

Текст ниже является переводом статьи, опубликованной в журнале Science Advances, издаваемом American Association for the Advancement of Science. Материал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY 4.0), что допускает его перевод и распространение при указании авторства.

Перевод выполнен в ознакомительных целях и не включает элементы оригинальной публикации, такие как форматирование, иллюстрации, гиперссылки и список литературы. Рекомендуем обращаться к оригинальной версии статьи для уточнений, цитирования и научного использования:

<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aba2578>

Вмешательство, направленное на повышение биоразнообразия, усиливает иммунорегуляцию и связанную со здоровьем комменсальную микробиоту у детей детских садов

Авторы исследования:

Мария И. Рослунд
Рийкка Пухакка
Мира Грёнрус
Ноора Нурминен
Сами Ойкаринен
Ахмад М. Газали
Ондржей Цинек
Ленка Крамна
Натан Ситер
Хели К. Вари
Лаура Сойнинен
Анирудра Параджули
Юхо Раяниеми
Тууре Киннунен
Олли Х. Лайтинен
Хейкки Хюёти
Аки Синкконен
Исследовательская группа ADELE

SCIENCE ADVANCES
14 Oct 2020
Vol 6, Issue 42
DOI: 10.1126/sciadv.aba2578

Аннотация

Поскольку заболеваемость иммуноопосредованными болезнями быстро растет в развитых обществах, существует неудовлетворенная потребность в новых профилактических подходах для борьбы с этими недугами.

Данное исследование является первым интервенционным испытанием на людях, в котором биоразнообразие городской среды было изменено с целью изучения его влияния на комменсальный микробиом и иммунорегуляцию у детей.

Мы проанализировали изменения микробиоты кожи и кишечника, а также иммунных маркеров крови у детей в течение 28-дневного вмешательства, направленного на повышение биоразнообразия. Для сравнения были проанализированы дети из обычных городских и природоориентированных детских садов. Вмешательство повысило разнообразие как окружающих, так и кожных сообществ *Gamma*proteobacteria, что, в свою очередь, было связано с увеличением уровней TGF- β 1 в плазме и доли регуляторных Т-клеток. Отношение IL-10 к IL-17A в плазме увеличилось у детей из группы вмешательства в ходе испытания.

Наши результаты позволяют предположить, что вмешательство, направленное на повышение биоразнообразия, усиливает иммунорегуляторные пути и дает стимул для будущих профилактических подходов к снижению риска иммуноопосредованных заболеваний в городских обществах.

ВВЕДЕНИЕ

Наблюдательные исследования показали, что иммуноопосредованные заболевания встречаются чаще среди населения, ведущего современный городской образ жизни, чем среди населения с доиндустриальным образом жизни (1–3). Одна из ведущих гипотез утверждает, что основной причиной такой картины является очевидная потеря биоразнообразия в современных условиях жизни (3–6). Однако убедительные доказательства, основанные на интервенционных испытаниях на людях, все еще отсутствуют.

Потеря биоразнообразия в городских районах ограничивает воздействие разнообразной микробиоты, но увеличивает воздействие патогенных бактерий в плотно застроенных районах (5). Высокий уровень гигиены и западный городской образ жизни (например, потребление переработанных продуктов и использование антибиотиков) также влияют на комменсальную микробиоту человека (7, 8). Кроме того, городские загрязнители изменяют микробные сообщества, связанные со здоровьем человека и иммуноопосредованными заболеваниями (9–11).

Все эти факторы могут привести к микробному дисбалансу, называемому дисбиозом, который связывают с иммуноопосредованными заболеваниями (4, 12, 13). К детерминантам раннего возраста, влияющим на микробиоту кишечника, относятся способ рождения, генетика, использование антибиотиков, диета и другие факторы окружающей среды (14). В то время как микробиота кишечника годовалых детей доминирует *Faecalibacterium*, *Bacteroides* и *Anaerostipes* (15), здоровая микробиота кишечника взрослых характеризуется типами *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, особенно родами *Bacteroides* и *Prevotella* (16, 17). *Lactobacillales* является доминирующим

порядком на коже годовалых детей, а разнообразие кожной микробиоты увеличивается с возрастом (18). Основные причины, по которым кожная микробиота меняется с возрастом, связаны с физиологией человека и усилением влияния внешних факторов, таких как домашние животные и среда обитания (18).

Доминирующими таксонами бактерий на коже здоровых взрослых являются типы Actinobacteria, Firmicutes и Proteobacteria, особенно роды Propionibacterium, Staphylococcus и Corynebacterium (16, 19). Actinobacteria и Proteobacteria также являются доминирующими типами в почве (5, 6, 10, 11). Хотя кожные и почвенные бактериальные сообщества имеют несколько общих таксонов (4, 19, 20), таксономический состав заметно различается между почвенными и кишечными сообществами (5, 17, 21).

Несмотря на это таксономическое различие, последние данные указывают на то, что тип почвенного покрова и садовая растительность вокруг постоянного места жительства влияют на микрофлору кишечника (17). Предполагается, что воздействие микробов окружающей среды, комменсальная микробиота человека и иммунологические пути взаимосвязаны (4, 8, 14, 17). Уровни цитокинов в плазме и частоты FOXP3+ регуляторных Т-клеток (Treg) в крови могут использоваться в качестве суррогатных маркеров изменений в иммунорегуляторных путях. Интерлейкин-10 (IL-10) является противовоспалительным цитокином, и его уровни в крови отражают активацию иммунорегуляторных путей (22).

Трансформирующий фактор роста-β1 (TGF-β1) является многофункциональным цитокином, который подавляет воспалительные процессы, особенно в иммунной системе, ассоциированной с кишечником (22). IL-17 является провоспалительным цитокином, который связан с несколькими иммуноопосредованными заболеваниями, включая диабет 1 типа (23), воспалительные заболевания кишечника, ревматоидный артрит и рассеянный склероз (24). Treg-клетки являются важнейшими регуляторами иммунной системы, играющими ключевую роль в поддержании самотолерантности, а также толерантности к комменсальной микробиоте, тем самым предотвращая аутоиммунные и хронические воспалительные заболевания (25).

Поскольку иммуноопосредованные заболевания являются новой проблемой здоровья в урбанизированных обществах, существует неудовлетворенная потребность в новых профилактических подходах для борьбы с этими недугами. Чтобы решить эту задачу, мы провели интервенционное исследование для проверки гипотезы биоразнообразия (3).

В этом исследовании экологическое биоразнообразие городских детских садов было обогащено путем покрытия их дворов лесной подстилкой и дерном. Эффект вмешательства изучался среди 75 городских детей в возрасте от 3 до 5 лет, посещающих три разных типа детских садов: (i) обычные дворы, (ii) дворы с элементами биоразнообразия (группа вмешательства) и (iii) природоориентированные детские сады, где дети ежедневно посещали близлежащие леса. Мы измерили микробиоту кожи и кишечника, уровни цитокинов в плазме и частоту Treg-клеток в крови у этих детей до и после 28-дневного периода вмешательства. Кроме того, мы сравнили микробиоту окружающей среды между обычными дворами и дворами с

вмешательством. Основываясь на более ранних сравнительных исследованиях среди детей (1, 4), мы выдвинули гипотезу, что вмешательство, направленное на повышение биоразнообразия, повлияет на комменсальную микробиоту детей и что положительное изменение в разнообразии кожной микробиоты будет связано с усиленной секрецией иммунорегуляторных цитокинов и/или увеличением количества Трег-клеток после испытания. Кроме того, мы ожидали, что изменения в комменсальной микробиоте будут отражать состав микробиоты окружающей среды в группе вмешательства, а связи между комменсальной микробиотой и иммунным ответом будут отличаться в этой группе по сравнению с группой стандартного детского сада.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вмешательство изменило микробиоту поверхностного слоя почвы во дворах детских садов. В исследование были включены десять детских садов в двух городах Финляндии (Лахти и Тампере), каждый с населением более 100 000 жителей (Таблица 1). Три из них были природоориентированными детскими садами, которые служили положительным контролем (испытуемые, $n = 23$). Каждый из стандартных городских детских садов содержал дворы площадью примерно 500 м² с небольшим количеством зелени или без нее. В четырех из этих дворов детских садов, далее называемых «детские сады с вмешательством», мы заменили часть гравия лесной подстилкой (100 м²) и дерном (200 м²) (испытуемые, $n = 36$). Три неизмененных двора («стандартные детские сады») служили контролем (испытуемые, $n = 16$). Детские сады с вмешательством получили фрагменты лесной подстилки, дерна, кашпо для выращивания однолетних растений и торфяные блоки для лазания и копания.

Растительность на перенесенной естественной лесной подстилке состояла в основном из вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris*), черники (*Vaccinium* sp.), водяники (*Empetrum nigrum*) и мхов (*Pleurozium shreberi*, *Hylocomium splendens*, *Sphagnum* sp. и *Dicranum* sp.). Дерн состоял из овсяниц (*Festuca* sp.) и мятликов (*Poa* sp.). Воспитатели детских садов направляли детей на контакт с привнесенными зелеными материалами. К направленным мероприятиям относились, например, посадка растений в ящики, поделки из природных материалов и игры. Кроме того, зеленые материалы были доступны детям во время свободных занятий на улице (26).

Дети играли во дворах примерно от 0,5 до 2 часов два раза в день в детских садах с вмешательством и стандартных детских садах (26). Среднее время пребывания на улице составляло 1,5 часа. Детям ежедневно подавали три одинаковых приема пищи (завтрак, обед и полдник) в участвующих детских садах; две центральные кухни, по одной в каждом городе, готовили еду в соответствии с подробными рекомендациями для детей раннего возраста, опубликованными Национальным советом по питанию Финского продовольственного управления (www.ruokavirasto.fi/en/themes/healthy-diet/national-nutrition-council/).

Личное потребление свежих растений, количество контактов с животными, время, проведенное на улице или на природе, и количество братьев и сестер были одинаковыми во всех группах детских садов (таблица S1). Вмешательство длилось 28 дней в мае-июне 2016 года.

Чтобы измерить различия в микробном сообществе окружающей среды между измененными и неизменными дворами детских садов и оценить, были ли таксономические изменения аналогичны изменениям в бактериальных сообществах кожи, мы сравнили состав сообщества, относительную численность, богатство и разнообразие бактериальных сообществ в образцах поверхностного слоя почвы. Мы отобрали образцы поверхностного слоя почвы со дворов детских садов с вмешательством и стандартных детских садов после 28-дневного периода вмешательства (образцы были собраны из песочницы и игровой площадки, рядом с качелями, спортивным комплексом и главной дверью). Те же поверхностные почвы (песочница и игровая площадка) были отобраны также в день 0, до прибытия материалов для вмешательства.

В образцах поверхностного слоя почвы относительная численность *Proteobacteria* (36% до и 34% после вмешательства), *Bacteroidetes* (24 и 28%), *Actinobacteria* (20 и 15%) и *Acidobacteria* (5 и 7%) превышала 5%. После вмешательства состав сообществ этих типов и всего бактериального сообщества различался между дворами детских садов с вмешательством и стандартными детскими садами (таблица S2A и рис. S1A). Вмешательство изменило состав сообщества *Gammaproteobacteria* в поверхностных почвах [данные по численности в таблице S2B: PERMANOVA, $P = 0,008$ и $P_{adj} = 0,03$; рис. S1B], и это сообщество отличалось между дворами с вмешательством и стандартными дворами после вмешательства (данные по наличию/отсутствию в таблице S2A: PERMANOVA, $P = 0,03$ и $P_{adj} = 0,05$; рис. S1B). Более того, неклассифицированные OTU *Gammaproteobacteria* были обогащены во дворах детских садов с вмешательством, и их относительная численность была более чем в восемь раз выше по сравнению со стандартными дворами детских садов после периода вмешательства (таблица S3, A и B). Наблюдаемое богатство OTU и разнообразие Шеннона всего бактериального сообщества ($P_{adj} = 0,04$ в обоих случаях) и богатство *Gammaproteobacteria* были выше в дворах с вмешательством, чем в стандартных дворах (рис. 1, A и B, и таблица S3C). Мы использовали многомерную однородность групповых дисперсий [PERMDISP] для изучения бета-разнообразия, и она показала, что бета-разнообразие пяти родов было выше в детских садах с вмешательством, чем в стандартных детских садах (таблица S2C).

После испытания (A) сообщество *Gammaproteobacteria* и (B) общее бактериальное сообщество поверхностного слоя почвы было более разнообразным в почвах дворов детских садов с вмешательством по сравнению со стандартными дворами детских садов. На коже альфа-разнообразие (индекс Шеннона) (C) *Proteobacteria* было выше среди детей в детских садах с вмешательством ($n = 29$) и природоориентированных детских садах ($n = 19$) по сравнению с детьми в стандартных детских садах ($n = 13$) после периода исследования. (D) Разнообразие *Alphaproteobacteria* на коже детей детских садов с вмешательством увеличилось в ходе вмешательства и было выше по сравнению с детьми в стандартных детских садах после периода исследования. (E) Разнообразие *Betaproteobacteria* было выше среди детей в природоориентированных детских садах и (F) разнообразие *Gammaproteobacteria* выше среди детей в детских садах с вмешательством по сравнению с детьми в стандартных детских садах после периода исследования. Данные представлены как средние значения \pm SE. * $P < 0,05$ и ** $P < 0,01$, t -тесты после вмешательства (A и B), пост-хок тесты Данна после вмешательства (C–E) и критерий знаковых рангов Уилкоксона (D).

Вмешательство способствовало разнообразию кожных бактерий

В соответствии с предыдущими исследованиями (4, 12), вмешательство, направленное на повышение биоразнообразия, было связано с высоким разнообразием кожных *Proteobacteria*. Мы сравнили индексы разнообразия Шеннона кожных бактерий между тремя различными группами детских садов с помощью ковариационного анализа (ANCOVA) и с помощью критериев Крускала-Уоллиса и пост-хок тестов Данна с использованием пола в качестве ковариаты. До вмешательства у детей в природоориентированных детских садах состав бактериального сообщества на коже отличался от такового у детей в стандартных детских садах (таблица S2D и рис. S1C), а кожное сообщество *Alphaproteobacteria* было более разнообразным по сравнению с детьми в детских садах с вмешательством (рис. 1D и таблица S4). Группы стандартных детских садов и детских садов с вмешательством имели сходный состав бактериального сообщества (таблица S2D) и обладали одинаково разнообразными кожными сообществами *Proteobacteria*, включая классы *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma**proteobacteria* до периода вмешательства (рис. 1, C–F, и таблица S4).

После испытания у детей в детских садах с вмешательством были более разнообразные кожные сообщества *Proteobacteria* и *Gamma**proteobacteria*, чем у детей в стандартных детских садах (рис. 1, C–F, и таблица S4). Сравнения «до-после» с использованием парных *t*-тестов и статистики Уилкоксона выявили одно различие: разнообразие *Alphaproteobacteria* увеличилось в детских садах с вмешательством (рис. 1D и таблица S5), став выше по сравнению с детьми в стандартных детских садах (рис. 1D и таблица S4). Эти результаты демонстрируют, как вмешательство, направленное на повышение биоразнообразия, способствовало или предотвращало потерю разнообразия кожных бактерий в течение периода исследования, приводя к разнообразию, сопоставимому с таковым в природоориентированных детских садах (рис. 1).

Вмешательство изменило бактериальное сообщество кишечника

Поскольку известно, что пробиотики и лекарства, такие как антибиотики, влияют на микробное сообщество кишечника (14, 27), мы исключили из анализов микробиома кишечника тех испытуемых, которые получали пробиотики или лекарства во время вмешательства (Таблица 1). Мы наблюдали несколько различий, связанных со средой детского сада. У детей в детских садах с вмешательством относительная численность *Clostridiales* снизилась ($P = 0,003$ и $P_{adj} = 0,04$), а альфа-разнообразие *Ruminococcaceae* ($P = 0,01$ и $P_{adj} = 0,05$), известного содержанием видов, продуцирующих бутират, увеличилось (таблица S6A; парные *t*-тесты). Никаких таких изменений не наблюдалось у детей в природоориентированных или стандартных детских садах (таблица S6, B и C). Дополнительно мы сравнили различия в составе сообщества кишечных бактерий между тремя группами детских садов с помощью PERMANOVA. У детей в стандартных и природоориентированных детских садах был различающийся состав сообщества *Ruminococcaceae* как до ($P = 0,05$ и $P_{adj} = 0,10$), так и после ($P = 0,01$ и $P_{adj} = 0,03$) периода вмешательства, в то время как у детей стандартных детских садов и детских садов с вмешательством были схожие сообщества *Ruminococcaceae* в начале вмешательства ($P = 0,14$), но слегка

различающиеся сообщества в конце вмешательства ($P = 0,03$ и $P_{adj} = 0,08$; таблица S2E и рис. S1, E и F). Более того, таксоны *Faecalibacterium* различались по PERMANOVA между детьми из природоориентированных и стандартных детских садов после вмешательства ($P = 0,03$; таблица S2F).

Корреляции между микробиотой и иммунологическими показателями

Мы проанализировали уровни цитокинов IL-10, IL-17A и TGF- β 1 в образцах плазмы и частоту CD4+CD25+CD127lowFOXP3+ Treg-клеток в образцах крови с помощью проточной цитометрии. Мы искали связи между изменениями уровней цитокинов в плазме или общих частот Treg-клеток и изменениями в разнообразии и численности бактерий с помощью линейных моделей смешанных эффектов (LMM) и неметрического многомерного шкалирования (NMDS). Кроме того, мы провели сравнение «до-после» уровней цитокинов и их соотношений. Эти сравнения показали, что соотношение IL-10:IL-17A увеличилось среди детей группы вмешательства, но не среди детей в стандартных или природоориентированных детских садах (Таблица 2).

Когда все дети были проанализированы вместе в LMM, увеличение разнообразия кожных *Gammaproteobacteria* было связано с увеличением концентрации TGF- β 1 в плазме ($P_{adj} = 0,01$; рис. 2A и таблица S7A), а среди детей группы вмешательства это увеличение разнообразия также было связано со снижением уровня IL-17A в плазме ($P_{adj} = 0,002$; рис. 2B и таблица S7B) и увеличением процентной доли Treg-клеток ($P = 0,016$; рис. 2C и таблица S7C). Среди детей природоориентированных детских садов высокое разнообразие *Gammaproteobacteria* в кожных микробиомах было связано с увеличением концентрации IL-10 в плазме ($P_{adj} = 2,3 \times 10^{-6}$; таблица S7D), тогда как среди детей стандартных детских садов низкое разнообразие *Gammaproteobacteria* было связано со снижением экспрессии TGF- β 1 ($P_{adj} = 0,01$; таблица S7E и рис. S2).

Когда все дети были проанализированы вместе в модели NMDS, состав сообщества видов *Faecalibacterium* в кишечнике был связан с концентрацией IL-17A в плазме после периода вмешательства ($P = 0,015$ и $P_{adj} = 0,045$; таблица S8). Среди детей из природоориентированных детских садов более высокая численность *Faecalibacterium* Otu00007 (*Faecalibacterium prausnitzii* в BLASTN; покрытие запроса = 100%, E значение = 2×10^{-127} , идентичность = 99%) была связана с более низкими уровнями IL-17A в плазме (LMM, $P_{adj} = 0,004$), тогда как более высокая численность *Faecalibacterium* Otu000008 (совпадений в BLASTN с порогом значимости 10 не найдено) была связана с более высокими уровнями IL-17A в плазме (LMM, $P_{adj} = 0,009$; рис. 2D и таблица S7F). Последняя связь была слабее, но также значима среди детей в стандартных детских садах (LMM, $P_{adj} = 0,04$; таблица S7G). Среди детей природоориентированных детских садов снижение концентрации IL-17A в плазме дополнительно было связано со снижением относительной численности *Romboutsia* ($P_{adj} = 5,7 \times 10^{-5}$) и *Dorea* ($P_{adj} = 0,03$) и увеличением *Anaerostipes* ($P_{adj} = 0,01$) в кишечнике (таблица S7H).

ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя раннее воздействие биоразнообразия окружающей среды связывают с развитием хорошо функционирующей иммунной системы (1, 4), окончательное доказательство

причинно-следственной связи все еще отсутствует. Данное исследование является первым интервенционным испытанием на людях, в котором биоразнообразие городской среды было изменено для изучения его влияния на комменсальный микробиом и иммунную систему у маленьких детей. 28-дневное вмешательство, включавшее обогащение биоразнообразия микробов на дворах детских садов, было связано с изменениями микробиоты кожи и кишечника детей, которые, в свою очередь, были связаны с изменениями уровней цитокинов в плазме и частоты Трег-клеток. Эти данные позволяют предположить, что воздействие микробного разнообразия окружающей среды может изменить микробиом и модулировать функцию иммунной системы у детей. В частности, вмешательство было связано со сдвигом в сторону более высокого соотношения между уровнями цитокинов IL-10 и IL-17A в плазме и положительной связью между разнообразием Gammaproteobacteria и частотой Трег-клеток в крови, что позволяет предположить, что вмешательство могло стимулировать иммунорегуляторные пути. Эти регуляторные изменения произошли, несмотря на несколько противоречивые данные по кожной микробиоте (см. рис. 1 и 2). В целом, исследование указывает на то, что модулировать иммунную систему возможно с помощью относительно простых действий, изменяющих среду обитания маленьких детей в городских сообществах.

Вмешательство поддерживало высокое разнообразие комменсальной кожной микробиоты, особенно среди Gammaproteobacteria, по сравнению с детьми в стандартных детских садах, у которых разнообразие этой микробиоты снизилось за период исследования. Наши результаты согласуются с предыдущими наблюдательными исследованиями, показывающими связи между маркерами иммунной системы, средой обитания и комменсальной микробиотой, включая кожные Gammaproteobacteria (1, 4, 12). Таким образом, результаты настоящего интервенционного исследования подтверждают гипотезу биоразнообразия (3, 4). Поскольку вмешательство, направленное на повышение биоразнообразия, предлагает непосредственный опыт общения с природой и обеспечивает мультисенсорное исследование и разнообразные обучающие ситуации (26), у детей, возможно, было больше прямых контактов с почвой и растительностью в детских садах с вмешательством, чем в стандартных детских садах. Время, проведенное во дворах, также может быть одним из объяснений того, почему разнообразие кожных Proteobacteria снизилось среди детей в стандартных детских садах, но не среди детей в детских садах с вмешательством, хотя время, проведенное на улице, было одинаковым во всех группах детских садов. Мы делаем вывод, что предоставление городским детям возможности играть в микробиологически разнообразной грязи и растительности изменяет микробиоту кожи и кишечника, что сопровождается параллельными изменениями в иммунной системе в течение относительно короткого периода в 1 месяц.

Важным аспектом этих выводов является то, что комменсальная микробиота детей в детских садах с вмешательством стала более похожей на ту, что наблюдается у детей, посещающих природоориентированные детские сады (рис. 1), где дети ежедневно совершают визиты в близлежащие леса. Сегодня подавляющее большинство детей в развитых обществах и все большее число в развивающихся живут в городских районах (28), и многие из них имеют ограниченный доступ к территориям, характеризующимся богатым природным биоразнообразием, таким как леса. Кроме того, зеленые зоны

вокруг городской среды часто загрязнены вредителями и патогенными микробами (29). По этой причине можно ожидать, что предоставление детям возможности ежедневного контакта с разнообразной растительностью и землей в безопасных городских зеленых зонах, таких как игровые площадки и дворы детских садов или школ, может улучшить здоровье детей за счет активации регуляторных путей иммунной системы.

Это может снизить гиперактивные иммунные реакции и, следовательно, уменьшить риск развития иммуноопосредованных заболеваний. Кроме того, вмешательство, направленное на повышение биоразнообразия, может обеспечить преимущества для благополучия и увеличить физическую активность детей (26). Результаты настоящего исследования и нашего предыдущего исследования благополучия (26) поощряют внедрение этих решений в управление и планирование городской среды.

Воздействие микробного биоразнообразия повлияло на микробиоту кишечника, особенно на *Ruminococcaceae* (включая *Faecalibacterium*), которая включает грамотрицательные бактерии, связанные с поддержанием здоровья кишечника (30). Семейство также содержит установленные или потенциальные пробиотики (13). Вмешательство увеличило разнообразие *Ruminococcaceae*, хотя сами материалы вмешательства не содержали штаммов, обнаруженных в образцах стула. Это поднимает вопрос о том, был ли механизм иммунорегуляции во вмешательстве по повышению биоразнообразия принципиально иным по сравнению с воздействием пробиотических обработок; пробиотики улучшают численность только определенных штаммов и могут даже задерживать восстановление микробиоты кишечника после лечения антибиотиками (31). Пробиотические обработки также показали лишь ограниченный, если вообще какой-либо, эффект в профилактике аллергий (32). Более того, наш подход — вмешательство по повышению биоразнообразия — подвергал детей воздействию широкого спектра микробов окружающей среды, включая микроскопических беспозвоночных, простейших, грибы, археи и вирусы. Это воздействие также происходило через множественные пути, включая кожный и слизистые пути. Таким образом, такое вмешательство по повышению биоразнообразия должно активировать гораздо более широкий спектр рецепторов распознавания образов (PRR), чем пероральное лечение пробиотическими бактериями (33). Однако для выяснения природы потенциальной широкоспектральной стимуляции PRR с помощью описанного здесь подхода потребуются дальнейшие исследования. Снижение разнообразия кожной микробиоты в стандартной группе детских садов без вмешательства также может быть объяснено снижением микробной активности в течение периода вмешательства. Поскольку вмешательство началось менее чем через месяц после таяния снега, и поскольку период вмешательства был сухим, верхний слой минеральной почвы, бетон и асфальт, вероятно, высыхали в течение вмешательства. Следовательно, неудивительно, что богатство *Gamma*proteobacteria и численность неидентифицированных OTU были выше во дворах с вмешательством, чем в стандартных дворах в конце периода вмешательства (см. рис. 1 и таблицу S3). Поскольку дети в группе вмешательства ежедневно контактировали с богатым сообществом *Gamma*proteobacteria поверхностного слоя почвы в будние дни, и поскольку *Gamma*proteobacteria располагаются ниже субэпидермальных отделов в коже (34), их содержание кожных *Gamma*proteobacteria, вероятно, оставалось выше по сравнению с детьми в стандартных детских садах. Было показано, что прикосновение к органическим материалам для ландшафтного дизайна немедленно увеличивает

разнообразие *Proteobacteria*, включая *Gammaproteobacteria*, на коже (19). Параллельным фактором было увеличение желания играть с почвой и растительными материалами во дворах с вмешательством (26), что привело к увеличению добровольного микробного воздействия на детей.

Стандартные дворы детских садов, состоящие в основном из неорганических искусственных материалов для ландшафтного дизайна, можно рассматривать как искусственные суровые, засушливые среды. Поскольку засушливые среды обычно характеризуются низкой микробной активностью, но огромным микробным разнообразием, особенно при истощении питательных веществ (35), мы были удивлены, увидев более высокое богатство *Proteobacteria* во дворах с вмешательством. Возможно, что часть сообщества *Proteobacteria* во дворах с вмешательством произошла из периода до вмешательства и что перенос дерна и лесной подстилки привел к лаг-периоду, в течение которого бактериальное разнообразие и богатство все еще адаптировались к новой среде, поддерживающей рост. Мы рекомендуем отслеживать эффекты вмешательства по повышению биоразнообразия в течение более длительного периода, чтобы понять динамику микробного сообщества на дворах детских садов и увидеть долговечность изменений цитокинов в плазме.

Факторы, формирующие иммунный ответ, включают изменения во внешней среде и воздействие человеческих патогенов. Последнее вызывает провоспалительный ответ, например, влияет на соотношение IL-10:IL-17A (см. Таблицу 2). Поскольку различные домашние условия не маскировали различий между группами детских садов (см. рис. 1), влияние вмешательства по повышению биоразнообразия на комменсальную микробиоту было сильным по сравнению с потенциальными временными воздействиями в течение периода вмешательства. Поскольку богатство *Gammaproteobacteria* улучшилось, а неидентифицированные OTU в пределах *Gammaproteobacteria* были обогащены только во дворах с вмешательством, изменения кожных *Gammaproteobacteria* в стандартной и природоориентированной группах, вероятно, имели иное происхождение по сравнению с группой вмешательства. Это неудивительно, так как в стандартной группе *Gammaproteobacteria* поступали из городской незеленой среды, а дети в природоориентированных детских садах подвергались воздействию лесного биоразнообразия в течение всего года. Поэтому, и поскольку мы недавно продемонстрировали, как воздействие органической почвы снижает относительную численность родов, содержащих оппортунистические патогены, на коже городских жителей (36), положительные связи между разнообразием кожных *Gammaproteobacteria* и уровнями IL-17A в плазме в группах без вмешательства могут быть следствием воздействия гаммапротеобактериальных патогенов или других неидентифицированных факторов окружающей среды. В этом контексте примечательно, что групповые углы наклона регрессии между разнообразием кожных *Gammaproteobacteria* и многофункциональным цитокином TGF- β были схожи во всех группах детских садов и что численность неидентифицированного *Faecalibacterium* OTU 000008 в кишечнике была прямо связана с IL-17A в плазме во всех группах детских садов. *Faecalibacterium prausnitzii*, с другой стороны, была связана с IL-17A только в природоориентированной группе; мы недавно показали, что разнообразная растительность, которая является прокси для воздействия разнообразной микробиоты, связана с высокой численностью *Faecalibacterium* в кишечнике (17). Отсутствие связи

F. prausnitzii–IL-17A в стандартных детских садах может быть результатом низкого ежедневного воздействия биоразнообразия окружающей среды, в то время как микрофлора кишечника у детей группы вмешательства, возможно, все еще адаптировалась к новой среде обитания с высоким биоразнообразием. В итоге, хотя связи между факторами окружающей среды и цитокинами сложны, настоящее исследование подчеркивает глубокое влияние вмешательства по повышению биоразнообразия на комменсальную микробиоту, что может частично объяснять расходящиеся связи между цитокинами плазмы и микробиотой в различных условиях детских садов.

Одним из основных недостатков нашего исследования была невозможность контролировать домашнюю среду. У семей разные условия жизни, образ жизни, и у детей разное количество братьев и сестер и домашних животных. Однако, хотя семьи с ребенком в природоориентированном детском саду могут часто интересоваться различными видами деятельности на свежем воздухе в своей личной жизни, это не было заметно во времени, проведенном на улице или в зеленых зонах. Вряд ли есть основания предполагать неизвестную систематическую ошибку между детскими садами с вмешательством и стандартными детскими садами при наборе. Вместо этого мы, очевидно, не можем исключить потенциальное влияние поведения ребенка вне детских садов. Эти неопределенности подчеркивают проблемы, присущие всем попыткам проведения интервенционных испытаний в обычной среде обитания среди семей с маленькими детьми, но они также подчеркивают важность среды детского сада с высоким биоразнообразием и результирующую силу связей между микробиотой кожи и кишечника и уровнями иммунных маркеров, несмотря на множество смешивающих факторов в городской среде обитания детей.

Во вмешательстве мы использовали медленно возобновляемую естественную лесную подстилку, запасы которой ограничены. Чтобы справиться с этой проблемой, мы недавно предложили широкоспектральный микробный инокулят из лесных и сельскохозяйственных материалов, который напоминает микробиоту в органических почвах и содержит широкий спектр эукариотических и прокариотических микроорганизмов, описанных выше, включая сотни неактивных и медленно растущих филотипов бактерий (19, 20). В недавнем исследовании (36) не было обнаружено факультативных патогенов и меньше оппортунистических патогенов на коже человека после контакта с песком игровой площадки, обогащенным широкоспектральным микробным инокулятом, по сравнению с контактом со стандартным песком игровой площадки или отсутствием контакта вообще. Двухнедельное испытание воздействия на людей (20) с этим широкоспектральным инокулятом не привело к каким-либо негативным последствиям для здоровья испытуемых. При условии, что предварительные результаты могут быть подтверждены в последующих интервенционных испытаниях, широкоспектральная стимуляция PRR вмешательством по повышению биоразнообразия может оказаться полезной для модуляции иммунной системы и микробных сообществ городских жителей (36).

Наше испытание имеет значение для интерпретации результатов предыдущих наблюдательных исследований (1–5, 12). Результаты этого исследования поддерживают гипотезу биоразнообразия и концепцию, согласно которой низкое биоразнообразие в современной среде обитания может привести к необученной

иммунной системе и, следовательно, увеличить распространенность иммуноопосредованных заболеваний (4, 5). Аналогично, хотя в более ранних исследованиях сообщалось о снижении численности *Faecalibacterium* при нескольких иммунных нарушениях (13, 15), мы обнаружили, что высокая численность *F. prausnitzii* связана со сниженной экспрессией провоспалительного цитокина IL-17A среди здоровых детей. В заключение, наше исследование продемонстрировало, что изменение среды обитания детей с помощью микробиологически разнообразных природных материалов может предоставить осуществимый подход для снижения риска иммуноопосредованных заболеваний в городских популяциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемая группа

Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Финского консультативного совета по научной добросовестности с одобрения этического комитета местного больничного округа (Пirkanmaa, Финляндия). Письменное информированное согласие, полученное от всех опекунов, соответствовало Хельсинкской декларации.

В исследовании могли участвовать субъекты, посещающие детские сады и проживающие в городской среде и соответствующие критериям включения. В общей сложности в исследовании приняли участие 75 детей в возрасте от 3 до 5 лет. Критериями исключения из исследования были следующие: возраст младше 3 или старше 5 лет на начало исследования, неродная страна, отличная от Финляндии, иммунодефицит (например, дефицит антител и ВИЧ-инфекция), иммуносупрессивная терапия (например, кортикостероиды), состояние, влияющее на иммунный ответ (например, ревматоидный артрит, язвенный колит, болезнь Крона, диабет, синдром Дауна) или диагноз рака. Использование антибиотиков, пробиотиков, лекарств и другая справочная информация регистрировались с использованием стандартизированных анкет.

Сбор образцов

Чтобы изучить влияние вмешательства на комменсальную микробиоту и иммунорегуляцию, образцы кожи, стула и крови были собраны у детей до преобразования дворов и после периода вмешательства. Поверхностный слой почвы был собран до и после периода вмешательства со дворов детских садов, расположенных в Лахти. До вмешательства образцы были собраны из песочниц и игровых площадок, а после вмешательства также рядом с качелями и под спортивным комплексом.

Обученная медсестра-исследователь собирала образцы кожных мазков в детских садах, а родители детей собирали образцы стула дома. Кожные мазки брались с тыльной стороны руки (область 5 см × 5 см), 10-секундное протирание ватной палочкой, смоченной в солевом буфере (0,1% Tween 20 в 0,15 M NaCl). После отбора проб вата помещалась в стерильную полиэтиленовую пробирку и замораживалась при -80°C до использования для анализов микробиома. Образцы стула хранились в

домашних морозильниках (-18° до 20°C) до тех пор, пока исследователи не собрали их и не хранили при -80°C.

Венозный образец крови брали из вены руки в пробирки Vacutainer CPT Mononuclear Cell Preparation с цитратом натрия (BD Biosciences, Нью-Джерси, США) и центрифугировали согласно инструкциям производителя для отделения плазмы и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). PBMC замораживали в замораживающей среде, состоящей из 10% диметилсульфоксида (Merck KGaA, Дармштадт, Германия), 10% человеческой сыворотки АВ (Sigma-Aldrich, Миссури, США), пенициллина (50 Ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл; Sigma-Aldrich, Миссури, США) и 10 мМ L-глутамин (Life Technologies, Калифорния, США) в среде RPMI 1640 (Life Technologies, Калифорния, США) с использованием контейнеров для замораживания при -80°C (BioCision LLC, Калифорния, США). Образцы PBMC переносили в жидкий азот для длительного хранения через 48 часов. Образцы плазмы хранили при -80°C.

Подготовка образцов для секвенирования MiSeq и биоинформатика

Образцы кожи и стула для секвенирования MiSeq готовили, как в исследовании Roslund et al. (11). Почву, кожу и образцы стула секвенировали с помощью Illumina MiSeq 16S рибосомной РНК (рРНК) гена метабаркодирования с длиной считывания 2 × 300 пар оснований с использованием набора реагентов v3. Необработанные данные обрабатывали в Mothur (версия 1.39.5) (37), как описано Roslund et al. (10).

Бактериальные последовательности выравнивали по ссылке SILVA (версия 123) и классифицировали с использованием версии байесовского классификатора Mothur с набором для обучения RDP версии 16 с порогом начальной загрузки 80%. OTU с низкой численностью (≤ 10) и OTU, обнаруженные в отрицательных контролях экстракции и ПЦР, были удалены из данных последовательности. В экстракции ДНК кожи было обнаружено 3 OTU, в стуле - 0 OTU, а в почве - 21 OTU (3 совпадают с кожей) в контроле экстракции ДНК или ПЦР (стерильная вода). Наблюдаемое богатство OTU и разнообразие Шеннона рассчитывали в Mothur. Образцы почвы и стула были прорежены до глубины 3842, а образцы кожи — до глубины 329 для анализа состава бактериального сообщества. Для образцов кожи 13 из 28-дневных образцов не были собраны или количество последовательностей было слишком низким, и, таким образом, 29 детей из детских садов с вмешательством, 19 из природоориентированных детских садов и 13 из стандартных детских садов были включены в анализы образцов кожи. Индекс покрытия Гуда (среднее \pm SD: почва, 0,96 \pm 0,02; стул, 1,00 \pm 0,00; кожа, 0,96 \pm 0,06) использовали для определения адекватности покрытия OTU для анализа разнообразия и состава сообщества. Поскольку статистические тесты показали связи внутри рода *Faecalibacterium*, OTU *Faecalibacterium* были дополнительно идентифицированы с помощью микроорганизма BLASTN (версия 2.8.1+).

Анализ цитокинов и Treg-клеток

Концентрации IL-17A и IL-10 измеряли в образцах плазмы с использованием набора Milliplex MAP high-sensitivity T cell panel kit (Merck KGaA, Дармштадт, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресценцию анализировали с

помощью системы Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США), и данные собирали с помощью программного обеспечения Bio-Plex Manager (версия 4.1, Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США). Концентрацию TGF- β 1 анализировали с помощью иммуноферментного анализа (Bender MedSystems GmbH, Вена, Австрия).

Замороженные PBMC размораживали, и иммуноокрашивание для идентификации CD3+CD4+CD25+CD127^{low}FOXP3⁺ Трег-клеток проводили, как описано ранее (38). Частоту Трег-клеток определяли как процент от общего количества CD3+CD4⁺ Т-клеток.

Статистические анализы

Все статистические тесты проводились в R версии 3.4.2 (R Development Core Team, 2018) (39) с двусторонними тестами. Различия в составе сообщества анализировали с помощью PERMANOVA (функция `adonis` в пакете `vegan`) (40) с метрикой Брея-Кертиса. PERMANOVA анализировали с наборами данных о численности и наличии-отсутствии бактерий. PERMANOVA проводили на уровне OTU, рода, порядка, семейства, класса и типа, а также внутри некоторых конкретных таксонов, если относительная численность превышала 5% (образцы кожи и стула), и всякий раз, когда была причина предполагать биологическую значимость. В данных из образцов стула мы проанализировали различия в композиционных центроидах OTU *Faecalibacterium*, поскольку сравнительные исследования между пациентами с нарушениями иммунной системы и здоровыми людьми сообщали о сниженной численности *Faecalibacterium* в кишечнике пациентов (13, 15), и поскольку численность этого клада в наших данных превышала 5%. NMDS использовали с метрикой Брея-Кертиса для нанесения OTU *Faecalibacterium* на ординацию, и корреляцию с соответствующими уровнями экспрессии цитокинов оценивали с помощью функции `envfit` в пакете `vegan` в R. В образцах кожи мы проанализировали сообщества *Gamma*proteobacteria, поскольку они были связаны со средой обитания, экспрессией IL-10 и частотой атопии (4). В образцах стула и кожи мы также анализировали таксоны на уровне типа, класса, порядка или семейства, если численность превышала 5%. Поскольку численность и разнообразие бактерий, особенно в органических почвах, чрезвычайно высоки (21), для образцов почвы со дворов детских садов мы анализировали таксоны на уровне типа, класса, порядка, семейства и рода с помощью PERMANOVA, если численность превышала 1%.

Индекс разнообразия Шеннона использовали для оценки альфа-разнообразия, а многомерную однородность групповых дисперсий (PERMDISP) использовали для изучения бета-разнообразия. Различия в бактериальном богатстве (индекс Чао, прореженные виды и наблюдаемое богатство OTU), альфа-разнообразии и относительной численности бактерий между детьми детских садов определяли с помощью ANCOVA или, в случае ненормально распределенных данных, с помощью критерия Крускала-Уоллиса. Пол использовался в качестве ковариаты. Попарное сравнение проводилось с помощью теста Тьюки HSD или теста Данна. Связь между изменениями бактериального разнообразия и численности, а также уровнями экспрессии цитокинов и их изменениями оценивали с использованием LMM (функция `lmer` в пакете `lme4`). LMM строились для бактериальной таксономии с наблюдаемыми

изменениями, т.е. изменениями относительной численности, разнообразия и богатства в ходе вмешательства. В LMM изменение экспрессии цитокинов или уровня Трег-клеток использовалось в качестве зависимой переменной, изменения бактерий — в качестве объясняющих переменных, а детский сад — в качестве случайной переменной.

Различия между временными точками определяли с помощью парного t-теста или, в случае ненормально распределенных данных, с помощью критерия знаковых рангов Уилкоксона. Чтобы концептуализировать частоту ложных открытий, все статистические тесты проводились с поправкой Беньямини-Хохберга (обозначается как Padj в результатах).

Первичной популяцией для анализа было намерение лечить (ITT). Популяция по протоколу (PP) (полные случаи) использовалась, когда анализировались изменения между двумя временными точками (исходный уровень и день 28). Кроме того, популяция PP для других анализов использовалась в качестве анализа чувствительности для исследования того, являются ли выводы чувствительными к предположениям относительно характера пропущенных данных. Эти анализы чувствительности проводились для значимых результатов, т.е. для ANCOVA кожи и цитокинов, а также для PERMANOVA Ruminococcaceae и Faecalibacterium. Первичной мерой исхода для расчета мощности является разница между испытуемыми детских садов с вмешательством и стандартными контрольными детскими садами в изменении разнообразия Gammaproteobacteria на коже между исходным уровнем и днем 28. Мы использовали предварительные оценки эффекта из предыдущего исследования, которые оценивают корреляции между биоразнообразием окружающей среды, микробиотой человека и иммунной функцией (4).

Благодарности

Мы благодарим всех членов команды ADELE и AlmaLab за их поддержку. Особая благодарность семьям за их участие в этом исследовании. Мы также очень благодарны участвующим детским садам и их персоналу, а также городам Лаhti и Тампере за возможность проведения исследования. Финансирование: Эта работа была поддержана Business Finland (ранее: Финское агентство финансирования инноваций TEKES) (номера грантов 40333/14, 6766/31/2017 и 7941/31/2017). Вклад авторов: A.S., H.H., O.H.L., R.P., M.I.R. и N.N. спроектировали исследование. R.P., M.G., M.I.R., H.K.V., A.S., N.N., N.S. и O.H.L. реализовали исследование. M.I.R., N.N., S.O., T.K., A.M.G., O.C. и L.K. генерировали данные. M.I.R., M.G., A.S. и A.P. анализировали данные. M.I.R., A.S., R.P., M.G., N.N., T.K., O.C., J.R., A.P., H.H. и O.H.L. написали рукопись. M.I.R., L.S. и A.S. подготовили рисунки и таблицы. A.S., H.H. и J.R. были главными исследователями проекта.

Конкурирующие интересы: A.S., H.H., O.H.L., M.G., N.N. и S.O. указаны в качестве изобретателей в заявке на патент "иммуномодулирующие составы", поданной Университетом Хельсинки (номер заявки на патент 20165932 в Финском патентно-регистрационном бюро).

M.G., A.P., M.I.R., A.S. и H.K.V. указаны в качестве изобретателей в заявке на патент "Иммуномодулирующий материал для садоводства и ландшафтного дизайна", поданной Университетом Хельсинки (номер заявки на патент 175196 в Финском патентно-регистрационном бюро). Ни один из изобретателей не получал гонораров от патентной заявки.

Доступность данных и материалов: Все данные бактериальных последовательностей были зарегистрированы в Sequence Read Archive (номер доступа PRJNA531814). Все другие данные, необходимые для поддержки выводов этой рукописи, включены в основной текст и дополнительные материалы.