

на правах рукописи

ФЕДОСЕНКО

Сергей Вячеславович

**ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И УРОВЕНЬ ГЕНОВ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ И
КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В ФОРМИРОВАНИИ
КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФЕНОТИПОВ БРОНХИАЛЬНОЙ
АСТМЫ И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

14.01.25 – пульмонология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

ТОМСК-2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Огородова Людмила Михайловна доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заслуженный деятель науки РФ

Официальные оппоненты:

Шмелев Евгений Иванович заведующий отделом дифференциальной диагностики туберкулеза и экстракорпоральных методов лечения ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ

Лещенко Игорь Викторович профессор кафедры фтизиатрии, пульмонологии и торакальной хирургии ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ

Визель Александр Андреевич заведующий кафедрой фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор

Ведущая организация: ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России

Защита состоится 30 октября 2015 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.02 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2015 г.



Ученый секретарь диссертационного совета

Агеева Т.С.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. У больных БА и ХОБЛ на фоне персистирующего бронхолегочного воспаления и ослабления локальных механизмов иммунной защиты, нарушения дренажной и вентиляционной функции бронхов создаются оптимальные условия для модификации естественного состава респираторного микробиома с закреплением в нем представителей условно-патогенной и патогенной микробиоты, отдельные представители которой по данным ряда исследований могут быть ассоциированы с более тяжелым течением БА и ХОБЛ [Gollwitzer E.S. et al., 2014; Martin C. Et al., 2015].

Трансформация бронхолегочной бактериальной контаминации в инфекционный процесс в настоящее время рассматривается в качестве одного из важнейших механизмов развития инфекционно-зависимых обострений у больных ХОБЛ [Dickson R.P. et al., 2013]. Несмотря на то, что обострения БА существенно реже обусловлены фактором бактериальной инфекции [Marsland B.J. et al., 2013], оба заболевания находятся в группе повышенного риска как обоснованного, так и нерационального назначения системных антибактериальных препаратов (АБП) широкого спектра действия (макролидов, бета-лактамовых антибиотиков и респираторных фторхинолонов), направленного на подавление вероятной бронхолегочной инфекции в период обострения болезни [Al-Ani S. et al., 2015].

Опубликованные данные выполненных к настоящему моменту исследований, характеризующие преимущественно совокупные различия состава респираторной микробиоты у больных БА и ХОБЛ относительно здоровых лиц, не позволяют оценить системный вклад повторяющихся эпизодов применения антибактериальных препаратов в трансформацию состава естественных микробиотических сообществ различных регионов тела человека и накопление молекулярно-генетических механизмов антибиотикорезистентности (АР), что необходимо для понимания влияния проводимой антибиотикотерапии (АБТ) на тяжесть и фенотипические особенности течения хронических обструктивных заболеваний легких.

Степень разработанности. Результаты выполненных и опубликованных на данный момент молекулярно-генетических исследований в области изучения состава респираторной микробиоты больных БА и ХОБЛ описывают преимущественно сравнительные межзоологические особенности относительно здоровых лиц, а также различия состава в стабильный период и период обострения указанных заболеваний.

Однако, несмотря на отдельные достижения в области исследования микробиоты дыхательных путей (как в норме, так и при патологии), в целом сохраняется значительное количество пробелов в детализации качественных и количественных различий респираторных микробиотических сообществ у больных БА и ХОБЛ с учетом клинико-функциональных особенностей течения заболевания и данных анамнеза, включающих количественный и качественный анализ состава проводимой АБТ.

В настоящее время отсутствуют данные о проведенных и выполняемых одновременных исследованиях респираторной (орофарингеальной) и кишечной микробиоты у больных БА и ХОБЛ с целью выявления системного характера

микробиотических модификаций и формирования молекулярно-генетических механизмов лекарственной устойчивости под влиянием периодически повторяющихся курсов АБТ и оценки их вклада в трансформацию клинико-функциональных характеристик хронических обструктивных болезней легких.

Цель исследования. Установить состав орофарингеальной и кишечной микробиоты с идентификацией генетических детерминант лекарственной устойчивости и оценкой уровня представленности генов антибиотикорезистентности при БА и ХОБЛ, а также определить их вклад в клиническую трансформацию заболеваний.

Задачи исследования:

1. Установить сравнительные особенности качественного (таксономического) и количественного состава орофарингеальной микробиоты больных БА и ХОБЛ вне обострения и оценить ее влияние на клинико-функциональную характеристику хронических бронхообструктивных заболеваний.
2. Охарактеризовать различия состава кишечных микробиотических сообществ у больных БА и ХОБЛ в стабильный период заболевания относительно здоровых лиц, а также в зависимости от клинико-anamnestических факторов.
3. Установить состав генов антибиотикорезистентности кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ в сравнении с микробиомом кишечника здоровых лиц и оценить уровень их представленности в зависимости от клинических данных и особенностей анамнеза проводимой антибактериальной терапии.
4. Идентифицировать особенности состава орофарингеальных стрептококков у больных БА и ХОБЛ вне обострения и оценить уровень представленности генов антибактериальной устойчивости *mef* и *ermB*, ответственных, в том числе, и за формирование механизмов антибиотикорезистентности к макролидам, в зависимости от влияния клинико-anamnestических факторов, включая характеристику проводимой антибактериальной терапии.
5. Оценить способность системных глюкокортикостероидов, назначенных в период обострения БА и ХОБЛ, оказывать модифицирующее влияние на качественный и количественный состав орофарингеальной и кишечной микробиоты.

Научная новизна. Основные результаты данного исследования являются приоритетными. Так, впервые в мире в рамках сравнительного неинтервенционного исследования в параллельных группах, сочетающего высокотехнологичный молекулярно-генетический и биоинформационный анализ качественного и количественного состава орофарингеальной и кишечной микробиоты у больных БА и ХОБЛ с клинико-anamnestической характеристикой пациентов, получены детализированные результаты состава и уровня представленности генов АР орофарингеальной и кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ в зависимости от клинико-функциональных особенностей заболевания, данных анамнеза (включая частоту и состав проводимой антибиотикотерапии), а также в сравнении с уровнем резистомы кишечных микробиотических сообществ здоровых лиц.

Впервые установлено, что в сравнении с кишечной микробиотой здоровых лиц микробиотические сообщества кишечника больных БА и ХОБЛ характеризуются снижением содержания ответственных за синтез короткоцепочечных жирных кислот бактерий типа *Firmicutes* (семейства *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae* и *Clostridiaceae*) и увеличением представленности микроорганизмов типа *Bacteroidetes* (преимущественно за счет родов *Bacteroides* и *Parabacteroides*, включающих в том числе и потенциально патогенные виды). При этом выраженность указанных изменений в соотношении микроорганизмов типов «*Firmicutes* – *Bacteroidetes*» в пользу увеличения представленности последних напрямую ассоциирована с частотой назначения АБП при хронических бронхообструктивных болезнях и наиболее высока у больных ХОБЛ, положительно коррелируя со степенью тяжести заболевания.

Впервые выявлено, что содержание в орофарингеальной микробиоте протеобактерий семейства *Moraxellaceae*, условно патогенных *Neisseria cinerea* и *Aggregatibacter segnis* возрастает на фоне тяжелой неконтролируемой БА по сравнению с легкой контролируемой и частично контролируемой астмой, а степень представленности *Neisseria* у больных БА и ХОБЛ положительно коррелирует с продукцией мокроты.

Приоритетными являются данные о том, что использование СКС, назначенных в период обострения БА и ХОБЛ, модифицирует состав респираторного микробиома в стабильный период, увеличивая орофарингеальную представленность непатогенных бактерий типа *Bacteroidetes* (включая представителей рода *Prevotella*) и снижая бактериальную обсемененность орофарингеальных мазков протеобактериями родов *Streptococcus* и *Haemophilus*, включающих патогенные микроорганизмы.

Впервые показана высокая распространенность генов антибактериальной устойчивости *mef* и *ermB*, реализующих механизмы АР, в том числе, к макролидам и линкозамидам в орофарингеальной микробиоте больных БА и ХОБЛ; уровень представленности данных генов положительно коррелирует с выраженностью обсемененности образца стрептококками, а также прямо ассоциирован с частотой эпизодов приема АБП в целом и макролидов в частности.

Впервые выявлено, что больные БА и ХОБЛ с положительным результатом определения гена *ermB* в орофарингеальной микробиоте отличаются более высоким индексом курения и выраженной продукцией мокроты от больных, не содержащих данный ген в образцах. У больных ХОБЛ определяется положительный характер корреляции степени представленности гена *ermB* в образце с выраженностью продукции мокроты и индексом курения, а генов *mef* и *ermB* – с частотой обострений заболевания.

Приоритетными являются данные о том, что кишечная микробиота больных БА и ХОБЛ, отражающая системный характер накопления генетических детерминант антибактериальной устойчивости на фоне повторяющейся АБТ, отличается более выраженной относительной представленностью генов АР по сравнению с микробиомом кишечника здоровых лиц и характеризуется наиболее высоким уровнем резиста по отношению к АБП, ассоциированным с терапией респираторных инфекций – макролидам, бета-лактамам и фторхинолонам. Величина

представленности генов AP к указанным АБП напрямую связана с частотой их применения и наиболее выражена в образцах кишечной микробиоты больных ХОБЛ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные представляют высокую теоретическую и практическую ценность, поскольку позволяют обосновать патогенетические механизмы эволюции хронических бронхообструктивных заболеваний, заключающиеся в том, что бесконтрольное и необоснованное применение АБП широкого спектра действия не только провоцирует системное накопление генетических детерминант антибиотикорезистентности, но и приводит к патологической трансформации естественных микробиотических сообществ, что носит системный характер и оказывает негативное влияние на дальнейшее течение заболевания.

Результаты данного исследования позволят сфокусировать внимание научно-медицинской общественности на проблеме рационального использования антибактериальных препаратов у больных БА и ХОБЛ, поскольку бронхолегочная бактериальная контаминация, представленная условно-патогенной и патогенной микробиотой респираторного тракта со сниженной антибактериальной чувствительностью, является фактором, усугубляющим тяжесть клинических проявлений заболевания, и способствует увеличению частоты обострений, что сопряжено с ростом потребности в терапии СКС и антибиотиками.

Полученные данные о положительном модифицирующем влиянии СКС, назначенных при обострении БА и ХОБЛ, на состав респираторной микробиоты, проявляющемся в увеличении в стабильный период заболевания орофарингеальной представленности непатогенных бактерий типа *Bacteroidetes* и снижением бактериальной обсемененности представителями типа *Proteobacteria*, включающего патогенные микроорганизмы, могут быть использованы в качестве дополнительного обоснования целесообразности назначения глюкокортикостероидов при обострении БА и ХОБЛ.

Результаты настоящей работы могут быть рекомендованы для включения в учебные программы дипломной и последипломной подготовки врачей-терапевтов и пульмонологов. Данные результаты могут стать основой разработки методических рекомендаций по рациональному использованию антибактериальных препаратов и СКС для лечения больных БА и ХОБЛ в период обострения.

Полученные результаты используются в работе отделения пульмонологии ОГБУЗ «Томская областная клиническая больница» (г. Томск). Материалы проведенных исследований используются в учебном процессе на кафедре госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (г. Томск) для студентов лечебного факультета, интернов и ординаторов, на кафедре общей врачебной практики и поликлинической терапии ФПК и ППС ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (г. Томск) для врачей общей практики, на кафедре последипломного образования ГБУ ВПО ОмГМА Минздрава России (г. Омск) для интернов, ординаторов, врачей терапевтов и пульмонологов на сертификационных циклах, на кафедре пульмонологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России (г. Москва) для подготовки

ординаторов, профессиональной переподготовки специалистов и циклов повышения квалификации врачей по направлению «Пульмонология».

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам выбраны методологически оправданные и высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе современных научно-исследовательских лабораторий.

На первом этапе, выполненном на базе ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России по единому протоколу, разработанному в соответствии со стандартами «Надлежащей клинической практики», проведено одномоментное сравнительное неинтервенционное исследование в параллельных группах, в рамках которого описана клиническая характеристика изучаемых групп больных, выполнена сравнительная оценка клинико-функциональных показателей, произведен сбор кала и орофарингеальных мазков для исследования кишечной и орофарингеальной микробиоты. На втором этапе исследования выполнена молекулярно-генетическая идентификация орофарингеальных и кишечных микробиотических сообществ больных БА и ХОБЛ с использованием методов 16S рРНК секвенирования и полногеномного (shotgun) метагеномного секвенирования на базе ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» ФМБА России (Москва, Россия). В рамках третьего этапа исследования выполнен сравнительный анализ таксономического состава кишечной и орофарингеальной микробиоты больных БА и ХОБЛ, а также анализ профилирования уровней генов AP в метагеномах кала больных БА и ХОБЛ в сравнении с образцами кала здоровых лиц по 2 референсным базам данных: Antibiotic Resistance Database – ARDB; The Comprehensive Antibiotic Resistance Database – CARD.

Положения, выносимые на защиту:

1. Повторяющиеся эпизоды антибиотикотерапии на фоне обострений у больных ХОБЛ и БА ассоциированы с системной трансформацией естественных микробиотических сообществ различных регионов тела человека, включая респираторный тракт и кишечник, с тенденцией замещения нормобиотических непатогенных микроорганизмов условно-патогенными и патогенными бактериями, что носит более выраженный характер у пациентов, страдающих ХОБЛ. При этом бактериальная контаминация дыхательных путей у больных ХОБЛ и БА определяет тяжесть течения болезни и сама по себе является значимым фактором риска развития обострений.
2. Накопление генов лекарственной устойчивости к макролидам, бета-лактамам и фторхинолонам сообществами микробиоты у больных ХОБЛ и БА носит системный характер, более выраженный у пациентов, страдающих ХОБЛ, положительно коррелирует с клинической тяжестью течения заболевания и напрямую ассоциировано с частотой применения соответствующих антибактериальных препаратов на протяжении предшествующего года.
3. Системные глюкокортикостероиды, назначенные в период обострения БА и ХОБЛ, оказывают положительное модифицирующее влияние на состав респираторной микробиоты в стабильный период заболевания, что проявляется

увеличением представленности непатогенных бактерий типа *Bacteroidetes* (включая представителей рода *Prevotella*) со снижением содержания протеобактерий родов *Streptococcus* и *Haemophilus*, включающих патогенные микроорганизмы.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы в соответствии с единым протоколом клинического исследования, достаточным объемом клинического материала, обеспечением контролируемого сбора лабораторных образцов с соблюдением соответствующих утвержденных методик, использованием современных и высокотехнологичных молекулярно-генетических методов, включающих секвенирование по 16S рРНК для идентификации качественного и количественного состава орофарингеальной микробиоты и полногеномное (shotgun) метагеномное секвенирование с последующей идентификацией таксономического состава кишечной микробиоты, а также применением адекватных и современных методов анализа и статистической обработки результатов.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Конгрессе Европейского респираторного общества (Вена, 2012), XII международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке (Москва, 2012), Конгрессе Европейского респираторного общества (Барселона, 2013), XXIII Национальном конгрессе по болезням органов дыхания Российского респираторного общества (Казань, 2013), IV Сибирском пульмонологическом форуме «Современные проблемы пульмонологии: достижения и перспективы» (Новосибирск, 2014), Конгрессе Европейского общества аллергологов и клинических иммунологов (Копенгаген, 2014), IV Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014), научно-практической конференции «Коморбидная патология в практике врача-терапевта» (Тюмень, 2015), V Сибирском пульмонологическом форуме «Современные проблемы пульмонологии: достижения и перспективы» (Новосибирск, 2015), XIII Региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аллергологии и иммунологии, клинической лабораторной диагностики» (Владивосток, 2015).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № НК 13-04-01854 и федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы» (ГК № 14.604.21.0075, уникальный идентификатор RFMEFI60414X0075).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 работ, в том числе 16 публикаций в изданиях, рекомендованных ВАК РФ (14 полнотекстовых статей и 2 патента).

Личное участие автора. Автор принимал непосредственное участие в проведении научно-исследовательской работы на всех этапах от разработки идеи

исследования и проектирования протокола до статистического анализа, обсуждения и публикации результатов исследования.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 285 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, клинических групп и методов исследования, глав собственных наблюдений (3-7 главы), обсуждения, заключения, списка литературы. Работа иллюстрирована 47 рисунками и 56 таблицами. Список источников цитируемой литературы включает в себя 278 работ, из которых 39 принадлежат отечественным и 239 зарубежным авторам.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

КЛИНИЧЕСКИЕ ГРУППЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В рамках протокола предусмотрен 1 визит, включавший оценку соответствия пациента критериям включения / исключения, подписание информированного согласия, сбор анамнестических данных и выполнение основных процедур исследования. Данное исследование не предполагало скрининга, лечебного периода и визитов последующего наблюдения (Рисунок 1).

Визит 1

Пациенты с легкой контролируемой и частично контролируемой БА	n = 24 57,08 ± 8,4 лет	<ol style="list-style-type: none"> 1. Оценка соответствия пациента критериям включения / исключения; 2. Подписание информированного согласия; 3. Сбор анамнестических данных; 4. Оценка выраженности симптомов и заполнение вопросников (mMRC, ACT); 5. Физикальное исследование, проведение теста с 6-минутной ходьбой, спирометрия со стандартной бронхолитической пробой; 6. Сбор биологического материала для исследования микробиоты (орофарингеальные мазки, образцы кала)
Пациенты с тяжелой неконтролируемой БА	n = 28 56,21 ± 6,27 лет	
Пациенты с ХОБЛ средней степени тяжести	n = 64 56,7 ± 9,32 лет	
Пациенты с ХОБЛ тяжелого и крайне тяжелого течения	n = 33 61,48 ± 9,02 лет	

Рисунок 1. Схема исследования

В исследование включены мужчины и женщины в возрасте от 40 до 70 лет с диагнозами: легкая контролируемая и частично контролируемая БА, тяжелая неконтролируемая БА, ХОБЛ средней степени тяжести и ХОБЛ тяжелого и крайне тяжелого течения (Рисунок 1). Длительность соответствующего заболевания составляла не менее 12 месяцев на момент подписания информированного согласия. Все больные БА и ХОБЛ характеризовались отсутствием анамнеза обострений и системной АБТ на протяжении 4-х недель и более до момента включения в исследование. В исследование включались некурящие больные БА, а также бывшие курильщики, страдающие астмой, со значением индекса курения менее 10 пачка/лет. Индекс курения у больных ХОБЛ составлял 10 и более пачка/лет. Также для больных астмой обязательным являлось наличие анамнеза базисной терапии ИГКС в стабильной дозе на протяжении минимум 6 месяцев на момент включения в исследование.

В исследование не включались больные БА и ХОБЛ, страдающие онкопатологией, тяжелой сопутствующей патологией в стадии декомпенсации, а также больные другими клинически значимыми заболеваниями бронхолегочной системы, которые, по мнению исследователя, могли повлиять на результаты исследования.

На визите 1 помимо сбора анамнестических данных, включавших оценку продолжительности основного заболевания и анализ сопутствующей патологии, выяснение проводимой поддерживающей терапии, среднесуточной потребности в КДБА за предшествующие 7 дней, частоты обострений БА / ХОБЛ, ассоциированных с ними госпитализаций, эпизодов курсовой терапии СКС и АБП (с анализом состава антибиотиков) за предшествующие 12 месяцев, также оценивались основные респираторные симптомы – интенсивность кашля и продукции отделяемой мокроты по шкале Ю.Л. Куницыной и Е.И. Шмелева (2003) [Куницина Ю.Л. и соавт., 2003], выраженность одышки по шкале mMRC [GOLD, 2011], у больных БА определялся контроль над заболеванием с использованием вопросника АСТ [GINA, 2011], выполнялось объективное исследование и спирометрия с проведением стандартной пробы на обратимость бронхообструкции (в соответствии с требованиями ATS [Miller M.R. et al., 2005]), тест с 6-минутной ходьбой и измерением сатурации крови кислородом до и после нагрузки [Enright, P.L., 1998]. Для подтверждения БА у пациентов с ОФВ1>75%, проводился тест на определение бронхиальной гиперреактивности; при отсутствии возможности проведения процедуры допускалось использование результатов теста, полученных в течение последних 6 месяцев. Также на визите 1 выполнялся сбор биологических образцов для выделения бактериальной ДНК – 2-х орофарингеальных мазков (мазок с задней стенки глотки) стерильной ватной палочкой и образца кала в стерильный контейнер.

Статистический анализ клинико-функциональных параметров. Для статистической обработки клинико-функциональных параметров использован пакет программ Statistica for Windows version 10.0. При сравнении частот качественных признаков использовался критерий χ^2 или 2-сторонний критерий Фишера. Для оценки различия средних в попарно несвязанных выборках использован U-критерий Манна-Уитни. Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) частот, количественные – в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение. Разницу значений считали значимой при $p < 0,05$. Корреляционный анализ выполнен по методу Спирмена.

Молекулярно-генетическая идентификация и биоинформатическая обработка данных анализа состава орофарингеальной микробиоты. Метагеномный анализ в формате оценки разнообразия последовательностей гена 16S рРНК в суммарном образце ДНК осуществляли согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part #15044223 Rev. B), рекомендованному Illumina для секвенатора MiSeq. Фильтрация ридов по качеству и таксономическая классификация проводились с использованием встроенного программного комплекса QIIME [Caporaso J.G. et al., 2010]. Таксономический состав образцов оценен путем классификации по базе данных 16S рРНК генов Greengenes v. 13.5 с помощью байесовского классификатора. Результатом классификации считали количество ридов, которые легли на операционные таксономические единицы (ОТЕ).

Использованием специальных программ выдача классификатора приведена к виду матрицы образцов и ОТЕ с описанной филогенией последних.

Полногеномное (shotgun) метагеномное секвенирование с последующей идентификацией таксономического состава кишечной микробиоты. После выделения тотальной ДНК и подготовки библиотек для секвенирования выполняли полногеномное (shotgun) метагеномное секвенирование на приборах Life Technologies – SOLiD 4 (ДНК-прочтения – риды – длиной 50 пар нуклеотидов) и SOLiD 5500W (75 пар нуклеотидов). Среднее число ридов на образец составило 38 млн. штук. Полученные от секвенаторов риды в цветовом формате подвергали стандартной фильтрации по качеству и обрезанию до первой высококачественной позиции ($QV \geq 30$). Бактериальный состав метагеномных образцов определяли в результате картирования нуклеотидных прочтений на неизбыточный референсный каталог из репрезентативных геномов микроорганизмов, встречающихся в кишечнике человека. В качестве источников для составления каталога геномов использовались база проекта Human Microbiome Project (<http://www.hmpdacc.org>) и NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), а также другие общедоступные источники. В качестве контроля использованы результаты открытой базы данных, содержащей исследованные по аналогичной методике образцы кала 402 здоровых добровольцев из 6 стран мира, включая 96 добровольцев из России [Tyakht A.V. et al., 2013].

Статистический анализ данных количественного состава орофарингеальной и кишечной микробиоты проводили на языке программирования R 3.1.0. Для подсчета матрицы расстояний между образцами использовано расстояние Брэй-Кертис. Поиск признаков, по которым различаются группы образцов, осуществляли тестом Манна-Уитни. Поправку на множественные сравнения производили с помощью FDR. Для поиска различающихся низкопредставленных таксонов использована библиотека metagenomeSeq для языка программирования R. Для выявления взаимосвязи между таксономическим составом метагеномов и их метаданными использована обобщенная линейная модель (GLM) [Nelder J. et al., 1972] в ее реализации на программном языке R версии 3.1.0, пакет glm2 [Marschner I., 2014]. В качестве предикторных переменных использованы данные о диагнозе доноров образцов (как категориальные предикторные переменные), а также сведения о терапии, в том числе частота антибиотикотерапии и курсов СКС (как непрерывные предикторные переменные). В качестве ответных переменных использованы проценты представленности бактериальных видов или родов. Модель применена в предположении Пуассоновского распределения величин [Marschner I., 2014]. Результатом данного анализа является определение набора значений параметра оценки (англ. Estimate), отражающего влияние изменения регрессора – предикторной переменной (в данном случае клинично-anamнестические факторы) на зависимую переменную (представленность той или иной операционной таксономической единицы) в логарифмическом масштабе. Рассчитываемый при этом коэффициент наклона прямой (Estimate, КНП), определяющий направление и степень зависимости, является значением из выдачи команды glm в поле "Estimate".

Далее выполнен сравнительный анализ таксономического состава кишечной и орофарингеальной микробиоты больных БА и ХОБЛ, а также анализ профилирования уровней генов AP в метагеномах кала больных БА и ХОБЛ в

сравнении с образцами кала здоровых лиц по 2 референсным базам данных: Antibiotic Resistance Database – ARDB; The Comprehensive Antibiotic Resistance Database – CARD.

Полученные данные об особенностях состава кишечной микробиоты, а также результаты профилирования генов АР сопоставлены с клинико-функциональными фенотипами и анамнестической характеристикой больных БА и ХОБЛ (включая сведения по обострениям и АБТ, проводимой на протяжении предшествующих 12 месяцев).

Анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости кишечной микробиоты. В ходе исследования для секвенированных и проанализированных кишечных метагеномов пациентов с ХОБЛ и больных БА относительно метагеномов кала здоровых добровольцев выполнен сравнительный анализ профилирования уровней генов АР двумя методами и по двум референсным базам данных соответственно. В качестве дополнительной группы сравнения (контроля) использованы результаты открытой базы данных, содержащей исследованные по аналогичной методике образцы кала 96 здоровых добровольцев из России [Tyakht A.V. et al., 2013].

В первом методе в качестве референсной базы использованы аминокислотные последовательности белков – предполагаемых продуктов трансляции генов АР, представленные в базе данных Antibiotic Resistance Database – ARDB [Liu B. Et al., 2009].

Во втором методе в качестве референсной базы использованы нуклеотидные последовательности генов, входящих в базу The Comprehensive Antibiotic Resistance Database – CARD [<http://aac.asm.org/content/57/7/3348.full>].

Видовая идентификация и анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости орофарингеальных стрептококков по ДНК, изолированной из образцов орофарингеальных мазков, выполнены под руководством доктора биологических наук Ильиной Е.Н. на базе ООО НПФ Литех, Москва с помощью экспериментальной диагностической панели «Стрептопол+» (ООО НПФ Литех) согласно протоколу производителя по принципу количественной ПЦР с регистрацией сигнала в реальном времени. Диагностическая тест-система «Стрептопол+» включает в себя два триплексных набора «*Streptococcus spp.* (FAM) / *S. pyogenes* (HEX) / *S. agalacticae* (ROX)» и «*S. pneumoniae* (FAM) / *mef* (HEX) / *erm* (ROX)». Постановку ПЦР и интерпретацию полученных данных проводили с использованием прибора CFX-96 (BioRad, США).

С целью анализа ассоциации выявляемости стрептококков с клиническими признаками рассчитывалась безразмерная величина (ΔCt), как разность между пороговыми значениями накопления сигнала от ДНК человека и ДНК стрептококков. Опосредованно, эта величина отражает степень бактериального обсеменения.

В ходе обработки количественных данных по циклам выхода сигнала амплификации генов *mef* и *ermB* с целью поиска ассоциаций степени представленности указанных генов в образцах с рядом клинико-функциональных характеристик выполнен корреляционный анализ по Спирману. Косвенно, величина,

обратная значению цикла выхода, отражает степень представленности анализируемых генетических детерминант устойчивости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика изучаемой популяции и результаты клинико-функциональных исследований

Согласно единому протоколу в исследование включены 52 пациента с БА (24 больных легкой персистирующей контролируемой и частично контролируемой БА и 28 больных тяжелой неконтролируемой астмой) и 97 больных ХОБЛ (64 пациента с ХОБЛ средней степени тяжести и 33 больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения. Размер выборки является достаточным для достижения поставленной цели и соотносится с данными мировых исследований [Pedro N. Et al., 2010; Sze M., 2014].

Сформированные группы сопоставимы по возрасту (табл. 1).

Таблица 1 – Распределение пациентов по полу и возрасту

Группы	Женщины		Мужчины		Средний возраст, лет*
	Абс.	%	Абс.	%	
БА все (n=52)	38	73,08	14	26,92	56,61±7,26
ХОБЛ все (n=97)	8	8,25	89	91,75	58,33±9,46

*Примечание – * Различия по возрасту между пациентами с БА и больными ХОБЛ недостоверны (p>0,05). Здесь и далее данные представлены в виде среднее значение ± стандартное отклонение.*

В группе больных БА преобладали женщины (OR 2,71; 95% CI 1,25-5,98; p=0,006), среди пациентов с ХОБЛ статистически значимо преобладали мужчины (OR 11,13; 95% CI 4,89-26,3; p<0,0001).

На момент включения все пациенты с легкой БА получали на протяжении минимум 6 месяцев регулярную базисную монотерапию ИГКС в объеме низких доз, рекомендованных GINA (2011), что в пересчете на флутиказона пропионат (HFA) составляло 100-250 мкг/сутки, а также сальбутамол в режиме «по требованию». Больные тяжелой БА на протяжении 6 месяцев и более до момента включения в исследование получали регулярную базисную терапию фиксированными комбинациями, содержащими рекомендованные GINA (2011) для данной группы пациентов средние / высокие дозы ИГКС в комбинации с ДДБА (доза ИГКС в пересчете на флутиказона пропионат HFA составляет 250-500 мкг/сутки или более 500 мкг/сутки соответственно).

В соответствии с поставленной целью в исследование включены пациенты с различной степенью тяжести и уровнем контроля БА (больные легкой контролируемой/частично контролируемой БА и тяжелой неконтролируемой астмой). В связи с этим данные группы больных характеризовались наличием статистически значимых различий по заданным клинико-функциональным и анамнестическим критериям (табл. 2).

Таблица 2 – Данные анамнеза и клинико-функциональная характеристика больных БА

Показатель	БА (Группа 1),	БА легкая (Группа 1А),	БА тяжелая (Группа 1В),	P _{1А-1В}
------------	-------------------	---------------------------	----------------------------	--------------------

	n=52	n=24	n=28	
Потребность в КДБА, дозы/сутки	2,7±2,4	0,56±0,42	5,82±3,11	<0,0001
Обострения за 12 мес., n	1,27±0,98	0,65±0,71	1,78±0,87	<0,0001
Госпитализации за 12 мес., n	0,23±0,43	0±0	0,43±0,5	0,0002
Курсы СКС за 12 мес., n	0,55±0,75	0,13±0,34	0,89±0,83	0,00015
Курсы АБТ, за 12 мес., n	0,31±0,79	0,17±0,49	0,43±0,96	0,25
Индекс курения, пачка/лет	2,65±5,53	3,74±5,96	1,75±7,2	0,46
Кашель, баллы	1,2±0,85	0,69±0,82	1,6±0,63	<0,0001
Мокрота, баллы	0,53±0,64	0,22±0,52	0,78±0,63	0,0011
mMRC, баллы	1,76±1,21	0,69±0,63	2,64±0,78	<0,0001
Дистанция, м	290,3±93,2	368,48±70,9	226,25±50,2	<0,0001
SatO2 до ходьбы, %	96,35±1,02	96,91±0,42	95,9±1,13	0,0002
SatO2 после ходьбы, %	96,23±1,27	96,8±0,29	95,68±1,49	0,0003
ОФВ1 до теста*, %	73,14±18,4	84,06±15,28	53,84±11,71	0,000032
ОФВ1 после теста*, %	78,84±15,6	87,8±11,56	63,47±12,35	0,003
ФЖЕЛ до теста*, %	91,07±18,1	98,74±18,93	84,11±14,4	0,0071
ФЖЕЛ после теста*, %	95,42±15,8	87,8±11,56	73,47±15,35	0,0035
АСТ, баллы	17,0±5,0	23,0±1,16	13,59±3,53	<0,0001
РС20, мг/мл	-	4,8±3,1	-	-

*Примечание – * Стандартный бронходилатационный тест с сальбутамолом (400 мкг)*

Во всех группах больных ХОБЛ число включенных в исследование мужчин достоверно преобладало над количеством женщин (для группы больных ХОБЛ 2 степени тяжести OR 9,97; 3,67-26,88; $p < 0,0001$, для группы больных ХОБЛ 3-4 степени OR 15,5; 3,2-102,8; $p < 0,0001$).

На момент включения в исследование регулярную терапию с применением длительно действующих бронхолитических препаратов получали 43 пациента с ХОБЛ, среди которых 23 человека со среднетяжелой ХОБЛ и 20 больных с ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения. При этом тиотропия бромид (ТБ) в составе поддерживающей терапии на протяжении 6 и более месяцев применяли у 26 больных ХОБЛ (включая 14 пациентов с ХОБЛ 3-4 степени тяжести). ИГКС регулярно на протяжении полугода и более получали 26 пациентов с ХОБЛ (включая 11 больных с заболеванием средней степени тяжести, 2 из которых применяли ингаляционные глюкокортикостероиды в сочетании с Беродуалом Н (фенотерол / ипратропия бромид) без ДДБА).

Для 54 пациентов с ХОБЛ (включая 13 больных с тяжелой и крайне тяжелой формами заболевания) проводимая терапия характеризовалась использованием бронхолитиков «скорой помощи» в режиме «по требованию» (КДБА, ипратропия бромид (ИБ), КДБА в комбинации с ИБ). Пациенты с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания отличались более выраженной одышкой (по значению шкалы mMRC), высокой суточной потребностью в КДБА, более частыми обострениями, ассоциированными с ними госпитализациями, курсами системной терапии ГКС на протяжении предшествующего года, а также различались по некоторым другим показателям (табл. 3).

Таблица 3 – Данные анамнеза и клиничко-функциональная характеристика больных ХОБЛ

Показатель	ХОБЛ	ХОБЛ 2 ст.	ХОБЛ 3-4 ст.	P _{2A-2B}
------------	------	------------	--------------	--------------------

	(Группа 2), n=97	(Группа 2А), n=64	(Группа 2В), n=33	
Потребность в КДБА, дозы/сутки	1,94±2,6	1,06±1,35	3,64±3,48	<0,0001
Обострения за 12 мес	2,08±1,44	1,81±1,22	2,61±1,67	0,017
Госпитализации за 12 мес.	0,27±0,55	0,12±0,38	0,54±0,71	0,0002
Курсы СКС за 12 мес	0,24±0,59	0,12±0,45	0,45±0,75	0,00015
Курсы АБТ, за 12 мес	1,69±1,48	1,48±1,27	2,09±1,77	0,055
Индекс курения, пачка/лет	58,04±33,2	54,11±31,39	65,67±35,69	0,46
Кашель, баллы	1,98±0,79	1,95±0,8	2,03±0,77	0,65
Мокрота, баллы	1,51±0,75	1,51±0,79	1,51±0,67	0,89
mMRC, баллы	1,48±1,16	0,97±0,94	2,48±0,87	<0,0001
Путь, м*	418,3±184,5	477,5±177,8	303,6±138,9	<0,0001
SatO2 до ходьбы, %	96,94±1,45	97,51±1,23	95,82±1,16	<0,0001
SatO2 после ходьбы, %	96,04±2,08	96,97±1,65	94,24±1,6	<0,0001
ОФВ1 до теста**, %	56,53±14,14	64,0±9,75	41,58±8,57	<0,0001
ОФВ1 после теста**, %	63,6±11,2	71,34±9,97	48,14±11,47	<0,0001
ФЖЕЛ до теста**, %	77,84±16,14	82,62±15,36	68,26±13,29	<0,0001
ФЖЕЛ после теста**, %	91,57±18,75	99,48±12,59	75,74±15,29	0,011
<i>Примечания</i>				
<i>* Стандартный 6-минутный тест с ходьбой; ** Стандартный бронходилатационный тест с сальбутамолом (400 мкг).</i>				

При сравнении общих выборок больных БА и ХОБЛ выявлено, что пациенты с ХОБЛ реже использовали КДБА, характеризовались более частым применением АБП на протяжении года, однако меньшим количеством эпизодов терапии СКС по поводу обострений заболевания (табл. 4).

Таблица 4 – Различия клиничко-anamнестических данных у больных БА и пациентов с ХОБЛ

Показатель	Больные БА, n=52	Больные ХОБЛ, n=97	p
Индекс курения, пачка/лет	2,65±5,53	58,04±33,19	<0,0001
Обострения за 12 мес.	1,27±0,98	2,16±1,58	0,0006
Кашель, баллы	1,2±0,85	1,98±0,79	<0,0001
Курсы СКС за 12 мес.	0,55±0,76	0,24±0,59	0,006
Курсы АБП за 12 мес.	0,31±0,78	1,69±1,48	<0,0001
Потребность в КДБА, дозы/сутки	3,69±3,46	1,94±2,6	0,001
ОФВ1 до теста*, %	73,14±18,43	56,53±14,14	<0,0001
ОФВ1 после теста*, %	78,84±15,57	63,61±15,16	<0,0001
ФЖЕЛ до теста*, %	91,07±18,09	77,83±16,14	0,00004
<i>Примечание – * Стандартный бронходилатационный тест с сальбутамолом (400 мкг).</i>			

Сопутствующая патология, зарегистрированная у больных БА и ХОБЛ, не противоречила критериям включения / исключения и, по мнению исследователя, не могла повлиять на результаты данной работы.

Метагеномный анализ орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА по результатам секвенирования генов 16S рРНК

В ходе исследования выявлено принципиальное сходство качественного состава орофарингеальной микробиоты как между группами больных БА и ХОБЛ, так при внутригрупповом сравнении образцов больных легкой и тяжелой БА, среднетяжелой ХОБЛ и ХОБЛ тяжелого и крайне тяжелого течения.

Различия представленности микроорганизмов в образцах орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ по данным анализа GLM и metagenomeSeq. При глубинном анализе таксономического состава микробиоты в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА выявлено, что в число наиболее представленных микроорганизмов со значением 10% и более в структуре идентифицированного микробиотического генома вошли роды *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veillonella* (табл. 5, 6), что коррелирует с результатами зарубежных исследований по анализу респираторной микробиоты при БА и ХОБЛ [Elliot W.m., 2001], а также соотносится с данными состава наиболее представленных микроорганизмов в микробиотических сообществах дыхательных путей здоровых лиц [Beck J.M., 2013; Hilty M., 2010].

Среди преобладающих микроорганизмов, составляющих от 2 до 10% микробиоты, в образцах больных ХОБЛ следует выделить роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Porphyromonas* (табл. 5), а в образцах пациентов с БА – роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Actinobacillus* (табл. 6), что также не противоречит результатам международных исследований в этой области [Marri P.R., 2013].

Таблица 5 – Преобладающие роды микроорганизмов, составляющие в сумме 95% от метагенома во всех образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ (n=88)

Роды микроорганизмов	% от состава метагенома*
<i>Streptococcus</i>	31,12±16,86
<i>Prevotella</i>	18,16±10,2
<i>Veillonella</i>	14,71±9,24
<i>Fusobacterium</i>	3,37±3,79
<i>Neisseria</i>	3,29±7,26
<i>Leptotrichia</i>	3,1±3,54
<i>Haemophilus</i>	3,01±4,79
<i>Actinomyces</i>	2,83±2,97
<i>Rothia</i>	2,26±1,82
<i>Porphyromonas</i>	2,12±4,15
<i>Granulicatella</i>	1,87±1,91
<i>Actinobacillus</i>	1,65±5,25
<i>Clostridiales</i>	1,5±1,69
<i>Gemella</i>	1,11±1,16
<i>Campylobacter</i>	1,04±1,37
<i>Gemellaceae</i>	0,77±1,1
<i>Megasphaera</i>	0,64±0,74

<i>Atopobium</i>	0,6±0,81
<i>Coprococcus</i>	0,59±0,58
<i>Capnocytophaga</i>	0,47±0,98
<i>Neisseriaceae</i>	0,46±1,15
<i>Selenomonas</i>	0,39±0,38
Примечание – * Здесь и далее данные, представленные в виде $M \pm m$, означают среднее значение \pm стандартное отклонение.	

Таблица 6 – Преобладающие роды микроорганизмов составляющие в сумме 95% от метагенома во всех образцах орофарингеальных мазков больных БА (n=50)

Род	% от состава метагенома*
<i>Streptococcus</i>	28,71±15,51
<i>Prevotella</i>	19,26±8,5
<i>Veillonella</i>	11,79±7,91
<i>Fusobacterium</i>	5,25±4,93
<i>Neisseria</i>	4,54±7,31
<i>Leptotrichia</i>	3,3±5,58
<i>Porphyromonas</i>	2,85±4,0
<i>Haemophilus</i>	2,83±3,54
<i>Actinomyces</i>	2,48±2,39
<i>Rothia</i>	2,04±1,87
<i>Actinobacillus</i>	2,0±11,88
<i>Granulicatella</i>	1,97±1,55
<i>Clostridiales</i>	1,58±1,27
<i>Campylobacter</i>	1,23±1,04
<i>Gemella</i>	0,89±0,7
<i>Megasphaera</i>	0,65±0,85
<i>Gemellaceae</i>	0,59±0,67
<i>Capnocytophaga</i>	0,54±1,21
<i>Neisseriaceae</i>	0,53±1,07
<i>Coprococcus</i>	0,52±0,43
<i>Atopobium</i>	0,49±0,47
<i>Selenomonas</i>	0,47±0,39
Примечание – * Данные представлены в виде $M \pm m$.	

Использование метода линейной регрессии, оптимизированной под метагеномные данные, позволило выявить, что образцы орофарингеальных мазков больных БА в сравнении с образцами пациентов, страдающих ХОБЛ, характеризуются достоверно более высоким содержанием микроорганизмов, относящихся к отделу *Bacteroidetes* (23,26±11,0% и 21,1±13,1% соответственно; $p=0,0007$), но меньшим содержанием микроорганизмов родов *Veillonella* (14,71±9,3% и 11,79±7,9% соответственно; $p=0,01$) и *Actinomyces* (2,84±3,0% и 2,49±2,4% соответственно; $p=0,01$). По данным Hilty M. et al (2010) *Bacteroidetes* (в частности, *Prevotella spp.*) более распространены у здоровых лиц, чем пациентов, страдающих БА и ХОБЛ, что позволяет рассматривать представителей данного

отдела в качестве составной части нормального респираторного микробиома [Hilty M., 2010]. Более того, уменьшение содержания *Bacteroidetes* в бронхиальном дереве у больных бронхообструктивными заболеваниями в сравнении со здоровыми добровольцами может быть проявлением модификации нормальной микрофлоры на фоне болезни [Park H., 2014].

Дополнительный анализ данных с помощью приложения metagenomeSeq позволил зарегистрировать, что образцы больных БА по сравнению с мазками пациентов с ХОБЛ характеризовались более высокой представленностью *Prevotella melaninogenica* и микроорганизмов таких родов, как *Selenomonas*, *Granulicatella* и *Gemella*, меньшей представленностью *Prevotella nigrescens*, *Haemophilus influenzae* и представителей родов *Aggregatibacter*, *Alcaligenaceae*, *Alloiococcus*, *Catonella*, *Mycoplasma*, *Peptoniphilus*, *Peptostreptococcaceae*, *Sediminibacterium* и *Bacteroides* (табл. 7).

Таблица 7 – Роды микроорганизмов, представленность которых при анализе metagenomeSeq статистически значимо различается в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ (n=88) и БА (n=50)

ОТЕ – операционная таксономическая единица	Коэффициент наклона прямой (КНП)*	Pvalue**	% от состава метагенома (M±m) в образцах больных БА	% от состава метагенома (M±m) в образцах больных ХОБЛ
<i>Alcaligenaceae</i>	-4,799	0,027	0,065±0,466	0,466±0
<i>Alloiococcus</i>	-1,728	0,0002	0,029±0,19	0,19±0,005
<i>Peptostreptococcaceae</i>	-1,586	0,00016	0,022±0,081	0,081±0,004
<i>Sediminibacterium</i>	-1,024	0,035	0,034±0,085	0,085±0,013
<i>Peptoniphilus</i>	-0,898	0,032	0,057±0,253	0,253±0,023
<i>Mycoplasma</i>	-0,747	0,00013	0,053±0,134	0,134±0,027
<i>Catonella</i>	-0,458	0,031	0,104±0,129	0,129±0,068
<i>Aggregatibacter</i>	-0,449	0,0084	0,11±0,178	0,178±0,072
<i>Prevotella nigrescens</i>	-0,343	0,0006	0,207±0,636	0,636±0,152
<i>Selenomonas</i>	-0,238	0,004	0,461±0,392	0,392±0,37
<i>Granulicatella</i>	-0,096	0,0075	1,976±1,555	1,555±1,873
<i>Prevotella melaninogenica</i>	-0,041	0,0038	11,014±7,879	7,879±10,929
<i>Gemella</i>	0,186	0,00013	0,89±0,706	0,706±1,11
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,352	0,00882	0,158±0,574	0,574±0,222
<i>Bacteroides</i>	0,881	0,03463	0,018±0,032	0,032±0,046

Примечания:
* Чем выше значение коэффициента наклона прямой по модулю, тем сильнее выявленное влияние (значительнее различие); ** Представлены значения p-value с поправкой на множественное сравнение по формуле Бонферрони.

В работе установлено (табл. 7), что в группе образцов орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ по сравнению с образцами пациентов с БА наблюдается более высокая представленность микроорганизмов, относящихся к типу *Firmicutes* (роды *Veillonella*, *Alloiococcus*, *Catonella*, *Peptoniphilus* и *Peptostreptococcaceae*). В ряде зарубежных исследований отмечено увеличение представленности протеобактерий и представителей типа *Firmicutes* в

орофарингеальной мокроте и лаважной жидкости в качестве маркера, отличающего респираторную микробиоту больных БА и ХОБЛ от микробиома дыхательных путей здоровых лиц. Также показано увеличение представленности *Firmicutes* во фрагментах легочной паренхимы у больных ХОБЛ по мере прогрессирования болезни [Park H., 2014; Sze M.A., 2012].

Также, больным тяжелой БА свойственна более высокая представленность рода *Lactobacillus*, который вносит существенный вклад в увеличение содержания бактерий типа *Firmicutes* у больных тяжелой ХОБЛ [Sze M.A. et al., 2012]. Выявленное нами увеличение обсемененности дыхательных путей бактериями рода *Lactobacillus* у больных тяжелой неконтролируемой астмой, вероятно, может быть рассмотрено в качестве одного из факторов, сближающих фенотипически сходные варианты тяжелого течения БА и ХОБЛ у ряда пациентов.

В сравнении с легкой персистирующей (контролируемой и частично контролируемой) астмой, образцы орофарингеальных мазков пациентов с тяжелой БА на фоне более низкого содержания бактерий рода *Prevotella* характеризуются более выраженным присутствием *Bifidobacterium longum*, *Prevotella nanceiensis*, *Neisseria cinerea*, *Aggregatibacter segnis*, а также представителей родов бактерий *Odoribacter*, *Alloiococcus*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Parvimonas*, *Moraxellaceae* и *Sneathia* (табл. 8).

Таблица 8 – Микроорганизмы, представленность которых при анализе metagenomeSeq статистически значимо различается в образцах орофарингеальных мазков больных легкой контролируемой и частично контролируемой (n=23) и тяжелой неконтролируемой БА (n=27)

ОТЕ – операционная таксономическая единица	Коэффициент наклона прямой (КНП)*	Pvalue**	% от состава метагенома (M±m) в образцах больных легкой БА	% от состава метагенома (M±m) в образцах больных тяжелой БА
<i>Odoribacter</i>	-3,823	0,00893	0,075±0,276	0,276±0,002
<i>Alloiococcus</i>	-2,429	0,00347	0,058±0,279	0,279±0,005
<i>Bifidobacterium longum</i>	-2,357	0,00043	0,067±0,197	0,197±0,06
<i>Lactobacillus</i>	-1,71	0,0022	0,06±0,201	0,201±0,011
<i>Prevotella nanceiensis</i>	-0,406	0,00063	0,504±1,509	1,509±0,356
<i>Megasphaera</i>	-0,259	0,03213	0,731±0,815	0,815±0,583
<i>Neisseria cinerea</i>	-0,241	0,00127	1,292±2,288	2,288±1,056
<i>Prevotella</i>	-0,12	0,00016	5,964±4,546	4,546±5,301
<i>Parvimonas</i>	0,488	0,00745	0,187±0,389	0,389±0,302
<i>Aggregatibacter segnis</i>	1,225	0,01546	0,021±0,043	0,043±0,076
<i>Sneathia</i>	1,825	0,00033	0,013±0,046	0,046±0,082
<i>Moraxellaceae</i>	4.393	0,00069	0,001±0,009	0,009±0,166

Примечания:
* Чем выше значение коэффициента наклона прямой по модулю, тем сильнее выявленное влияние (значительнее различие); ** Представлены значения p-value с поправкой на множественное сравнение по формуле Бонферрони.

В сравнении с ХОБЛ средней степени тяжести мазки больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения характеризовались достоверно менее выраженной

представленностью бактерий отдела *Proteobacteria* ($11,67 \pm 7,48\%$ и $9,17 \pm 7,53\%$ соответственно; $p=0,0037$).

Результаты анализа с использованием пакета приложений metagenomeSeq продемонстрировали, что орофарингеальной микробиоте больных ХОБЛ 2 степени тяжести в сравнении с образцами ХОБЛ 3-4 степени тяжести на фоне снижения представленности *Prevotella melaninogenica* свойственно более высокое содержание *Brevibacterium aureum* и представителей родов *Scardovia*, *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*, *Coprococcus*, *Gemellaceae*, *Haemophilus*, *Moryella*, *Dialister*, *Paludibacter* и *Leptotrichiaceae* (табл. 9).

Таблица 9 – Микроорганизмы, представленность которых при анализе metagenomeSeq статистически значимо различается в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ 2 степени тяжести (n=57) и пациентов с ХОБЛ 3-4 степени тяжести (n=31)

ОТЕ – операционная таксономическая единица	Коэффициент наклона прямой (КНП)*	Pvalue**	% от состава метагенома (M±m) в образцах больных ХОБЛ 2 степени	% от состава метагенома (M±m) в образцах больных ХОБЛ 3-4 степени
<i>Brevibacterium aureum</i>	-3,442	0,04849	0,23±0	0,042±0,23
<i>Scardovia</i>	-1,607	0,01633	0,086±0,005	0,028±0,086
<i>Lachnospiraceae</i>	-0,381	0,00048	0,398±0,256	0,385±0,398
<i>Veillonellaceae</i>	-0,304	0,04597	0,605±0,242	0,328±0,605
<i>Coprococcus</i>	-0,245	0,00344	0,779±0,531	0,708±0,779
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0,054	0,01189	9,325±11,122	10,575±9,325
<i>Gemellaceae</i>	0,245	0,00102	0,9±0,835	0,654±0,9
<i>Haemophilus</i>	0,329	0,0132	1,063±0,383	0,255±1,063
<i>Moryella</i>	0,628	0,00878	0,121±0,13	0,071±0,121
<i>Dialister</i>	0,643	0,00023	0,194±0,196	0,11±0,194
<i>Paludibacter</i>	0,853	0,01817	0,131±0,078	0,037±0,131
<i>Leptotrichiaceae</i>	1,035	0,00551	0,092±0,072	0,024±0,092
<i>Примечания:</i>				
* Чем выше значение коэффициента наклона прямой по модулю, тем сильнее выявленное влияние (значительнее различие); ** Представлены значения p-value с поправкой на множественное сравнение по формуле Бонферрони.				

Отметим, что существенное повышение представленности *Prevotella nancaiensis* в образцах больных тяжелой неконтролируемой БА (по сравнению с легкой формой заболевания) и *Prevotella melaninogenica* в мазках пациентов, страдающих ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения (по сравнению с образцами больных среднетяжелой ХОБЛ), может отражать их вклад в развитие и поддержание бронхолегочного воспаления (в частности нейтрофильного его компонента), обуславливая, в том числе, и более тяжелое течение заболевания с частыми обострениями и госпитализациями, резистентность к проводимой базисной терапии и, вероятно, некоторое фенотипическое сходство тяжелых форм БА и ХОБЛ (особенно в случае варианта БА с нейтрофилией) [Larsen J.M., 2015].

С помощью анализа методом обобщенных линейных моделей обнаружено, что группа образцов больных легкой контролируемой и частично контролируемой

астмой в отличие от образцов больных ХОБЛ среднетяжелого течения характеризуется более высокой представленностью как микроорганизмов рода *Fusobacterium* ($5,27 \pm 5,4\%$ и $3,05 \pm 4,2\%$ соответственно; $p=0,0007$), так и в целом представителей отдела *Fusobacteria* ($9,53 \pm 8,4\%$ и $6,41 \pm 5,9\%$ соответственно; $p=0,00028$).

В то же время в образцах больных ХОБЛ 2 степени зафиксирована более высокая представленность бактерий отдела *Firmicutes* ($54,03 \pm 16,1\%$ и $46,44 \pm 17,8\%$ соответственно; $p=0,00039$) и рода *Veillonella* ($14,49 \pm 9,3\%$ и $11,25 \pm 6,6\%$ соответственно; $p=0,0094$) по сравнению с мазками больных БА легкой степени тяжести.

В свою очередь у больных тяжелой неконтролируемой БА содержание в орофарингеальных мазках микроорганизмов рода *Fusobacterium* достоверно выше, чем в образцах больных ХОБЛ среднетяжелого течения ($5,23 \pm 3\%$ и $3,055 \pm 4,2\%$ соответственно; $p=0,00023$).

Важно отметить, что не получено статистически значимых различий в составе орофарингеальной микробиоты у больных тяжелой неконтролируемой БА и ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения ($p > 0,05$).

Анализ метагеномного состава орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ методом обобщенных линейных моделей с учетом клиничко-анамнестических данных. Влияние эпизодов приема СКС больными БА и ХОБЛ по сравнению с пациентами без анамнеза курсового приема глюкокортикостероидов на протяжении предшествующих 12 месяцев нашло отражение в снижении содержания в орофарингеальных мазках представителей родов *Streptococcus* (КНП= $-0,091$; $p=0,005$) и *Haemophilus* (КНП= $-0,333$; $p=0,006$), а также в увеличении представленности микроорганизмов отдела *Bacteroidetes* (КНП= $0,091$; $p=0,0087$) и рода *Prevotella* (КНП= $0,176$; $p=0,005$). При этом исключение из ассоциативной статистической обработки больных БА не привело к изменению выявленных трендов во взаимосвязи степени представленности указанных выше бактерий в структуре орофарингеальных метагеномов в изолированной группе пациентов с ХОБЛ и влияния терапии СКС (табл. 10).

Таблица 10 – Особенности количественного состава орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ ($n=88$) в зависимости от частоты курсовой терапии СКС на протяжении предшествующих 12 месяцев

ОТЕ – операционная таксономическая единица	Коэффициент наклона прямой (КНП)*	Pvalue**
<i>Streptococcus</i> (род)	-0,09	0,005
<i>Haemophilus</i> (род)	-0,33	0,006
<i>Bacteroidetes</i> (тип)	0,09	0,01
<i>Prevotella</i> (род)	0,18	0,005

Важным является достоверный тренд к увеличению доли микроорганизмов типа *Bacteroidetes* и представляющих его бактерий рода *Prevotella* в орофарингеальных мазках у больных БА и ХОБЛ, использовавших СКС при обострениях, в отличие от образцов пациентов, не применявших СКС на протяжении предшествующего года. Однако установлено, что по мере увеличения

количества эпизодов приема СКС (свидетельствовавших о большей частоте обострений) наблюдалось падение содержания *Bacteroidetes* в мазках, однако их содержание по-прежнему оставалось статистически более высоким, чем в образцах пациентов, не применявших СКС, что, вероятно, свидетельствует о способности данной группы препаратов, назначенных в период обострения больных хроническими бронхообструктивными заболеваниями, оказывать благотворное модифицирующее влияние на состав респираторного микробиома.

Для больных БА и ХОБЛ с более частыми госпитализациями характерна более высокая обсемененность орофарингеальных мазков бактериями рода *Actinomyces* (КНП= 0,334; p= 0,01).

Пациентам с выраженным кашлем и продукцией мокроты свойственна меньшая обсемененность образцов бактериями рода *Prevotella* (КНП= -0,101; p= 0,003 и КНП= -0,115; p= 0,0007 соответственно) по сравнению с образцами пациентов с менее выраженным кашлем, более высокое содержание в мазках представителей рода *Neisseria* характерна для больных БА и ХОБЛ, отличающихся более выраженной продукцией мокроты (КНП= 0,172; p= 0,0055).

Таксономическое разнообразие орофарингеальной микробиоты у больных БА и ХОБЛ. В результате проведенного анализа не выявлены статистически значимые различия в видовой и родовой представленности микроорганизмов, составляющих орофарингеальную микробиоту больных БА и ХОБЛ. Однако при сравнении показателей таксономического разнообразия орофарингеальной микробиоты у больных БА и ХОБЛ на уровне отделов бактерий выявлено, что значение среднего индекса Шеннона для группы образцов больных ХОБЛ несколько ниже, чем значение индекса альфа-разнообразия, рассчитанного для группы образцов больных БА ($1,10 \pm 0,24$ и $1,18 \pm 0,25$ соответственно; p=0,031).

Видовая идентификация и анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости орофарингеальных стрептококков у больных БА и ХОБЛ

По данным ПЦР-тестирования присутствие стрептококков (*Streptococcus spp.*) подтверждено в 83 (93,3%) образцах от пациентов с ХОБЛ и в 50 (98%) образцах от больных БА. У 1 пациента с ХОБЛ стрептококки в мазке не обнаружены, 6 образцов (5 от пациентов с ХОБЛ и 1 от больного БА) попали в, так называемую, «серую» зону, характерную для низких титров ДНК.

Генетические маркеры лекарственной устойчивости орофарингеальных стрептококков больных БА и ХОБЛ. Присутствие генов *mef* зафиксировано у всех пациентов с ХОБЛ (в 89 образцах; 100 %). Ген *ermB* в проанализированной группе больных ХОБЛ встречался реже, чем *mef*, и обнаружен в 81 образце (91,0%), из которых в 28 образцах (31,3%) результат обнаружения указанного гена расценен как слабоположительный. У больных БА ген *mef* также обнаружен во всех образцах (51 образец, 100%), два из которых оценены как слабоположительные по содержанию данного гена. В группе пациентов с БА гены *ermB* встречались несколько реже, чем в образцах больных ХОБЛ – в 42 образцах (82,4%), из которых слабоположительный результат идентификации гена определен для 21 образца (41,2%). В то же время статистически значимые различия по представленности гена

ermB между группами образцов орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ, а также внутри группы пациентов с астмой не выявлены ($p>0,05$).

При сравнении клинико-anamnestических данных между группами больных БА и ХОБЛ с отрицательным (*ermB* -) и слабоположительным (*ermB* +/-) результатом обнаружения гена *ermB* значимые различия не выявлены ($p>0,05$). Однако выявлен ряд статистически значимых различий между группами *ermB* + (положительный результат) и *ermB* -, *ermB* + и *ermB* +/-, а также *ermB* + и обобщенной группой, содержащей образцы *ermB* +/- и *ermB* - (табл. 11).

Таблица 11 – Статистически значимые различия между группами больных БА и ХОБЛ, в зависимости от результата обнаружения гена *ermB* в образцах орофарингеальных мазков

Параметры	Группы больных по содержанию гена <i>ermB</i>				p
	<i>ermB</i> +	<i>ermB</i> +/-	<i>ermB</i> -	<i>ermB</i> +/-, -	
Номер группы	1	2	3	4	
n	74	49	17	66	
Представленность гена <i>mef</i> в мазках, расчетная величина	4,42± 0,41	4,05± 0,33	3,93± 0,45	4,02± 0,37	$p_{1-2}=0,00000004$ $p_{1-3}=0,00023$ $p_{1-4}=0,00000001$
Обсемененность мазка стрептококками, расчетная величина	5,7± 3,14	3,65± 3,2	2,39±5, 1	3,3± 3,8	$p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3}=0,014$ $p_{1-4}=0,0002$
Курсы АБП за год	1,6± 1,2	0,64± 0,88	0,82±1, 5	0,69± 1,07	$p_{1-2}=0,0007$ $p_{1-3}=0,026$ $p_{1-4}=0,00025$
Курсы терапии макролидами за год	0,54± 0,58	0,18± 0,44	0,11±0, 47	0,17± 0,45	$p_{1-2}=0,002$ $p_{1-3}=0,0054$ $p_{1-4}=0,00028$
Индекс курения, пачка/лет	47,1± 41,4	22,1± 25,7	29,5±2 9,3	47,1± 41,4	$p_{1-2}=0,0006$ $p_{1-3}>0,05$ $p_{1-4}=0,001$
Продукция мокроты, баллы	1,32± 0,84	0,98± 0,76	0,76±0, 97	0,92± 0,82	$p_{1-2}=0,043$ $p_{1-3}=0,012$ $p_{1-4}=0,008$

Указанные различия сохранялись и при аналогичном анализе внутри группы ХОБЛ. Так группа больных ХОБЛ с положительным результатом детекции гена *ermB* в орофарингеальных мазках отличалась от пациентов с отсутствием данного гена или слабоположительным результатом более высокой представленностью гена *mef*, более частыми курсами АБТ, включая более частое применение макролидных АБП, выраженным риском обострений и характеризовались более существенным стажем курения.

Представленность генов *mef* и *ermB* в образцах орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ и клинико-anamnestические особенности заболевания. При проведении корреляционного анализа в обобщенной группе образцов мазков ротоглотки больных БА и ХОБЛ отмечена положительная связь между уровнем представленности генов *mef* и *ermB* ($r=0,55$; $p<0,000015$).

В группе больных ХОБЛ высокая представленность гена *ermB* в образце соотносилась с более высоким значением индекса курения и положительно коррелировала с более частыми обострениями ХОБЛ у пациентов, увеличением частоты приема АБП (макролидов, в частности) и более выраженной продукцией мокроты. Схожие результаты у больных ХОБЛ получены при анализе представленности гена *mef* – высокая представленность этого гена достоверно ассоциировалась с частыми эпизодами обострения ХОБЛ и большим количеством курсов АБТ (в частности, эпизодов лечения макролидными АБП) за предшествующие 12 месяцев (табл. 12).

Таблица 12 – Анализ корреляционных связей между представленностью генов *mef* и *ermB* с клинико-anamnestическими характеристиками больных ХОБЛ

Представленность гена в образце	Клинико-anamnestический признак	n	r	p
<i>mef</i>	Частота обострений	88	0,25	0,018
<i>mef</i>	Частота курсов АБТ	88	0,27	0,010
<i>mef</i>	Частота курсов терапии макролидами	88	0,25	0,016
<i>ermB</i>	Частота обострений	87	0,30	0,0045
<i>ermB</i>	Частота курсов АБТ	87	0,49	0,000002
<i>ermB</i>	Частота курсов терапии макролидами	87	0,43	0,00003
<i>ermB</i>	Продукция мокроты	87	0,30	0,0045
<i>ermB</i>	Индекс курения	87	0,32	0,0022

Примечание – n – количество исследованных образцов и пациентов; r – коэффициент корреляции; p – значение достоверности (здесь и далее).

В группе больных БА выявлена прямая корреляционная связь между представленностью гена *ermB* и частотой антибиотикотерапии за предшествующий год ($r=0,37$; $p=0,037$).

Таким образом, наиболее высокий уровень представленности указанных генов AP, выявленный при идентификации орофарингеальных стрептококков, характерен для больных ХОБЛ и БА, отличающихся тяжелым течением заболевания с выраженной симптоматикой, склонностью к частым обострениям и, как следствие, составляющим группу высокого риска по частоте назначения системных АБП, среди которых современные макролиды (азитромицин и кларитромицин) являются широко востребованными препаратами в лечении инфекционно-зависимых обострений у больных бронхообструктивными заболеваниями, особенно у пациентов с ХОБЛ [Чучалин А.Г. и соавт., 2014].

Качественные и количественные особенности состава орофарингеальных стрептококков больных БА и ХОБЛ. Для определения ассоциации содержания стрептококков в образцах орофарингеальных мазков у больных БА и ХОБЛ с клиническими признаками заболевания рассчитана безразмерная величина ΔSt , отражающая разность между пороговыми значениями накопления сигнала амплификации от ДНК человека и от ДНК стрептококков. Опосредованно, эта величина характеризует степень бактериального обсеменения. При проведении корреляционного анализа в обобщенной группе больных БА и ХОБЛ выявлено, что

уровень обсемененности орофарингеальных мазков стрептококками положительно коррелирует с представленностью генов *mef* ($r=0,51$; $p<0,00001$) и *ermB* ($r=0,29$; $p=0,001$).

По данным видовой идентификации в группе больных ХОБЛ *S. pneumoniae* достоверно выявлен в двух образцах, еще в четырех наблюдался слабоположительный сигнал (6,74% образцов). Во всех этих образцах присутствовали гены *mef*. Гены *ermB* обнаружены в пяти образцах из шести (83,3% случаев). Следует отметить, что у двух пациентов данной группы болезнь характеризовалась тяжелым течением, высоким риском развития обострений (два и более эпизода за 12 месяцев) и потребностью в применении антибиотиков один или более эпизодов в год. Еще у двух пациентов из группы ХОБЛ с выявленным *S. pneumoniae* зарегистрирована средняя степень тяжести по спирометрической классификации GOLD, 2010, высокий риск развития обострений (2 и 4 эпизода обострения) и один эпизод назначения АБТ за предшествующие 12 месяцев.

Среди больных БА *S. pneumoniae* идентифицирован в четырех образцах (7,8%), однако в низких (слабоположительных) титрах. Следует отметить, что эти пациенты относились к группе больных частично контролируемой и неконтролируемой астмой и перенесли на протяжении предшествующих 12 месяцев минимум по 1 эпизоду обострения заболевания. При этом у 2 пациентов в качестве базисной терапии использовались ИГКС в низких дозах, еще 2 пациента получали фиксированные комбинации ИГКС и пролонгированных бета-2-агонистов. Во всех случаях обнаружение ДНК *S. pneumoniae* в образцах мазков больных БА также как и в образцах пациентов с ХОБЛ сопровождалось выявлением генов *mef* и *ermB*, предопределяющих устойчивость к макролидам.

Таким образом, обследованные группы больных ХОБЛ и пациентов с БА характеризовались низкой степенью контаминации *S. pneumoniae* по результатам исследования орофарингеальных мазков (6,74% и 7,8% мазков соответственно). В то же время, все образцы с выявленным *S. pneumoniae* отличались наличием генетических детерминант устойчивости к макролидным антибиотикам.

Присутствие низких титров (слабоположительный сигнал) *S. pyogenus* установлено в 60 образцах (42,9% совокупной выборки образцов), причем *S. agalacticae* не обнаружены, что закономерно при исследовании биологических проб со слизистых верхних дыхательных путей.

Подавляющее большинство стрептококков, выявленных в орофарингеальных мазках больных БА и пациентов с ХОБЛ, - зеленящие стрептококки группы *mitis*.

Результаты таксономического исследования кишечной микробиоты у пациентов с ХОБЛ, больных БА и здоровых лиц

При сравнении сходства образцов кала больных ХОБЛ по бактериальному составу с группой контроля (базой данных по образцам кала практически здоровых добровольцев) и образцами кала больных БА с использованием метода многомерного шкалирования – MDS – по метрике Bray-Curtis не выявлены существенные различия, которые позволили бы выделить анализируемые образцы в независимые группы.

Данные по содержанию в образцах кала больных ХОБЛ и БА преобладающих родов микроорганизмов, составляющих в сумме 95% от всего микробиотического состава по всем образцам, отражены в порядке уменьшения их представленности в группе образцов в таблицах 13 и 14 соответственно.

Таблица 13 – Преобладающие роды микроорганизмов, составляющие в сумме 95% от метагенома во всех образцах кала больных ХОБЛ (n=58)

Роды микроорганизмов	% от состава метагенома*
<i>Bacteroides</i>	36,8±23,97
<i>Prevotella</i>	10,25±17,57
<i>Lachnospiraceae</i>	9,25±8,77
<i>Faecalibacterium</i>	4,61±3,21
<i>Blautia</i>	5,07±4,46
<i>Roseburia</i>	3,82±3,39
<i>Coprococcus</i>	3,33±3,35
<i>Escherichia/Shigella</i>	3,66±12,88
<i>Parabacteroides</i>	3,18±3,54
<i>Ruminococcus</i>	2,51±2,77
<i>Alistipes</i>	1,96±1,85
<i>Eubacterium</i>	1,77±2,45
<i>Dorea</i>	1,34±2,19
<i>Anaerostipes</i>	1,29±1,51
<i>Dialister</i>	1,21±3,31
<i>Clostridium</i>	0,9±1,18
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,49±0,95
<i>Streptococcus</i>	0,76±2,05
<i>Akkermansia</i>	0,7±1,75
<i>Barnesiella</i>	0,69±1,0
<i>Odoribacter</i>	0,54±0,44
<i>Bifidobacterium</i>	0,45±1,17

Примечание – * Здесь и далее данные, представленные в виде $M \pm t$, означают среднее значение \pm стандартное отклонение.

При сравнении представленности, идентифицированных геномов микроорганизмов в 2-х независимых группах (образцы больных ХОБЛ 2 степени тяжести и образцы больных ХОБЛ 3-4 степени тяжести) по методу Манна-Уитни статистически значимые различия для большинства из них получены не были. Однако, в образцах больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения по сравнению с метагеномами больных ХОБЛ средней степени тяжести выявлено достоверно более высокое содержание типового штамма *Bacteroides uniformis* ATCC 8492 (7,7±16,5% и 4,1±4,6% соответственно; $p=0,001$). В то же время метагеномы больных ХОБЛ 2 степени тяжести отличались от образцов пациентов, страдающих ХОБЛ 3-4 степенью тяжести более высокой представленностью микроорганизмов семейства *Lachnospiraceae* (12,53±10,2% и 8,12±7,9% соответственно; $p=0,0001$).

Таблица 14 – Преобладающие роды микроорганизмов, составляющие в сумме 95% от метагенома во всех образцах кал больных БА (n=32)

Роды микроорганизмов	% от состава метагенома*
----------------------	--------------------------

<i>Prevotella</i>	33,9±25,76
<i>Bacteroides</i>	19,85±17,38
<i>Lachnospiraceae</i>	10,18±8,78
<i>Faecalibacterium</i>	5,07±2,99
<i>Blautia</i>	2,62±1,68
<i>Roseburia</i>	4,42±2,85
<i>Coprococcus</i>	4,85±2,4
<i>Phascolarctobacterium</i>	1,67±3,07
<i>Parabacteroides</i>	1,6±1,64
<i>Ruminococcus</i>	1,52±1,34
<i>Eubacterium</i>	1,51±1,37
<i>Alistipes</i>	1,2±1,8
<i>Bifidobacterium</i>	0,88±1,42
<i>Dorea</i>	0,83±0,43
<i>Dialister</i>	0,8±1,42
<i>Escherichia/Shigella</i>	0,8±0,87
<i>Anaerostipes</i>	0,69±0,95
<i>Akkermansia</i>	0,47±0,91
<i>Streptococcus</i>	0,45±0,56
<i>Odoribacter</i>	0,44±0,21
<i>Barnesiella</i>	0,35±0,35
<i>Clostridium</i>	0,28±0,29
Примечание – * Здесь и далее данные, представленные в виде $M \pm m$, означают среднее значение \pm стандартное отклонение.	

Различия таксономического состава кишечной микробиоты у больных ХОБЛ и здоровых добровольцев. С помощью теста Манна-Уитни (U-тест) выявлены статистически значимые различия в представленности 5 родов (табл. 15) и 15 видов (табл. 16) между 58 образцами пациентов с ХОБЛ и 88 образцами метагенома кала здоровых жителей Российской Федерации ($p < 0,01$).

Таблица 15 – Роды микроорганизмов, статистически значимо различающиеся ($p < 0,01$) по представленности в образцах кала у больных ХОБЛ ($n=58$) и здоровых добровольцев Российской Федерации ($n=88$)

Роды микроорганизмов	p (U-тест, FDR)	% у больных ХОБЛ	% в группе контроля
<i>Dorea</i>	0,0061	1,34±2,2	1,72±1,7
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,00056	0,49±0,95	1,07±1,8
<i>Akkermansia</i>	0,0026	0,7±1,75	1,9±6,9
<i>Odoribacter</i>	0,0098	0,54±0,4	0,35±0,4
<i>Paraprevotella</i>	0,0098	0,4±0,4	0,24±0,3

Как видно из табл. 16, кишечная микробиота больных ХОБЛ достоверно отличалась от сообщества микроорганизмов здоровых добровольцев более низким содержанием бактерий-комменсалов, составляющих нормофлору кишечника, таких как представители рода *Dorea* (в 1,28 раза), *Phascolarctobacterium* (в 2,18 раза), *Akkermansia* (в 2,71 раза). В то же время в образцах кала больных ХОБЛ

наблюдалась более выраженная представленность микроорганизмов рода *Odoribacter* (в 1,54 раза) и *Paraprevotella* (в 1,67 раза).

Таблица 16 – Виды микроорганизмов, статистически значимо различающиеся по представленности в образцах кала у больных ХОБЛ (n=58) и здоровых добровольцев Российской Федерации (n=88)

Виды микроорганизмов	p (U-тест)	% у больных ХОБЛ	% в группе контроля
<i>Prevotella copri</i> DSM 18205	0,0012	8,9±16,5	15,11±20,1
<i>Butyrivibrio crossotus</i> DSM 2876	0,0009	2,45±7,4	1,91±6
<i>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 8503	0,0001	1,15±1,4	0,47±0,8
<i>Phascolarctobacterium</i> sp. YIT 12067	0,0005	0,49±0,95	1,07±1,8
<i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA 835	0,0025	0,69±1,75	1,93±6,9
<i>Bacteroides coprophilus</i> DSM 18228	0,002	0,6±1,5	0,28±0,4
<i>Ruminococcus obeum</i> ATCC 29174	0,0003	0,44±0,4	0,8±0,8
<i>Paraprevotella xylaniphila</i> YIT 11841	0,0082	0,37±0,4	0,24±0,3
<i>Ruminococcus obeum</i> A2 162	0,0005	0,36±0,3	0,54±0,4
<i>Dialister succinatiphilus</i> YIT 11850	0,0023	0,37±1,6	0,55±2,6
<i>Eubacterium cylindroides</i> T2 87	0,002	0,27±0,3	0,37±0,25
<i>Clostridium leptum</i> DSM 753	0,0008	0,16±0,6	0,17±0,3
<i>Roseburia inulinivorans</i> DSM 16841	0,0099	1,63±1,7	2,19±1,7
<i>Dorea longicatena</i> DSM 13814	0,0087	1,26±2,2	1,61±1,7

В образцах кала больных ХОБЛ по сравнению со здоровыми добровольцами зарегистрирован статистически значимо более высокий уровень таких бактерий, как *Butyrivibrio crossotus* (в 1,28 раза), *Parabacteroides distasonis* (в 2,45 раза), *Bacteroides coprophilus* (в 2,14 раза), *Paraprevotella xylaniphila* (в 1,54 раза). В то же время у больных ХОБЛ в сравнении с группой контроля в образцах кала существенно снижается содержание бактерий-комменсалов типа *Firmicutes*, составляющих нормофлору кишечника, в том числе *Prevotella copri* (в 1,7 раза), *Dorea longicatena* (в 1,28 раза), *Phascolarctobacterium* sp. (в 2,18 раза), *Dialister succinatiphilus* (в 1,49 раза), *Clostridium leptum* (в 1,1 раза), также снижено содержание потенциально полезных и составляющих часть нормальной микробиоты кишечника *Akkermansia muciniphila* (в 2,8 раза), бутират-продуцирующих *Ruminococcus obeum* (в 1,8 раза), *Ruminococcus obeum* (в 1,5 раза), *Eubacterium cylindroides* (в 1,37 раза) и *Roseburia inulinivorans* (в 1,34 раза) (табл. 16).

При сравнительном анализе представленности микроорганизмов в образцах кала больных ХОБЛ в зависимости от степени тяжести заболевания, анамнеза антибиотикотерапии, частоты обострений и ассоциированных с ними госпитализаций статистически значимых различий между группами не выявлено.

Различия таксономического состава кишечной микробиоты у больных БА и здоровых добровольцев. С помощью теста Манна-Уитни (U-тест) выявлены статистически значимые различия в представленности 5 родов (табл. 17) и 1 вида (табл. 18) между 32 образцами пациентов с БА и 88 образцами метагенома кала здоровых жителей Российской Федерации (p<0,01).

Таблица 17 – Роды микроорганизмов, статистически значимо различающиеся по представленности в образцах кала у больных БА (n=32) и здоровых добровольцев Российской Федерации (n=88)

Роды и семейства микроорганизмов	p (U-тест)	% у больных БА	% в группе контроля
<i>Blautia</i>	0,0037	2,62±4,5	6,42±7,1
<i>Clostridium</i>	0,0063	0,28±1,2	0,61±0,6
<i>Ruminococcaceae</i> (семейство)	0,0037	0,29±0,7	0,64±0,5
<i>Subdoligranulum</i>	0,007	0,28±0,3	0,57±0,4
<i>Collinsella</i>	0,006	0,1±0,2	0,36±0,4

По данным выполненного анализа кишечная микробиота больных БА достоверно отличалась от микробиоты кишечника здоровых добровольцев пониженным содержанием бутират-продуцирующих бактерий семейства *Ruminococcaceae* (в 2,21 раза), а также бактерий рода *Blautia* (в 2,45 раза), *Clostridium* (в 2,18 раза), *Subdoligranulum* (в 2,03 раза), *Collinsella* (в 3,6 раза) (табл. 18).

Таблица 18 – Виды микроорганизмов, статистически значимо различающиеся по представленности в образцах кала у больных БА (n=32) и здоровых добровольцев Российской Федерации (n=88)

Виды микроорганизмов	p (U-тест)	% у больных БА	% в группе контроля
<i>Ruminococcus sp. 5 I 39BFAA</i>	0,0075	0,76±2,2	2,34±3,7
<i>Faecalibacterium prausnitzii A2 I 65</i>	0,0073	1,14±1,2	2,89±3
<i>Bacteroides ovatus SD CMC</i>	0,0078	0,95±1,3	0,51±0,5
<i>Blautia wexlerae AGR2146</i>	0,0079	0,49±1,3	1,53±2,4
<i>Coprococcus catus GD 7</i>	0,0073	0,38±0,3	0,81±0,6
<i>Eubacterium cylindroides T2 87</i>	0,0093	0,18±0,3	0,37±0,25
<i>Clostridium bolteae ATCC BAA 613</i>	0,0051	0,02±0,6	0,09±0,15
<i>Collinsella aerofaciens ATCC 25986</i>	0,0073	0,1±0,2	0,34±0,4
<i>Acidaminococcus sp. D21</i>	0,009	0,02±0,6	0,07±0,07
<i>Lachnospiraceae bacterium 3 I 57FAA CT1</i>	0,0073	0,07±0,2	0,11±0,1
<i>Acidaminococcus fermentans DSM 20731</i>	0,0073	0,23±0,08	0,02±0,1

Согласно результатам сравнительного анализа образцы кала больных БА по сравнению с образцами здоровых лиц характеризовались существенным снижением таких микроорганизмов, как *Ruminococcus sp.* (в 3,08 раза), *Faecalibacterium prausnitzii* (в 2,53 раза), *Blautia wexlerae* (в 3,12 раза), *Coprococcus catus* (в 2,13 раза), *Eubacterium cylindroides* (в 2,05 раза), а также некоторым снижением представленности *Clostridium bolteae* (в 4,5 раза), *Collinsella aerofaciens* (в 3,4 раза), *Acidaminococcus sp.* (в 3,5 раза) и *Lachnospiraceae bacterium* (в 1,57 раза). В то же время кишечная микробиота пациентов, страдающих БА, отличалась более высоким содержанием *Acidaminococcus fermentans* (в 1,15 раза) и *Bacteroides ovatus* (в 1,86 раза) (табл. 18).

Таким образом, по сравнению с метагеномами кала здоровых лиц, образцы больных БА характеризовались более низкой представленностью микроорганизмов, относящихся к типу *Firmicutes* (семейства *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae* и *Clostridiaceae*) и являющихся типичными представителями нормальной кишечной микробиоты, участвующей в синтезе короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) [Wang F., 2015]. Отметим, что *Faecalibacterium prausnitzii* – бактерии-комменсалы семейства *Clostridiaceae* – основной продуцент масляной КЦЖК (бутирата). Масляная КЦЖК, помимо регуляции пищеварения и всасывания в толстом кишечнике, обладает высокой способностью подавлять свободнорадикальное окисление и, вероятно, уменьшать выраженность аутоиммунного воспаления в толстом кишечнике [Sokol H., 2008].

При сравнительном анализе содержания микроорганизмов в образцах кала больных БА в зависимости от степени тяжести заболевания, анамнеза антибиотикотерапии, частоты обострений и ассоциированных с ними госпитализаций статистически значимых различий между группами не выявлено.

Различия таксономического состава кишечной микробиоты у больных ХОБЛ и пациентов с БА. При сравнении таксономического состава микробиоты кала больных ХОБЛ и БА с использованием обобщенной линейной регрессии (англ. GLM, generalized linear model) выявлены статистически значимые различия в представленности некоторых родов и видов (типовых штаммов) микроорганизмов ($p < 0,01$). В частности, образцы кала больных БА в сравнении с образцами пациентов с ХОБЛ характеризовались достоверно более высоким содержанием микроорганизмов, относящихся к роду *Phascolarctobacterium* ($p = 0,00054$; $1,68 \pm 3,1\%$ и $0,57 \pm 0,95\%$ соответственно), но уступали по уровню представленности бактериального рода *Parabacteroides* ($p = 0,0066$; $1,48 \pm 1,6\%$ и $3,01 \pm 3,5\%$ соответственно).

При сравнении видового состава метагеномов кала больных ХОБЛ и БА выявлено, что образцы кала больных БА отличались достоверно более высоким содержанием *Prevotella stercorea* (в 2,55 раз выше) и *Phascolarctobacterium sp.* (в 2,95 раз выше). В то же время у больных ХОБЛ метагеномы кала характеризовались более высоким содержанием геномов *Bacteroides vulgatus* (в 1,63 раза), *Bacteroides dorei* (в 1,91 раза), *Escherichia coli* (в 5,5 раз) и *Escherichia sp.* (в 5,34 раза) (табл. 19).

Таблица 19 – Виды микроорганизмов, статистически значимо различающиеся по представленности в образцах кала у больных БА ($n=32$) и пациентов, страдающих ХОБЛ ($n=58$)

Виды (типовые штаммы) микроорганизмов	p (U-тест)	% у больных БА	% у пациентов с ХОБЛ
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	0,0013	$5,19 \pm 9,6$	$8,47 \pm 8,9$
<i>Bacteroides dorei</i> 5 1 36 D4	0,003	$2,48 \pm 4,15$	$4,75 \pm 8,3$
<i>Escherichia coli</i> str. K12 substr. MG1655	0,001	$0,4 \pm 0,4$	$2,21 \pm 6,9$
<i>Prevotella stercorea</i> DSM 18206	0,00023	$2,69 \pm 2,8$	$1,05 \pm 2$
<i>Escherichia sp.</i> 1 1 43	0,008	$0,29 \pm 0,3$	$1,55 \pm 4,7$
<i>Phascolarctobacterium sp.</i> YIT 12067	0,0014	$1,68 \pm 3,1$	$0,57 \pm 0,95$

Образцы больных ХОБЛ 2 степени тяжести отличались от образцов кала пациентов с легкой БА более высокой представленностью бактериальных родов *Lachnospiraceae* (в 1,95 раз), *Escherichia* (в 6,32 раз) и *Parabacteroides* (в 5,1 раз), а также *Bacteroides dorei* (в 7,38 раз) и *Butyrivibrio crossotus* (в 5,15 раз). В то же время метагеномы кала пациентов с ХОБЛ средней степенью тяжести характеризовались менее выраженным содержанием *Prevotella stercorea* (в 4,82 раза) и представителей рода *Bifidobacterium* (в 8,19 раз) (табл. 20).

Таблица 20 – Роды и типовые штаммы микроорганизмов, статистически значимо различающиеся по представленности в образцах кала у больных легкой БА (n=32) и пациентов с ХОБЛ 2 степени тяжести (n=58)

Роды микроорганизмов	p (U-тест)	% у больных легкой БА	% у пациентов с ХОБЛ 2 степени
<i>Lachnospiraceae</i>	0,003	6,42±4,2	12,53±9,8
<i>Escherichia</i>	0,0078	0,59±0,5	3,73±10,85
<i>Parabacteroides</i>	0,0078	0,78±1,1	3,97±4,35
<i>Bifidobacterium</i>	0,0028	2,047±2,2	0,25±0,65
Виды (типовые штаммы) микроорганизмов			
<i>Bacteroides dorei</i> 5 1 36 D4	0,003	0,79±0,9	5,83±2,8
<i>Butyrivibrio crossotus</i> DSM 2876	0,0041	1,11±1,4	5,72±8,5
<i>Prevotella stercorea</i> DSM 18206	0,00034	4,24±4,3	0,88±1

У больных среднетяжелой ХОБЛ по сравнению с группой пациентов, страдающих тяжелой неконтролируемой БА, метагеномы кала характеризовались существенно более высокой представленностью бактерий рода *Escherichia* (3,73±10,85 и 0,59±0,5% соответственно; p=0,0005) и менее выраженным содержанием *Eubacterium eligens* (1,5±2,1 и 3,13±5,5% соответственно; p=0,008).

Результаты обобщенного линейного регрессионного анализа представленности микроорганизмов в образцах кала здоровых добровольцев, больных БА и пациентов с ХОБЛ. Для выявления тренда различий при одновременном сравнении представленности микроорганизмов в образцах кала больных ХОБЛ, пациентов с БА и здоровых добровольцев использован метод обобщенного линейного регрессионного анализа с помощью программного языка R (пакет glm2) [Marschner I., 2011]. В результате данного анализа выявлены 5 родов и 15 видов бактерий, достоверно различающихся между всеми выборками образцов (табл. 21 и 22).

Таблица 21 – Роды микроорганизмов, статистически значимо различающиеся в образцах кала у больных ХОБЛ, пациентов с БА и здоровых добровольцев (по результатам обобщенного линейного регрессионного анализа)

Род микроорганизма	КНП*	p **
<i>Lachnospiraceae</i>	-0,07	0,0094
<i>Blautia</i>	-0,13	0,0004
<i>Phascolarctobacterium</i>	-0,31	0,0023
<i>Lactobacillus</i>	-0,46	0,0001
<i>Tannerella</i>	0,55	0,005

Примечания:

* Чем выше значение КНП по модулю, тем сильнее обнаруженное влияние (значительнее различие); при положительном значении – обсемененность микроорганизмом возрастает в ряду образцов от здоровых лиц к больным БА и далее к пациентам с ХОБЛ, а при отрицательном – представленность таксона микроорганизма выше в образцах здоровых добровольцев, ниже в группе образцов больных БА и еще ниже в группе образцов пациентов с ХОБЛ; ** Значения *p-value* даны с поправкой FDR.

При расположении сравниваемых групп метагеномов кала в ряду «образцы здоровых лиц – образцы больных БА – образцы больных ХОБЛ» регистрируется наивысшая представленность микроорганизмов рода *Tannerella* в исследуемом биоматериале, полученном от больных ХОБЛ и наименьшая – в кале здоровых добровольцев. В то же время образцы больных ХОБЛ отличались наименьшим содержанием представителей рода *Lachnospiraceae*, *Blautia*, *Phascolarctobacterium* и *Lactobacillus*. Наибольшая представленность данных родов микроорганизмов наблюдалась в образцах здоровых лиц, а группа образцов пациентов с БА занимала промежуточное положение по степени обсемененности данными бактериями (табл. 21).

Образцы кала больных ХОБЛ по сравнению с образцами здоровых лиц и пациентов с БА характеризовались наибольшей представленностью таких микроорганизмов, как *Eubacterium siraeum*, *Dialister invisus*, *Ruminococcus torques*, *Parabacteroides johnsonii* а также ряда представителей рода *Bacteroides* (*Bacteroides coprophilus*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides sp.*, *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides oleiciplenus*). При этом наименьшее содержание указанных бактерий наблюдалось в образцах здоровых добровольцев, а образцы больных БА занимали промежуточное положение в ряду анализируемых групп. Следует отметить более высокую представленность потенциально патогенных *Tannerella sp.* и *Escherichia fergusonii* в ряду сравнения групп образцов по мере перемещения от метагеномов кала здоровых лиц к группе проб больных БА и далее к образцам пациентов с ХОБЛ (табл. 22).

Таблица 22 – Виды микроорганизмов, статистически значимо различающиеся в образцах кала у здоровых лиц, больных БА и пациентов с ХОБЛ (по результатам обобщенного линейного регрессионного анализа)

Вид микроорганизма	Коэффициент КНП*	p **
<i>Eubacterium siraeum</i> 70 3	0,31	0,0033
<i>Ruminococcus torques</i> L2 14	-0,32	0,0004
<i>Dialister invisus</i> DSM 15470	0,46	0,0002
<i>Ruminococcus torques</i> ATCC 27756	0,32	0,0067
<i>Phascolarctobacterium sp.</i> YIT 12067	-0,31	0,0032
<i>Bacteroides coprophilus</i> DSM 18228	0,38	0,0087
<i>Bacteroides ovatus</i> 3 8 47FAA	0,65	0,0002
<i>Bacteroides sp.</i> D2	0,78	0,0002
<i>Bacteroides intestinalis</i> DSM 17393	0,62	0,0017
<i>Coprococcus catus</i> GD 7	-0,39	0,0038
<i>Tannerella sp.</i> 6 1 58FAA CT1	0,55	0,0065
<i>Eubacterium bifforme</i> DSM 3989	-0,46	0,0029

<i>Bacteroides oleiciplenus</i> YIT 12058	0,75	0,0055
<i>Parabacteroides johnsonii</i> DSM 18315	0,68	0,0098
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	1	0,0038
<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 25644	-0,78	0,0038
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> DSM 16992	-1,19	0,0053
<p>Примечания: * Чем выше значение коэффициента β по модулю, тем сильнее обнаруженное влияние (значительнее различие); при положительном значении – обсемененность микроорганизмом возрастает в ряду образцов от здоровых лиц к больным БА и далее к пациентам с ХОБЛ, а при отрицательном – представленность таксона микроорганизма выше в образцах здоровых добровольцев, ниже в группе образцов больных БА и еще ниже в группе образцов пациентов с ХОБЛ; ** Значения <i>p-value</i> даны с поправкой FDR.</p>		

Противоположные результаты представленности между сравниваемыми группами получены для таких микроорганизмов, как *Phascolarctobacterium sp.*, *Coprococcus catus*, *Eubacterium bifforme*, *Lactobacillus ruminis*, *Bifidobacterium catenulatum* и продуцирующие бутират *Ruminococcus torques*. Максимальное содержание данных бактерий зарегистрировано в образцах кала здоровых лиц, промежуточное – у больных БА, и минимальное – в образцах пациентов с ХОБЛ (табл. 22).

Для обобщенной выборки образцов кала больных ХОБЛ и БА выявлено, что частота приема АБП на протяжении предшествующих 12 месяцев прямо коррелирует с выраженностью обсеменения образцов кала такими микроорганизмами, как *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides xylanisolvens* и обратно коррелирует с представленностью и бактерий рода *Coprococcus* (табл. 23).

Таблица 23 – Результаты корреляционного анализа частоты курсового приема антибиотиков и представленности некоторых микроорганизмов в обобщенной выборке образцов кала больных БА и ХОБЛ

Микроорганизмы	Коэффициент корреляции, r	p
<i>Coprococcus</i>	-0,15	0,0058
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	0,094	0,003
<i>Bacteroides uniformis</i> ATCC 8492	0,13	0,0002
<i>Bacteroides dorei</i> 5 1 36 D4	0,12	0,0046
<i>Bacteroides stercoris</i> ATCC 43183	0,2	0,001
<i>Clostridium sp.</i> L2 50	-0,38	0,003
<i>Bacteroides caccae</i> ATCC 43185	0,25	0,0027
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> XB1A	0,3	0,001

Таким образом, уникальные результаты выполненного нами исследования свидетельствуют о более выраженном характере патологической модификации качественного и количественного состава кишечной микробиоты у больных ХОБЛ по сравнению с группой образцов больных БА и здоровых лиц. При параллельном сравнении представленности бактериальных геномов в образцах всех трех групп с помощью метода обобщенного линейного регрессионного анализа выявлено, что

образцы кала больных ХОБЛ характеризуются наиболее выраженным сдвигом в соотношении микроорганизмов типов «*Firmicutes* – *Bacteroidetes*» в пользу увеличения представленности последних.

Поскольку, согласно приоритетным результатам данной работы, выявлена положительная корреляция частоты приема АБП и увеличения представленности в образцах микроорганизмов рода *Bacteroides*, а также отрицательная корреляция между представленностью *Clostridium sp.* и бактерий рода *Coprococcus* в образцах кала и количеством курсов приема АБП на протяжении предшествующего года, нами выдвинута гипотеза о вкладе системной АБТ у больных бронхообструктивными заболеваниями в развитие указанных выше микробиотических аномалий. В современной литературе описано, что при антибиотик-ассоциированных нарушениях микробиоты в первую очередь истощается КЦЖК-продуцирующая нормобиота, что приводит к снижению продукции бутирата и других КЦЖК, истощению энергообеспечения и дистрофическим изменениям покровного эпителия кишечника, способствуя повышению проницаемости кишечного барьера по отношению к антигенам пищевого микробного происхождения, нарушению всасывания воды и электролитов. Все это способствует развитию хронических воспалительных заболеваний толстого кишечника, значительно усугубляющих дисбаланс в кишечной микробиоте [Ардатская М.Д., 2014].

Анализ антибиотикорезистентности кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ

Профилирование генов АР кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ в сравнении со здоровыми добровольцами относительно Antibiotic Resistance Database – ARDB. В результате анализа обнаружено значительное разнообразие представленных генов резистентности к АБП: ненулевое покрытие ридами получили 2074 аминокислотных последовательности транслированных генов устойчивости (89 классов генов АР), соответствующих 14 группам АБП. Суммарная относительная представленность генов АР значимо различалась между тремя группами (критерий Краскела-Уоллиса $p < 0,00001$). При этом для группы БА данная величина значимо выше, чем для контрольной группы (односторонний тест Манна-Уитни, $p = 0,008596$, отношение медиан (ОМ) двух групп 1,3), и ниже, чем для группы ХОБЛ ($p = 0,004087$, ОМ двух групп 1,4).

Относительный уровень соответствующих генов АР выше в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с группой контроля (односторонний тест Манна-Уитни, скорректированное p -значение $< 0,05$) для таких групп АБП, как бета-лактамы (пенициллины и цефалоспорины), аминогликозиды, макролиды, сульфаниламиды, фторхинолоны и препараты других групп (табл. 24).

Таблица 24 – Антибиотики, гены резистентности к которым избыточно представлены в группе образцов кишечной микробиоты пациентов, страдающих ХОБЛ, по сравнению с образцами группы контроля

Антибактериальные препараты	p	Отношение медиан (ОМ) двух групп*
I. Бета-лактамы	0	0,3103

1. Пенициллины	0,0344	0,438
2. Цефалоспорины	0	0,29
Первого поколения	0,0281	1,0
Второго поколения	0,0281	1,0
II. Аминогликозиды	0	0,3155
Канамицин	0	0,2088
Неомицин	0,0001	0,2126
Паромомицин (мономицин)	0,0001	0,2126
Рибостамицин	0,0001	0,2126
Ливидомицин	0,0002	0,2126
Бутирозин	0,0002	0,2425
Стрептомицин	0,0016	0,5182
Сизомицин	0,0028	0,0212
Дибекацин	0,0028	0,0212
Гентамицин В	0,00002	0,2126
Нетилмицин	0,0054	0,0222
Тобрамицин	0,0036	0,0212
Амикацин	0	0,1842
Изепамицин	0	0,1842
III. Макролиды	0	0,3474
Эритромицин	0	0,3059
Рокситромицин	0,0054	0,4046
IV. Сульфаниламиды и котримоксазол		
Сульфаниламиды	0	1,0
V. Хинолоны		
Фторхинолоны	0	0,3399
VI. Препараты других классов		
1. Тетрациклины		
Тетрациклин	0	0,7069
2. Глицилциклины	0	0,3366
Тигециклин	0,0015	0,4443
3. Линкозамиды	0	0,3194
Линкомицин	0	0,0176
4. Прочие		
Хлорамфеникол	0	0,4116
Фосмидомицин	0	0,3882
Стрептограмин А	0,0102	0,6439
Стрептограмин В	0	0,3194
Спектиномицин	0,04	1,0
<i>Примечание – * Элементы с обеими нулевыми медианами не учитывались.</i>		

Данные по антибиотикам, гены резистентности к которым повышено представлены у больных БА по сравнению со здоровыми лицами, приведены в табл. 25.

Таблица 25 – Антибиотики, гены резистентности к которым избыточно представлены в группе образцов кишечной микробиоты пациентов, страдающих БА, по сравнению с образцами контрольной группы

Антибактериальные препараты	p	ОМ двух групп*
I. Бета-лактамы	0,0093	0,3983
Цефалоспорины	0,0037	0,2837
II. Аминогликозиды	0,0143	0,4633
III. Макролиды		
Эритромицин	0,037	0,3887
Рокситромицин	0,0143	0,3051
IV. Хинолоны		
Фторхинолоны	0,0143	0,4554
V. Препараты других классов		
1. Глицилциклины	0,0093	0,4181
2. Прочие		
Фосмидомицин	0,0093	0,4082
<i>Примечание – * Элементы с обеими нулевыми медианами не учитывались.</i>		

В среднем, наиболее высоким уровнем представленности в метагеномах кала больных ХОБЛ и БА характеризовались гены резистентности к таким группам антибиотиков, как тетрациклины, макролиды, цефалоспорины, линкозамиды, а также к ванкомицину, тейкопланину, бацитрацину и стрептограмину В. Относительный уровень генов АР по отношению к тетрациклинам, макролидам, цефалоспорином, линкозамидам, стрептограмину В статистически значимо был повышен в группе метагеномов кала больных ХОБЛ по сравнению с образцами здоровых лиц. Метагеномы кала больных БА демонстрировали значимо более высокий уровень относительной представленности генов АР к тетрациклинам, макролидам и цефалоспорином. По ряду АБП между группами метагеномов кала больных БА и ХОБЛ также выявлены статистически значимые различия. Так, в группе больных ХОБЛ относительный уровень генов АР был выше по сравнению с метагеномами кала больных БА к макролидам, линкозамидам, ванкомицину, тейкопланину и стрептограмину В (табл. 26).

Таблица 26 – Различия представленности генов устойчивости к отдельным АМП и группам антибиотиков согласно номенклатуры ARDB с наиболее высоким средним уровнем резистенции между образцами здоровых лиц, больных БА и пациентов, страдающих ХОБЛ

АМП, группы АМП	Уровень резистенции в образцах здоровых лиц (n=96)	Уровень резистенции в образцах больных БА (n=58)	Уровень резистенции в образцах больных ХОБЛ (n=16)	P*
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	
Тетрациклины)	5,34E-05 ± 8,49E-05	6,52E-05 ± 1,82E-05	7,64E-05 ± 9,49E-05	P ₁₋₂ = 0,012 P ₁₋₃ =2,22E-06 P ₂₋₃ =0,11

Макролиды	6,73E-06 ± 9,04E-06	1,08E-05 ± 6,42E-06	1,91E-05 ± 2,35E-05	P ₁₋₂ =0,013 P ₁₋₃ =1,12E-13 P ₂₋₃ =0,00094
Цефалоспорины	3,41E-06 ± 4,97E-06	1,19E-05 ± 1,04E-05	1,16E-05 ± 2,81E-05	P ₁₋₂ =7,36E-05 P ₁₋₃ =3,77E-11 P ₂₋₃ =0,29
Бацитрацин	5,88E-06 ± 2,86E-06	6,33E-06 ± 1,61E-06	6,34E-06 ± 4,70E-06	P ₁₋₂ =0,096 P ₁₋₃ =0,063 P ₂₋₃ =0,41
Ванкомицин	5,06E-06 ± 2,64E-06	4,20E-06 ± 1,66E-06	5,50E-06 ± 5,92E-06	P ₁₋₂ =0,95 P ₁₋₃ =0,2 P ₂₋₃ =0,028
Линкозамиды	2,42E-06 ± 4,35E-06	3,79E-06 ± 3,93E-06	7,52E-06 ± 1,45E-05	P ₁₋₂ =0,091 P ₁₋₃ =3,43E-11 P ₂₋₃ =0,0026
Стрептограмин В	2,44E-06 ± 4,36E-06	3,81E-06 ± 3,92E-06	7,54E-06 ± 1,46E-05	P ₁₋₂ =0,1 P ₁₋₃ =3,43E-11 P ₂₋₃ =0,0026
Тейкопланин	2,32E-06 ± 1,20E-06	1,49E-06 ± 9,57E-07	2,33E-06 ± 1,74E-06	P ₁₋₂ =0,99 P ₁₋₃ =0,49 P ₂₋₃ =0,032

Примечание – * Проведен односторонний тест Манна-Уитни, оценено повышение уровня во второй группе сравнения по сравнению с первой; данные, представленные в виде xE -у означают: x – числовое значение мантиссы, E -у – 10 в отрицательной степени, y – величина порядка отрицательной степени.

В образцах кала больных ХОБЛ отмечена наиболее высокая представленность генов, кодирующих нечувствительность бактерий к макролидным АБП – *macb*, *ermf*, *mefa*, *acrb*, *ermb*, отличающаяся от представленности данных генов в образцах больных БА и здоровых лиц. В сравнении с образцами здоровых лиц, метагеномы кала больных БА характеризовались более высоким уровнем представленности генов *ermf*, *mefa* и *acrb*.

Образцы больных БА и ХОБЛ демонстрировали достоверно более высокую представленность генов *bl2e cfxa* по сравнению с метагеномами кала здоровых лиц. Кроме того, в метагеномах кала больных ХОБЛ выявлена наиболее выраженная представленность генов *bl2e sera* и *bl2e cbla*, в то время как образцы больных БА и здоровых лиц по содержанию указанных генов не различались. Указанные гены участвуют в формировании бактериальной АР к цефалоспорином.

В результате анализа с использованием базы данных CARD в кишечных метагеномах как здоровых людей, так и пациентов с бронхообструктивными заболеваниями обнаружено значительное присутствие генов устойчивости к АМП. Суммарная относительная представленность генов АР у группы контроля не оказалась статистически ниже, чем у группы БА (односторонний тест Манна-Уитни, $p=0,14$, ОМ двух групп 1,14). У группы ХОБЛ суммарная представленность генов АР несколько выше, но статистически не отличалась от величины аналогичного показателя в группах контроля и больных БА ($p=0,055$, отношение медиан 1,17).

В среднем, наиболее представленными по содержанию генов резистентности во всех метагеномах оказались тетрациклины, бета-лактамы, макролиды,

цефалоспорины, линкозамиды и другие АБП. Для аминогликозидов, линкозамидов, макролидов а также стрептограминов относительный уровень соответствующих им генов AP достоверно выше в группе образцов пациентов, страдающих ХОБЛ, по сравнению с группой контроля (односторонний тест Манна-Уитни, скорректированное р-значение $< 0,05$), что согласуется с данными анализа генов по ARDB. Данные по антибиотикам и группам АБП, гены резистентности к которым в большей степени представлены у больных ХОБЛ, чем у здоровых лиц, приведены в табл. 27 в порядке уменьшения статистической значимости. Ни для одного из семейств представленность не оказалась статистически различной между группой БА и контрольной группой.

Таблица 27 – Антибиотики, относительный уровень представленности генов резистентности к которым избыточен в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с контролем

Антибиотики, группы АБП	р-значение	ОМ 2-х групп
Аминогликозиды	0,00075	0,31
Линкозамиды	0,00075	0,51
Макролиды	0,00056	0,59
Стрептограмины	0,00056	0,49

Качественный состав АБТ и различия в представленности соответствующих генов AP по базе ARDB. В работе определен уровень представленности генов, относящихся к соответствующим группам АБП, по базе ARDB для обобщенной выборки метагеномов кала 58 больных ХОБЛ и 16 пациентов, страдающих БА, у которых удалось собрать достоверный анамнез качественного состава получаемой АБТ на протяжении года перед включением в исследование. У 16 пациентов, применявших макролиды в течение года до исследования, уровень генов AP к данным АБП был статистически значимо более высоким, чем в группе 48 пациентов, не использовавших макролидные АБП (отношение медиан 0,69, $p=0,01$). При этом конкретно по эритромицину различий в представленности соответствующих ему генов AP между группами не выявлено ($p=0,13$). Параллельно у пациентов, применявших макролиды, отмечался более высокий уровень генов AP к линкозамидам и стрептограмину В (отношение медиан (ОМ) 0,47, $p=0,02772$), поскольку большинство из анализируемых по ARDB генов AP к макролидам перекрестно обеспечивают формирование резистентности к линкозамидам и стрептограмину.

В группе больных, получавших цефалоспорины ($n=21$), в отличие от пациентов, не использовавших их ($n=53$), выявлен достоверно более высокий уровень резистомы по генам, относящимся в базе ARDB к формированию резистентности к цефалоспорином (ОМ 0,33, $p=0,0028$), а также к линкозамидам и стрептограмину В (ОМ 0,47, $p=0,006$).

У пациентов, использовавших на протяжении 12 месяцев перед включением фторхинолоны ($n=18$), выявлена более высокая представленность в кишечных метагеномах генов AP к указанной группе препаратов (ОМ 0,52, $p=0,012$), чем у больных, не использовавших фторхинолоны ($n=56$).

Корреляционный анализ уровня представленности генов AP в метагеномах кала больных ХОБЛ в зависимости от клинико-анамнестических факторов. В результате анализа не выявлена корреляционная связь между типом ХОБЛ (классификация GOLD 2011 по степени риска обострений), степенью тяжести заболевания (спирометрическая классификация GOLD 2010) и уровнем представленности генов резистентности к антибактериальным препаратам (по базам CARD и ARDB) – как в отношении общего уровня AP ($p>0,05$), так и с уровнем резистента к отдельным антибиотикам и их группам ($p>0,05$). При оценке корреляционных влияний между общим уровнем представленности генов AP (по базам CARD и ARDB) и частотой курсов АБТ за предшествующие 12 месяцев статистически значимые результаты также не получены. Также при использовании базы данных CARD не выявлено корреляции между уровнем резистента по отдельным классам АБП и частотой АБТ ($p>0,05$, корреляция Спирмена).

Однако, анализ по генам из базы данных ARDB позволил выявить прямую корреляционную связь между уровнем представленности генов AP по отдельным классам АБП и частотой антибиотикотерапии. Так, частота курсовой терапии АБП на протяжении предшествующих 12 месяцев положительно коррелировала с уровнем представленности генов AP к линкозамидам, цефалоспоринам, макролидам, сульфониламидам и стрептограмину В (табл. 28).

Таблица 28 – Корреляции уровня AP по отдельным классам препаратов и частоты случаев приема АБП за предшествующие 12 месяцев ($p<0,05$)

Антибиотики	r	p
Линкозамиды	0,40368	0,004
Стрептограмин В	0,40368	0,004
Цефалоспорины	0,3731	0,0083
Макролиды	0,3422	0,0161
Сульфониламиды	0,33837	0,0174

Таким образом, кишечная микробиота больных БА и ХОБЛ, отражающая системный характер накопления генетических детерминант антибактериальной устойчивости на фоне повторяющейся АБТ, отличается более выраженной относительной представленностью генов AP по сравнению с микробиомом кишечника здоровых лиц и характеризуется наиболее высоким уровнем резистента по отношению к АБП, ассоциированным с терапией респираторных инфекций, включая обострения хронических обструктивных заболеваний легких, - макролидам, бета-лактамам и фторхинолонам. Величина представленности генов AP к указанным АБП напрямую связана с частотой их применения, и наиболее выражена в образцах кишечной микробиоты больных ХОБЛ, представляющих группу высокой вероятности назначения АБП.

Обращает на себя внимание высокий уровень накопления орофарингеальной и кишечной микробиотой больных ХОБЛ генов AP к макролидным АБП, что, вероятно, требует дополнительного исследования микробиологической устойчивости наиболее значимых для патогенеза ХОБЛ респираторных возбудителей и оценки клинической эффективности применения макролидных АБП

для их эрадикации с целью разработки рекомендаций по оптимизации применения макролидов в лечении данной группы больных.

Данное диссертационное исследование, основанное на высокотехнологичном молекулярно-генетическом анализе орофарингеальных и кишечных микробиотических сообществ больных БА и ХОБЛ, а также идентификации генов AP с профилированием уровней их представленности в ассоциации с клинико-анамнестическими данными пациентов, продемонстрировало, что бесконтрольное применение системных АБП широкого спектра действия у больных ХОБЛ и БА, нарушая нормальный рост респираторного и кишечного микробиомов и способствуя развитию контаминации условно-патогенными и патогенными микроорганизмами, а также приводя к накоплению респираторной микробиотой генетических детерминант лекарственной устойчивости с последующим обменом генами, кодирующими AP, само по себе является фактором, усугубляющим тяжесть клинических проявлений заболевания, способствует увеличению частоты обострений и связанных с ними эпизодов госпитализаций, а, значит, сопряжено с последующим ростом потребности в терапии СКС и антибиотиками.

В отличие от антибиотиков, назначение СКС в период обострения больным хроническими бронхообструктивными заболеваниями ассоциировано с положительной модификацией состава орофарингеальной микробиоты, проявляющейся увеличением в стабильный период заболевания орофарингеальной представленности непатогенных бактерий типа *Bacteroidetes* и снижением содержания протеобактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные особенности клинической характеристики больных БА и ХОБЛ, ассоциированные с модификацией качественного и количественного состава орофарингеальной и кишечной микробиоты, накапливающей генетические детерминанты лекарственной устойчивости на фоне повторяющейся АБТ, позволят сфокусировать внимание научной общественности на проблеме рационального использования АБП широкого спектра действия. Наряду с высокой теоретической ценностью данные, полученные в рамках исследования, позволят оптимизировать фармакотерапевтические схемы лечения обострений у больных БА и ХОБЛ.

КОНЦЕПЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хронические обструктивные заболевания легких, такие как ХОБЛ и БА, ассоциированы с персистирующим бронхолегочным воспалением, которое лежит в основе развития, поддержания и усугубления вентиляционных нарушений, связанных с обратимой в случае БА и преимущественно необратимой при ХОБЛ бронхиальной обструкцией, дисфункцией бронхиального эпителия, гиперпродукцией вязкой слизи, obturiruyemykh мелкие бронхи [GINA, 2015; GOLD, 2015]. В свою очередь, персистирующее бронхолегочное воспаление и выраженные вентиляционные нарушения у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких представляют собой значимый фактор риска контаминации

дыхательных путей условно-патогенными и патогенными микроорганизмами, более выраженной в случае ХОБЛ [Monso E. Et al., 1995].

В основе развития обострений, как явлений закономерных и повторяющихся при бронхообструктивных болезнях, далеко не всегда главенствующая роль принадлежит фактору бактериальной инфекции [Пульмонология. Национальное руководство, 2014; Синопальников А.И., 1999]. Значение бактериальной контаминации дыхательных путей как причины обострений возрастает при тяжелом течении хронических обструктивных заболеваний легких и является особенно актуальным в патогенезе ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения с высоким риском развития обострений [Hilty M., 2010; GOLD, 2015].

Повторяющиеся эпизоды обострений являются для больных хроническими бронхообструктивными заболеваниями значимым фактором риска как обоснованного (в связи с наличием бактериальной инфекции), так и неоправданного (без показаний) назначения системных АБП, частота использования которых наиболее высока у больных ХОБЛ [Al-Ani S., 2015; Leuppi J.D., 2014].

Периодические и частые эпизоды курсовой АБТ у больных БА и ХОБЛ приводят к существенной модификации не только респираторной микробиоты, но и микробиотических сообществ других регионов тела человека, воздействуя системно, что подтверждается результатами выполненного нами исследования состава кишечной микробиоты у больных БА и ХОБЛ относительно здоровых лиц. Микробиотическая модификация, происходящая повсеместно под влиянием повторяющихся эпизодов применения АБП, проявляется замещением нормобиоты, свойственной данному биотопу, на микробиоту, характеризующуюся выраженным присутствием условно-патогенных и патогенных микроорганизмов и накоплением генетических детерминант лекарственной устойчивости к используемым антибиотикам. При этом степень указанных патологических изменений напрямую ассоциирована с частотой использования системных АБП и носит наиболее выраженный характер у больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения, характеризующихся частыми обострениями и высоким риском назначения курсовой АБТ.

В свою очередь, приобретение на фоне повторяющихся эпизодов противомикробной терапии пациентом с хроническим обструктивным заболеванием легких условно-патогенной и патогенной контаминантной микробиоты дыхательных путей, характеризующейся сниженной чувствительностью к антибиотикам широкого спектра действия, приводит к усилению бронхолегочного воспаления, благоприятствует дальнейшему росту бактериальной колонизации респираторного тракта и препятствует эффективной эрадикации возбудителя. Это, в свою очередь, обуславливает увеличение частоты обострений и более тяжелое течение заболевания у больных БА и ХОБЛ, снижая эффективность проводимой базисной терапии.

Важно отметить, что применение СКС в период обострения у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких ассоциировано с положительной модификацией состава орофарингеальной микробиоты в стабильный период, что подтверждается увеличением представленности

непатогенных бактерий типа *Bacteroidetes* и снижением содержания протеобактерий.

В данной работе достоверно показано, что клинико-функциональные фенотипы БА и ХОБЛ, сформированные по тяжести течения заболевания и различающиеся по клинико-функциональным и анамнестическим параметрам, характеризуются статистически значимыми различиями в составе орофарингеальной микробиоты. При этом, основываясь на данных литературы, следует отметить, что наиболее приближенной к естественному микробиому здорового человека является состав орофарингеальной микробиоты больных легкой контролируемой БА. В свою очередь, орофарингеальные микробиотические сообщества пациентов, страдающих тяжелой неконтролируемой БА и ХОБЛ тяжелого и крайне тяжелого течения, характеризуясь значительной трансформацией состава, не различаются между собой ($p > 0,05$), что, вероятно, свидетельствует о сходстве в направленности патологических изменений, имеющих место в бронхиальном регионе при тяжелом течении заболевания и реализующихся под влиянием выраженного неконтролируемого воспаления независимо от его генеза.

ВЫВОДЫ

1. Вне обострения орофарингеальная микробиота больных ХОБЛ отличается от состава орофарингеального сообщества микроорганизмов больных БА сниженной представленностью бактерий, составляющих естественный респираторный микробиом у здоровых лиц, – преимущественно, непатогенных представителей *Bacteroidetes* (в 1,1 раз; $p=0,0007$), в частности *Prevotella melaninogenica* (в 1,4 раз; $p=0,004$), на фоне более высокого содержания бактерий типа *Firmicutes* (роды *Veillonella* (в 1,25 раз; $p=0,01$), *Alloiococcus* (в 6,55 раз; $p=0,0002$), *Catonella* (в 1,24 раз; $p=0,03$), *Peptoniphilus* (в 4,43 раз; $p=0,032$), и *Peptostreptococcaceae* (в 3,68 раз; $p=0,0002$)) и *Proteobacteria* (*Aggregatibacter* (в 1,62 раз; $p=0,008$), *Alcaligenaceae* (в 7,17 раз; $p=0,027$) и *Haemophilus influenzae* (в 3,63 раз; $p=0,009$), включающих условно-патогенные и патогенные микроорганизмы. При этом в случае тяжелой неконтролируемой БА количество *Proteobacteria* в орофарингеальной микробиоте значительно превышает их содержание у больных легкой контролируемой и частично контролируемой БА (в частности, *Moraxellaceae* (в 9 раз; $p=0,0007$), *Neisseria cinerea* (в 1,77 раз; $p=0,0013$), *Aggregatibacter segnis* (в 2,05 раз; $p=0,015$)).
2. В сравнении с кишечной микробиотой здоровых лиц микробиотические сообщества кишечника больных БА и ХОБЛ характеризуются снижением содержания ответственных за синтез короткоцепочечных жирных кислот бактерий типа *Firmicutes* и увеличением представленности микроорганизмов типа *Bacteroidetes*. Степень выраженности указанных изменений в соотношении микроорганизмов типов «*Firmicutes* – *Bacteroidetes*» в пользу увеличения представленности последних напрямую ассоциирована с частотой назначения антибактериальных препаратов и наиболее высока у больных ХОБЛ, положительно коррелируя со степенью тяжести заболевания.
3. В подавляющем большинстве орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ в стабильный период заболевания сочетанно идентифицируются гены *mef* и *ermB*, реализующие механизмы антибиотикорезистентности к макролидам и

линкозамидам (91% мазков больных ХОБЛ и в 82,4% мазков больных БА). Уровень представленности генов *mef* и *ermB* положительно коррелирует с выраженностью обсемененности мазка стрептококками ($r=0,51$; $p<0,0001$ и $r=0,29$; $p=0,001$ соответственно), а также прямо ассоциирован с частотой эпизодов приема антибактериальных препаратов в целом ($r=0,27$; $p=0,01$ и $r=0,49$; $p<0,0001$ соответственно) и макролидов в частности ($r=0,25$; $p=0,016$ и $r=0,43$; $p<0,0001$ соответственно). У больных ХОБЛ определяется положительный характер корреляции степени представленности генов *mef* и *ermB* с частотой обострений заболевания ($r=0,25$; $p=0,018$ и $r=0,3$; $p=0,0045$ соответственно).

4. Кишечная микробиота больных БА и ХОБЛ, отражающая системный характер накопления генетических детерминант антибактериальной устойчивости на фоне повторяющейся антибактериальной терапии, отличается более выраженной относительной представленностью генов антибиотикорезистентности по сравнению с микробиомом кишечника здоровых лиц и характеризуется наиболее высоким уровнем резиста по отношению к антибактериальным препаратам, ассоциированным с терапией респираторных инфекций – макролидам, бета-лактамам и фторхинолонам. Величина представленности генов антибактериальной устойчивости к указанным антибиотикам напрямую связана с частотой их применения, и наиболее выражена в образцах кишечной микробиоты больных ХОБЛ.

5. Использование системных глюкокортикостероидов в период обострения БА и ХОБЛ ассоциировано с увеличением в стабильный период заболевания орофарингеальной представленности непатогенных бактерий типа *Bacteroidetes* (КНП= 0,091; $p= 0,0087$) и относящихся к нему представителей рода *Prevotella* (КНП= 0,176; $p= 0,005$) со снижением бактериальной обсемененности орофарингеальных мазков протеобактериями родов *Streptococcus* (КНП= -0,091; $p= 0,005$) и *Haemophilus* (КНП= -0,333; $p= 0,006$), включающих патогенные микроорганизмы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывая высокую системную распространенность генов лекарственной устойчивости к антибактериальным препаратам широкого спектра действия в микробиотических сообществах у больных ХОБЛ и БА, а также в связи с воздействием антибиотиков, ухудшающих качественный и количественный состав респираторной микробиоты в сторону усиления условно-патогенной и патогенной бактериальной контаминации, каждый эпизод антибактериальной терапии в период обострения заболевания должен исходить из принципов рациональной необходимости, обоснованной наличием четких свидетельств бактериальной инфекции в соответствии с актуальными международными и национальными рекомендациями по лечению данной категории больных.

2. Основываясь на общеизвестных фактах, касающихся механизмов формирования резистентности микроорганизмов к антибиотикам и данных, полученных в рамках диссертационного исследования, возможно рекомендовать смену антибактериальных препаратов при повторяющихся инфекционных обострениях у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких, использование рационально

коротких курсов и исключение необоснованно длительных эпизодов применения антибактериальных препаратов, а также верификацию возбудителя с оценкой антибактериальной чувствительности у больных ХОБЛ с частыми обострениями.

3. Назначение системных глюкокортикостероидов в качестве курсовой терапии при обострениях БА и ХОБЛ является рациональным с позиции их положительного модифицирующего влияния на состав респираторной микробиоты в стабильный период заболевания, что особенно актуально для больных ХОБЛ с высоким риском обострений и частыми эпизодами назначения антибактериальных препаратов в анамнезе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Анализ генетических детерминант антибактериальной устойчивости кишечной микробиоты больных хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / С.В. Федосенко, Л.М. Огородова, И.А. Деев, А.В. Тяхт, А.С. Попенко, М.А. Карнаушкина, Е.С. Кострюкова, Е.С. Куликов, Н.А. Кириллова, И.В. Салтыкова, В.М. Говорун, Д.Г. Алексеев // **Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия**. – 2015. – №17(2). – С. 157-166. (0,833)
2. Курение: механизмы патологического воздействия и эффекты отказа (обзор) [Электронный ресурс] / О.С. Кобякова, И.А. Деев, Е.С. Куликов, Е.А. Старовойтова, Н.А. Кириллова, В.А. Бойков, С.В. Федосенко, Н.В. Селиванова // **Социальные аспекты здоровья населения**. – 2015. – №1(41). – С. 15. – Режим доступа: http://vestnik.mednet.ru/index2.php?option=com_content&task=view&id=656&prop=1&page=0&Itemid=27. (1,875)
3. Особенности орофарингеальной микробиоты у больных бронхиальной астмой в зависимости от тяжести заболевания и уровня контроля [Текст] / С.В. Федосенко, Л.М. Огородова, А.С. Попенко, В.А. Петров, А.В. Тяхт, И.В. Салтыкова, И.А. Деев, Е.С. Куликов, Н.А. Кириллова, В.М. Говорун, Е.С. Кострюкова // **Российский аллергологический журнал**. – 2015. – №2. – С. 29-36. (0,727)
4. Видовая идентификация и анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости стрептококков с помощью количественной мультиплексной полимеразной цепной реакции у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / Л.Н. Икрянникова, М.Е. Сенина, Е.С. Лисицина, Л.М. Огородова, С.В. Федосенко, М.А. Карнаушкина, Е.Н. Ильина // **Пульмонология**. – 2014. – №6. – С. 40-48. (1,286)
5. Состав сообщества микроорганизмов нижних дыхательных путей при хронической обструктивной болезни легких [Текст] / С.В. Федосенко, Л.М. Огородова, М.Б. Фрейдин, И.В. Салтыкова, Е.С. Куликов, И.А. Деев, Н.А. Кириллова, П.А. Селиванова, И.И. Балашева // **Клиническая медицина**. – 2014. – №8. – С. 26-32. (0,778)
6. Роль сообщества микроорганизмов дыхательных путей в патогенезе хронической обструктивной болезни легких [Текст] / С.В. Федосенко, Л.М. Огородова, М.А. Карнаушкина, М.Б. Фрейдин, И.В. Салтыкова, Е.С. Куликов, И.А. Деев, Н.А. Кириллова // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2014. – Т. 13. - №1. – С. 153-160. (1,0)
7. Состав сообщества микроорганизмов в дыхательных путях у здоровых лиц и

больных бронхиальной астмой [Текст] / С.В. Федосенко, Л.М. Огородова, М.А. Карнаушкина, Е.С. Куликов, И.А. Деев, Н.А. Кириллова // **Вестник Российской академии медицинских наук**. – 2014. – № 3-4. – С. 71-76. (1,0)

8. Особенности микробиоты кишечника у больных хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / Л.М. Огородова, В.М. Говорун, С.В. Федосенко, М.А. Карнаушкина, И.В. Салтыкова, Д.Г. Алексеев, Е.С. Кострюкова, А.В. Тяхт, А.С. Попенко // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2014. – Т. 13. - №5. – С. 55-61. (0,778)

9. Анализ таксономического состава кишечной микробиоты больных хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / С.В. Федосенко, Л.М. Огородова, В.М. Говорун, М.А. Карнаушкина, И.В. Салтыкова, Д.Г. Алексеев, Е.С. Кострюкова, А.В. Тяхт, А.С. Попенко // **Уральский медицинский журнал**. – 2014. – №6(120). – С. 168-173. (0,667)

10. Пат. **2522678 Российская Федерация**, МПК G01N 33/50. Способ прогнозирования тяжести течения хронической обструктивной болезни легких / Л.М. Огородова, С.В. Федосенко, П.А. Селиванова, Н.А. Кириллова, Е.С. Куликов, М.Б. Фрейдин, Е.Э. Кремер, О.П. Иккерт, И.В. Салтыкова. – № **2012134940/15**; заявл. 15.08.2012; опубл. 20.07.2014, Бюл. № 20.

11. High prevalence of FEV1 decline without diagnose [Текст] / S. Fedosenko, E. Kulikov, O. Kobyakova, M. Muzykina, I. Deev, E. Starovoytova, N. Kirillova, N. Kosova, V. Boykov, O. Laricheva, Y. Chatorova, S. Mazeina, A. Almikeeva. // *Eur. Respiratory J.* – 2013. – Vol. 42, suppl. 57. – P. 494s.

12. Nitric oxide oxidation products in bronchoalveolar lavage of patients with different severity of asthma [Текст] / P. Selivanova, E. Kulikov, N. Kirillova, O. Kozina, M. Freidin, L. Ogorodova, S. Fedosenko. // *Eur. Respiratory J.* – 2013. – Vol. 42, suppl. 57. – P. 170s.

13. Молекулярные и фармакогенетические механизмы тяжелой бронхиальной астмы [Текст] / Е.С. Куликов, Л.М. Огородова, М.Б. Фрейдин, И.А. Деев, П.А. Селиванова, С.В. Федосенко, Н.А. Кириллова // **Вестник Российской академии медицинских наук**. – 2013. – № 3. – С. 15–23. (0,641)

14. Молекулярные механизмы тяжелой бронхиальной астмы [Текст] / Е.С. Куликов, Л.М. Огородова, М.Б. Фрейдин, И.А. Деев, П.А. Селиванова, С.В. Федосенко, Н.А. Кириллова // **Молекулярная медицина**. – 2013. – № 1. – С. 24–32. (1,407)

15. Эффективность базисной терапии и уровень Т-регуляторных клеток при хронической обструктивной болезни легких [Текст] / Н.А. Кириллова, И.А. Деев, Е.Э. Кремер, Л.М. Огородова, Г.Э. Черногорюк, Е.С. Куликов, С.В. Федосенко // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2012. – Т. 11. - №6. – С. 153-159. (1,0)

16. Клиническая эффективность лекарственного средства, нормализующего энергетический обмен при лечении обострения хронической обструктивной болезни легких [Текст] / А.Ю. Фисенко, Г.Э. Черногорюк, М.С. Санжаровская, Н.А. Кириллова, С.В. Федосенко // Сборник научных статей и тезисов XII международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке». – 2012. – Т. 14. - №3. – С. 324-325.

17. Efficacy of basis therapy and level of immunoregulatory T-cells (T-regs) in COPD

[Текст] / N. Kirillova, E. Kremer, I. Deev, L. Ogorodova, G. Chernogoryuk, E. Kulikov, S. Fedosenko. // Eur. Respiratory J. – 2012. – Vol. 40, suppl. 56. – P2304.

18. Клиническая эффективность кларитромицина (Клабакса) при обострении хронической обструктивной болезни легких и его влияние на цитобиохимические маркеры воспаления [Текст] / Г.Э. Черногорюк, А.А. Смотровая, А.Ю. Фисенко, О.Е. Акбашева, Т.К. Климентьева, Е.П. Рослякова, А.А. Михайлова, Н.В. Варвянская, М.С. Санжаровская, Н.А. Кириллова, С.В. Федосенко // **Практическая медицина**. – 2011. – №3(51). – С. 92-97. (0,545)

19. **Пат. 2425369 Российская Федерация**, МПК G01N 33/48. Способ ранней диагностики хронической обструктивной болезни легких / Г.Э. Черногорюк, Е.П. Рослякова, А.А. Михайлова, Н.В. Варвянская, М.С. Санжаровская, С.И. Антипов, С.В. Федосенко, А.Ю. Фисенко, Н.А. Кириллова. – № **2010122238/15**; заявл. 31.05.2010; опубл. 27.07.2011, Бюл. № 21.

20. Характеристика нейтрофилов и макрофагов индуцированной мокроты больных хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / С.В. Федосенко, Г.Э. Черногорюк, Н.А. Кириллова, А.Ю. Фисенко, Е.П. Рослякова // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2011. – №6. – С. 52-56. (1,0).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБП	антибактериальные препараты
АБТ	антибактериальная терапия
АМП	антимикробные препараты
АР	антибиотикорезистентность
БА	бронхиальная астма
ДДБА	длительно действующие бета-2-агонисты
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИКС, ИГКС	ингаляционные глюкокортикостероиды
КДБА	коротко действующие бета-2-агонисты
КНП	коэффициент наклона прямой
КЦЖК	короткоцепочечные жирные кислоты
ОФВ1	объем форсированного выдоха за 1-ю секунду
ПСВ	пиковая скорость выдоха
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
СКС	системные глюкокортикостероиды
ФВД	функция внешнего дыхания
ФЖЕЛ	форсированная жизненная емкость легких
ХОБЛ	хроническая обструктивная болезнь легких
ARDB	Antibiotic Resistance Data Base (База данных по антибактериальной устойчивости)
CARD	The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (Обширная база данных антибактериальной устойчивости)
CD	cluster designation (маркеры клеточной поверхности лейкоцитов)
FDR	False Discovery Rate (средняя доля ложных отклонений гипотезы)
GINA	Global Initiative for Asthma (регламентирующий документ «Глобальная инициатива по бронхиальной астме»)
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (регламентирующий документ «Глобальная инициатива по ХОБЛ»)
ICH GCP	International Conference on harmonization, Good Clinical Practice (Международная конференция по гармонизации, Качественная клиническая практика)
$M \pm m$	вариант представления данных, где M означает среднее значение, а m – стандартное отклонение
n	количество
SatO ₂	периферическая кислородная сатурация венозной крови
16S рРНК	тип рибосомальной РНК, участвующий в образовании бактериальных рибосом, находится в малой , находится в малой (30S) субъединице
6MWD	6 min walking distance (тест с 6-минутной ходьбой)

Подписано в печать **XX.XX.XXXX** г.
Усл.печ.листов **0,65** Печать на ризографе.
Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ
634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 53-04-08
Заказ № **XX** Тираж **XXX** экземпляров