

# Проект научно-исследовательской работы «Метагеномы\* фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи» (НИР1).

Песляк Михаил Юрьевич,  
Антипсориатическая Ассоциация «ЕСТЕСТВЕННЫЙ ПУТЬ»

## Оглавление

1. Введение.....	3
1.1. Псориатическая болезнь.....	3
1.2. Модели патогенеза и предпосылки НИР1 .....	3
2. Метагеномное секвенирование .....	5
2.1. Метагеном крови .....	5
2.2. Метагеном кожи.....	10
2.3. Фагоциты кожи в норме и при псориазе .....	15
2.4. Комплексное изучение метагеномов фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи .....	16
3. Цели и задачи НИР1 .....	17
4. Приложения .....	21
4.1. Виды бактерий, предполагаемые псоразными. ....	21
4.2. Пептиды – потенциальные Y-антигены.....	22
4.3. Сравнительные характеристики 16S и WMS-тестов.....	23
4.4. Порядок подготовки и выполнения WMS-теста цельной крови (фагоцитов крови), поиск корреляций с PASI .....	26
4.5. Алгоритм разделения MPPS на фракции .....	28
4.5.1. Переопределение принадлежности фракции М путем повторного картирования на референсные штаммы .....	28
4.5.2. Разделение обновленной общей фракции М на нерезидентную и смешанную. ....	28
4.6. Точные и оценочные параметры метагеномов фагоцитов крови и кожи. ....	30
4.7. Ресурсы по метагеномным исследованиям и секвенированию. ....	32
4.8. Дополнительная информация (ссылки на файлы) .....	32
5. Иллюстрации (слайды).....	33
6. Библиография.....	36

---

\* Метагеном – совокупность всех phDNA (нехозяйских DNA, т.е. в данной НИР - не принадлежащих человеку), содержащихся в биоматериале.

## Принятые сокращения

Краткое	Полное (либо English)	Примечание
<b>ЖКТ</b>	Желудочно-кишечный тракт	
ЗП	Здоровая Персона	
<b>ИЭМК</b>	Интегральная Электронная Медицинская Карта.	
Метагеном		Совокупность всех nhDNA (нехозяйских DNA, т.е. в данной НИР - не принадлежащих человеку), содержащихся в биоматериале.
ПБ	Псориатическая болезнь	
ПП	Псориатический пациент	
<b>СИБР</b>	Синдром избыточного бактериального роста	Превышение микробного присутствия над нормой и/или присутствие патогенов в биоматериале. В качестве биоматериала могут быть мазки, соскобы со слизистой или аспират.
СВНД	Стерильный вариант низкомикробной диеты	См. ссылку на источник в Приложении 4.8.
<b>bacDNA</b>	Bacterial DNA	Бактериальная ДНК
<b>Buffy coat</b>	<a href="#">Лейкоцитарная пленка</a>	Фракция лейкоцитов и тромбоцитов, образующаяся при фракционировании цельной крови между эритроцитами и плазмой.
IB-Y		Межпептидные мостики (Interpeptide bridges) пептидогликана <i>Str.pyogenes</i> : (L-Ala)(2-3) или (L-Ser)-(L-Ala)
hDNA	Host DNA (Human DNA)	Хозяйская ДНК (в данной НИР – человеческая)
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide (endotoxin)	Липополисахарид (эндотоксин)
MPB	Metagenome of phagocytes from blood	Совокупность всех nhDNA (в том числе bacDNA), содержащихся в фагоцитах крови.
MPPS	Metagenome of phagocytes from psoriatic skin	Совокупность всех nhDNA (в том числе bacDNA), содержащихся в фагоцитах псориатической кожи.
nhDNA	Non-host DNA (Non-human DNA)	Любая нехозяйская ДНК (бактериальная, архейная, грибковая, гельминтная, вирусная, фаговая и т.д.)
PsB	Psoragenic bacteria	Виды бактерий предполагаемые псориагенными (с пептидогликаном PG-Y)
PG	Peptidoglycan	Любой пептидогликан (в т.ч. PG-Y)
PG-Y		Пептидогликан A3alpha, содержащий межпептидные мостики IB-Y (но может содержать и другие также).
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular patterns	Патоген-ассоциированные молекулярные структуры (в частности LPS, PG и (1,3)-beta-D-глюкан) ( <a href="#">Fukui 2016</a> ) (слайд <a href="#">PAMP_TLR_NOD</a> ).
РАМР-немия	PAMP-nemia	Повышенная кРАМР-нагрузка на фагоциты крови. Повышенный уровень (концентрация) кРАМР в крови. Главные кРАМР (key PAMP) это PG и LPS.
SPP	Systemic psoriatic process	Системный псориатический процесс (основа Y-модели патогенеза) ( <a href="#">Песляк 2012-1</a> )
WMS	Whole metagenome sequencing (shotgun)	Полное метагеномное секвенирование (методом «дробовика»).

**Жирным** шрифтом выделены общепринятые сокращения.

## 1. Введение

### 1.1. Псориатическая болезнь

Самообновление эпидермиса происходит постоянно - в базальном слое рождаются новые клетки, созревают, и, меняясь, мигрируют наружу, образуют внешний роговой слой, а затем отмирают и отслаиваются. В норме для участков кожи средней толщины срок жизни клеток (срок полного обновления) эпидермиса составляет 20-25 дней. При псориазе самообновление ускоряется, жизнь клеток длится 4-10 дней. Мигрирующие наружу клетки не успевают сформироваться и не вполне функциональны. Псориатические бляшки имеют красный оттенок, легко ранимы, из-за интенсивного отмирания клеток покрыты белыми чешуйками, значительно утолщены.

Псориаз (psoriasis) не заразен, имеет различные типы: пятнистый (L40.0- vulgaris or plaque), интертригинозный (L40.83-4 - flexural or inverse), эритродермический (L40.85 - erythrodermic), пустулезный (L40.1-3, L40.82 - pustular), каплевидный (L40.4 - guttate). Коды болезней даны по классификатору ICD-10. Наиболее распространен пятнистый псориаз (более 80% от общего числа случаев), при этом до 15% псориатиков имеют псориатический артрит (L40.5 - psoriatic arthritis).

Псориазом болеют около 2% населения земного шара (~150 млн.чел.), ежегодно в мире им впервые заболевают ~5 млн. человек. Заболевание возникает сразу после рождения, в подростковом или зрелом возрасте и даже в глубокой старости, а затем сопровождает больного всю жизнь, самопроизвольно или благодаря лечению ослабляясь, а затем вновь рецидивируя. Тяжелый псориаз может привести к инвалидности, от спровоцированных им болезней в мире ежегодно погибают до 10 тысяч человек. Течение псориаза одинаково у мужчин и женщин, реже он возникает у афроамериканцев, индейцев, китайцев и японцев и вовсе не поражает эскимосов.

На слайдах [Patient Stat-C](#) и [Patient Stat-R](#) представлена статистика заболеваемости псориазом по странам согласно ([Michalek 2017](#), фрагмент Таблицы 3), которые дополнены статистикой для США за 2004 г. для ПП старше 18 лет ([Vanderpuye 2015](#)). Экономические данные, связанные с расходами на лечение псориаза и убытками по нетрудоспособности регулярно подсчитываются в развитых странах. Так в этом же детальном исследовании ([Vanderpuye 2015](#)) выполненном для США указано, что на 5,3 миллионов ПП старше 18 лет, которые проживали на начало 2013 г. (около 2,2% населения) ежегодное экономическое бремя составляло \$35,2 млрд., из них \$12,2 млрд. составляли расходы на здравоохранение. Т.е. в среднем на одного ПП ежегодные расходы составляли \$6592, из них \$2307 на здравоохранение. В других работах, посвященных этой теме, суммы ежегодных расходов на лечение псориаза в США аналогичны.

Псориаз зарегистрирован в базе данных человеческих генов и генетических заболеваний под номером OMIM\*177900. Предрасположенность к псориазу передается по наследству - однояйцевые близнецы проявляют 70% конкордантность, при наличии псориаза у одного из родителей вероятность заболевания ребенка составляет 15-25%, у обоих родителей – 40-60%. Доказана взаимосвязь аллели HLA-Cw\*0602 (хромосома 6p21) с псориазом первого типа, характеризующегося ранним началом. Носителями этой аллели являются более 60% ПП (среди ЗП - не более 15%). Более слабые взаимосвязи установлены для локусов других хромосом. При этом только генетических отклонений для начала и поддержания псориаза недостаточно - необходимо воздействие со стороны внешней среды. Инфекции, травмы кожи, стрессы, реакция на лекарственные препараты, климатические изменения и другие причины могут спровоцировать начало болезни или рецидив ([Песляк 2012-1](#)).

Псориаз нередко сочетается с системными заболеваниями, включая метаболический синдром, сахарный диабет II типа, ишемическую болезнь сердца, артериальную гипертензию, патологию гепатобилиарной системы. В принятых недавно в РФ «*Федеральных клинических рекомендациях по ведению больных псориазом*» ([Федеральные 2015](#)) даны подробные рекомендации по применению топических препаратов, фототерапии, системных ретиноидов и иммуносупрессивных средств.

Эти рекомендации направлены на снижение внешних проявлений псориаза, но не на устранение причин его возникновения и поддержки.

### 1.2. Модели патогенеза и предпосылки НИР1

Есть несколько моделей патогенеза псориатической болезни (ПБ), но ни одна из них не является общепринятой. Системные модели (BF-модель, Y-модель) описаны в ([Baker 2006b](#), [Песляк 2012-2](#)) локальные GL-модель, GK-модель, N-модель и TC-модель) в ([Gilliet 2008](#), [Guttman-Yassky 2011](#), [Perera 2012](#), [Tonel 2009](#)). Сравнительный анализ перечисленных моделей выполнен в ([Песляк 2012-2](#)).

Основанием для проведения НИР1 является информация, содержащаяся в работах ([Wang 1999](#), [Okubo 2002](#), [Munz 2010](#), [Peslyak 2012](#), [Гумаюнова 2009а](#), [Гумаюнова 2009b](#), [Гумаюнова 2009с](#)). Повышенная колонизация пристеночной биопленки тонкой кишки бактериями (тонкокишечный СИБР) может играть важную роль в патогенезе псориазической болезни (ПБ) ([Baker 2006b](#), [Песляк 2012-2](#)).

Здесь и далее термин «тонкокишечный СИБР» используется для обозначения синдрома избыточного бактериального роста пристеночной микрофлоры на любом участке (участках) или на всем протяжении слизистой тонкой кишки.

Фрагменты бактериальных продуктов тонкокишечных бактерий содержат в себе PAMP: липополисахарид (LPS), пептидогликан (PG) и, в частности, специфический пептидогликан (PG-Y). При повышенной макромолекулярной проницаемости тонкой кишки ([Короткий 2005](#), [Харьков 2008](#), [Харьков 2006](#), [Харьков 2005](#)) эти бактериальные продукты попадают в системный кровоток, формируют хронически повышенный уровень PAMP в крови и хронически повышенную PAMP-нагрузку на фагоциты крови.

Специфический пептидогликан PG-Y содержит Y-антиген, т.е. пептид, который включает в себя межпептидные мостики (L-Ala)-(L-Ala) и/или (L-Ser)-(L-Ala). Такие мостики присутствуют почти у всех видов *Streptococcus*, у *Enterococcus faecalis*, а также у многих видов из родов *Leuconostoc* и *Weissella* (слайды [PG PsB-1](#) и [PG PsB-3](#)). Такие виды предполагаются пораженными ([Baker 2006a](#), [Baker 2006b](#), [Песляк 2012-1](#), [Песляк 2012-2](#)), всюду далее они обозначены PsB.

PAMP-нагрузка (в первую очередь синергичная PG- и LPS-нагрузка) действует на фагоциты крови, активируя их. Часть активированных фагоцитов толеризуется и образует фракцию толеризованных фагоцитов крови. В толеризованных фагоцитах понижен уровень протеинов, ответственных за деградацию эндцитированных бактериальных продуктов, поэтому они оказываются носителями антигенного материала. Совокупность перечисленных подпроцессов, приводящая к появлению в системном кровотоке фракции толеризованных фагоцитов - носителей специфического антигенного материала, названа системным псориазическим процессом SPP.

Толеризованные фагоциты крови (моноциты Мо-Т и дендритные клетки DC-Т) приобретают хемотатус аналогичный неактивированному и поэтому могут быть привлечены к местам воспалений в любые ткани и, в частности, в дерму. Эти моноциты и дендритные клетки, будучи привлеченными в воспаленную дерму, под воздействием цитокинов перепрограммируются и превращаются в зрелые дендритные клетки. Некоторые из них (моноциты Мо-Р и дендритные клетки DC-Р) содержат Y-антигены. Зрелые дендритные клетки, образованные из Мо-Р и DC-Р, презентируют Y-антигены специфическим Т-лимфоцитам. Таким образом инициируется и поддерживается ложный приобретенный ответ на мнимую PsB-инфекцию, одним из последствий которого является гиперпролиферация кератиноцитов (слайды [SPP](#) и [Y-model](#)).

Подробное обоснование и описание системной Y-модели патогенеза, а также обзор других моделей патогенеза содержится в ([Песляк 2012-1](#), [Песляк 2012-2](#)).

Согласно результатам культуральных проксимальных СИБР-тестов один или несколько из предполагаемых пораженных видов в подавляющем большинстве случаев обнаруживаются в тонкокишечной микрофлоре, взятой в зоне связки Трейца у ПП (слайд [SIBO Moscow](#)). Если исследовались два (или более) биоматериала, то указано максимальное значение. Большая часть обследований выполнена в НМХЦ им. Н.И.Пирогова в 2013-5 гг. (результаты обследований предоставлены ПП).

Эти и другие факты дают основания предполагать, что системная Y-модель патогенеза точнее других описывает причины возникновения и поддержки ПБ.

В рамках НИР1 предполагается получить новые факты в поддержку гипотез Н2, Н3 и Н10, лежащих в основе Y-модели патогенеза (слайды [SPP hypothesis](#), [Local hypothesis](#)). И, если эта поддержка будет значимой, то и проведение НИР2 станет целесообразно.

В рамках НИР2 каждый ПП пройдет детальное обследование, которое позволит назначить индивидуальный режим, целью которого будет избирательная элиминация обнаруженных пораженных и/или патогенных бактерий из пристеночной тонкокишечной микрофлоры и нормализация МПК. В рамках НИР2 также предполагается получить новые факты в обоснование гипотез Н1, Н2, Н3.

Инициатором НИР1 и НИР2 является [Антипсориазическая Ассоциация «Естественный путь»](#). Она представляет интересы большой группы ПП, а также врачей и исследователей.

## 2. Метагеномное секвенирование

### 2.1. Метагеном крови

Исследования наличия *bacDNA* в крови ПП и ЗП начались еще в прошлом веке. В работе ([Wang 1999](#)) исследовалась плазма крови пациентов с псориатическим артритом, у 9 из 19 ПП было показано присутствие *bacDNA* *Streptococcus pyogenes*, *Str. agalactiae* и *Str. pneumoniae*.

В работе ([Okubo 2002](#)) по нескольким праймерам для 16S rRNA определялось присутствие *bacDNA* внутри моноцитов крови у 15 ПП и 12 ЗП. Было обнаружено, что у ПП оно существенно выше (в 1,5-2 раза), чем у ЗП (*bacDNA* была обнаружена у всех ПП и ЗП). Метод не позволял определить принадлежность *bacDNA* конкретным видам (родам или типам) бактерий. Авторы предположили, что основным источником *bacDNA* является кишечная микрофлора.

В работе ([Munz 2010](#)) с помощью 16S-теста определялось присутствие *bacDNA* в плазме периферической крови 20 ПП и 12 ЗП, она была обнаружена у всех ПП и ни у одного ЗП. У 17 ПП обнаруженная *bacDNA* была определена как принадлежащая бактериям из родов *Streptococcus* или *Staphylococcus* (слайд [Blood Psor](#)).

В краткой заметке ([Ramírez-Boscá 2015](#)) сообщено, что *bacDNA* обнаружена у 16 из 54 ПП и не обнаружена ни у одного из 27 ЗП, метод обнаружения отличался от стандартного.

Тот факт, что *bacDNA* не обнаруживалась в плазме крови у ЗП, а часто и у большей части ПП, (а исследования цельной крови не проводились) делал затруднительными какие-либо утверждения о роли ее присутствия в крови в патогенезе ПБ. Но в последние годы произошло усовершенствование техники исследований: методы элиминации *hDNA*, повышение точности и достоверности результатов при обнаружении малых количеств и самое главное феноменальное снижение стоимости WMS-тестов. Перечислим наиболее существенные результаты таких работ.

В работах ([Amar 2013](#), [Amar 2011](#)) подводились итоги длительного исследования, в котором участвовало более 5 тыс. человек. Главной целью этого исследования был поиск причин и условий, способствующих развитию диабета. Инициатором данной работы была [D.E.S.I.R. Study Group](#). В широкий спектр обследований, которые проводились в течение 9 лет (с интервалом в 3 года) был включен количественный 16S-тест лейкоцитов крови. Была отлажена методика получения *bacDNA* с максимальной концентрацией в образце. В работе ([Amar 2011](#)) выполнено сравнение результатов для пациентов с диабетом и без него, в работе ([Amar 2013](#)) для пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и без них. В работе ([Amar 2011](#)) для небольшой части пациентов с диабетом (n=14) и контрольной группы без него (n=28) были выполнены качественные 16S-тесты, которые позволили определить относительное присутствие бактерий с точностью до рода.

В работе ([Dinakaran 2014](#)) было обследовано 80 пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и 40 ЗП. В качестве биоматериала использовалась плазма крови. Для всех применен 16S-тест, а для 3 пациентов и 3 ЗП дополнительно WMS-тест.

В работе ([Sato 2014](#)) было обследовано 50 пациентов с диабетом 2-го типа и 50 ЗП. С помощью 16S RT-PCR теста изучалась микрофлора фекалий и плазмы крови с применением ограниченного набора праймеров (для 21 вида, рода или типа бактерий). 16S RT-PCR тест плазмы крови был качественный (да/нет), присутствие *bacDNA* в плазме крови было зафиксировано у 14 пациентов и 2 ЗП. Поиск корреляций между родами бактерий, обнаруженных в фекалиях и крови, не проводился.

В работе ([Yun 2016](#)) были обследованы 78 постоперационных пациентов и 10 ЗП. Выполнялся WMS-тест для плазмы крови, параллельно выполнялся культуральный посев (слайд [Blood WMS and Culture](#)). Определялось присутствие *hDNA* (бактерии с точностью до вида, грибки и вирусы), картирование выполнялось на референсные каталоги [NCBI Genome](#). Большинство ридов было картировано на человеческий геном (в среднем 95,6%), из оставшихся менее 1% было картировано на геномы конкретных бактерий, грибов или вирусов.

В работе ([Païssé 2016](#)) был выполнен 16S-тест цельной крови, а также ее фракций у 30 ЗП (доноров) на предмет обнаружения bacDNA. Применен метод, разработанный и опробованный авторами ранее ([Lluch 2015](#)). Оказалось, что bacDNA обнаруживается у **всех** ЗП (слайд [Blood-bacDNA](#)), а также, что большая ее часть содержится в лейкоцитарной пленке, т.е. во фракции лейкоцитов и тромбоцитов (93.7%), меньшая - в эритроцитах (6.2%) и плазме крови (0.03%). Главным образом это bacDNA Gram(-) бактерий типа [Proteobacteria](#) (87%) и [Bacteroidetes](#) (классы [Sphingobacteriia](#), [Bacteroidia](#) и [Flavobacteriia](#)) (2,5%), но также преимущественно Gram+ бактерии типов [Actinobacteria](#) (6,7%), [Firmicutes](#) (класс [Bacilli](#)) (3%). Это исследование не ставило целью установить источники происхождения bacDNA в крови, и поэтому осталось неясным живые или деградированные бактерии, оказавшиеся в крови, были источником обнаруженной bacDNA, каким образом bacDNA была связана с лейкоцитами и тромбоцитами, а так же откуда бактерии и/или бактериальные продукты, содержащие bacDNA, попали в кровь.

Отметим, что концентрация 16S, обнаруженная в плазме крови ( $1.4 \cdot 10^4$  шт/мл в среднем), имеет один порядок, с концентрацией 16S, обнаруженной в контрольном тесте одного из реагентов ( $1.5 \cdot 10^4$  шт/мл). Достаточную достоверность имеют результаты для цельной крови, поскольку концентрация 16S составила от  $1.8 \cdot 10^7$  до  $7.6 \cdot 10^7$  шт/мл ( $4 \cdot 10^7$  шт/мл в среднем) в зависимости от ЗП. Это соответствует  $10^6$ - $10^7$  шт/мл bacDNA (ибо в геноме одной бактерии содержится от 1 до 15 копий гена 16S). На один лейкоцит приходилось в среднем около 5 копий гена 16S (конечно они преимущественно содержались в фагоцитах).

Результаты исследования с точностью до рода представлены только для основных патогенов: [Acinetobacter](#)  $\sim 6 \cdot 10^5$  шт/мл; [Corynebacterium](#)  $\sim 4 \cdot 10^6$  шт/мл, [Escherichia](#) или [Shigella](#)  $\sim 1.5 \cdot 10^5$  шт/мл (16S-тест не различает эти два рода), [Pseudomonas](#)  $\sim 1.5 \cdot 10^6$  шт/мл, [Staphylococcus](#)  $\sim 1.7 \cdot 10^5$  шт/мл, [Stenotrophomonas](#)  $\sim 2.3 \cdot 10^5$  шт/мл. Указана концентрация 16S в среднем, обнаруженная в лейкоцитарной пленке (из расчета на 1 мл цельной крови). Род [Shewanella](#)  $\sim 10^4$  шт/мл обнаружен только в плазме ([Païssé 2016](#), рис. S3).

Авторы предполагают, что основным источником поступления bacDNA в кровь является кишечная микрофлора. И действительно распределение bacDNA по типам аналогично выявленному в биоптатах слизистой тонкой кишки, взятых в зоне связки Трейца у ЗП ([Li 2015](#)). Более высокая суммарная концентрация bacDNA в крови (по сравнению с другими исследованиями) предположительно связана с тем, что ЗП являлись донорами и, возможно, перед сдачей крови, как положено донорам, завтракали. Известно, что прием пищи влечет быстрый рост тонкокишечной просветной и пристеночной микрофлоры, что в свою очередь вызывает временный рост (почти в 100 раз) поступления бактериальных продуктов в системный кровоток ([Ciampolini 1996](#)).

В работе ([Lelouvier 2016](#)) был применен метод ([Lluch 2015](#)) для 16S-тестов лейкоцитарной пленки (пациенты в Испании) и цельной крови (пациенты в Италии). Каждая из групп пациентов была разделена на две части (нет или есть фиброз). Венепункция выполнялась после 12-часового воздержания от пищи. Были обнаружены существенно меньшее (по сравнению с [Païssé 2016](#)) число копий 16S для групп без фиброза – около  $2,4 \cdot 10^3$  шт/мл и в 1,5-2 раза больше копий для групп с фиброзом.

В работе ([Grumaz 2016](#)) были обследованы следующие три группы: пациенты с сепсисом (n=60), пациенты, перенесшие полостную операцию (n=30) и ЗП (n=30). Изучалась DNA, свободно находящаяся в плазме крови (cellfree DNA). Ее концентрация была определена с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (LifeTechnologies). Затем выполнялся WMS-тест, аналитически исключались риды, принадлежащие hDNA, остальные риды картировались с точностью до вида с применением [NCBI RefSeq](#) (референсной геномной БД) (слайд [Blood-Germany](#) – для части пациентов). В результате были получены как относительные, так и абсолютные значения (концентрации) присутствия nhDNA.

В работе ([Gyarmati 2016](#)) были обследованы только пациенты с подозрением на сепсис (n=9). Изучалась nhDNA в цельной крови. Перед секвенированием было выполнено последовательное обогащение биоматериала. Вначале был применен [MolYsis Complete5 kit](#). С помощью этого набора последовательно выполняется следующее: а) в образце разрушаются все хозяйские клетки крови (большинство нехозяйских клеток при этом не затрагиваются); б) нехозяйские клетки выделяются из образца; в) нехозяйские клетки разрушаются и выделяется nhDNA.

Затем для образцов, полученных в результате такой подготовки, было выполнено дополнительное обогащение nhDNA путем снижения концентрации hDNA ([NebNext microbiome enrichment](#)). Затем был выполнен WMS-тест, после чего аналитически исключены риды, принадлежащие hDNA (79%), остальные риды картировались с точностью до вида с применением [NCBI Genome](#). Удалось картировать только 0,07% ридов. Была обнаружена nhDNA бактерий, вирусов и грибов в корреляции с состоянием пациентов.

В работе ([Gosiewski 2017](#)) были обследованы 62 пациента с сепсисом и 23 ЗП, с помощью 16S-теста изучалась цельная кровь, были получена информация об относительном присутствии bacDNA с точностью до рода. Техника выделения DNA из цельной крови основана на собственном исследовании ([Gosiewski 2014](#)). Дополнительно были проведены тесты с NTC (no template control), которые показали спектр возможного загрязнения образцов.

Краткое описание перечисленных выше исследований сведено в [Таблицу 1](#). Следует обратить внимание, что концентрация bacDNA (nhDNA) определялась только в 6-ти из перечисленных работ и, как следует из другой таблицы (Excel-файл Параметры-примеры, лист «nhDNA in blood», ссылка в подразделе 4.8) имеет место достаточно большой разброс результатов. Частично это объясняется следующими различиями: подготовкой перед сдачей крови (обязательная еда у доноров, 12-ти часовой период без еды у большинства групп пациентов); фракциями (цельная кровь, лейкоциты, лейкоцитарная пленка); методами экстракции DNA ([Psifidi 2015](#)); 16S или WMS-тестами секвенирования; алгоритмами обработки ридов, методами измерения (оценки) концентрации bacDNA (nhDNA). На сохранность nhDNA, содержащейся в фагоцитах крови на момент забора крови, безусловно влияет время и условия хранения и транспортировки, а также предварительной обработки перед выделением DNA. Фагоциты крови (до тех пор, пока они не разрушены) продолжают деградацию ранее эндоцитированных бактериальных продуктов (в т.ч. nhDNA). Темп этой деградации зависит от многих факторов (транспортной среды, температуры и т.д.).

На результаты также может влиять контаминация (одного или нескольких реагентов, случайная и др.), подробнее об этом в работе ([Glassing 2016](#)), которая полностью посвящена этой проблеме и содержит обоснованную критику некоторых из перечисленных выше работ. В [Таблице 1](#) для каждой из них есть примечание о том, осуществлялся ли контроль контаминации (если в публикации нет информации об этом, то предполагается, что такого контроля не было). При выполнении НИР1 контролю за уровнем контаминации и принятию мер для максимального снижения этого уровня должно быть уделено особое внимание.

В рамках задачи 1 предполагается выполнить несколько стандартных биохимических тестов по определению уровня PAMP-немии (задачи 1.6 и 1.7). Биоматериал – цельная кровь или цельная кровь после разрушения клеток. Это один из стандартных тестов для определения концентрации LPS: [LAL-тест](#) (Limulus Amebocyte Lysate с подавлением влияния (1,3)-beta-D-глюкана на результат) или [ЕАА-тест](#) (Spectral Medical Inc.) ([Ishihata 2013](#)). (Задача 1.6). Этот тест позволит определить Q6 - концентрацию LPS стандартным проверенным методом и сравнить с ее с суммарной концентрацией bacDNA Gram(-) видов (задача 3.2). А также определение Qs - суммарной концентрации PG и (1,3)-beta-D-глюкана [SLP-теста](#) ([доп.](#)) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) и Qg – концентрации (1,3)-beta-D-глюкана в биоматериале с помощью одного из стандартных тестов: [Fungitell](#) (Cape Cod, Inc.), [Endosafe-PTS glucan assay](#) (Charles River Laboratories International, Inc.), [Fungus \(1-3\)-β-D-Glucan Assay](#) (Dynamiker Biotechnology Co., Ltd.) или [Goldstream Fungus \(1-3\)-β-D-glucan](#) (Era Biology Group) (Задача 1.7) ([Barreto-Berqter 2014](#), [Wright 2011](#)). Это позволит определить Q7 (через Qs и Qg) - концентрацию PG стандартными проверенными методами и сравнить с ее с суммарной концентрацией bacDNA Gram+ видов (задача 3.3). Также можно будет сравнить Qg с суммарной концентрацией грибковой nhDNA. Результаты этих тестов позволят дополнить и уточнить информацию, полученную с помощью WMS-тестов, а также определить их корреляцию с тяжестью проявлений ПБ по PASI. Ранее для псориаических пациентов выполнялся только LAL-тест ([Гараева 2007](#)), (слайд [LPS PG](#)).

В дополнение к задаче 3.1 ([Таблица 3](#)) предполагается оценить суммарную концентрацию в крови bacDNA бактерий, содержащих TLR4-активный LPS (задача 3.2). Это возможно сделать, определив одновременное присутствие КО (KEGG ортологов) бактериальных генов типа IpxL ([K02517](#)) и IpxM ([K02560](#)) в геномах Gram(-) видов. Эти гены отвечают за [биосинтез LPS](#) в Gram(-) бактериях, которые обладают максимальной TLR4-активностью ([Gnauck 2016](#)). В результате может быть выявлена корреляция между суммарной концентрацией в крови bacDNA TLR4-активных Gram(-) бактерий и тяжестью ПБ. ([Fukui 2016](#)).

В дополнение к задаче 3.3 ([Таблица 3](#)) предполагается определить и сравнить суммарную концентрацию КО (KEGG ортологов) бактериальных генов типа murM (K12554) и murN (K05363), содержащихся в геномах Gram+ видов (Задача 3.4). Это можно выполнить так, как было выполнено для пациентов с атеросклерозом, когда в метагеноме кишечной микрофлоры было выявлено превышение над нормой КО (KEGG ортологов), ответственных за [биосинтез пептидогликана](#) ([Karlsson 2012](#)). Таким образом, во-первых может быть дополнен и откорректирован список видов бактерий, предполагаемых псориагенными (слайд [PG PsB-3](#)). А во-вторых - выявлена возможная корреляция между суммарной концентрацией в крови bacDNA бактерий, предполагаемых псориагенными, и тяжестью ПБ.

Задачи 3.2 и 3.4 невозможно выполнить с помощью 16S-теста (сравнительные характеристики 16S-теста и WMS-теста перечислены в [Таблице 4](#)). Следовательно, в рамках НИР1 предстоит выполнять WMS-тесты. WMS-тест применялся ранее для определения hDNA только в плазме крови ([Grumaz 2016](#), [Gyarmati 2016](#), [Yun 2016](#)), причем предварительная элиминация hDNA не проводилась. Однако предварительная элиминация успешно применялась в других работах ([Archer 2010](#), [Fitting 2012](#), [Opota 2015](#), [Song 2014](#), [Yigit 2016](#)) и может быть также применена в рамках НИР1.

Метод, реализованный в тест-наборе [NebNext Microbiome DNA Enrichment](#), описан и изучен в работах ([Feehery 2013](#), [Yigit 2016](#)). Обогащение достигается связыванием hDNA и ее последующей элиминацией (при этом также может быть частично связана и элиминирована DNA некоторых видов бактерий). В работе ([Feehery 2013](#)) было изучено обогащение нескольких искусственных биоматериалов (смеси hDNA и bacDNA E.coli в разных пропорциях), а также двух образцов слюны и одного образца крови. Для образцов слюны обогащение было успешным. % hDNA снизился приблизительно в 20 раз (элиминировалось 94-96% hDNA), а % картированных ридов bacDNA увеличился в среднем в 8 раз. При этом относительное содержание bacDNA видов обогащенного образца вполне соответствовало исходному (за исключением bacDNA видов, обнаруженных только в обогащенном образце и видов с малым относительным присутствием) (диаграмма для R2, рис.6 из [Feehery 2013](#)). Нормированное отклонение для видов, присутствующих в количестве более 0,5%, составило 0,413 (R1) и 0,079 (R2).

Обогащение образца крови дало сомнительный (по мнению авторов статьи) результат по причине очень малого абсолютного присутствия bacDNA, а также возможной его контаминации.

В работе ([Yigit 2016](#)) содержится подробный протокол выполнения этого тест-набора.

В тест-наборе [LOOXSTER® Enrichment Kit](#) реализован метод обогащения PureProve, основанный на связывании существенной части бактериальной и грибковой DNA и последующей элиминации всего остального. Метод основан на различной частоте присутствия в DNA фрагментов, с которыми происходит связывание (бактерии: 1:50, грибы: 1:160, человек: 1:2200). В результате обогащения элиминируется существенная часть hDNA, вирусная DNA, а также некоторая часть несвязанной бактериальной и грибковой DNA, причем доля элиминированной DNA сильно зависит от рода (вида) бактерий. Наиболее подробно тест-набор изучен в работе ([Glassing 2015](#)). В качестве образцов использована подслизистая часть биоптатов тонкого кишечника, содержащая высокий % хозяйских клеток (4 образца). Концентрация hDNA после обогащения снизилась в среднем в 2,4 раза, количество копий 16S увеличилось в среднем в 3,4 раза. Нормированное отклонение для родов, присутствующих в количестве более 0,5%, составило для 4-х образцов: 0,6, 0,53, 0,31, 0,73 (в среднем 0,54) (диаграмма для образца 4 приведена на рис.3, [Glassing 2015](#)). Авторы статьи признают, что нарушение относительного присутствия bacDNA в образце после обогащения неизбежно.

Метод LOOXSTER также применялся и в других исследованиях, но в них не выполнялась качественная оценка эффекта обогащения на естественных образцах (иногда осуществлялась проверка на искусственно созданной смеси hDNA и bacDNA).

В Excel-файле Параметры-Примеры (лист «EHD») содержится сводка и оценка результатов обогащения биоматериалов, выполненного этими двумя тест-наборами (Приложение 4.8).

В целом можно сделать вывод о преимуществах тест-набора NebNext Microbiome DNA Enrichment по сравнению с LOOXSTER® Enrichment Kit. Окончательный выбор предстоит сделать с учетом возможности реализовать выполнение этих тест-наборов в рамках НИР1.

Проведение контрольных тестов (no template control), оценка уровня и спектра возможной контаминации и достоверности полученных результатов обязательны ([Glassing 2016](#)).

Подробная информация содержится в Приложении 4.4. С учетом планов по комплексному изучению метагеномов фагоцитов крови и фагоцитов псориазической кожи (Раздел 2.4) в качестве исходного биоматериала предполагается использовать фагоциты крови, а не цельную кровь.



Таблица 1. Исследования метагенома крови. Сводка.

Пациенты	Биоматериал	Тест	Определение концентраций, PMID	Контроль контаминации	nhDNA (в частности bacDNA)	Работа (год, страна), примечания
ПП (псориазные пациенты) и ЗП						
19 ПП	Плазма	16S	нет	да	bacDNA у 9 из 19 ПП	<a href="#">Wang 1999</a> (USA), ПП с псориазным артритом
15 ПП, 12 ЗП	Моноциты	16S	нет	да	bacDNA у всех.	<a href="#">Okubo 2002</a> (Japan). Относительный уровень у ПП существенно выше, чем у ЗП
20 ПП, 12 ЗП	Плазма	16S	нет	да	bacDNA у всех ПП, ни у одного из ЗП.	<a href="#">Munz 2010</a> (UK). Слайд <a href="#">Blood_Psor.</a>
54 ПП, 27 ЗП	Плазма	нст	нет	?	У 16 из 54, ни у одного из ЗП.	<a href="#">Ramírez-Boscá 2015</a> (Spain), нст- метод нестандартный. Краткая заметка
Неспсориазные пациенты и/или ЗП						
3280 человек	Лейкоциты	16S	да, 21976140	нет	bacDNA	<a href="#">Amar 2011</a> (France), количественный 16S. Качественный 16S был выполнен только для 42 человек. Общий контингент с ( <a href="#">Amar 2013</a> ), в т.ч. с диабетом.
3936 человек	Лейкоциты	16S	да, 23372728	нет	bacDNA	<a href="#">Amar 2013</a> (France), оценка концентрации только Eubacteria и Proteobacteria phylum в целом. Общий контингент с ( <a href="#">Amar 2011</a> ), в т.ч. с сердечно-сосудистыми заболеваниями.
80 пациентов и 40 ЗП	Плазма	16S и WMS	да, 25133738	да, NTC	bacDNA у всех	<a href="#">Dinakaran 2014</a> (India), WMS-тест был выполнен для 3 пациентов и 3 ЗП
50 пациентов, 50 ЗП	Плазма	16S RT-PCR	нет	нет	bacDNA у 14 из 50 пациентов, у 2-х из 50 ЗП	<a href="#">Sato 2014</a> (Japan), Пациенты с диабетом 2-го типа. Тесты плазмы крови выполнялись в дополнение к тестам фекалий. Использовался ограниченный набор праймеров.
78 пациентов и 10 ЗП	Плазма	WMS	нет	нет	nhDNA у всех	<a href="#">Yun 2016</a> (China), пациенты постоперационные, изучалась вся nhDNA, выполнялся культуральный посев. Слайд <a href="#">Blood_WMS_and_Culture.</a>
30 ЗП	Цельная кровь и 3 фракции	16S	да, 26865079	да, NTC	bacDNA у всех	<a href="#">Paissé 2016</a> (France), ЗП – доноры (предположительно сдавали кровь после еды). Повышенную концентрацию bacDNA, обеспечил метод ( <a href="#">Lluch 2015</a> ). Слайд <a href="#">Blood-bacDNA.</a>
2 группы пациентов (Испания – 37, Италия – 71)	Фракция ВС и цельная кровь	16S	да, 27639192	нет	bacDNA у всех	<a href="#">Lelouvier 2016</a> (France), каждая из двух групп пациентов была разделена на две части (без фиброза, с фиброзом). ВС - Buffy coat (лейкоцитарная пленка)
30 ЗП, 90 пациентов	Плазма	WMS	да, 27368373	да	nhDNA у всех	<a href="#">Grumaz 2016</a> (Germany), изучалась вся nhDNA, пациенты с сепсисом и постоперационные. Также выполнялся культуральный посев. Слайд <a href="#">Blood-Germany.</a>
9 пациентов	Цельная кровь	WMS	нет	да	nhDNA у всех	<a href="#">Gyarmati 2016</a> (Sweden), перед секвенированием было выполнено последовательное обогащение (Molysis, NebNext). Изучалась вся nhDNA. Концентрация определялась только для cfDNA.
62 пациента и 23 ЗП	Цельная кровь	16S	нет	да	bacDNA у всех	<a href="#">Gosiewski 2017</a> (Poland), пациенты с сепсисом, техника выделения DNA основана на собственном исследовании ( <a href="#">Gosiewski 2014</a> ).
Проект НИР1						
15 ПП	Фагоциты крови (альтернативно – цельная кровь)	WMS	да	да	nhDNA у всех	(2017, Russia), забор крови через 3 часа после еды, предварительная элиминация nhDNA, вся nhDNA. Аналогичные тесты фагоцитов псориазных биоптатов. Их комплексное изучение.

Данные по концентрациям bacDNA представлены в таблице (Excel-файл «Параметры-примеры», лист «nhDNA in blood», столбец «PMID», ссылка на файл в подразделе 4.8).

## 2.2. Метагеном кожи

Микрофлора нормальной и псориатической кожи исследовалась и сравнивалась неоднократно, хорошо известно, что *Staphylococcus aureus*, *Malassezia Species*, *Candida Albicans* в псориатических пятнах обнаруживаются чаще нормы, что, как правило, усугубляет воспалительный процесс ([Alekseyenko 2013](#), [Fry 2016](#), [Fry 2013](#), [Gao 2008](#), [Фомина 2009](#)). Также известно, что у ПП инфекция здоровой кожи, затронувшая дерму, может вызвать появление псориатического пятна (эффект Кебнера). В некоторых случаях устранение инфекции с псориатического пятна может привести к его ослаблению и даже к постепенному исчезновению. Однако полное исчезновение происходит весьма редко. Ни один из кожных бактериальных патогенов не рассматривается в качестве основной причины инициации и поддержки псориатических высыпаний. Все они рассматриваются как триггеры (провокаторы инициации) и/или как факторы усугубляющие тяжесть псориатического пятна.

Метагеном кожи в норме, а также при различных ее заболеваниях последние 10 лет активно изучается. В большей части работ в качестве биоматериала использовали мазок или соскоб, биоптат изучался только в двух работах ([Fahlen 2012](#), [Nakatsuji 2013](#)). WMS-тесты применялись только для мазков или соскобов.

В работе ([Gao 2008](#)) исследовалось присутствие *bacDNA* в мазках, взятых с кожи у ЗП и ПП. У ПП мазки брались с видимо здоровой кожи и с псориатических пятен. Была применена аналитическая обработка результатов 16S-теста, позволяющая интерпретировать OTU с точностью до вида (метод SLOTU). У 6 ПП было взято 19 мазков (13 с псориатических пятен и 6 - с видимо здоровой кожи). Всего было обнаружено 1925 клонов (2038 – у ЗП). На основании 98%-идентичности 1841 клон (95,6%) был картирован на 6 типов, 86 родов или 189 видов. Доля *Propionibacterium sp.* оказалась ниже на псориатических высыпаниях (~2,9%) чем у ЗП (~21%;  $p < 0,001$ ) (на видимо здоровой коже ПП ~12,3%). И наоборот - доля *Streptococcus sp.* была выше (~15,2%) на псориатических пятнах ( $p < 0,001$ ), чем у ЗП (~7,1%) (на видимо здоровой коже ПП ~3,4%). Самый высокий % среди *Streptococcus sp.* обнаруженных у ПП, оказался у *Str.mitis* (~5,6%) и *Str.salivarius* (~2,3%). А *Str.pyogenes* вообще не был обнаружен. Концентрации не определялись. Авторы предположили, что отличия в кожной микрофлоре могут иметь отношение к патогенезу ПБ, однако не сформулировали никаких гипотез.

В работе ([Фомина 2009](#)) исследовалось присутствие как HPV (PCR-тест), так и бактериальной микрофлоры (культуральный посев) в мазках ПП. DNA HPV обнаруживается в 87% образцов ПП, и только в 44% образцов ЗП ( $p < 0,001$ ). Определялась вирусная нагрузка  $HPVL = \lg((\text{кол-во DNA HPV}) / (10^5 \text{ клеток человека}))$ . Оказалось, что  $HPVL < 2$  для 40% HPV+образцов ПП и для 83% HPV+ЗП,  $2 < HPVL < 3$  для 45% HPV+ образцов ПП и для 17% HPV+ ЗП и  $HPVL > 3$  для 15% HPV+образцов ПП и для 0% HPV+ЗП. Т.е. оказалось, что HPVL для ПП достоверно выше, чем для ЗП. Также было показано, что HPVL достоверно ниже для ПП в стадии ремиссии по сравнению со стадией ухудшения. Увеличение HPVL в псориатической коже коррелирует с нарушениями микрофлоры, в частности существенно увеличивается количество *S.aureus*.

В работе ([Fahlen 2012](#)) впервые 16S-тест (переменные области V3-V4) был применен для исследования биоптатов кожи. Они (диаметр 2 мм) были взяты у 10 ПП и у 12 ЗП. ПП не получали местное лечение в течение двух недель, а также ультрафиолет или системное лечение в течение месяца до этого. Результаты сгруппировались в 19 типов, 265 таксонов и 652 OTU с 97%-идентичностью. Тремя наиболее распространенными типами у ЗП и ПП были Firmicutes (39% у ПП, 43% у ЗП), Proteobacteria (38% у ПП, 27% у ЗП) и Actinobacteria (5% у ПП, 16% у ЗП). *Streptococcus sp.* оказался хорошо представлен у ПП (32% - обнаружен во всех биоптатах) и у ЗП (26%), *Staphylococcus sp.* был менее представлен у ПП (5%), чем у ЗП (16%) (слайд [Skin-bacDNA](#)).

В двух публикациях ([Alekseyenko 2013](#), [Statnikov 2013](#)) содержится подробный анализ результатов 16S-тестов мазков большого контингента ПП (n=54) и ЗП (n=112). Все образцы удалось разделить на два кластера, представляющие несколько отличающиеся микробные сообщества. Микробиота псориатических высыпаний преимущественно оказалась в кластере Firmicutes и Actinobacteria, а микробиота кожи ЗП – в кластере Proteobacteria. Когда у части ПП с тех же высыпаний спустя несколько месяцев (во время которых проводилось лечение псориаза) мазки были взяты повторно, то принадлежность этому же кластеру сохранилась.

Также было обнаружено, что в псориатических образцах (по сравнению с ЗП) увеличена доля суммарного присутствия родов *Corynebacterium*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* и, наоборот,

уменьшена доля родов *Cupriavidus*, *Flavisolibacter*, *Methylobacterium* и *Schlegelella*. Интересно, что величина доли порядка *Acidobacteria* Gp4 положительно коррелировала с PASI. Никаких выводов о связи обнаруженных корреляций с патогенезом ПБ авторы не сделали.

В работе ([Jagielski 2014](#)) было исследовано только грибковое присутствие в мазках, взятых у 6 ПП, 6 ЗП и 6 АД-пациентов (с атопическим дерматитом). *Malassezia sympodialis* оказался преобладающим видом (82.9%), обнаруженным во время культивирования 29 образцов. У АД-пациентов были обнаружены исключительно виды *M. sympodialis*, а виды *M. furfur* были обнаружены только у ПП. *M. sympodialis* чаще обнаруживался у АД-пациентов и ЗП, чем среди ПП. Конкордантность между фенотипическими и молекулярными методами была высокой (65%). Все виды *Malassezia* были восприимчивы к cyclopiroxolamine и azole, однако виды *M. furfur*, были нечувствительны к большему количеству лекарственных препаратов, чем другие.

В работе ([Takemoto 2015](#)) также исследовалось только грибковое присутствие (образцы брались пинцетом или на специальную повязку) у 12 ПП и 12 ЗП. Было получено 317806 качественных последовательностей, которые соответствовали 142 родам грибов. У ПП обнаруживалось большее разнообразие родов, но меньшая доля *Malassezia* (46,9%) по сравнению с ЗП (76%). *Malassezia* был самым богатым типом и для ПП и для ЗП. Отношение долей *Malassezia globosa* к *Malassezia restricta* было ниже у ПП, чем у ЗП. В этом, как и в предшествующих исследованиях, не было обнаружено никакой корреляции между присутствием каких-либо родов грибов и PASI.

В диссертационной работе ([Tanes 2015](#)) проанализированы результаты, полученные для ПП в рамках Human Microbiome Project (Приложение 4.7.). На основании результатов 16S-тестов для 155 мазков с помощью [QIIME](#) и [PICRUST](#) были изучены основные гены микробиома ПП (их перечень и количество определялось программно). Также изучались значимые изменения в хозяйских генах, осуществлялся поиск взаимосвязей. Работа интересна своим подходом, в рамках которого на основе ограниченной информации, которую дает 16S-тест, смоделирован и изучен генный состав микробиома.

Детальные обзоры выше перечисленных и ряда других (более ранних и менее значимых) исследований кожной микробиоты при псориазе выполнены в двух недавних работах ([Fry 2016](#), [Yan 2017](#)).

Далее рассмотрим несколько работ, в которых изучался микробиом кожи ЗП и/или при других заболеваниях (помимо псориаза). Причем либо изучались биоптаты, либо применялось WMS-тестирование.

В работе ([Nakatsuji 2013](#)) исследовалось присутствие bacDNA в кожных биоптатах (n=11). Биоптаты были получены следующим образом. Постхирургическая здоровая кожа очищалась стерильным скальпелем, а затем стерилизовалась тампоном. После этого с помощью 6 мм панча осуществлялся забор биоптата на глубину 2-3 мм - так, чтобы в него попадали эпидермис, дерма и часть жировой ткани, расположенной под дермой.

После чего биоптат в стерильных условиях был разделен на слои толщиной 30-50 микрон, которые затем по отдельности прошли 16S-тест. Результаты были сгруппированы по 4-м отделам: эпидермис, фолликулярная дерма, дерма и жировая ткань (adipose tissue). Оказалось, что bacDNA присутствует не только в эпидермисе и фолликулярной дерме, но в нижележащих слоях дермы (которые не содержат фолликулы и потовые железы) и в жировой ткани (слайд [Derm-16S-1](#)).

Относительное присутствие bacDNA представлено с точностью до порядка (order) в таблице (в дополнительных материалах к статье) и с точностью до класса (class) на диаграмме (слайд [Derm-16S-2](#)). Определение абсолютного присутствия (концентраций) было выполнено для нескольких характерных бактерий (*Propionibacterium acnes*, *Staph. epidermidis* и *Pseudomonas* sp.) в дополнительных 16S-тестах со специфическими праймерами. Бактерии рода *Pseudomonas* sp. (входит в семейство *Pseudomonadaceae*) были обнаружены в среднем в фолликулярной дерме - 4200 КОЕ/мм<sup>3</sup>, а в дерме, которая не содержит фолликулы, - 500 КОЕ/мм<sup>3</sup>.

Согласно результатам ([Fahlen 2012](#)) 16S-тестов для контрольной группы здоровых пациентов (n=13) бактерии из семейства (family) *Pseudomonadaceae* составляют 2% от общего числа обнаруженных (слайд [Skin-bacDNA](#)). Другие работы, в которых изучалось бы бактериальное присутствие в биоптатах кожи методами метагеномного секвенирования, на данный момент отсутствуют ([Ferretti 2017](#)). Сравнивая результаты ([Fahlen 2012](#)) и ([Nakatsuji 2013](#)) для этого семейства можно оценить диапазон концентраций дермальной bacDNA в норме от 500/0,02 до 4200/0,02 КОЕ/мм<sup>3</sup>, т.е. от  $2,5 \cdot 10^4$  до  $2,1 \cdot 10^5$  КОЕ/мм<sup>3</sup> ([Табл.5](#)).

В работе ([Bouslimani 2015](#)) с помощью 16S-теста для двух ЗП впервые была изучена биогеография распределения кожной микрофлоры (мазки с 400 участков для каждого из ЗП). На слайде [Skin Bacteria 3D](#) представлено 3D-распределение для родов *Streptococcus* и *Staphylococcus*.

В работе ([Oh 2014](#)) впервые было выполнено систематическое WMS-тестирование мазков с человеческой кожи, взятых на различных участках (15 ЗП, 18 участков с различными микросредами - сухая, влажная, сальная, ноготь пальца ноги и т.д. – слайды [Skin-WMS-18-1](#) и [Skin-WMS-18-2](#)). Выполнялось картирование на следующие референсные БД: National Center for Biological Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Human Microbiome Project (HMP, <http://www.hmpdacc.org>), Saccharomyces Genome Database (SGD, <http://www.yeastgenome.org>), Fungal Genome Initiative (FGI, <http://www.broadinstitute.org>), FungiDB (<http://fungidb.org>), также был применен неререференсный метод. Определены сообщества микроорганизмов, включая DNA-вирусы, грибки, бактерии, в т.ч. подвиды и штаммы доминирующих бактерий. Показано, как функциональные способности сообщества микроорганизмов зависят от локализации участка на теле, создан мультидоменный каталог генов кожных микроорганизмов. Идентифицированы кластеры метагеномных видов, не имеющих референса. Показано, что биогеография и индивидуум в значительной степени определяют функциональные и таксономические характеристики сообществ микроорганизмов. Всего было изучено 263 мазка (9 мужчин, 6 женщин). Количество хозяйской DNA составило от 19,4% (внутренний эпителий ноздри) до 98,2% (пятка) ридов. Качество ридов и эффективное покрытие зависели от участков (от 38% до 81%). Всего было получено и проанализировано 289 Gbp ([giga base pairs](#)) отфильтрованных ридов pHNA. Основные исходные данные и итоговые результаты опубликованы и свободно доступны [в формате Excel](#).

В работе ([Hannigan 2015](#)) впервые было проведено сравнительное WMS-тестирование виroma и полного метагенома кожи (16 ЗП, мазки с 8 контралатеральных участков). Для изучения виroma биоматериал вначале был очищен от всего, кроме вирусных частиц, из которых затем была извлечена DNA (оптимизированный метод обогащения). Картирование осуществлялось с применением собственных и существующих программных продуктов. Показано, что как виром, так и полный метагеном сильно зависят от микросреды (т.е. от конкретных участков кожи). В виrome были преимущественно обнаружены гены умеренных фагов. Спейсеры CRISPR, обнаруженные в бактериальных геномах, частично позволили обосновать сосуществование фагов и бактерий в сообществах (как правило с большим содержанием *Corynebacterium* sp.), а также биогеографию фагов. Такое детальное изучение виroma кожи ранее было невозможно из-за малой концентрации вирусной pHNA в и на коже. Однако современные методы секвенирования, работающие с ультрамалыми количествами (< 1 ng) DNA, сделали возможным это исследование.

В работе ([Chng 2016](#)) были обследованы 39 человек (19 AtD+ - пациентов с историей атопического дерматита, 15 ЗП SPT(-) - с отрицательным скарификационным тестом и 5 ЗП SPT+ - с положительным скарификационным тестом). У каждого брались два мазка (с правой и левой локтевых складок - antecubital fossae) с применением [D-Squame Standard Sampling Discs](#) (метод tape-stripping). Результат двух WMS-тестов усреднялся. Для нескольких пациентов дополнительно был выполнен 16S-тест, что позволило сравнить его результаты с результатами WMS-теста и показать преимущества WMS-теста.

Авторы отметили семь родов и девять видов, по которым отличия между группами обследуемых оказались наиболее значимыми. На слайде [Skin-AtD-WMS-genus](#) представлены результаты для родов *Streptococcus* sp. и *Gemella* sp. (повышенная представленность по сравнению с контролем) и *Demacoccus* sp. (пониженная представленность по сравнению с контролем). Среди девяти видов – три вида альфа-гемолитических стрептококков. Большинство видов, присутствие которых у AtD+ пациентов повышено, являются комменсалами или условными патогенами ВДП.

Для родов *Streptococcus* sp. и *Staphylococcus* sp. изучена представленность по видам (слайды [Skin-AtD-WMS-Strep](#), [Skin-AtD-WMS-Staph](#)), а для патогенного вида *Staphylococcus aureus* по штаммам (слайд [Skin-AtD-WMS-Strain](#)). Авторы отметили, что *Str. ruogenes* не был обнаружен ни у одного из обследованных. Такая достоверная детализация по видам и любая детализация по штаммам возможна только по результатам WMS-тестов. На данный момент это первая и единственная работа, в которой WMS-тест выполнялся для дерматологических пациентов, именно поэтому она важна для проекта НИР1. Основные исходные данные и итоговые результаты этой работы свободно доступны на [NCBI. Sequence Read Archive](#) и на сайте журнала [Nature Microbiology](#).

Заслуживают внимания несколько обзорных статей, поскольку в них, как правило, приводится описание наиболее интересных работ и дается сравнительная характеристика методов исследования. В работе ([Grice 2011](#)) приведены результаты исследования мазков, взятых у 4 ЗП с 20 различных мест на коже (16S-тест). Авторы подчеркивают, что WMS-тест может дать больше

информации, если будет решен вопрос о предварительной элиминации hDNA. На данный момент разработано несколько методов элиминации hDNA (Приложение 4.4, п.7) и опубликованы результаты WMS-тестов кожи ([Chng 2016](#), [Ferretti 2017](#), [Oh 2014](#), [Hannigan 2015](#)), в которых в той или иной степени применялась предварительная элиминация. В работе также представлен обзор результатов исследований по присутствию вирусов, грибов и даже клещей на коже и в коже.

На слайде [Healthy-skin](#) (слева) размещена схема присутствия микроорганизмов в здоровой коже, соответствующая представлениям на момент подготовки этого обзора (2011 г.). Схема справа (на этом же слайде) соответствует представлениям о присутствии микроорганизмов (а точнее их bacDNA) в данный момент (с учетом результатов ([Nakatsuji 2013](#)), слайд [Derm-16S-1](#)).

Обзор ([Корниенко 2015](#)) выполнен российским автором и содержит краткое описание результатов исследований метагенома кожи, выполненных зарубежными авторами. В нем сравниваются возможности 16S и WMS-тестов, приводятся характеристики метагенома кожи при различных заболеваниях (в частности при псориазе по результатам [Fahlen 2012](#) и [Statnikov 2013](#)).

Обзор ([Ferretti 2017](#)) содержит подробное сравнение характеристик 16S- и WMS-тестов. Перечисляет преимущества WMS-тестов, содержит описание преимуществ и недостатков различных методов выделения hDNA, оценивает работы, в которых выполнялась предварительная элиминация hDNA. В обзоре подробно рассмотрен вопрос контроля контаминации. Выполнен анализ собственного исследования (WMS-тест мазков с 4 участков кожи, взятых у 3 ЗП, [Truong 2015](#)). Описана роль разработанного авторами ПО [MetaPhiAn2](#), которое позволяет интерпретировать результаты WMS-тестов с точностью до штамма. Некоторые из авторов этого обзора – сотрудники лаборатории [SegataLab](#), которая разработала ряд ПО, имеющих аналогичные возможности.

Краткое описание перечисленных выше исследований сведено в [Таблицу 2](#). В некоторых из них показана повышенная распространенность *Streptococcus* sp. на коже (преимущественно видов, комменсальных для ВДП) ([Gao 2008](#), [Fahlen 2012](#), [Alekseyenko 2013](#), [Statnikov 2013](#), [Bouslimani 2015](#), [Chng 2016](#)). На слайде [Skin Bacteria 3D](#) хорошо видно, что такая распространенность у ЗП имеет место на коже лица и рук (преимущественно кистей). Это вполне ожидаемый факт, поскольку любой человек регулярно трогает (осознанно и непроизвольно) пальцами рук, тыльной стороной кистей рот. А некоторые люди смачивают слюной кончики пальцев (например, при перелистывании страниц), при этом слюна (содержащая комменсальные для ВДП бактерии) попадает на пальцы и кисти рук, а через них на кожу лица и другие части тела.

Отметим, что у ПП повышенная распространенность *Streptococcus* sp. имеет место на всех псориазных высыпаниях независимо от их расположения. Это также объяснимо, поскольку почти каждое из псориазных высыпаний подвержено регулярному касанию пальцами рук (осознанное и непроизвольное смачивание слюной, почесывание, отшелушивание, втирание гелей и мазей и т.д.). Исключения составляют высыпания, расположенные «неудобно», например, на спине (особенно на ее верхней части), для которых касание пальцами рук происходит гораздо реже. Поскольку почти все виды из *Streptococcus* sp. (в том числе и комменсалы ВДП) предполагаются псориагенными (слайд [PG\\_PsB-3](#)), то присутствие в псориазном биоптате их bacDNA нерезидентного происхождения (т.е. принесенное внутри фагоцитов из кровотока) ожидаемо. Для того чтобы снизить сложность, связанную с разделением метагенома фагоцитов псориазной кожи на резидентное (bacDNA от *Streptococcus* sp. на коже) и нерезидентное подмножество (bacDNA из фагоцитов) желательно выбрать такие псориазные высыпания, на которых вероятность присутствия резидентных *Streptococcus* sp. ниже (подробнее см. Раздел 2.4).

Таблица 2. Исследования метагенома кожи. Сводка.

Пациенты	Биоматериал, (образцов)	Тест	Определение концентрации	Контроль контаминации	nhDNA (в частности bacDNA)	Работа (год, страна), примечания
<b>ПП (псориазные пациенты) и ЗП</b>						
6 ПП, 6 ЗП	мазок (19,20)	16S	нет		bacDNA	<a href="#">Gao 2008</a> (USA), см. <i>Streptococcus</i> sp.
69 ПП, 46 ЗП	мазок	cult, PCR	да		PCR для HPV	<a href="#">Фомина 2009</a> (Russia)
10 ПП, 12 ЗП	биоптат	16S	нет	да	bacDNA	<a href="#">Fahlen 2012</a> (UK), Слайд <a href="#">Skin-bacDNA</a> , см. <i>Streptococcus</i> sp.
54 ПП, 112 ЗП	мазок	16S	нет		bacDNA	<a href="#">Statnikov 2013</a> (USA) вместе с <a href="#">Alekseyenko 2013</a> , см. <i>Streptococcus</i> sp.
54 ПП, 37 ЗП	мазок	16S	нет		bacDNA	<a href="#">Alekseyenko 2013</a> (USA) вместе с <a href="#">Statnikov 2013</a> , см. <i>Streptococcus</i> sp.
6 ПП, 6 ЗП, 6 AD	мазок (29)	cult, PCR	нет		DNA грибов	<a href="#">Jagielski 2014</a> (Poland)
12 ПП, 12 ЗП	пинцет, повязка	26S	да		DNA грибов	<a href="#">Takemoto 2015</a> (Japan)
?	мазок (155)	16S	нет	-	bacDNA	<a href="#">Tanes 2015</a> (USA). По результатам HMP.
						<a href="#">Fry 2016</a> (UK). Обзор.
						<a href="#">Yan 2017</a> (China). Обзор.
<b>Непсориазные пациенты и/или ЗП</b>						
11 пациентов	биоптат (> 6x4)	16S	да	да	bacDNA	<a href="#">Nakatsuji 2013</a> (Japan), впервые доказано дермальное присутствие бактерий Слайды <a href="#">Derm-16S-1</a> , <a href="#">Derm-16S-2</a> .
15 ЗП	мазок-соскоб (263)	WMS, 16S	нет	да	nhDNA (бактерии, грибки, вирусы, археи)	<a href="#">Oh 2014</a> (USA), объединенный референсный каталог > 4000 видов, картирование на штаммы для двух видов, 16S – для контроля. Слайды <a href="#">Skin-WMS-18-1</a> , <a href="#">Skin-WMS-18-2</a> , <a href="#">Skin-WMS-18-3</a> .
2 ЗП	мазок (2x400)	16S	нет	да	bacDNA	<a href="#">Bouslimani 2015</a> (USA, Germany), 3D-биогеография. Слайд <a href="#">Skin_Bacteria_3D</a> , см. <i>Streptococcus</i> sp.
16 ЗП	мазок (16x2x8)	WMS	нет	да	Отдельно вирусная DNA, отдельно вся nhDNA (бактерии, грибки, вирусы)	<a href="#">Hannigan 2015</a> (USA)
19 AtD+ пациентов, 15 SPT(-) ЗП, 5 SRT+ ЗП	клеякий диск (> 78)	WMS, 16S	нет	да	nhDNA (бактерии, грибки, вирусы)	<a href="#">Chng 2016</a> (Singapore), 16S – только для сравнения по bacDNA для нескольких пациентов, картирование на штаммы для <i>Staph.aureus</i> Слайды <a href="#">Skin-AtD-WMS-genus</a> , <a href="#">Skin-AtD-WMS-Strep</a> , <a href="#">Skin-AtD-WMS-Staph</a> , <a href="#">Skin-AtD-WMS-Strain</a> , см. <i>Streptococcus</i> sp.
<b>Обзорные статьи</b>						
10 ЗП	мазок (10x20)	16S	нет	нет	bacDNA	<a href="#">Grice 2011</a> (USA), обзор
						<a href="#">Корниенко 2015</a> (Russia), обзор
3 ЗП	Мазок (3x4)	WMS	нет	нет	nhDNA	<a href="#">Ferretti 2017</a> (Italy), обзор и <a href="#">Truong 2015</a> (Italy), картирование на штаммы
<b>Проект НИР1</b>						
15 ПП	Фагоциты псориазного биоптата	WMS	да	да	nhDNA	(2017, Russia), предварительная элиминация nhDNA. Аналогичные тесты фагоцитов крови. Их комплексное изучение.

### 2.3. Фагоциты кожи в норме и при псориазе

Y-модель патогенеза предполагает ключевую роль фагоцитов крови (моноцитов и дендритных клеток) в развитии и поддержке псориатических пятен ([Песляк 2012-1](#), [Песляк 2012-2](#)). Предполагается, что толеризованные моноциты и дендритные клетки приносят в псориатическую дерму недеградированные бактериальные продукты и, в частности, LPS и PG (в том числе PG-Y). Роль нейтрофилов крови предполагается как посредников, отвечающих за костномозговую подготовку предшественников моноцитов и дендритных клеток на стадии гемопоэза ([Песляк 2012-1](#), Приложение 5). Роль нейтрофилов, привлеченных в псориатическую кожу, рассматривается только как активных участников врожденного иммунного ответа на иницирующий процесс LP2, что соответствует их роли и в других моделях патогенеза, в частности, в GL-модели ([Gilliet 2008](#)).

Однако есть несколько причин, по которым в рамках НИР1 предполагается исследовать не только моноциты (макрофаги) и дендритные клетки, но и нейтрофилы.

Во-первых, нейтрофилы составляют большую часть фагоцитов крови (> 85%) и ответственны за эндоцитирование (фагоцитоз) большей части бактериальных продуктов. И для того, чтобы получить максимально представительный спектр метагенома крови, необходимо извлекать nhDNA из всех фагоцитов.

Во-вторых, нейтрофилы привлекаются в псориатическую кожу на самой ранней стадии возникновения псориатического пятна и составляют существенный процент среди ее фагоцитов (до 45% при средне-тяжелом псориазе), причем почти все имеют нерезидентное происхождение (слайд [Phagocytes-1](#)). После привлечения в кожу нейтрофилы претерпевают апоптоз, а апоптотные тела эндоцитируются другими фагоцитами (в первую очередь макрофагами и дендритными клетками) ([Greenlee-Wacker 2016](#), [Soehnlein 2010](#)). При этом есть вероятность повторного эндоцитирования недеградированных бактериальных продуктов (в т.ч. nhDNA, LPS, PG и PG-Y). И, как следствие, возможна активная роль некоторых из этих бактериальных продуктов и в процессах приобретенного иммунного ответа.

В-третьих, недавно стало известно, что нейтрофилы могут реализовывать функции антиген-презентирующих клеток ([Davey 2014](#)). Т.е. презентировать CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитам ранее эндоцитированные антигены и, тем самым, напрямую участвовать в процессах приобретенного иммунного ответа.

Перечисленных причин достаточно для того, чтобы в рамках НИР1 изучались и сравнивались метагеномы не только моноцитов (макрофагов) и дендритных клеток, но и нейтрофилов, т.е. всех фагоцитов крови и всех фагоцитов псориатической кожи.

На слайдах [Skin 2D](#) и [Skin 3D](#) представлено пространственное распределение лейкоцитов (в т.ч. моноцитов и дендритных клеток) в здоровой коже ([Wang 2014](#)). В псориатической коже их состав и распределение существенно отличается от нормы. На слайдах [Neutrophils](#) ([Lin 2011](#)) и [Neutrophils-Munro](#) ([Ozawa 2005](#), [Reich 2015](#)) представлено сравнительное распределение нейтрофилов в здоровой (где их практически нет) и в псориатической коже. На слайде [Macrophages](#) представлено распределение CD163+ макрофагов (моноцитов) ([Fuentes-Duculan 2010](#)), а на слайде [Dendritic Cells](#) представлено распределение CD11c+ и CD1a+ дендритных клеток в здоровой и псориатической коже при средне-тяжелом псориазе ([Komine 2007](#), [Zaba 2009](#)).

На слайде [Phagocytes-1](#) собрана сводная информация о фагоцитах крови и фагоцитах псориатической кожи. Количественные характеристики фагоцитов крови в норме и при псориатической болезни отличаются незначительно. Основные отличия имеют место в псориатической коже. В здоровой коже почти все фагоциты имеют резидентное происхождение, т.е. происходят от MoDP - предшественников моноцитов и дендритных клеток - резидентных дермальных стволовых клеток. Но в псориатическом высыпании ситуация иная - до 80% фагоцитов имеют нерезидентное происхождение, т.е. либо они привлечены из кровотока, либо произошли от клеток, привлеченных из кровотока. Это все нейтрофилы и до 70% моноцитов-макрофагов и дендритных клеток. Как показывают расчеты, их концентрация в верхнем слое кожи толщиной 0,5 мм достигает ~ 41000 шт/мм<sup>3</sup>. Около 45% фагоцитов составляют нейтрофилы, около 35% - моноциты (макрофаги) и до 20% - дендритные клетки. Процентное соотношение между типами фагоцитов в псориатической коже определяется увеличением среднего времени жизни макрофагов и особенно дендритных клеток по сравнению этими же величинами для фагоцитов крови.

## 2.4. Комплексное изучение метагеномов фагоцитов крови и фагоцитов псориазической кожи

Y-модель патогенеза предполагает, что специфические бактериальные продукты, находящиеся внутри конкретных фагоцитов крови, поступают вместе с ними в псориазическую дерму и поддерживают воспалительный процесс ([Peslyak 2012](#), [Песляк 2012-1](#), [Песляк 2012-2](#)) (Гипотеза H10).

В рамках НИР1 предстоит доказать или опровергнуть гипотезу H10-S, которая представляет собой расширение гипотезы H10 (слайд [Biotransfer](#)). Гипотеза H10-S предполагает, что недеградированный нехозяйский биоматериал перемещается в псориазическую кожу внутри фагоцитов крови (в рамках гипотезы H10 конкретизированы и фагоциты, и бактериальные продукты, ответственные за поддержку псориазического воспаления). Доказательство гипотезы H10-S будет основано на комплексном изучении метагеномов фагоцитов крови и метагеномов псориазической кожи. Обнаружение в метагеноме псориазической кожи nhDNA, имеющей нерезидентное происхождение, т.е. поступившей в кожу внутри фагоцитов крови, будет прямым доказательством гипотезы H10-S и серьезным фактом в поддержку гипотезы H10.

На слайде [Phagocytes-2](#) детализирована схема предполагаемого поступления нехозяйского биоматериала (в т.ч. nhDNA, LPS и PG) в псориазическую кожу внутри толеризованных фагоцитов крови Neu-T, Mo-T и DC-T. Фагоциты псориазической кожи (независимо от их происхождения) эндоцитируют nhDNA, LPS, PG и другой нехозяйский биоматериал резидентного происхождения (т.е. от любых микроорганизмов, живущих на коже и в коже). При этом внутри толеризованных фагоцитов предположительно сохраняется недеградированный нехозяйский биоматериал ранее эндоцитированный в крови. nhDNA резидентного и nhDNA нерезидентного происхождения можно отличить с помощью комплексного изучения метагеномов фагоцитов крови и фагоцитов псориазической кожи. К сожалению это невозможно сделать для другого (отличного от nhDNA) нехозяйского биоматериала. Предполагается определить концентрацию nhDNA и оценить концентрацию другого нехозяйского биоматериала нерезидентного происхождения в псориазической коже (в первую очередь пептидов – предполагаемых Y-антигенов) (Приложение 4.2).

Предполагаемая схема влияния метагенома фагоцитов крови на метагеном фагоцитов псориазической кожи в динамике изображена на слайде [2Pools-D](#), а на слайде [2Pools-S](#) изображен мгновенный срез для стабильного псориазического пятна и предложены формулы, определяющие это влияние. Подробно эта задача рассмотрена в отдельном Приложении BS (ссылка на файл в подразделе 4.8).

Для того чтобы обнаружить это влияние выполняются два независимых WMS-теста. Исходным биоматериалом для них являются фагоциты (крови и псориазической кожи, соответственно). Фагоциты (нейтрофилы, моноциты и дендритные клетки) крови иммуномагнитным способом ([Plouffe 2015](#)) выделяются из цельной крови (они составляют 65-70% от всех лейкоцитов). Псориазический биоптат в стерильных условиях преобразуется в клеточную суспензию, из которой иммуномагнитным способом выделяются все фагоциты (нейтрофилы, моноциты и дендритные клетки) (слайд [Phagocytes selection](#)). Целесообразность применения иммуномагнитного способа для селекции фагоцитов крови из цельной крови (с учетом последующей элиминации hDNA) предстоит определить. Перед выполнением WMS-тестов определяется количество фагоцитов в каждом из исходных клеточных биоматериалов, затем стандартным образом выделяется вся DNA (к сожалению включая hDNA) и определяется ее концентрация. После чего выполняется максимально возможная элиминация hDNA (что равнозначно обогащению содержания nhDNA).

Для обогащенных биоматериалов выполняется WMS-тест, после чего аналитически исключаются риды, принадлежащие hDNA. Затем принадлежность остальных ридов определяется с точностью до вида с применением [NCBI RefSeq](#) (референсной геномной БД) ([Grumaz 2016](#)). Для части ридов не удается найти подходящий геном, однако множество картированных ридов, как правило, достаточно большое для того, чтобы выполнить детальное изучение метагенома.

На основе обработки информации по картированным ридам формируются два перечня видов nhDNA: MPB – метагеном фагоцитов крови и MPPS – метагеном фагоцитов псориазической кожи.

Все, что предполагается делать только с результатами по MPB, описано в разделе 2.1. Метагеном крови (Задачи 1 и 3). Далее речь идет про интерпретацию и изучение результатов по MPPS и MPB в комплексе.

Простое сравнение с MPB сразу позволяет разделить MPPS на две фракции R – резидентную и M – общую. Если конкретной nhDNA из MPPS нет в MPB, то она сразу включается в фракцию R (слайд [nhDNA-MPPS](#)). Дальнейшее разделение общей фракции M на нерезидентную N и смешанную RuN происходит алгоритмически (Приложение 4.5).



Перечислим возможные причины существования смешанной фракции RuN:

- контаминация биоматериала крови кожной микрофлорой во время венепункции;
- транспорт организма и/или его *nhDNA* из кожи в кровь во время травмы и/или инфекционного воспаления дермы;
- наличие в микрофлоре кожи и ЖКТ (ВДП) идентичных штаммов;
- картирование различных видов на один референсный;

Чтобы снизить размер смешанной фракции RuN кожные биоптаты рекомендуется брать с тех частей тела, на которые вероятность переноса микрофлоры ЖКТ (ВДП) минимальна (т.е. исключается лицевая кожа вокруг носа и рта, кожа кистей, кожа вблизи ануса и т.п.). Оптимальное расположение псориатических пятен, предназначенных для биоптата, такое, которое предполагает минимальное их касание пальцами (например, на спине) – таким образом, присутствие в биоптатах оральной микрофлоры будет понижено. Распределение *Streptococcus* sp. на коже ЗП – слайды [Skin Bacteria 3D \(Bouslimani 2015\)](#) и [Skin-WMS-18-2 \(Oh 2014\)](#).

В результате будут получены ответы на поставленные вопросы 2-4 (слайд [Questions](#)). От того какие они будут, зависит итоговая ценность НИР1 в целом.

### 3. Цели и задачи НИР1

Главными целями являются (слайд [Main Goals](#))

Цели	Задачи	Слайды
Изучение подпроцессов, лежащих в основе системного псориатического процесса. Получение фактов в поддержку гипотез Н2 и Н3.	1 и 3	<a href="#">SPP</a> <a href="#">SPP hypothesis</a>
Получение фактов в поддержку гипотезы Н10 (Н10-S). Н10 лежит в основе Y-модели патогенеза ПБ и предполагает ключевую роль поступления специфических бактериальных продуктов из системного кровотока в псориатическую дерму внутри фагоцитов крови.	1,2 и 4	<a href="#">Local hypothesis</a> <a href="#">Biotransfer</a> <a href="#">Phagocytes-2</a>
Обоснование целесообразности и подготовка к проведению НИР2	Все задачи	

Для достижения целей необходимо решить задачи, перечисленные в Таблице 3 (слайды [Task1](#), [Task2](#), [Task3](#), [Task4](#)). Выполнение НИР1 разделено на два этапа: 1) Подготовка и отбор и 2) Определение и изучение метабеномов фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи.

На этапе 1 помимо сбора информации о ПП - кандидатах на участие в Программе и осуществления отбора, необходимо обеспечить разработку, формирование и апробацию ИЭМК (самостоятельно или в рамках приобретенного Программного обеспечения), специализированную для ПП.

Таблица 3. Задачи НИР1.

<p><b>Задача 1 (практическая).</b>  <b>Определение МРВ - метагенома фагоцитов крови.</b>  <b>Определение уровня РАРМ-немии.</b></p>	<p><b>Реализуемость при использовании 16S-теста вместо WMS-теста.</b>                      Имеет смысл решать в рамках пилотного предпроектa НИР1:                      (+) – да, (-) – нет.</p>
<p>1.1. Разработка и применение иммуномагнитного метода выделения фагоцитов из крови.</p>	<p>Да, но нет необходимости. Можно в качестве биоматериала взять цельную кровь, поскольку задачи 2 и 4 при таком подходе не имеет смысла решать.                      (-)</p>
<p>1.2. Разработка и применение метода полного метагеномного секвенирования (WMS) для обнаружения всего спектра hDNA в фагоцитах крови с точностью до вида, т.е. определение МРВ – метагенома фагоцитов крови (<a href="#">Païssé 2016</a>, <a href="#">Gyarmati 2016</a>, <a href="#">Yun 2016</a>).</p>	<p>Только bacDNA.                      Будет очень неточно.                      16S-тест для ~42% родов определение с точностью до вида не может дать (<a href="#">Табл.4</a>, п.4).                      (+) – в цельной крови с точностью до рода.</p>
<p>1.3. Определение концентрации каждой hDNA, обнаруженной в метагеноме.</p>	<p>Только bacDNA. Будет очень неточно из-за серьезных недостатков 16S-теста (<a href="#">Табл.4</a>, пп.19 и 20).                      (+) – с точностью до рода</p>
<p>1.4. Оптимизация подготовки ПП к сдаче теста с целью повышения концентрации в крови hDNA, поступающей из тонкого кишечника.</p>	<p>Только bacDNA.                      (+)</p>
<p>1.5. Разработка и применение оптимального метода предварительной (до секвенирования) элиминации hDNA из биоматериала (<a href="#">Archer 2010</a>, <a href="#">Fitting 2012</a>, <a href="#">Opota 2015</a>, <a href="#">Song 2014</a>, <a href="#">Yigit 2016</a>).</p>	<p>В разработке нет необходимости (можно использовать один из стандартных тестов, например <a href="#">NebNext Microbiome DNA Enrichment</a>).                      См. также. (<a href="#">Табл.4</a>, п.22).                      Разработка (-), применение (+).</p>
<p>1.6. Определение Q6 - концентрации LPS в биоматериале с помощью одного из стандартных тестов: <a href="#">LAL-тест</a> или <a href="#">ЕАА-тест</a>.</p>	<p>(+)</p>
<p>1.7. Определение Qs – суммарной концентрации РG и (1,3)-beta-D-глюкана в биоматериале с помощью <a href="#">SLP-теста</a>. Определение Qg – концентрации (1,3)-beta-D-глюкана с помощью одного из стандартных тестов. Определение Q7 концентрации РG, исходя из Qs и Qg.</p>	<p>(+)</p>

**Таблица 3. Продолжение.**

<p><b>Задача 2 (практическая).</b>  <b>Определение MPPS - метагенома фагоцитов псориатической кожи.</b></p>	<p><b>Реализуемость при использовании 16S-теста вместо WMS-теста.</b>                  (-) – Задача 2 не имеет смысла в целом из-за принципиальной невозможности решить задачу 4.</p>
<p>2.1. Разработка и применение иммуномагнитного метода выделения фагоцитов из псориатической кожи (<a href="#">Ferretti 2017</a>, <a href="#">Garcia-Garcera 2013</a>, <a href="#">Meisel 2016</a>, <a href="#">Oh 2014</a>).</p>	<p>Да</p>
<p>2.2. Разработка и применение метода полного метагеномного секвенирования (WMS) для обнаружения всего спектра hDNA в фагоцитах с точностью до вида, т.е. определение MPPS – метагенома фагоцитов псориатической кожи (общая с подзадачей 1.2).</p>	<p>Только bacDNA.                  Будет очень неточно.                  См п.1.2.</p>
<p>2.3. Определение концентраций каждой hDNA, обнаруженной в метагеноме (общая с подзадачей 1.3).</p>	<p>Только bacDNA.                  Будет очень неточно.                  См п.1.3.</p>
<p>2.4. Оптимизация подготовки ПП к сдаче теста с целью повышения концентрации в коже hDNA, поступающей из крови (общая с подзадачей 1.4).</p>	<p>Только bacDNA.                  Да.</p>
<p>2.5. Разработка и применение оптимального метода предварительной (до секвенирования) очистки биоматериала от hDNA (общая с подзадачей 1.5)</p>	<p>Нет необходимости (<a href="#">Табл.4</a>, п.22).</p>

Таблица 3. Продолжение.

<p><b>Задача 3 (аналитическая).</b>  <b>Изучение МРВ – метагенома фагоцитов крови и РАМР-немии в комплексе.</b>  <b>Проверка гипотез Н2 и Н3.</b></p>	<p><b>Реализуемость при использовании 16S-теста вместо WMS-теста.</b>                      Имеет смысл решать в рамках пилотного предпроекта НИР1:                      (+) – да, (-) – нет.</p>
<p>3.1. Определение Q0 – суммарной концентрации bacDNA Gram(-) видов (ответственных за LPS-нагрузку).</p>	<p>Будет очень неточно из-за недостатков 16S-теста (<a href="#">Табл.4</a>, пп.19 и 20).                      (+) – но только для Gram(-) родов</p>
<p>3.2. Определение генов, ответственных за TLR4 активность LPS. Виды, имеющие эти гены, ответственны за TLR4-активную LPS-нагрузку. Определение Q1 – суммарной концентрации bacDNA таких видов (либо вычисление Q1 для всех Gram(-) видов с применением коэффициентов TLR4-активности).                       Согласование Q0, Q1 и Q6 (см. задачу 1.6)</p>	<p>Невозможно, ибо 16S-тест не дает какой-либо информации о генах, кроме участков 16S rRNA, которые использованы в самом тесте (<a href="#">Табл.4</a>.п.7 и 10).                      (-)</p>
<p>3.3. Определение Q2 – суммарной концентрации bacDNA Gram+ видов (ответственных за PG-нагрузку).                       Согласование Q2 и Q7 (см. задачу 1.7).</p>	<p>Будет очень неточно. См п.3.1.                      (+) – но только для Gram(+) родов</p>
<p>3.4. Определение наличия генов MurM, MurN, ответственных за образование в пептидогликане межпептидных мостиков IB-Y. Виды, имеющие эти гены, предполагаются псоррагенными. Определение Q3 - суммарной концентрации bacDNA всех видов, имеющих межпептидные мостики IB-Y.</p>	<p>Невозможно. См п.3.2. (-).                      Альтернатива:                      3.4а. Определение Q4 - суммарной концентрации родов, в которых существенная часть видов предполагается псоррагенными (Streptococcus sp., Leuconostoc sp. и Weissella sp.),                       Отдельно Q5 - концентрация Enterococcus sp. (в котором E.faecalis и несколько других предполагается псоррагенным), либо (что точнее) применение RT-PCR с доп. праймерами для выявления концентрации E.faecalis (см. <a href="#">Holler 2014</a> и др.).</p>
<p>3.5. Поиск прямых корреляций между параметрами (Q0, Q1, Q2, Q3, Q6, Q7) и тяжестью проявлений ПБ по PASI. Проверка гипотез Н2 и Н3 (слайд <a href="#">SPP hypothesis</a>).</p>	<p>Q1 и Q3 не определяются. (-).                       Альтернатива:                      3.5а. Поиск прямых корреляций между параметрами (Q0, Q2, Q4 и Q5) и тяжестью проявлений ПБ по PASI. Проверка гипотез Н2 и Н3 (не полностью – так как определение с точностью до рода)                      (слайд <a href="#">SPP hypothesis</a>).</p>

<p><b>Задача 4 (аналитическая).</b>  <b>Изучение MPB (метагенома фагоцитов крови) и MPPS (метагенома фагоцитов псориатической кожи) в комплексе. Проверка гипотезы H10-S.</b></p>	<p><b>Реализуемость при использовании 16S-теста вместо WMS-теста.</b></p> <p>(-) – не имеет смысла в целом (см. Примечание к Задаче 2).</p>
<p>4.1. Комплексное изучение результатов WMS-тестов фагоцитов крови и фагоцитов псориатической кожи (MPB и MPPS).  Определение фракций MPPS - резидентной, нерезидентной и смешанной.  Определение спектра, доли и концентрации phDNA нерезидентного происхождения в MPPS. Определение спектров, долей и концентраций bacDNA патогенных и предполагаемых псоррагенными бактерий резидентного и нерезидентного происхождения в MPPS.  Проверка гипотезы H10-S (слайды <a href="#">Local hypothesis</a>, <a href="#">Biotransfer</a> и <a href="#">Phagocytes-2</a>).</p>	<p>Невозможно, в связи с тем, что разделение метагенома на фракции предполагает, что его состав известен с точностью до вида и (согласно алгоритму) для отдельных видов может быть уточнен до штамма.</p>
<p>4.2. Поиск и изучение корреляций между тяжестью ПБ и параметрами, характеризующими спектры и концентрации bacDNA в MPB и MPPS.</p>	<p>Найти корреляции маловероятно (с учетом возможности и качества решения задачи 3 и 4.1).</p>
<p>4.3. Аналогичный подход при обнаружении существенной концентрации небактериальной phDNA (архейной, грибковой, гельминтной, вирусной и т.д.) в MPPS.</p>	<p>Нет, поскольку обнаруживается только bacDNA.</p>
<p><b>Задача 5. Итоговая.</b>  5.1. Статистический анализ и оценка результатов.  5.2. Подготовка и публикация отчета и статей.  5.3. Доработка и подготовка проекта НИР2.</p>	<p>Да, но результаты могут быть малозначимы.  (+)</p>

Подробнее об участии ПП в НИР1 на слайде [Participation Order](#) (ссылка на файл с оценочной стоимостью Программы в подразделе 4.8). Вся информация (Анкета, результаты обследований и тестов) будет храниться в ИЭМК. ПП будут иметь доступ только к своей ИЭМК, специалисты, участвующие в НИР1, будут иметь доступ ко всем ИЭМК. На слайдах [NIR1-2-plan](#) и [NIR1-2-bio](#) содержится краткая информация о сроках, объемах, количестве пациентов и типах биоматериалов для НИР1 и НИР2. На слайде [NIR1-2-ptasks](#) перечислены задачи, которые необходимо решить до начала выполнения НИР1.

## 4. Приложения

### 4.1. Виды бактерий, предполагаемые псоррагенными.

У псориатических пациентов имеет место тонкокишечный СИБР ([Peslyak 2012](#), [Гумаюнова 2009a](#), [Гумаюнова 2009b](#), [Гумаюнова 2009c](#)). Предполагается, что тонкокишечная микрофлора в избытке содержит бактерии, названные псоррагенными ([Песляк 2012-1](#), [Песляк 2012-2](#)). Это бактерии, которые имеют пептидогликан аналогичный *Str.pyogenes*, т.е. содержащий межпептидные мостики типа (L-Ala)-(L-Ala) или (L-Ser)-(L-Ala). Формирование этих мостиков в [пептидогликане](#) обусловлено наличием энзимов типа [murM](#) и [murN](#) (слайд [PG\\_PsB-2](#)).

*murM* - энзим, обеспечивающий присоединение серина/аланина (первой аминокислоты начиная от Lys) в процессе формирования межпептидного мостика у пептидогликана. При отсутствии этого энзима мостиков почти не будет.

*murN* - энзим, обеспечивающий присоединение аланина (второй аминокислоты начиная от Lys) в процессе формирования межпептидного мостика у пептидогликана. При отсутствии этого энзима, мостик будет длиной в одну аминокислоту.

В разных бактериях формирование межпептидных мостиков обеспечивают различные *murMN*-гены. По БД KEGG можно определить все (внесенные в нее) штаммы бактерий, которые имеют гены,

обеспечивающие секрецию обоих энзимов, т.е. и типа murM и типа murN (БД KEGG – см. Приложение 4.7). На слайде [PG PsB-3](#) перечислены виды таких бактерий. Все штаммы каждого из этих видов имеют межпептидные мостики типа (L-Ala)-(L-Ala) или (L-Ser)-(L-Ala), т.е. их пептидогликан аналогичен пептидогликану *Str.pyogenes*. Все эти виды предполагаются псоррагенными.

#### 4.2. Пептиды – потенциальные Y-антигены.

На слайде [PG PsB-4](#) изображены муропептиды и пептиды, которые образуются при деградации пептидогликана *Str.pneumonia* (один из видов, предполагаемых псоррагенными). Муропептиды 20, 21, 23 и 25 после воздействия амидазы NAMLAA ([EC 3.5.1.28](#)) образуют линейные пептиды 5 и 6а (нумерация по [Bui 2012](#)). Эти пептиды содержат эпитоп IB-Y и имеют длину 9 аминокислот, что позволяет им презентироваться через MHC I. MDP будучи адьювантом обеспечивает интенсивность процессирования и презентации.

На слайде [PG PsB-5](#) изображен пептид B15-3 (имя условное), который после воздействия амидазы NAMLAA ([EC 3.5.1.28](#)) образуется из муропептидов 33, 34 и 35 (нумерация по [Bui 2012](#)). В зависимости от числа разрезов, выполняемых эндопептидазой GDGDA (имя условное) ([EC 3.4.14.13](#)), из пептида B15-3 получаются пептиды из 13-ти аминокислот (три варианта - один из них это B13-2), из 11-ти (три варианта) или из 9-ти аминокислот.

Пептид B15-3 (и его аналоги), а также и некоторые из его производных (не менее чем из 11 аминокислот) - потенциальные Y-антигены, презентруемые через MHC II. В качестве эпитопов при этом будут один или оба мостика IB-Y. MDP, будучи адьювантом, обеспечивает интенсивность процессирования и презентации.

На слайде [PG PsB-6](#) изображен пептид IX (аналогичный пептидам VII и VIII), которые после воздействия амидазы NAMLAA ([EC 3.5.1.28](#)) образуются из муропептидов 36 и 37 (нумерация пептидов и муропептидов по [Bui 2012](#) и [Filipe 2000](#)). В зависимости от числа разрезов, выполняемых эндопептидазой GDGDA ([EC 3.4.14.13](#)), из пептида IX получаются пептиды из 15 аминокислот (три варианта), из 13-ти (три варианта) или линейный пептид Y-B11 из 11-ти аминокислот.

Пептид IX (и его аналоги – пептиды VII и VIII), а также и некоторые из их производных (не менее чем из 11 аминокислот) - потенциальные Y-антигены, презентруемые через MHC II. В качестве эпитопов при этом будут один или оба центральных мостика IB-Y. MDP, будучи адьювантом, обеспечивает интенсивность процессирования и презентации.

В Excel-файле Параметры-примеры, лист «B13-2\_Y-B11» (ссылка на файл в подразделе 4.8) содержится оценка количества и суммарного веса пептидов B13-2 и Y-B11, которые могут образоваться при деградации пептидогликана одной Gram+ бактериальной клетки PsB. Первая оценка выполнена исходя из % содержания MDP в пептидогликане ([Sekine 1985](#)), предполагаемой плотности межпептидных мостиков в 50% ([Vollmer 2010](#)) и соотношением между содержанием MDP и B13-2 (или Y-B11) в пептидогликане.

Вторая оценка для B13-2 выполнена исходя из суммарного содержания муропептидов 33, 34 и 35 (~1,5%) в пептидогликане *Str.pneumonia* штамм R6 и соотношения веса пептида B13-2 и среднего веса этих муропептидов ([Bui 2012](#)). Вторая оценка для Y-B11 выполнена исходя из суммарного содержания муропептидов 36 и 37 (~1,3%) в пептидогликане *Str.pneumonia* штамм R6 и соотношения веса пептида Y-B11 и среднего веса этих муропептидов ([Bui 2012](#)).

Пептид – потенциальный Y-антиген	Оценка	шт/клетка	г/клетка	% от веса клетки
B13-2	1	~10 <sup>6</sup>	2,1*10 <sup>-15</sup>	0,21%
	2	~6*10 <sup>5</sup>	1,2*10 <sup>-15</sup>	0,12%
Y-B11	1	~5,3*10 <sup>5</sup>	8,5*10 <sup>-16</sup>	0,08%
	2	~5*10 <sup>5</sup>	8,0*10 <sup>-16</sup>	0,08%

Оценки дали близкие результаты и на их основании можно будет оценить концентрацию B13-2 и Y-B11 в псоррагической коже. Это можно сделать по суммарной концентрации bacDNA видов (штаммов) бактерий, предполагаемых псоррагенными, в подмножестве нерезидентного происхождения MPSS (см. Приложение 4.5.2). При этом нужно будет учесть плотность и состав межпептидных мостиков этих бактерий. Такой способ оценки допустим, если концентрации бактериальных продуктов, таких как bacDNA, муропептиды и пептиды, производные от пептидогликана, при поступлении в кровоток, эндоцитировании (связывании) и деградации фагоцитами и транспортировке недеградированных частей в псоррагическую кожу, изменяются пропорционально.

### 4.3. Сравнительные характеристики 16S и WMS-тестов

Таблица 4. Сравнительные характеристики 16S и WMS-тестов.

	Характеристики	16S	WMS	Источники
	<b>Основные</b>			
1	Возможность выявлять любые, в т.ч. и некультивируемые виды.	Да	Да	
2	Определение DNA и живых и мертвых (частично деградированных, в т.ч. и DNA) организмов. Определить отдельно невозможно.	Да	Да	
3	Обнаружение небактериальных DNA (эукариотов, архей, вирусов, фагов, грибов, простейших и т.д.).	Нет	Да	<a href="#">Jovel 2016</a> , <a href="#">Meisel 2016</a> , <a href="#">Ranjan 2016</a>
4	Уровень качественной классификации таксонов. 16S-тест для ~42% родов определение с точностью до вида не может дать в принципе, поскольку межвидовое совпадение последовательности ампликонов более 97%. Только WMS-тест дает возможность идентификации любой bacDNA с точностью до вида (штамма) ( <a href="#">Jovel 2016</a> ).	Тип (phyla) +++ Род (genus) ++ Вид (species) -+ Штамм -	Тип (phyla) +++ Род (genus) +++ Вид (species) +++ Штамм +-	<a href="#">Frey 2015</a> , <a href="#">Meisel 2016</a> , <a href="#">Ranjan 2016</a> , <a href="#">Тягт 2014</a>
5	Определяется относительное количество (типов, родов, видов). Для определения абсолютных значений (концентраций) необходим дополнительный тест исходного биоматериала, который позволит нормировать относительные результаты. Применяются qPCR ( <a href="#">Glassing 2016</a> , <a href="#">Païssé 2016</a> ) и dPCR ( <a href="#">Bhat 2016</a> , <a href="#">Tan 2015</a> ) для оценки общей бактериальной нагрузки по одному из универсальных участков 16S (при этом в подсчет не попадают виды, не содержащие данный участок) ( <a href="#">Nakatsuji 2013</a> ). Применяются тесты для определения суммарного количества любой DNA (или только hDNA) ( <a href="#">Grumaz 2016</a> ). Также применяется метод «внутреннего стандарта» - добавления в биоматериал - конкретного количества (около 1% от суммарной ожидаемой величины) DNA характерной бактерии. Такой бактерии, bacDNA которой заведомо не может присутствовать в этом биоматериале ( <a href="#">Tan 2015</a> ).	Да	Да	<a href="#">Bhat 2016</a> , <a href="#">Glassing 2016</a> , <a href="#">Grumaz 2016</a> , <a href="#">Païssé 2016</a> , <a href="#">Tan 2015</a>
6	Покрытие генома. Для WMS-теста возможно даже для DNA с малым % присутствия (зависит от глубины покрытия).	Одна или несколько областей в 16S rRNA	Равномерное покрытие всего генома.	<a href="#">Ranjan 2016</a>
7	Идентификация конкретных генов. Благодаря этому результаты WMS-теста могут быть интерпретированы с точностью до вида (штамма) по маркерным уникальным генам ( <a href="#">Jovel 2016</a> ).	Нет	Да	<a href="#">Ferretti 2017</a> , <a href="#">Ranjan 2016</a>
8	Идентификация генов резистентности к антибиотикам (резистом).	Нет	Да	<a href="#">Frey 2015</a>
9	Идентификация генов вирулентности (патогенности).	Нет	Да	<a href="#">Meisel 2016</a>
10	Функциональная классификация обнаруженных видов, открытие новых генов.	Нет	Да	<a href="#">Jovel 2016</a>
11	Информация для выбора лекарственных препаратов.	+	++	<a href="#">Frey 2015</a>

Таблица 4. Сравнительные характеристики 16S и WMS-тестов. Продолжение 1.

	Характеристики	16S	WMS	Источники
	<b>Дополнительные характеристики и недостатки</b>			
12	Количество родов (видов) бактерий, для которых определена последовательность 16S rRNA (для 16S-теста) или геномов конкретных штаммов (в т.ч. полных) (для WMS-теста). Данные на 8.02.2017.	3 356 809 ( <a href="#">RDP</a> )	~ 86 000 (в т.ч. ~ 6500 полных) <a href="#">Genome</a>	
13	Количество видов бактерий (для 16S с неточной классификацией), которые были обнаружены в одном биоматериале (фекалии) путем увеличения размера библиотек (до $3,2 \cdot 10^7$ ).	2050	4100	<a href="#">Ranjan 2016</a>
14	Разнообразие микробиома, обнаруженного в одном биоматериале по трем различным метрикам.	Ниже	Выше	<a href="#">Ranjan 2016</a>
15	Чувствительность методов ограничена возможным загрязнением реагентов посторонней DNA. Необходимы контрольные тесты по оценке уровня загрязнения и возможно дополнительная обработка реагентов. При тестировании биоматериалов с низкой концентрацией nhDNA и/или с высокой концентрацией hDNA возможны ложноположительные результаты по nhDNA.	Да	Да	<a href="#">Glassing 2016</a>
	<b>WMS-тест vs 16S.</b>			
16	Когда патоген неизвестен, когда требуется больше, чем идентификация (определение штамма, оценка патогенной нагрузки, резистентности к антибиотикам). При микст-инфекциях (например, при микст-сепсисе) 16S-тест часто дает ошибки, имеет слабую повторяемость.	Нет	Да	<a href="#">Frey 2015</a>
17	Возможность обнаружить DNA любого вида, а не только такого, который входит в заранее определенный перечень. Лучшие 16S тесты диагностики сепсиса <a href="#">SepsiTest</a> (более 345 видов бактерий и грибов) и <a href="#">IRIDICA</a> (более 1000 патогенов, в 2017 снят с производства) не в состоянии определить присутствие патогена не из своего перечня.	Нет	Да	<a href="#">Frey 2015</a> , <a href="#">Stevenson 2016</a>
18	Идентификация геномов новых, ранее не обнаруженных видов.	Нет	Да	<a href="#">Frey 2015</a> , <a href="#">Jovel 2016</a>
19	<b>16S-тест. Недостаток.</b> Число копий 16S в геноме меняется в широком диапазоне (в зависимости от вида и даже штамма). Это влечет гарантированные погрешности: а) При оценке относительного присутствия таксонов в биоматериале. % присутствия таксонов с большим числом копий 16S будет завышен. б) При оценке количественного присутствия конкретного вида (всех видов вместе) по числу DNA в 1 мл биоматериала. Оно может быть определено только через число 16S в 1 мл, а точное значение коэффициентов (копий 16S в геномах) неизвестны.	Да		<a href="#">Vetrovsky 2013</a> , <a href="#">Тягт 2014</a>



Таблица 4. Сравнительные характеристики 16S и WMS-тестов. Продолжение 2.

	Характеристики	16S	WMS	Источники
20	<b>16S-тест. Недостаток.</b> Выбор праймеров для разных переменных участков (от V1 до V9) для проведения амплификации приводит к существенно различным результатам, не только из-за их различных характеристик при амплификации (аффинитет), но из-за влияния на классификацию по таксонам.	Да		<a href="#">Jovel 2016</a> , <a href="#">Meisel 2016</a>
21	<b>16S-тест. Недостаток.</b> Мутации отдельных видов в переменных участках (от V1 до V9) могут мешать правильной классификации по таксонам.	Да		
22	<b>WMS-тест. Недостаток.</b> Необходимость максимального удаления хозяйской DNA (hDNA) из биоматериала до секвенирования (биохимическими методами) и после секвенирования (алгоритмическими методами).		Да	<a href="#">Ferretti 2017</a> , <a href="#">Frey 2015</a>
	<b>Стоимостные и технические характеристики</b>			
23	Стоимость из расчета на один образец (для задачи, в которой не менее 100 образцов). Зависит от оборудования и постановки задачи. Определяется относительное присутствие практически всех hDNA (для 16S – только bacDNA) – до нескольких тысяч.	47-60\$	120-290 \$	<a href="#">Ranjan 2016</a> , <a href="#">Genohub</a> , <a href="#">Allseq</a>
24	<b>WMS-тест.</b> Стоимость в будущем может снизиться до суммы менее чем 1\$ на один бактериальный геном (2014). Это уже произошло (см.выше).		Да	<a href="#">Applications 2015</a>
25	<b>WMS-тест.</b> Без учета стоимости обслуживания оборудования и затрат на оплату труда персонала, только реактивы стоят минимум 1000\$ на один сеанс (2014). Стоимость может быть снижена за счет пробоподготовки образца, либо путем обогащения присутствия патогенов и/или элиминации хозяйской ДНК.		Да	<a href="#">Frey 2015</a>
26	Время выполнения (зависит от оборудования и постановки задачи)	2-5 ч	7–60 ч	<a href="#">Frey 2015</a>
27	Требования к соблюдению температурного режима при транспортировке и пробоподготовке.	Менее высокие	Более высокие	<a href="#">Frey 2015</a>
28	Отработанные конвейеры (pipeline) выполнения тестов. Срок активного применения. Однако для 16S-теста нет (и не может быть) схем удовлетворительных для классификации с точностью до вида ( <a href="#">Jovel 2016</a> ).	Много. Более 30 лет.	Мало. Около 10 лет.	<a href="#">Ranjan 2016</a>
29	Число публикаций (по данным <a href="https://scholar.google.ru">https://scholar.google.ru</a> )	26500	16500	<a href="#">Ranjan 2016</a>

#### 4.4. Порядок подготовки и выполнения WMS-теста цельной крови (фагоцитов крови), поиск корреляций с PASI.

1. **Отбор ПП.** Участвуют только ПП, которые удовлетворяют требованиям, перечисленным на слайде [Requirements](#). В число участников рекомендуется включить ПП с широким диапазоном тяжести по PASI, но без инфекционных проблем. Для того чтобы максимально снизить поступление бактериальных продуктов в кровь помимо тех, которые постоянно поступают из тонкого кишечника. Широкий диапазон PASI необходим для поиска корреляций между PASI и спектром (качественным и количественным) *hhDNA* цельной крови. Первоначальный отбор осуществляет Оргкомитет НИР1 по информации, предоставленной ПП - кандидатами на участие в Программе. Это происходит путем изучения Анкет ([образец Анкеты](#)), результатов обследований (выполненных в течение последних 6 месяцев) и фотографий, позволяющих оценить состояние ПБ.

2. **Подготовка к сдаче теста.** До сдачи WMS-теста ПП соблюдает 5-7 дней СВНД (стерильный вариант низкомикробной диеты) для того, чтобы максимально снизить присутствие транзитной тонкокишечной микрофлоры, поступление в кровь ее бактериальных продуктов, а также их накопление в фагоцитах крови. Предстоит разработать примерное меню.

В этот период запрещен прием каких-либо лекарственных препаратов, которые могут влиять на микрофлору ЖКТ и ВДП.

После любого инфекционного заболевания перед выполнением теста должно пройти не менее 2 недель.

3. **Спецпитание перед тестом.** В день предшествующий выполнению WMS-теста ПП меняет ассортимент питания. В рамках СВНД отдается предпочтение продуктам, которые вызывают **быстрое обострение** ПБ (как правило, это хорошо знает ПП по собственному опыту).

В день забора крови для выполнения WMS-теста утром ПП принимает обильный завтрак. Меню завтрака должно быть в рамках СВНД, и также состоять преимущественно из продуктов, которые вызывают **быстрое обострение** ПБ, по объему в 1,5-2 раза с превышением своей нормы, причем пища должна быть быстро усваиваемая.

Предстоит разработать примерное индивидуальное меню.

После завтрака химус должен заполнить тонкий кишечник и дойти до баугиниевой заслонки не более чем за 3-4 часа. Главной целью такого завтрака является необходимость подпитать всю тонкокишечную микробиоту так, чтобы максимально увеличить темп поступления бактериальных продуктов (и в частности *bacDNA*) в системный кровоток. Известно, что прием пищи влечет быстрый рост тонкокишечной просветной и пристеночной микрофлоры, что в свою очередь вызывает рост поступления бактериальных продуктов в системный кровоток ([Ciampolini 1996](#)).

4. **Сдача теста.** Через 3-4 часа после завершения завтрака ПП должен прибыть в медлабораторию и сдать кровь. При этом применяются все меры предосторожности ([Mangul 2016](#), [Païssé 2016](#), [Potgieter 2015](#)), которые позволяют исключить (максимально снизить) контаминацию образцов крови кожной микрофлорой через иглу во время забора крови из вены, а также при их хранении, транспортировке и обработке. Количество и объем образцов крови, взятых у одного ПП, определяется требованиями последующих тестов. Между моментом сдачи крови и моментом выделения из нее *DNA* образец крови должен храниться и транспортироваться в условиях, которые максимально снижают темп деградации фагоцитами крови бактериальных продуктов (как эндцитированных ранее, так и содержащихся в биоматериале). С этой же целью должно быть минимизировано время между этими двумя моментами.

5. **Выделение *DNA*.** Исследуется цельная кровь или только фагоциты крови (решение предстоит принять при доработке проекта). Пробоподготовка аналогична ([Païssé 2016](#)), т.е. разрушаются все клетки крови, чтобы из них высвободилась вся ранее эндцитированная (связанная) *hhDNA*. При этом (к сожалению) также высвобождается *hDNA*. Затем образец стандартно очищается от всего, кроме *DNA*.

6. **Определение суммарной концентрации *DNA*.** Определяется суммарная концентрация всей *DNA* в образце, либо только *bacDNA* ([Bhat 2016](#), [Glassing 2016](#), [Grumaz 2016](#), [Païssé 2016](#)). Это необходимо для подготовки биоматериала для последующего секвенирования, а также для нормирования относительных результатов WMS-теста после того, как они будут получены.

Также для нормирования выполняют формирование стандартных кривых для растворов, содержащих от  $1$  до  $10^7$  копий 16S (последовательно с 10-ти кратным разбавлением), в (Païssé 2016) с этой целью был использован раствор 16S плазмиды штамма BL21 Escherichia coli.

Альтернативно может быть применен метод «внутреннего стандарта» - добавления в образец конкретного количества (около 1% от суммарной ожидаемой величины) DNA характерной бактерии. Такой бактерии, DNA которой заведомо не может присутствовать в данном биоматериале (Tan 2015). Это позволит выполнить нормировку по соотношению между ее исходной концентрацией в образце и количеству ридов, которые будут картированы на ее геном по данным WMS-теста.

**7. Элиминация hDNA.** Из образца максимально элиминируется hDNA, но так, чтобы сохранилась nhDNA. Целью является максимальное обогащение (повышение концентрации) nhDNA в образце (при сохранении пропорций ее спектра). Вес одной hDNA составляет  $3,6 \cdot 10^{-12}$  г и после разрушения клеток крови концентрация hDNA составила в среднем  $2,73 \cdot 10^{-5}$  г/мл (основной вклад вносят лейкоциты) (Païssé 2016). Это существенно превышает ожидаемую концентрацию nhDNA. По результатам этой же работы можно оценить концентрацию bacDNA. Количество bacDNA в цельной крови доноров составило в среднем  $7,2 \cdot 10^6$  шт/мл (в пересчете для E.coli, вес bacDNA которой составляет  $5 \cdot 10^{-15}$  г). Тем самым концентрация bacDNA в среднем составила  $3,6 \cdot 10^{-8}$  г/мл (показана прямая корреляция с концентрацией лейкоцитов в крови). Для доноров отношение массовой концентрации hDNA к концентрации bacDNA в цельной крови после разрушения всех клеток в среднем составило около 750.

Ожидается, что для ПП это соотношение будет существенно ниже из-за постоянного интенсивного поступления бактериальных продуктов в кровь. Но даже если оно будет находиться в диапазоне 200-400, то все равно необходимо выполнять предварительную элиминацию hDNA.

От того насколько успешной и качественной будет такая элиминация зависит трудоемкость, качество и степень достоверности результатов последующего WMS-теста (Song 2014).

Существует много различных методов выполнения предварительной элиминации hDNA (Applications 2015, Archer 2010, Ferretti 2017, Fitting 2012, Gyarmati 2016, Opota 2015, Song 2014, Yigit 2016, Zhou 2012), так что предстоит выбрать наиболее оптимальный вариант из стандартных. Сравнение стандартных тест-наборов [NebNext Microbiome DNA Enrichment](#) и [LOOXSTER® Enrichment Kit](#) было выполнено в конце раздела 2.1.

**8. WMS-тест.** Для образца, полученного после элиминации hDNA, выполняется стандартный WMS-тест. Полученные результаты обрабатываются (удаляются риды, принадлежащие hDNA, а также ошибочные риды), а затем осуществляется сборка оставшихся ридов в контиги и картирование на NCBI RefSeq (референсную геномную БД). Наиболее оптимально и подробно это описано в (Grumaz 2016).

В результате получается спектр относительной представленности nhDNA. Абсолютные значения (концентрации) nhDNA в цельной крови вычисляются после нормирования исходя из того, какой метод был выбран (пункт 6). Контрольные тесты, выполненные заранее (до выполнения WMS-тестов для всех ПП) позволяют оценить точность полученных результатов и исключить из последующего изучения информацию с низкой достоверностью (в частности исключить информацию о nhDNA, представленность которой ниже конкретного %).

**9. Определение уровня PAMP-немии.** Определение Q6 - концентрации LPS в биоматериале с помощью одного из стандартных тестов: LAL-тест или EAA-тест. Определение Qs – суммарной концентрации PG и (1,3)-beta-D-глюкана в биоматериале с помощью SLP-теста. Определение Qg – концентрации (1,3)-beta-D-глюкана с помощью одного из стандартных тестов. Определение Q7 концентрации PG, исходя из Qs и Qg (Таблица 3. Задачи 1.6 и 1.7).

**10. bacDNA - аналитика и поиск корреляций.** Предполагается, что в полном спектре bacDNA достоверную долю будут составлять виды патогенных и предполагаемых псоразными бактерий.

10.1. Для всех Gram(-) видов. Определение Q0 – суммарной концентрации bacDNA Gram(-) видов (ответственных за LPS-нагрузку). Изучение ортологов генов lpxL (K02517) и lpxM (K02560), ответственных за TLR4 активность LPS. Подсчет суммарной концентрации таких видов – Q1. Согласование параметров Q0, Q1 и Q6. (Таблица 3. Задачи 3.1 и 3.2).

10.2. Для всех Gram+ видов. Подсчет суммарной концентрации всех Gram+ видов – Q2. Изучение ортологов генов энзимов murM (K12554) и murN (K05363), ответственных за формирование пептидогликана PG-Y. При этом возможно выявление новых видов, предполагаемых псоразными (отличных от перечисленных на слайде [PG PsB-3](#)). Подсчет суммарной концентрации таких видов – Q3. Согласование параметров Q2 и Q7 (Таблица 3, Задачи 3.3 и 3.4).

10.3. Поиск прямых корреляций между этими параметрами и PASI. Наличие таких корреляций является серьезным фактом в поддержку гипотез H2 и H3. Отсутствие корреляций ставит эти гипотезы под сомнение.

11. **nhDNA (отличная от bacDNA)**. WMS-тест дает возможность выявить DNA грибов, гельминтов, вирусов, фагов. При обнаружении существенного количества DNA грибов, гельминтов и вирусов должны быть назначены дополнительные исследования, направленные на поиск локализации инфекционного процесса.

#### 4.5. Алгоритм разделения MPPS на фракции

##### 4.5.1. Переопределение принадлежности фракции M путем повторного картирования на референсные штаммы

После выделения фракции R происходит проверка всех видов фракции M на возможность разделения на штаммы и переопределение принадлежности этих штаммов фракциям. Действительно один и то же вид может колонизировать и кожу и слизистую ВДП (или ЖКТ), но с учетом существенно различных условий (температура, влажность, доступность кислорода и т.д.), есть все основания предполагать, что в большинстве случаев это будут различные штаммы этого вида ([Chng 2016](#), [Oh 2014](#)).

Дальнейшие действия предназначены для исключения из фракции M (перевод во фракцию R) всех штаммов, имеющих только резидентное происхождение. Это существенно повысит эффективность второй части алгоритма (4.5.2).

Для каждого вида фракции M формируется референсный подкаталог, состоящий из всех штаммов вида k, имеющихся в референсных БД (это возможно, если в геномных БД имеются геномы более, чем одного штамма вида k).

После этого выполняется повторное картирование на референсный подкаталог штаммов каждого из двух подмножеств ридов (из WMS-тестов крови и кожи), которые первоначально картировались на вид k. Алгоритм повторного картирования (основанный на уникальных SNP – однонуклеотидных полиморфизмах) был применен при изучении биогеографии штаммов *Propionibacterium acnes* и *Staphylococcus epidermidis* ([Oh 2014](#), слайд [Skin-WMS-18-3](#)), а также при определении относительного присутствия штаммов *Staphylococcus aureus* ([Chng 2016](#), слайд [Skin-AtD-WGS-Strain](#)). Также существуют [несколько ПО](#) (в частности *MetaPhlan2*: [Ferretti 2017](#), [Truong 2015](#)), с помощью которых можно выполнить такое картирование с высокой достоверностью.

Для всех штаммов вида k, получивших достаточное покрытие при вторичном картировании, переопределяется принадлежность фракции M. Если штамм есть в MPB и MPPS, то он остается во фракции M, если штамм есть в MPB, но его нет в MPPS, то он исключается из фракции M, если штамм отсутствует в MPB, но есть в MPPS, то он переходит из фракции M во фракцию R.

После выполнения повторного картирования и переопределения принадлежности в общей фракции M останутся только общие для MPPS и MPB виды и штаммы.

##### 4.5.2. Разделение обновленной общей фракции M на нерезидентную и смешанную.

Далее общая фракция M разделяется на нерезидентную N и смешанную RuN фракции. Это происходит путем выделения нерезидентной фракции N. Опишем этот алгоритм упрощенно.

По результатам WMS-тестов для каждого вида (штамма) k фракции M известны его покрытия в MPPS и в MPB, определяемые по формулам (1) и (2).

$$(1) \quad PS(k) = (\text{сумма длин ридов в MPPS, картированных на геном } k) / (\text{размер генома } k)$$

$$(2) \quad PB(k) = (\text{сумма длин ридов в MPB, картированных на геном } k) / (\text{размер генома } k)$$

Определим для всех видов k (кроме тех, для которых  $PB(k)=0$ ) отношение покрытий:

$$(3) \quad z(k) = PS(k) / PB(k)$$

Вначале включим в нерезидентную фракцию N такие виды k, которые заведомо не могут существовать в коже (например гельминты, хеликобактеры, облигатные анаэробы и т.д). Они составят основу нерезидентной фракции N. Вычислим среднее арифметическое

$$(4) \quad Z = 1/L * \sum z(k),$$

где сумма берется по всем видам k, включенным в N (их всего L).

Вычислим девиацию (среднеквадратичное отклонение):

$$(5) \quad DZ = \sqrt{1/L * \sum (z(k)-Z)^2},$$

где сумма в подкоренном выражении берется по всем видам k, включенным в N (их всего L).

Предполагается, что для всех видов k, которые еще предстоит включить во фракцию N, будет верно:

$$(6) \quad z(k) \leq Z + 3*DZ$$

А для тех видов k, которые останутся во фракции RuN, будет верно

$$(7) \quad z(k) > Z + 3*DZ$$

Причем Z и DZ пересчитываются при каждом добавлении нового вида k во фракцию N.

Покрытия нерезидентного и резидентного происхождения для каждого вида (штамма) k фракции RuN определяются по формулам (8) и (9).

$$(8) \quad Z*PB(k) \quad - \text{покрытие нерезидентного происхождения};$$

$$(9) \quad PS(k) - Z*PB(k) \quad - \text{покрытие резидентного происхождения};$$

Фракция RuN может содержать виды (штаммы) k, которые попали в кровь случайно - вследствие недавней травмы и/или инфекционного воспаления дермы. Кроме того возможна контаминация биоматериала крови кожной микрофлорой во время венепункции. Эти два случая можно определить, если  $Z \ll z(k)$ , т.е. в случае очень малого нерезидентного вклада.

Основой же фракции RuN будут такие виды (штаммы) (например Staph. aureus), которые являются резидентными как для псориазической кожи, так и для слизистой тонкого кишечника и/или ВДП и, следовательно, их phDNA поступает в кровь и есть в МРВ.

Затем вычисляются

$$(10) \quad TPSN = Z*\sum PB(k) \quad - \text{сумма покрытий нерезидентного происхождения в МРВ};$$

$$(11) \quad TPS = \sum PS(k) \quad - \text{сумма всех покрытий в МРВ};$$

И определяется

$$(12) \quad MT = TPSN/TPS \quad - \text{доля покрытий в МРВ нерезидентного происхождения};$$

Аналогичным образом можно будет определить доли покрытий в МРВ (и их концентрации) резидентного и нерезидентного происхождения для bacDNA патогенных бактерий и бактерий, предполагаемых псоразгенными. Подробное описание алгоритма, кратко изложенного в этом подразделе, содержится в Приложении BS (формулы для концентраций, ссылка на файл в подразделе 4.8).

На слайде [MPPS-example](#) в графическом виде приведен результат выполнения предложенного алгоритма на тестовом примере (значения и формулы для концентраций). Исходные данные для тестового примера находятся на листе "Задача2-П2-(KZ хорош)-" в Excel-файле "Параметры-примеры" (ссылка на файл в подразделе 4.8).

#### 4.6. Точные и оценочные параметры метагеномов фагоцитов крови и кожи.

Таблица 5. Точные и оценочные параметры.

Параметр		Единица	Кол-во	Примечания
<b>MPV (метагеном фагоцитов крови)</b>				
Фагоциты крови	ЗП	шт/мл	5,14E+06	
Фагоциты крови	ПП	шт/мл	6,50E+06	Выше, чем у ЗП на 10-15%
V - объем крови взрослого человека		мл	5000	
APV - проба (кровь из вены)		мл	30	Больше редко берут
Фагоцитов в V	ПП	шт	3,25E+10	
Фагоцитов в пробе APV	ПП	шт	1,95E+08	
bacDNA во всех фагоцитах крови	ЗП	шт/мл	7,24E+06	<a href="#">Païssé 2016</a>
bacDNA в одном фагоците крови	ЗП	шт/шт	1,41	
nhDNA в одном фагоците крови	ПП	шт/шт	2	Для ПП взято больше. Для nhDNA взято больше.
TPV - концентрация всех nhDNA в фагоцитах крови	ПП	шт/мм3	13000	В тестовом примере взята эта величина
TVB - все nhDNA в фагоцитах V	ПП	шт	6,50E+10	
TPV - все nhDNA в выборке APV	ПП	шт	3,90E+08	Сумма покрытий в целом
RPV=APV/V - доля выборки			0,0060	оно же TPV/TVB
<b>MPPS (метагеном фагоцитов псориатической кожи)</b>				
Площадь кожи взрослого человека		мм2	1,80E+06	
Площадь псориатического поражения		%	5%	
S - псориатическая кожа (площадь)	ПП	мм2	9,0E+04	
Фагоциты в здоровой коже	ЗП	шт/мм2	1540	Расчетное по нескольким работам (сумма по всем типам фагоцитов в эпидермисе и дерме на основании реальных срезов) в верхнем слое толщиной около 0,5 мм
Фагоциты в псориатической коже (средне-тяжелый) под мм2	ПП	шт/мм2	20500	
Фагоциты в псориатической коже (средне-тяжелый) концентрация в верхнем слое толщиной LD (рекомендованная глубина проникновения панча)	ПП	шт/мм3	41000	Не менее чем, поскольку в этом объеме попадут некоторые фагоциты из дермальной жировой ткани (adipose tissue).
Диаметр панча		мм	3	Повышая - увеличиваем APS
LD - толщина верхнего слоя псориатической кожи = глубина проникновения панча		мм	0,5	Достаточно, чтобы при средне-тяжелом псориазе захватить весь эпидермис и всю дерму
Площадь биоптата из панча		мм2	7,07	
Объем биоптата из панча		мм3	3,53	
Количество биоптатов		шт	4	Повышая - увеличиваем APS
Выборка APS - биоптаты псориатической кожи		мм2	28,27	Суммарная площадь

**Таблица 5. Точные и оценочные параметры. Продолжение.**

Параметр		Единица	Кол-во	Примечания
Фагоцитов в S		шт	1,85E+09	
Фагоцитов в выборке APS		шт	5,80E+05	
bacDNA в нефолликулярной дерме	ЗП	КОЕ/мм3	25000	в норме по данным (Nakatsuji 2013) и (Fahlen 2012)
Толщина дермы	ЗП	мм	0,20	
bacDNA в нефолликулярной дерме	ЗП	КОЕ/мм2	5000	
bacDNA в одном дермальном фагоците кожи	ЗП	шт/шт	3,25	В предположении, что КОЕ соответствует 1 bacDNA и все они внутри фагоцитов.
nhDNA в одном фагоците псориатической кожи	ПП	шт/шт	2	Принято равным содержанию в фагоцитах крови (но наверное будет выше). Больше, чем bacDNA.
TPS - концентрация всех nhDNA в фагоцитах верхнего слоя (LD мм) псориатической кожи	ПП	шт/мм3	82000	Как в тестовом примере
Z условный	ПП		0,3	Как в тестовом примере
TPSN=Z*TPB	ПП	шт/мм3	3900	Нерезидентная часть концентрации TPS
TPSR=TPS-TPSN	ПП	шт/мм3	78100	Резидентная часть концентрации TPS
MT=TPSN/TPS	ПП		0,0476	Как в тестовом примере
TVS - все nhDNA во всех фагоцитах S	ПП	шт	3,69E+09	
TPS - все nhDNA во всех фагоцитах выборки APS	ПП	шт	1,16E+06	Сумма покрытий в целом
RPS=APS/S - доля выборки	ПП		0,00031	равно отношению площади биоптатов к площади всех псориатических высыпаний

**Примечание:** Параметры на желтом фоне – переменные, выделенные красным шрифтом - производные от других. Исходная таблица находится в Excel-файле "Параметры-Примеры" (Лист «Задача 2 – Параметры») (ссылка на файл в подразделе 4.8).

#### 4.7. Ресурсы по метагеномным исследованиям и секвенированию.

Наименование	Описание. Примечания
<a href="#">HMP (Human Microbiome Project)</a>	Вся информация о микроорганизмах, живущих на и в человеческом теле (проект основан в 2008), содержит информацию о более чем 3000 геномах.
<a href="#">KEGG</a>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (более 4000 геномов)
<a href="#">MetaHIT</a>	Кишечная микрофлора. Проект завершен в 2012 г.
<a href="#">Integrated gene catalog (IGC)</a>	Каталог генов кишечной микрофлоры
<a href="#">NCBI Reference Sequence (RefSeq) Database</a>	NCBI. Референсная БД геномов. <a href="#">Статистика.</a>
<a href="#">NCBI.Genbank</a>	NCBI. БД геномов. ~ 86000 геномов прокариотов, в т.ч. ~ 6500 полных.
<a href="#">NCBI Microbial Genomes Resources</a>	NCBI. БД геномов бактерий. Таксономическое дерево.
<a href="#">NCBI. Sequence Read Archive</a>	NCBI. БД метагеномных проектов.
<a href="#">Genomes OnLine Database</a>	БД геномов.
<a href="#">MG-RAST</a>	БД метагеномных проектов.
<a href="#">Allseq. The Sequencing Marketplace.</a>	Информация о секвенаторах.
<a href="#">Genohub</a>	Информационный ресурс по методам секвенирования и выбору провайдера. Поиск провайдера.
<a href="#">Science Exchange</a>	Информационный ресурс по методам секвенирования и выбору провайдера. Поиск провайдера.
<a href="#">Omictools</a>	Поиск программного обеспечения для обработки результатов биологических исследований (в.ч. метагеномных)
<a href="#">Center for Genomic Epidemiology</a>	Ресурс для врачей-инфекционистов
<a href="#">The European Bioinformatics Institute. Metagenomics.</a>	БД метагеномных проектов.

#### 4.8. Дополнительная информация (ссылки на файлы)

- [Приложение BS. Постановка и анализ задачи о нехозяйской DNA \(nhDNA\) в двух емкостях, однонаправленно связанных \(B – кровь, S – псориатическая кожа\).](#)
- [Параметры-примеры \(Excel-файл\).](#)
- [Расчет стоимости Программы НИР1 \(Excel-файл\).](#)
- [Анкета псориатического пациента](#)
- [Низкомикробная диета](#)



## 5. Иллюстрации (слайды)

	Имя слайда (листа)	Заголовок	Число ссылок	
			Проект	Питч
1.	<a href="#">Razdel1</a>	Раздел 1. Вопросы НИР1. Псориазная болезнь – факты и гипотезы. Системный псориазная процесс SPP как основа Y-модели патогенеза.		1
2.	<a href="#">Psoriatic_disease</a>	Эпидермис при псориазе и в норме		1
3.	<a href="#">Patient_Stat-C</a>	Статистика заболеваемости ПБ по странам.	1	1
4.	<a href="#">Patient_Stat-R</a>	Статистика заболеваемости в РФ. Оценка числа псориажных пациентов в мире.	1	1
5.	<a href="#">Basic_research</a>	Базовые исследования		1
6.	<a href="#">Permeability-1</a>	Трансклеточная тонкокишечная проницаемость при псориазе. Тест с D-ксилозой.		1
7.	<a href="#">Permeability-2</a>	Межклеточная тонкокишечная проницаемость при псориазе. Овальбуминовый тест.		(1)
8.	<a href="#">SIBO-1</a>	Тонкокишечный СИБР при псориазе.		1
9.	<a href="#">SIBO-2</a>	Тонкокишечный СИБР при псориазе.		(1)
10.	<a href="#">SIBO-3</a>	Тонкокишечный СИБР при псориазе. Просветная микрофлора проксимальной части.		(1)
11.	<a href="#">SIBO_Moscow</a>	Микрофлора тонкой кишки псориажных пациентов в зоне связки Трейца, Ig(KOE/мл).	1	(1)
12.	<a href="#">PAMP,TLR,NOD</a>	PAMP, структура и локализация TLR2, TLR4, NOD1 и NOD2	1	
13.	<a href="#">PG_PsB-1</a>	Структура пептидогликана и PsB.	1	1
14.	<a href="#">PG_PsB-2</a>	Биосинтез пептидогликана.	1	(1)
15.	<a href="#">PG_PsB-3</a>	Виды Gram+ бактерий с межпептидными мостиками (L-Ala)-(L-Ala) или (L-Ser)-(L-Ala). База данных KEGG.	4	(1),1
16.	<a href="#">PG_PsB-4</a>	Муропептиды и пептиды, образующиеся при деградации пептидогликана Str.pneumonia.	1	(1)
17.	<a href="#">PG_PsB-5</a>	Пептид B13-2 – потенциальный Y-антиген.	1	(1)
18.	<a href="#">PG_PsB-6</a>	Пептид Y-B11 – потенциальный Y-антиген.	1	
19.	<a href="#">LPS_PG</a>	Псориаз и эндотоксемия (LPS-немия). Методы оценки концентрации LPS и PG в крови.	1	2
20.	<a href="#">BF-model</a>	BF-модель патогенеза (B.Baker & L.Fry, 2006-7).		
21.	<a href="#">Y-model</a>	Y-модель патогенеза (М.Песляк, 2012).	1	1
22.	<a href="#">Symbols</a>	Условные обозначения		
23.	<a href="#">SP1+SP2 to SP4</a>	SPP. Два первопричинных подпроцесса.		1
24.	<a href="#">SPP</a>	Системный псориажная процесс SPP и некоторые локальные процессы.	2	2
25.	<a href="#">SPP-basis_T+C</a>	Две компоненты SPP-базиса: толеризация фагоцитов и их (PG-Y)-носительство.		1
26.	<a href="#">SPP-basis_T</a>	Pre-SPP. Толеризация.		(1)
27.	<a href="#">SPP-basis_C</a>	(PG-Y)-носительство		(1)

Иллюстрации (слайды). Продолжение.

	Имя слайда (листа)	Заголовок	Число ссылок	
			Проект	Питч
28.	<a href="#">Tolerized monocytes</a>	Толеризованные Мо-Т и DC-Т		1
29.	<a href="#">Monocyte fractionation</a>	Распределение моноцитов по времени пребывания в кровотоке		1
30.	<a href="#">Monocyte chemostatus</a>	Трансформации и хемотатус CD14+CD16+ моноцитов		
31.	<a href="#">SPP hypothesis</a>	Системный псориазный процесс SPP. Гипотезы.	2	1
32.	<a href="#">Local hypothesis</a>	Локальные процессы. Гипотезы.	1	1
33.	<a href="#">Razdel2</a>	Раздел 2. Метагеномное секвенирование. Метагеном крови. Метагеном кожи. ----- Фагоциты кожи в норме и при псориазе. Комплексное изучение метагеномов фагоцитов крови и фагоцитов псориазной кожи. ----- Цели и задачи НИР1.		
34.	<a href="#">Blood Psor</a>	VacDNA в плазме крови псориазных пациентов (16S-тест)	2	
35.	<a href="#">Blood_WMS_and_Culture</a>	Патогены, определенные культуральным методом (BC) и NGS (WMS-тест) в плазме крови	2	
36.	<a href="#">Blood-bacDNA</a>	VacDNA в крови здоровых персон	1	
37.	<a href="#">Blood-Germany</a>	Характеристики плазмы крови (7 пациентов с сепсисом, 12 ЗП, WMS-тест)	2	
38.	<a href="#">Skin-bacDNA</a>	Бактериальная ДНК в псориазной и здоровой коже (16S-тест)	2	
39.	<a href="#">Derm-16S-1</a>	Бактериальная ДНК в эпидермисе и дерме непсориазных пациентов (16S-тест)	1	
40.	<a href="#">Derm-16S-2</a>	Бактериальная ДНК в эпидермисе и дерме непсориазных пациентов (16S-тест)	1	
41.	<a href="#">Healthy-skin</a>	Микроорганизмы (в т.ч. бактерии и vacDNA) в здоровой коже. Предположения и факты.	1	
42.	<a href="#">Skin_Bacteria_3D</a>	Бактериальная ДНК на здоровой коже мужчины (1) и женщины (2). 16S-тест.	2	
43.	<a href="#">Skin-WMS-18-1</a>	Биогеография кожи (15 ЗП, WMS-тест). Мазки с 18 участков.	1	
44.	<a href="#">Skin-WMS-18-2</a>	Биогеография кожи (15 ЗП, WMS-тест). Основные результаты.	2	
45.	<a href="#">Skin-WMS-18-3</a>	Биогеография кожи (15 ЗП, WMS-тест). Детализация для двух распространенных видов (P.acnes и Staph.epidermidis) с точностью до штаммов.	1	
46.	<a href="#">Skin-AtD-WMS-genus</a>	Метагеном кожи (15 ЗП SPT(-), 19 AtD+, 5 ЗП SPT+, WMS-тест). Относительное присутствие нескольких родов.	1	
47.	<a href="#">Skin-AtD-WMS-Strep</a>	Метагеном кожи (15 ЗП SPT(-), 19 AtD+, 5 ЗП SPT+, WMS-тест). Относительное присутствие видов Streptococcus sp.	1	
48.	<a href="#">Skin-AtD-WMS-Staph</a>	Метагеном кожи (19 AtD+, 15 ЗП SPT(-), 5 ЗП SPT+, WMS-тест). Относительное присутствие видов Staphylococcus sp.	1	
49.	<a href="#">Skin-AtD-WGS-Strain</a>	Метагеном кожи (19 AtD+, 15 ЗП SPT(-), 5 ЗП SPT+, WMS-тест). Относительное присутствие штаммов Staphylococcus aureus.	2	

**Иллюстрации (слайды). Продолжение.**

	Имя слайда (листа)	Заголовок	Число ссылок	
			Проект	Питч
50.	Razdel2a	Фагоциты кожи в норме и при псориазе. Комплексное изучение метагеномов фагоцитов крови и фагоцитов псориазической кожи.		
51.	<a href="#">Skin_2D</a>	Дендритные клетки, макрофаги и Т-лимфоциты в здоровой коже	1	
52.	<a href="#">Skin_3D</a>	Дендритные клетки, макрофаги и Т лимфоциты в здоровой коже (3D)	1	
53.	<a href="#">Neutrophils</a>	Нейтрофилы в здоровой и псориазической коже	1	
54.	<a href="#">Neutrophils-Munro</a>	Нейтрофилы в псориазическом эпидермисе (абсцессы Мунро)	1	
55.	<a href="#">Macrophages</a>	Макрофаги в здоровой и псориазической коже	1	
56.	<a href="#">Dendritic_Cells</a>	Дендритные клетки в здоровой и псориазической коже	1	
57.	<a href="#">Phagocytes-1</a>	Привлечение фагоцитов крови в кожу при средне-тяжелом псориазе.	1	2
58.	<a href="#">Biotransfer</a>	Схема присутствия и перемещения нехозяинского биоматериала между органами	1	1
59.	<a href="#">Phagocytes-2</a>	Нехозяинский биоматериал поступает в псориазическую кожу внутри фагоцитов крови (гипотеза H10-S).	1	3
60.	<a href="#">2Pools-D</a>	Метагеномы фагоцитов крови и фагоцитов псориазической кожи в динамике.	1	
61.	<a href="#">2Pools-S</a>	Метагеномы фагоцитов крови и фагоцитов псориазической кожи при ее стабильном состоянии. Мгновенный срез.	1	
62.	<a href="#">Phagocytes selection</a>	Отбор фагоцитов из крови и псориазической кожи иммуномагнитным методом	1	1
63.	<a href="#">nhDNA-MPPS</a>	Предполагаемые фракции метагенома фагоцитов псориазической кожи MPPS	1	1
64.	<a href="#">MPPS-example</a>	Алгоритм разделения метагенома фагоцитов псориазической кожи MPPS на фракции и подмножества. Пример.	1	1
65.	<a href="#">Questions</a>	Главные вопросы и возможные ответы	1	2
66.	<a href="#">Main_Goals</a>	Главные цели НИР1	1	1
67.	<a href="#">Task1</a>	Задача 1 (практическая). Определение МРВ - метагенома фагоцитов крови. Определение уровня PAMP-немии.	1	
68.	<a href="#">Task2</a>	Задача 2 (практическая). Определение MPPS - метагенома фагоцитов псориазической кожи.	1	
69.	<a href="#">Task3</a>	Задача 3 (аналитическая). Изучение МРВ – метагенома фагоцитов крови и PAMP-немии в комплексе. Проверка гипотез H2 и H3.	1	
70.	<a href="#">Task4</a>	Задача 4 (аналитическая). Изучение МРВ и MPPS в комплексе. Проверка гипотезы H10-S.	1	
71.	<a href="#">Participation Order</a>	Порядок участия псориазических пациентов (ПП) в Программе НИР1	1	1
72.	<a href="#">Requirements</a>	Требования к ПП. Заболевания или зависимости, наличие которых не допускается.	1	
73.	<a href="#">NIR1-2-plan</a>	План НИР на 2017-8 гг.	1	
74.	<a href="#">NIR1-2-bio</a>	Пациенты, типы биоматериалов и число WMS-тестов	1	
75.	<a href="#">LST</a>	Лаважный СИБР-тест. Интегральный смыв пристеночной микрофлоры. Лаважные воды как биоматериал для изучения микрофлоры ЖКТ.		
76.	<a href="#">Organizations</a>	Участники и исполнители НИР1		1
77.	<a href="#">NIR1-2-ptasks</a>	Задачи, которые необходимо решить до начала выполнения НИР1	1	

**Примечание.** Возможность открывать конкретный слайд презентации по имени не реализована в Adobe Reader и Foxit Reader, но реализована в [Sumatra Reader](#). Именно поэтому все ссылки на слайды организованы через Sumatra (все необходимые файлы для ее работы идут в комплекте с файлами НИР1).

## 6. Библиография

- Alekseyenko AV, Perez-Perez GI, De Souza A. et al. Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis. *Microbiome*. 2013 Dec 23;1(1):31. [24451201](#).
- Amar J, Lange C, Payros G. et al. Blood microbiota dysbiosis is associated with the onset of cardiovascular events in a large general population: the D.E.S.I.R. study. *PLoS One*. 2013;8(1):e54461. [23372728](#).
- Amar J, Serino M, Lange C. et al. Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia*. 2011 Dec;54(12):3055-61. [21976140](#).
- Applications of Clinical Microbial Next-Generation Sequencing. Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, in April 2015. p.56. [link](#).
- Archer MJ, Long N, Lin B. Effect of probe characteristics on the subtractive hybridization efficiency of human genomic DNA. *BMC Res Notes*. 2010 Apr 20;3:109 [20406484](#).
- a Baker BS, Laman JD, Powles AV. et al, Peptidoglycan and peptidoglycan-specific Th1 cells in psoriatic skin lesions, *J Pathol* 2006 Jun;209(2):174-81. [16493599](#).
- b Baker BS, Powles A, Fry L. Peptidoglycan: a major aetiological factor for psoriasis? *Trends Immunol*. 2006 Dec;27(12):545-51. [17045843](#).
- Barreto-Bergter E, Figueiredo RT. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014 Oct 14;4:145. [25353009](#).
- Bhat S, Emslie KR. Digital polymerase chain reaction for characterisation of DNA reference materials. *Biomol Detect Quantif*. 2016 May 3;10:47-49. [27990349](#).
- Bousslimani A, Porto C, Rath CM et al. Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 28;112(17):E2120-9. [25825778](#).
- Bui NK, Eberhardt A, Vollmer D. et al. Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Anal Biochem*. 2012 Feb 15;421(2):657-66. [22192687](#).
- Chng KR, Tay AS, Li C. et al. Whole metagenome profiling reveals skin microbiome-dependent susceptibility to atopic dermatitis flare. *Nat Microbiol*. 2016 Jul 11;1(9):16106. [27562258](#).
- Ciampolini M, Bini S, Orsi A. Microflora persistence on duodenum-jejunal flat or normal mucosa in time after a meal in children. *Physiol Behav*. 1996 Dec;60(6):1551-6. [8946504](#).
- Davey MS, Morgan MP, Liuzzi AR. et al. Microbe-specific unconventional T cells induce human neutrophil differentiation into antigen cross-presenting cells. *J Immunol*. 2014 Oct 1;193(7):3704-16. [25165152](#).
- Dinakaran V, Rathinavel A, Pushpanathan M. et al. Elevated levels of circulating DNA in cardiovascular disease patients: metagenomic profiling of microbiome in the circulation. *PLoS One*. 2014 Aug 18;9(8):e105221. [25133738](#).
- Fahlen A, Engstrand L, Baker BS, Powles A, Fry L. Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res*. 2012 Jan;304(1):15-22. [22065152](#).
- Feehery GR, Yigit E, Oyola SO. et al. A method for selectively enriching microbial DNA from contaminating vertebrate host DNA. *PLoS One*. 2013 Oct 28;8(10):e76096. [24204593](#).
- Ferretti P, Farina S, Cristofolini M. et al. Experimental metagenomics and ribosomal profiling of the human skin microbiome. *Exp Dermatol*. 2017 Mar; 26(3):211-219. [27623553](#).
- Filipe SR, Severina E, Tomasz A. Distribution of the mosaic structured murM genes among natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 2000 Dec;182(23):6798-805. [11073926](#).
- Fitting C, Parlato M, Adib-Conquy M. et al. DNAemia detection by multiplex PCR and biomarkers for infection in systemic inflammatory response syndrome patients. *PLoS One*. 2012;7(6):e38916. [22719987](#).
- Frey KG, Bishop-Lilly KA. Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection and Identification. Chapter 15 in *Methods in Microbiology*. Volume 42, 2015, 525–554. ISSN 0580-9517. [link](#).
- Fry L. Microbiome of chronic plaque psoriasis. Chapter 21 in *The Human Microbiota and Chronic Disease: Dysbiosis as a Cause of Human Pathology*. 2016, John Wiley & Sons, Inc. ISBN [9781118982877](#), [link](#).
- Fry L, Baker BS, Powles AV, Fahlen A, Engstrand L. Is chronic plaque psoriasis triggered by microbiota in the skin? *Br J Dermatol*. 2013 Jul;169(1):47-52. [23521130](#).
- Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Zaba LC et al. A Subpopulation of CD163-Positive Macrophages Is Classically Activated in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 2010 Oct; 130:2412-2422. [20555352](#).
- Fukui H. Endotoxin and Other Microbial Translocation Markers in the Blood: A Clue to Understand Leaky Gut Syndrome. *Cell Mol Med* 2016, 2:3. [link](#).

- Gao Z, Tseng CH, Strober BE. et al. Substantial alterations of the cutaneous bacterial biota in psoriatic lesions. PLoS ONE. 2008 Jul 23;3(7):e2719. [18648509](#).
- Garcia-Garcera M, Garcia-Etxebarria K, Coscolla M, Latorre A, Calafell F. A new method for extracting skin microbes allows metagenomic analysis of whole-deep skin. PLoS One. 2013 Sep 20;8(9):e74914. [24073227](#).
- Gilliet M, Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. Curr Opin Immunol. 2008 Aug;20(4):401-7. [18611439](#).
- Glassing A, Dowd SE, Galandiuk S. et al. Changes in 16s RNA Gene Microbial Community Profiling by Concentration of Prokaryotic DNA. J Microbiol Methods. 2015 Dec;119:239-42. [26569458](#).
- Glassing A, Dowd SE, Galandiuk S, Davis B, Chiodini RJ. Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. Gut Pathog. 2016 May 26;8:24. [27239228](#).
- Gnauck A, Lentle RG, Kruger MC. The Characteristics and Function of Bacterial Lipopolysaccharides and Their Endotoxic Potential in Humans. Int Rev Immunol. 2016 May 3;35(3):189-218. [26606737](#).
- Gosiewski T, Ludwig-Galezowska AH, Huminska K. et al. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method - the observation of DNAemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017 Feb;36(2):329-336. [27771780](#).
- Gosiewski T, Szała L, Pietrzyk A. et al. Comparison of methods for isolation of bacterial and fungal DNA from human blood. Curr Microbiol. 2014 Feb;68(2):149-55. [24026449](#).
- Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. Immunol Rev. 2016 Sep;273(1):357-70. [27558346](#).
- Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. Nat Rev Microbiol. 2011 Apr;9(4):244-53. [21407241](#).
- Grumaz S, Stevens P, Grumaz C. et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. Genome Med. 2016 Jul 1;8(1):73. [27368373](#).
- Guttman-Yassky E, Nogales KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis-Part II: Immune cell subsets and therapeutic concepts. J Allergy Clin Immunol., 2011 Jun;127(6):1420-32. [21419481](#).
- Gyarmati P, Kjellander C, Aust C. et al. Metagenomic analysis of bloodstream infections in patients with acute leukemia and therapy-induced neutropenia. Sci Rep. 2016 Mar 21;6:23532. [26996149](#).
- Hannigan GD, Meisel JS, Tyldsley AS. et al. The human skin double-stranded DNA virome: topographical and temporal diversity, genetic enrichment, and dynamic associations with the host microbiome. MBio. 2015 Oct 20;6(5):e01578-15. [26489866](#).
- Holler E, Butzhammer P, Schmid K. et al. Metagenomic Analysis of the Stool Microbiome in Patients Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation: Loss of Diversity Is Associated with Use of Systemic Antibiotics and More Pronounced in Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2014 May;20(5):640-5. [24492144](#).
- Ishihata K, Kakihana Y, Yasuda T. et al. Newly Developed Endotoxin Measurement Method (the Endotoxin Activity Assay) May Reflect the Severity of Sepsis. Open Journal of Pathology, Vol. 3 No. 1, 2013, pp. 1-6. [link](#)
- Jagielski T, Rup E, Ziółkowska A. et al. Distribution of Malassezia species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. BMC Dermatol. 2014 Mar 7;14(1):3. [24602368](#).
- Jovel J, Patterson J, Wang W. et al. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. Front Microbiol. 2016 Apr 20;7:459. [27148170](#).
- Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, Tremaroli V, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. Nat Commun. 2012;3:1245. [23212374](#).
- Komine M, Karakawa M, Takekoshi T. et al. Early inflammatory changes in the "perilesional skin" of psoriatic plaques: is there interaction between dendritic cells and keratinocytes? J Invest Dermatol. 2007 Aug;127(8):1915-22. [17446902](#).
- Lelouvier B, Servant F, Païssé S. et al. Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis. Hepatology. 2016 Dec;64(6):2015-2027. [27639192](#).
- Li G, Yang M, Zhou K. et al. Diversity of Duodenal and Rectal Microbiota in Biopsy Tissues and Luminal Contents in Healthy Volunteers. J Microbiol Biotechnol. 2015 Jul;25(7):1136-45. [25737115](#).
- Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R. et al. Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. J Immunol. 2011 Jul 1;187(1):490-500. [21606249](#).
- Lluch J, Servant F, Païssé S. et al. The Characterization of Novel Tissue Microbiota Using an Optimized 16S Metagenomic Sequencing Pipeline. PLoS One. 2015 Nov 6;10(11):e0142334. [26544955](#).

- Mangul S, Loohuis LMO, Ori A. et al. Total RNA Sequencing reveals microbial communities in human blood and disease specific effects. bioRxiv 057570; <http://dx.doi.org/10.1101/057570>.
- Meisel JS, Hannigan GD, Tyldsley AS. et al. Skin Microbiome Surveys Are Strongly Influenced by Experimental Design. *J Invest Dermatol*. 2016 May;136(5):947-56. [26829039](#).
- Michalek IM, Loring B, John SM. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Feb;31(2):205-212. [27573025](#).
- Munz OH, Sela S, Baker BS et al. Evidence for the presence of bacteria in the blood of psoriasis patients. *Arch Dermatol Res*. 2010 Sep;302(7):495-8. [20607546](#).
- Nagl M, Kacani L, Müllauer B. et al. Phagocytosis and Killing of Bacteria by Professional Phagocytes and Dendritic Cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002, Nov;9(6):1165-8. [12414745](#).
- Nakatsuji T, Chiang HI, Jiang SB. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. *Nat Commun*. 2013;4:1431. [23385576](#).
- Oh J, Byrd AL, Deming C. et al. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*. 2014 Oct 2;514(7520):59-64. [25279917](#).
- Okubo Y, Oki N, Takeda H, Amaya M. et al. Increased microorganisms DNA levels in peripheral blood monocytes from psoriatic patients using PCR with universal ribosomal RNA primers. *J Dermatol*. 2002 Sep;29(9):547-55. [12392062](#).
- Opota O, Jatou K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Apr;21(4):323-31. [25686695](#).
- Ozawa M, Terui T, Tagami H. Localization of IL-8 and complement components in lesional skin of psoriasis vulgaris and pustulosis palmaris et plantaris. *Dermatology*. 2005;211(3):249-55. [16205070](#).
- Païssé S, Valle C, Servant F. et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion*. 2016 May;56(5):1138-47. [26865079](#).
- Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 2012. 7:385–422 [22054142](#).
- Peslyak MY, Gumayunova NG, Nesterov AS, Potaturkina-Nesterova NI, Small intestine microflora at psoriasis. Its possible role in pathogenesis, Abstracts of the 3rd World Psoriasis & Psoriatic Arthritis Conference 2012, Stockholm, *Dermatol Ther* 2012, 2(10), S12. [link](#), [link-R](#).
- Plouffe BD, Murthy SK, Lewis LH. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. *Rep Prog Phys*. 2015 Jan;78(1):016601. [25471081](#).
- Potgieter M, Bester J, Kell DB, Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol Rev*. 2015 Jul;39(4):567-91. [25940667](#).
- Psifidi A, Dovas CI, Bramis G. et al. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PLoS One*. 2015 Jan 30;10(1):e0115960. [25635817](#).
- Ramírez-Boscá A, Navarro-López V, Martínez-Andrés A. et al. Identification of Bacterial DNA in the Peripheral Blood of Patients With Active Psoriasis. *JAMA Dermatol*. 2015 Jun;151(6):670-1. [25760018](#).
- Ranjan R, Rani A, Metwally A. et al. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 22;469(4):967-77. [26718401](#).
- Reich K, Papp KA, Matheson RT. et al. Evidence that a neutrophil-keratinocyte crosstalk is an early target of IL-17A inhibition in psoriasis. *Exp Dermatol*. 2015 Jul;24(7):529-35. [25828362](#).
- Sato J, Kanazawa A, Ikeda F. et al. Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2014 Aug;37(8):2343-50. [24824547](#).
- Sekine K, Toida T, Saito M. et al. A New Morphologically Characterized Cell Wall Preparation (Whole Peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a Higher Efficacy on the Regression of an Established Tumor in Mice. *Cancer Res*. 1985 Mar;45(3):1300-7. [3971375](#).
- Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jun;10(6):427-39. [20498669](#).
- Song Y, Giske CG, Gille-Johnson P. et al. Nuclease-assisted suppression of human DNA background in sepsis. *PLoS One*. 2014 Jul 30;9(7):e103610. [25076135](#).
- Statnikov A, Alekseyenko AV, Li Z. et al. Microbiomic signatures of psoriasis: feasibility and methodology comparison. *Sci Rep*. 2013 Sep 10;3:2620. [24018484](#).
- Stevenson M, Pandor A, Martyn-St James M, et al. Sepsis: the LightCycler SeptiFast Test MGRADE®, SepsiTest™ and IRIDICA BAC BSI assay for rapidly identifying bloodstream bacteria and fungi - a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2016 Jun;20(46):1-246. [27355222](#).

- Takemoto A, Cho O, Morohoshi Y, Sugita T, Muto M. Molecular characterization of the skin fungal microbiome in patients with psoriasis. *J Dermatol.* 2015;42(2):166–70. [25510344](#).
- Tan B, Ng C, Nshimiyimana JP. et al. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Front Microbiol.* 2015 Sep 25;6:1027. [26441948](#).
- Tanes CE. Psoriasis: A Study of the Skin Transcriptome and Microbiome. 2015. Drexel University, 107 p. [link](#).
- Tonel G, Conrad C. Interplay between keratinocytes and immune cells - Recent insights into psoriasis pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 May;41(5):963-8. [19027868](#).
- Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL. et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nat Methods.* 2015 Oct;12(10):902-3. [26418763](#).
- Vanderpuye-Orgle J, Zhao Y, Lu J. et al. Evaluating the economic burden of psoriasis in the United States. *J Am Acad Dermatol.* 2015 Jun;72(6):961-7.e5. [25882886](#).
- Vetrovsky T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One.* 2013;8(2):e57923. [23460914](#).
- Vollmer W1, Seligman SJ. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.* 2010 Feb;18(2):59-66. [20060721](#).
- Wang Q, Vasey FB, Mahfood JP, Valeriano J, Kanik KS, Anderson BE, Bridgeford PH. V2 regions of 16S ribosomal RNA used as a molecular marker for the species identification of streptococci in peripheral blood and synovial fluid from patients with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999 Oct;42(10):2055-9. [10524676](#).
- Wang XN, McGovern N, Gunawan M. et al. A Three-Dimensional Atlas of Human Dermal Leukocytes, Lymphatics, and Blood Vessels. *J Invest Dermatol.* 2014 Apr;134(4):965-74. [24352044](#).
- Wright W.F, Overman S.B, Ribes J.A. (1–3)-beta-D-Glucan Assay: A Review of its Laboratory and Clinical Application. *Laboratory Medicine, Volume 42, Issue 11, 1 November 2011, Pages 679–685*, [link](#).
- Yan D, Issa N, Afifi L. et al. The Role of the Skin and Gut Microbiome in Psoriatic Disease. *Curr Derm Rep* (2017). [doi:10.1007/s13671-017-0178-5](#).
- Yigit E, Feehery GR, Langhorst BW. et al. A Microbiome DNA Enrichment Method for Next-Generation Sequencing Sample Preparation. *Curr Protoc Mol Biol.* 2016 Jul 1;115:7.26.1-7.26.14. [27366894](#).
- Yun Longa, Yinxin Zhangb, Yanping Gongb et al. Diagnosis of Sepsis with Cell-free DNA by Next-Generation Sequencing Technology in ICU Patients. *Arch Med Res.* 2016 Jul;47(5):365-371. [27751370](#).
- Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ et al. Psoriasis Is Characterized by Accumulation of Immunostimulatory and Th1/Th17 Cell-Polarizing Myeloid Dendritic Cells. *J Invest Dermatol.* 2009 Jan;129(1):79-88. [18633443](#).
- Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and "Inflammatory" Dendritic Cells in Human Skin. *J Invest Dermatol.* 2009 Feb;129(2):302-8. [18685620](#).
- Zhou L, Pollard AJ. A novel method of selective removal of human DNA improves PCR sensitivity for detection of Salmonella Typhi in blood samples. *BMC Infect Dis.* 2012 Jul 27;12:164. [22839649](#).
- Гараева З. Ш., Сафина Н. А., Тюрин Ю. А., Куклин В. Т., Зинкевич О. Д. Дисбиоз кишечника как причина системной эндотоксинемии у больных псориазом. *Вестник дерматологии и венерологии*, 2007;(1):23-27. [elib](#).
- a Гумаюнова Н.Г. Синдром избыточного роста бактерий в тонкой кишке при псориатической болезни на фоне бластоцистной инвазии. дис. к.мн, Челябинск, 2009, 169 с., [link](#).
- b Гумаюнова Н.Г., Потатуркина-Нестерова Н.И., Нестеров А.С., Магомедов М.А. Новые подходы к диагностике кишечного дисбиоза у пациентов с псориатической болезнью. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*, 2009;(2):93-97. [elib](#).
- c Гумаюнова Н.Г. Выявление синдрома избыточного роста бактерий в тонкой кишке при псориатической болезни. *Аспирантский вестник Поволжья*, 2009(3-4):162-4. [elib](#).
- Корниенко В.Ю. Микробиом кожи: взаимосвязь между изменением микробного сообщества и болезнью (обзор литературы), Молодой ученый. 2015. № 10 (90). 477-483. [elib](#).
- Короткий Н.Г., Песляк М.Ю. Псориаз как следствие включения beta-стрептококков в микробиоценоз кишечника с повышенной проницаемостью (концепция патогенеза). *Вестник дерматологии и венерологии*, 2005;(1): 9-18, [link1](#), [link2](#), [elib](#)
- Песляк М.Ю. Модель патогенеза псориаза. Часть 1. Системный псориатический процесс, Москва, МУРЕ, 2012, 94 с, ISBN 9785905504013, [link](#).
- Песляк М.Ю. Модель патогенеза псориаза. Часть 2. Локальные процессы, Москва, МУРЕ, 2012, 116 с, ISBN 9785905504037, [link](#).
- Тягт А.В. Функциональный анализ метагенома кишечника человека. дис. к.мн, Москва, 2014, 131 с. [link](#).

Федеральные клинические рекомендации по ведению больных псориазом. [РОДБК](#), Москва. 2015, 59 с, [link](#), [ФЭМБ](#)

Фомина Е.С. Ассоциация вирусов папилломы человека и стафилококков в формировании нарушений микрофлоры кожи при псориазе. дис., к.м.н., Москва, 2009, 110 с. [link](#)

Харьков Е.И., Прохоренков В.И., Ширяева Ю.А. Показатели функциональной активности тонкой кишки у больных псориазом. Сибирское медицинское обозрение, 2008;(6):55-58. [elib](#).

Харьков Е.И., Ширяева Ю.А., Терешина Д.С. Синдром мальабсорбции и псориаз: способ коррекции. Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2006;(7):61-63. [elib](#).

Харьков Е.И., Ширяева Ю.А. Синдром мальабсорбции при псориазе: клинико-лабораторные параллели. Сибирское медицинское обозрение, 2005;(2-3):62-64. [elib](#).