечается вариант аллельного семейства В*48 ($gf = 0,057$). Этот ген практически не встречается в европеоидных популяциях, а в монголоидных отмечается с частотами не более $gf = 0,02-0,04$. Таким образом, частота данного гена у башкир ЧО превосходит его частоту в европейских и монголоидных популяциях России и является отличительной особенностью данной популяции. Ещё только в одной популяции России, а именно у коренного северного народа европейской части России — ненцев, данный вариант аллельного семейства был обнаружен У них частота В*48 статистически значимо выше, чем у башкир ($P = 0,01$) (Евсеева и др., 2001).

Вариант аллельного семейства В*46, обнаруженный у башкир с частотой 0,015, практически не встречается в популяциях России, изученных на сегодняшний день, но является типичным для китайских популяций и является редкочастотным в Европе.

Частота типичных европейских специфичностей В*08,*44, которые характерны и для русских России, у башкир достоверно снижена, так же как и в других монголоидных популяциях России, а именно у тувинцев, бурятов, казахов, а также саамов и ненцев (Евсеева и др., 2001; Чернова, 2014).

Другим типичным и распространённым в европейских популяциях, особенно Севера Европы и в финно-угорских, является вариант гена В*07 (Johansson et al., 2008; Wennerström et al., 2013). Частота встречаемости HLA-B*07 ($gf = 0,086$) у башкир достоверно меньше, чем у русских севера России — жителей Санкт-Петербурга, Кирова, поморов. Вариант этого аллельного семейства достоверно выше у ненцев и чувашей, чем у башкир. Примерно равны частоты В*07 у башкир и казахов, саамов и южно-сибирских монголоидных популяций. У тувинцев и якутов частота этого гена снижена в большей степени, чем у башкир по сравнению с русскими. Вариант аллельного семейства В*58, входящего в состав распространённого анцестрального азиатского гаплотипа А*01-В*58-DRB1*03 (АН 58.1), встречается у башкир с частотой $gf = 0,04$, что в несколько раз ниже, чем в китайских, монгольских, и японских популяциях. Вариант аллельного семейства В*73, крайне редко встречающийся как в монголоидных, так и европеоидных популяциях, был обнаружен у пятерых башкир ($gf = 0,011$). Причём во всех случаях он входил в состав консервативного гаплотипа В*73-С*15-DRB1*04-DQB1*0201, ранее не обнаруженного ни в одной из исследованных мировых популяций. В локусе А в данном гаплотипе у башкир были представлены аллельные семейства А*32,*30,*02. Гаплотип А*32-В*73-С*15-DRB1*04-DQB1*0201 был обнаружен при секвенировании денисовского человека, и, как предполагают учёные, появился у лиц монголоидной расы интрогрессией

от неандертальцев (Abi-Rached et al., 2011; Meyer et al., 2018). Наибольшая частота HLA-B*73 выявлена в популяциях Ливии и пакистанских парси (Allele Frequency..., 2015).

Результаты иммуногенетических расчётов по генам HLA II класса показывают, что в локусе DRB1* у башкир ЧО с различной частотой обнаружены все исследуемые гены. Превалирует в популяции вариант гена DRB1*07. Такая неожиданно высокая ($gf = 0,226$) частота DRB1*07 отмечается только в некоторых популяциях, сформировавшихся на территории современной России в процессе исторического развития и проживающих там в настоящее время. Это представители волго-уральского региона — удмурты, татары ($gf = 0,24$), представители центрально-сибирских популяций — буряты ($gf = 0,20$ и $gf = 0,13$ по данным двух независимых работ) и центральносибирская народность — манси ($gf = 0,17$) (Kuranov et al., 2014). Интересно отметить, что, кроме того, частота встречаемости DRB1*07 более $gf = 0,20$ установлена у некоторых древних народностей Ирана — у зороастрийцев — $gf = 0,22$ и хузестанских арабов — $gf = 0,21$, и в родственной им популяции Пакистана, так называемых парси (зороастрийцев) — $gf = 0,18$. То есть, популяций, которые своей гипотетической прародиной называют Центральную Азию и Юг России (Mohyuddin, Mehdi, 2005). Все эти популяции имели скотоводческий уклад жизни в процессе своего исторического развития, поэтому возможно предположить, что лица с DRB1*07 имели селективное преимущество при столкновении со специфическими зооантропонозными инфекционными агентами.

DRB1*01, *03, *11 у башкир ЧО снижен по сравнению с русским, так же, как и у южно-сибирских, финно-угорских народностей, калмыков, казахов, ненцев, др. (Хаитов и др., 2005). DRB1*12 встречается с частотой 0,064 у башкир ЧО. Этот ген ещё более широко ($gf > 0,10$) представлен в монголоидных популяциях Сибири — манси, буряты, тувинцы, тоджа, а также у казахов, и ненцев — $gf = 0,16$. Это намного выше, чем у русских различных регионов России, и чем в европейских популяциях Европы, его частота не превышает $gf = 0,01-0,03$ (Хаитов и др., 2005). Частота встречаемости остальных генов HLA-DRB1*, а также распределение частот HLA-DQB1* у башкир ЧО не имеет характерных особенностей.

Таким образом, оценивая иммуногенетический профиль башкир ЧО, можно отметить следующие характерные признаки: во-первых, ведущим отличительным признаком башкир, проживающих в ЧО, от европеоидных и монголоидных популяций России являются необычно высокая частота HLA: A*68, B*13 и B*48, DRB1*07 и DQB1*02, гаплотипов A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02, A*24-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02, A*02-B*48-C*08-DRB1*07-DQB1*03, A*68-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02. Эти уникальные признаки не повторяются ни в одной из исследованных на сегодняшний день популяций России. Во-вторых, близость популяции башкир к азиатским популяциям подтверждается высокими частотами A*24, B*40, DRB1*12, а также распространением в популяции частот A*33, B*50, B*58, B*46, гаплотипов HLA:

A*02-B*50-C*06-DRB1*07-DQB1*02, A*024-B*48-C*08-DRB1*12-DQB1*03. В-третьих, популяция башкир имеет иммуногенетическую общность и с европейскими популяциями — на это указывают отличные от нуля частоты HLA: A*01, A*03, В*07, В*08, В*35, В*44, DRB1*01, 03, гаплотипов A*01-B*08C*07-DRB1*03-DQB1*02 и особенно A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*02. И наконец, в отличие от русских и татар ЧО, башкиры не имеют иммуногенетических признаков, показывающих сходство башкир с финскими народностями финно-угорской языковой семьи.

2.5.2.3. Иммуногенетический профиль (HLA) популяции татар

Третьим этапом нашей работы было проведение иммуногенетического анализа HLA у татар, проживающих в ЧО. Результаты исследования также представлены в табл. 2.5.1 и 2.5.2. Они свидетельствуют, что в популяции татар ЧО наиболее частыми аллельными семействами локусов HLA I и II класса являются аллели A*01, *02, *03, *11, *24; В*07, *13, *18, *27, *35, *40, *44; С*03, *04, *06, *07, *12; DR*07, *01, *03, *07, *08, *11, *13. Высокие частоты данных аллельных семейств типичны для любой европеоидной популяции. Аллельные варианты, определяющиеся по данным литературы как характерные азиатские, а именно — A*33, *31; В*52*54, *46, *48; DR*09, *10, *12, встречаются у татар с минимальной частотой. Все эти признаки позволяют нам утверждать, что татары России являются принципиально европейской популяцией.

О том же говорит и частота гаплотипов HLA, наиболее распространены: A*03-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05 ($hf = 2,58\%$), A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06 ($hf = 1,59\%$), и сходные с ним A*03-B*07-C*07-DRB1*13-DQB1*06 ($hf = 1,9\%$), A*02-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06 ($hf = 0,99\%$). Частота анцестрального АН 8.1 составляет 2,78%, что несколько ниже, чем в европейских популяциях. Из гаплотипов, встречающихся чаще в азиатских популяциях, у татар ЧО, наиболее распространён A*02-B*50-C*06-DRB1*07-DQB1*02. Он занимает 4-е место в числе наиболее распространённых гаплотипов в данной популяции с частотой 1,98%. Наиболее встречаем в популяции азиатский гаплотип A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1* с частотой $hf = 3,17$.

При сравнении популяций уральских татар с русскими, проживающими в ЧО, можно отметить лишь небольшие различия в частотных характеристиках обеих популяций. Так, у татар ЧО повышены частоты аллельных семейств A*68; С*06; DRB1*07, *09; DQB1*02 и снижены A*03; В*14; С*07, *15; DRB1*11. Следует отметить у татар некоторое снижение частот аллелей, входящих в анцестральные европейские гаплотипы АН 8.1, АН 7.3. Имеется также и некоторое различие в частотах наиболее распространенных гаплотипов. У татар наиболее распространены гаплотипы A*03-B*35-C*03-DRB1*01-DQB1*05; A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02 и A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02, в то время как у русских A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02; A*03-B*35-C*03-DRB1*01-DQB1*05 и A*03-B*07-C*07-DR*15-DQB1*06.

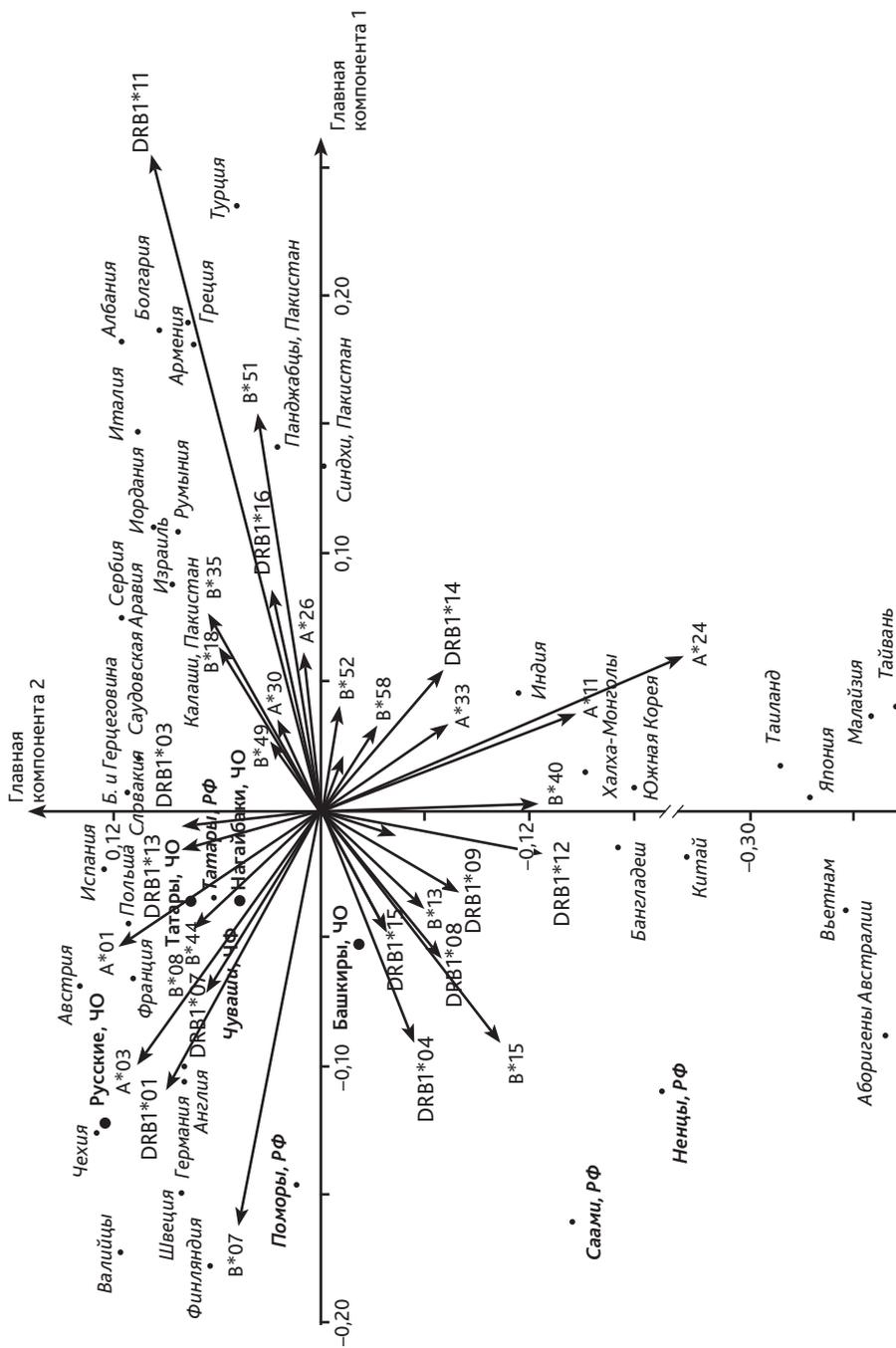
Сравнение иммуногенетического профиля татар и башкир, проживающих в ЧО, показывает более резкие отличия между этими двумя этническими группами, а именно: у татар достоверно выше частота A*29, B*18,*39,*41,*44, C*04,*12,*17; DRB1*01; DQB1*05, в то время как частоты A*24; B*13,*40,*48, C*03,*08,*15; DRB1*12,*14 существенно снижены. Следует отметить, что частоты аллельных семейств A*24, B*13,*40,*48, DRB1*12,*14 являются характерной чертой башкирской популяции, отличающей её от многих европейских и даже азиатских, придавая ей иммуногенетическое своеобразие и отражая древнее происхождение и многовековую обособленность башкир от остальных народностей России. Частоты наиболее распространенных гаплотипов у татар и башкир также различны (см. табл. 2.5.2). У башкир это гаплотипы, включающие превалирующие в популяции B*13, 48, DRB1*07, *12, в то время как у татар это гаплотипы A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02, характерный также для европейских популяций и популяции русских, гаплотип A*03-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05, характерный для финских популяций финно-угорской языковой семьи и A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02, превалирующий у башкир.

Сравнение иммуногенетического профиля татар ЧО, с другими этническими группами региона, показало их близость к русским, проживающим на той же территории. Кроме сходства русских и татар по частотным характеристикам основных аллельных семейств HLA, характерным для европейских популяций, следует предположить, что обе популяции в своём историческом развитии имели выраженное влияние финской части финно-угорских популяций (высокие частоты B*35, C*04, DRB1*01 и гаплотипа A*03-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05). В то же время у татар и башкир есть нечто общее, что позволяет отличить эти тюркские этносы по иммуногенетическим показателям от славянских и других европейских популяций: равные и относительно высокие частоты B*13,*46,*48,*50,*54,*58 и достаточно высокие частоты гаплотипов, из них состоящие.

2.5.3. Сравнение распределения частот генов HLA популяций Челябинской области с мировыми популяциями

Графическая иллюстрация сходства и различия популяций различного этнического происхождения представлена на рис. 2.5.1 и 2.5.2, построенных на основании данных о генных частотах аллельных семейств.

На ординационной диаграмме (рис. 2.5.1) представлены результаты анализа главных компонент, согласно которым популяции русских и татар ЧО находятся в верхней левой четверти диаграммы — вместе со всеми европейскими популяциями. Русские ЧО находятся в непосредственной близости к западнославянским популяциям — Чехии, Польши, также Австрии, Германии, Швеции. Также видно,



что наибольший вклад в подобное распределение популяций внесли частотные характеристики аллельных семейств A*01,*03, B07,*08, DRB1*01. Популяция татар ЧО, располагаясь в том же фрагменте европейских популяций, приближена к татарам Татарстана, чувашам, нагайбакам, и эта близость обеспечена частотными характеристиками аллельных семейств A*26, B*08, B*44,*27, DRB1*07,*13. В правом верхнем квадрате диаграммы располагаются южнославянские популяции Боснии и Герцеговины, отличающиеся от остальных популяций Европы, расположенных в Центральной и Северной Европе, другие средиземноморские популяции, азиатские популяции Саудовской Аравии, Иордании, а также популяции Пакистана.

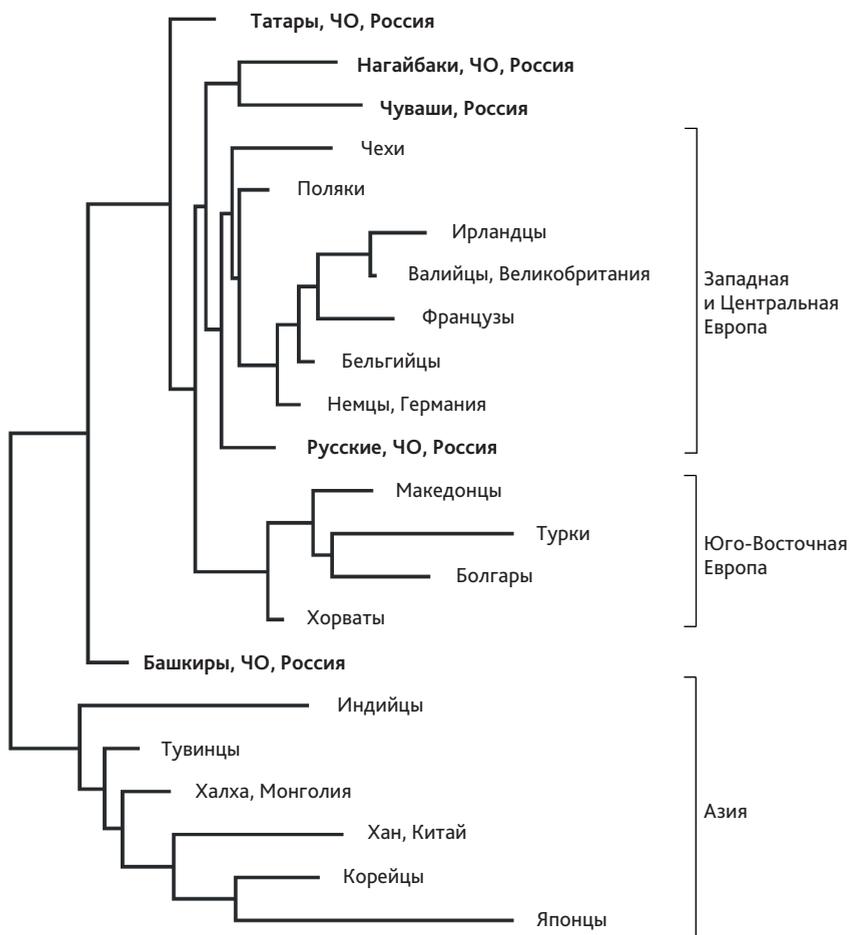


Рис. 2.5.2. Дендрограмма сходства популяций ЧО и 20 мировых популяций (согласно (Allele Frequency..., 2015)) по частотам HLA-A, -B и -DRB1

Они находятся в одном сегменте графика за счёт A*30, B*35,*51 DRB1*11,*16, частоты которых в азиатских и пакистанских популяциях максимальны, а у южных славянских этносов отражают турецкое влияние в этногенезе. В нижней правой половине диаграммы находятся монголоидные популяции (халха-монголы) за счёт преобладания частот A*24,*33, B*40,*58, DRB1*10,*14. Популяция башкир располагается в нижнем левом квадрате диаграммы, на достаточном расстоянии от популяции ненцев и саами России. Они отдалены как от европейских, так и от азиатских средиземноморских популяций, и наибольший вклад в эту обособленность, согласно диаграмме, внесли частотные характеристики аллельных семейств A*31, B*13,*48,*54, DRB1*04,*08*09*12.

На рис. 2.5.2 представлена дендрограмма, построенная согласно величине генетических дистанций. Согласно ей, популяции русских и татар ЧО расположены вместе с другими европейскими популяциями в кластере «Западная и Центральная Европа», а башкиры ЧО приближены к азиатским популяциям.

Заключение

Таким образом, каждая из исследованных популяций, проживающих в ЧО, имеет свои иммуногенетические особенности: русские — типичные признаки европейской популяции с вкладом аллельных семейств, характерных для финнов финно-угорских народностей и кочевых народов Евразии. Татары по иммуногенетическим признакам также являются типичными европейскими, но несущими больший, чем русские, вклад азиатских генов HLA и генов финских народов. Башкиры — уникальная популяция, несущая свои специфичные HLA частотные характеристики, в основе которых лежат азиатские гены, имеющая, кроме того, некоторый пласт европейских генов и не показывающий схожест с финскими (но не угорскими) популяциями.

Знание иммуногенетического профиля популяций, проживающих в регионе, необходимо для проведения научно-исследовательских работ по поиску ассоциаций HLA с заболеваниями. Можно утверждать, что для населения ЧО следует проводить отдельный поиск ассоциаций в однородной этнической популяции для русских и башкир.

Полученные данные отражают также тот факт, что для каждой изученной популяции характерно своё специфическое микробное окружение. Встреча с различными инфекционными агентами (в зависимости от специфики уклада жизни это могли быть антропонозы или зооантропонозы) привела к селекции генов иммунного ответа, ответственных за их презентацию, что нашло отражение в изменении частот встречаемости аллелей и гаплотипов в этих популяциях.

Установление в определённых этнических группах в регионе ассоциативных с заболеваниями генов HLA а также генов, имеющих устойчивость к заболеваниям и приводящих к более мягкому течению, — все это, в конечном счёте, приведёт к адекватному выбору метода лечения, кратности профилактических осмотров, успешности фармакотерапии.

2.6. Генетический полиморфизм системы цитокинов при дезадаптации человека на примере воспалительных заболеваний кишечника

В жизни все просто: счастье целиком зависит от везения и от генов. Все сводится к генам и к везению. А если задуматься, то и гены — это вопрос везения.

Джордж Карлин

Согласно автору концепции и термина «стресс» Гансу Селье, любая болезнь связана с проявлением стресса. Воздействуя на организм человека, чрезмерные стрессовые факторы могут явиться причиной различного рода заболеваний, например соматических: язвы желудка и кишечника, неспецифического язвенного колита, гипертонической болезни, аритмии, болезни Рейно (резкий спазм сосудов конечностей), мигрени, бронхиальной астмы, экземы. Кроме того, показано, что под влиянием стрессовых воздействий инфекционные болезни приобретают тяжёлое затяжное течение, за счёт иммунодепрессии могут возникать опухоли. Немалая роль стресса и в развитии психических нарушений: неврозов, депрессивных и психосоматических состояний. Абсолютное большинство заболеваний человека относится к полигенным. Причины возникновения многих из них до конца не ясны, хотя выявлено множество факторов предрасположенности, включая как генетические, так и факторы окружающей среды (Львовс, 2012).

Полигенные заболевания, к которым относятся воспалительные заболевания кишечника (Болезнь Крона, неспецифический язвенный колит) и синдром раздражённого кишечника, возникают в результате совместного вклада множества независимо действующих или взаимодействующих полиморфных генов, причём

вклад каждого из них по отдельности может быть невелик или вовсе не проявляться (Львовс и др., 2012). В основе наследственной предрасположенности к данным патологиям, как известно, лежит специфическая комбинация аллелей нескольких генов, характеризующаяся кумулятивным эффектом и возможными эпистатическими взаимодействиями, которые оказывают влияние на развитие заболевания или же на модификацию клинических проявлений болезни (Львовс и др., 2012; Кипень, 2015; Шевченко, 2015).

В норме многие органы, в том числе слизистая оболочка кишечника, находятся в состоянии «контролируемого» воспаления, регулируются сложным балансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

Высказывается предположение о том, что неблагоприятные факторы внешней среды, воздействуя на комменсальную микробиоту, приводят к изменению стабильности микробиоценоза и численности видового состава. Как следствие, изменённая микробиота и продукты её жизнедеятельности служат аутоантигенами, приводящими к потере толерантности хозяина, в результате чего может развиваться состояние хронического воспаления, характеризующееся цитокиновым дисбалансом. Среди воспалительных цитокинов важнейшее значение имеют фактор некроза опухоли — альфа (TNF- α), интерлейкин-1 (IL-1), IL-6, IL-8 и IL-12, которым «противостоят» противовоспалительные цитокины IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 (Macsharry et al., 2008).

Неспецифический язвенный колит (НЯК) — это хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание слизистой оболочки толстого кишечника, занимающее одно из ведущих мест среди заболеваний органов пищеварения по распространённости (Рекомендации..., 2015). Согласно современной концепции патогенеза, НЯК — заболевание с аутоиммунным компонентом, на иммунопатогенез которого оказывает влияние дисбаланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (Zhou et al., 2017). В доступных источниках литературы показано, что микробиота кишечника у пациентов с НЯК обладает сниженным разнообразием в сравнении со здоровыми людьми. Так, по данным генетических исследований, у таких больных микробных генов на 25 % меньше. У пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, в том числе у больных с неспецифическим язвенным колитом, отмечается меньшее количество представителей типов *Firmicutes* и *Bacteroidetes* и увеличенное — *Actinobacteria* и *Proteobacteria* (Reddy, Brandt, 2013). До сих пор не ясно, являются ли эти изменения причиной или последствиями НЯК.

Синдром раздражённого кишечника (СРК) — функциональное расстройство кишечника, проявляющееся рецидивирующей болью в животе, возникающей по меньшей мере 1 раз в неделю, которая характеризуется следующими признаками (двумя или более): связана с дефекацией, с изменением частоты стула и/или формы стула. Согласно современной концепции патогенеза СРК, в формировании данного заболевания важную роль играют генетическая предрасположенность,

а также психосоциальные факторы, включающие в себя стрессовые ситуации, нарушение копинга (способности преодолевать стресс) и недостаточную социальную поддержку. Сочетание данных составляющих приводит к развитию висцеральной гиперчувствительности и нарушению моторики кишки (Синдром..., 2017).

Согласно биопсихосоциальной модели развития СРК, предложенной Г. Энгель (Engel, 1980), при СРК возникает расстройство регуляции между центральной нервной системой (ЦНС) и автономной энтеральной нервной системой (ЭНС). В норме ЭНС регулирует основные функции кишечника — моторику, абсорбцию и секрецию при минимальном влиянии со стороны симпатической и парасимпатической систем. Во время действия сенсibiliзирующего фактора любые отклонения функции кишечника вызывают активацию большого числа спинальных нейронов, вызывая синдром спинальной гипервозбудимости, связанный с активацией большого числа молекул азота, и корригирующий рефлекторный ответ воспринимается как болезненный. Наличие генетической предрасположенности в сочетании с воздействием сенсibiliзирующего фактора может способствовать формированию длительной следовой памяти о боли у некоторых лиц. Обычные, а не чрезмерные отклонения, вызывают выраженный болевой ответ, соответствующий воздействию стрессорного сенсibiliзирующего фактора (Дорофеев, Рассохина, 2011).

Как известно по данным литературы, микробиота кишечника оказывает трофическое обеспечение слизистой кишечника и, в частности, её эпителиального слоя, а также регулирует моторику кишечника. Наличие дисбактериоза является одним из факторов развития иммунных нарушений, в том числе и при СРК (Ивашкин, Шептулин, 2002, Родионова, Бабаева, 2011). Существуют доказательства влияния изменённого состава микробиоты кишечника на патофизиологию СРК, но этиологическая роль остаётся неопределённой (Rajilić-Stojanović et al., 2011).

Участие цитокинов в патофизиологических процессах при СРК подтверждают данные лабораторных исследований: снижена экспрессия иммунорегуляторных цитокинов и повышена экспрессия провоспалительных цитокинов (Ивашкин, Шептулин, 2002; Родионова, Бабаева, 2011; Hotoleanu et al., 2008; Rodriguez-Fandiño et al., 2010).

В последние годы отмечается стремительный рост НЯК и СРК во всем мире. Наиболее высока тенденция роста заболеваний в индустриально развитых странах (Шумилов, 2010). Высокие уровни заболеваемости также связывают с увеличением экологической нагрузки, нарушением характера и режима питания, употреблением рафинированных продуктов, высоким уровнем стресса у жителей мегаполисов (Дорофеев и др., 2014).

Прослеживается отчётливая связь между активностью заболевания и психоэмоциональными факторами. Стрессовые ситуации часто оказываются пусковым механизмом в возникновении заболевания, развитии обострения и рецидивов болезни. Длительное хроническое течение СРК может вызвать развитие вторич-

ных психических нарушений (депрессия, лабильность настроения, склонность к анорексии) (Волосников и др., 2016).

Таким образом, гены цитокинов могут служить генами-кандидатами предрасположенности к мультифакторным патологиям. Благодаря высокой степени полиморфизма для цитокинов характерны следующие особенности функционирования: если полиморфные сайты присутствуют в промоторной области гена, они влияют на уровень экспрессии гена, замены в кодирующей области могут приводить к аминокислотным заменам в молекуле цитокина, что вызывает конформационные изменения белка и, как следствие, изменение функциональной активности.

В связи с особенностями функционирования ни один из цитокинов не существует и не проявляет своей активности изолированно. В совокупности цитокины формируют разветвлённую и многоуровневую цитокиновую сеть (рис. 2.6.1).

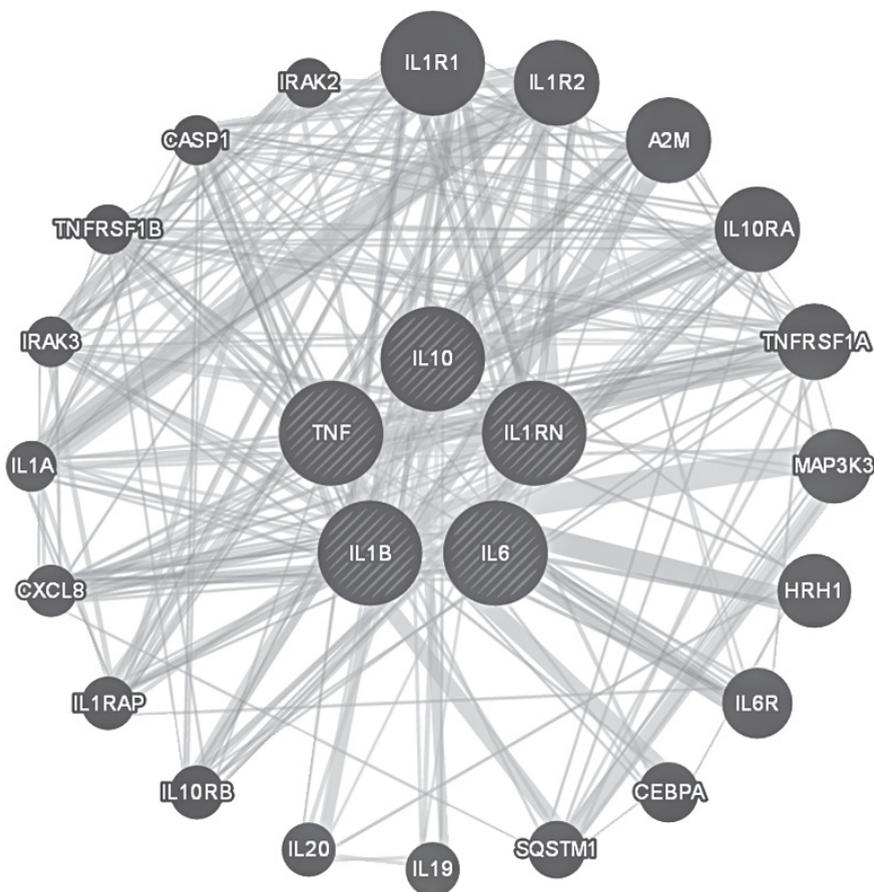


Рис. 2.6.1. Цитокиновая сеть генов IL1b, IL1Ra(N), TNFA, IL6, IL10 согласно (GeneMANIA, 2018)

Для её правильного функционирования необходимо строгое соблюдение баланса как самих цитокинов, так и их рецепторов, содержание которых подвергается существенным изменениям в зависимости от состояния участвующих во взаимодействиях клеток. При физиологическом состоянии количество вырабатываемых цитокинов достаточно мало, однако при стрессовом воздействии увеличивается их количественный и качественный состав, начинают преобладать цитокины с дистантной или системной активностью, обеспечивающие «сигнал тревоги», вызывающий перестройку работы всех систем организма для адаптации к стрессовым воздействиям. Описаны случаи увеличения уровня IL-1 в плазме крови при стрессовых ситуациях и тяжёлой физической нагрузке (Сибиряк и др., 2006), сделано предположение, что увеличение концентраций происходит под влиянием стрессовых факторов неинфекционной природы.

Кроме того, показано, что IL-6 является активатором гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, а глюкокортикоиды регулируют его секрецию по принципу отрицательной обратной связи. IL-6 в значительной степени стимулирует секрецию соматотропного гормона, подавляет секрецию тиреотропного гормона и снижает концентрацию липидов в крови. Секреция IL-6 усиливается под влиянием стресса и регулируется катехоламинами по принципу положительной обратной связи. Гиперпродукция IL-6 может способствовать развитию заболеваний в период старения и при хроническом стрессе (Papanicolaou et al., 1998).

В случае несостоятельности местных защитных реакций повышенный синтез цитокинов обеспечивает эффективную активацию системной воспалительной реакции. В результате будет наблюдаться дисбаланс с преобладанием провоспалительных цитокинов, оказывающих своё влияние на ЦНС, что будет отражаться в снижении аппетита, повышении температуры, изменении комплекса поведенческих реакций, все это необходимо для борьбы с патогенами и/или адаптацией к стрессовым воздействиям неинфекционной природы. Таким образом, цитокины осуществляют связь между иммунной, нервной, эндокринной и другими системами и служат для вовлечения их в организацию и регуляцию единой защитной реакции. Нормальная работа цитокиновой сети во многом базируется на механизмах, лежащих в основе регуляции экспрессии генов цитокинов и функционирования их полиморфных вариантов. Изучение их роли при различных патологических состояниях человека послужило основой для появления теории цитокин-опосредованных заболеваний. Согласно этой теории, эндогенные цитокины могут вызывать симптомы патологических изменений в органах, оказывать повреждающее действие на ткани. К настоящему времени увеличивается количество заболеваний, в этиопатогенез которых вовлечены цитокиновые молекулы (Симбирцев, 2013). Значительный интерес представляет изучение полиморфизма генов цитокиновой сети во взаимосвязи с различными патологическими состояниями человека. В качестве моделей заболеваний для оценки иммуногенетического компонента

выбраны распространённые заболевания — синдром раздражённого кишечника, неспецифический язвенный колит.

Таким образом, в настоящее время является актуальным создание модели генетической структуры цитокиновой сети для больных мультифакторными заболеваниями, в том числе НЯК и СРК, отражающей особые взаимодействия генов системы воспаления при данных патологиях как примеры изменений генетического контроля при дезадаптации человека. Цель данного исследования заключалась в оценке распределения аллельных вариантов, генотипов генов основных цитокинов TNFA, IL1b, IL1Ra, IL6, IL10 и их межгенных взаимодействий у больных неспецифическим язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника русских ЧО.

Исследование относится к типу ретроспективных работ «случай — контроль». Работа проводилась на базе учебной лаборатории инновационных биотехнологий кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «ЧелГУ» и отдела молекулярно-биологической диагностики ГБУЗ «ЧОСПК».

Контингент обследуемых лиц. Для исследования были использованы образцы тотальной ДНК, выделенной из цельной венозной крови взрослых неродственных между собой практически здоровых представителей (группа сравнения) и больных неспецифическим язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника русской популяции. Этническая принадлежность определялась по данным генеалогического анамнеза в трёх поколениях. Демографическая характеристика выборок на момент формирования групп представлена в табл. 2.6.1.

Таблица 2.6.1

**Демографическая характеристика обследуемых групп:
частота (f) и среднее ± стандартная ошибка**

Показатель	Группа сравнения (n = 109)		Больные НЯК (n = 116)		Больные СРК (n = 78)	
	f, чел.	f,%	f, чел.	f,%	f, чел.	f,%
Мужчины	60	55,0	50	43,1	21	26,9
Женщины	49	45,0	66	56,9	57	73,1
Средний возраст, лет	34,6 ± 0,75		41,9 ± 1,3		43,4 ± 1,6	

Исследование проводилось в несколько этапов.

1. Пробоподготовка — выделение ДНК колоночным методом с использованием реагентов PROTRANS DNA Vox 500.

2. Генетический анализ. Определение SNPs в полиморфных сайтах -1082G/A, -819C/T и -592C/A гена IL10, -174 G/C IL6 проводилось аллель-специфической

ПЦР (ООО НПФ «Литех», Россия), VNTR IL1Ra — методом прямой амплификации (ИХБиФМ СО РАН, Россия), SNP IL1b (ИХБиФМ СО РАН, Россия) и SNPs в промоторной области гена TNFA с помощью метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (праймеры Синтол, Россия, рестриктазы: TaqI, BpiI, TaiI, NcoI, BamHI Fermentas, USA) — с последующей УФ-детекцией результатов в 3 % агарозном геле. Характеристика исследуемых генов подробно описана в автореферате Д. С. Сташкевич (Сташкевич, 2009).

3. Статистическая обработка. Для оценки распределения полиморфных генов исследуемых цитокинов рассчитывали частоты встречаемости (в %) аллеля и генотипа. Статистическую значимость различий между исследуемыми выборками рассчитывали по критерию хи-квадрат Пирсона (в т. ч. с поправкой Йейтса на непрерывность) и точному методу Фишера (двусторонний критерий). В качестве показателей величины эффекта использовали отношения шансов (*Odds Ratio*, *OR*) с 95 % доверительными интервалами (95 % ДИ). Значимыми считали различия при $P \leq 0,05$; незначимыми — при $P \geq 0,10$.

Для определения модели наследования проводили анализ данных по следующим пяти моделям.

1. Кодоминантная — отдельное сравнение гетерозиготного (GA) и гомозиготных (GG, AA) генотипов. Считается, что каждый генотип может изменять риск независимо от остальных генотипов.

2. Доминантная — сравнение гетерозиготного (GA) и гомозиготного по редкому аллелю (AA) генотипов с гомозиготным по частому аллелю (GG) генотипом. Согласно данной модели наследования, считается, что для изменения риска достаточно одного аллеля с заменой (A).

3. Рецессивная — сравнение гетерозиготного (GA) и гомозиготного по частому аллелю (GG) генотипов с гомозиготным по редкому аллелю (AA) генотипом. Для изменения риска необходимо наличие обоих аллелей с заменой (A).

4. Сверхдоминантная — сравнение гомозиготных (AA, GG) генотипов с гетерозиготным (GA). Для изменения риска необходимо наличие и аллеля дикого типа (G), и аллеля с заменой (A).

5. Лог-аддитивная — подразумевает, что каждый аллель с заменой (A) изменяет риск в аддитивной манере (т. е. наличие двух аллелей с заменой увеличивает риск в два раза по сравнению с наличием лишь одного).

Наиболее вероятной моделью наследования считали модель с наименьшим значением информационного критерия Акаике (*AIC*) (Кутихин и др., 2017). Расчёты выполнены в программе SNPStats (SNPStats, 2016).

Анализ межгенных взаимодействий проведен методом снижения многофакторной размерности (*Multifactor Dimensionality Reduction*, *MDR*). В ходе данного анализа мультилокусные генотипы объединяются в группы повышенного и пониженного риска развития заболевания, что уменьшает размерность числа рассчитываемых

параметров. Таким образом, из всех предложенных вариантов моделей, сформированных на основе вводимых первичных данных, путём многократных проверок выбирается оптимальная модель межгенного взаимодействия, позволяющая с наиболее высокой точностью и низкой вероятностью ошибки предсказать респонденту наличие или отсутствие предрасположенности к определённым болезням. Для оценки межгенных взаимодействий использовался алгоритм всестороннего поиска (*Exhaustive search algorithm*), который рассматривал все возможные комбинации полиморфных локусов в отношении риска развития предрасположенности к СРК и НЯК. В качестве оптимальных моделей выбирали модели с наименьшими ошибками прогноза по результатам перекрёстной проверки (*Cross-validation, CV*). Для визуализации результатов анализа межгенных взаимодействий использовали дендрограммы сходства и графы, построенные силовым алгоритмом Фрехтермана — Рейнгольда (*Fruchterman-Rheingold*). Расчёты выполнены в программе MDR (version 2.0 beta 8), математической базой которой является непараметрический кластерный анализ (Moore, 2007; Motsinger, Ritchie, 2007).

2.6.1. Особенности распределения частот аллелей и генотипов у больных неспецифическим язвенным колитом и синдромом раздраженного кишечника

На первом этапе был проведён монолокусный анализ для оценки особенностей частот встречаемости аллельных вариантов и генотипов. Все полученные в исследовании частоты соответствовали равновесию Харди — Вайнберга.

В группе больных неспецифическим язвенным колитом распределение частот аллелей и генотипов SNPs генов -308G/A, -863 C/A TNFA, IL1Ra, IL1b, IL6, -1082G/A, -819C/T, -592C/A IL10 не имело особенностей по сравнению с группой условно здоровых лиц русской популяции ЧО. Следует отметить, что для больных НЯК характерно накопление редкого аллеля -238*A TNFA в гомозиготном и гетерозиготном состоянии (табл. 2.6.2).

Носительство предкового аллеля в гомозиготном состоянии снижает вероятность развития НЯК согласно доминантной модели ($OR = 0,25$; 95 % ДИ: от 0,11 до 0,59; $P = 0,0014$; $AIC = 305,5$).

Таким образом, оценка независимого вклада генов цитокинов в развитие предрасположенности к НЯК показала значимость только одного SNP -238 G/A TNFA.

Анализ частот встречаемости аллельных вариантов и генотипов TNFA, IL1b, IL1Ra, IL6, IL10 у больных СРК показал, что у них была повышена частота аллеля с заменой -174*C IL6 и его гомозиготного генотипа по сравнению с группой

Таблица 2.6.2

**Распределение частот аллелей и генотипов
полиморфизма гена TNFA -238G/A у больных НЯК и контрольной группы**

TNFA -238G/A	Больные НЯК (n = 116)		Группа сравнения (n = 109)		Значимость различий	Отношение шансов OR [95% ДИ]
	f, чел.	f, %	f, чел.	f, %		
Частоты встречаемости генотипов						
GG	92	79,3	102	93,6	$\chi^2_{(1)} = 8,47$ P = 0,004	0,26 [0,11; 0,64]
GA	21	18,1	7	6,4	$\chi^2_{(1)} = 6,0$ P = 0,015	3,2 [1,3; 7,9]
AA	3	2,6	0	0,00	$\chi^2_{(1)} = 1,23$ P = 0,270	более 2,9 -
Частоты встречаемости аллелей						
G	205	88,4	211	96,79	$\chi^2_{(1)} = 10,25$ P = 0,002	0,25 [0,11; 0,59]
A	27	11,6	7	3,21		3,9 [1,7; 9,3]

условно-здоровых лиц и больных НЯК (для частот аллеля -174*С: 62,8 % vs 46,8 % и 51,7 %; $P = 0,003$ и $P = 0,031$ соответственно; для частот генотипа -174 СС: 42,3 % vs 18,4 % и 26,7 %; $P < 0,001$ и $P = 0,024$ соответственно). Интересным фактом для данного полиморфизма является то, что в группе СРК снижено количество гетерозигот -174 GС, при сравнении с группой условно-здоровых лиц данные были статистически значимы, а при сравнении с НЯК — нет (41 % vs 56,9 % и 50 %; $P = 0,033$ и $P = 0,200$ соответственно). Анализ моделей наследования показал, что вероятнее всего вклад полиморфизма -174 G/C в предрасположенность к СРК описывает доминантная модель (CC vs GC + GG; $P < 0,001$; AIC = 245,3). Носительство гомозиготного генотипа повышает шансы развития СРК в 3,3 раза (OR = 3,3, 95 % ДИ от 1,7 до 6,3).

Таким образом, из всех полиморфных локусов генов только -174 G/C IL6 и -238 G/A TNFA оказались значимы для СРК и для НЯК соответственно.

Исходя из полученных данных видно, что монолокусный анализ не позволил установить ассоциацию большинства исследованных генов. Поэтому следующим этапом было проведение MDR-анализа для установления возможных межгенных взаимодействий и формирования моделей генных сетей при исследуемых патологиях.

2.6.2. Модель межгенных взаимодействий в контрольной группе

В контрольной группе, как и предполагалось, сильных взаимодействий обнаружено не было (данные представлены в табл. 2.6.3). Для неё нами была установлена четырёхлокусная модель IL6(-174)*C, IL6(-174)*G, IL10(-1082)*A, IL1Ra*4r, которая характеризовалась 80 % воспроизводимостью (*Cross-validation, CV*) и точностью предсказания (*Testing balance accuracy*) в 49,3 %. Наибольшим прогнозным потенциалом в данной модели обладает полиморфизм IL1Ra*4r с $CV = 9/10$ и точностью предсказания 45,5 %. Оптимальной для данной группы является двухкомпонентная модель межгенного взаимодействия IL6(-174)*C, IL1RAa*4r с $CV = 9/10$ и точностью предсказания 49,3 %.

Таблица 2.6.3

Модели межгенных взаимодействий в контрольной группе

Модель	Точность прогноза	Воспроизводимость
IL1Ra*4r	0,4552	9/10
IL6(-174)*C, IL1Ra*4r	0,4931	9/10
IL6(-174)*C, IL10(-1082)*A, IL1Ra*4r	0,4966	8/10
IL6(-174)*C, IL6(-174)*G, IL10(-1082)*A, IL1Ra*4r	0,4931	8/10

Программа MDR позволяет представить вклад каждого полиморфизма в виде дендрограммы (рис. 2.6.2, а). На ней длинные линии соответствуют слабой взаимосвязи между генами, короткие — сильной. Серые линии на рисунке характеризуют наиболее сильные синергетические взаимодействия.

Информационную ценность отдельных маркеров и парных взаимодействий генов демонстрирует диаграмма Фрюхтермана — Рейнгольда (рис. 2.6.2, б). На ней в вершинах графа расположены члены модели и указана информационная ценность каждого такого маркера (в %), а на рёбрах — приведены значения информационной ценности взаимодействия пары генов (в %).

Как видно из рис. 2.6.2, б, на долю комбинации локусов IL6(-174)*C и IL1Ra*4r приходится 0,38 % фенотипической энтропии, а на комбинацию IL10(-1082)*A и IL1Ra*4r — 0,29 %. Эти взаимодействия демонстрируют синергетический эффект полиморфизмов. Из четырёх анализируемых полиморфизмов наибольшим прогнозным потенциалом обладает полиморфизм IL1Ra*4r — 2,35 %. Взаимодействие локусов IL6(-174)*C и IL6(-174)*G, которое представлено на дендрограмме черным цветом, представляет собой антагонистический эффект. Взаимодействия локусов IL1Ra*4r и IL6(-174)*G имеют слабый отрицательный эффект.

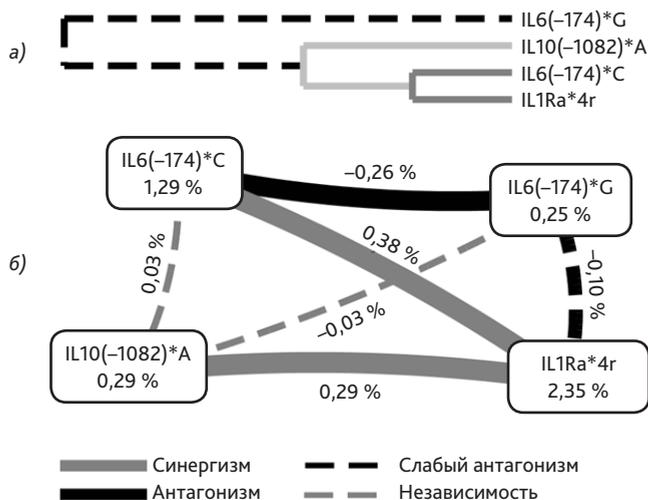


Рис. 2.6.2. Дендрограмма (а) и граф (б) межгенных взаимодействий для контрольной группы. Здесь и далее толщина ребер графа пропорциональна величине эффекта

2.6.3. Модель межгенных взаимодействий при синдроме раздраженного кишечника

В результате аналогичного описанному выше исследованию было установлено, что для группы СРК наибольший прогнозный потенциал имела модель взаимодействий между генами цитокинов IL1b, TNFA, IL1Ra, IL10, IL6 ($P < 0,001$). Характеристики полученных моделей представлены в табл. 2.6.4.

Таблица 2.6.4

Модели межгенных взаимодействий при синдроме раздраженного кишечника

Модель	Точность прогноза	Воспроизводи- мость
IL6(-174)*G	0,6702	10/10
TNFA(-308)*A, IL6(-174)*G	0,6307	7/10
IL-1(+3953)*T, TNFA(-308)*A, IL6(-174)*G	0,7344	10/10
IL1b(+3953)*T, TNFA(-308)*A, IL10(-1082)*G, IL6(-174)*G	0,7453	9/10

По результатам анализа межгенных взаимодействий для СРК была выбрана четырёхлокусная модель IL1b(+3953)*T, TNFA(-308)*A, IL10(-1082)*G, IL6*G, которая характеризовалась 90 % воспроизводимостью и точностью прогноза в 74,5 %. Исходя

из максимальных значений коэффициента перекрёстной проверки и наименьшей ошибки предсказания, в данном случае оптимальной является трёхкомпонентная модель IL1b(+3953)*T, TNFA(-308)*A, IL6(-174)*G, которая характеризовалась коэффициентом перекрёстной проверки $CV = 10/10$ и точностью предсказания 73,4 %.

Как видно из рис. 2.6.3, из четырёх анализируемых полиморфизмов (IL1b(+3953)*T, TNFA(-308)*A, IL10(-1082)*G, IL6(-174)*G) наибольшим прогнозируемым потенциалом обладает полиморфизм IL6(-174)*G. Остальные гены объясняют только 0,51, 2,05 и 1,08 % энтропии соответственно. Вероятно, вклад SNP -174 IL6 в развитие предрасположенности к СРК среди исследуемых генов является максимальным.

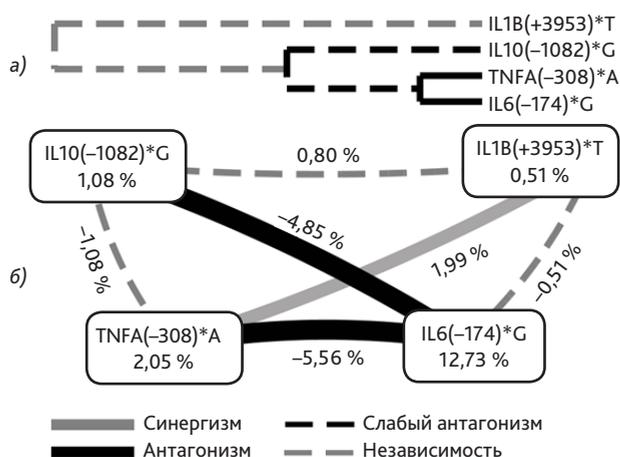


Рис. 2.6.3. Дендрограмма (а) и граф (б) межгенных взаимодействий для больных СРК

На рис. 2.6.3, б отражена сила влияния отдельных генов на развитие заболевания с помощью показателя энтропии межфакторных взаимодействий. Видно, что полиморфные локусы IL6(-174)*G, IL10(-1082)*G, TNFA(-308)*A имеют сильный отрицательный эффект, и вероятно, данные межгенные взаимодействия в модели можно охарактеризовать как антагонистические. Умеренное синергичное взаимодействие наблюдается между генами IL1b(+3953)*T и TNFA(-308)*A. Установленное в нашем исследовании синергичное взаимодействие между SNPs IL1b(+3953)*T и TNFA(-308)*A содержит аллели, отвечающие за высокопродуктивные варианты обоих цитокинов. Антагонистические взаимодействия IL6(-174)*G и TNFA(-308)*A, включающие аллели высокой продукции, могут быть объяснены тем, что, согласно литературным данным, IL-6 снижает экспрессию TNFA. Особенностью данных генов является взаимодействие между их белковыми продуктами (Сташкевич и др., 2018). Продукция IL-6 активируется провоспалительными цитокинами

(IL-1 и TNF- α), а подавляется белками-супрессорами опухоли (p53 и RB1) и гормонами-эстрогенами. Сам же IL-6 ингибирует продукцию IL-1 и TNF- α и активирует противовоспалительные цитокины IL-1Ra и IL-10 (Tanaka, Kishimoto, 2012).

2.6.4. Модель межгенных взаимодействий при неспецифическом язвенном колите

В результате оценки модели взаимодействий между генами цитокинов IL1b, TNFA, IL1Ra, IL10, IL6 для НЯК получены следующие результаты, представленные в табл. 2.6.5.

Таблица 2.6.5

Модели межгенных взаимодействий при неспецифическом язвенном колите

Модель	Точность прогноза	Воспроизводимость
TNFA(-863)*A	0,8322	10/10
TNFA(-863)*A, TNFA(-238)*A	0,8819	10/10
TNFA(-308)*A, TNFA(-863)*A, TNFA(-238)*A	0,8717	9/10
TNFA(-863)*A, TNFA(-238)*A, IL6(-174)*C,IL1Ra*2r	0,8717	8/10

Установлена пятилокусная модель TNFA(-863)*A, TNFA(-238)*A, IL6(-174)*C, IL1Ra*2r, которая характеризовалась 80 % воспроизводимостью и точностью предсказания 87,17 %. Оптимальным межгенным взаимодействием является двухкомпонентная модель TNFA(-863)*A, TNFA(-238)*A, которая характеризуется коэффициентом перекрёстной проверки 10/10 и точности предсказания 88,19 %. Следует отметить, что наибольшую значимость в данной модели имеет высокопродуктивный аллель TNFA(-863)*A.

Рис. 2.6.4 позволил установить, что на долю комбинации локусов TNFA(-863)*A и TNFA(-238)*A приходится 6,35 % фенотипической энтропии, что демонстрирует выраженный антагонистический эффект полиморфизмов при формировании предрасположенности к развитию НЯК.

Согласно диаграмме на рис. 2.6.4, б, из пяти анализируемых полиморфизмов наибольшим предсказательным потенциалом обладает полиморфизм TNFA(-863)*A — 40,47%. Лocus IL6(-174)*C оказывает выраженный независимый эффект в формировании предрасположенности к НЯК. Взаимодействия локусов TNFA(-238)*A и IL1Ra*2r,

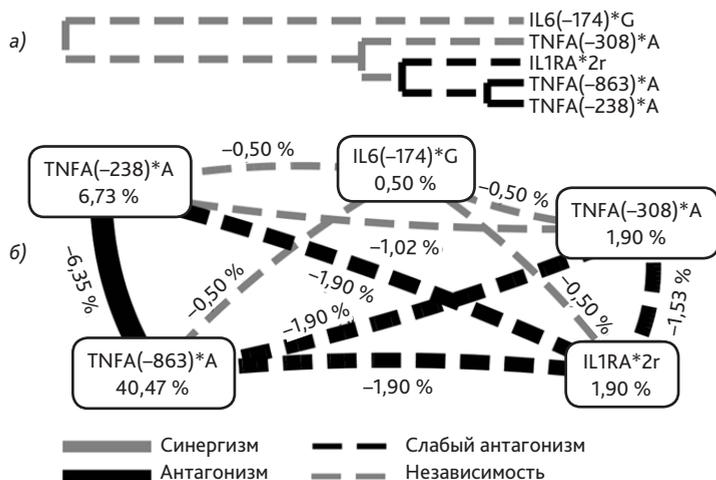


Рис. 2.6.4. Дендрограмма (а) и граф (б) межгенных взаимодействий для больных НЯК

TNFA(-308)*A и TNFA(-863)*A, IL1Ra*2r и TNFA(-308)*A, IL1Ra*2r и TNFA(-863)*A имеют отрицательные эффекты.

Проведённое исследование показало, что анализ частот отдельных аллелей и генотипов отдельных генов, белковые продукты которых вовлечены в иммунопатогенез заболеваний, является малоинформативным. Учитывая сложный каскад взаимодействий цитокинов, который запускается при презентации антигена иммунокомпетентным клеткам, огромную роль играет изменение работы сразу нескольких элементов сети. Поэтому нами был проведён анализ межгенных взаимодействий генов системы воспаления у больных неспецифическим язвенным колитом. Вероятно, вклад SNP TNFA(-863)*A в развитие предрасположенности к НЯК среди исследуемых генов является максимальным.

Среди SNPs гена TNFA полиморфизм TNFA(-863)*A влияет на сайт связывания белка транскрипционного фактора NF-κB, что приводит к увеличению транскрипции и количеству белкового продукта — TNF-α.

В исследовании Н. Надери с соавт. на Иранской популяции было выяснено, что частота аллеля с заменой в позиции -863 выше у пациентов с неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона по сравнению с условно-здоровыми лицами (Naderi et al., 2014). Аналогичные результаты были представлены в двух исследованиях из Канады, в исследовании по европейскому населению Великобритании и в двух отдельных исследованиях в Азии, включая корейскую и китайскую популяции (Валуйских, 2012; Norouzinia, Naderi, 2015). В работе (Ahirvar et al., 2012) показано, что высокопродуктивный генотип TNFA(-863 AA) был связан с повышенным риском неспецифического язвенного колита. В данной модели локус IL6(-174)*C оказывает выраженный независимый эффект в формировании НЯК, а остальные

взаимодействия локусов TNFA(-238)*A и IL1Ra*2r, TNFA(-308)*A и TNFA(-863)*A, IL1Ra*2r и TNFA(-308)*A, IL1Ra*2r и TNFA(-863)*A имеют отрицательные эффекты.

У больных НЯК оптимальным межгенным взаимодействием является двухкомпонентная модель TNFA(-863)*A и TNFA(-238)*A, которая характеризуется выраженным антагонистическим эффектом входящих в неё полиморфизмов. Такие взаимодействия совпадают с данными литературы: аллель A в положении -863 ассоциирован с повышенной продукцией TNF-α, тогда как для другого полиморфного варианта гена TNFA(-238)*A аллель A ассоциирован с понижением продукции TNF-α (Бодиенкова, Титова, 2015; Васильев, 2015; Рыдловская, Симбирцев, 2005). Также оптимальной является модель трёх различных локусов TNFA, для которой, кроме описанных взаимодействий, характерны антагонистические взаимодействия между аллелями TNFA(-863)*A и TNFA(-308)*A, что, вероятно, связано с дублированием информации, так как оба полиморфизма являются высокопродуктивными.

Заключение

Проведённый анализ позволил выявить различия в частотах встречаемости SNPs -238 G/A TNFA, -174 G/CIL-6, которые могут использоваться как маркёры предрасположенности к НЯК и СРК соответственно, а также позволил построить модели межгенных взаимодействий: для СРК основу модели составляет предковый аллель -174*G IL6, а для НЯК — редкие аллели -863*A и -238*A TNFA.

Гены цитокинов, наряду с генами стресс-гормонов, нейротрансмиттеров, хемокинов и ростовых факторов, белков теплового шока и других биологически активных молекул вовлечены в генетическую регуляцию адаптивного ответа организма человека на стрессовые реакции (Rokutan et al., 2005). Разные аллельные варианты генов цитокинов, комбинируясь друг с другом, создают «пластичные» комбинации, т. е. дающие результат, зависящий в большей мере от среды (Belsky et al., 2009). Конечным итогом дезадаптации является запуск патологических процессов, в которые вовлечены цитокиновые молекулы. То, как человек реагирует на стрессовые условия, то, насколько хорошо и быстро он восстанавливается после стресса, зависит от различных аллельных вариантов и комбинаций генов, носителем которых он является. Согласно исследованиям, носители определённых комбинаций генетически детерминированным более сильным воспалительным ответом при высоком уровне стресса оказываются более подвержены заболеваниям с воспалительной компонентой, в том числе к сердечно-сосудистым аутоиммунным заболеваниям и некоторым психическим расстройствам.

2.7. Морфофункциональная характеристика клеточных элементов системы мононуклеарных фагоцитов потомства матерей с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы

В случае, когда организм встречает в какой-нибудь своей части опасность со стороны проникшего в него вредного начала механической, химической или паразитарной природы, тотчас же наступают явления, на которые следует смотреть как на начальные, ведущие к исцелению процессы.

Хаммерл

2.7.1. Пренатальный стресс и количественная характеристика макрофагов различных компартментов потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени

Одним из наиболее распространенных факторов, обуславливающих пренатальный стресс плода, являются экстрагенитальные заболевания. В то же время роль экстрагенитальной патологии матери в нарушении реактивности и резистентности потомства до конца не изучена. Среди заболеваний матери особое место, в силу своей распространённости, имеют хронические поражения гепатобилиарной системы. Ранее нами было установлено, что экспериментальные поражения печени матери, обуславливающие развитие пренатального стресса, вызывают нарушения морфофункционального становления систем жизнеобеспечения потомства (Брюхин, 1994; Грачев, 1994; Николина, 2000; Евченко, 2001; Федосов, 2003; Пашнина, 2003; Ильиных, 2006; Кузнецова, 2006; Леонов, 2007; Соляникова, 2010; Серышева, 2013; Ласьков, 2014; Сизоненко, 2015).

Учитывая, что неспецифическая резистентность во многом определяется морфофункциональным состоянием клеточных элементов системы мононуклеарных фагоцитов, нами предпринята попытка проанализировать особенности содержания и функциональной активности тканевых макрофагов у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени.

Для достижения поставленной цели у половозрелых самок крыс нами создавался пренатальный стресс путём моделирования хронической патологии печени различного генеза, в том числе токсического, мезенхимального, аутоиммунного, лекарственного и холестатического, обуславливающих развитие наиболее распространенных клинических синдромов: цитолитического, холестатического, аутоиммунного и поликлональной гаммапатии. Объектом исследования явились тканевые макрофаги различных компартментов, в том числе перитонеальные, селезёночные, печёночные, альвеолярные и моноциты периферической крови у потомства в различные сроки постнатального периода.

Общепризнано, что нормальное функционирование системы мононуклеарных фагоцитов возможно только при оптимальном численном составе моноцитарных клеток и тканевых макрофагов (Земсков и др., 1993).

Нами установлено, что пренатальный стресс, обусловленный экспериментальным поражением печени различного генеза, приводит, прежде всего, к уменьшению у потомства в различные сроки постнатального онтогенеза численного состава альвеолярных, перитонеальных и селезёночных макрофагов, а также моноцитов периферической крови.

Не подлежит сомнению, что образуемые в костномозговых резервах моноциты расходуются на поддержание метаболического гомеостаза и защиту макроорганизма от чужеродных агентов. Причём от активности моноцитопоэза в костном мозге зависит не только число образуемых моноцитов циркулирующей крови, но и количество фагоцитирующих тканевых макрофагов (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983). При моделировании хронического поражения печени различного генеза у самок крыс происходит системное нарушение процессов жизнеобеспечения, что проявляется, в том числе, угнетением костномозгового кроветворения (Брюхин, Невзорова, 2013): нарушение дифференцировки и созревания клеток-предшественников, в том числе моноцитарного пула, проявляющееся качественными и количественными нарушениями. Угнетение миелоидного ростка в костном мозге, как правило, приводит к нарушению метаболической активности моноцитов периферической крови и снижению их защитных механизмов (Грачев, 1994; Шаврина, 2012; Шопова, 2015; Брюхин, Комарова, 2018).

С другой стороны, анализируя данные, полученные при изучении количественных показателей печёночных макрофагов (клеток Купфера), отмечается иная закономерность. Содержание печёночных макрофагов у крысят, рождённых от самок с хронической патологией гепатобилиарной системы, существенно возрастает по сравнению с интактными животными. Логично предположить, что данные изменения, свидетельствующие об увеличении числа печёночных макрофагов, направлены на активацию защитных механизмов, которые могут восполнить образующийся функциональный дефицит и усилить секрецию биологически активных соединений (цитокинов, активных форм кислорода, ферментов), а так-

же фагоцитарную реакцию печёночных макрофагов (Gao, 2008). Вместе с тем нельзя исключить, что пул резидентных макрофагов печени может пополняться и из других источников, например, мигрировать из селезёнки (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983).

Клеточные элементы системы мононуклеарных фагоцитов составляют единую линию дифференцировки, включающую костномозговых предшественников, пул относительно незрелых клеток, циркулирующих в крови (моноциты), и пул дифференцированных клеток (органоспецифические и тканеспецифические макрофаги). Моноциты, поступающие в циркуляцию из костного мозга, затем мигрируют в ткани, где под влиянием специфического микроокружения происходит их дифференцировка в высокодифференцированные тканевые макрофаги, в том числе купферовские клетки (макрофаги печени), селезёночные, береговые (макрофаги лимфатических узлов), перитонеальные (макрофаги брюшной полости) макрофаги и др. (Фрейдлин, 1984; Земсков и др., 1993; Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983). Так установлено, что 56 % моноцитов мигрируют в печень, 16 % — в лёгкие, 8 % — в перитонеальную полость, 5 % — в соединительную (интерстициальную) ткани. В силу общего источника развития разнообразные тканевые макрофаги имеют общий план строения.

2.7.2. Функциональная характеристика тканевых макрофагов потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени в различные сроки постнатального онтогенеза

Тканевые макрофаги под влиянием специфического микроокружения подвергаются морфологической и функциональной перестройке и приобретают новые неоднородные в функциональном отношении свойства. Важно, что поступление циркулирующих мононуклеаров в ткани и их преобразование в макрофаги происходит непрерывно как в норме, так и при патологии (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983).

Вместе с тем, анализируя исследования в этой области, обращает на себя внимание, что большинство авторов судят о влиянии того или иного экзогенного или эндогенного фактора на макрофагальную систему, определяя содержание и функциональное состояние фагоцитов лишь одного компартмента (Пауков и др., 2005; Сонова, Осипова, 2007; Ромашкина, Трофимов, 2008; Шевалдин, 2010). Однако, изучая определённый пул макрофагов или их предшественников, не представляется возможным в полной мере оценить функциональный статус системы

моноклеарных фагоцитов в целом, так как она весьма динамична. Известно, что при дифференцировке тканевых макрофагов клетки приобретают специализированные функции, определяющиеся той средой, в которую они попали. Интересно, что при изменении количественных параметров моноклеаров одного компартмента активируются процессы миграции их прекурсоров костномозговой локализации (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983; Брюхин, 1994; Шопова, 2015).

Однако сегодня не вызывает сомнений, что свободные макрофаги могут перемещаться не только в пределах конкретного органа, но и из одной системы в другую (Фрейдлин, 1984; Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983; Голохваст, Чайка, 2011). Это было показано при сепсисе (Зурочка и др., 2008), асептическом и гнойном воспалении (Пауков и др., 2005), хроническом вирусном гепатите (Шевалдин, 2010), экспериментальном эндометриозе (Назарова и др., 2004). Заслуживают внимания результаты, полученные С. И. Шпаком и Ю. И. Шрамко (2000), доказавшие зависимость содержания моноцитов/макрофагов от длительности действия повреждающего агента. В частности, было показано, что в начале эксперимента число альвеолярных макрофагов значительно превышало контрольные значения, а в конце эксперимента концентрация лёгочных фагоцитов в лаваже значительно снижалась. При этом содержание моноцитов, напротив, значительно возрастало, что указывало на активацию моноцитарного ростка костного мозга при истощении местного пула альвеолярных макрофагов и их предшественников.

Таким образом, не вызывает сомнений, что при патологических состояниях защитные реакции моноцитов/макрофагов носят, как правило, системный характер и проявляются изменением их количества в поражённом органе и уровне активации тканевых макрофагов.

Анализируя возможные механизмы перераспределения клеток системы моноклеарных фагоцитов, мы оценивали различные функции моноклеаров в циркуляции и тканях.

Прежде всего, результаты наших исследований указывают на достоверное угнетение спонтанной миграционной активности тканевых макрофагов, в том числе перитонеальных макрофагов и моноцитов периферической крови. Исходя из того что двигательная активность клеток представляет собой энергозависимый процесс, можно предположительно связать угнетение миграции с нарушением внутриклеточного метаболизма моноклеарных фагоцитов в результате эффекта токсических метаболитов, накапливающихся в кровотоке плода при снижении детоксикационной функции поражённой печени у матери.

Одним из необходимых условий для адекватного функционирования макрофагов является распознавание чужеродных частиц, осуществляемое путём специфического взаимодействия их с помощью поверхностно-рецепторного аппарата (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983; Пинегин, Карсонова, 2009; Mitsuko, Harunori, 1992). Перемещение в биологической мембране специфических белков — рецеп-

торов и молекул адгезии способствует быстрому взаимодействию их с фагоцитируемым объектом, тем самым создаются оптимальные условия для становления мононуклеаров на путь активации и участия в процессах межклеточной кооперации (Земсков, Субботин, 1990; Ковальчук, Чередеев, 1991). Причём, чем более выражено сродство спектра рецепторов адгезии к клетке — мишени, тем активнее протекает процесс узнавания. Известно, что на плазматической мембране макрофагов содержатся рецепторы адгезии, включающие три основные группы (Gordon, Taylor, 2005), в том числе фагоцитарные рецепторы, способные к распознаванию опсонизированных и неопсонизированных бактерий, а также нефагоцитарные поверхностные рецепторы. По принадлежности все адгезивные молекулы относятся к семейству иммуноглобулинов и интегринов и включают адгезины типа С3bI-рецептора, а также гликопротеины Mac-1, p-150, p95, LFA-1, кадгеринины, селектины и муцины, принимающие непосредственное участие в процессе распознавания, и нередко подвергаются патологическим изменениям (Ковальчук, Чередеев, 1991; Lessey, 2002). Взаимодействуя с мишенью, молекулы клеточной адгезии не просто механически улавливают «нужный» лиганд, а запускают процесс межклеточной сигнализации, активность которого зависит от степени экспрессии молекул адгезии. В связи с этим выявленное нами снижение адгезивных свойств мононуклеарных фагоцитов различных компартментов у потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы, о чем свидетельствует снижение числа адгезировавших и распластанных клеток, может быть обусловлено дефектом рецепторного аппарата. Кроме того, установлено, что процесс адгезии и расплывания фагоцитов напрямую зависят от адекватного функционирования аппарата цитоскелета (Фрейдлин, 1987; Myers, Casanova, 2008). В частности, взаимодействие клетки — мишени с мембранными рецепторами стимулирует активацию аппарата цитоскелета (Цаплина, 2013). Например, на начальном этапе адгезивного процесса происходит стимуляция полимеризации и увеличение длины актиновых микрофиламентов в кортикальном слое плазмолеммы, один из концов которых укреплён на адгезивных контактах благодаря «якорным» белкам-интегринам (Bershadsky et al., 2006). Под влиянием достаточной внутриклеточной концентрации кальция возникает сокращение актомиозинового комплекса, возрастает гидростатическое давление, активируется фосфорилирование белков. Все это способствует быстрому образованию выростов биологической мембраны, которые захватывают субстрат-мишень (Cossart, Sansonetti, 2004).

Результаты цитохимического исследования позволяют сделать заключение о нарушении метаболических процессов в моноцитах периферической крови, перитонеальных, альвеолярных и печёночных макрофагах потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени, о чем свидетельствует, с одной стороны, изменение активности оксидоредуктаз — снижение активности сукцинатдегидрогеназы и увеличение активности альфа-глицерофосфатдегидрогеназы,

что, в определённой мере, указывает на нарушение сбалансированности аэробных и анаэробных окислительных процессов распада и синтеза гликогена.

Снижение спонтанного НСТ-теста в тканевых макрофагах различных компартментов отражает нарушение кислородзависимого индуцированного метаболизма, способности клеток к активации, усилению метаболизма и функциональных возможностей клеток, в том числе локомоторного ответа на хемотаксические стимулы и их адгезивности.

Вместе с тем перераспределение клеточных элементов системы мононуклеарных фагоцитов можно объяснить, в том числе, с позиции феномена хоминга, в реализации которого первостепенную роль играют адгезивные молекулы, в том числе интегрины и селектины.

После прикрепления макрофага к объекту начинается фагоцитоз, включающий в себя два основных этапа: поглощение объекта и его киллинг, определяющий уровень фагоцитарной активности. Вместе с тем ведущая роль в процессе фагоцитоза бесспорно принадлежит лизосомам, участвующим в кислороднезависимых механизмах бактерицидности (Хидирова, Маянская, 2012). Важно, что завершённость фагоцитоза определяется, прежде всего, функциональным состоянием лизосомальных гранул, богатых гидролитическими ферментами.

Анализ состояния лизосомального аппарата тканевых макрофагов различных компартментов подопытных животных проводился по общепринятой методике с использованием акридинового оранжевого (Фрейдлин, 1976). Установлено, что после рождения у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза (лекарственного, аутоиммунного, алкогольного, токсического, холестатического) имеет место снижение по сравнению с контролем лизосомальной активности (количества акридиноранж-позитивных клеток) тканевых макрофагов различных компартментов (рис. 2.7.1).

При этом лизосомальная активность тканевых макрофагов (перитонеальных, альвеолярных, печёночных, селезёночных) на всех сроках исследования оказалась существенно выше, чем в моноцитах периферической крови, что согласуется с данными литературы (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983; Луговская, 1997), свидетельствующими о том, что именно зрелые специализированные макрофаги наиболее богаты лизосомами.

Известно, что лизосомальные гранулы содержат целый спектр гидролитических ферментов, включая протеазы, гликозидазы, эстеразы. Однако ферментативный потенциал лизосомальных пузырьков реализуется в зависимости от состояния макроорганизма по-разному. При воздействии повреждающих факторов начинается немедленная миграция фагоцитов к очагу воспаления, при этом изменяется и функциональный потенциал клетки — в аппарате внутриклеточного пищеварения наблюдаются качественные и количественные преобразования, направленные на скорую встречу с патогеном. Имеются данные (Маянская и др., 2005), указывающие на то,

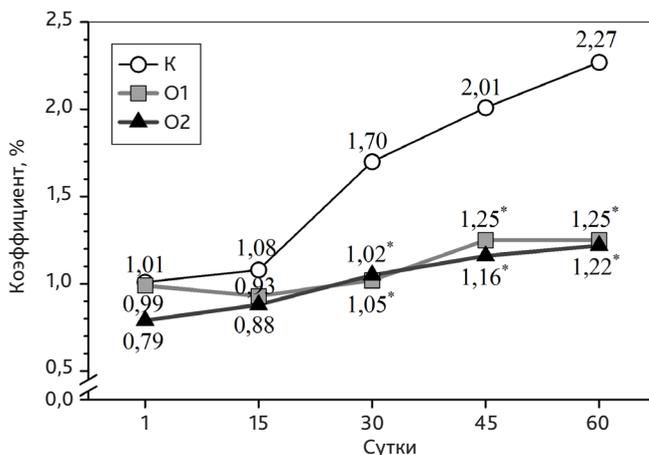


Рис. 2.7.1. Средний цитохимический коэффициент лизосомальной активности перитонеальных макрофагов (%) потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени (O1, O2) в различные периоды постнатального развития. К — контроль. * $p < 0,05$

что выраженность энзиматической активности лизосом прямо пропорциональна силе провоцирующего агента. Так, было выявлено, что при одновременном моделировании хронического алкогольного гепатита и экспериментальной пневмонии у крыс наблюдается снижение функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов, сопровождающееся повышением активности лизосомальных ферментов с усиленной секрецией их в системный кровоток (Филиппенко и др., 2009). Интересные данные были получены при исследовании лизосомального аппарата сократительных кардиомиоцитов (Романов, 2003). При этом была выявлена прямая корреляционная зависимость между активностью лизосомальной системы и перекисного окисления липидов клеток миокарда и содержанием в саркоплазме ионов Ca^{2+} , на основании чего было высказано предположение об участии ионов Ca^{2+} в процессе активации энзимов лизосом.

В механизмах бактерицидности мононуклеарных фагоцитов участвуют не только ферментативные системы лизосомального аппарата, а многие механизмы. Является постулатом положение о том, что любой патологический процесс сопровождается активацией активных форм кислорода, образованием свободных радикалов (Романова, 2005; Донцов и др., 2006). Однако избыточная их продукция способствует развитию оксидативного стресса.

Вместе с тем известно, что события фагоцитарного процесса всегда сопровождаются «респираторным взрывом», смысл которого заключается в повышении активности ферментов дыхательной цепи и генерации свободно-радикальных продуктов, принимающих самое активное участие в разрушении образованной фагосомы.

Наиболее распространённым методом, позволяющим оценить кислородзависимый потенциал клетки, является спонтанный НСТ-тест, благодаря которому становится возможной быстрая оценка уровня активации фагоцитирующих клеток и их готовности к киллингу бактерий (Кульчиков и др., 2011). В настоящее время принято считать, что НСТ-тест является наиболее информативным показателем, характеризующим состояние общей адаптации и связанной с ней устойчивости к стрессорным воздействиям (Фрейдлин, 1984). В то же время индуцированный (стимулированный) НСТ-тест позволяет определить потенциальные ресурсы клеточных элементов неспецифической резистентности к возникновению «метаболического взрыва» в ответ на внедрение патогенных микроорганизмов (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983). Благодаря тому, что в данной реакции на клетку в условиях *in vitro* воздействуют дополнительные стимулы (частица латекса, гранулы зимоzana, микроорганизмы), активирующие фагоцит, становится возможной оценка резервной функциональной активности данных клеток.

Анализ интенсивности спонтанного и индуцированного НСТ-теста в тканевых макрофагах различных компартментов (перитонеальных, альвеолярных, печёночных и селезёночных) у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза (лекарственного, алкогольного, токсического, мезенхимального, холестатического, аутоиммунного) позволил констатировать существенное снижение исследуемого показателя в различные сроки постнатального онтогенеза по сравнению с контрольными животными соответствующего возраста. Эти данные, с одной стороны, свидетельствуют о том, что у подопытных крысят имеет место угнетение в клеточных элементах системы мононуклеарных фагоцитов кислородзависимого метаболизма, а с другой — о депрессии их резервной функциональной возможности, а следовательно, о снижении компенсаторно-приспособительного потенциала. Эти результаты согласуются с данными, полученными А. И. Курбановым (2008), свидетельствующими о модулирующем влиянии на механизмы фагоцитоза различных антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота, витамин Е, мелатонин, что связано, главным образом, с нейтрализацией продуктов респираторного взрыва, кислородных радикалов, образующихся при фагоцитозе. Вместе с тем снижение спонтанного и индуцированного НСТ-теста в мононуклеарах подопытных животных полностью согласуется с результатами исследования интенсивности цитохимических реакций на окислительно-восстановительные ферменты цикла трикарбоновых кислот, кислую фосфатазу, а также ШИК-позитивный материал.

Вместе с тем среди множества различных механизмов, которыми оснащены клеточные элементы неспецифической резистентности, особая роль принадлежит миелопероксидазе (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983). При этом миелопероксидазной системе отводится ведущая роль в механизмах бактерицидности, в то время как лизосомальные гидролитические ферменты участвуют в «очищении» клетки

от повреждённого и уже обработанного пероксидазой материала (Маслов, 2007). В результате взаимодействия миелопероксидазы с одним из основных продуктов «респираторного взрыва» перекисью водорода образуются активные формы кислорода, а также оксид азота, принимающие самое активное участие в киллинге захваченных микроорганизмов. Кроме того, данный фермент способен непосредственно связываться с компонентами клеточной стенки бактерий, что ведёт к нарушению её проницаемости и гибели микроорганизмов (Ашкинази и др., 2013).

Известно, что защита организма от различного рода инфекционных агентов состоит в последовательном взаимодействии с ними трёх протекторных механизмов — неспецифической резистентности, активации секреторной активности клеток с высвобождением цитокинов и, наконец, включением специфического адаптивного иммунного ответа (Хайтов, Пинегин, 2000). Именно компоненты естественной резистентности в первую очередь вступают во взаимодействие с проникшими в организм чужеродными агентами, так как имеют целый спектр необходимых для их элиминации средств и в большинстве случаев способствуют их гибели (Игнатов, 2002). Однако наибольшую роль в устранении проникших возбудителей имеют клеточные факторы, в том числе нейтрофилы и макрофаги, которые при контакте с экзогенной частицей быстро запускают фагоцитарный процесс, включающий цепь последовательных событий, начиная с распознавания объекта и кончая его разрушением (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983; Мазуров и др., 2000). Наиболее сильными активаторами, оказывающими на мононуклеары стимулирующее действие, являются компоненты бактерий, их токсины, а также ионы кальция и опсонизированный зимозан (Fleming et al., 1991).

Для оценки особенностей фагоцитарной активности тканевых макрофагов различных компартментов у потомства самок крыс с моделированным поражением гепатобилиарной системы различной этиологии (токсической, алкогольной, лекарственной, холестатической, аутоиммунной) нами были использованы в качестве объекта фагоцитоза полистерольный латекс и суточная культура золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*, штамм ATCC 25923). Для оценки фагоцитарной способности тканевых макрофагов подсчитывали фагоцитарный показатель (процент фагоцитирующих клеток), фагоцитарный индекс (количество частиц латекса или *S. aureus* в перерасчёте на одну клетку) и киллинг (количество убитых микроорганизмов). Прежде всего, установлено, что у подопытных животных имеет место депрессия фагоцитарных свойств, о чем свидетельствует снижение фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса. Интересно, что при исследовании фагоцитарных свойств макрофагов M1 и M2 фенотипов установлено, что наибольшей фагоцитарной активностью обладают макрофаги M1 фенотипа, что связано с более высокой активностью рецепторного поля (Platt et al., 1999), а большей специализацией при захвате повреждённых и разрушенных клеток обладают макрофаги M2 фенотипа (Cairo et al., 2010).

Не подлежит сомнению, что при внедрении в организм чужеродных микроорганизмов незамедлительно включаются различные уровни его защиты. Прежде всего, активируются факторы естественной резистентности, которые первыми вступают в борьбу с инфекционными агентами после преодоления ими поверхностных барьеров. При этом ключевым звеном в механизмах неспецифической защиты служит клеточно-опосредованный ответ специализированных тканевых макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток и натуральных киллеров (Хаитов, Пинегин, 2000), которые обеспечивают фагоцитарную реакцию с последующим уничтожением захваченных частиц (Маянский, Пикуза, 1993; Дамбаева и др., 2002).

В то же время фагоцитарный процесс, являясь прямым механизмом защиты макроорганизма, включает последовательно сменяющие друг друга стадии хемотаксиса, адгезии, захвата, киллинга и деградации бактериальных частиц. При этом следует отметить, что активация макрофагов и запуск каскада реакций фагоцитоза инициируются, прежде всего, появлением какого-либо раздражителя, а особенно живых бактериальных агентов и их токсинов (Fleming, 1991), в результате чего в мононуклеарах резко усиливаются метаболические процессы, в цитоплазме увеличивается активность лизосомального аппарата и органоидов синтеза. Однако при развитии стрессовой реакции в ответ на какое-либо воздействие на определённом этапе возникает сбой, сопровождающийся снижением числа синтезирующихся молекул адгезии, рецепторов и нарушением лиганд — рецепторного воздействия. Кроме того, нарушения затрагивают и актиновый цитоскелет фагоцитов, тем самым угнетая явление миграции и положительного хемотаксиса (Ke et al., 2001). Так, активирующийся в макрофагах оксид азота и цикло-гуанозинмонофосфат цГМФ в присутствии ионов Ca^{2+} вызывают дезорганизацию актиновых микрофиламентов (Hall, 1998).

Вместе с тем известно, что аппарат цитоскелета принимает непосредственное участие в процессах фагоцитоза (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983; Мухамедова и др., 2011), при этом компоненты цитоскелета претерпевают изменения, например, увеличивается содержание F-актина (Caro et al., 1998). Ключевым компонентом сигнального каскада являются ионы кальция, которые с помощью белка — регулятора кальмодулина запускают активацию фосфолипазы C, которая, в свою очередь, регулирует реакцию преобразования инозитолбифосфата в инозитолтрифосфат, способствующий повышению концентрации ионов кальция, и диацилглицерол, запускающий протеинкиназу C (Илларионов, 1992). В результате повышения цитозольного кальция фагоциты быстро активируются и вовлекаются в фагоцитарный процесс. Таким образом, нельзя исключить, что при моделировании поражения печени матери у потомства возникает повреждение компонентов цитоскелета, в частности актиновых нитей, а также снижение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , обусловленное нарушением гематоплацентарного барьера (Абдильдин, 2016; Медведь, 2007) и воздействием на плазмолемму клеток токсичных продуктов

метаболизма, поступающих из материнского организма (Савченков, Лобынцев, 1980; Медведь, 2007).

Вместе с тем неотъемлемой частью фагоцитарного процесса является преобразование поглощённых фагоцитами частиц гидролитическими ферментами лизосом, ведущее к полному или частичному их лизису (Парахонский, 2005; Тихомирова и др., 2008). При этом механизмы, участвующие в этом процессе, достаточно многочисленны и связаны с содержанием цитозольного кислорода. Причём, если бактерицидная активность мононуклеаров осуществляется как кислородзависимой, так и кислороднезависимой системами, то эффективность киллинга зависит от соотношения и взаимодействия данных механизмов (Мазуров и др., 2000). При этом наибольшее значение придаётся именно кислородзависимым механизмам, активация которых связана с продукцией свободнорадикальных продуктов (Брудастов и др., 2008; Курбанов, 2008). Сразу после попадания чужеродной частицы в цитоплазму макрофага происходит активация ферментов дыхательной цепи, что приводит к появлению высокоактивных кислородных метаболитов, в том числе перекиси водорода, синглетного кислорода, гидроксильных радикалов, супероксида-аниона, действие которых направлено на активацию перекисного окисления липидов и уничтожение фагоцитированных микроорганизмов (Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1983). Эти теоретические предпосылки тесно согласуются с результатами, полученными нами при оценке фагоцитарных свойств тканевых макрофагов различных компартментов у подопытных крыс в различные сроки постнатального периода с использованием золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*. Так, было установлено, что у потомства самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы различной этиологии имеет место депрессия как поглощательной способности, так и киллинговой активности тканевых макрофагов на всех сроках постнатального онтогенеза.

2.7.3. Ловушкообразующая способность тканевых макрофагов потомства самок крыс с экспериментальным поражением гепатобилиарной системы

В настоящее время не вызывает сомнений, что одними из основных клеток, во многом определяющих уровень неспецифической резистентности организма, являются клеточные элементы системы мононуклеарных фагоцитов. В то же время в процессе фагоцитоза поглощательная способность макрофагов постепенно снижается, что связано с нарушением рецепторного поля мононуклеаров

и истощением функциональных резервов фагоцита и, как следствие, приводит к невозможности адекватного реагирования на внедрение чужеродных агентов. Наряду с фагоцитарными свойствами, осуществляемыми посредством внутриклеточной бактерицидности, а также высокоактивного поверхностно-рецепторного аппарата и выраженной секреторной активностью, относительно недавно было выявлено ещё одно уникальное свойство макрофагов. Преодолев все резервы внутриклеточного фагоцитоза, мононуклеары запускают следующий механизм своей бактерицидности, образуя внеклеточные ДНК-содержащие сетеподобные структуры — внеклеточные ловушки. Первоначально ловушкообразующая способность была открыта в отношении нейтрофильных гранулоцитов (Brinkmann et al., 2004; Долгушин и др., 2009). В 2004 г. в институте Макса Планка (Германия) группой учёных под руководством Бринкманн впервые был открыт механизм внеклеточной бактерицидности нейтрофилов периферической крови — нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ, Neutrophil Extracellular Traps — NETs), способные к захвату, фагоцитозу корпускулярных частиц и их уничтожению (Коротина, 2012; Urban et al., 2006; McDonald, 2012; Pilszek et al., 2010). Позднее было установлено, что к образованию внеклеточных ловушек способны не только нейтрофилы, но и клетки системы мононуклеарных фагоцитов (Долгушин и др., 2012; Helenbrand, 2013; Mohanan, 2013).

Закономерным процессом завершения жизнедеятельности клетки является её гибель. При этом окончание жизненного цикла связано как с развитием внутриклеточных процессов, так и с естественным старением двух принципиально различных путей (Манских, 2007; Едранов, 2012). При апоптозе происходит конденсация хроматина, образование цитоплазматических выпячиваний, сморщивание органоидов, фрагментация ядра и распад клетки с образованием апоптотических телец. Эти события ведут к уплотнению органелл, которые, однако, сохраняют свою целостность на всех стадиях апоптоза (Okada, Mak, 2004; Degenhardt et al., 2006). При некрозе, возникающем вследствие патологического процесса, происходит разобщение внутриклеточных ионных процессов, набухание клетки, разрыв актинового цитоскелета и разрушение цитоплазматической мембраны (Фирсова, 2013). При образовании внеклеточных ловушек («нетозе», NETosis), третьем варианте судьбы клетки, происходят принципиально отличные изменения клетки, ведущие, в конечном итоге, к прекращению её жизнедеятельности (Долгушин и др., 2009; Коротина, 2012; Urban et al., 2006; McDonald, 2012; Pilszek et al., 2010).

Процесс формирования внеклеточных ловушек сопровождается характерными морфологическими изменениями (рис. 2.7.2). Прежде всего, происходит стимуляция образования свободнорадикальных продуктов (Кравцов, 2012). При этом форма клетки становится уплощённой, кариолема утрачивает свою структуру, становясь более рыхлой, затем начинает постепенно разрушаться, одновременно нарушается целостность органоидов внутриклеточного пищеварения, и компоненты лизосом

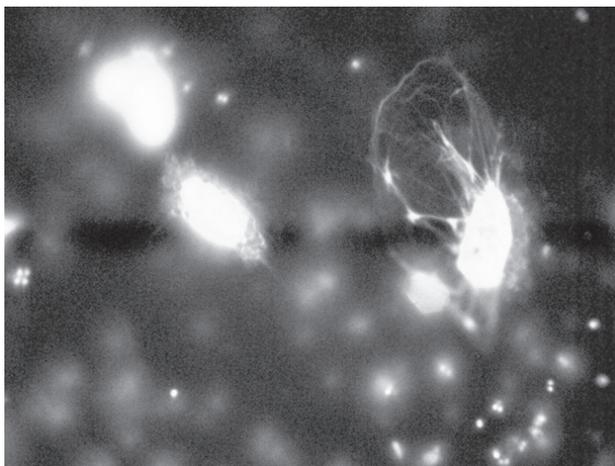


Рис. 2.7.2. Альвеолярный макрофаг 60-дневного животного, рожденного от интактной самки. Визуализируются внеклеточно расположенные нити ДНК и лизосомальные гранулы (макрофагальная ловушка). Окраска: акридиновый оранжевый. Микрофото. Увеличение: 900 (об. $\times 90$; ок. $\times 10$)

смешиваются с ядерным хроматином (Кравцов, 2012), однако фрагментации ДНК не происходит (Fuchs, 2007). Хроматин выходит в цитоплазму и заполняет весь внутриклеточный объем, затем происходит смешивание ядерного и цитоплазматического компартментов. Следующим этапом является выброс ДНК и других компонентов будущей ловушки во внеклеточное пространство с формированием сетеподобной структуры, куда попадают бактерии, при этом клетка погибает. В связи с тем, что под действием ДНК-азы внеклеточные сети подвергаются инволюции, предполагается, что основным компонентом ловушек является ДНК (Кравцов, 2012). Исходя из вышеизложенного, для комплексной оценки фагоцитарных свойств мононуклеаров при нарушении условий внутриутробного развития необходимым является оценка их способности к образованию внеклеточных ловушек. Для определения ловушкообразующей способности тканевых макрофагов используются такие показатели, как число макрофагов, способных к образованию ловушек и размеры (длина их хвостов). Об активности ловушек судили по числу активных ловушек (количество внеклеточных структур, захвативших *Staphylococcus aureus*), индексу макрофагальной ловушки (число бактерий в 100 подсчитанных внеклеточных ловушках в пересчёте на одну ловушку) и киллинговой активности (процент убитых поглощённых микроорганизмов из расчёта на одну макрофагальную ловушку) (Шаврина, 2012; Шопова, 2015).

Заслуживают внимания данные, полученные А. В. Шоповой (2015), свидетельствующие о том, что иммобилизационный стресс обуславливает угнетение

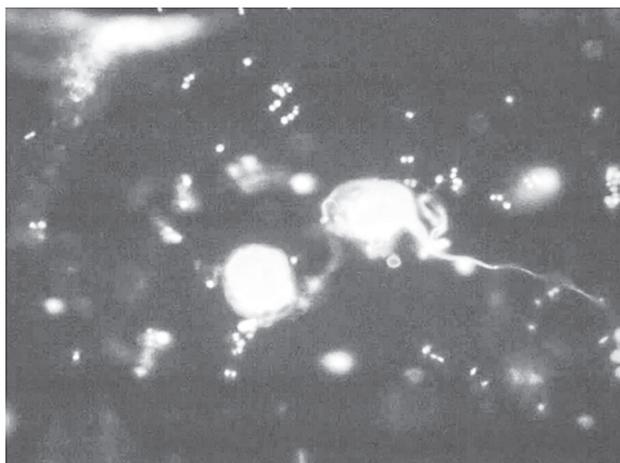


Рис. 2.7.3. Перитонеальные макрофаги 45-дневного животного от самок с экспериментальным поражением печени. Визуализируются немногочисленные внеклеточно расположенные нити ДНК. Окраска: акридиновый оранжевый. Микротофо. Увеличение: 900 (об. $\times 90$; ок. $\times 10$)

ловушкообразующей способности перитонеальных макрофагов и моноцитов периферической крови, а также активности самих экстрацеллюлярных ловушек (рис. 2.7.3, рис. 2.7.4). Результаты проведённого исследования позволяют сделать заключение, что у потомства самок крыс с экспериментальным поражением гепа-

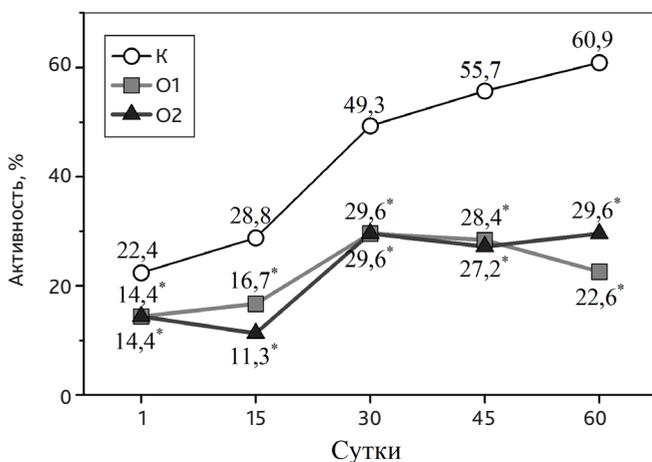


Рис. 2.7.4. Снижение киллинговой активности макрофагальных внеклеточных ловушек, образованных перитонеальными макрофагами потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени (O1, O2) в различные периоды постнатального развития. К — контроль. * $P < 0,05$

тобилиарной системы имеет место угнетение ловушкообразующей способности всех клеточных элементов системы мононуклеарных фагоцитов, протекающее на фоне депрессии активности формирующихся у них ловушек.

Известно, что физиологическая беременность сопровождается повышением активности коры надпочечников, что обуславливает повышенный уровень глюкокортикоидов (Губарева и др., 2000). В свою очередь гиперкортицизм при беременности обеспечивает повышенные метаболические потребности материнского организма путём стимуляции глюконеогенеза и липолиза. Кроме того, повышенный уровень глюкокортикоидов необходим для нормальных процессов дифференцировки тканей и органов плода. Известно, что у взрослого человека гормональный гомеостаз в гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системе осуществляется по принципу отрицательной обратной связи между кортикостероидами надпочечных желёз и гипоталамо-гипофизарной системой. В отличие от человека у плода в конце гестационного периода глюкокортикоиды стимулируют секрецию адренкортикотропного гормона гипофиза, т. е. действуют по принципу положительной обратной связи (Резников, 2004).

В то же время при патологической беременности, осложнённой экстрагениральными заболеваниями, происходит активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, приводящей к чрезмерному накоплению кортикотропина и глюкокортикоидов, часть из которых поступает через плаценту в кровь плода и обуславливает повышенный уровень стрессовых гормонов («пренатальный стресс, или синдром пренатального стресса»). На гормональные изменения плод отвечает преждевременной активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. В свою очередь внутриутробные изменения гормонального баланса, биосинтеза, секреции и метаболизма гормонов в организмах матери и плода, независимо от их внутреннего или внешнего происхождения, могут вызывать не только тератогенные, но и микроструктурные и функциональные нарушения у потомства. Так оказалось, что пренатальный стресс вызывает комплекс разнообразных морфологических (микроструктурных и ультраструктурных), нейрхимических, эндокринных, метаболических изменений, которые могут оказывать продолжительное или перманентное влияние в течение всей его постнатальной жизни (теория «внутриутробного программирования болезней») (Резников и др., 2004).

Согласно теории внутриутробного программирования болезней, воздействие неблагоприятных факторов во время беременности вызывает «адаптивный ответ» как у беременной женщины, так и у плода. В основе адаптивного ответа плода на действие различных неблагоприятных факторов лежат несколько компонентов, в том числе изменение экспрессии генов и модификация факторов транскрипции, модификация синтеза и секреции гормонов и других биологически активных веществ, изменение характера чувствительности рецепторов к этим веществам, метаболической активности в органах и тканях (Бадалян и др., 2012).

Исходя из этих теоретических предпосылок, логично предположить, что пренатальный стресс, обусловленный моделированием хронической патологии гепатобилиарной системы различной этиологии, приводит к истощению адаптивного ответа на разных уровнях организации (субклеточном, клеточном, тканевом, органном), что может проявиться в дисфункции различных функциональных систем плода, в том числе системы мононуклеарных фагоцитов. Выявленное нами у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза изменение содержания тканевых макрофагов и снижение их функционального состояния (миграционной, рецепторной, поглотительной, метаболической и киллинговой активности) является основной причиной нарушения неспецифической резистентности организма.

Тот, кто хочет решать вопросы естественных наук без помощи математики, ставит неразрешимую задачу. Измеряйте то, что измеримо, и делайте измеримым то, что таковым не является.

Галилео Галилей

Корреляционная адаптометрия (КА) — направление в отечественной биологии, медицине и биоинформатике, изучающее формирование связей в биологических системах и их изменение при действии экстремальных и прочих стрессирующих факторов. Оно зародилось в конце 1980-х гг. в недрах Института медицинских проблем Севера СО АМН СССР благодаря работам А. Н. Горбаня, Е. В. Смирновой (Петушковой) и В. Т. Манчук с коллегами (Горбань и др., 1987; Седов и др., 1988). В основе КА лежит открытый авторами «эффект группового стресса», проявляющийся увеличением силы связей физиологических показателей организма в ответ на действие стрессоров. На практике данный эффект обычно регистрируется как увеличение веса корреляционного графа (ВКГ) G — суммы абсолютных значений парных коэффициентов корреляции между всеми анализируемыми показателями. В типичной ситуации с ростом адаптационной нагрузки в популяции величина G повышается, а в результате успешной адаптации — снижается (Горбань и др., 1997). Таким образом, анализ силы коррелированности показателей в биологической системе позволяет судить о величине адаптационной нагрузки и косвенно — о силе вызвавшего её стрессирующего воздействия, что и составляет суть метода КА.

К настоящему времени установлено, что «эффект группового стресса» проявляет себя не только в физиологических показателях и даже не только в биологических системах (Горбань, Смирнова, 2018). Вероятно, в его основе лежат некие универсальные механизмы, которые обсуждаются и уже более 20 лет являются самостоятельным и довольно успешным объектом математического моделирования (Разжевайкин, Шпитонков, 2008). В то же время, несмотря на обилие исследований по КА, вопросы статистического анализа таких данных практически не освещаются в литературе. В известных нам работах ВКГ выступал в качестве неподверженного влиянию ошибок интегрального показателя. Вследствие этого в предметной области выводы об уровнях стресса и/или адаптации делались лишь на основании того, в каких группах величина G принимала большее или меньшее значение. Вместе с тем ясно, что как парные коэффициенты корреляции, так и ВКГ в целом являются случайными величинами, которые проявляются в выборке с отклонениями от параметров генеральной совокупности, а потому требуют статистического оценивания. В работе Е. В. Смирновой (2000) указывалось, что «для определения статистической достоверности при сравнении весов корреляционного графа используются методы бутстрепа и «складного ножа», с их же помощью «решается проблема интервального оценивания веса корреляционного графа» (Смирнова, 2000, раздел 4.1). Цель настоящей работы заключалась в эмпирическом исследовании возможностей техник бутстрепа, «складного ножа» и ряда других статистических методов применительно к решению задач КА, а также в поиске путей повышения надёжности оценок и сопоставимости результатов КА.

В данной работе КА была апробирована на примере взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при психофизической адаптации людей пожилого возраста, так как хорошо известно, что физическое и психическое здоровье человека обусловлено, прежде всего, адаптацией к внешним и внутренним стрессорам, которая поддерживается нейро-иммуно-эндокринными механизмами и значительно снижается с возрастом (Epel, Lithgow, 2014; Rogers, Lucchesi, 2014; Wagner et al., 2016). Для стимуляции исследований в области КА в работу включён набор оригинальных данных (приложение 3.1), а все нестандартные для статистических пакетов расчёты сопровождаются приложениями с кодом для программно-статистической среды R — наиболее популярной и динамично развивающейся системы статистической обработки данных в мире.

В исследование было включено 63 чел. пожилого возраста, проживающих в Челябинском геронтологическом центре. Средний возраст обследованных составил 79 ± 5 лет. Всем пожилым людям в ходе клинического обследования был проведён мониторинг когнитивных нарушений с использованием шкалы «Mini Mental State Examination» и классификацией стадий дисциркуляторной энцефалопатии по Н. Н. Яхно с соавт. (2005), а также физического состояния с помощью индекса Бартел (Barthel Index of Activities of Daily Living, 1993). По результатам оценки психофизического статуса все обследованные были разделены на три группы: 1) 20 чел. с умеренными когнитивными расстройствами и незначительными физическими нарушениями — группа «Активное долголетие»; 2) 15 чел. с выраженной когнитивной недостаточностью (преимущественно — сосудистая деменция) и физической несостоятельностью — группа «Милосердие»; 3) 28 чел. с промежуточными показателями психического и физического состояния — группа «Пожилые люди промежуточного типа».

Все обследованные имели одинаковые возраст-ассоциированные заболевания: кардиоваскулярные, бронхолёгочные, заболевания ЖКТ и опорно-двигательного аппарата. При этом из исследования были исключены индивидуумы с ожирением, онкологическими заболеваниями, болезнью Паркинсона и Альцгеймера, врождёнными нарушениями центральной нервной системы. Группу сравнения составили случайным образом отобранные 19 штатных доноров крови Челябинской областной станции переливания крови — группа «Доноры», их средний возраст — 39 ± 4 года. Перед процедурой взятия крови все участники исследования подписали форму информированного согласия на исследование.

Концентрацию цитокинов (IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-2, IL-10), интерферона-гамма — IFN- γ , фактора некроза опухолей-альфа TNF- α (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) и четырёх гормонов: кортизола (ООО «Хема», Москва), адренкортикотропного гормона — АКТГ («Biomerica», Германия), дофамина и норадреналина («LDN», Германия) определяли в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Multiscan EX («Labsystems», Финляндия).

В ходе статистического анализа вычисляли парные коэффициенты корреляции Спирмена, а также исследовали различные способы расчёта веса корреляционного графа с 95 %-ными доверительными интервалами (95% ДИ), включая бутстреп и технику «складного ножа». В ходе выборочных сравнений использовали рандомизационную технику Монте-Карло и однофакторный дисперсионный анализ, проведённый на псевдозначениях складного ножа. Расчёты проведены базовыми средствами программно-статистической среды R (version 3.3.2, пакет «stats» (R Core Team, 2016)) и с использованием пакета «boot» (version 1.3–20 (Canty, Ripley, 2017)). Графические построения выполнены в пакетах: «stats» для R, KyPlot (version 5.0 (Yoshioka, 2002)) и TrX (version 1.5 (TrX, 2018)).

3.1. Стандартный подход к расчёту веса корреляционного графа и пути его модификации

3.1.1. Стандартный подход

В оригинальном виде метод КА состоит из шести этапов (для обеспечения внутреннего единства материала некоторые термины были нами заменены без искажения смысла). На этапах 1–5 для каждой группы проводятся следующие операции (Смирнова, 2000):

- 1) проверяется гипотеза о нормальности закона распределения показателей в выборке по критерию хи-квадрат;
- 2) проводится стандартизация матрицы данных;
- 3) по стандартизованным данным для всех показателей (признаков) вычисляются парные коэффициенты ковариации и далее — парные коэффициенты корреляции r_{ij} между i -м и j -м признаками;
- 4) проверяется статистическая значимость коэффициентов корреляции и на основании результатов этой проверки устанавливается пороговое значение a для принимаемых в рассмотрение коэффициентов корреляций;
- 5) ВКГ рассчитывается как сумма абсолютных значений отобранных на предыдущем этапе парных коэффициентов корреляции r_{ij} ;

$$G = \sum_{|r_{ij}| \geq a} |r_{ij}|,$$

где r_{ij} — коэффициент корреляции; a — пороговое значение (на практике часто устанавливается равным 0,5).

На последнем шестом этапе с использованием методов бутстрепа и «складного ножа» проводится интервальное оценивание показателя G и сравнение групп по величине G . Иными словами, для показателей G рассчитываются доверительные интервалы, например, 95% ДИ, а вывод о значимом различии выборок принимается на основании отсутствия их трансгрессии.

3.1.2. Выбор корреляции для оценки ВКГ

Поскольку КА формировалась в среде специалистов по биоинформатике и математическому моделированию, оригинальный подход может быть сразу подвергнут модификации: с учётом наработок в биостатистике и исходя из практики статистического анализа биомедицинских данных. Как можно заметить, стандартный подход является параметрическим; именно поэтому на первом этапе проверяется нормальность распределения показателей, а вычисляемые на третьем этапе r_{ij} являются коэффициентами корреляции Пирсона. Следует отметить, что для проверки на нормальность предложено более двух десятков критериев, и критерий хи-квадрат не является лучшим из них. В большинстве ситуаций (разные значения асимметрии и эксцесса, а также их соотношение) большей мощностью обладает критерий Шапиро — Уилка, который разрабатывался специально для столь частых в биомедицинских работах малых выборок (Кобзарь, 2006; Гайдышев, 2015). Также, поскольку собственно ковариация в анализе не используется, а ковариация стандартизованных значений является корреляцией Пирсона, второй этап можно опустить и вычислять корреляцию напрямую. При этом, исходя из теоретических соображений, корреляции Пирсона следует предпочесть её прямой ранговый аналог — корреляцию Спирмена. Во-первых, очень многие биологические показатели распределены не нормально, а положительно асимметрично и скорее логарифмически нормально. Во-вторых, связи между ними зачастую далеки от линейных. Корреляция Спирмена оценивает монотонную связь, тогда как корреляция Пирсона — только линейную (вся нелинейность уходит в ошибку оценки). Поэтому использование корреляции Спирмена решает сразу обе эти проблемы и увеличивает точность оценки без какого-либо ущерба для подхода в целом. Таким образом, этапы 1–3 можно редуцировать до вычисления парных коэффициентов корреляции Спирмена.

3.1.3. Выбор величины порогового значения

На этапе 4 предстоит оценить статистическую значимость полученных коэффициентов корреляции и с учётом результатов этой оценки ввести пороговое значение a — для выбора наиболее сильных корреляций, которые и будут участвовать далее в расчёте G . Полагаем, что выбор порогового значения — очень важный момент, на котором следует остановиться подробнее.

Во-первых, поскольку оценка силы коррелированности показателей проводится для всей системы признаков, то будет логичным включить в расчёт такого интегрального показателя как G все корреляции, независимо от их силы, т. е. без какого-либо порога.

Во-вторых, для оценки явлений стресса/адаптации индивидуумов на физиологическом (в том числе нейроэндокринном и иммунологическом) уровне важно не столько наличие сильных связей, сколько присутствие/отсутствие связей между «ключевыми игроками» системы, которые определяют её стабильность в целом. Поэтому для корректной биологической интерпретации результатов статистического анализа важен учёт всех, в том числе и слабых связей.

В-третьих, в типичном для практики случае разных по объёму выборок статистически значимыми могут оказаться разные по силе корреляции. Так, например, может оказаться, что для большой выборки это будут $|r| > 0,2$, а для малой выборки — только $|r| > 0,6$. Это позволяет разным исследователям и в разных ситуациях выбирать произвольные пороговые значения, что снижает методологическую строгость техники КА.

Наконец, в-четвертых, с увеличением порогового значения будет увеличиваться дискретность оценки G . В качестве примера на рис. 3.1 показаны изменения величины ВКГ для набора из 11 показателей цитокинов и нейрогормонов в четырёх рассматриваемых группах лиц. Из него видно, что введение порогового значения почти не влияет на ранжирование групп по величине ВКГ, однако заметно ухудшает стабильность оценки относительных различий. Так, если в диапазоне пороговых значений 0...0,15 относительная величина межгрупповых различий более-менее постоянна, то с ростом порогового значения она начинает скачкообразно изменяться. Более того, если бы мы выбрали в качестве порога число 0,5, то сделали бы неверный вывод о наименьшем значении G в группе «Доноры», тогда как в действительности он минимален в группе «Пожилые люди промежуточного типа». Также дискретность статистики является ограничением для применения техники «складного ножа» (см. далее).

Таким образом, и биологические, и математические доводы указывают на необходимость отказа от использования порогового значения. Это не только не нанесёт ущерба подходу КА, но также повысит надёжность оценок ВКГ и унификацию методологии КА. Для того чтобы читатели могли самостоятельно это проверить,

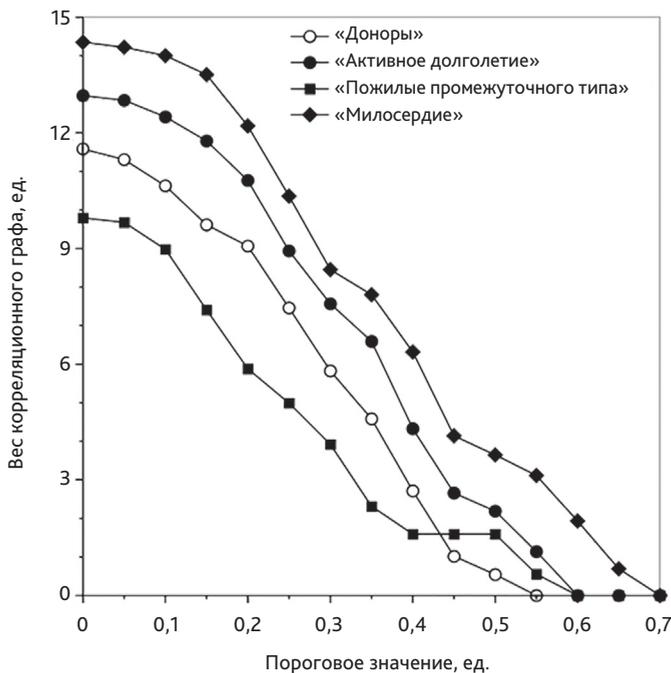


Рис. 3.1. Изменение веса корреляционного графа в зависимости от величины порогового значения

в функциях расчёта ВКГ для программно-статистической среды R (Приложение 3.2) возможность введения порогового значения (`mycutoff`) была сохранена.

3.1.4. Выбор функции для измерения «эффекта группового стресса»

Использование в качестве меры стресса/адаптации в КА функции ВКГ является на сегодняшний день доминирующим, хотя авторы подхода указывали, что в качестве подобной интегральной меры могут быть использованы и другие показатели. Например, это могут быть собственные значения и собственные векторы, полученные в анализе главных компонент, или средняя абсолютная корреляция (САК) (Gorban et al., 2009). Полагаем, что для развития направления КА будет полезным использовать именно САК, т. е. ВКГ, делённый на число корреляций в наборе из k признаков:

$$САК = G / \frac{k(k-1)}{2} = \frac{2G}{k(k-1)}.$$

В отличие от ВКГ, величина которого зависит от числа используемых показателей, САК от них не зависит и теоретически может изменяться в диапазоне от 0 (все парные корреляции в наборе нулевые) до 1 (все корреляции в наборе максимально сильные с $|r| = 1$). Хотя на практике значения САК, в точности равные 0 или 1, наблюдаться и не будут, введение такой меры позволит выражать и сравнивать величину стресса или адаптационных затрат в одинаковых и сопоставимых единицах: а) в случае разного числа анализируемых признаков, б) в разных системах, причём не только биологических. По аналогии с коэффициентами корреляции и ассоциации для САК можно будет ввести границы, чтобы классифицировать уровень адаптационной нагрузки, например, как «низкий», «средний» или «высокий». При этом опубликованные беспороговые значения ВКГ могут быть легко пересчитаны в САК. Учитывая последнее обстоятельство, во второй части работы мы решили использовать пока более привычную для всех оценку ВКГ.

3.2. Интервальная оценка веса корреляционного графа

3.2.1. Бутстреп

— метод оценки параметров эмпирического распределения интересующей статистики, основанный на многократной генерации случайных выборок из исходного набора данных. Он используется в ситуациях, когда обычную аналитическую оценку (преимущественно дисперсии и доверительного интервала) сложно или невозможно получить, а также для вычисления смещения оценок параметров генеральной совокупности на основании изучения выборки и для коррекции этого смещения. Метод был предложен Брэдли Эфроном в 1979 г. как развитие идеи другой ресемплинг-техники (от англ. *re...* — повтор и *sample* — выборка) — «складного ножа», однако стал широко популярен только с появлением доступных персональных компьютеров.

Для построения бутстреп-оценки ВКГ для каждой из четырёх исходных выборок с возвратом значений были сгенерированы 9999 новых выборок — реплик бутстрепа, для которых были построены распределения и рассчитаны $G_{\text{бутстреп}}$ как средние

значения ВКГ этих 9999 выборок. На рис. 3.2 такое распределение для группы «Доноры» показано серым цветом. Видно, что оно является отчётливо положительно асимметричным, а $G_{\text{бутстреп}}$ сильно смещён вправо относительно G . Для других групп ситуация была аналогичной.

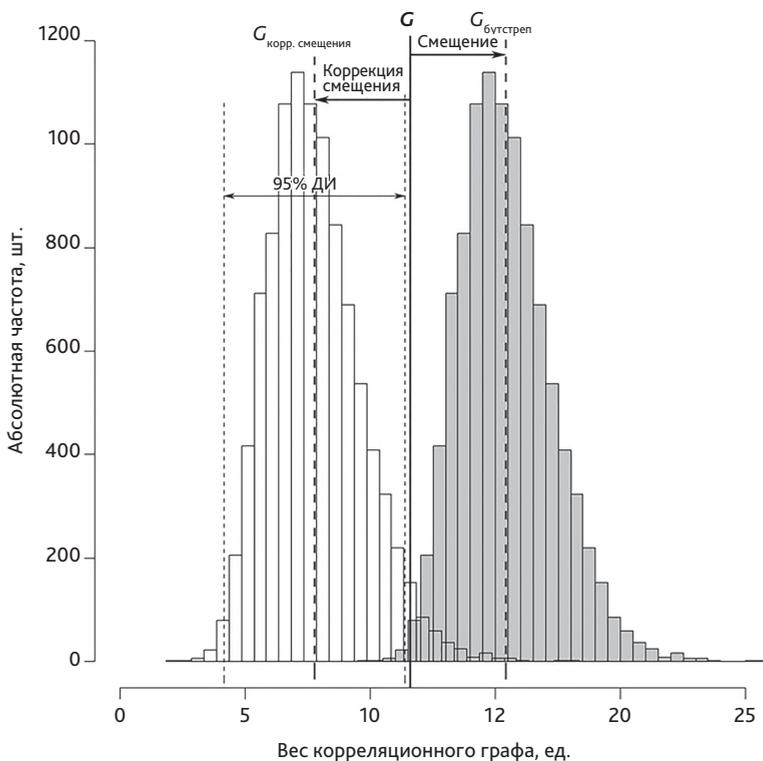


Рис. 3.2. Использование техники бутстрепа для вычисления несмещенной оценки веса корреляционного графа γ генеральной совокупности по его выборочной оценке G (на примере группы «Доноры»)

Это означает, что полученная нами выборочная оценка G столь же сильно смещена вправо относительно истинного ВКГ генеральной совокупности γ . Поэтому для получения несмещённой оценки γ нужно из выборочной оценки G вычесть величину смещения *bias* (Efron, Tibshirani, 1993):

$$\gamma = G - bias = 2G - G_{\text{бутстреп}}$$

На практике Эфрон и Тибширани рекомендуют ориентироваться на отношение величины смещения и стандартной ошибки $se_{\text{бутстреп}}$: если $bias < 0,25 se_{\text{бутстреп}}$, то смещением можно пренебречь, иначе коррекция необходима (Efron, Tibshirani,

1993). После коррекции получается оценка $G_{\text{корр. смещения}}$ (табл. 3.1), которая является лучшей в рамках данного подхода оценкой γ , и для которой одним из существующих способов можно рассчитать доверительный интервал.

Таблица 3.1

**Интервальная оценка веса корреляционного графа G
иммунологических и нейроэндокринных показателей в группах доноров
и пожилых людей с использованием техник бутстрепа и «складного ножа»**

Показатель	«Доноры»	Пожилые		
		«Активное долголетие»	«Пожилые промежуточного типа»	«Милосердие»
Объем выборки n	19	20	28	15
G	11,58	12,97	9,79	14,35
Бутстреп				
$G_{\text{бутстреп}}$	15,38	16,14	12,94	18,29
Смещение ($bias$)	3,82	3,18	3,14	3,93
Ст. ошибка $se_{\text{бутстреп}}$	1,860	1,839	1,311	2,260
$G_{\text{корр. смещения}}$	7,76	9,79	6,65	10,42
95 % ДИ $_{\text{корр. смещения}}$	[4,13; 11,39]	[6,21; 13,36]	[4,08; 9,23]	[6,00; 14,86]
$G_{\text{lg, корр. смещения}}$	8,77	10,49	7,47	11,36
95 % ДИ $_{\text{lg, корр. смещения}}$	[6,97; 11,04]	[8,43; 13,06]	[6,14; 9,09]	[8,99; 14,32]
«Складной нож»				
Смещение ($bias$)	3,87	4,64	3,71	4,83
Ст. ошибка $se_{\text{скл. нож}}$	1,590	2,188	1,194	2,183
$G_{\text{скл. нож}}$	7,71	8,32	6,09	9,52
95 % ДИ $_{\text{скл. нож}}$	[4,37; 11,05]	[3,75; 12,91]	[3,64; 8,54]	[4,84; 14,21]
$G_{\text{lg, скл. нож}}$	8,39	9,23	6,78	10,41
95 % ДИ $_{\text{lg, скл. нож}}$	[6,33; 11,13]	[6,47; 13,15]	[5,31; 8,64]	[7,60; 14,26]
$G_{\text{lg, скл. нож, выбросы}}$	7,83	7,91	6,80	15,00
95 % ДИ $_{\text{lg, скл. нож, выбросы}}$	[6,28; 9,77]	[5,93; 10,55]	[5,58; 8,29]	[10,62; 21,18]

Как видно из табл. 3.1, в нашем случае смещение приблизительно в 2 раза превышало ошибку: например, для группы «Доноры» в $3,82/1,860 = 2,05$ раза. Ввиду столь сильного смещения и асимметрии распределения два наиболее популярных способа расчёта ДИ оказались непригодными: процентильный метод (*percentile*

method) давал ДИ, не включавшие исходное значение G , а его вариант с коррекцией смещения и асимметрии распределения (BCa) — нереалистично узкие или даже точечные ДИ. Поэтому в итоге нами был выбран вариант оценки максимального правдоподобия, предполагающий асимптотическую нормальность распределения (до устранения асимметрии — нереалистичное предположение), с коррекцией смещения и оценкой дисперсии по бутстреп-репликам. В пакете *boot* для среды R функция *boot.ci* выдаёт такие ДИ по умолчанию как результаты метода Normal (приложение 3.3). Эти ДИ приведены в табл. 3.1 как 95 % ДИ_{корр. смещения}.

Пока не ясно, насколько величина смещения свойственна самой функции ВКГ, а насколько обусловлена особенностями набора данных. Однако отмеченная асимметрия распределения присуща именно функции, поскольку G складывается из парных коэффициентов корреляции r , для которых асимметрия распределения хорошо известна. Правда, для положительных r эта асимметрия будет отрицательной (Zimmerman et al., 2003). Именно для её коррекции при работе с корреляциями Пирсона (реже — Спирмена) используют z -преобразование Фишера или z^* -преобразование Хотеллинга (Sokal, Rohlf, 1995; Zimmerman et al., 2003). Проведённое нами моделирование поведения различных по величине и знаку корреляций показало, что положительная асимметрия распределения ВКГ бутстреп-реплик привносится этапом взятия абсолютных значений; при этом наблюдаются следующие три ситуации:

1) средние и сильные положительные корреляции с исходно отрицательной асимметрией получают ограничение варьирования влево; небольшой левый отрицательный конец хвоста распределения перекладывается вправо, отрицательная асимметрия уменьшается;

2) средние и сильные отрицательные корреляции с исходно положительной асимметрией целиком перекладываются вправо;

3) слабые корреляции, варьирующие вправо и влево около нуля, теряют отрицательную половину распределения, которая перекладывается вправо.

В результате формируется сильная асимметрия распределения функции ВКГ, препятствующая традиционному интервальному оцениванию. Для подобных асимметричных распределений в бутстреpe рекомендуют использовать нормализующие преобразования (которые, однако, применимы не ко всем его разновидностям при расчёте ДИ) (Efron, Tibshirani, 1993), либо использовать специально разработанные, но пока малоизвестные методы (Zhou, Dinh, 2005). Поэтому вторая популяционная оценка ВКГ была рассчитана нами для преобразованных данных; при этом в качестве преобразования использовали десятичный логарифм — функцию, которая часто применяется на практике для снижения асимметрии распределений с тяжёлыми хвостами справа. Для этого функцию расчёта G из wg модифицировали в $wg\log$ (приложение 3.2).

В результате асимметрию удалось снизить (рис. 3.3), хотя и не устранить полностью: если для исходных данных величина коэффициента асимметрии распределе-

ния бутстреп-реплик в группе доноров составляла 0,66, то после логарифмирования — 0,28. Для других групп результаты были аналогичными. Далее для преобразованных значений рассчитывали скорректированное вычитанием смещения значение G и 95% ДИ для него (метод Normal), которые пересчитывали в исходные единицы путём «наивной» ретрансформации (*naïve retransformation*) — возведением числа 10 в эти степени. Полученные в результате значения представлены в табл. 3.1 как $G_{\lg, \text{ корр. смещения}}$ и 95% ДИ $_{\lg, \text{ корр. смещения}}$.

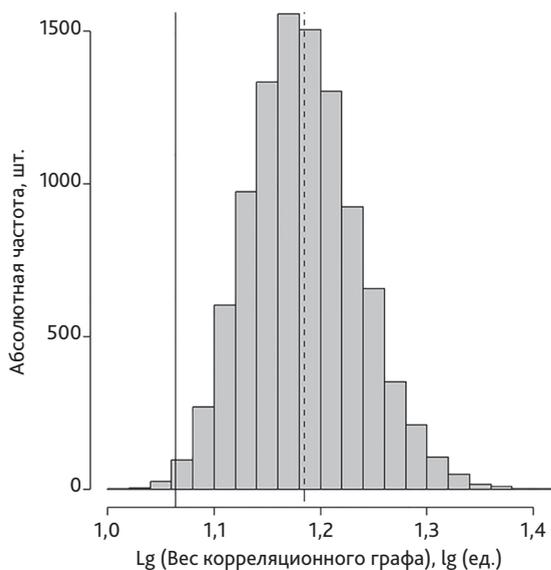


Рис. 3.3. Распределение логарифма веса корреляционного графа в 9999 бутстреп-репликах группы «Доноры»

Таким образом, получение интервальной оценки ВКГ с использованием техники бутстрепа оказалось не самой простой задачей, имеющей к тому же разные варианты решения. Более того, помимо технических сложностей, к использованию методологии бутстрепа в КА имеются также вопросы теоретического характера. Так, если для функции любого отдельно взятого показателя применимость бутстрепа не вызывает сомнений, то с увеличением числа показателей в наборе количество возможных их сочетаний по закону комбинаторики будет увеличиваться, а вероятность обнаружения в популяции ещё одного такого же сочетания — снижаться. В пределе каждый объект может рассматриваться как уникальный вектор значений k признаков. Это в полной мере относится к нашим данным, так как для каждого человека характерен свой уникальный профиль нейро-иммуно-эндокринной системы, который изменяется в зависимости от состояний организма, таких как

здоровье/болезнь/старение и развития возраст-ассоциированных заболеваний (Саїавате et al., 2014). Напомним также, что именно на уникальности биологических объектов основаны, например, методы биометрической защиты данных, а также набирающие популярность в медицине идеи персонализированного подхода к лечению пациента. Вместе с тем реплика бутстрепа содержит в среднем 63,2 % оригинальных значений выборки и 36,8 % ($1/e = 0,368$) повторов. Это — так называемое правило «*the .632+ rule*», которое хорошо известно специалистам и на основе которого был даже предложен ещё один вариант бутстрепа (Efron, Tibshirani, 1997). В многопеременных (*multivariable*) техниках, к которым следует отнести и КА, в ресемплинге участвует сразу весь вектор значений одного объекта, а потому каждая повторная выборка бутстрепа содержит около 37 % повторов потенциально уникальных данных — таких, которых в популяции больше нет, — и на основании именно этого невозможного набора рассчитывается интересующая статистика. Таким образом, с философских позиций заложенную в бутстрепе модель ресемплинга в случае КА следует признать не отвечающей реальности. Поэтому далее нами был рассмотрен исторически более ранний вариант ресемплинга — техника «складного ножа».

3.2.2. «Складной нож»

— метод оценки параметров эмпирического распределения интересующей статистики, основанный на генерации выборок из исходного набора данных путём удаления их части. Технику разработал в 1949–1956 гг. Морис Кенуй, а в 1958 г. Джон Тьюки расширил её и за универсальность назвал «складным ножом». Существуют варианты метода с удалением разных частей данных, однако чаще всего из выборки удаляется только один элемент (*leave-one-out jackknife*). Поскольку данный метод нередко понимается неправильно или путается с перекрёстным оцениванием (*cross-validation*) рассмотрим его несколько подробнее.

Техника «складного ножа» проводится в следующие четыре этапа (Miller, 1974; Abdi, Williams, 2010). На первом этапе по полной выборке в n элементов рассчитывается интересующая статистика $\hat{\theta}$. На втором этапе из выборки поочередно удаляется каждый i -й элемент, и интересующая статистика рассчитывается без него с получением n значений $\hat{\theta}_{(-i)}$. Таким образом, в отличие от бутстрепа, реплики «складного ножа» формируются исключительно из имеющихся и, возможно, уникальных наблюдений. Поскольку выборочная оценка статистики $\hat{\theta}$, вычисленная по всем элементам, известна, а также известно её значение без i -го элемента, значение этого удалённого элемента можно вычислить вычитанием как $P_i = n\hat{\theta} - (n-1)\hat{\theta}_{(-i)}$, что и проводится на третьем этапе. Такие «воссозданные» расчётом значения P_i

получили название «псевдозначений» (*pseudo-values*). Их также будет n , но, в отличие от полученных на перекрывающихся данных и потому зависимых $\hat{\theta}_{(-i)}$, они будут независимыми. На последнем этапе рассчитывается среднее арифметическое всех P_i и их дисперсия, которые и являются, соответственно, несмещённой популяционной оценкой функции θ и её дисперсией, вычисленных техникой «складного ножа». Полученная таким путём оценка θ уже не нуждается в какой-либо коррекции смещения, хотя сама величина смещения может быть вычислена как разность между выборочным значением статистики и средним псевдозначений: $bias = \hat{\theta} - \bar{P}$. Доверительный интервал для θ рассчитывается обычным способом с использованием t -распределения Стьюдента и оценкой стандартного отклонения по псевдозначениям «складного ножа» (Miller, 1997).

В приложении 3.4 приведена функция для расчётов методом «складного ножа», а полученные с её помощью оценки ВКГ с 95% ДИ представлены в табл. 3.1 как $G_{\text{скл. нож}}$ и 95% ДИ $DI_{\text{скл. нож}}$. Видно, что они оказались близки к таковым, полученным методом бутстрепа. В данном случае 95% ДИ также не содержали выборочные оценки G , что указывает на сильное смещение последних относительно ВКГ γ генеральной совокупности. Кроме того, часть псевдозначений имела отрицательный знак, что говорит о возможной ошибке в оценке γ техникой «складного ножа», которую можно пытаться уменьшить с помощью преобразований. На необходимость преобразований для функций, дающих отрицательные псевдозначения, Руперт Миллер указывал в своём обзоре ещё в 1974 г. (Miller, 1974). Поскольку техника «складного ножа» устраняет смещение путём вычитания, т. е. линейной операции, она работает правильно только для статистик, которые являются линейными функциями параметров и данных и распределение которых является непрерывным или «достаточно гладким», чтобы считаться таковым. А для достижения этой линейности используются преобразования (типа z -преобразования Фишера для корреляций или логарифмического преобразования для стандартных отклонений) (Abdi, Williams, 2010). Поэтому в данном случае мы также воспользовались логарифмическим преобразованием ВКГ (функция $wglog$). Итоговые ретрансформированные из логарифмов значения представлены в табл. 3.1 как $G_{\text{lg, скл. нож}}$ и 95% ДИ $DI_{\text{lg, скл. нож}}$.

3.3. Проблемы интервального оценивания

На рис. 3.4 представлены результаты расчёта выборочного значения ВКГ для четырёх исследуемых групп, а также результаты всех описанных выше способов получения несмещённой оценки популяционного значения ВКГ с ДИ. Анализ рисунка позволяет обозначить ряд проблем, требующих осмысления и последующего решения.

Во-первых, почти во всех случаях выборочная оценка ВКГ не попадала в 95% ДИ для популяционной оценки (!). В большинстве биомедицинских работ интервальная оценка используется для мер центральной тенденции (преимущественно — для среднего значения), для которых ДИ всегда содержит выборочную оценку. Поэтому налицо психологическая проблема принятия в качестве результата исследования некоего теоретического значения, которое: а) существенно различается с вычисленным по реальной выборке значением, б) заметно варьирует в зависимости от использованной техники оценки. Эта проблема нуждается в дальнейшем исследовании.

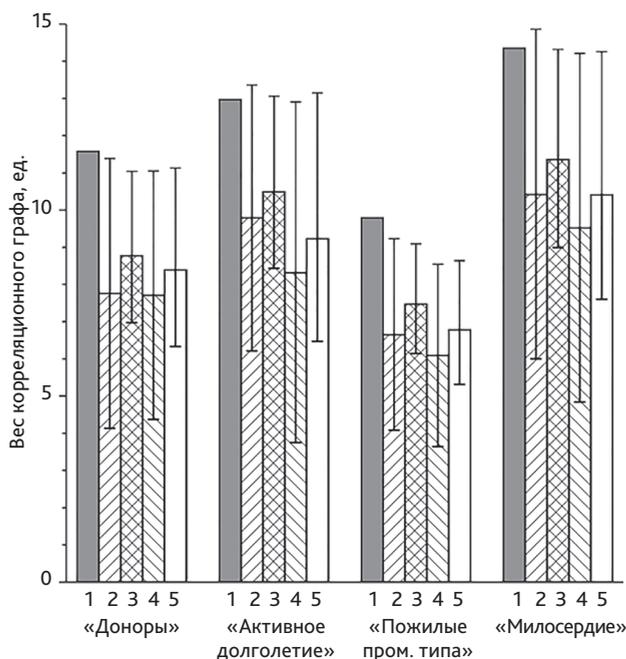


Рис. 3.4. Сопоставление доноров и трех групп пожилых людей по весу корреляционного графа с 95% ДИ, рассчитанных разными способами: 1 — выборочная оценка, 2 — бутстреп с коррекцией смещения, 3 — бутстреп с логарифмированием и коррекцией смещения, 4 — «складной нож», 5 — «складной нож» с логарифмированием

На данном этапе разногласия между выборочной и популяционной оценками можно примирить приведением в работах их обеих.

Во-вторых, можно заметить, что 95% ДИ, вычисленные на десятичных логарифмах ВКГ, существенно уже как для бутстреп-оценок, так и для оценок «складного ножа», что указывает на эффективность уменьшения дисперсии функции ВКГ с помощью преобразований. Более того, ввиду сильной асимметрии её распределения следует рекомендовать не только использование преобразований, но и продолжение поиска функции для наиболее полного устранения этой асимметрии. Такой поиск может быть продолжен как в теоретическом, так и в практическом плане. Здесь следует отметить, что устранение положительной асимметрии отдельного распределения не представляет сложности и может быть проведено адаптивными к данным степенными преобразованиями Бокса — Кокса или Йео — Джонсона (в случае наличия отрицательных псевдозначений). Однако для обеспечения сопоставимости результатов в разных приложениях КА желательно иметь одинаковую для всех случаев преобразующую функцию. Пока мы использовали эмпирический подход с логарифмической функцией, но как было отмечено выше, она не устранила асимметрию полностью.

Третья проблема относится к сравнению выборок посредством сопоставления ДИ (последний этап оригинального метода). Очевидно, что для обеспечения неперекрывания ДИ оценки ВКГ или САК должны: 1) заметно различаться, 2) иметь узкие ДИ. Вместе с тем свобода варьирования коэффициентов корреляции существенно ограничена математически: они могут находиться только в интервале $[-1, 1]$. Математическое ограничение ВКГ или САК ещё в 2 раза строже, так как сводится к диапазону $[0, 1]$. Таким образом, особенности самих используемых в КА функций отчасти препятствуют получению сильных межгрупповых различий. В этих условиях следует сосредоточить усилия именно на обеспечении узости ДИ. Выше уже обсуждался один такой способ — устранение асимметрии преобразованиями. Другой, более тривиальный, способ — увеличение объёмов выборок. С использованием функций приложений 3.2–3.4 зависимость ширины ДИ от объёма выборки легко смоделировать, однако даже по рис. 3.4 видно, что полученные ретрансформацией из логарифмов ДИ примерно прямо пропорциональны объёмам выборок. Это означает, что для двукратного уменьшения ДИ необходимо примерно двукратное увеличение объёма выборки. Наконец, последний способ уменьшить ДИ — увеличить внутреннюю однородность выборки путём удаления резко отклоняющихся наблюдений — выбросов.

3.4. Проверка данных на выбросы в корреляционной адаптометрии

Проблема засорения выборки элементами других генеральных совокупностей и нетипичными наблюдениями («выбросами») по-разному остро стоит в разных областях биологии и медицины. Применительно к нашей области известно, что при старении наблюдается выраженная гетерогенность в функционировании основных регуляторных систем организма (нервной, эндокринной и иммунной), что приводит к высокой межиндивидуальной вариабельности как отдельных показателей, так и их комбинаций (Brodin, Davis, 2017; Li et al., 2017). Даже когда условия экспериментов жёстко стандартизуют, показатели иммунных реакций *in vivo* и *ex vivo* изменяются в очень широком диапазоне, что связывают с такими факторами, как генетические полиморфизмы, особенности пренатального развития, гормонального статуса, образа жизни, диеты, структуры кишечной микробиоты и др. (Calder, 2007). А в условиях высокой вариабельности возможно появление редких сочетаний экстремальных значений признаков, проявляющихся в виде резко отклоняющихся от остальных значений выборки наблюдений.

Обнаружение подобных многомерных выбросов и наиболее влиятельных наблюдений не является проблемой в современной прикладной статистике. Для этого разработано и используется большое число мер: стандартизованные остатки, студентизированные (внутренние и внешние) остатки, расстояния Махаланобиса и Кука, ковариационное отношение, меры *DFFIT*, *DFBETA* и их стандартизованные варианты. Анализ этих мер показал, что некоторые из них могут быть применены к функции ВКГ, причём наиболее удобной является внешний (удалённый) студентизированный остаток (*externally studentized residual*, *studentized deleted residual*). Можно показать, что применительно к технике вычисления ВКГ псевдозначение «складного ножа» является прямым аналогом удалённого остатка в регрессионном анализе, а его отношение к стандартной ошибке выборки, вычисленной в отсутствие удалённого наблюдения, должно иметь *t*-распределение Стьюдента (при условии нормального распределения псевдозначений) с числом степеней свободы $df = n - 2$. Также данная мера может быть получена по формуле сравнения единственного наблюдения с выборкой по *t*-критерию (Sokal, Rohlf, 1995), если в качестве наблюдений использовать псевдозначения «складного ножа».

Таким образом, промежуточные результаты техники «складного ножа» оказались очень удобными для проверки наблюдений на выбросы, и нами была написана функция, позволяющая рассчитать соответствующие *P*-значения (приложение 3.5). Её применение к группе доноров позволило выявить существенное отличие от остальных первого донора, который уменьшал оценку ВКГ на 10 %-ном уровне значимости: критерий Стьюдента $t_{(17)} = -1,79$; $P = 0,091$. Проведение та-

кой же либеральной ($P \leq 0,10$) проверки на выбросы в группах пожилых людей выявило всего лишь 6 относительно нетипичных лиц: по два в каждой из трёх групп. Удаление всех 7 лиц из анализа позволило существенно уменьшить дисперсию «складного ножа» и, соответственно, сократить ширину 95 % ДИ. Полученные значения приведены в двух последних строках табл. 3.1 как $G_{\text{lg, скл. нож, выбросы}}$ и 95% ДИ $_{\text{lg, скл. нож, выбросы}}$, а также на рис. 3.5, где функция ВКГ была дополнительно пересчитана в САК делением на 55 (число корреляций в наборе из $k = 11$ признаков равно $k(k-1)/2 = 11 \times 10/2 = 55$). Полагаем, что именно этот результат, полученный техникой «складного ножа» на преобразованной (пока — логарифмированием) функции ВКГ с предварительно удалёнными потенциальными выбросами, наиболее близок к реальному популяционному значению и может быть интерпретирован с биологической точки зрения. Однако прежде следует рассмотреть другие возможные варианты статистического сравнения групп.

3.5. Выборочные сравнения в корреляционной адаптометрии

Сравнения между выборками по значению ВКГ или САК можно провести разными способами, из которых рассмотрим четыре.

3.5.1. Сопоставление доверительных интервалов

Весь предыдущий раздел был посвящён вопросам интервального оценивания ВКГ. Полученные в результате ДИ можно напрямую использовать для установления межгрупповых различий путём анализа наличия или отсутствия трансгрессии ДИ для сравниваемых выборок. Так, из рис. 3.5 видно, что 95% ДИ первых трёх групп перекрываются, а значит, вероятность того, что они принадлежат одной генеральной совокупности, велика ($P > 0,05$). Напротив, поскольку 95 % ДИ группы «Милосердие» не перекрываются ни с одной группой, вероятность их принадлежности к тем же совокупностям мала ($P \leq 0,05$), ВКГ в группе таких лиц статистически значимо выше.

Отметим, что полученные таким путём оценки различий являются консервативными, поскольку для каждой группы ДИ рассчитывался на основании значений

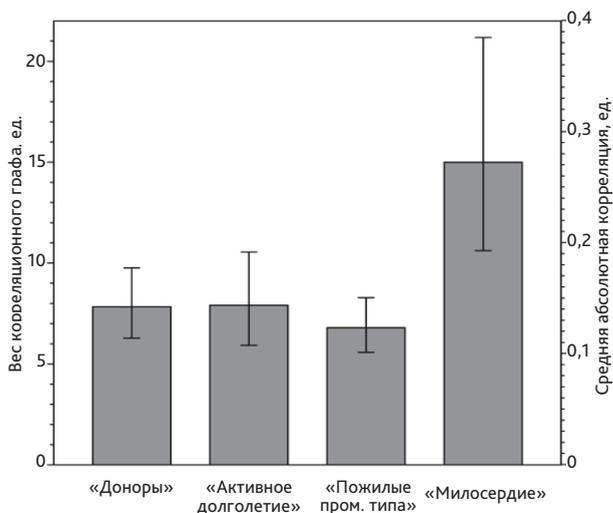


Рис. 3.5. Несмещённые оценки «складного ножа» для веса корреляционного графа и средней абсолютной корреляции с 95% ДИ в группе доноров и трех группах пожилых людей после удаления потенциальных выбросов

лишь одной выборки, т. е. с использованием лишь части имеющихся данных. Поэтому сравнение с помощью парных критериев, задействующих информацию одновременно о двух выборках, а ещё лучше — omnibusных критериев с включением всех выборок, будет намного более мощным в статистическом смысле.

3.5.2. Доверительные интервалы для разности ВКГ

Такие ДИ можно построить с использованием ресемплинг-техник. Например, можно организовать бутстреп таким образом, чтобы на первом шаге цикла генерировать реплики из значений первой выборки с расчётом ВКГ G_1 , на втором шаге — из значений второй выборки с расчётом G_2 , а на третьем шаге — находить разность значений $\Delta_{1, \text{бутстреп}} = (G_1 - G_2)$, рассчитанных по этим бутстреп-репликам. Повторяя циклы многократно, можно построить распределение разностей $\Delta_{\text{бутстреп}}$ и рассчитать для него ДИ, например, 95%-ный. Если этот интервал не будет содержать нулевого значения, значит, различия между выборками статистически значимы. Такой подход возможен только для попарных сравнений, а потому при наличии трёх и более выборок он будет иметь ограниченную мощность. Также к нему остаются вопросы теоретического характера, отмеченные в разделе 3.2.1.

3.5.3. Рандомизационная техника Монте-Карло

— широкий класс вычислительных алгоритмов, основанных на взятии повторных случайных выборок для получения числовых результатов.

Рассмотрим вариант использования этой техники для сравнения двух наиболее контрастных по ВКГ групп: «Пожилых людей промежуточного типа» ($n = 28$) и «Милосердие» ($n = 15$). На первом этапе для каждой из групп рассчитывается ВКГ и находится их разность $\Delta = (G_1 - G_2)$. На втором этапе наблюдения обеих групп объединяются, а из объединённой выборки 28 случайно выбранных значений назначается в группу 1, а оставшиеся 15 — в группу 2. На третьем этапе для этих сгенерированных перемешиванием (*permutation*) выборок рассчитываются ВКГ и их разность с получением $\Delta_{1, \text{Монте-Карло}}$. Далее этапы 2 и 3 многократно повторяются, например 10–100 тыс. раз, и строится распределение разности $\Delta_{\text{Монте-Карло}}$, представляющее собой распределение искомой статистики, сгенерированное по данным, и соответствующее нулевой гипотезе отсутствия межгрупповых различий (рис. 3.6).

Таким образом, в отличие от бутстрепа и подобно «складному ножу», техника Монте-Карло работает исключительно с имеющимися и, возможно, уникальными векторами значений признаков, лишь помещая их случайным образом в ту или иную группу. На последнем, четвёртом, этапе вероятность нулевой гипотезы рассчитывается как площадь под кривой распределения, отсекаемая исходным, полученным на первом этапе значением (см. рис. 3.6). Согласно расчётам с помощью

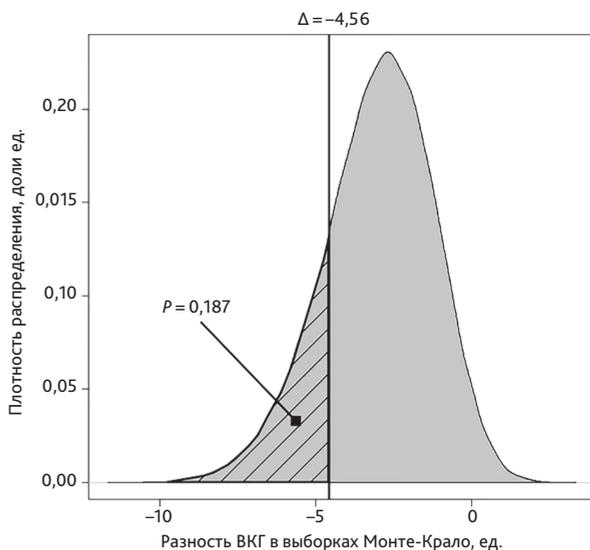


Рис. 3.6. Оценка значимости различий по ВКГ между двумя группами пожилых людей, полученная техникой Монте-Карло ($n = 100\,000$)

кода приложения 3.6 для двух сравниваемых групп, данная вероятность $P = 0,187$; т. е. без удаления выбросов эти различия были бы статистически незначимыми.

Следует особо отметить, что в описанном способе расчёта не задействовались никаких статистических критериев. Его результат асимптотически близок к максимально точному варианту, который можно было бы реализовать, генерируя не просто большое число случайных выборок Монте-Карло, а в точности все возможные комбинации размещения 43 лиц в двух группах по $n = 28$ и $n = 15$ наблюдений (*exact permutation*). Точные рандомизационные критерии вычислительно очень ресурсозатратны, но могут быть реализованы и особенно важны при работе с малыми выборками.

Также, аналогично рассмотренному варианту парного сравнения, можно было организовать перемешивание векторов индивидуумов между всеми четырьмя группами с одновременным построением распределений попарных межгрупповых разностей ВКГ. Более простой вариант такого omnibusного теста можно реализовать с использованием рандомизационного варианта дисперсионного анализа, пример которого с кодом для среды *R* можно найти в (Шитиков, Розенберг, 2013).

3.5.4. Статистические критерии на псевдозначениях складного ножа

Поскольку псевдозначения «складного ножа» являются независимыми случайными величинами, их можно использовать в классических статистических тестах вместо исходных наблюдений. Это придаёт критериям свойство робастности, а также используется в случаях, когда классические тесты неприменимы (наш случай). Хотя такой подход является статистически корректным, он не очень распространён, и частные его случаи могут иметь самостоятельные названия. Так, например, дисперсионный анализ (ДА) на псевдозначениях «складного ножа», используемый для сравнения коррелирующих ROC-кривых, называется методом Дофмана — Бербаума — Метза (*Dorfman-Berbaum-Metz method*). Как и в любом ДА, в случае асимметричных распределений сравниваемых функций возможно использование преобразований (Miller, 1997).

В табл. 3.2 представлены результаты однофакторного дисперсионного анализа, проведённого на тех же данных, по которым был построен рис. 3.5, т. е. на псевдозначениях «складного ножа» с логарифмическим преобразованием ВКГ и удалением семи потенциальных выбросов. Видно, что требования дисперсионного анализа были соблюдены, а межгрупповые различия оказались высоко статистически значимыми. Апостериорные сравнения методом Тьюки показали, что эти различия были обусловлены более высоким значением ВКГ в группе «Милосердие», тогда

как остальные группы не различались значимо между собой. Таким образом, результаты ДА совпали с интерпретацией рис. 3.5 по 95% ДИ, но ДА предоставил также значения P для попарных различий, причём высокого качества — с одновременным удержанием вероятности ошибок семейства («омнибуса») гипотез (*family-wise error rate, FWER*) на одном уровне значимости. Это означает, что данные значения не нуждаются в поправках на множественность сравнений с помощью техники Бонферрони или её менее консервативных аналогов.

Таблица 3.2

**Результаты сравнения доноров и трёх групп пожилых людей
по величине ВКГ в ходе однофакторного дисперсионного анализа
псевдозначений складного ножа**

Источник изменчивости	Сумма квадратов SS	Степени свободы df	Средний квадрат MS	F -критерий	Оценка значимости P
Между группами	1,071	3	0,357	7,08	0,0003
Внутри групп	3,579	71	0,050	–	–
Общая	4,650	74	–	–	–
Проверка требований дисперсионного анализа: – однородность дисперсий, критерий Левене: $P = 0,373$; – нормальность распределения остатков, критерий Шапиро — Уилка: $P = 0,102$.					
Апостериорные сравнения методом Тьюки: Доноры — «Активное долголетие»: $P > 0,999$ Доноры — «Пожилые промежуточного типа»: $P = 0,809$ Доноры — «Милосердие»: $P = 0,005$ «Активное долголетие» — «Пожилые промежуточного типа»: $P = 0,776$ «Активное долголетие» — «Милосердие»: $P = 0,006$ «Пожилые промежуточного типа» — «Милосердие»: $P < 0,001$.					

3.6. Результаты оценки взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем при психофизической адаптации людей пожилого возраста методом корреляционной адаптометрии

Для оценки эффективности использования метода КА в предложенной нами модификации для выявления уровня общей дезадаптации организма были проанализированы 11 показателей иммунной системы (цитокины), гипоталамо-гипофизарной оси (ГГА-оси — АКТГ, кортизол) и симпато-адреналовой медуллярной системы (норадреналин, дофамин) у людей пожилого возраста с разным психофизическим статусом. Как показано в табл. 3.1, 3.2 и на рис. 3.5, метод КА позволил установить различия в уровнях адаптации у пожилых людей с наличием/отсутствием психических и физических нарушений. Обнаружено, что наименьшим уровнем адаптации обладали пожилые люди, имеющие выраженные физические и когнитивные расстройства — группа «Милосердие», у которых наблюдались значимо высокие уровни показателя ВКГ по сравнению с аналогичным показателем остальных исследуемых групп («Доноры», «Активное долголетие», «Пожилые люди промежуточного типа»). Полученные нами результаты согласуются с данными ряда авторов о том, что существует взаимное регулирование между центральной нервной, эндокринной и иммунной системами, поддерживаемое анатомическими связями и опосредованное различными сигналами, такими как нейротрансмиттеры, нейропептиды и цитокины, высвобождаемые нейроэндокринными и иммунными клетками (Cañavate et al., 2014). Считается, что контролируемые взаимодействия между этими системами имеют решающее значение для поддержания гомеостатического баланса в организме и сохранения здоровья. Дисбаланс в этих системах в ответ на болезни, стресс, травмы и/или метаболические изменения опасен возможной дисрегуляцией функций организма (Taub, 2008). Известно, что длительный хронический стресс приводит к устойчивому повышению уровня глюкокортикоидов в циркуляции, что может представлять серьёзный риск для здоровья, включая гипертонию и атрофию гиппокампа.

Потери объёма гиппокампа, хорошо документированные при нормальном и патологическом старении, приводят, в свою очередь, к нарушениям в функционировании ГГА-оси, что может стать причиной возраст-ассоциированных заболеваний, включая тревогу, депрессию и когнитивные нарушения (Gupta, Morley, 2014; O'Hara et al., 2007). Ранее нами было показано, что у индивидуумов группы «Милосердие», характеризующихся наличием физической и психической несостоятельности, в ответ на физиологические уровни АКТГ вырабатывается избыточное

количество кортизола, что является отражением хронического стресса и может привести к повреждению областей мозга, отвечающих за когнитивные функции (префронтальной коры, паравентрикулярных нейронов, гиппокампа) (Бурмистрова и др., 2015). Нарушение работы ГГА-оси как базового механизма адаптации у человека (млекопитающих), приводит к перестройке связей между нервной, иммунной и эндокринной системами у пожилых людей группы «Милосердие», что проявляется значимым увеличением показателя ВКГ, характеризующего «эффект группового стресса», лежащий в основе КА.

Таким образом, метод КА может быть успешно применён для определения степени дезадаптации организма при различных состояниях, таких как здоровье/болезнь/старение и развитие возраст-ассоциированных заболеваний.

Заключение

Проведённое исследование показало, что для увеличения точности, надёжности и сопоставимости оценок уровней адаптации и стресса в корреляционной адаптометрии оригинальный подход к измерению может быть модифицирован путём использования корреляции Спирмена, отказа от порогового значения при вычислении веса корреляционного графа и заменой последнего на среднюю абсолютную корреляцию.

Функция веса корреляционного графа (ВКГ) неудобна для интервального оценивания ресемплинг-техниками ввиду сильного смещения оценки и асимметрии распределения. Однако такое оценивание можно провести с использованием преобразований ВКГ, поиск функций для которых должен быть продолжен.

В отличие от бутстрепа техника «складного ножа» лучше согласуется с природой данных, используемых в корреляционной адаптометрии, а также удобна для обнаружения потенциальных выбросов и проведения межгрупповых сравнений.

Методология корреляционной адаптометрии может быть успешно применена для анализа взаимодействия основных регуляторных систем: нервной, эндокринной и иммунной, при адаптации организма к различным стрессовым состояниям, включая старение и развитие возраст-ассоциированных заболеваний.

Приложение к главе 3. Расчеты по корреляционной адаптометрии в программно-статистической среде R

Приложение 3.1

**Набор данных с 11 иммунологическими
и нейрогормональными показателями в группе «Доноры» (n = 19)**

IL-6	IFN- γ	TNF- α	IL-10	IL-2	IL-1 β	IL-18	Кортизол	АКТГ	Дофамин	Норадреналин
4,25	8,66	2,08	6,84	7,39	2,64	505,2	118,7	79,63	163,0	4,94
0,87	12,72	3,18	7,14	0,92	1,58	332,0	143,9	6,88	130,8	4,33
1,79	5,88	2,98	0,02	0,75	0,50	306,2	262,6	1,38	93,7	7,80
3,06	8,42	1,98	0,83	1,36	1,53	183,9	137,8	12,41	91,6	12,62
1,47	8,66	3,64	0,29	2,42	0,76	174,5	151,5	4,23	97,0	5,71
4,01	9,38	2,78	2,24	0,34	1,27	203,6	152,3	11,49	97,6	4,23
3,40	12,85	3,15	11,92	3,00	3,23	234,6	290,4	3,84	118,0	11,33
0,44	7,74	2,12	8,45	1,09	3,56	112,4	47,9	75,41	111,5	7,38
1,21	11,47	2,84	0,03	1,47	1,81	346,0	122,0	4,50	100,7	9,87
1,12	15,21	2,17	1,50	5,32	3,53	218,4	188,6	0,03	103,6	9,14
0,84	15,10	2,67	2,14	5,08	2,05	204,2	213,6	5,21	106,9	8,07
5,60	11,26	3,99	1,45	1,87	2,93	242,0	182,0	9,80	134,9	6,52
1,78	9,27	3,38	2,40	2,52	4,12	855,2	291,4	4,11	114,0	7,21
0,47	13,22	2,24	0,02	0,82	3,19	300,8	309,6	13,67	128,8	5,72
0,56	12,11	2,90	9,12	0,68	3,13	201,4	140,6	178,10	145,7	6,67
0,72	8,42	3,37	3,16	0,89	1,73	205,2	204,4	5,97	141,4	5,18
1,62	12,08	3,06	2,24	4,94	4,06	189,3	102,0	13,65	153,0	10,70
1,24	9,48	3,71	0,02	1,64	3,06	271,4	201,0	1,27	132,7	4,79
1,90	8,53	2,47	2,57	3,88	2,11	134,1	129,8	9,37	114,9	8,47

Для удобства работы с кодом R данное приложение можно скачать в формате MS Word по следующим ссылкам:

<http://forum.dissert.ru/index.php?showtopic=2999&st=18> (Сообщение #19)

<https://yadi.sk/d/uj1Mg4OUBMp4SA>

Приложение 3.2

Вычисление веса корреляционного графа и средней абсолютной корреляции

```

# копирование содержимого таблицы приложения 1 в буфер обмена
# в пакете R вставка данных из буфера обмена с заголовком (header=TRUE) и запятой в качестве десятичного разделителя
mydata<-read.table("clipboard", h=T, dec=",")
# просмотр данных, проверка правильности
mydata
# программирование функции для вычисления ВКГ (wg) с подсчетом количества показателей в наборе (nvar), использованием корреляции Спирмена (method=>spearman»), с произвольным пороговым значением (mycutoff) и возможностью перебора строк для бутстрепа (indices)
wg<-function(data, indices, mycutoff=0) {
  nvar<-length(data)
  i=data[indices,]
  mycor<-abs(cor(i, method="spearman"))
  cutoffcor<-mycor(mycor>=mycutoff)
  (sum(cutoffcor)- nvar)/2
}
# вычисление ВКГ для данных Приложения 3.1 с пороговым значением 0 (по умолчанию)
wg(mydata)
# вычисление ВКГ для данных Приложения 3.1 с произвольным пороговым значением, например, 0,5
wg(mydata, mycutoff=0.5)
# вычисление средней абсолютной корреляции с пороговым значением 0 (по умолчанию)
(Mean.abs.cor<-2*wg(mydata) / length(mydata) / (length(mydata)-1))
# Для сравнения результатов предлагаемого подхода с оригинальным может потребоваться вычисление корреляций Пирсона. Для этого следует изменить строку функции: mycor<-abs(cor(i, method="pearson"))
# Аналогично программируется функция для вычисления десятичного логарифма ВКГ (wglog)
wglog<-function(data, indices, mycutoff=0) {
  nvar<-length(data)
  i=data[indices,]
  mycor<-abs(cor(i, method="spearman"))
  cutoffcor<-mycor(mycor>=mycutoff)
  log10((sum(cutoffcor)- nvar)/2)
}
# вычисление логарифма ВКГ для данных Приложения 3.1 с пороговым значением 0 (по умолчанию)
wglog(mydata)

```

Приложение 3.3

**Построение доверительных интервалов
для веса корреляционного графа методом бутстрепа, иллюстрации**

```
# подключение предварительно установленного пакета boot
library (boot)
# вычисление 9999 значений ВКГ для бутстреп-выборок из данных Приложение
3.1. Для использования логарифма ВКГ в строке команды wg следует заменить
на wglg
mydata.boot <- boot (mydata, wg, R=9999)
# просмотр результатов бутстрепа: исходного значения функции (original),
смещения (bias) и стандартной ошибки (std. error)
mydata.boot
# вычисление популяционного значения ВКГ методом бутстрепа
mean (mydata.boot$t)
# получение бутстреп-оценки 95 % ДИ для ВКГ разными методами
boot.ci (mydata.boot, conf=0.95)
# задание в качестве шрифта для графиков в данной сессии R шрифта Times
New Roman
par (family='serif')
# построение чернового варианта гистограммы распределения бутстреп-оценок
ВКГ с 95 % ДИ
hist (mydata.boot $t)
# для построения чистового варианта гистограммы нужно по рисунку выбрать
и задать
границы осей, количество интервалов и цвет, например:
hist (mydata.boot $t, xlim=c(8,25), ylim=c(0,1300), breaks=30, col='gray')
# также можно наложить на гистограмму любые из рассчитанных выше зна-
чений ВКГ или границ ДИ, например:
abline(v=11.58, lwd=2, col='blue')
abline(v=15.38, lty='dashed', lwd=2, col='red')
# Полученный рисунок удобно скопировать в буфер обмена и вставить для
доработки в векторный редактор, например, Тр Х.
```

Приложение 3.4

Метод «складного ножа»

```

# программирование универсальной функции для вычислений любых функций
от данных (theta) методом «складного ножа»
JackKnife <- function (x, theta, percent, ...)
{
  n <- nrow(x)
  u <- rep(0, n)
  for (i in 1: n) {
    u[i] <- theta(x[-i,], ...)
  }
  theta.hat <- theta(x, ...)
  pseudo.values <- n*theta.hat — (n-1)*u
  theta.jack <- mean(pseudo.values)
  jack.se <- sqrt(sum((pseudo.values — theta.jack)^2)/(n*(n-1)))
  jack.bias <- (n-1)*(mean(u)-theta.hat)
  alpha <- (100-percent)/100
  LCL <- theta.jack-abs(qt(p=alpha/2, df=n-1))*jack.se
  UCL <- theta.jack+abs(qt(p=alpha/2, df=n-1))*jack.se
  return(list(theta.hat = theta.hat,
    theta.jack = theta.jack,
    jack.bias = jack.bias,
    jack.se = jack.se,
    leave.one.out.estimates = u,
    pseudo.values = pseudo.values,
    percent.CI = percent,
    confidence.interval.percent=c(LCL, UCL)))
}
# получение результатов «складного ножа» для десятичного логарифма ВКГ
с 95 % ДИ
> jk.res<-JackKnife (mydata, wglog, 95)
# просмотр результатов
> jk.res
# комментарий к результатам
$theta.hat — выборочная оценка
$theta.jack — несмещённая оценка складного ножа (среднее псевдозначений)
$jack.bias — смещение
$jack.se — стандартная ошибка
$leave.one.out.estimates — оценки с удалёнными наблюдениями
$pseudo.values — псевдозначения
$percent.CI — процент для вычисления границ доверительных интервалов
$confidence.interval.percent — доверительные интервалы

```

Приложение 3.5

Проверка выборки на наличие выбросов

```

# программирование функции для вычисления выбросов
OutliersTest <- function (x, ...)
{
  n <- length(x)
  delMean <- vector(length=n, mode="numeric")
  delVar <- vector(length = n, mode = "numeric")
  for (i in 1: n) {
    delMean[i] <- mean (x[-i])
    delVar[i] <- var(x[-i])
  }
  del.mean <- delMean
  del.var <- delVar
  diff <- x-delMean
  ttest <- (x-delMean)/sqrt(delVar)/(sqrt(n/(n-1)))
  res.p <-round(2*(1-pt(abs(ttest), df=(n-2))),5)
  return (list(deleted.mean=del.mean, deleted.var=delVar, diff.means=diff, t.test=ttest,
df=n-2, p=res.p))
}
# проверка на выбросы псевдозначений «складного ножа», вычисленных
на предыдущем этапе
OutliersTest (jk.res$pseudo.values)
# комментарий к результатам
$deleted.mean — среднее значение в выборке с удаленным наблюдением
$deleted.var — дисперсия в выборке с удаленным наблюдением
$diff.means — удаленный остаток
$t.test — t-критерий Стьюдента
$df — число степеней свободы df
$p — оценка статистической значимости P

```

Приложение 3.6

Сравнение ВКГ двух выборок методом Монте-Карло

```

# поочерёдная вставка предварительно скопированных в буфер данных по вы-
боркам 1 и 2
mydata1<-read.table ("clipboard", h=T, dec=",")
mydata2<-read.table ("clipboard", h=T, dec=",")
# объединение выборок
mydata12<-merge (mydata1, mydata2, sort=F, all = T)
# расчёт разности ВКГ
(wgdif<-wg (mydata1)-wg (mydata2))
# получение распределения разности ВКГ методом Монте-Карло
reps <- 10000
permutwgdif <- numeric(reps)
for (i in 1: reps) {
  temp <- mydata12(sample(nrow(mydata12), nrow(mydata12)),)
  permutwgdif(i) <- wg(temp(1:(nrow(mydata1))),)-
wg(temp((nrow(mydata1)+1):(nrow(mydata12))),)
}
# расчёт занимает некоторое время; при reps <- 100000 — до нескольких минут.
# построение графика плотности распределения разности ВКГ с наложенным
значением выборочной оценки
res<-density(permutwgdif, n=10000)
plot (res)
polygon (res, col='gray')
abline (v=wgdif, lwd=2, col='black')
# расчёт значения P проводится по кумулятивной функции сгенерированного
методом Монте-Карло распределения разности ВКГ permutwgdif
cumuldist<-ecdf(permutwgdif)
cat("P=", ecdf(permutwgdif)(wgdif))
# построение графика кумулятивной функции распределения разности ВКГ
с наложенным значением выборочной оценки
plot(cumuldist)
abline (v=wgdif, lwd=2, col='black')

```

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

Введение

- Бурмистрова А. Л.* Иммунный гомеостаз и микросинбиоз. Метаморфозы и пути развития воспалительных заболеваний кишечника. Челябинск, Изд-во «Челябинский дом печати», 1997. 216 с.
- Маргелис Л.* Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983. 347 с.
- Филиппова Ю. Ю., Нохрин Д. Ю., Бурмистрова А. Л.* Метод иммуносигнатуры в дифференциальной диагностике расстройств аутистического спектра: пилотное исследование // *Медицинская иммунология*. 2019. Т. 21, № 2. С. 303–312.
- Ayres J. S.* Cooperative microbial tolerance behaviors in host-microbiota mutualism // *Cell*. 2016. Vol. 165, № 6. P. 1323–1331. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.049
- Ayres J. S., Schneider D. S.* Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. Vol. 8, № 11. P. 889–895. DOI: 10.1038/nri2432
- Bailey M. T., Dowd S. E., Galley J. D. et al.* Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation // *Brain Behav. Immun.* 2011. Vol. 25, № 3. P. 397–407. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.10.023
- Basler M., Ho B. T., Mekalanos J. J.* Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions // *Cell*. 2013. Vol. 152, № 4. P. 884–894. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.042
- Ben-Jacob E.* Social behavior of bacteria: from physics to complex organization // *Eur. Phys. J. B*. 2008. Vol. 65. P. 315–322. DOI: 10.1140/epjb/e2008-00222-x
- Chovatiya R., Medzhitov R.* Stress, inflammation, and defense of homeostasis // *Mol. Cell*. 2014. Vol. 54, № 2. P. 281–288. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.030
- Collins S. M., Surette M., Bercik P.* The interplay between the intestinal microbiota and the brain // *Nat. Rev. Microbiol.* 2012. Vol. 10, № 11. P. 735–742.
- Costello E. K., Stagaman K., Dethlefsen L. et al.* The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome // *Science*. 2012. Vol. 336, № 6086. P. 1255–1262. DOI: 10.1126/science.1224203
- Day R. L., Laland K. N., Odling-Smee F. J.* Rethinking adaptation: the niche-construction perspective // *Perspect. Biol. Med.* 2003. Vol. 46, № 1. P. 80–95.
- Dwyer D. J., Kohanski M. A., Collins J. J.* Networking Opportunities for Bacteria // *Cell*. 2008. Vol. 135, № 7. P. 1153–1156. DOI: 10.1016/j.cell.2008.12.016
- Eberl G.* The microbiota, a necessary element of immunity // *Comptes Rendus Biologies*. 2018. Vol. 341, № 5. P. 281–283. DOI: 10.1016/j.crv.2018.03.003

- Ebert D.* The epidemiology and evolution of symbionts with mixed-mode transmission // *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 2013. Vol. 44. P. 623–643. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-032513-100555
- El Aidy S., Merrifield C. A., Derrien M.* et al. The gut microbiota elicits a profound metabolic reorientation in the mouse jejunal mucosa during conventionalization // *Gut*. 2013. Vol. 62, № 9. P. 1306–1314. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301955
- El Aidy S., van den Bogert B., Kleerebezem M.* The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. Vol. 32. P. 14–20. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.09.005
- Foster K. R., Schluter J., Coyte K. Z.* et al. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash // *Nature*. 2017. Vol. 548, № 7665. P. 43–51. DOI: 10.1038/nature23292
- Fung T. C., Bessman N. J., Hepworth M. R.* et al. Lymphoid-Tissue-Resident Commensal Bacteria Promote Members of the IL-10 Cytokine Family to Establish Mutualism // *Immunity*. 2016. Vol. 44, № 3. P. 634–646. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.019
- Gilbert S. F., Sapp J., Tauber A. I.* A symbiotic view of life: we have never been individuals // *Q. Rev. Biol.* 2012. Vol. 87, № 4. P. 325–41.
- Gomez de Agüero M., Ganal-Vonarburg S. C., Fuhrer T.* et al. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development // *Science*. 2016. Vol. 351, № 6279. P. 1296–1302. DOI: 10.1126/science.aad2571
- Gonzalez-Pastor J. E., Hobbs E. C., Losick R.* Cannibalism by sporulating bacteria // *Science*. 2003. Vol. 301. P. 510–513. DOI: 10.1126/science.1086462
- Johnson K. V. A., Foster K. R.* Why does the microbiome affect behaviour? // *Nature Reviews Microbiology*. 2018. Vol. 16. P. 647–655. DOI: 10.1038/s41579-018-0014-3
- Kagan J. C.* Lipopolysaccharide detection across the kingdoms of life // *Trends Immunol.* 2017. Vol. 38, № 10. P. 10696–10704. DOI: 10.1016/j.it.2017.05.001
- Kim O. Y., Monsel A., Bertrand M.* et al. Translocation of bacterial NOD2 agonist and its link with inflammation. *Crit. Care*. 2009. Vol. 13: R124. DOI: 10.1186/cc7980
- Kitano H., Oda K.* Robustness trade-offs and host-microbial symbiosis in the immune system // *Mol. Syst. Biol.* 2006. Vol. 2. DOI: 10.1038/msb4100039
- Knoop K. A., Newberry R. D.* Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces // *Mucosal Immunology*. 2018. DOI: 10.1038/s41385-018-0039-y
- Kültz D.* Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function // *J. Exp. Biol.* 2003. Vol. 206. P. 3119–3124.
- Kültz D.* Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response // *Annu. Rev. Physiol.* 2005. Vol. 67. P. 225–257. DOI: 10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635
- Lewis K.* Persister cells // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. Vol. 64. P. 357–372. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134306.
- Lewis K.* Persister cells, dormancy and infectious disease // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. Vol. 5, № 1. P. 48–56. DOI: 10.1038/nrmicro1557

- Little T. J., Shuker D. M., Colegrave N.* et al. The coevolution of virulence: tolerance in perspective // *PLoS Pathog.* 2010. Vol. 6, № 9. P. e1001006. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001006
- Liu J., Prindle A., Humphries J.* et al. Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms // *Nature.* 2015. Vol. 523, № 7562. P. 550–554. DOI: 10.1038/nature14660
- López-Maury L., Marguerat S., Bähler J.* Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation // *Nat. Rev. Genet.* 2008. Vol. 9, № 8. P. 583–93. DOI: 10.1038/nrg2398
- Marijuán P. C., Navarro J., del Moral R.* On prokaryotic intelligence: strategies for sensing the environment // *Biosystems.* 2010. Vol. 99, № 2. P. 94–103. DOI: 10.1016/j.biosystems.2009.09.004
- McFall-Ngai M.* Adaptive immunity: care for the community // *Nature.* 2007. Vol. 445, № 7124. P. 153. DOI: 10.1038/445153a
- McFall-Ngai M.* Are biologists in ‘future shock’? Symbiosis integrates biology across domains // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. Vol. 6, № 10. P. 789–792. DOI: 10.1038/nrmicro1982
- McInerney J. O., McNally A., O’Connell M. J.* Why prokaryotes have pangenomes // *Nat. Microbiol.* 2017. Vol. 2. P. 17040. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.40
- Medzhitov R., Schneider D. S., Soares M. P.* Disease Tolerance as a Defense Strategy // *Science* 2012. Vol. 335, № 6071. P. 936–941. DOI: 10.1126/science.1214935
- Mushegian A. A., Ebert D.* Rethinking «mutualism» in diverse host-symbiont communities // *Bioessays.* 2016. Vol. 38, № 1. P. 100–108. DOI: 10.1002/bies.201500074
- Nadell C. D., Drescher K., Foster K. R.* Spatial structure, cooperation and competition in biofilms // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. Vol. 14, № 9. P. 589–600. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.84
- Nicholson J. K., Holmes E., Kinross J.* et al. Host-gut microbiota metabolic interactions // *Science.* 2012. Vol. 336, № 6086. P. 1262–1267. DOI: 10.1126/science.1223813
- Nicholson J. K., Holmes E., Wilson I. D.* et al. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. Vol. 3, № 5. P. 431–438. DOI: 10.1038/nrmicro1152
- Nuñez S., Moore C., Gao B.* et al. The human thymus perivascular space is a functional niche for viral-specific plasma cells // *Sci. Immunol.* 2016. Vol. 1, № 6. P. 4447. DOI: 10.1126/sciimmunol.aah4447
- Obata T., Goto Y., Kunisawa J.* et al. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107, № 16. P. 7419–7424. DOI: 10.1073/pnas.1001061107
- Perez P. F., Doré J., Leclerc M.* et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? // *Pediatrics.* 2007. Vol. 119, № 3. P. e724–732. DOI: 10.1542/peds.2006–1649

- Powell N. D., Sloan E. K., Bailey M. T. et al.* Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via β -adrenergic induction of myelopoiesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. Vol. 110, № 41. P. 16574–16579. DOI: 10.1073/pnas.1310655110
- Quintana F. J., Merbl Y., Sahar E. et al.* Antigen-chip technology for accessing global information about the state of the body // *Lupus*. 2006. Vol. 15, № 7. P. 428–30. DOI: 10.1191/0961203306lu2328oa
- Råberg L., Sim D., Read A. F.* Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals // *Science*. 2007. Vol. 318, № 5851. P. 812–814. DOI: 10.1126/science.1148526
- Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F. et al.* Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis // *Cell*. 2004. Vol. 118. P. 229–241. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.002
- Roberts R. C., Farmer C. B., Walker C. K.* The human brain microbiome; there are bacteria in our brains! // *Mat. Conference «Neuroscience 2018»*. 2018.
- Schieber A. M., Lee Y. M., Chang M. W. et al.* Disease tolerance mediated by microbiome *E. coli* involves inflammasome and IGF-1 signaling // *Science*. 2015. Vol. 350. P. 558–563. DOI: 10.1126/science.aac6468
- Shaw A. C., Joshi S., Greenwood H. et al.* Aging of the Innate Immune System // *Curr. Opin. Immunol.* 2010. Vol. 22. P. 507–513. DOI: 10.1016/j.coi.2010.05.003
- Shulzhenko N., Morgun A., Hsiao W. et al.* Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut // *Nat. Med.* 2011. Vol. 17, № 12. P. 1585–1593. DOI: 10.1038/nm.2505
- Soares M. P., Gozzelino R., Weis S.* Tissue damage control in disease tolerance // *Trends Immunol.* 2014. Vol. 35, № 10. P. 483–94. DOI: 10.1016/j.it.2014.08.001
- Steinert M.* Pathogen intelligence // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2014. Vol. 4. P. 8. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00008
- Svensson E. I., Råberg L.* Resistance and tolerance in animal enemy-victim coevolution // *Trends Ecol. Evol.* 2010. Vol. 25, № 5. P. 267–274. DOI: 10.1016/j.tree.2009.12.005
- Swamy M., Jamora C., Havran W.* Epithelial decision makers: in search of the ‘epimmunome’ // *Nat Immunol.* 2010. Vol. 11, № 8. P. 656–665. DOI: 10.1038/ni.1905
- Tsatsaronis J. A., Franch-Arroyo S., Resch U. et al.* Extracellular vesicle RNA: a universal mediator of microbial communication? *Trends Microbiol.* 2018. Vol. 26, № 5. P. 401–410. DOI: 10.1016/j.tim.2018.02.009
- Walter J., Ley R.* The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes // *Annu. Rev. Microbiol.* 2011. Vol. 65. P. 411–429. DOI: 10.1146/annurev-micro-090110-102830
- Wexler A. G., Bao Y., Whitney J. C. et al.* Human symbionts inject and neutralize antibacterial toxins to persist in the gut // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2016. Vol. 113, № 13. P. 3639–3644. DOI: 10.1073/pnas.1525637113

Глава 1

- Борьба с устойчивостью к антибиотикам с позиций безопасности пищевых продуктов в Европе. ВОЗ. Европейское региональное бюро. 2011. 12 с.
- Виноградова К. А., Булгакова В. Г., Полин А. Н. и др. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистенция, ее объем, разнообразие и развитие // *Антибиотики и химиотерапия*. 2013. Т. 58, № 5–6. С. 38–48.
- Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. ВОЗ, 2001. 20 с.
- Евдокимова Н. В., Черненко Т. В. Персистирующие клетки микроорганизмов // *КМАХ*. 2013. Т. 15, № 3. С. 192–197.
- Козлов Р. С., Стецюк О. У., Андреева И. В. Цефтазидим-авибактам: новые «правила игры» против полирезистентных грамотрицательных бактерий // *КМАХ*. 2018. Т. 20, № 1. С. 24–34.
- Кузьменков А. Ю., Трушин И. В., Авраменко А. А. и др. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности // *КМАХ*. 2017. Т. 19, № 2. С. 84–90.
- Маянский А. Н. Патогенетическая микробиология: руководство. Нижний Новгород: изд-во НижГМА, 2006. 520 с.
- Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: методические рекомендации. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 154 с.
- Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: методические рекомендации. 2015. 162 с.
- Петров Р. В., Бердникова Н. Г. Механизмы резистентности бактерий к антибактериальным лекарственным средствам // *Антибактериальные лекарственные средства. Методы стандартизации препаратов*. М.: Медицина, 2004. С. 74–93.
- Рациональная антимикробная фармакотерапия: рук-во для практикующих врачей / под общей ред. В. П. Яковлева, С. В. Яковлева. М.: Литтера, 2003. 1008 с.
- Рачина С. А., Фокин А. А., Ишмухаметов А. А. и др. Анализ амбулаторного потребления антимикробных препаратов для системного применения в различных регионах РФ // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2008. Т. 10, № 1. С. 59–69.
- Руководство EUCAST по выявлению механизмов резистентности и резистентности, имеющей особое клиническое и/или эпидемиологическое значение. 2013. 54 с.
- Сидоренко С. В. Клиническое значение резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам // *Российские медицинские вести*. 1998. № 1. С. 28–34.
- Сидоренко С. В. Бета-лактамазы расширенного спектра: клиническое значение и методы детекции // *Инфекции и антимикробная терапия*. 2002. Т. 4, № 6. С. 27–34.
- Сидоренко С. В. Клиническое значение антибиотикорезистентности грамположительных микроорганизмов // *Инфекции и антимикробная терапия*. 2003. Т. 5, № 2. С. 48–54.

- Сидоренко С. В., Эйдельштейн М. В.* Механизмы резистентности микроорганизмов // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. Смоленск: МАКМАХ, 2007. С. 19–32.
- Степанова М. В.* Постановка конъюгации // Бета-лактамазы: значение и методы выявления: материалы научно-практического семинара. Смоленск, 2005. С. 24–25.
- Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г.: Распоряжение правительства РФ от 25.09.2017 № 20450. 10 с.
- Страчунский Л. С., Белькова Ю. А., Дехнич А. В.* Внебольничные MRSA — новая проблема антибиотикорезистентности // КМАХ. 2005. Т. 7, № 1. С. 32–46.
- Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Склеенова Е. Ю.* и др.; исследовательская группа «Марафон». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» в 2013–2014 гг. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017. Т. 19, № 16. С. 49–56.
- Тапальский Д. В., Осипов В. А., Жаворонок С. В.* Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции // Медицинский журнал. 2012. № 2. С. 10–15.
- Тапальский Д. В., Петренев Д. Р.* Распространенность *Klebsiella pneumoniae* — продуцентов карбапенемаз в Беларуси и их конкурентноспособность // КМАХ. 2017. Т. 19, № 2. С. 139–144.
- Чеботарь И. В., Бочарова Ю. А., Маянский Н. А.* Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция // КМАХ. 2017. Т. 19, № 4. С. 308–319.
- Шевченко О. В., Эйдельштейн М. В., Степанова М. Н.* Металло- β -лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий // КМАХ. 2007. Т. 9, № 3. С. 197–288.
- Эйдельштейн М. В.* Бета-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования // КМАХ. 2001. Т. 3, № 3. С. 223–242.
- Alonso A., Sanchez P., Martinez J. L.* Environmental selection of antibiotic resistance genes // Environ. Microbial. 2001. Vol. 3, № 1. P. 1–9.
- AMRmap. 2018. URL: <http://map.antibiotic.ru/?id=xAd0W35g457g413> (дата обращения: 05.10.2018).
- AMRmap. 2018a. URL: <http://map.antibiotic.ru/?id=qHNx4489O439O13> (дата обращения: 05.10.2018).
- AMRmap. 2018б. URL: <http://map.antibiotic.ru/?id=kxYxs231X161X15> (дата обращения: 05.10.2018).
- AMRmap. 2018в. URL: <http://map.antibiotic.ru/?id=0IxXo10KL21KL16> (дата обращения: 05.10.2018).

- AMRmap. 2018 г. URL: <http://map.antibiotic.ru/?id=mQl1423tC28tC16> (дата обращения: 05.10.2018).
- Ausvet. EpiTools epidemiological calculators. 2018. URL: <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=CIPproportion> (дата обращения: 15.11.2018).
- Baltz R. H. Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? // *SIM News*. 2005. Vol. 55. P. 186–196.
- Boutibaa Ben Boubaker I., Ben Abbes R., Ben Abdallah H. et al. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Clin. Microbiol. Infect.* 2004. Vol. 10, № 8. P. 762–765. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2004.00919.x
- Chait R., Vetsigian K., Kishony R. What counters antibiotic resistance in nature? // *Nature Chem. Biol.* 2012. Vol. 8, № 1. P. 2–5. DOI: 10.1038/nchembio.745
- Garau G., Di Guilmi A. M., Hall B. G. Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 7. P. 2778–2784. DOI: 10.1128/AAC.49.7.2778-2784.2005
- Hall B. G., Barlow M. Evolution of the serine / beta-lactamases: past, present and future // *Drug Resist. Updat.* 2004. Vol. 7, № 2. P. 111–123. DOI: 10.1016/j.drup.2004.02.003
- Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica*. 2001. № 1. P. 1–9.
- Henrichfreise B., Wiegand I., Pfister W. et al. Resistance mechanisms of ultra-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. Vol. 51, № 11. P. 4062–4070. DOI: 10.1128/AAC.00148-07
- Lewis K. Persister cells // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. Vol. 64. P. 357–372. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134306
- Lu S., Walters G., Parg R. et al. Nanomechanical response of bacterial cells to cationic antimicrobial peptides // *Soft Matter*. 2014. Vol. 10, № 11. P. 1806–1815. DOI: 10.1039/c3sm52801d
- Martinez J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria // *Proc Biol Sci* 2009. Vol. 276, № 1667. P. 2521–2530. DOI: 10.1098/rspb.2009.0320
- Muller C., Plesiat P., Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. Vol. 54, № 3. P. 1211–1221. DOI: 10.1128/AAC.01252-10
- Nordmann P., Naas T., Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* // *Emerg Infect Dis.* 2011. Vol. 17, № 10. P. 1791–1798. DOI: 10.3201/eid1710.110655
- Quale J., Bratu S., Gupta J. et al. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates // *Antimicrob.*

- Agents Chemother. 2006. Vol. 50, № 5. P. 1633–1641. DOI: 10.1128/AAC.50.5.1633–1641.2006
- Mack S. G., Turner R. L., Dwyer D. J. Achieving a Predictive Understanding of Antimicrobial Stress Physiology through Systems Biology // Trends in Microbiology. 2018. Vol. 206, № 4. P. 296–312. DOI: 10.1016/j.tim.2018.02.004
- Tomas M., Doumith M., Warner M. et al. Efflux Pumps, OprD Porin, AmpC β Lactamase, and Multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients // Antimicrob. Agents Chemother. 2010. Vol. 54, № 5. P. 2219–2224. DOI: 10.1128/AAC.00816–09
- Trimble M. J., Mlynarcik P., Kolar M. et al. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance // Cold Spring Harb Perspect Med. 2016. Vol. 6, № 10. pii: a025288. DOI: 10.1101/cshperspect.a025288
- Walters M. C., Roe F., Bugnicourt A. et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin // Antimicrob. Agents Chemother. 2003. Vol. 47, № 1. P. 317–323.
- Wolter D. J., Lister P. D. Mechanisms of β lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa* // Curr Pharm Des. 2013. Vol. 19, № 2. P. 209–222.
- Song W., Kim H.-S., Kim J.-S. et al. Carbapenem Inactivation Method: Accurate Detection and Easy Interpretation of Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. // Ann Clin Microbiol. 2016. Vol. 19, № 4. P. 83–87. DOI: 10.5145/ACM.2016.19.4.83

Глава 2

2.1

- Самышкина Н. Е. Характер немедленной эффекторной реакции микоцидного ответа лейкоцитов периферической крови здоровых и больных вульвовагинальным кандидозом: автореф. дис. ... канд. мед. наук (14.00.36). Челябинск, 2008. 23 с.
- Al Rushood M., McCusker C., Mazer B. Autosomal dominant cases of chronic mucocutaneous candidiasis segregates with mutations of signal transducer and activator of transcription 1, but not of toll-like receptor 3 // J. Pediatr. 2013. Vol. 163, № 1. P. 277–279. DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.02.040
- Anderson D. J., Marathe J., Pudney J. The structure of the human vaginal stratum corneum and its role in immune defense // Am. J. Reprod. Immunol. 2014. Vol. 71, № 6. P. 618–623. DOI: 10.1111/aji.12230

- Bailey M. T., Dowd S. E., Galley J. D.* Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2011. Vol. 25, № 3. P. 397–407. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.10.023
- Bommanavar S. B., Gugwad S., Malik N.* Phenotypic switch: The enigmatic white-gray-opaque transition system of *Candida albicans* // *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2017. Vol. 21, № 1. P. 82–86. DOI: 10.4103/0973-029X.203781
- De Cremer K., Staes I., Delattin N.* et al. Combinatorial drug approaches to tackle *Candida albicans* biofilms // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2015. Vol. 13, № 8. P. 973–984. DOI: 10.1586/14787210.2015.1056162
- Dühring S., Germerodt S., Skerka C.* et al. Host-pathogen interactions between the human innate immune system and *Candida albicans* — understanding and modeling defense and evasion strategies // *Front. Microbiol.* 2015. Vol. 6. Article 625. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00625
- Galley J. D., Bailey M. T.* Impact of stressor exposure on the interplay between commensal microbiota and host inflammation // *Gut Microbes*. 2014. Vol. 5, № 3. P. 390–396. DOI: 10.4161/gmic.28683
- Gur T. L., Bailey M. T.* Effects of Stress on Commensal Microbes and Immune System Activity // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. Vol. 874. P. 289–300. DOI: 10.1007/978-3-319-20215-0_14
- Hammad N. M., El Badawy N. E., Nasr A. M.* et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its association with susceptibility to recurrent vulvovaginal candidiasis // *BioMed Research International*. 2018. Vol. 2018. P. 1–8. DOI: 10.1155/2018/7648152
- Hammer O., Harper D., Ryan P.* PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica*. 2001. Vol. 4, № 1. P. 1–9.
- Jaeger M., Plantinga T. S., Joosten L. A. B.* Genetic basis for recurrent vulvo-vaginal candidiasis // *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2013. Vol. 15, № 2. P. 136–142. DOI: 10.1007/s11908-013-0319-3
- Jašarević E., Howerton C. L., Howard C. D.* Alterations in the vaginal microbiome by maternal stress are associated with metabolic reprogramming of the offspring gut and brain // *Endocrinology*. 2015. Vol. 156, № 9. P. 3265–3276. DOI: 10.1210/en.2015-1177
- Marrazzo J. M., Fiedler T. L., Srinivasan S.* Extravaginal reservoirs of vaginal bacteria as risk factors for incident bacterial vaginosis // *JID*. 2012. Vol. 205, № 10. P. 1580–1588. DOI: 10.1093/infdis/jis242
- Mayer F. L., Wilson D., Hube B.* *Candida albicans* pathogenicity mechanisms // *Virulence*. 2013. Vol. 4, № 2. P. 119–128. DOI: 10.4161/viru.22913
- Mech F., Wilson D., Lehnert T.* Epithelial invasion outcompetes hypha development during *Candida albicans* infection as revealed by an image-based systems biology approach // *Cytometry. Part A*. 2014. Vol. 85, № 2. P. 126–139. DOI: 10.1002/cyto.a.22418
- Medzhitov R., Schneider D. S., Soares M. P.* Disease tolerance as a defense strategy // *Science*. 2012. Vol. 335, № 6071. P. 936–941. DOI: 10.1126/science.1214935
- Miller E. A., Beasley D. E., Dunn R. R.* Lactobacilli dominance and vaginal pH: Why is the human vaginal microbiome unique? // *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 7. Article 1936. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01936

- Moyes D. L., Naglik J. R. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection // Clin. Dev. Immunol. 2011. Vol. 2011. P. 1–9. DOI: 10.1155/2011/346307
- Nett J. E., Zarnowski R., Cabezas-Olcoz J. Host contributions to construction of three device-associated *Candida albicans* biofilms // Infection and Immunity. 2015. Vol. 83, № 12. P. 4630–4638. DOI: 10.1128/iai.00931–15
- Nobile C. J., Johnson A. D. *Candida albicans* biofilms and human disease // Annu. Rev. Microbiol. 2015. Vol. 69, № 1. P. 71–92. DOI: 10.1146/annurev-micro-091014–104330
- Patin E. C., Thompson A., Orr S. J. Pattern recognition receptors in fungal immunity // Semin. Cell Dev. Biol. 2018. pii: S1084–9521(17)30541–4. DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.03.003
- Peyyala R., Ebersole J. L. Multispecies biofilms and host responses: “Discriminating the Trees from the Forest” // Cytokine. 2013. Vol. 61, № 1. P. 15–25. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.10.006
- Romani L., Bistoni F., Puccetti P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence // Trends in Microbiology. 2002. Vol. 10, № 11. P. 508–514. DOI: 10.1016/s0966–842x(02)02460–5
- Smith S. B., Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology // J. Physiol. 2017. Vol. 595, № 2. P. 451–463. DOI: 10.1113/JP271694
- Sobel J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis // AJOG. 2016. Vol. 214(1). P. 15–21. DOI: 10.1016/j.ajog.2015.06.067
- Toth A., Zajta E., Csonka K. Specific pathways mediating inflammasome activation by *Candida parapsilosis* // Scientific Reports. 2017. Vol. 7, № 1. DOI: 10.1038/srep43129
- Turovskiy Y., Noll K. S., Chikindas M. L. The aetiology of bacterial vaginosis // Journal of Applied Microbiology. 2011. Vol. 110, № 5. P. 1105–1128. OI: 10.1111/j.1365–2672.2011.04977.x
- Uppuluri P., Zaldívar M. A., Anderson M. Z. *Candida albicans* dispersed cells are developmentally distinct from biofilm and planktonic cells // mBio. 2018. Vol. 9, № 4. DOI: 10.1128/mbio.01338–18
- van de Veerdonk F. L., Joosten L. A. B., Netea M. G. The interplay between inflammasome activation and antifungal host defense // Immunological Reviews. 2015. Vol. 265, № 1. P. 172–180. DOI: 10.1111/imr.12280
- van de Wijgert J. H. H. M., Borgdorff H., Verhelst R. et al. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 8. e105998. DOI: 10.1371/journal.pone.0105998
- Vylkova S., Lorenz M. C. Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport // PLoS Pathog. 2014. Vol. 10, № 3. P. e1003995. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003995
- Wilson D., Thewes S., Zakikhany K. et al. Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era // FEMS Yeast Res. 2009. Vol. 9, № 5. P. 688–700. DOI: 10.1111/j.1567–1364.2009.00524.x
- Witkin S. S. The vaginal microbiome, vaginal anti-microbial defence mechanisms and the clinical challenge of reducing infection-related preterm birth // BJOG. 2015. Vol. 122, № 2. P. 213–218. DOI: 10.1111/1471–0528.13115

- Witkin S. S., Linhares I. M. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? // BJOG. 2017. Vol. 124, № 4. P. 606–611. DOI: 10.1111/1471-0528.14390
- Xie Z., Thompson A., Sobue T. et al. Candida albicans biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing // JID. 2012. Vol. 206, № 12. P. 1936–1945. DOI: 10.1093/infdis/jis607

2.2

- Бурмистрова А. Л., Филиппова Ю. Ю., Нохрин Д. Ю. и др. Микробный социум экологической ниши: ротовая полость здоровых детей // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 54–60. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-54-60
- Бухарин О. В., Перунова Н. Б., Иванова Е. В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека. Екатеринбург: УрО РАН, 2014. 212 с.
- Осипов Г. А., Родионов Г. Г. Применение метода масс-спектрометрии микробных маркеров в клинической практике // Лабораторная диагностика. 2013. № 2. С. 68–73.
- Федосова Н. Ф., Лядов К. В., Осипов Г. А. Новые подходы к анализу инфекционных послеоперационных и посттравматических осложнений // Инфекции в хирургии. 2010. № 2. С. 56–62.
- Филиппова Ю. Ю., Бурмистрова А. Л. Когнитивная ось старости: воспаление — микробиота тонкого кишечника // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017. № 5. С. 3–9.
- Яхно Н. Н., Штульман Д. Р. Болезни нервной системы: руководство для врачей. М.: Медицина, 2005. 452 с.
- Biagi E., Candela M., Fairweather-Tait S. et al. Ageing of the human metaorganism: the microbial counterpart // Age (Dordr). 2012. Vol. 34, № 1. P. 247–267. DOI: 10.1007/s11357-011-9217-5
- Booijink C. C., Zoetendal E. G., Kleerebezem M. et al. Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics // Future Microbiology. 2007. Vol. 2, № 3. P. 285–295. DOI: 10.2217/17460913.2.3.285
- Coyte K. Z., Schluter J., Foster K. R. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability // Science. 2015. Vol. 350, № 6261. P. 663–666. DOI: 10.1126/science.aad2602
- El Aidy S., van den Bogert B., Kleerebezem M. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health // Current Opinion in Biotechnology. 2015. Vol. 32. P. 14–20. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.09.005
- Epel E. S., Lithgow G. J. Stress biology and aging mechanisms: toward understanding the deep connection between adaptation to stress and longevity // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 2014. Vol. 69, Suppl.1: S10–6. DOI: 10.1093/gerona/glu055
- Franceschi C., Campisi J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 2014. Vol. 69. P. S4–S9. DOI: 10.1093/gerona/glu057

- Gupta D., Morley J. E.* Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging // *Compr. Physiol.* 2014. Vol. 4, № 4. P. 1495–1510. DOI: 10.1002/cphy.c130049
- Hollister E. B., Gao C., Versalovic J.* Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health // *Gastroenterology.* 2014. Vol. 146, № 6. P. 1449–1458. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.01.052
- Holzer P., Farzi A.* Neuropeptides and the Microbiota-Gut-Brain Axis // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2014. Vol. 817. P. 195–219. DOI: 10.1007/978-1-4939-0897-4_9
- Larsson L.* Determination of microbial chemical markers by gas chromatography-mass spectrometry — potential for diagnosis and studies on metabolism in situ // *APMIS.* 1994. Vol. 102, № 3. P. 161–169.
- Leung K., Thuret S.* Gut Microbiota: A Modulator of Brain Plasticity and Cognitive Function in Ageing // *Healthcare.* 2015. Vol. 3, № 4. P. 898–916. DOI: 10.3390/healthcare3040898
- Osipov G. A., Boiko N. B., Fedosova N. F.* et al. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces // *Microbial Ecology in Health and Disease.* 2009. Vol. 21, № 3–4. P. 159–171. DOI: 10.3109/08910600903462657
- Porges S. W.* The polyvagal perspective // *Bio. Psychol.* 2007. Vol. 74, № 2. P. 116–143. DOI: 10.1016/j.biopsycho.2006.06.009
- Rai R. V., Bai J. A.* Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods // CRC Press. 2015. P. 551–571.
- Saraswati S., Sitaraman R.* Aging and the human gut microbiota — from correlation to causality // *Frontiers in Microbiology.* 2014. Vol. 5. P. 764. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00764
- Skuse D. H., Gallagher L.* Dopaminergic-neuropeptide interactions in the social brain // *Trends Cogn. Sci.* 2008. Vol. 13, № 1. P. 27–35. DOI: 10.1016/j.tics.2008.09.007
- Wagner K. H., Cameron-Smith D., Wessner B.* et al. Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology // *Nutrients.* 2016. Vol. 8, № 6. pii: E338 DOI: 10.3390/nu8060338
- Yoshioka K.* KyPlot — A user-oriented tool for statistical data analysis and visualization // *Computational Statistics.* 2002. Vol. 17, № 3. P. 425–437.
- Zoetendal E. G., Raes J., van den Bogert B.* et al. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates // *The ISME Journal.* 2012. Vol. 6. P. 1415–1426. DOI: 10.1038/ismej.2011.212

2.3

- Бурмистрова А. Л., Филиппова Ю. Ю., Тимофеева А. В.* Микробный консорциум и окситоцин в социальном поведении детей с расстройствами аутистического спектра // *ЖМЭИ.* 2018. № 4. С. 62–67.
- Бухарин О. В., Вальшев А. В., Гильмутдинова Ф. Г.* и др. Экология микроорганизмов человека. Екатеринбург: УрО РАН, 2006. 480 с.
- Пригожин И., Стенгерс И.* Порядок из хаоса: Новый диалог человека с природой / пер. с англ. под ред. В. И. Аршинова, Ю. Л. Климонтовича и Ю. В. Сачкова. М.: Прогресс, 1986. 432 с.

- Факторный, дискриминантный и кластерный анализ / Дж.-О. Ким, Ч. У. Мьюллер, У. Р. Клекка и др.; пер. с англ. под ред. И. С. Енюкова. М.: Финансы и статистика, 1989. 215 с.
- Aagaard K., Ma J., Antony K. M. et al. The placenta harbors a unique microbiome // *Sci. Transl. Med.* 2014. Vol. 6, № 237. P. 237–265. DOI: 10/1126/scitransmed.3008599
- Ayres J. S., Schneider D. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. Vol. 8, № 11. P. 889–895. DOI: 10.1038/nri2432
- Baron-Cohen S. Editorial Perspective: Neurodiversity — a revolutionary concept for autism and psychiatry // *J. Child. Psychol. Psychiatry.* 2017. Vol. 58, № 6. P. 744–747. DOI: 10.1111/jcpp.12703
- Baron-Cohen S., Belmonte M. K. Autism: a window onto the development of the social and the analytic brain // *Annu. Rev. Neurosci.* 2005. Vol. 28. P. 109–126. DOI: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144137
- Bonnin A., Goeden N., Chen K. et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain // *Nature.* 2011. Vol. 472, № 7343. P. 347–350. DOI: 10.1038/nature09972
- Borre Y. E., O’Keeffe G. W., Clarke G. et al. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders // *Trends Mol. Med.* 2014. Vol. 20, № 9. P. 509–518. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.05.002
- Broad K. D., Keverne E. B. Placental protection of the fetal brain during short-term food deprivation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. Vol. 108, № 37. P. 5237–5241. DOI: 10.1073/pnas.1106022108
- Conover W. J., Iman R. L. Rank Transformations as a Bridge Between Parametric and Nonparametric Statistics // *The American Statistician.* 1981. Vol. 35, № 3. P. 124–129.
- DiCicco-Bloom E., Lord C., Zwaigenbaum L. et al. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26, № 26. P. 6897–6996. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1712–06.2006
- Dorrestein P. C., Mazmanian S. K., Knight R. From microbiomes to metabolomes to function during host-microbial interactions // *Immunity.* 2014. Vol. 40, № 6. P. 824–832. DOI: 10/1016/j.immuni.2014.05.015
- Eberl G. The microbiota, a necessary element of immunity // *Comptes Rendus Biologies.* 2018. Vol. 341, № 5. P. 281–283. DOI: 10.1016/j.crv.2018.03.003
- Ferguson B. J., Marler S., Altstein L. L. et al. Associations between cytokines, endocrine stress response, and gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder. *Brain Behav. Immun.* 2016. Vol. 58. P. 57–62. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.05.009
- Füng T. C., Bessman N. J., Hepworth M. R. et al. Lymphoid-Tissue-Resident Commensal Bacteria Promote Members of the IL-10 Cytokine Family to Establish Mutualism // *Immunity.* 2016. Vol. 44, № 3. P. 634–646. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.019
- Gilbert S. F., Sapp J., Tauber A. I. A symbiotic view of life: we have never been individuals // *Q Rev. Biol.* 2012. Vol. 87, № 4. P. 325–341.
- Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica.* 2001. № 1. P. 1–9.

- Lai M. C., Lombardo M. V., Baron-Cohen S.* Autism // *Lancet*. 2014. Vol. 383, № 9920. P. 896–910. DOI: 10.1016/S0140–6736(13)61539–1
- Mazefsky C. A., Schreiber D. R., Olin T. M.* et al. The association between emotional and behavioral problems and gastrointestinal symptoms among children with high functioning autism // *Autism*. 2014. Vol 18, № 5. P. 493–501. DOI:10.1177/1362361313485164
- Mushegian A. A., Ebert D.* Rethinking «mutualism» in diverse host-symbiont communities // *Bioessays*. 2016. Vol. 38, № 1. P. 100–108. DOI: 10.1002/bies.201500074
- Osipov G. A., Boiko N. B., Fedosova N. F.* et al. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces // *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2009. Vol. 21, № 3–4. P. 159–171. DOI: 10.3109/08910600903462657
- Perez P. F., Doré J., Leclerc M.* et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? // *Pediatrics*. 2007. Vol. 119, № 3. P. e724–732. DOI: 10.1542/peds.2006–1649
- Roth T. L., Lubin F. D., Funk A. J.* Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene // *Biol. Psychiatry*. 2009. Vol. 65, № 9. P. 760–769. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.11.028
- Sandman C. A., Davis E. P., Glynn L. M.* Prescient human fetuses thrive // *Psychol. Sci*. 2012. Vol. 23, № 1. P. 93–100. DOI: 10.1177/0956797611422073
- Soleimani F., Zaheri F. F. Abdi* Long-Term Neurodevelopmental Outcomes after Preterm Birth // *Iran Red. Crescent Med J*. 2014. Vol. 16, № 6. P. e17965. DOI: 10.5812/ircmj.17965
- Sood R., Zehnder J. L., Druzin M. L.* Gene expression patterns in human placenta // *PNAS*. 2006. Vol. 103, № 14. P. 5478–5483. DOI: 10.1073/pnas.0508035103
- Yoshioka K.* KyPlot — A user-oriented tool for statistical data analysis and visualization. *Computational Statistics*. 2002. V. 17, № 3. P. 425–437.

2.4

- Абрамов В. М.* IL-1R/TLR распознающая система является мишенью для факторов вирулентности *Yersinia pestis* / В. М. Абрамов и др. // *Наука и современность*. 2011. № 13(1). С. 186–188.
- Балановская Е. В., Балановский О. П.* Русский генофонд на Русской равнине. М.: Луч, 2007. 424 с.
- Виноградов Н. Б., Елисеева В. Н., Лушников А. В.* Очерки истории Челябинской области: в 2 ч. Челябинск: Юж-Урал. кн. изд-во, 1991. Ч. 1. 192 с.
- Евдокимов А. В.* Генетические паттерны кластера TLR10–TLR1–TLR6 популяций ЧО (русские, башкиры, нагайбаки) в сопоставлении с некоторыми евразийскими популяциями: автореф. ... канд. биол. наук: 14.03.09 — клиническая иммунология, аллергология. Челябинск, 2016. 23 с.
- Евдокимов А. В.* Селективный отбор высокопатогенными инфекциями двухлокусных гаплотипов генов TLR1 и TLR6 в эволюции человека на примере популяции татар ЧО / А. В. Евдокимов и др. // III Всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах»: сборник тезисов. Оренбург. 2017. С. 14.

- Итоги Всероссийской переписи населения // Федеральная служба государственной статистики. Москва, 2010. URL: <http://www.gks.ru> (дата обращения: 15.09.2018).
- Лобов А. С. Структура генофонда субпопуляций башкир: автореф. ... канд. биол. наук: 03.00.15 — генетика. Уфа, 2009. 23 с.
- Чернова М. С. Иммуногенетический профиль популяций ЧО (русские, татары, башкиры, нагайбаки) в структуре мировых популяций: автореф. ... канд. биол. наук: 14.03.09 — клиническая иммунология, аллергология. Челябинск, 2014. 22 с.
- Abi-Rached L. The shaping of modern human immune systems by multiregional admixture with archaic humans / L. Abi-Rached et al. // *Science*. 2011. № 334. P. 89–94. DOI: 10.1126/science.1209202
- Adib-Conquy M., Scott-Algara D., Cavailon J. M. et al. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammal // *Immunology and Cell Biology*. 2014. Vol. 92, № 3. P. 256–262. DOI: 10.1038/icb.2013.99
- A global reference for human genetic variation: The 1000 Genomes Project Consortium // *Nature*. 2015. № 526. P. 68–74. DOI: 10.1038/nature15393
- Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis. 2018. URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35> (дата обращения: 30.10.2018).
- Ayres J. S., Schneider D. S. Two ways to survive an infection: what resistance and tolerance can teach us about treatment for infectious diseases // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. Vol. 8, № 11. P. 889–895. DOI: 10.1038/nri2432
- Barreiro L. B. Evolutionary Dynamics of Human Toll-Like Receptors and Their Different Contributions to Host Defense / L. B. Barreiro et al. // *PLoS Genet.* 2009. Vol. 5, № 7. e1000562. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000562
- Barreiro L. B., Quintana-Murci L. From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes // *Nature Reviews Genetics*. 2010. Vol. 11. P. 17–20. DOI: 10.1038/nrg2698
- Botos I., Segal D. M., Davies D. R. The Structural Biology of Toll-Like Receptors // *Structure*. 2011. Vol. 19. № 4. P. 447–459. DOI: 10.1016/j.str.2011.02.004
- Casals F. Genetic adaptation of the antibacterial human innate immunity network / F. Casals et al. // *BMC Evolutionary Biology*. 2011. Vol. 11, № 202. P. 1–11. DOI: 10.1186/1471-2148-11-202
- Casanova J.-L., Abel L., Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: Natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics // *Annu. Rev. Immunol.* 2011. № 29. P. 447–491. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101335
- Dannemann M., Andres A. M., Kelso J. Introgression of Neandertal- and Denisovan-like haplotypes contributes to adaptive variation in human Toll-like receptors // *The American J. of Human Genetics*. 2016. Vol. 98, № 1. P. 22–33. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.11.015
- Daub J. T., Hofer T., Cuvet E. Evidence for Polygenic Adaptation to Pathogens in the Human Genome // *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol. 30, № 7. P. 1544–1558.
- Georgel P., Macquin C., Bahram S. The Heterogeneous Allelic Repertoire of Human Toll-Like Receptor (TLR) Genes // *PLoS ONE*. 2009. Vol. 4, № 11. e7803. DOI: 10.1371/journal.pone.0007803

- Guan Y.* Human TLRs 10 and 1 Share Common Mechanisms of Innate Immune Sensing but Not Signaling / *Y. Guan et al.* // *J. Immunol.* 2010. Vol. 184, № 9. P. 5094–5103. DOI: 10.4049/jimmunol.0901888
- Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D.* PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontologia Electronica.* 2001. № 1. P. 1–9.
- Hawn T. R.* A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides / *T. R. Hawn et al.* // *Eur. J. Immunol.* 2007. Vol. 37, № 8. P. 2280–2289. DOI: 10.1002/eji.200737034
- Johnson C. M., Lyle E. A., Omuetti K. O.* Cutting Edge: A Common Polymorphism Impairs Cell Surface Trafficking and Functional Responses of TLR1 but Protects against Leprosy // *J. Immunol.* 2007. Vol. 178, № 12. P. 7520–7524.
- Laayouni H.* Convergent evolution in European and Roma populations reveals pressure exerted by plague on Toll-like receptors / *H. Laayouni et al.* // *PNAS.* 2014. Vol. 111. № 7. P. 2668–2673. DOI: 10.1073/pnas.1317723111
- Lazaridis I., Patterson N., Mitnik A.* Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans // *Nature.* 2014. Vol. 513. P. 409–413. DOI: 10.1038/nature13673
- Means T. K., Golenbock D. T., Fenton M. J.* Structure and function of Toll-like receptor proteins // *Life Sciences.* 2000. Vol. 68. № 3. P. 241–258.
- Mendez F., Watkins J. C., Hammer M. F.* Neandertal Origin of Genetic Variation at the Cluster of OAS Immunity Genes // *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol. 30, № 4. P. 798–801. DOI: 10.1093/molbev/mst004
- Mikacenic C.* Variation in the TLR10/TLR1/TLR6 Locus is the Major Genetic Determinant of Inter-Individual Difference in TLR1/2-Mediated Responses / *C. Mikacenic (et al.)* // *Genes Immun.* 2013. Vol. 14, № 1. P. 52–57. DOI: 10.1038/gene.2012.53
- Oosting M., Cheng S.-C., Bolscher J. M.* Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. Vol. 111, № 42. P. 4478–4484. DOI: 10.1073/pnas.1410293111
- Takeuchi O., Akira S.* Pattern Recognition Receptors and Inflammation // *Cell.* 2010. Vol. 140, № 6. P. 805–820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022
- Vandenbon A.* Systems biology approaches to toll-like receptor signaling / *A. Vandenbon (et al.)* // *WIREs Syst. Biol. Med.* 2012. Vol. 4, № 5. P. 497–507. DOI: 10.1002/wsbm.1178

2.5

- Балановская Е. В., Балановский О. П.* Русский генофонд на Русской равнине. М.: Луч, 2007. 424 с.
- Болдырева М. Н., Алексеев Л. П., Хаитов Р. М.* и др. HLA-генетическое разнообразие населения России и СНГ. 1. Русские // *Иммунология.* 2005. № 5. С. 260–263.
- Всероссийская перепись населения 2010 г. URL: http://www.gks.ru/free_doc/new_site/perepis2010/croc/perepis_itogi1612.htm (дата обращения: 16.08.2018).

- Евсеева И. В., Уэлс С., Тонкс С.* Генетический полиморфизм генов иммунного ответа класса I в коренных популяциях европейского Севера России // *Иммунология*. 2001. № 5. С. 27–30.
- Елисеева В. Я., Григорьев Б. В., Матушкин П. Г.* и др. Краткий очерк истории Челябинской области. Челябинск: Южно-Уральское кн. изд-во. 1965. 516 с.
- Самигулов Г. Х.* Челябинск XVIII–XIX веков: население, планировка, материальная культура (по данным археологии и письменных источников): автореф. дис. ... канд. истор. наук. Ижевск, 2005. 24 с.
- Суслова Т. А., Бурмистрова А. Л., Чернова М. С.* и др. Распределение генов, гаплотипов HLA в популяции башкир, проживающих в ЧО // *Иммунология*. 2011. № 2. С. 65–69.
- Чернова М. С.* Иммуногенетический профиль популяций ЧО (русские, татары, башкиры, нагайбаки) в структуре мировых популяций: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Челябинск, 2014. 22 с.
- Abi-Rached L., Jobin M. J., Kulkarni S.* et al. The shaping of modern human immune systems by multiregional admixture with archaic humans // *Science*. 2011. Vol. 334, № 6052. P. 89–94. DOI: 10.1126/science.1209202
- Allele Frequency Net Database. AFND. 2015. URL: <http://www.allelefrequencies.net> (дата обращения: 16.01.2019).
- Arnaiz-Villena A., Martinez-Laso J., Moscoso J.* et al. HLA genes in the Chuvashian population from European Russia: admixture of Central European and Mediterranean populations // *Human Biology*. 2003. Vol. 75, № 3. P. 375–392.
- Blackwell J. M., Jamieson S. E., Burgner D.* HLA and infectious diseases // *Clin. Microbiol. Rev.* 2009. Vol. 22, № 2. P. 370–385. DOI: 10.1128/CMR.00048–08
- Bubnova L. N., Zaitseva G. A., Erokhina L. V.* et al. A comparative study of HLA-A and HLA-B antigens and haplotype distribution among donors of hematopoietic stem cells from Russian and German regions // *Cell. Ther. Transplant*. 2008. Vol. 1, № 1. P. 28–34. DOI: 10.3205/ctt2008–05–28–001-en
- Darke C., Guttridge M. G., Thompson J.* et al. HLA class I (A, B) and II (DR, DQ) gene and haplotype frequencies in blood donors from Wales // *Exp. Clin. Immunogenet*. 1998. Vol. 15, № 2. P. 69–83. DOI: 10.1159/000019057
- Excoffier L., Lischer H. E. L.* Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Res.* 2010. Vol. 10, № 3. P. 564–567. DOI: 10.1111/j.1755–0998.2010.02847.x
- Fellay J., Shianna K. V., Ge D.* et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1 // *Science*. 2007. Vol. 317, № 5840. P. 944–947. DOI: 10.1126/science.1143767
- Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D.* PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica*. 2001. № 1. P. 1–9.
- Immuno Polymorphism Database: IPD-IMGT/HLA. 2018. URL: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> (дата обращения: 08.11.2018).

- Johansson A., Ingman M., Mack S. J.* et al. Genetic origin of the Swedish Sami inferred from HLA class I and class II allele frequencies // *Eur. J. Human Genet.* 2008. Vol. 16, № 11. P. 1341–1349. DOI: 10.1038/ejhg.2008.88
- Kamatani Y., Wattanapokayakit S., Ochi H.* et al. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians // *Nat. Genet.* 2009. Vol. 41, № 5. P. 591–595. DOI: 10.1038/ng.348
- Kulkarni S., Savan R., Qi Y.* et al. Differential microRNA regulation of HLA-c expression and its association with HIV control // *Nature.* 2011. Vol. 472, № 7344. P. 495–498. DOI: 10.1038/nature09914
- Kuranov A. B., Vavilov M. N., Abildinova G. Zh.* et al. Polymorphisms of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 in inhabitants of Astana, the capital city of Kazakhstan // *PloS One.* 2014. Vol. 9, № 12. e115265. DOI: 10.1371/journal.pone.0115265
- Meyer D., Aguiar V. R. C., Bitarello B. D.* et al. A genomic perspective on HLA evolution // *Immunogenetics.* 2018. Vol. 70, № 1. P. 5–27. DOI: 10.1007/s00251-017-1017-3
- Mohyuddin A., Mehdi S. Q.* HLA analysis of the Parsi (Zoroastrian) population in Pakistan // *Tissue Antigens.* 2005. Vol. 66, № 6. P. 691–695. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2005.00507.x
- Nishida N., Ohashi J., Khor S. S.* et al. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 19, № 6. 24767. DOI: 10.1038/srep24767
- PHYLIP. 2018. URL: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html> (дата обращения: 08.11.2018).
- Ricco M. E., Buhler S., Nunes J. M.* et al. 16th IHIW: Analysis of HLA Population Data, with updated results for 1996 to 2012 workshop data (AHPD project report) // *Int. J. Immunogenet.* 2013. Vol. 40, № 1. P. 21–30. DOI: 10.1111/iji.12033
- Suslova T. A., Burmistrova A. L., Chernova M. S.* et al. HLA gene and haplotype frequencies in Russians, Bashkirs and Tatars, living in the Chelyabinsk Region (Russian South Urals) // *Int. J. Immunogenet.* 2012. Vol. 39, № 5. P. 394–408. DOI: 10.1111/j.1744-313X.2012.01117.x
- Sveinbjornsson G., Gudbjartsson D. F., Halldorsson B. V.* et al. HLA Class II sequence variants influence tuberculosis risk in populations of European ancestry // *Nat. Genet.* 2016. Vol. 48, № 3. P. 318–322. DOI: 10.1038/ng.3498
- Thomas R., Thio C. L., Apps R.* et al. A novel variant marking HLA-DP expression levels predicts recovery from hepatitis B virus infection // *J. Virol.* 2012. Vol. 86, № 12. P. 6979–6985. DOI: 10.1128/JVI.00406-12
- Tian C., Hinds D. A., Hromatka B. S.* et al. Genome-wide association and HLA region fine-mapping studies identify susceptibility loci for multiple common infections // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. P. 599. DOI: 10.1038/s41467-017-00257-10.1101/073056
- Wennerström A., Vlachopoulou E., Lahtela L. E.* et al. Diversity of extended HLA-DRB1 haplotypes in the Finnish population // *PloS One.* 2013. Vol. 8, № 11. 79690. DOI: 10.1371/journal.pone.0079690
- Zhang F. R. R., Huang W., Chen S. M. M.* et al. Genomewide association study of leprosy // *N. Engl. J. Med.* 2009. Vol. 361, № 27. P. 2609–2618. DOI: 10.1056/NEJMoa0903753

2.6

- Бодиенкова Г. М., Титова Ж. В.* Роль полиморфизма и экспрессии отдельных генов цитокинов в формировании патологии (обзор) // Успехи современного естествознания. 2015. № 1, ч. 4. С. 616–620.
- Валуйских Е. Ю.* Влияние генетических и средовых факторов на клинические проявления хронических воспалительных заболеваний кишечника (болезнь Крона и неспецифический язвенный колит): автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.04. Новосибирск, 2012. 23 с.
- Васильев Ф. Ф.* Ассоциация аллельных вариантов генов рецепторов TNFA и IL1 с уровнем экспрессии их мембраносвязанных и растворимых рецепторов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.09. Новосибирск, 2015. 23 с.
- Волосников Д. К., Сабирова А. В.* и др.. Воспалительные заболевания кишечника у детей ЧО // Педиатрический вестник Южного Урала. 2016. № 2. С. 24–27.
- Дорофеев А. Э., Рассохина О. А., Дорофеева А. А.* Изменения микрофлоры при воспалительных и функциональных заболеваниях кишечника и способы их коррекции // Сучасна гастроентерологія. 2014. — Т. 75, № 1. С. 34–40.
- Дорофеев А. Э., Рассохина О. А.* Синдром раздраженного кишечника — современный взгляд на проблему // Гастроэнтерология. 2011. № 358. С. 10–21.
- Ивашкин В. Т., Шептулин А. А.* Избранные лекции по гастроэнтерологии. М.: Мед-пресс-информ, 2002. 85 с.
- Кипень В. Н.* Роль межгенных взаимодействий в формировании предрасположенности к спорадическому раку молочной железы (на примере генов XRCC1, XRCC3 И PALB2) // Труды БГУ. 2015. Т. 10, ч. 1. С. 146–152.
- Кутихин А. Г., Южалин А. Е., Понасенко А. В.* Современные тенденции статистической обработки данных и представления результатов в кандидатных генетико-эпидемиологических исследованиях // Фундам. и клинич. медицина. 2017. Т. 2, № 2. С. 77–82.
- Львовс Д.* Статистический поиск и валидация биомаркеров, связанных с рассеянным склерозом: автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. Москва, 2012. 28 с.
- Львовс Д., Фаворова О. О., Фаворов А. В.* Полигенный подход к исследованиям полигенных заболеваний // Acta Naturae (рус. версия). 2012. Т. 4, № 3. С. 62–76.
- Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом // РЖГГК он-лайн. 2015. С. 48–65. URL: http://www.gastro-j.ru/files/_2015_1_s7_1431173541.pdf (дата обращения: 05.11.2018).
- Родионова О. Н., Бабаева А. Р.* Патогенетическая роль сывороточных цитокинов при синдроме раздраженного кишечника // Цитокины и воспаление. 2011. Т. 10, № 3. С. 45–48.
- Рыдловская А. В., Симбирцев А. С.* Функциональный полиморфизм гена TNF α и патология // Цитокины и воспаление. 2005. Т. 4, № 3. С. 4–10.
- Сибиряк С. В., Черешнев В. А., Симбирцев А. С.* и др.. Цитокиновая регуляция биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных соединений. Екатеринбург: УрО РАН, 2006. 160 с.

- Симбирцев А. С.* Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал. 2013. Т. 13, № 3. С. 18–41.
- Синдром раздраженного кишечника // Клинические рекомендации. Колопроктология. 2-е изд., испр. и доп. / под ред. чл.-кор. РАН Ю. А. Шельгина. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2017. 36 с.
- Сташкевич Д. С., Беляева С. В., Филиппова Ю. Ю., Бурмистрова А. Л.* Межгенные взаимодействия генов цитокинов IL1, IL-1RA, IL6, IL10 и TNFA у больных синдромом раздраженного кишечника и неспецифическим язвенным колитом русской популяции ЧО // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 6. С. 133–138.
- Шевченко А. В.* Иммуногенетический анализ полиморфизма генов цитокинов, матричных металлопротеиназ и фактора роста эндотелия сосудов при ряде мультифакториальных заболеваний: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2015. 441 с.
- Шумилов П. В.* Патогенетические факторы развития и течения болезни Крона и неспецифического язвенного колита у детей: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.08, 14.01.28. М., 2010. 53 с.
- Ahirvar D. K., Kesarwani P., Singh R. et al.* Role of tumor necrosis factor-alpha (C-863A) polymorphism in pathogenesis of inflammatory bowel disease in Northern India // J. of Gastrointestinal Cancer. 2012. Vol. 43, № 2. P. 196–204. DOI: 10.1007/s12029-010-9238-9
- Belsky J., Jonassaint C., Pluess M. et al.* Vulnerability genes or plasticity genes? // Molecular Psychiatry. 2009. Vol. 14, № 8. P. 746–754. DOI: 10.1038/mp.2009.4
- Engel G.* The clinical application of the biopsychosocial model // The American J. of Psychiatry. 1980. Vol. 137. P. 535–544.
- GeneMANIA. 2018. URL: <http://genemania.org> (дата обращения: 05.11.2018).
- Hotoleanu C., Popp R., Trifa A. P. et al.* Genetic determination of irritable bowel syndrome // World Journal of Gastroenterology. 2008. Vol. 14, № 43. P. 6636–6640.
- Macsharry J., O'Mahony L., Fanning A. et al.* Mucosal cytokine imbalance in irritable bowel syndrome // Scandinavian J. of Gastroenterology. 2008. Vol. 43. P. 1467–1476. DOI: 10.1080/00365520802276127
- Moore J.* Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction // Expert Review of Molecular Diagnostics. 2007. Vol. 2. P. 318. DOI: 10.1586/14737159.4.6.795
- Motsinger A. A., Ritchie M. D.* Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies // Human Genomics. 2007. Vol. 2. P. 318–328.
- Naderi N., Farnood A., Dadaei T. et al.* Association of Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphisms with Inflammatory Bowel Disease in Iran // Gastroenterology and Liver Disease Research Center. 2014. Vol. 43, № 5. P. 630–636.

- Norouzinia M., Naderi N.* Personalized management of IBD; is there any practical approach? // *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*. 2015. Vol. 8, № 1. P. 1–3.
- Papanicolaou D. A., Wilder R. L., Manolagas S. C.* et al. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease // *Ann. Intern. Med.* 1998. Vol. 15, № 2. P. 127–137.
- Rajilić-Stojanović M., Biagi E., Heilig H. G.* et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome // *Gastroenterology*. 2011. Vol. 141, № 5. P. 1792–1801. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.07.043
- Reddy S. S., Brandt L. J.* Clostridium difficile infection and inflammatory bowel disease // *J. Clin. Gastroenterol.* 2013. Vol. 47. P. 666–671.
- Rodriguez-Fandiño O., Hernandez-Ruiz J., Schmulson M.* From cytokines to toll-like receptors and beyond — current knowledge and future research needs in irritable bowel syndrome // *J. of Neurogastroenterology and Motility*. 2010. Vol. 16, № 4. P. 363–373. DOI: 10.5056/jnm.2010.16.4.363
- Rokutan, K. Morita K., Masuda K.* et al. Gene expression profiling in peripheral blood leukocytes as a new approach for assesment of human stress response // *The Journal of Medical Investigation*. 2005. Vol. 52, № 3–4. P. 137–144.
- SNPStats: Your web tool for SNP analysis. Institut Català d’Oncologia, 2016. URL: <https://www.snpstats.net/start.htm?> (дата обращения: 06.05.2018).
- Tanaka T., Kishimoto T.* Targeting Interleukin-6: All the way to treat autoimmune and inflammatory diseases// *Int. J. of Biol. Sciences*. 2012. Vol. 8, № 9. P. 1227–1236. DOI: 10.7150/ijbs.4666
- Zhou M., He J., Shen Y.* et al. New Frontiers in Genetics, Gut Microbiota, and Immunity: A Rosetta Stone for the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease // *Biomed. Res. Int.* 2017. Vol. 2017. Article ID8201672. 17 p. DOI: 10.1155/2017/8201672.

2.7

- Абдильдин Р. К.* Морфофункциональная характеристика плаценты самок крыс с экспериментальным хроническим поражением печени различного генеза: дис. ... канд. биол. наук. Оренбург, 2016. 22 с.
- Ашкинази В. И., Маянская И. В., Толкачева Н. И.* и др.. Молекулы адгезии при деструктивно-воспалительном процессе в кишечнике у детей с язвенным колитом // *Вопросы современной педиатрии*. 2013. Т. 12, № 4. С. 52–56. DOI: 10.15690/vsp.v12i4.731
- Бадалян Б. Ю., Сарксян Дж. С., Худавердян А. Д.* и др.. Пренатальный стресс — как фактор морфофункциональных нарушений ЦНС в пре- и постнатальном онтогенезе // *Вопросы теоретической и клинической медицины*. 2012. № 3. С. 35–37.
- Брудастов Ю. А., Журлов О. С., Колинченко Е. В.* и др.. Активные метаболиты кислорода при фагоцитозе // *Вестник ОГУ*. 2008. № 12. С. 148–151.
- Брюхин Г. В.* Влияние хронического холестатического поражения печени матери на потомства в условиях эксперимента // *Морфология*. 1994. № 2. С. 18–21.

- Брюхин Г. В., Невзорова Н. В.* Роль хронической экспериментальной патологии печени матери в становлении неспецифической резистентности потомства // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 155, № 1. С. 114–118.
- Брюхин Г. В., Комарова Т. М.* Характеристика пролиферативной и апоптотической активности моноцитарных клеток костного мозга у потомства самок крыс с хроническим токсическим поражением печени // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018. Т. 165, № 3. С. 309–322. URL: <https://rucont.ru/efd/670424>
- Голохваст К. С., Чайка В. В.* Альвеолярный макрофаг (краткий обзор) // Вестник новых медицинских технологий. 2011. Т. 18, № 2. 23 с.
- Грачев А. Ю.* Система мононуклеарных фагоцитов у потомства матерей с хронически аутоиммунным и холестатическим поражением печени: дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 1994. 225 с.
- Дамбаева С. В., Мазуров Д. В., Пинегин Б. В.* Некоторые особенности фагоцитарной системы у больных хронической гранулематозной болезнью // Иммунология. 2002. № 2. С. 87–93.
- Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Савочкина А. Ю.* Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Изд-во РАМН, 2009. 208 с.
- Долгушин И. И., Прокопьева О. Б., Смирнова Т. Г. и др..* Изучение способности моноцитов, выделенных из периферической крови, образовывать внеклеточные ловушки спонтанно и после активации // Иммунология. 2012. Т. 33, № 5. С. 240–243.
- Донцов В. И., Крутько В. Н., Мрикаев Б. М. и др..* Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении // Труды ИСА РАН. 2006. Т. 19. С. 50–69.
- Евченко Е. В.* Роль иммунного компонента в поражении одноименного органа у потомства самок крыс с хронической экспериментальной патологией гепатобилиарной системы: дис. ... мед. наук. Челябинск, 2001. 314 с.
- Земсков В. М., Субботин С. М.* Молекулярные механизмы влияния адгезии на активацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток // Иммунология. 1990. № 2. С. 9–12.
- Земсков В. М., Николаева Е. Н., Родионов С. В.* Гетерогенность мононуклеарных фагоцитов // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113. Вып. 3. С. 336–350.
- Илларионов В. Е.* Основы лазерной терапии. М.: Респект, 1992. 122 с.
- Ильиных М. А., Брюхин Г. В.* Влияние аутоиммунного и токсического поражения печени матери на структурно-функциональное становление поджелудочной железы ее потомства // Известия Челябинского научного центра УрО РАН. 2006. № 4. С. 82–84.
- Ковальчук Л. В., Чередеев А. Н.* Иммунорегуляторная роль моноцитов в норме и при иммунопатологии // Итоги науки и техники. Сер. Иммунология. М.: ВИНТИ, 1991. 270 с.

- Коротина О. Л., Генералов И. И.* Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012. № 4. С. 23–32.
- Кравцов А. Л.* Формирование внеклеточных ловушек — эффективный механизм защиты организма от патогена // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. Т. 112, № 2. С. 69–74. DOI: 10.21055/0370–1069–2012–2(112)–69–74
- Кузнецова А. Б., Брюхин Г. В.* Особенности экспрессии β -эндорфина в нейросекреторных клетках аркуатного ядра гипоталамуса потомства самок крыс с хронической алкогольной интоксикацией в различные сроки постнатального онтогенеза // Естествознание и гуманизм: сб. науч. тр. Томск: Вайнар, 2006. Т. 3, № 1. С. 83–84.
- Кульчиков А. Е., Морозов С. Г., Гриненко Е. А.* и др. Нарушение фагоцитоза и его фармакокоррекция при геморрагическом инсульте // Цитокины и воспаление. 2011. Т. 10. № 3. С. 102–107.
- Курбанов А. И.* Современные представления о механизме действия антиоксидантов на фагоцитоз // Международный медицинский журнал. 2008. № 3. С. 104–107. URL: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/53904>
- Ласьков Д. С., Брюхин Г. В., Сизоненко М. Л.* и др.. Особенности морфофункциональных характеристик сперматозоидов у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени алкогольного генеза // Проблемы репродукции. 2014. № 2. С. 18–22.
- Леонов Н. В., Брюхин Г. В.* Влияние хронического алкогольного поражения печени матери на морфофункциональное состояние тучных клеток тимуса у потомства // Морфологические ведомости. 2007. Т. 1, № 3–4. С. 43–45.
- Луговская С. А.* Структура и функции моноцитов и макрофагов // Клиническая лабораторная диагностика. 1997. № 9. С. 10–16.
- Мазуров Д. В., Дамбаева С. В., Пинегин Б. В.* Оценка внутриклеточного киллинга стафилококка фагоцитами периферической крови с помощью проточной цитометрии // Иммунология. 2000. № 2. С. 57–59.
- Маслов А. К.* Роль пероксидазы в патогенезе заболеваний и реализация ее фармакологической активности на примере экспериментальной лепры // Вестник новых медицинских технологий. 2007. Т. 14, № 4. С. 161–164.
- Маянская Н. Н., Вохминцева П. В., Насенкова Н. А.* и др. Оценка влияния факторов риска на течение экспериментальной пневмонии у крыс Вистар // Современные наукоемкие технологии. 2005. № 10. С. 49–50.
- Маянский А. Н., Маянский Д. Н.* Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1983. 343 с.
- Маянский А. Н., Пикуза О. И.* Клинические аспекты фагоцитоза. Казань: Магариф, 1993. 172 с.
- Медведь В. И.* Введение в клинику экстрагенитальной патологии беременных. Киев: Гидромакс, 2007. 556 с.

- Мухамедова Н. М., Свиридов Д. Д., Собенин И. А. и др.. Липопротеиды высокой плотности подавляют воспалительную реакцию моноцитов // Сб. науч. трудов «Проблемы перспективы современной науки» с материалами международной телеконференции «Фундаментальные науки и практика». Томск, 2011. Т. 3. № 1. С. 64–68.
- Назарова А. О., Валькова А. В., Шарабанова И. Ю. и др.. Состояние клеточных компонентов перитонеального микроокружения у крыс с экспериментальным эндометриозом и эффективность хирургического лечения // Проблемы репродукции. 2004. Т. 10, № 3. С. 12–15.
- Николина О. В. Структурно-функциональная характеристика щитовидной железы потомства самок крыс в норме и при нарушении условий внутриутробного развития: дис. ... канд. биол. наук. Челябинск, 2000. 166 с.
- Парахонский А. П. Ферментативная активность нейтрофильных лейкоцитов при хронических заболеваниях печени // Фундаментальные исследования. 2005. № 5. С. 79–80.
- Пауков В. С., Даабуль С. А., Беляева Н. Ю. Роль макрофагов в патогенезе ограниченного воспаления // Архив патологии. 2005. Т. 67, № 4. С. 3–10.
- Пашнина Е. Н. Структурно-функциональная характеристика селезенки потомства матерей с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза в условиях эксперимента: дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2003. 226 с.
- Пинегин Б. В., Карсонова М. И. Макрофаги: свойства и функции // Иммунология. 2009. № 4. С. 241–249.
- Резников А. Г., Пишак В. П., Носенко Н. Д. и др.. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. Черновцы: Медакадемия, 2004. 351 с.
- Романов Б. К. Лекарственная регуляция активности лизосомальных ферментов // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2003. № 1–2. С. 75–82.
- Романова Н. В. Продукция активных форм кислорода циркулирующими фагоцитами и суставной синдром при системной красной волчанке // Успехи современного естествознания. 2005. № 3. С. 116–117.
- Ромашкина М. В., Трофимов В. А. Влияние перекиси водорода и стауроспорина на гибель моноцитов/макрофагов периферической крови доноров и больных раком молочной железы // Морфологические ведомости. 2008. № 3–4. С. 201–204.
- Савченков Ю. И., Лобынцев К. С. Очерки по физиологии и морфологии функциональной системы мать — плод. М.: Медицина, 1980. 254 с.
- Серышева О. Ю., Брюхин Г. В. Морфофункциональная характеристика эпителия крипт двенадцатиперстной кишки у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени // Морфология. 2013. Т. 144, № 4. С. 36–40. DOI: 10.14529/hsm160107

- Сизоненко М. Л.* Роль хронических экспериментальных поражений гепатобилиарной системы различного генеза в нарушении морфофункционального становления мужской репродуктивной системы потомства: дис. ... д-ра биол. наук. Оренбург, 2015. 320 с.
- Соляникова Д. Р.* Роль хронического поражения гепатобилиарной системы самок крыс в нарушении морфофункционального состояния щитовидной железы потомства: дис. ... канд. биол. наук. Челябинск, 2010. 273 с.
- Сонова М. М., Осипова А. А.* Роль макрофагов перитонеальной жидкости при наружном генитальном эндометриозе // *Материалы 9-го Всеросс. форума «Мать и дитя»*. М., 2007. С. 522–523.
- Тихомирова Е. И., Карпунина Л. В., Абросимова О. В.* Участие лектина *Raenibacillus polytuxa* в процессах киллинга бактерий в макрофагах // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008. № 6. С. 82–84.
- Федосов А. А.* Структурно-функциональная характеристика тимуса у потомства матерей с хроническим поражением гепатобилиарной системы различного генеза в условиях эксперимента: дис. ... канд. мед наук. Челябинск, 2003. 237 с.
- Филиппенко П. С., Ивченко Г. С., Филиппенко Н. П.* Влияние биологически активных веществ на лизосомы поджелудочной железы // *Успехи современного естествознания*. 2009. № 7. С. 99–101.
- Фирсова В. Г., Паршиков В. В.* Деструктивный панкреатит: механизмы гибели клетки и их возможное клиническое значение // *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2013. Т. 6, № 1. С. 100–106.
- Фрейдлин И. С., Немировский С. В., Рудакова Т. А.* Некоторые морфологические и функциональные характеристики моноцитов периферической крови человека, культивируемых *in vitro* // *Факторы естественного иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях*. Омск, 1976. Вып. 4. С. 13–14.
- Фрейдлин И. С., Кошкина М. А., Забелина Т. С.* Неспецифическая активация клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы препаратами ЛПС и полисахаридов микробного происхождения // *Актуальные проблемы иммунологии*. 1981. Т. 1. С. 139–140.
- Фрейдлин И. С.* Система мононуклеарных фагоцитов. М.: Медицина, 1987. 472 с.
- Хидирова Л. Д., Маянская Н. Н.* Особенности активации лизосомального аппарата и нарушения обмена микроэлементов при экспериментальном повреждении миокарда // *Фундаментальные исследования*. 2012. № 5. С. 130–132.
- Хаитов Р. М., Пинегин Б. В.* Современные представления о защите организма от инфекции // *Иммунология*. 2000. № 1. С. 61–64.
- Цаплина О. А.* Фагоцитоз патогенных бактерий: модификация клеточных процессов бактериальными эффекторами // *Цитология*. 2013. Т. 55. № 2. С. 83–91.
- Шаврина Е. Ю., Брюхин Г. В.* Сравнительная характеристика цитохимического состояния перитонеальных и альвеолярных макрофагов потомства самок крыс

- с экспериментальным поражением печени // Вестник ЮУрГУ. 2012. Т. 287, № 28. С. 85–88. DOI: 10.14529/ozfk12.28.20
- Шевалдин А. Г.* Хронический гепатит С и резидентные макрофаги печени // Фундаментальные исследования. 2010. № 2. С. 138–147.
- Шопова А. В.* Фагоцитарная активность и ловушкообразующая способность макрофагов различных компартментов у потомства самок крыс с лекарственным поражением печени: дис. ...канд. мед. наук. Оренбург, 2015. 235 с.
- Шпак С. И., Шрамко Ю. И.* Альвеолярные макрофаги при воздействии ксенобиотиков // Морфология. 2000. Т. 118. № 6. С. 66–68.
- Bershadsky A., Kozlov M., Geiger B.* Adhesion-mediated mechanosensitivity a time to experiment and a time to theorize // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2006. Vol. 18. P. 472–481. DOI: 10.1016/j.ceb.2006.08.012
- Gairo G., Locati M., Mantovani A.* Control of iron homeostasis as key component of macrophage polarization // *Haematologica*. 2010. Vol. 95, № 11. P. 1801–1803. DOI: 10.3324/haematol.2010.030239
- Capo C., Meconi S., Sanguedolce M. V.* et al. Effect of cytotoxic necrotizing factor — 1 on actin cytoskeleton in human monocytes: role in the regulation of integrin-dependent phagocytosis // *Journal Immunol.* 1998. Vol. 161. P. 4301–4308.
- Cossart P., Sansonetti P. J.* Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens // *Science*. 2004. Vol. 304. P. 242–248. DOI: 10.1126/science.1090124
- Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B.* et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis // *Cancer Cell*. 2006. Vol. 10. P. 51–64. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.06.001
- Fuchs T., Abed U., Goosmann C.* et al. Novel cell death leads to neutrophil extracellular traps // *J. Cell. Biol.* 2007. Vol. 176, № 2. P. 231–241. DOI: 10.1083/jcb.200606027
- Gao B., Jeong W., Tian Z.* Liver: Liver: an organ with predominant innate immunity // *Hepatology*. 2008. Vol. 47. P. 729–736. DOI: 10.1002/hep.22034
- Hall A.* Rho GTPases and the actin cytoskeleton // *Science*. 1998. Vol. 279. P. 509–514. DOI: 10.1126/science.279.5350.509
- Ke X., Terashima M., Nariai Y.* et al. Nitric oxide regulates actin reorganization through cGMP and Ca²⁺ calmodulin in RAW 264.7 cells // *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. Vol. 28. P. 101–113. DOI: 10.1016/S0167-4889(01)00090-8
- Lessey B. A.* Adhesion molecules and implantation // *J. Reprod. Immunol.* 2002. Vol. 55, № 1–2. P. 101–112. DOI: 10.1016/S0165-0378(01)00139-5
- McDonald B., Urrutia R., Yipp B. G.* et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis // *Cell Host & Microbe*. 2012. Vol. 12. P. 324–333. DOI: 10.1016/j.chom.2012.06.011
- Mitsuko T., Harunori I.* Identification of novel adhesion proteins in mouse peritoneal macrophages // *Bio Cell*. 1992. Vol. 76. P. 103–109. DOI: 10.1016/0248-4900(92)90200-K
- Myers K. R., Casanova J. E.* Regulation of actin cytoskeleton dynamics by Arf-family GTPases // *Trends Cell. Biol.* 2008. Vol. 18. P. 184–192. DOI: 10.1016/j.tcb.2008.02.002

- Okada H., Mak T. W.* Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells // *Nat. Rev. Cancer*. 2004. Vol. 4. P. 592–603. DOI: 10.1038/nrc1412
- Pilsczek F. H., Salina D., Poon K. et al.* A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus* // *J. Immunol*. 2010. Vol. 185, № 12. P. 7413–7425. DOI: 10.4049/jimmunol.1000675
- Platt N., Haworth R., Silva R. P. et al.* Scavenger receptors and phagocytosis of bacteria and apoptotic cells // *Advances in cellular and molecular biology of membranes and organelles*. 1999. Vol. 5. P. 71–85. DOI: 10.1016/S1874–5172(99)80028–5
- Urban C. F., Reichard U., Zychlinsky A.* Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms // *Cell Microbiology*. 2006. Vol. 8, № 4. P. 668–6 DOI: 10.1111/j.1462–5822.2005.00659.x 76

Глава 3

- Бурмистрова А. Л., Филиппова Ю. Ю., Михайлова А. С.* Нейро-иммуно-эндокринная ось у людей пожилого возраста с разным качеством жизни // *Российский иммунологический журнал*. 2015. Т. 9. № 2. С. 198–200.
- Гайдышев И. П.* Моделирование стохастических и детерминированных систем: рук-во пользователя программы AtteStat. Курган, 2015. 484 с.
- Горбань А. Н., Манчук В. Т., Петушкова Е. В.* Динамика корреляций между физиологическими параметрами при адаптации и эколого-эволюционный принцип полифакториальности // *Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем*. Л.: Гидрометеиздат, 1987. Т. 10. С. 187–198.
- Горбань А. Н., Смирнова (Петушкова) Е. В.* Эффект группового стресса и Корреляционная адаптометрия. 2018. URL: <http://adaptometry.narod.ru/Index.htm> (дата обращения: 10.01.2019).
- Горбань А. Н., Смирнова Е. В., Чеусова Е. П.* Групповой стресс: динамика корреляций при адаптации и организация систем экологических факторов. Красноярск: Вычислительный центр СО РАН, 1997. Рукопись деп. в ВИНТИ 17.07.97, № 2434В97. 54 с.
- Кобзарь А. И.* Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2006. 816 с.
- Разжеввайкин В. Н., Шпитонков М. И.* Корреляционная адаптометрия. Модели и приложения к биомедицинским системам // *Математическое моделирование*. 2008. Т. 20. № 8. С. 13–27.
- Седов К. Р., Горбань А. Н., Петушкова Е. В. и др.* Корреляционная адаптометрия как метод диспансеризации населения // *Вестник АМН СССР*. 1988. № 10. С. 69–75.
- Смирнова Е. В.* Математическое моделирование адаптации к экстремальным условиям, эффект группового стресса и корреляционная адаптометрия: дис. ... д-ра физ.-мат. наук. Красноярск, 2000. 273 с.

- Шитиков В. К., Розенберг Г. С.* Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. Тольятти: Кассандра, 2013. 289 с.
- Яхно Н. Н., Штульман Д. П.* Болезни нервной системы: рук-во для врачей. М.: Медицина, 2005. 452 с.
- Abdi H., Williams L. J.* Jackknife // Encyclopedia of Research Design (Neil Salkind ed.). Thousand Oaks: Sage, 2010. P. 1–10. DOI: 10.4135/9781412961288.n202
- Brodin P., Davis M. M.* Human immune system variation. // Nat. Rev. Immunol. 2017. Vol. 17, № 1. P. 21–29. DOI: 10.1038/nri.2016.125
- Calder P. C.* Immunological parameters: what do they mean? // J. Nutr. 2007. Vol. 137. P. 773S–780S. DOI: 10.1093/jn/137.3.773S
- Cañavate M. L., García de Galdeano A., Arteaga O. et al.* Cross-talk between nervous and immune systems: cytokines modulating morphology and function of both systems under stress conditions // Microscopy: advances in scientific research and education. 2014. Vol. 1. P. 414–421.
- Canty A., Ripley B.* boot: Bootstrap R (S-Plus) functions. R package version 1.3–20. 2017. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/boot/boot.pdf> (дата обращения: 20.09.2018).
- Efron B., Tibshirani R.* An Introduction to the Bootstrap. N. Y.: Chapman and Hall/CRC, 1993. 456 p.
- Efron B., Tibshirani R.* Improvements on cross-validation: the .632+ bootstrap method // J. of the Am. Statistical Association. 1997. Vol. 92, № 438. P. 548–560. DOI: 10.2307/2965703
- Epel E. S., Lithgow G. J.* Stress biology and aging mechanisms: toward understanding the deep connection between adaptation to stress and longevity // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2014. Vol. 69. Suppl.1: S10–6. DOI: 10.1093/gerona/glu055
- Gorban A. N., Smirnova E. V., Tyukina T. A.* General Laws of Adaptation to Environmental Factors: from Ecological Stress to Financial Crisis // Math. Model. Nat. Phenom. 2009. Vol. 4, № 6. P. 1–53. DOI: 10.1051/mmnp/20094601
- Gupta D., Morley J. E.* Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging // Compr. Physiol. 2014. Vol. 4, № 4. P. 1495–1510. DOI: 10.1002/cphy.c130049
- Li R., Yin S., Zhu X., et al.* Linking Inter-Individual Variability in Functional Brain Connectivity to Cognitive Ability in Elderly Individuals // Front. Aging Neurosci. 2017. Vol. 21. P. 385. DOI: 10.3389/fnagi.2017.00385
- Miller R. G.* Beyond ANOVA: Basics of Applied Statistics. N. Y.: Chapman and Hall/CRC, 1997. 336 p.
- Miller R. G.* The Jackknife — A Review // Biometrika. 1974. V. 61, № 1. P. 1–15. DOI: 10.2307/2334280
- O'Hara R., Schroder C. M., Mahadevan R. et al.* Serotonin transporter polymorphism, memory and hippocampal volume in the elderly: association and interaction with cortisol // Mol. Psychiatry. 2007. Vol. 12, № 6. P. 544–555. DOI: 10.1038/sj.mp.4001978
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Austria, Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. URL: <https://www.R-project.org> (дата обращения: 20.09.2018)

- Rogers L. K., Lucchesi P. A.* Stress adaptation and the resilience of youth: fact or fiction? // *Physiology* (Bethesda). 2014. Vol. 29, № 3. P. 156. DOI: 10.1152/physiol.00017.2014
- Sokal R. R., Rohlf F. J.* Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. N. Y: Freeman & C°, 1995. 850 p.
- Taub D. D.* Neuroendocrine Interactions in the Immune System. // *Cell Immunol.* 2008. Vol. 252, № 1–2. P. 1–6. DOI: 10.1016/j.cellimm.2008.05.006
- ТрХ — A drawing tool for Windows. 2018. URL: <https://ctan.org/tex-archive/graphics/tpx> (дата обращения: 20.09.2018)
- Wagner K. H., Cameron-Smith D., Wessner B.* Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology // *Nutrients.* 2016. Vol. 8. № 6. Pii: E338. DOI: 10.3390/nu8060338
- Yoshioka K.* KyPlot — A user-oriented tool for statistical data analysis and visualization. *Computational Statistics.* 2002. V. 17, № 3. P. 425–437.
- Zimmerman D. W., Zumbo B. D., Williams R. H.* Bias in estimation and hypothesis testing of correlation // *Psicologica.* 2003. Vol. 24. P. 133–158.
- Zhou X. H., Dinh P.* Nonparametric confidence intervals for the one and two-sample problems // *Biostatistics.* 2005. Vol. 6, № 2. P. 187–200. DOI: 10.1093/biostatistics/kxi002

Metaorganism. Stress and adaptation

(Synopsis)

Microbial associations — the integral of all eukaryotes (Introduction)

Alexandra L. Burmistrova

An analysis of the data is presented, allowing to consider the metaorganism as an integral complex, including communities of many cells and genes, metabolic images and informational signals, various forms of life: macroscopic (eukaryotic) — human, and microscopic (prokaryotic). Both partners live a complex social life, each in their own sensory world, and develops various forms of intelligent processes (Steinert, 2014), and, therefore, demonstrate their lifestyle — within the microbial community (microbe-microbe) and between partners — microbe / host.

Since stress is life (K. Butcher, I. M. Lorel), then a modern look at the key aspects of the intestinal stress response and inflammatory response necessary for inducing adaptation to the stressor is presented. In addition, two types of protective strategies that ensure the survival of the host followed by the restoration of homeostasis, resistance and tolerance, are discussed.

In conclusion, data are presented that allow for a new look at the core principle of modern biology, combining the concept of individuality with the concept of congruence. Despite the new «omics» technologies, we are still facing the “mystery of the Sphinx” — what is a metaorganism, whether it has a symbiosis of boundaries, or is it a form of life, or is it life itself.

Chapter 1. Antibiotics as a selection factor of antibiotic resistant bacterial strains

Nailya E. Khaidarshina, Larisa I. Bakhareva

Antibacterial compounds are toxic stressors of pathogens and representatives of the normobiota of the human body, acting on them during the treatment of the infectious process. These compounds cause a disastrous effect associated with inhibition of the synthesis of vital components of the cell (peptidoglycan, proteins, nucleic acids) or

disruption of the cytoplasmic membranes. Adaptive response of bacteria to such toxic stressors is 5 biochemical mechanisms: the synthesis of enzymes, inactivating the molecule of the antibiotic, decrease the permeability of the external structures of the cell, the active removal of the antibiotic molecule from the cell, modification of the target of action of drugs, the formation of metabolic shunt. Genetic determinants of resistance mechanisms occur in bacterial cells either spontaneously, which is rare, or are acquired during horizontal transport in the process of communication effects. The rate of spread of antibiotic resistance genes depends on the selective pressure of antibiotics on the bacterial population. The principal differences in the dynamics of the ratio of sensitive and resistant microorganisms in the clinical inpatient and outpatient environment, as well as in natural conditions were established. In the course of our study, significant differences in the frequency of antibiotic-resistant strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* were found in patients who had been in the surgical hospital for a long time.

Chapter 2. **Adaptation to stressors. Protective strategies against microbes — resistance and tolerance as a biological property**

Section 2.1. **Model of the interaction of the host and the pathogen as a response to the stress of the microorganism in opportunistic candidiasis**

Natalya E. Samyshkina

Many years of research by G. Selye, his co-workers and followers around the world confirm that stress is the nonspecific basis of many diseases, because the pathogenesis of any disease is inevitably accompanied by adaptation reactions. Vulvovaginal candidiasis (VVC) is an opportunistic infection of the mucous membranes of the lower genital tract, most often caused by polymorphic fungi *Candida albicans*.

We have examined mycocidal responses of peripheral blood leukocytes (PBL) of the host in relation to *C. albicans* in the acute form (debut) of VVC and chronic forms of VVC with rare and frequent relapses.

The following results were obtained: the high proinflammatory cytokine potential of the extracellular medium of PBL is characteristic of the acute form of VVC; the mild proinflammatory cytokine potential of the environment is — for chronic forms of VVC with rare and frequent relapses. Attaching a concomitant mixed infection (the presence of bacterial vaginal associates in etiologically significant titers) in the debut of the VVC is accompanied by a decrease in the pro-inflammatory cytokine potential of the extracellular medium of PBL compared with candidal mono-infection. The addition of a concomitant

mixed infection in chronic recurrent forms of vaginal candidiasis is accompanied by an increase in the pro-inflammatory cytokine potential of the extracellular environment compared with a candidal mono-infection.

Section 2.2. Variations of the microbial signature of the small intestine in the psychophysical adaptation of the elderly

Yuliya Yu. Filippova

Aging is a natural and multi-factorial phenomenon characterized by the accumulation of degenerative processes that can undermine the body's adaptive capacity, causing changes in the endocrine, nervous, immune systems and human intestinal microbiota. On the other hand, the intestinal microbiota is capable of influencing virtually all functions of the body, including acting as a modulator of brain plasticity, its cognitive functions, and the person's overall behavior during aging. In the work, using the method of gas chromatography — mass spectrometry of microbial markers, the microbial signature of the small intestine in elderly people with different levels of psychophysical adaptation was evaluated. It was shown that the predominant microorganisms of the small intestine, regardless of age, were bacteria of phylum *Firmicutes*, represented mainly by *Clostridium clusters* and *Streptococcus spp.* In aging, there was a deficit in the total number of microorganisms in the small intestine, compared with the same indicator of young individuals. This deficit was due to a significant decrease in the number of the main representatives of probiotic strains — microorganisms of the genus *Bifidobacterium spp.* Variations in the composition and quantity of microorganisms in the small intestine of the elderly with different levels of psychophysical adaptation are reflected in the change in the structure of the microbial community. It has been established that the structure of the microbial community of small intestinal of young individuals (based on the assessment of paired correlation coefficients) is highly stable. This stability is provided by a small number of weak interactions between microorganisms of different phylums, with a predominance of competitive relations, which allows the human body to control the number of bacteria through the immune system. For elderly with a high level of psychophysical adaptation (the Active Longevity group), there is a maximum degree of cooperation (a large number of positive correlations) between the main members of the microbial community of the small intestine, which leads to an increase in the metabolic efficiency of microorganisms. This, we believe, can serve as one of the mechanisms of adaptation to changes occurring in the ecological niche — the human body, in the aging. The structure of the small intestine microbiota of elderly with severe psychophysical disadaptation (the Charity group) is based on the negative correlations of the genus *Bifidobacterium spp.* Such a restructuring of the community: a sharp decrease in the number and strengthening of the competitive relations of bacteria of the genus *Bifidobacterium spp.* may reflect the state of psychophysical disadaptation in the elderly.

Section 2.3. Microbial patterns of the small intestine of children with autism spectrum disorders in the context of the presence or absence of social adaptation

*Alexandra L. Burmistrova, Yuliya Yu. Filippova,
Arina V. Timofeeva*

In recent years, Autism Spectrum Disorders (ASD) are causing interest of various specialists in the field of biomedicine. These disorders could be assumed to be a model for the disorganization of the congruent relationships of the basic regulatory systems of metaorganism — intestinal microbial community, immune and neuroendocrine systems. This is not by chance, because ASD are characterized by a variety of deficiencies that indicate changes / disorders of neurodevelopment, among which the most pronounced, are difficulties in social communication / adaptation, and which are most comorbidity with many other diseases, especially those with disorders of the gastrointestinal tract. As a result, children with ASD are characterized by heterogeneity of clinical symptoms and a generalized diagnosis, including children with a slow neurodevelopmental trajectory and limited social adaptation, as well as children with functional disorders and diseases of the central nervous system. The study assessed microbial assemblies of various phylum / genera / species, organizing patterns of microbial communities of the small intestine of typically developing children (TD) and children with ASD in the context of the presence / absence of social adaptation. Differences in microbial assemblies that create patterns of microbial communities of TD children and children with ASD, regardless of the level of social adaptation, are established.

Two groups of children with ASD who have varying degrees of severity of social adaptation are attracted attention: the presence of social adaptation (SC) and the heterogeneous group — regress (weak social contact / lack of it), which are demonstrated by alternative in the number of correlation relationships patterns of microbial communities small intestine. Group SC is characterized by the minimum number, without the dominant role of representatives of various genera / species, which probably indicates the functional immaturity / passivity of microbial assemblies. The regression group is the saturation of correlation links with a pronounced dominance of various representatives, which, as can be supposed, demonstrates the instability of the assembly of microbes, i. e. “Chaos” of mutual relations, preceding the establishment of order at a new level — “order from chaos”.

Such approach, we believe, allows to consider the patterns of microbial communities not only as a diagnostic sign, although there are clear differences between TD children and children with ASD, but also as pathological features of children with ASD, with different levels of basic symptom — insufficiency of social adaptation.

Section 2.4. Microorganisms as selection factor in human populations (on the example of TLR genes)

Alexander V. Evdokimov

Infectious diseases, as one of the leading causes of death throughout the history of mankind, have had a significant impact on it. In the course of epidemics of high-virulent infections, natural selection took place, which influenced the genes of the immune system, especially the genes of cell receptors that primarily recognize the components of microorganisms, including toll-like receptors (TLR) genes. This selection led to an increase in the frequency of a number of single-nucleotide polymorphisms modulating the functional activity of the corresponding TLR. There were selected TLR genes allele variants, which provide adaptive advantages, contributing to better survival for the population on a certain territory and in certain infectious conditions (epidemic of a particular strain of infectious agent). As a result, TLR gene patterns typical for human populations inhabiting a certain territory were formed. In this section the features of natural selection acting on toll-like receptors by infectious agents are discussed. On the example of the Chelyabinsk Region major populations the analysis of a number of TLR genes single-nucleotide polymorphisms, causing functional changes in these receptors and having adaptive significance in high mortality epidemics, is conducted.

Section 2.5. Selection of human populations by microbes (on the example of population differences in genes of HLA I, II classes)

Tatyana A. Suslova, Michail N. Vavilov, Elena B. Khromova

The section is devoted to studying of population differences in the genes of the main histocompatibility complex in the main ethnic groups of the Chelyabinsk region.

The ethnogenesis of populations of certain areas occurs under the constant influence of various factors, one of them is the microbial environment. Differences in lifestyle, traditional methods of treatment, migration from areas endemic for infections, epidemics and pandemics have influenced to selection of genes, able to quickly and precisely trigger the immune response. HLA genes code for glycoproteins that bind peptides and present them to T cell receptors and interact with other molecules involved in innate and adaptive immunity. One of responsible for triggering the immune response is the system of the main histocompatibility complex, in particular the HLA system. The main function of which is the presentation of antigens to T-lymphocytes followed by activation of the mechanisms of adaptive immunity for the elimination of the pathogen. The unusually high degree of polymorphism HLA is in the regions encoding the antigen-binding pocket of the HLA

molecule. So, HLA polymorphism is correlated with pathogen diversity. Pathogen-driven selection at HLA now has theoretical and empirical support. Pathogen-driven selection could drive adaptive HLA alleles to higher frequencies, and thus cause an increase in population differentiation. It has been proven that HLA genes experience a balancing natural selection in favor of heterozygotes. HLA heterozygotes have an evolutionary advantage over homozygotes due to the broader repertoire of pathogen receptors. Thus, the pressure of selection on the genetic region of HLA leads to the fact that the population establishes specific frequency of allelic variants of HLA genes and haplotypes, including extended haplotypes, alleles and SNP mapped in areas beyond the HLA genes.

This chapter presents the data of a long-term study of the Department of Microbiology, Immunology and General Biology of CSU on the population diversity of the HLA in various ethnic groups currently living in the Chelyabinsk Region. The basic patterns of the distribution of HLA genes and haplotypes in various ethnic groups (Russians, Tatars, Bashkirs) that populated the territory of the Chelyabinsk region in different time intervals are presented. We have characterized the HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 profiles of three major ethnic groups living in Chelyabinsk Region of Russian South Urals, viz., Russians ($n = 1352$), Bashkirs ($n = 272$) and Tatars ($n = 252$). First field level typing was performed by PCR using sequence-specific primers. Estimates included carriage and gene frequencies, linkage disequilibrium and its significance and related values. Population comparisons were made between the allele family frequencies of the three populations and between these populations and 20 others using a cluster analysis. Chelyabinsk Region Russians demonstrate all the features typical of a Europeans population, also have some peculiarities. Together with Tatars, Russians have high frequencies of allele families and haplotypes characteristic of Finno-Ugric populations. This presupposes a Finno-Ugric impact on Russian and Tatar ethnogenesis. However, this was not apparent in Bashkirs, the first of the three populations to live in this territory, and implies admixture with populations of a Finno-Ugric origin with precursors of Russians and Tatars before they came to the South Urals. The Bashkirs appear close to Asians in allele and haplotype distribution. However, Bashkirs cannot be labelled either as typical Asians or as Europeans. Thus, Bashkirs possess some alleles and haplotypes frequent in Asians, which supports the Turkic impact on Bashkir ethnogenesis, but also possess the AH 8.1 haplotype, which could evidence an ancient Europeans population that took part in their ethnic formation or of recent admixture with adjacent populations (Russians and Tatars). Bashkirs showed no features of populations with a substantial Finno-Ugric component, for example Chuvashes or Russian Saami. This disputes the commonly held belief of a Finno-Ugric origin for Bashkirs. Tatars appeared close to many European populations. However, they possessed some characteristics of Asiatic populations possibly reflecting a Asians influence on Tatar ethnogenesis. Some aspects of HLA in Tatars appeared close to Chuvashes and Bulgarians, thus supporting the view that Tatars may be descendents of ancient Bulgars.

Section 2.6. Genetic polymorphism of the cytokine system in human disadaptation on the example of inflammatory bowel diseases

Daria S. Stashkevich, Svetlana V. Belyaeva

Influencing the human organism, excessive stress factors could cause various kinds of diseases, in particular inflammatory bowel diseases (Crohn's disease, ulcerative colitis) and irritable bowel syndrome. Adverse environmental factors, affecting the commensal microbiota, lead to changes in the stability of the microbiocenosis and the number of species composition. As a result, the altered microbiota and its metabolic products serve as autoantigens, leading to a loss of host tolerance, as a result of which a state of chronic inflammation characterized by cytokine imbalance could develop. The study of the role of cytokines in various pathological conditions of man formed the basis for the emergence of the theory of cytokine-mediated diseases. According to this theory, endogenous cytokines can cause symptoms of pathological changes in the organs, have a damaging effect on the tissue. Currently, the number of diseases in whose etiopathogenesis cytokine molecules are involved is increasing. As disease models for evaluating the immunogenetic component, common diseases are chosen — irritable bowel syndrome, ulcerative colitis.

Monocus analysis showed the significance of the polymorphic loci of the -174 G/C IL-6 genes for IBS and -238 G/A TNFA for UC according to the dominant inheritance model. Using the method of reducing the multifactor dimension allowed us to establish the optimal models of intergenic interactions of cytokine genes: for IBS, a three-component model $IL1\beta (+3953) * T / TNFA (-308) * A / IL6 (-174) * G$; the model is based on the ancestral allele $-174 * G\text{ IL-6}$; for UC, the two-component model $TNFA (-863) * A / TNFA (-238) * A$, the highly productive $TNFA (-863)*A$ allele is most significant in this model. Cytokine genes, along with a number of other biologically active molecules, are involved in the genetic regulation of the adaptive response of the human organism to stress reactions. Carriers of «unsuccessful» combinations of cytokine genes in response to the trigger effect of adverse factors may be more susceptible to multifactorial diseases, including irritable bowel syndrome and nonspecific ulcerative colitis.

Section 2.7. **Morphofunctional characteristics of the cellular elements of the system of mononuclear phagocytes of the offspring of mothers with experimental lesions of the hepatobiliary system**

Gennady V. Bryukhin

The effect of experimental damage of the hepatobiliary system of the mother on the content and morphofunctional state of the cellular elements of the mononuclear phagocyte system of different compartments in the offspring during different periods of the postnatal period was studied. To achieve this aim, sexually mature female rats were used to simulate chronic liver damage of various etiologies, including autoimmune, cholestatic, toxic, mesenchymal, alcoholic, and drug.

It was established that in experimental animals progeny are born with reduced content of tissue macrophages (peritoneal, alveolar, hepatic and peripheral blood monocytes) and their dysfunction, as evidenced by a decrease in their migration, adhesion, lysosomal and phagocytic activity.

In general, the obtained results allow us to conclude that prenatal stress, caused by experimental damage to the liver of various origins, leads to an imbalance in the structural and functional formation of the cellular elements of the mononuclear phagocyte system in the offspring.

Chapter 3. **Correlation adaptometry and stress: questions of statistical analysis (on the example of the interaction estimation of the immune and neuroendocrine systems in the psychophysical adaptation of the elderly)**

Denis Yu. Nokhrin, Yuliya Yu. Filippova

Correlation adaptometry (CA) is a scientific direction in Russian biology, medicine, and bioinformatics, which studies the formation of relations in biological systems and their change under, when applying the stress factors. The main indicator in CA is the weight of the correlation graph (WCG) — the sum of the absolute values of the correlation coefficients between all the analyzed traits. With the growth of adaptation costs in the population in response to stress, WCG usually increases, but the techniques for statistical comparison of WCG's in the samples are not developed.

On the example of indicators of the immune and neuroendocrine systems in the elderly, the work addresses the issues of statistical data analysis in CA. It is shown that in order to increase accuracy, reliability and comparability of adaptation levels and stress

estimates in CA, it is necessary to abandon the use of the threshold value when calculating the WCG, also it is preferable to use the Spearman correlation and average absolute correlation instead the Pearson correlation and WCG. It has been established that due to the strong bias of the estimate and the asymmetry of the distribution, the WCG function is inconvenient for interval estimation by resampling techniques (bootstrap, jackknife). In the case of using normalizing WCG data transformations, it is preferable to use the jackknife technique, which suits the nature of the data used in CA, and is also convenient for detecting potential outliers and making comparisons between groups. Several variants of sample comparisons in CA were considered: 1) comparison of confidence intervals, 2) the use Monte Carlo randomization procedure, and 3) ANOVA of jackknife pseudo-values.

It has been shown that the methodology of CA can be successfully applied to analyze the interaction of the main regulatory systems: nervous, endocrine and immune, when the organism adapts to various stressful conditions, including aging and the development of age-related diseases. A statistically significant increase in WCG was found in the group of elderly people with cognitive impairment. To stimulate research in the field of CA, applications with a set of original data and a code of the statistical software environment R for all the methods considered in the work are included.

Научное издание

МЕТАОРГАНИЗМ. СТРЕСС И АДАПТАЦИЯ

Коллективная монография

*Под редакцией доктора медицинских наук,
профессора А. Л. Бурмистровой*

Издается в авторской редакции

*Вёрстка М. В. Трифионовой
Идея обложки Д. Ю. Нохрина.
Макет обложки Е. С. Меньшениной*

Подписано в печать 10.09.19.
Формат 70×100 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 19,4. Уч.-изд. л. 17,0.
Тираж 500 экз. Заказ 340.
Цена договорная

Челябинский государственный университет
454001 Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129

Издательство Челябинского государственного университета
454021 Челябинск, ул. Молодогвардейцев