

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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

**Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

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

ТОМСК-2015

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Роль микробиотических сообществ в формировании персистирующего воспаления при хронических обструктивных заболеваниях легких (обзор литературы)	17
1.1 Современное представление о проблеме хронических обструктивных заболеваний легких	17
1.2 Персистирующее бронхолегочное воспаление как основа клинической гетерогенности хронических обструктивных болезней легких.....	20
1.3 Понятие о микробиоме дыхательных путей человека	31
1.4 Особенности кишечной микробиоты в норме и при патологии.....	57
1.5 Проблема обострений БА и ХОБЛ с позиции рациональной антибиотикотерапии	62
Глава 2. Клинические группы и методы исследования	66
2.1 Протокол исследования	66
2.2 Методы исследования.....	73
Глава 3. Характеристика изучаемой популяции и результаты клинико-функциональных исследований	100
3.1 Исходная клинико-anamnestическая характеристика изучаемой популяции больных БА.....	101
3.2 Исходная клинико-anamnestическая характеристика изучаемой популяции больных ХОБЛ	110
3.3 Сравнительная клинико-anamnestическая характеристика пациентов, страдающих БА, и больных ХОБЛ	118
3.4 Характеристика сопутствующей патологии у обследованных групп больных БА и ХОБЛ	119
Глава 4. Метагеномный анализ орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА по результатам секвенирования генов 16S рРНК.....	124

4.1 Сходство таксономического состава орофарингеальной микробиоты у больных БА и пациентов, страдающих ХОБЛ	125
4.2 Различия представленности микроорганизмов в образцах орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ по данным анализа GLM и metagenomeSeq.....	132
4.3 Анализ метагеномного состава орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ методом обобщенных линейных моделей с учетом клинко-анамнестических данных	141
4.4 Таксономическое разнообразие орофарингеальной микробиоты у больных БА и ХОБЛ	151
Глава 5. Видовая идентификация и анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости орофарингеальных стрептококков у больных БА и ХОБЛ.....	156
5.1 Генетические маркеры лекарственной устойчивости орофарингеальных стрептококков больных БА и ХОБЛ.....	158
5.2 Представленность генов <i>mef</i> и <i>ermB</i> в образцах орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ и клинко-анамнестические особенности заболевания	162
5.3 Качественные и количественные особенности состава орофарингеальных стрептококков больных БА и ХОБЛ.....	163
Глава 6. Результаты таксономического исследования кишечной микробиоты у пациентов с ХОБЛ, больных БА и здоровых лиц	168
6.1 Различия таксономического состава кишечной микробиоты у пациентов с ХОБЛ и здоровых добровольцев.....	176
6.2 Различия таксономического состава кишечной микробиоты у больных БА и здоровых добровольцев	180
6.3 Различия таксономического состава кишечной микробиоты у больных ХОБЛ и пациентов с БА	182
6.4 Результаты обобщенного линейного регрессионного анализа представленности микроорганизмов в образцах кала здоровых добровольцев, больных БА и пациентов с ХОБЛ	185
6.5 Таксономическое разнообразие кишечной микробиоты у больных ХОБЛ и пациентов с БА в сравнении со здоровыми добровольцами	190

Глава 7. Анализ антибиотикорезистентности кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ	196
7.1 Профилирование генов АР кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ в сравнении со здоровыми добровольцами относительно Antibiotic Resistance Database – ARDB	196
7.2 Сравнительный анализ профилирования резистома для выборочных генов с помощью метагеномного метода с использованием базы данных ARDB и ПЦР реального времени	211
7.3 Профилирование генов антибиотикорезистентности кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ в сравнении со здоровыми добровольцами относительно The Comprehensive Antibiotic Resistance Database – CARD	213
7.4 Качественный состав АБТ и различия в представленности соответствующих генов АР по базе ARDB	219
7.5 Корреляционный анализ уровня представленности генов АР в метагеномах больных ХОБЛ в зависимости от клинико-анамнестических факторов.....	220
Глава 8. Обсуждение результатов	225
Заключение	246
Практические рекомендации	254
Список сокращений и условных обозначений	255
Список литературы	258

Введение

Актуальность темы исследования

Выраженные вентиляционные нарушения у больных БА и ХОБЛ представляют собой значимый фактор риска бактериальной контаминации дыхательных путей [212]. На фоне персистирующего бронхолегочного воспаления и ослабления локальных механизмов иммунной защиты, нарушения дренажной и вентиляционной функции бронхов вследствие бронхоконстрикции, обтурации периферических отделов бронхиального дерева слизью и увеличения площади слабовентилируемых участков легких 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 [157, 168].

Трансформация бронхолегочной бактериальной контаминации в инфекционный процесс в настоящее время рассматривается в качестве одного из важнейших механизмов развития инфекционно-зависимых обострений у больных ХОБЛ [116]. Несмотря на то, что обострения БА существенно реже обусловлены фактором бактериальной инфекции [197], оба заболевания находятся в группе повышенного риска как обоснованного, так и нерационального назначения системных антибактериальных препаратов широкого спектра действия (макролидов, бета-лактамовых антибиотиков и респираторных фторхинолонов), направленного на подавление вероятной бронхолегочной инфекции в период обострения болезни [55].

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, что необходимо для понимания влияния проводимой антибиотикотерапии 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 межнозологические 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 состав 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 антибиотикорезистентности 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 резистоста 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 АР 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, реализованные в рамках комплексного исследования на базе современных научно-исследовательских лабораторий.

Исследование состояло из трех этапов. На первом этапе, выполненном на базе СибГМУ под руководством доктора медицинских наук, члена-корреспондента РАМН, профессора Огородовой Л.М. по единому протоколу, основанному на строгом соответствии принципам Надлежащей клинической практики (ICH GCP, ГОСТ Р2005) и успешно прошедшему этическую экспертизу,

проведено одномоментное сравнительное неинтервенционное исследование в параллельных группах, в рамках которого описана клиническая характеристика изучаемых групп больных, выполнена сравнительная оценка функциональных показателей (по результатам исследования ФВД, теста с 6-минутной ходьбой), анамнестических данных (включая анализ поддерживающей терапии, изучение частоты обострений и госпитализаций, потребность в проводимой на протяжении предшествующих 12 месяцев терапии АБП и СКС).

В рамках второго этапа выполнена молекулярно-генетическая идентификация орофарингеальных и кишечных микробиотических сообществ больных БА и ХОБЛ. Разработка молекулярно-генетических методик для последующей идентификации качественного и количественного состава орофарингеальной и кишечной микробиоты выполнена при участии Национального Института Сердца и Легкого (Лондон, Великобритания) в рамках совместного проекта с лабораторией молекулярной генетики и геномики (руководитель – профессор Куксон В.).

Подготовительные работы по экстракции ДНК из орофарингеальных мазков выполнены на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск, Россия) под руководством доктора медицинских наук Сазонова А.Э.

Основная часть молекулярно-генетических исследований, включающая секвенирование по 16S рРНК для идентификации качественного и количественного состава орофарингеальной микробиоты, полногеномное (shotgun) метагеномное секвенирование с последующей идентификацией таксономического состава кишечной микробиоты выполнена на базе ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» ФМБА России (Москва, Россия) под руководством доктора биологических наук, профессора Говоруна В.М.

Указанные методики секвенирования исследования таксономического состава орофарингеальной и кишечной микробиоты в настоящее время широко применяются в мире, являются актуальными и высоко результативными.

В рамках третьего этапа выполнен сравнительный анализ таксономического состава кишечной и орофарингеальной микробиоты больных БА и ХОБЛ. На данном этапе выполнен анализ профилирования уровней генов АР 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.

Видовая идентификация и анализ генетических детерминант антибактериальной устойчивости стрептококков по ДНК, изолированной из образцов орофарингеальных мазков, выполнены под руководством доктора биологических наук, профессора 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.

Полученные в ходе третьего этапа исследования данные об особенностях качественного и количественного состава орофарингеальной и кишечной микробиоты, а также результаты профилирования генов АР в образцах кишечных метагеномов и орофарингеальных мазков сопоставлены с клинико-функциональными фенотипами и анамнестической характеристикой больных БА и ХОБЛ (включая сведения по обострениям и антибиотикотерапии, проводимой на протяжении предшествующих 12 месяцев).

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).

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.

Глава 1. Роль микробиотических сообществ в формировании персистирующего воспаления при хронических обструктивных заболеваниях легких (обзор литературы)

1.1 Современное представление о проблеме хронических обструктивных заболеваний легких

Бронхиальная астма (БА) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) относятся к числу наиболее распространенных заболеваний бронхолегочной системы среди взрослого населения, приводящих к существенному снижению качества жизни, ранней инвалидизации и высокой смертности больных. Данные болезни являются социально значимыми, поскольку сопряжены с существенным экономическим и социальным ущербом [6, 8, 54]. БА и ХОБЛ характеризуются высокими прямыми (медикаментозное обеспечение, дорогостоящая экстренная медицинская помощь) и косвенными (длительные периоды нетрудоспособности, выплаты по инвалидности) затратами ресурсов здравоохранения [6, 24, 248].

В современном представлении ХОБЛ, занимающая четвертое место в рейтинге причин смертности в мире [276], представляет серьезную угрозу здоровью населения. ХОБЛ является одним из ведущих факторов хронической заболеваемости взрослых пациентов, длительно страдающих данным заболеванием и преждевременно умирающих вследствие его естественного течения или от развивающихся осложнений. В результате сохраняющегося влияния факторов риска и старения населения (увеличения продолжительности жизни) прогнозируется неуклонный рост заболеваемости ХОБЛ в течение ближайших десятилетий во всем мире [98].

Данные о распространенности ХОБЛ имеют значительные расхождения, что обусловлено различиями в методах исследования, диагностических критериях и аналитических подходах к обработке данных. По самым скромным подсчетам выявлено, что в большинстве стран менее 6% населения осведомлены о наличии у них диагноза ХОБЛ [47, 145, 152]. В то же время, по данным эпидемиологических

исследований, проведенных во многих странах с использованием стандартизированных методов, в том числе спирометрии, до четверти лиц в возрасте 40 лет и старше могут иметь ограничение скорости воздушного потока, классифицируемое как стадия I (легкая ХОБЛ) или более тяжелая стадия ХОБЛ [91, 108, 187]. Если в 2002 г. в мире насчитывалось около 600 млн. больных ХОБЛ (12-е место по распространенности среди других болезней), то к 2020 г. ожидается, что их количество удвоится (5-е место по распространенности среди других болезней) [61, 146, 151].

По результатам систематического обзора и метаанализа исследований, выполненных в 28 странах с 1990 по 2004 годы, показано, что распространенность ХОБЛ у курильщиков и бывших курильщиков значительно больше, чем у некурящих, при этом страдают ХОБЛ преимущественно лица старше 40 лет и среди мужчин распространенность ХОБЛ значительно выше, чем среди женского населения [107, 145, 152]. Следует отметить, что распространенность ХОБЛ ступенчато увеличивается с возрастом и достигает максимума у лиц старше 60 лет [96].

Данные ВОЗ свидетельствуют о повсеместном росте заболеваемости ХОБЛ. Сегодня это, пожалуй, единственная болезнь легких, распространенность которой продолжает расти как в развитых, так и в развивающихся странах [30, 35, 152].

Ежегодно в мире от ХОБЛ умирает 2,74 млн. человек. При этом ХОБЛ – единственная ведущая причина смерти, частота которой увеличилась за последние годы [151].

Данные эпидемиологических исследований о заболеваемости и смертности зачастую не отражают истинной ситуации, поскольку обычно ХОБЛ не диагностируется до развития клинически выраженных и относительно тяжелых стадий заболевания. По официальным материалам Министерства здравоохранения в России насчитывается около 2,4 млн. больных ХОБЛ, тогда как по данным эпидемиологических исследований реальная численность страдающих ХОБЛ может превышать 16 млн. человек [29].

Таким образом, ХОБЛ сегодня – широко распространенное, неуклонно прогрессирующее заболевание, приводящее к существенному снижению качества жизни, обуславливающее раннюю инвалидизацию и высокую смертность больных. В связи с этим ХОБЛ по праву определяется как социально значимая болезнь [133, 153, 203].

Как и ХОБЛ, бронхиальная астма является глобальной проблемой мирового здравоохранения. В среднем в мире насчитывается около 300 млн. больных БА. Основываясь на стандартизированных методах оценки распространенности заболеваний органов дыхания, характеризующихся наличием синдрома бронхиальной обструкции, можно предположить, что распространенность БА в разных странах мира колеблется от 1 до 18% [8].

Тяжелая БА, составляющая в общей структуре заболевания 15-20%, представляет собой крайне значимую медико-социальную проблему. Тяжелая БА характеризуется низким качеством жизни больных и значительной частотой ранней инвалидизации. Именно пациентам со сложной неконтролируемой БА свойственны частые эпизоды тяжелых и жизнеугрожающих обострений, сопровождающиеся высоким риском летального исхода. По приблизительным оценкам от БА ежегодно умирает порядка 250 тысяч человек, при этом показатели смертности слабо коррелируют с уровнем распространенности заболевания. Так, например, Россия, характеризующаяся сравнительно небольшой распространенностью БА, отличается одним из самых высоких уровней смертности от нее [8, 23, 166].

Ведение пациента с тяжелой БА сопровождается существенным потреблением ресурсов здравоохранения, направленных как на обеспечение непрерывной медикаментозной терапии, оказание дорогостоящей экстренной помощи, так связанных с длительными периодами нетрудоспособности пациентов при утрате контроля над болезнью [5, 33, 256].

Анализируя долгосрочные затраты, связанные с ведением больных БА и ХОБЛ, можно сделать ряд важных выводов. Во-первых, затраты на лечение БА и ХОБЛ напрямую связаны с адекватностью и регулярностью базисного

(поддерживающего) лечения, а также с эффективностью мер, направленных на предупреждение и своевременную терапию обострений. Во-вторых, стоимость неотложной терапии, связанной с обострениями БА и ХОБЛ, всегда более значительна, чем стоимость планового лечения. Именно поэтому основные усилия глобального здравоохранения, помимо профилактики, направлены на раннее выявление БА и ХОБЛ, подбор адекватной базисной терапии с целью замедления прогрессирования болезни и предотвращения тяжелых обострений [8, 153].

1.2 Персистирующее бронхолегочное воспаление как основа клинической гетерогенности хронических обструктивных болезней легких

Длительное время считалось, что для БА характерен преимущественно эозинофильный тип воспаления (проявляющийся обилием эозинофилов в индуцированной мокроте), тогда как при ХОБЛ наблюдается накопление активированных нейтрофилов в бронхолегочный регион. Однако у определенной группы больных тяжелой БА отмечается нейтрофильный тип воспаления в бронхах (преимущественно у пациентов с гормонозависимой БА на фоне применения системных кортикостероидов). Нейтрофильный компонент воспаления при тяжелой бронхиальной астме не может быть объяснен с позиции признанной парадигмы об атопической природе этой болезни. В настоящий момент дифференциальная диагностика этих двух состояний в реальной клинической практике невозможна, и определяется личными взглядами конкретного специалиста, так как отсутствуют четкие дифференциальные критерии ХОБЛ и БА с преобладанием нейтрофильного паттерна воспаления [135].

По характеру воспалительного инфильтрата бронхиальной стенки выделяют как минимум три фенотипа БА: астма с преобладанием эозинофильного или нейтрофильного паттернов воспаления, а также астма с минимальным количеством гранулоцитов [273]. Эти фенотипы ассоциированы с особыми

клиническими проявлениями заболевания, характером воспалительного и репаративного процессов [120, 124, 135].

Астма с преобладанием эозинофилов в воспалительном инфильтрате является наиболее изученным патогенетическим вариантом. Эозинофилы присутствуют в различных пропорциях в мокроте, лаважной жидкости, эндобронхиальных биоптатах многих пациентов, страдающих БА. С эозинофилами связаны такие патологические процессы, как утолщение базальной мембраны, инфильтрация клетками, экспрессирующими TGF β , металлопротеиназы, 15-липоксигеназу и ее продукты [120, 135]. Результаты ряда исследований показали, что количество эозинофилов увеличивается у больных в зависимости от тяжести течения заболевания. В то же время другие исследователи не выявляют подобной ассоциации [132, 136, 255]. Присутствие эозинофильного воспаления в случае тяжелой астмы часто связано с манифестацией заболевания в зрелом возрасте и наличием непереносимости ацетилсалициловой кислоты (так называемая «аспириновая» астма [124]. Пациенты с преобладанием эозинофилов в инфильтрате бронхов имеют большее количество симптомов, худший контроль над заболеванием и высокий риск обострения болезни, по сравнению с другими фенотипами астмы [69, 218].

Преобладание нейтрофилов в воспалительном инфильтрате при БА четко не ассоциируется с клиническим фенотипом заболевания. Показано, что нейтрофильная инфильтрация чаще встречается в случае тяжелого течения заболевания, а также в аутопсийном материале бронхов, полученном от пациентов, умерших вскоре после начала тяжелого обострения [88, 266]. Причины нейтрофильного воспаления при БА остаются до конца не изученными. Обсуждается значение таких факторов риска, как курение в анамнезе, профессиональное воздействие ирритантов или вирусные инфекции [206, 210]. Кроме того, пациенты с тяжелой астмой получают высокие дозы кортикостероидов, которые *in vitro* обладают эффектом угнетения апоптоза нейтрофилов [110, 177]. Присутствие большого числа нейтрофилов у пациентов с БА ассоциировано с повышенным уровнем ИЛ-8, нейтрофильной эластазы и

форм высокомолекулярной матриксной металлопротеиназы 9. Активация этих ферментов приводит к структурной перестройке легочной паренхимы, и как следствие, к снижению функции легких у больных БА с нейтрофильным воспалением [103, 247].

В редких случаях встречаются пациенты, у которых симптомы астмы не сопровождаются инфильтрацией бронхиальной стенки клетками воспаления (эозинофилами, нейтрофилами или лимфоцитами) [127]. Сегодня не ясно, являются ли эти находки поводом для выделения отдельного фенотипа астмы, либо во время взятия образцов ткани были пропущены участки с воспалительной инфильтрацией. Важно, что у части больных с подобной морфологической картиной даже на фоне высоких доз кортикостероидов сохраняются симптомы БА [154]. Воспаление в этом случае может быть следствием вовлечения в патологический процесс резидентных клеток ткани легких, в частности эпителиальных или гладкомышечных. Прогрессирование признаков воспаления может наблюдаться у таких пациентов во время обострения или при попытке снижения дозы кортикостероидов [273].

Воспаление в дыхательных путях у пациентов с ХОБЛ выглядит как патологически усиленный нормальный воспалительный ответ на длительное воздействие факторов риска [106]. При этом воспалительная реакция в бронхиальном регионе при ХОБЛ по своей сути является результатом клеточной кооперации [39]. В патогенезе изменений легких важное место отводится дисбалансу активности клеток фагоцитарного звена иммунной системы [80, 118, 183, 265]. Так, например, наблюдается повышение количества нейтрофилов, макрофагов и Т-лимфоцитов (особенно CD8⁺) в различных отделах легких [58].

В сложной иерархии клеточных отношений при ХОБЛ, происходящих в разные фазы воспаления, ключевым элементом является нейтрофил. Под действием факторов риска содержание этих микрофагоцитирующих клеток в дистальных отделах респираторной системы возрастает примерно в 10 раз [39]. Не вызывает сомнений, что миграция нейтрофилов в бронхиальное пространство происходит под воздействием нейтрофильных хемоаттрактантов, таких как

интерлейкин-8 (IL-8), лейкотриен В₄ (LT-B₄), GRO- α [80]. В мокроте и бронхоальвеолярном лаваже пациентов с ХОБЛ обнаруживаются целые скопления активированных нейтрофилов [57, 118, 186].

У больных ХОБЛ выявляется увеличение количества апоптозных нейтрофилов в легких [164], а также в скелетных мышцах, что подтверждает системность нарушений в нормальном механизме гибели клеток при данном заболевании. Неконтролируемая массивная клеточная гибель на фоне дефективного эффероцитоза может служить биомаркером болезни, в первую очередь отражающим активность воспаления, как регионарного, так и системного [240].

Существует взаимосвязь между количеством циркулирующих нейтрофилов и падением ОФВ₁ [262]. Количество нейтрофилов в бронхиальных биоптатах и индуцированной мокроте прямо коррелирует с тяжестью ХОБЛ [118, 236] и со скоростью ухудшения легочной функции [53].

Нейтрофилы, рекрутированные в дыхательные пути пациентов с ХОБЛ, являются активированными, что подтверждается обнаружением в супернатанте мокроты повышенной концентрации миелопероксидазы [10, 32, 112, 182, 216, 253, 272]. Вследствие секреции нейтрофилами различных протеиназ, таких как эластаза, катионные протеины, катепсин G, вследствие миелопероксидазозависимой продукции активных форм кислорода, происходит хроническая гиперсекреция слизи, метаплазия эпителиоцитов, разрушение эластического каркаса и фиброзные изменения паренхимы легких [3].

1.2.1 Хроническая обструктивная болезнь легких с позиции клинического полиморфизма

Длительное время в качестве основного маркера, определяющего особенности диагностики, классификации и фармакотерапевтической тактики ведения больных ХОБЛ, рассматривается такой показатель нарушения ФВД, как снижение ОФВ₁ (согласно международным рекомендациям GOLD и клиническим рекомендациям Российского респираторного общества). Однако степень

бронхообструктивных нарушений не всегда адекватно соотносится с клиническими и прогностическими особенностями течения ХОБЛ: выраженностью легочных и внелегочных проявлений, рентгенологическими признаками, долгосрочной эффективностью проводимой терапии, скоростью снижения функции легких и выживанием больных. Именно этим обусловлен особый интерес к новым подходам выявления гетерогенных фенотипов ХОБЛ [28, 97].

Различия патофизиологических и клинических признаков ХОБЛ позволяют классифицировать фенотипические проявления болезни по таким параметрам, как выраженность респираторных симптомов, общее состояние здоровья, частота и тип обострений, функция легких и ее долгосрочное изменение, структурные изменения, местное и системное воспаление, а также внелегочные проявления [78, 219]. Согласно традиционной клинической классификации, сформулированной в 1955 году Dornhorst A.C., и позже дополненной Burrows и соавторами (1966), выделяют три основных фенотипа болезни: эмфизематозный, бронхитический и смешанный. Эмфизематозный вариант ХОБЛ характеризуется доминированием симптома одышки над выраженностью кашля, который носит малопродуктивный характер. Эти пациенты обычно характеризуются низким нутритивным статусом, цвет кожи у них не изменен, так как за счет максимально возможного увеличения вентиляции поддерживается достаточная оксигенация крови. Поскольку максимальное насыщение крови кислородом может быть достигнуто только в состоянии покоя, больные очень плохо переносят физическую нагрузку. Полицитемия и эритроцитоз для пациентов с эмфизематозным фенотипом не характерны. Dornhorst A.C. назвал эмфизематозных больных ХОБЛ «розовыми пыхтельщиками», т.к. для преодоления преждевременно наступающего экспираторного коллапса бронхов выдох они производят через сложенные в трубочку губы, что сопровождается своеобразным пыхтением [126]. При рентгенологическом исследовании органов грудной клетки выявляется преобладание явления эмфиземы, преимущественно панацинарной. Редукция артериального русла, вызванная атрофией межальвеолярных перегородок, не

достигает выраженных значений, поэтому и легочная гипертензия у таких больных выражена умеренно. Клинические признаки хронического легочного сердца появляются поздно, чаще в пожилом возрасте, и длительно компенсированы. Таким образом, эмфизематозный тип ХОБЛ характеризуется прогрессирующей одышкой, астеническим телосложением, низким индексом массы тела, редкими обострениями (чаще инфекционного характера) и резким падением ЖЕЛ. При морфологических исследованиях ему свойственна деструкция легочной паренхимы с повышением количества макрофагов и Т-лимфоцитов, с преобладанием CD8⁺ (цитотоксических) над CD4⁺ (хелперами). Патогенетические механизмы, лежащие в основе развития процесса гипотрофии скелетных мышц, связывают с системным воспалительным эффектом, а также изменениями в эндокринной системе и трофическом статусе больного [34].

Бронхитический вариант ХОБЛ отличается выраженной обструкцией бронхов с преобладанием кашля и обильным выделением мокроты. Постоянная и избыточная продукция мокроты вызывает увеличение сопротивления на вдохе и выдохе, что приводит к значительному нарушению вентиляции. Это способствует выраженному уменьшению содержания кислорода в альвеолах, последующему нарушению перфузионно-диффузионного отношения и шунтированию крови, обуславливая характерный синий оттенок кожи и слизистых у данной категории больных. Для пациентов с бронхитическим типом ХОБЛ не характерно снижение веса – наоборот, эти больные, как правило, имеют повышенный статус питания. Dornhorst A.C. определил эту группу пациентов, как «синие одутловатики». При рентгенологическом исследовании у типичного больного бронхитическим типом ХОБЛ преобладает диффузный пневмосклероз, приводящий вместе с облитерацией просвета кровеносных сосудов к быстрому развитию легочного сердца и его ранней декомпенсации. Этому также способствует стойкая легочная гипертензия и значительная гипоксемия. Для больных ХОБЛ бронхитического типа характерны полицитемия, эритроцитоз и постоянная интоксикация вследствие выраженного воспалительного процесса в бронхах. В отличие от эмфизематозной формы у этих пациентов при компьютерной томографии органов

грудной клетки обнаруживают центриацинарную эмфизему [29]. Таким образом, принципиальное значение при бронхитическом варианте ХОБЛ имеет волнообразное течение клинических проявлений с частыми обострениями (с кашлем и гнойной мокротой), выраженная легочная гипертензия, гипоксемия. При морфологическом исследовании выявляется преобладание обструкции бронхиол с фиброзом и инфильтрацией макрофагами и Т-лимфоцитами [43, 90].

Следует отметить, что в клинической практике очень редко можно выделить в чистом виде эмфизематозную или бронхитическую форму ХОБЛ. Чаще говорят о преимущественно бронхитическом или преимущественно эмфизематозном типе заболевания. Наряду с этим может встречаться сочетание этих двух форм у одного больного (смешанная или сочетанная форма ХОБЛ) [29].

Cho M.H. et al (2010) методом кластерного анализа разделили больных ХОБЛ на следующие группы [101]:

- 1) пациенты с преобладанием эмфиземы (ассоциировано с полиморфизмами гена трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) SNP rs1800470);
- 2) больные ХОБЛ, быстро реагирующие на бронхолитическую пробу с сальбутамолом и характеризующиеся высокими значениями ОФВ₁;
- 3) дискордантные больные с низким ОФВ₁, несмотря на слабо выраженную эмфизему и незначительное утолщение бронхиальной стенки;
- 4) пациенты, страдающие ХОБЛ, отличающиеся преимущественным поражением бронхов [101].

В ряде исследований показаны фенотип-зависимые различия в эффективности проводимой фармакотерапии бронходилататорами и ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС) у различных больных ХОБЛ [92]. Также выявлено, что кроме нейтрофилов и макрофагов, важную роль в патогенезе ХОБЛ могут играть эозинофилы. При этом больные с эозинофильным типом воспаления могут относиться к отдельному фенотипу ХОБЛ [97, 158].

В современном представлении формирование фенотипа является генетически детерминированным. Вероятно, фенотип ХОБЛ – это генетически

лимитированный вариант развития заболевания в условиях взаимодействия организма человека с разнообразными средовыми факторами (особенности факторов риска, характеристика респираторного микробиома). Так наиболее изученным фактором риска ХОБЛ является наследственная недостаточность α 1-антитрипсина (основного ингибитора сериновых протеиназ в системном кровотоке). Именно с этим генетическим дефектом связано раннее развитие панлобулярной эмфиземы и снижение легочной функции, возникающие независимо от статуса курения, хотя риск для курильщиков гораздо выше [46, 245]. Кроме того, описаны генетические предикторы быстрого снижения ОФВ1 при ХОБЛ. В частности, обсуждается ассоциация падения ОФВ1 и степени выраженности фиброза в бронхиолах с полиморфизмом генов, контролирующих их активность цитокинов IL-6, IL-13, интерферона- γ . Von J.M. и соавторы выявили корреляцию выраженности эмфиземы с продукцией таких маркеров воспаления, как IL-6, матриксная металлопротеиназа 7 (ММП-7). Также обнаружена обратная корреляция между степенью повреждения паренхимы легких и продукцией фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) [257].

Другими потенциальными фенотипами ХОБЛ являются буллезная болезнь, сочетание астмы и ХОБЛ, раннее начало ХОБЛ, «молодые» больные ХОБЛ (моложе 50 лет), ХОБЛ у женщин, ХОБЛ с частыми обострениями и др. [219].

Важной характеристикой, ранее абсолютно не учитываемой в классификационном и терапевтическом подходе при ХОБЛ, является частота обострений. Именно частота обострений является наиболее значимым параметром, влияющим на качество жизни, скорость прогрессирования ХОБЛ и выживаемость больных, что продемонстрировано результатами международного исследования ECLIPSE [134, 249]. До 2011 г. в GOLD уменьшение частоты обострений у больного рассматривалось в качестве одной из задач долгосрочной базисной терапии [151]. В результате накопленной базы результатов клинических исследований, проспективных наблюдений и метаанализов, продемонстрировавших выраженную прямую корреляцию между частотой и тяжестью обострений ХОБЛ и скоростью прогрессирования болезни, в 2011 г.

эксперты GOLD возводят проблему снижения частоты обострений в ранг стратегических задач, концептуально меняя существующий классификационный и фармакотерапевтический подход к ведению больных ХОБЛ. Впервые формируется четкое разделение больных ХОБЛ на 2 фенотипа по частоте обострений: пациенты с «редкими» обострениями (0-1 обострение в год) и пациенты с «частыми» обострениями (2 и более в год). Анамнестическое определение частоты обострений теперь лежит в основе выделения групп пациентов по риску развития обострений в будущем и значимо влияет на рекомендации по лечению заболевания [152].

Учитывая, что большинство обострений ХОБЛ ассоциировано с бактериальной и/или вирусной инфекцией, вероятно предположить, что разработка фармакотерапевтических методов контроля над микробиомом респираторного тракта у конкретного больного позволит улучшить профилактику обострений болезни, а также уменьшить их тяжесть и последствия для пациента. Однако, это потребует углубленного изучения микробиоты бронхиального дерева с качественной и количественной идентификацией ее состава.

1.2.2 Клиническая гетерогенность бронхиальной астмы

Традиционным является разделение больных БА по степени тяжести. Оценка степени тяжести БА основана на сочетании клинических симптомов и значениях ФВД (прежде всего ОФВ1). Данная классификация применима для первичной оценки у пациента с впервые выявленной БА до начала базисной терапии. Согласно рекомендациям GINA 2008-2014 г. у пациентов, ранее получавших базисную терапию, рекомендуется оценивать не степень тяжести БА, а уровень достигнутого контроля над заболеванием [148].

По возрасту манифестации заболевания выделяют два фенотипа: early-onset (астма, возникшая в возрасте до 12 лет) и late-onset (астма, возникшая в зрелом возрасте) [56].

По патогенетическим механизмам выделяют экзогенную (атопическую) и эндогенную (неатопическую) формы астмы. Для atopической БА характерна

гиперпродукция общего и специфических IgE, связанных с дисбалансом Th2/Th1 цитокинового профиля с усилением продукции Th2 лимфоцитами, снижением продукции цитокинов, вырабатываемых Th1 клетками, усилением продукции лимфоцитами IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 и изменением активности дендритных клеток. В патогенезе неатопической (не IgE опосредуемой) БА значимы аллергические реакции, связанные с пролиферацией антиген-специфических лимфоцитов и проявляемые гиперчувствительностью замедленного типа на воздействие инфекционных агентов, химических соединений, а в развитии неатопической БА – первичная гиперреактивность бронхов, гастроэзофагеальный рефлюкс. [56, 71].

По чувствительности к стандартной базисной терапии выделяют терапевтически чувствительную и терапевтически резистентную (в том числе и гормонозависимую) формы заболевания.

Сегодня широко обсуждается феномен гетерогенности тяжелой БА, в структуре которого выделяют несколько фенотипов, отличных по своей клинической характеристике [73, 87, 165, 274]. S.Holgate, член экспертной группы Европейского респираторного общества по терапевтически резистентной астме, в 1999 году предложил выделять следующие варианты заболевания [121]:

1. Фатальная и близкая к фатальной астма. Клиническая характеристика: фатальные и близкие к фатальным эпизоды астмы, сопровождающиеся гиперкапнией и требующие искусственной вентиляции легких. Пациенты этой группы могут испытывать повторные жизнеугрожающие приступы, несмотря на адекватную терапию ингаляционными кортикостероидами (ИКС), или повторные курсы системными кортикостероидами (СКС).

2. Интермиттирующая тяжелая астма или «хрупкая» (brittle) астма. Является наиболее лабильным вариантом заболевания с непредсказуемым развитием острых приступов и хаотичными значениями пиковой скорости выдоха (ПСВ).

В настоящее время выделяют два типа «brittle» астмы [81]:

Тип I: характеризуется значительной вариабельностью ПСВ (>40% в течение дня на протяжении не менее 50% времени за период наблюдения 150 дней), несмотря на применение высоких доз ИКС (>1600 мкг БДП или эквивалент в сутки);

Тип II: внезапные острые приступы, развивающиеся в течение менее чем трех часов без объективной причины и на фоне практически нормальной функции бронхов или хорошо контролируемой астмы.

3. Хроническая тяжелая астма с постоянной бронхиальной обструкцией. К данному фенотипу БА относится тяжелая астма с наличием или без эпизодов внезапного ухудшения, требующая назначения СКС, на фоне которых, тем не менее, регистрируется неполный ответ. Часто обозначается как «кортикостероид-зависимая» или «БА с частичной кортикостероидной резистентностью».

Ряд исследований демонстрирует общие и различные иммунологические маркеры, лабильность дыхательных путей, эпидемиологические и клинические особенности фенотипов БА. Пересматривается и воспалительная концепция патогенеза БА, предусматривающая сочетание атопии, хронического воспаления и гиперреактивности бронхов. В современной литературе обсуждается, что «астма – это больше чем воспалительное заболевание» и «само по себе воспаление не может полностью объяснить патофизиологию этого комплексного заболевания». Согласно этой концепции, первичным является повреждение эпителия дыхательных путей, которое реализуется как в результате цитотоксического действия провоспалительных цитокинов эффекторных клеток, обусловленное Th2 типом иммунного ответа, так и посредством апоптоза, связанного с генетическими механизмами. Это и определяет различные фенотипы заболевания, а также взаимосвязь между воспалением и эпителиально-мезенхимальным компонентом в патогенезе персистирующей астмы [79, 185].

Следует отметить, что БА и ХОБЛ, характеризуясь существенной гетерогенностью и обилием вариантов клинических сценариев развития болезни, в ряде случаев проявляются столь значительной близостью диагностических и прогностических маркеров, столь выраженным фенотипическим сходством у

конкретного больного, что делает крайне затруднительной дифференциальную диагностику и подбор адекватной терапии (больные ХОБЛ, быстро реагирующие на бронхолитическую пробу с сальбутамолом и характеризующиеся высокими значениями ОФВ1 [101], различия в эффективности проводимой фармакотерапии бронходилататорами и ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС) у различных больных ХОБЛ [92], пациенты с эозинофилией в мокроте, демонстрирующие хороший ответ на терапию ИГКС [158], больные с резистентной к терапии глюкокортикостероидами формой БА [160], фенотип тяжелой БА с бронхиальной нейтрофилией, характеризующийся максимальным клиническим сходством с тяжелой ХОБЛ [19, 135]).

Таким образом, несмотря на наличие клинических критериев для выявления конкретных фенотипов при БА и ХОБЛ, их патофизиологические механизмы остаются до конца не ясны. В частности, остается невыясненным вклад респираторной микробиоты в формирование и поддержание персистирующего бронхолегочного воспаления, а также ее значение в определении тех или иных фенотипических проявлений болезни и особенностей ответа на проводимую терапию.

1.3 Понятие о микробиоме дыхательных путей человека

Известно, что в нормальных условиях тело человека является средой обитания огромного количества микроорганизмов, составляющих его естественный микробиом. Еще в 1977 г. Savage D.C. подтвердил, что организм человека содержит количество бактерий, по крайней мере, в 10 раз превышающее численность его собственных клеток. При этом большинство бактерий, населяющих тело человека, сосредоточено в желудочно-кишечном тракте [234].

Макроорганизм и его микробное население (сообщество микроорганизмов, микробиом, микробиота) в нормальных условиях находятся в состоянии динамического равновесия. Симбиотические взаимоотношения между ними сложились и закрепились в процессе длительного эволюционного развития, поэтому для микробиома каждой области тела человека характерно

относительное постоянство. Изменения в состоянии макроорганизма находят отражение в изменении микробного пейзажа всех участков тела [122].

Микробные популяции играют важную роль в поддержании здоровья. Так, например, в желудочно-кишечном тракте они детерминируют формирование локального и системного иммунитета, способствуют кишечному ангиогенезу и являются важным фактором нормального пищеварения [63, 167]. Кроме того, нарушение роста нормальной микрофлоры кишечника на фоне приема антибактериальных препаратов может способствовать патологической колонизации *Clostridium* или *Candida Spp.*

Определение биогеографии бактериальных популяций в среде обитания (тело человека) является одним из приоритетных для понимания взаимоотношений между бактериями и организмом-хозяином в норме и при патологии.

Длительное время в пульмонологии ответ на вопрос о стерильности нижних дыхательных путей был однозначен – в норме бронхиальное дерево стерильно. Данная концепция была обусловлена, с одной стороны, ограниченностью экспериментального доступа к дыхательным путям здоровых лиц, а, с другой, – ничтожно малыми возможностями верификации микроорганизмов классическими культуральными методами [243]. Внедрение современных высокотехнологичных молекулярно-генетических методов идентификации микроорганизмов позволило опровергнуть концепцию о стерильности нижних дыхательных путей. Всестороннее изучение респираторного микробиома подтверждает в актом *tyda*. тот факт, что в легких здорового человека он характеризуется своим уникальным составом. По аналогии с желудочно-кишечным трактом, можно предположить, что сохранение в респираторном тракте естественного состава микробиома является важным фактором защиты органов дыхания от развития бронхолегочных инфекций [40, 45, 267].

1.3.1 Методы идентификации микробиоты респираторного тракта

Сегодня изучение состава сообщества микроорганизмов респираторного тракта и его взаимодействия с организмом-хозяином (человеком) представляет

собой крайне актуальную проблему. С одной стороны, идентификация микробиома необходима для определения роли микроорганизмов в поддержании здоровья органов дыхания и развитии заболеваний бронхолегочной системы человека. С другой стороны, глубинная характеристика микробиоты легких человека (как здорового, так и при различных хронических респираторных заболеваниях) позволит оценить влияние микробиотических сообществ, ассоциированных с респираторным трактом, на особенности течения болезни, скорость прогрессирования бронхолегочной патологии и формирование резистентности к проводимой терапии [263].

Основным методом оценки состава микробиотических сообществ до последнего времени было принято считать культуральный метод. Преимуществами данного метода являются его относительно невысокая стоимость и возможность полуколичественной оценки микроорганизмов. В то же время, с помощью культуральных методов представляется возможным выявить только 1-10% бактерий. Очевидно, что стандартные методы культивирования не в состоянии адекватно представить огромное микробное разнообразие, прежде всего из-за необходимости соблюдения жестких особенностей роста многих микроорганизмов. Даже при создании оптимальных условий для роста, имитирующих экологическую питательную среду, до 80% микроорганизмов, идентифицированных альтернативными некультуральными методами, перестают расти в культуре [105, 106].

Другим важным недостатком данной методики является длительность процесса культивирования микроорганизмов, а, значит, отсроченная диагностика инфекционного процесса. Так, зачастую, результаты микробиологического исследования индуцированной мокроты, полученной от больного, становятся доступными лишь через несколько дней от начала антибактериальной терапии, назначенной эмпирически. Часто ценность таких «запоздалых» данных сводится лишь к уточнению этиологии инфекционного процесса, в ряде случаев позволяя скорректировать выбор антибиотика. Подобными недостатками обладают и

методы идентификации бактерий с использованием морфологических характеристик, а также химических и биохимических реакций [243].

Используя высокотехнологичные молекулярно-генетические методы, основанные на определении последовательности ДНК или применении микрочипов, можно исследовать состав микробиоты любого участка организма человека без выделения изолированных культур микроорганизмов. Для идентификации конкретных микроорганизмов в биологических образцах не требуется предварительная оценка культуральных особенностей роста, поскольку само по себе исследование основывается не на определении морфологических особенностей бактериальной клетки, а на выделении бактериальной ДНК из пробы микробиоты и ее последующем глубоком анализе. Применение молекулярных методов идентификации микроорганизмов позволяет избежать длительного времени культивирования, увеличить точность исследований и способствует определению новых бактериальных видов [45, 267].

Для характеристики микробиома человека, выявления связи между изменением состава сообщества микроорганизмов и здоровьем / болезнями человека, а также создания стандартизованного ресурса для внедрения новых технологических подходов, доступного для всего мирового сообщества, в 2007 г. организован международный масштабный проект «Микробиом человека», реализованный с использованием современных молекулярно-генетических методов. В рамках данного проекта у 250 «нормальных» (практически здоровых) добровольцев обоего пола проводился забор микробиоты из 5 регионов организма: желудочно-кишечный тракт, кожа, полость рта, полость носа и влагалище (у женщин). Этот проект позволил создать базы данных последовательностей генов микроорганизмов, которые в настоящее время доступны для свободного пользования [260].

В процессе выполнения проекта созданы необходимые предпосылки для получения новых знаний о взаимосвязи микробиотических сообществ, населяющих организм человека, с широким спектром потенциально значимых факторов, способных изменять состав микробиома (факторы среды обитания

макроорганизма, пол, возраст, особенности питания и иммунного ответа, заболевания человека, прием лекарственных препаратов и т.д.). Конечной целью проекта «Микробиом человека» является создание широких возможностей для улучшения здоровья человека через мониторинг и манипулирование человеческим микробиомом [260].

Методика идентификации микробиоты включает мультиплексную полимеразную цепную реакцию, которая позволяет одновременно амплифицировать несколько тысяч фрагментов ДНК. При этом объектом амплификации являются особые фрагменты генов микробов, кодирующих белки, которые формируют 16s субъединицу рибосомной РНК (16s rRNA) микроорганизмов различных видов. Установлено, что эти гены достаточно консервативны и удобны для анализа, поскольку имеют выявляемые секвенированием маркеры, характерные для отдельных микроорганизмов и их филогенетических групп [16, 122, 243].

В настоящее время более 16000 последовательностей бактериальных генов 16s РНК представлены в доступной базе данных, что открывает широкие перспективы для уточнения состава микробиоты самых различных локализаций в организме человека [16, 18, 102, 122].

1.3.2 Сообщество микроорганизмов органов дыхания у здорового человека

Длительное время считалось, что нижние дыхательные пути здорового человека в нормальных условиях стерильны. Долгосрочная актуальность данной концепции поддерживалась, прежде всего, вследствие отсутствия высокотехнологичных некультуральных методов, позволяющих выполнить глубинное исследование микроорганизмов, представленных в минимальных количествах.

Исследование микробиоты из легкодоступных регионов или регионов, содержащих высокие бактериальные биомассы (кожа, кишечник, полость рта, половые пути), не является затруднительным. Проблема идентификации микроорганизмов в нижних дыхательных путях и альвеолах складывается из двух

составляющих. Во-первых, при заборе материала из легких (индуцированная мокрота, бронхоскопия) достаточно сложно исключить его контакт с верхними дыхательными путями, содержащими разнообразные микроорганизмы. Во-вторых, было высказано предположение, что образцы из легких могут характеризоваться низкими микробными биомассами, что делает практически невозможным применение классических культуральных методов для идентификации микробиотических сообществ нижних дыхательных путей [122, 267].

Так, используя высокотехнологичные методики секвенирования бактериальных генов 16s rRNA, полученных из материала oro- и назофарингеальных мазков, браш-биоптатов и лаважной жидкости 6 практически здоровых добровольцев, Charlson E.S. и соавторы (2011) осуществили всесторонний количественный и качественный анализ состава микробиома верхних (ВДП) и нижних (НДП) дыхательных путей у практически здоровых добровольцев, опровергнув гипотезу о стерильности легких. Исследователи обнаружили, что нижние дыхательные пути практически здорового человека содержат бактериальные последовательности 16s rRNA, однако уровень бактериальной обсемененности в них характеризуется как низкий. Кроме того, идентифицированный состав сообщества микроорганизмов нижних дыхательных путей в целом неотличим от микробиома из верхних дыхательных путей. Находки уникальных (свойственных только нижним дыхательным путям) последовательностей бактериальных генов были редки, в связи с чем исследователи пришли к выводу об отсутствии значимых различий в бактериальных сообществах нижних и верхних дыхательных путей. Это может быть объяснено происхождением основного состава микробиома НДП, главным образом, от микрофлоры ВДП вследствие микроаспирации [267].

Внедрение современных технологий секвенирования по 16s рибосомному региону позволило выявить, что микробиота, населяющая бронхолегочную систему, гораздо более разнообразна, чем предполагалось ранее. В Великобритании группа исследователей Imperial Colledge London,

идентифицировав 5054 бактериальных сиквенсов 16S rRNA в биообразцах от 43 добровольцев, пришла к выводу, что на 1см² бронхиальной поверхности приходится порядка 2000 бактериальных геномов [122].

В частности, ученые изучили количественный и качественный состав микробиома респираторного тракта, характерного для здоровых взрослых индивидов в сравнении с больными БА и ХОБЛ, исследуя орофарингеальные мазки, мазки из полости носа и браш-биоптаты из верхней доли левого легкого у 8 практически здоровых добровольцев, 11 больных БА и 5 пациентов, страдающих ХОБЛ. Исследователями была получена корреляция между микробиомом биоптатов легких и ротоглотки у обследованных индивидов, в то время как состав микробиоты полости носа качественно отличался от состава микробиотических сообществ орофаринкса и легкого. Также результаты исследования продемонстрировали высокое сходство микробиоты бронхиального дерева у здоровых лиц и пациентов с БА [122, 184].

На основании проведенных исследований Hilty M. с соавторами не только подтвердили факт нестерильности бронхиального дерева, но и охарактеризовали среднюю микробиологическую обсемененность слизистой бронхов. Наиболее частыми микроорганизмами, колонизирующими бронхиальное дерево у здоровых добровольцев, являются бактерии рода *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria* и *Veillonella*. В меньшей степени представлены потенциально патогенные *Haemophilus* и *Neisseria* [83, 122].

Среди этих микроорганизмов есть анаэробы, такие как *Prevotella spp.*, с трудом произрастающие на специальных средах. *Bacteroidetes* (в частности, *Prevotella spp.*) более распространены у здоровых лиц, чем пациентов с БА и ХОБЛ (табл. 1) [122].

Таблица 1 – Кладистический анализ ассоциации: различия микробиома браш-биоптатов верхней доли левого легкого у практически здоровых взрослых добровольцев, пациентов с БА и ХОБЛ (по данным Hilty M. и соавторов) [122]

Семейство бактерий	1. ХОБЛ	2. БА	3. Практически здоровые	P ₁₋₃	P ₂₋₃
<i>Proteobacteria</i>	94	181	27	7,70E-15	2,16E-14
<i>Bacteroidetes</i>	62	179	151	3,38E-5	7,17E-3
<i>Firmicutes</i>	60	134	103		
<i>Fusobacteria</i>	8	19	11		
<i>Actinobacteria</i>	11	12	11		
Роды					
<i>Bacteroidetes/Prevotella</i>	51	158	121	7,55E-3	
Другие <i>Bacteroidetes</i>	11	21	30		
<i>Firmicutes/Staphylococcus</i>	4	2	3		
<i>Firmicutes/Streptococcus</i>	26	56	26		
<i>Firmicutes/Veillonella</i>	18	45	41		
Другие <i>Firmicutes</i>	12	31	31		
<i>Proteobacteria/Haemophilus</i>	46	108	13	2,06E-5	1,17E-4
<i>Proteobacteria/Neisseria</i>	24	44	11		
Другие <i>Proteobacteria</i>	24	29	3	9,22E-4	
<i>Fusobacteria</i>	8	19	11		
<i>Примечание</i> – Показатель P рассчитан с поправкой Бонферри для множественных сравнений и представлен для статистически различающихся данных.					

Prevotella spp. – грамотрицательные анаэробы – признаются частью нормального орального [113] и вагинального микробиома и являются преобладающими представителями среди анаэробных грамотрицательных бактерий, выделенных у пациентов с респираторными инфекциями [114].

В рамках исследования респираторного микробиома Hilty M. и соавторы (2010) также выполнили молекулярно-генетическую идентификацию микроорганизмов в смывах бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) у детей обоего пола в возрасте $11,8 \pm 2,8$ лет (11 пациентов с БА тяжелого течения и 7 практически здоровых добровольцев). До проведения исследования пациенты не получали антибактериальной терапии в течение предшествующего месяца. Также,

как и во взрослой популяции, у практически здоровых детей лаважная жидкость характеризовалась достоверным преобладанием *Bacteroidetes* и меньшей обсемененностью *Proteobacteria* по сравнению с группой детей, страдающих тяжелой БА (табл. 2) [122].

Таблица 2 – Кладистический анализ ассоциации: различия микробиома лаважной жидкости у практически здоровых детей и пациентов с тяжелой БА (по данным Hilty M. и соавторов) [122]

Тип бактерий	1. Практически здоровые дети	2. Больные астмой	P ₁₋₂
<i>Proteobacteria</i>	83	331	6.45E-14
<i>Bacteroidetes</i>	282	239	1.13E-17
<i>Firmicutes</i>	218	454	
<i>Fusobacteria</i>	69	70	
<i>Actinobacteria</i>	18	27	
Роды			
<i>Bacteroidetes/Prevotella</i>	247	137	3.23E-31
Другие <i>Bacteroidetes</i>	35	102	
<i>Firmicutes/Staphylococcus</i>	13	74	
<i>Firmicutes/Streptococcus</i>	98	242	
<i>Firmicutes/Veillonella</i>	69	90	
Другие <i>Firmicutes</i>	38	48	
<i>Proteobacteria/Haemophilus</i>	17	154	1.44E-13
<i>Proteobacteria/Neisseria</i>	53	77	
Другие <i>Proteobacteria</i>	13	100	1.01E-6
<i>Fusobacteria</i>	69	70	
Примечание – Показатель P рассчитан с поправкой Бонферри для множественных сравнений и представлен для статистически различающихся данных.			

Уменьшение содержания *Bacteroidetes* в бронхиальном дереве у больных бронхообструктивными заболеваниями в сравнении со здоровыми добровольцами может быть проявлением модификации нормальной микрофлоры на фоне болезни [122].

Большое внимание в исследованиях микробиоты следует отдавать анализу географической области проживания обследуемых. Резонно предполагать, что микробное сообщество будет варьировать в зависимости от климата,

микроорганизмов окружающей среды, источником которых являются другие индивиды, а также домашние животные. Так, в сравнительном исследовании оценили влияние места проживания обследуемых индивидов на состав сообщества микроорганизмов у больных фиброзом легких. Исследовались образцы слюны, полученные от 2-х групп пациентов: 19 пациентов из одной местности Соединенного королевства Великобритании и 19 пациентов из одного региона США. В результате проведенного исследования получены статистически значимые различия в составе микроорганизмов между группами. Кластерный анализ выявил значимый вклад географического различия в отношении количественного и качественного состава микробного сообщества [64, 83].

На данный момент исследование микробиотических сообществ - активно развивающаяся область науки, однако стандартные методологические и статистические подходы для сопоставления результатов таких исследований не разработаны.

1.3.3 Роль микроорганизмов в формировании и прогрессировании хронической бронхолегочной патологии

В современном представлении тело человека поддерживает хрупкое равновесие между жизнедеятельностью населяющих его микроорганизмов и активностью факторов иммунной защиты. Вопрос о роли микробиома дыхательных путей в формировании и прогрессировании хронических заболеваний органов дыхания остается по-прежнему открытым.

Так, например, Boyton R.J. и соавторы рассматривают дисбаланс естественной микробиотической экосистемы легких вследствие инфекций и/или антибактериальной терапии, как одну из значимых причин развития и поддержания аутоиммунного воспаления. В частности, феномен формирования бронхоэктазов, как исход многих хронических воспалительных заболеваний бронхиального дерева, с позиции иммунных и иммуногенетических механизмов сегодня все чаще рассматривается результатом «порочного круга» хронической бактериальной инфекции и нарушения процессов регуляции воспаления. При

бронхоэктазах в поддержании воспаления могут быть задействованы механизмы, реализующиеся через избыточную активацию натуральных киллеров (NK-клеток), что создает благоприятные условия для персистенции патогенных микроорганизмов в очаге воспаления [175].

В исследовании Charlson E.S. и соавторов, изучающих микробиом респираторного тракта у пациентов после трансплантации легких, показано, что лаважная жидкость у данной группы больных характеризуется большей бактериальной нагрузкой, чем в контрольной группе. Также было отмечено значительное разобщение состава микробиома ротоглотки и бронхиального дерева у реципиентов. Исследователи отмечают снижение видового разнообразия микробиоты трансплантированных легких и появление доминирующих микроорганизмов. Известно, что долгосрочная выживаемость после трансплантации легких часто ограничена развитием инфекционных осложнений и синдрома облитерирующего бронхиолита. По мнению исследователей патогенез хронического отторжения трансплантированных легких может быть частично связан с активностью микробных триггеров и особенностями видового состава микробиома [192, 198].

Традиционно существенной считается роль хронической бактериальной инфекции в прогрессировании муковисцидоза. С позиции микробиологии муковисцидоз, пожалуй, – одно из наиболее изученных хронических заболеваний органов дыхания. Ведущей причиной ухудшения течения заболевания и смертности больных муковисцидозом является развитие дыхательной недостаточности на фоне персистирующего воспаления дыхательных путей, связанного с хронической инфекцией.

Синегнойная палочка является основным общепризнанным бактериальным патогеном, колонизация которым тесно ассоциируется с тяжестью течения данного заболевания и смертностью больных муковисцидозом. Поэтому современная концепция антибактериальной терапии муковисцидоза, лечения его обострений преимущественно основана на способности подавлять активность именно *Pseudomonas aeruginosa* (например, ингаляционный тобрамицин) [170].

Действительно, классические культуральные исследования спонтанно отхаркиваемой мокроты у пациентов с данной патологией демонстрируют сравнительно небольшой по качественному составу пейзаж условно-патогенных микроорганизмов, которые постепенно приобретаются пациентом в течение жизни: от гемофильной палочки и золотистого стафилококка в раннем возрасте до комбинации хронически персистирующих бактерий в конце жизни пациента, среди которых преобладают *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia* [140, 228]. Также с возрастом у больных муковисцидозом увеличивается частота обнаружения таких условно-патогенных микроорганизмов, как *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* и нетуберкулезные микобактерии [190].

В последнее время появилось множество исследований, выполненных по строгим правилам культивирования анаэробных микроорганизмов. Эти исследования продемонстрировали, что респираторный тракт пациентов с муковисцидозом богат разнообразными облигатными анаэробами, включая представителей *Streptococcus*, *Prevotella*, *Actinomyces* и *Veillonella*. Использование высокотехнологичных независимых молекулярно-генетических методов, основанных на секвенировании по 16S рибосомальной РНК бактерий, существенно расширило наше представление о разнообразии бронхолегочного микробиома при муковисцидозе. Так, у данной категории больных в бронхиальном дереве выявляются представители порядка 43 семейств, 60 родов и 2000 видов бактерий [52, 241].

Несмотря на сложность и разнообразие микроорганизмов, которые присутствуют в дыхательных путях больных муковисцидозом, течение заболевания у конкретного пациента может характеризоваться относительно длительными стабильными периодами без обострения. Частота обострений при муковисцидозе является крайне значимой. Каждый эпизод обострения муковисцидоза обычно характеризуется быстрым снижением легочной функции, ухудшением респираторных симптомов и высоким риском смерти больных. Поэтому каждый эпизод обострения муковисцидоза требует антибиотикотерапии и своевременной госпитализации [100, 156].

В связи с появлением новых методов микробиологического исследования актуализируется проблема понимания роли состава микробиотического сообщества дыхательных путей, взаимоотношения его отдельных представителей в развитии обострений и прогрессировании хронической патологии респираторного тракта.

Так, в ряде исследований показано, что в развитии примерно трети всех эпизодов обострения муковисцидоза повинны респираторные вирусы, а не постоянно присутствующие в легких микроорганизмы [230]. В то же время, другие исследования свидетельствуют о высокой корреляции между частотой обострений муковисцидоза и колонизацией респираторного тракта такими бактериями, как *Streptococcus milleri* [264]. Некоторые исследователи муковисцидоза предполагают, что бактерии рода *Prevotella* могут играть определенную роль в развитии обострения данного заболевания, однако прямых доказательств этого факта пока не получено [224]. Интересно, что указанные микроорганизмы (*Streptococcus milleri* и *Prevotella*) связаны с развитием эндогенной анаэробной инфекции не только в дыхательных путях, но и в других регионах организма [241].

Еще одна важная проблема, актуализированная внедрением в реальную клиническую практику современных методов идентификации микроорганизмов и продемонстрированная на примере больных муковисцидозом, – это целесообразность и эффективность фармакотерапевтической (антибактериальной) эрадикации микробиома респираторного тракта. Так, Tunney M.M. и Worlitzsch D. с соавторами свидетельствуют о сохранении полимикробной контоминации бронхиального дерева у больных муковисцидозом даже после нескольких курсов антибактериальной терапии препаратами широкого спектра действия [60, 269].

Как и в отношении муковисцидоза, определение роли микробиотических сообществ дыхательных путей в формировании и прогрессировании хронических бронхообструктивных заболеваний представляет высокую ценность. Ряд микробиологических исследований в этой области демонстрирует отличия состава микробиоты дыхательных путей у пациентов с БА и ХОБЛ от

относительно здоровых добровольцев. Так, например, выявлено увеличение количества микроорганизмов типа *Proteobacteria* в респираторном тракте у пациентов с бронхообструктивными заболеваниями (БА и ХОБЛ). В качестве потенциально значимых патогенов у больных БА и ХОБЛ выявляются *Haemophilus*, *Moraxella* и *Neisseria spp.* [122].

По данным Wark P. и соавторов, проанализировавших 235 случаев госпитализаций по поводу обострения БА и ХОБЛ у 199 больных (96 пациентов с обострением БА и 103 пациента с обострением ХОБЛ) в течение 2-х месяцев, роль сочетанной респираторной вирусной и бактериальной инфекции в развитии обострения обоих заболеваний крайне высока. Исследователи использовали мультиплексную ПЦР для верификации вирусной инфекции и культуральные методы для идентификации сообщества бактерий в орофарингеальных и назальных мазках у пациентов, поступающих в стационар в течение первых 24 часов. В 40% случаев обнаружена изолированная вирусная инфекция (наиболее часто риновирус А), в 21% случаев – изолированная бактериальная инфекция, при этом в 18% наблюдалась сочетанная вирусная и бактериальная инфекция. В результате мультивариантного анализа факторов риска продемонстрирована роль бактериальной и вирусной инфекции, а также низкого ОФВ₁, как независимых прогностических критериев более длительного пребывания больных в стационаре. Также следует отметить значимую роль сочетанной респираторной вирусной и бактериальной инфекции в повышении риска развития повторных обострений и госпитализаций больных БА и ХОБЛ в течение последующих 60 дней. Исследователи сделали вывод о значимости вирусной инфекции (особенно на фоне хронической бактериальной контоминации) в развитии более тяжелых рецидивизирующих обострений БА и ХОБЛ с высоким риском повторных эпизодов и госпитализаций [270].

1.3.3.1 Микробиом дыхательных путей и ХОБЛ

Известно, что дыхательные пути у больных ХОБЛ (особенно тяжелого и очень тяжелого течения) часто колонизированы бактериями. Наиболее

распространена обсемененность *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, на поздних стадиях заболевания – *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* [85].

Интересные результаты были показаны в исследовании Marc A. Sze и соавторов. Исследователи, используя современные молекулярно-генетические методы идентификации микроорганизмов по 16s rRNA участкам генома, выполнили качественный и количественный анализ микробиома во фрагментах легочной ткани, полученных от здоровых некурящих лиц, курильщиков без признаков ХОБЛ, пациентов с ХОБЛ очень тяжелого течения (4 стадия по классификации GOLD, 2010) и больных муковисцидозом. В качестве отрицательного контроля использовалась стерильная вода. Продемонстрировано, что во всех группах присутствовали бактериальные клетки, исключая контрольную. В целом обсемененность исследуемых фрагментов легочной ткани была сравнительно небольшой – 20-1252 бактериальных клеток на 1000 клеток человека. Качественно выявлено 3 различных типа сообщества микроорганизмов. Интересно, что для здоровых некурящих лиц и курильщиков без признаков ХОБЛ был характерен схожий по качественному составу тип микробиома. В то же время сообщества микроорганизмов в группах пациентов с ХОБЛ 4 стадии и больных муковисцидозом различались между собой и отличались от первых двух групп. В частности, у пациентов с ХОБЛ 4 стадии отмечалось достоверно более высокое, по сравнению с другими группами, присутствие грамположительных бактерий Firmicutes ($p < 0,003$) [258].

Обострение инфекционного процесса в респираторной системе является важным фактором, усугубляющим бронхиальную обструкцию, ведущим к нарастанию всех признаков болезни и ее дальнейшему прогрессированию [152].

Безусловно, каждое инфекционно-зависимое обострение ХОБЛ ухудшает прогноз болезни. С клинической точки зрения все обострения следует рассматривать как фактор прогрессирования болезни. Обычно в течение года больной ХОБЛ переносит от одного до четырех обострений и более. Их частота заметно варьирует в зависимости от степени тяжести заболевания и адекватности

выбранной схемы лечения. Так, при ОФВ₁ 50–55% от должного средняя частота обострений составляет 1,9–2,1 обострения в год, а у больных с ОФВ₁ менее 40% – 2–3 обострений в год. Поэтому одним из основных критериев эффективного лечения стабильной ХОБЛ является уменьшение частоты обострений и увеличение продолжительности периода жизни больного без эпизодов обострения заболевания [152].

Из всего многообразия причин, ведущих к обострению ХОБЛ, наибольшее значение имеет респираторная инфекция, с развитием которой связывают до половины всех случаев обострения заболевания [76]. Однако примерно в 1/3 случаев причину обострения ХОБЛ установить так и не удается [25], так как у многих пациентов, обследованных в период обострения, не удается получить бактериальные культуры при посеве [62].

Именно трансформация бактериальной контоминации в инфекционный процесс является наиболее частой причиной развития обострений ХОБЛ [232]. С бактериальной контоминацией при ХОБЛ связано около 50% всех обострений. При этом в 20-30% случаев обострения ХОБЛ выявляется роль *H. Influenzae* [235].

В то же время появились новые данные, указывающие на то, что появление в дыхательных путях больного ХОБЛ новых бактериальных штаммов является более вероятным фактором, способным провоцировать развитие обострения болезни, нежели постоянно присутствующие («привычные» для пациента) штаммы бактерий. Так, например, высокая частота развития обострений ХОБЛ связана с появлением в бронхиальном дереве больных новых штаммов *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* или *Pseudomonas aeruginosa* [202, 211, 222].

При этом обострения, связанные с обсеменением «новыми» для пациента микроорганизмами, как правило, протекают более тяжело и сопровождаются более выраженными воспалительными изменениями бронхов, по сравнению с обострениями, ассоциированными с «привычной» микрофлорой, населяющей бронхиальное дерево больного. Так, при анализе 177 случаев обострения ХОБЛ в течение двухлетнего периода Sethi S. и соавторы подтвердили, что эпизоды,

ассоциированные с инфицированием новыми бактериальными штаммами, сопровождаются более высокими показателями IL-8, TNF- α и нейтрофильной эластазы в мокроте, а также С-реактивного протеина в сыворотке крови больных по сравнению с обострениями, не связанными с инфицированием *de novo*. При этом исследователи продемонстрировали высокую прямую корреляцию между уровнем активности сывороточного С-реактивного протеина и нейтрофильной эластазы в мокроте больных ХОБЛ и тяжестью клинических проявлений [180].

P. aeruginosa все чаще рассматривается как важный микробный агент в патогенезе обострений ХОБЛ. Синегнойная палочка часто колонизирует бронхиальное дерево у данной группы пациентов и с ней связано около 5-10% эпизодов обострения ХОБЛ [235]. Инфекция *P. aeruginosa* при ХОБЛ может демонстрировать краткосрочную колонизацию с последующим быстрым очищением респираторного тракта. Однако в ряде случаев наблюдается долгосрочное персистирование синегнойной палочки в дыхательных путях больного, характеризующееся частой сменой клонов микроорганизма и внутриклоновым микроэволюционированием. Все это приводит к повышению частоты мутаций *P. aeruginosa* и развитию резистентности возбудителя к воздействию антибактериальных препаратов, в частности, за счет увеличения продукции биопленок [99, 222, 223].

Дополнительно при обострениях ХОБЛ достаточно часто выделяются *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae* а также представители бактериального семейства *Enterobacteriaceae*. Несмотря на то, что роль этих микроорганизмов до конца не ясна, семейство *Enterobacteriaceae* могут представлять определенный интерес, поскольку включает в себя большое количество грамотрицательных бактерий, одни из которых традиционно связаны с желудочно-кишечным трактом, другие же являются известными патогенами [235]. Учитывая клиническую значимость многих из этих микроорганизмов вне дыхательных путей, обнаружение энтеробактерий у пациентов с ХОБЛ может свидетельствовать об их потенциальном вкладе в патогенез ХОБЛ и развитие обострений [170].

Примерно в 20-48% случаев обострения ХОБЛ у пациентов в бронхиальном дереве определяются вирусы (наиболее часто вирус гриппа и риновирусы) [48, 179, 235]. При анализе тяжелых обострений ХОБЛ, требующих госпитализации, показано, что вирусная коинфекция существенно пролонгирует сроки стационарного лечения больных (10 и более дней). Участие вирусной инфекции в развитии обострения ХОБЛ характеризуется более тяжелым течением эпизода с выраженными клиническими симптомами и более существенным ухудшением функции легких. Вероятно, это связано с более активными воспалительными изменениями в бронхиальном дереве вследствие коинфекции бактерий и вирусов, по сравнению с изолированно бактериальными факторами развития обострения ХОБЛ [129, 179]. Данные наблюдения предполагают синергичное воздействие бактерий и вирусов на респираторный тракт больного в случае коинфекции с прогрессивным увеличением патогенных свойств. В частности, доказан механизм увеличения адгезии *H. influenzae* или *S. Pneumoniae* к клеткам респираторного эпителия посредством вирус-индуцированной активации экспрессии бактериальных рецепторов на эпителиальных клетках [229]. Также, напротив, доказана способность *H. influenzae* активировать экспрессию эпителиальных рецепторов адгезии риновирусов (ICAM-1 и TLR3 рецепторы) [162].

В отличие от развития обострений ХОБЛ, роль бактериальной колонизации в формировании данного заболевания до конца не ясна. Известно, что ранняя колонизация дыхательных путей микроорганизмами, характерными для легкой ХОБЛ, обнаруживается у длительно курящих лиц и может расцениваться как свидетельство риска развития данного заболевания. Так же, как и у больных ХОБЛ легкого течения, у лиц с длительным стажем курения и высоким риском развития ХОБЛ в браш-биоптатах и лаважной жидкости определяется контоминация такими бактериями, как *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *M. Catarrhalis* [50].

Хотя при ХОБЛ тщательно изучена роль конкретных общепризнанных для данного заболевания микроорганизмов, другие виды бактерий и вирусов также могут колонизировать дыхательные пути пациентов. В частности, описаны

ассоциации между ХОБЛ и колонизацией бронхиального дерева *Pneumocystis*. Пневмоцисты, как эукариотический грибковый патоген и вероятная причина развития пневмонии у иммунокомпрометированных лиц, участвуют в колонизации дыхательных путей при ХОБЛ значительно чаще, чем у здоровых лиц. Кроме того, независимо от анамнеза курения распространенность колонизации *Pneumocystis* при ХОБЛ положительно коррелирует со степенью обструкции дыхательных путей и, следовательно, тяжестью течения заболевания [205]. Дыхательные пути пациентов с выраженной бронхиальной обструкцией в сочетании с особенностями микробиома у больных III-IV стадией ХОБЛ представляют собой крайне благоприятную среду для колонизации *Pneumocystis*, которые, как показывают исследования, могут быть фактором дальнейшего нарушения функции внешнего дыхания (ФВД) и прогрессирования болезни в целом [170].

Достаточно мало исследований посвящено изучению роли вирусов в колонизации респираторного тракта у больных ХОБЛ в стабильный период. Так, при исследовании биоптатов легочной ткани, полученных от больных ХОБЛ в отсутствие обострения, в качестве потенциального колонизатора у лиц с выраженной эмфиземой рассматривается аденовирус. В частности, количество альвеолярных эпителиальных клеток, экспрессирующих E1A протеин аденовируса, в сравнении с контрольной группой увеличено в 5 раз у пациентов с эмфиземой легкой степени выраженности и в 40 раз у пациентов с выраженной эмфиземой при крайне тяжелой ХОБЛ. Авторы пришли к выводу о наличии латентной аденовирусной инфекции у этих больных ХОБЛ [58].

Следует отметить, что даже в период стабилизации ХОБЛ (вне обострения) в респираторном тракте у 50% пациентов может обнаруживаться хроническая бактериальная колонизация, часто сопровождаемая высокими значениями маркеров воспаления в бронхиальном дереве [49, 65].

Ряд исследований продемонстрировал, что колонизация дыхательных путей сама по себе не является главным стимулом для привлечения нейтрофилов – ключевых иммунокомпетентных клеток, способствующих повреждению

паренхимы легкого и прогрессированию бронхиальной обструкции. Тем не менее, существует четкая взаимосвязь между бактериальной нагрузкой в дыхательных путях и интенсивностью нейтрофильного ответа [66].

Длительное время в качестве пускового фактора в патогенезе ХОБЛ рассматривается вдыхание аэрополлютантов. Табачный дым, несомненно, является основным стимулом для развития воспалительного процесса в бронхиальном дереве при ХОБЛ. При этом только у 15% курильщиков формируется ХОБЛ, что, возможно, обусловлено наличием у этих лиц генетической восприимчивости и/или воздействием дополнительных факторов воспаления. Так, у бывших курильщиков при ХОБЛ в центральных и малых дыхательных путях наблюдается стойкое поддержание активности воспалительных маркеров (в частности, увеличенное количество рекрутированных нейтрофилов и эозинофилов), свойственное для лиц, продолжающих курить. Это подтверждается результатами исследования лаважной жидкости и бронхиальных биоптатов среди бывших курильщиков, страдающих ХОБЛ [213]. Одним из возможных объяснений персистирующего воспаления при ХОБЛ у лиц, прекративших курение, может быть хроническая микробная колонизация дыхательных путей [82].

Sethi S. и соавторы, обследовали 3 группы добровольцев, не применявших антибиотики и/или системные стероиды в течение предшествующих 4 недель: бывшие курильщики с ХОБЛ (подтвержденный диагноз ХОБЛ в соответствии с критериями GOLD, отказ от курения сроком 1 год и более до включения в исследование, индекс курения 20 и более пачка/лет), бывшие курильщики без признаков ХОБЛ (отсутствие диагноза ХОБЛ в соответствии с критериями GOLD, отказ от курения сроком 1 год и более до включения в исследование, индекс курения 20 и более пачка/лет) и здоровые некурящие лица (отсутствие диагноза ХОБЛ в соответствии с критериями GOLD, отсутствие анамнеза курения или индекс курения менее 5 пачка/лет). Исследователи изучали наличие потенциально патогенных микроорганизмов (включая *Haemophilus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa и грам-отрицательные энтеробактерии) в лаважной жидкости. Также в промывных водах методом поточной мультиплексной цитометрии оценивали уровень IL-1 β , фактора некроза опухоли α , IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12, активность лейкотриена B₄, матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9), тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы 1, комплекса эластазы/антиэластазы нейтрофилов (NE-AIAT). Данное исследование продемонстрировало достоверную связь между колонизацией потенциально патогенными микроорганизмами и нейтрофильным воспалением в периферических отделах бронхиального дерева. По мнению исследователей ключевым медиатором в данном механизме является IL-8. Кроме того, высокий уровень активности MMP-9 и NE-AIAT, прямо коррелирующий с содержанием нейтрофилов в лаважной жидкости, позволяет предположить, что именно активированные нейтрофилы являются источником этих разрушительных протеиназ, способствуя прогрессированию ХОБЛ [49].

Ключевая роль IL-8 и нейтрофилов в патогенезе ХОБЛ подтверждается рядом исследований. Так, Tanino M. и соавторы обнаружили, что бессимптомные курильщики с эмфиземой характеризовались более высоким уровнем IL-8 в отличие от длительно курящих лиц без эмфиземы [178]. В свою очередь, более высокому содержанию нейтрофилов в просвете бронхов у пациентов с хроническим бронхитом соответствуют сниженные показатели ФВД и более выраженная продукция мокроты [265]. По мнению O'Donnell R.A. и соавторов периферическая дисфункция дыхательных путей при ХОБЛ, выявляемая методом компьютерной томографии высокого разрешения, в значительной степени связана с активностью нейтрофилов в индуцированной мокроте [226].

Сочетание различных исследований, подчеркивающих связь уровня бактериальной колонизации респираторного тракта у больных ХОБЛ, выраженности нейтрофилии и активности IL-8, может свидетельствовать о вероятном вкладе бактериальной контаминации в развитие бронхиального воспаления [49].

Таким образом, хроническая патологическая бактериальная колонизация дыхательных путей, участвующая в поддержании персистирующего бронхиального воспаления, связана с более частыми обострениями ХОБЛ и более выраженной обструкцией бронхов, что способствует дальнейшему прогрессированию заболевания [227].

1.3.3.2 БА и сообщество микроорганизмов бронхиального дерева

Респираторные инфекции тесно связаны с БА, поскольку провоцируют возникновение свистящих хрипов и увеличение выраженности симптомов у многих больных. По данным эпидемиологических исследований инфекционными микроорганизмами, вызывающими увеличение выраженности симптомов БА, обычно являются респираторные вирусы, а также бактерии [144]. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция – наиболее частая причина появления свистящих хрипов у детей первого года жизни [181], тогда как у детей старшего возраста и взрослых основными пусковыми механизмами свистящих хрипов и ухудшения течения БА служат риновирусы [144].

Так, Jackson D.J. и соавторы, изучая происхождение детской астмы, наблюдали 259 детей до 6-летнего возраста. Исследователи показали, что у детей, страдающих до 3-летнего возраста респираторными инфекциями, вызванными респираторно-синцитиальным вирусом, риновирусами или их комбинацией, к 6 годам чаще наблюдается развитие БА, чем у детей, которые в более раннем возрасте не страдали данными инфекциями [275]. Аналогичные результаты получены в австралийском исследовании, в рамках которого с рождения до 5-летнего возраста наблюдались 198 детей с высоким риском развития атопии. Показано, что дети, страдающие наличием свистящих хрипов на фоне риновирусной инфекции в течение первого года жизни, в возрасте 5 лет демонстрировали более высокий риск развития БА [128].

Прочие респираторные вирусы, такие как вирус парагриппа, гриппа, аденовирусы и коронавирусы, также могут вызывать усиление свистящих хрипов и симптомов БА [181].

Обнаружен ряд механизмов, объясняющих появление свистящих хрипов и увеличение бронхиальной гиперреактивности при респираторных инфекциях. К таким механизмам относят повреждение эпителия дыхательных путей, стимуляцию образования вирус-специфических антител класса IgE, усиление высвобождения медиаторов и развитие позднего астматического ответа на ингалируемый антиген. Таким образом, имеются данные о том, что вирусные инфекции усиливают выраженность воспалительной реакции и способствуют повреждению дыхательных путей за счет усиления в них воспаления [89].

Бактериальная инфекция дыхательных путей обсуждается как фактор, провоцирующий обострения БА и/или являющийся причиной сохранения симптомов заболевания. Получены доказательства наличия связи между хронической бактериальной инфекцией дыхательных путей и тяжестью астмы, между бактериальными инфекциями и обострениями БА. Бактериальные антигены достаточно редко выступают в качестве аллергенов, однако они выступают в роли триггерных факторов, запускающих каскад аллергического воспаления. У больных БА барьерные функции слизистых оболочек дыхательных путей изначально нарушены [122], а в результате прямого микробного повреждения и местного воспаления в ответ на бактериальную инфекцию еще более облегчается процесс проникновения аллергенов в организм. Такие возбудители респираторных инфекций, как *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumonia*, *B. catarrhalis* обладают набором факторов вирулентности, которые ведут к ослаблению мукоцилиарного клиренса, участвуют в повреждении бронхолегочного эпителия и нарушении его проницаемости, усиливают местную воспалительную реакцию, которая в свою очередь усугубляет повреждение. При этом бывает трудно добиться хорошего клинического эффекта от проводимой базисной терапии на фоне различных инфекционно-воспалительных заболеваний [31].

Arocha-Sandoval F. и соавторы при исследовании орофарингеальных мазков больных БА в период обострения и здоровых лиц обнаружили, что временная бактериальная флора присутствовала у 75,8% пациентов с обострением астмы. В

группе здоровых добровольцев бактериальная контаминация присутствовала достоверно реже (у 27,5%). Примечательно, что у больных астмой наиболее частой выделенной бактерией был *Streptococcus pyogenes* (17,2%), в то время, как в контрольной группе преобладала кишечная палочка [62].

Данные Hilty M. и соавторов свидетельствуют о том, что *Staphylococcus spp.* в избытке присутствует в дыхательных путях у детей, страдающих тяжелой БА [122]. Следует отметить, что, обнаруженные Hilty M. и соавторами в бронхах у пациентов с БА *Haemophilus*, *Moraxella* и *Neisseria spp.*, были также ассоциированы с повышенным риском развития бронхиальной астмы у детей раннего возраста по результатам Bisgaard H. и соавторов [113]. Так, у 321 ребенка в возрасте 1 месяца были выполнены мазки со слизистой гипофарингеальной области. В полученных образцах методом культивирования у 21% детей исследователи обнаружили признаки бактериальной колонизации *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* или комбинацией этих микроорганизмов. При этом колонизация одним или несколькими из этих микроорганизмов в значительной степени была ассоциирована как с наличием стойких сухих хрипов у детей первых 5 лет жизни, так и с распространенностью диагностированной БА. Так БА диагностирована у 33% детей из группы новорожденных с выявленной колонизацией по сравнению с детьми, у которых данные микроорганизмы в раннем детском возрасте не выявлялись (10% детей). Также дети с выявленной колонизацией дыхательных путей *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* или комбинацией этих микроорганизмов в возрасте 4 лет характеризовались более высоким уровнем общего Ig E, чем группа детей, у которых ранняя контаминация данными микробами не определялась [67]. Хотя данное исследование не подтверждает факта этиологической значимости указанных выше бактерий в формировании БА у конкретного пациента, оно все же подчеркивает роль бактериальной колонизации дыхательных путей как прогностического фактора риска развития заболевания.

Вероятно, присутствие выше указанных потенциально патогенных микроорганизмов в дыхательных путях, даже в количествах, не превышающих пороговые для развития инфекционного процесса значения, может способствовать поддержанию хронического воспаления в бронхиальном дереве у пациентов с БА и ХОБЛ. Кроме того, бактериальная контаминация создает благоприятные условия для развития бактериальной инфекции на фоне респираторной вирусной инфекции, например, сезонного гриппа [173, 204, 250].

Роль хронических инфекций, вызванных *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, в патогенезе ухудшения течения БА по-прежнему до конца не ясна. Несмотря на высокую частоту инфекций, вызванных этими возбудителями, их роль недооценена в связи со сложностью верификации из-за нетипичного клинического течения и отсутствием легкодоступных диагностических тестов.

Известно, что положительные результаты серологических исследований, подтверждающие наличие острой хламидийной или микоплазменной инфекции в прошлом или ее хронического течения встречаются чаще у больных БА по сравнению с контрольной группой здоровых добровольцев. Кроме того, результаты культуральных и молекулярно-генетических методов также свидетельствуют о более высокой вероятности колонизации бронхиального дерева *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* у больных бронхиальной астмой. Данные результаты особенно актуальны в случаях неконтролируемой бронхиальной астмы с симптомами респираторной инфекции.

В то же время у лиц с ранее не диагностированной БА атипичная инфекция, вызванная *Chlamydia pneumoniae* и/или *Mycoplasma pneumoniae*, может клинически сопровождаться типичными симптомами бронхообструктивного заболевания – длительный приступообразный сухой кашель, обструктивные нарушения функции внешнего дыхания, рассеянные сухие хрипы при аускультации, эпизоды диспноэ. Это заставляет задуматься о роли атипичных микроорганизмов в индукции бронхиальной астмы у ранее здоровых лиц, а также ухудшении течения заболевания. Так, ряд исследований продемонстрировал связь

между серологически выявленной атипичной инфекцией и манифестацией БА [68, 163].

Koguri M. и соавторы, обследовав 104 ребенка с вновь выявленной астмой и 110 практически здоровых детей, не выявили различий в распространенности серологически подтвержденной *S. pneumoniae* между этими группами [94]. В то же время, по данным ten Brinke A. и соавторов, среди пациентов с тяжелой БА, у которых определяется Ig G к *S. pneumoniae*, более выражено ежегодное снижение ОФВ₁, по сравнению с аналогичной группой серонегативных больных [217].

Вероятно, более масштабные исследования микробиоты дыхательных путей у детей и взрослых с БА, позволит также расширить знания о значимости в патогенезе заболевания таких микроорганизмов, как *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.* и *Streptococcus spp.* [93, 117].

Рассматривая бактериальную контаминацию при БА, как важный фактор риска обострения заболевания, следует отметить данные об эффективности антибактериальной терапии в устранении хронического влажного кашля [86, 125].

Результаты последних исследований, вероятно, формируют предпосылки для модификации существующих фармакотерапевтических подходов к лечению, например, тяжелой БА, ассоциированной с частыми инфекционно-зависимыми обострениями. В частности, обсуждается эффективность применения макролидных антибактериальных препаратов. Так, в некоторых исследованиях применение макролидов у пациентов с БА продемонстрировало обнадеживающие результаты в отношении улучшения контроля над астмой, но в большинстве случаев улучшение было временным [242].

В свою очередь, новые терапевтические возможности для лиц, у которых респираторные заболевания характеризуются персистенцией *Haemophilus influenzae*, может открыть появление эффективных вакцин против данного возбудителя [122].

Таким образом, респираторная микробиота, являясь неотъемлемым компонентом поддержания здоровья в дыхательной системе, подвергается качественной и количественной трансформации на фоне различных

бронхолегочных заболеваний. Характер подобных трансформаций у больных БА и ХОБЛ требует дальнейшего изучения как в аспекте влияния на эволюцию заболевания, так и в отношении устойчивости микробиотических сообществ к воздействию различных лекарственных средств, в частности, антибактериальных препаратов.

В свою очередь, одновременное исследование у больных БА и ХОБЛ респираторного микробиома и микробиоты других регионов позволит оценить системный вклад заболевания и проводимой фармакотерапии в модификацию состава сообществ микроорганизмов, населяющих тело человека. В качестве оптимальной модели для подобного исследования может быть использовано кишечное микробиотическое сообщество, чей состав и функции являются наиболее изученными, а вероятные модификации – наиболее хорошо интерпретированными.

1.4 Особенности кишечной микробиоты в норме и при патологии

В современном представлении микробиота, представленная в различных отделах желудочно-кишечного тракта, составляет около 60% всех микроорганизмов, населяющих тело человека, а ее численность колеблется в пределах 10^{13} – 10^{15} [14, 17, 36].

Состав кишечной микробиоты, стремящейся к сохранению стабильного и функционального состояния, на 90% представлен так называемой главной (резидентной) микрофлорой, которую составляют анаэробные бактерии, относящиеся к типам *Bacteroidetes* (около 20 родов грамотрицательных бактерий, включая род *Bacteroides*) и *Firmicutes* (грамположительные бактерии, включающие представителей более чем 200 родов микроорганизмов). Аэробные бактерии, составляющие сопутствующую микробиоту, представлены кишечными палочками, лактобациллами, энтерококками и др. К остаточной микрофлоре относятся стафилококки, клостридии, протей, грибы. Важно отметить, что соотношение анаэробов к аэробам в норме постоянно и составляет 10:1 независимо от локализации [14].

В толстом кишечнике человека в различных количествах присутствуют бактерии родов *Butyrovibrio*, *Acetovibrio*, *Campylobacter*, *Disulfomonas*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Propionobacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Selenomonas*, *Spirochetes*, *Succinomonas*, *Wolinella*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Pseudomonas*, *Veillonella*, *Acidominococcus*, *Anaerovibrio*. Также в составе микробиоты толстого кишечника определяются и другие анаэробные бактерии (*Gemiger*, *Anaerobiospirillum*, *Metanobrevibacter*, *Megasphaera*, *Bilophila*), различные представители непатогенных простейших родов *Chilomastix*, *Endolimax*, *Entamoeba*, *Enteromonas*) и некоторое количество кишечных вирусов [27, 36].

Крайне значимым является тот факт, что микробиота кишечника каждого отдельно взятого человека обладает выраженным индивидуальным характером, что проявляется различиями не только видового состава (около 30 000 видов), но особенностями представленности тех или иных штаммов (более 70 000 штаммов). При этом штаммовые различия могут достигать 25% и более от генома микроорганизмов. Так, в настоящий момент благодаря изучению кишечного микробиома очевидно, что состав симбионтной микробиоты определяется гено- и эпигенотипом организма человека, состоянием его иммунной и антиоксидантной систем, характеристикой анатомической области обитания микробиоты, пищевым рационом, хирургическими и медикаментозными вмешательствами, другими стрессовыми воздействиями [20, 37, 38, 41, 74, 252, 268, 278].

Многолетнее изучение состава кишечного микробиома сформировало определенное понимание значения некоторых микроорганизмов в формировании патологического процесса. Так к потенциально патогенным относятся *Ps. aeruginosa*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Clostridia*, *Veillonellae*. К потенциально полезным на сегодняшний день определенно относят представителей рода *Lactobacillus*. Остальные таксоны, представленные *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Actinobacteria* (*Collensella*, *Atopobium*, *Bifidobacteria*), *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*), и *Firmicutes* (*Clostridium*

coccoides, *Eubacterium rectale*, *Clostridium leptum*, содержат как потенциально полезные, так и потенциально патогенные микроорганизмы [2, 221].

В естественных условиях кишечная микробиота выполняет ряд незаменимых функций. Она обеспечивает колонизационную резистентность, реализующуюся путем протекции участков слизистой оболочки толстой кишки от адгезии патогенов, созданием неблагоприятных условий для роста патогенов, синтезом антибиотико-подобных субстанций и др. Иммунизирующая функция кишечной микробиоты обусловлена поддержанием синтеза иммуноглобулинов, опосредованным влиянием на созревание и функционирование иммунокомпетентных органов в ЖКТ [2].

Микробиота кишечника регулирует моторную функцию толстой кишки, определяя время и объем транзита, частоту и консистенцию стула. Метаболическая функция толстокишечной микробиоты проявляется, прежде всего, синтезом короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), витаминов, бактериоцинов, антиоксидантов, участием в метаболизме желчных кислот, стероидов [2, 111, 237, 259].

К числу наиболее значимых КЦЖК (основного продукта микробной ферментации углеводов, жиров и белков), синтезируемых преимущественно анаэробной микробиотой кишечника, являются уксусная (ацетат), пропионовая (пропионат), изомасляная, масляная (бутират), изовалериановая, валериановая (валерат), изокапроновая и капроновая (гексанат) кислоты. Ежедневно образуется около 200–1000 ммоль КЦЖК, из которых около 5% экскретируется с калом, а 95% быстро всасываются апикальной мембраной колоноцитов и в митохондриях подвергаются бета-окислению с образованием универсального источника энергии АТФ [12, 169].

Значительная часть КЦЖК (преимущественно ацетат и пропионат) через локальные кишечные капилляры и далее по системе воротной вены достигает печени, где подвергается трансформации с образованием глюкозы (около 50% поступивших КЦЖК). В гепатоцитах пропионат преимущественно участвует в глюконеогенезе, а также является регулятором метаболических процессов и

липидного обмена в печени. Ацетат принимает участие в липогенезе и является важным энергетическим субстратом для сердца, мозга, почек, мышц и других периферических тканей [12, 169].

В современном представлении каждая КЦЖК образуется бактериями определенного вида, что позволяет судить о функциональной активности конкретных представителей микробиоты кишечника. Так, основными продуцентами масляной КЦЖК являются анаэробные бактерии видов *Eubacterium rectale*, *Eubacterium ramulus*, *Eubacterium hallii*, *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Faecalibacterium prausnitzii* и *Coprococcus*, а также фузобактерии, непатогенные виды клостридий. Бактерии родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* являются ключевыми продуцентами уксусной КЦЖК [2].

Синтез КЦЖК кишечными бактериями зависит от многих факторов: возраста и состояния здоровья организма человека, факторов внешней среды, пищевого рациона, состава микробиоты, активности местной нейроэндокринной регуляции, составом и количеством кишечных соков, муцина, скоростью обновления кишечного эпителия, приемом лекарств, в частности различных АМП. Так, например, пероральное назначение клиндамицина приближает содержание в кале КЦЖК к уровню, свойственному безмикробным животным [1, 111, 193].

Важная роль в регуляции воспаления и окислительных процессов в кишечнике отводится масляной и изомасляной КЦЖК. Как известно, окислительный стресс является одним из механизмов воспаления и развития пролиферативных патологических процессов в кишечнике. В ряде исследований показано значение масляной кислоты в коррекции оксидативного стресса. Бутират способен значительно уменьшать выраженность пероксид-опосредованного повреждения ДНК, вероятно, оказывая непосредственно влияние на систему репарации ДНК и регулируя активность энзиматической и неэнзиматической антиоксидантной систем, а также усиливать активность глутатион-S-трансферазы и каталазы – ферментов антиоксидантной системы [231].

В свою очередь, дисбиоз, характеризующийся нарушением естественного состава и функции микробиоты кишечника, является причиной повышения

проницаемости кишечной стенки, что приводит к развитию воспаления в кишечнике и эндотоксемии с последующим развитием стеатоза печени путем увеличения продукции ФНО α [189].

По сравнению со здоровыми индивидуумами концентрация микроорганизмов в кишечнике пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), значительно выше [138]. При этом на фоне прогрессивного ее повышения в зависимости от тяжести заболевания, параллельно происходит снижение количества разновидностей бактериального сообщества – падает индекс альфа-разнообразия. Так, у больных ВЗК выявляется резкое уменьшение содержания полезных видов, в частности *Faecalibacterium prausnitzii*. Ключевые бактериальные агенты, обуславливающие развитие воспаления и определяющиеся в большом количестве у пациентов с персистирующим кишечным воспалением — *Bacteroides vulgatus* и *Streptococcus fecalis*. При болезни Крона значительно увеличивается разнообразие и представленность грибов [194].

Важно отметить, что рост заболеваемости ВЗК, пришедшим наряду с другими иммунопатологическими заболеваниями на смену инфекциям, согласно популярной «гигиенической гипотезе», может быть объяснен улучшением санитарного состояния окружающей среды, стерилизацией пищи и воды, а также широким применением антибиотиков. В частности, проспективное национальное исследование в Дании, проведенное в 1995–2003 гг. и включившее 577 622 детей, продемонстрировало повышение относительного риска (ОР) развития ВЗК (в большей степени – болезни Крона) после продолжительных курсов АБТ – более 3 месяцев (ОР=4,4), или повторных курсов АБТ – более 7 курсов в течение жизни (ОР=7,34) [174].

Таким образом, бесконтрольное потребление антибиотиков может воздействовать на микробиоту кишечника, инициируя стойкие изменения в ее качественном и количественном составе. Так, по результатам секвенирования кишечного метагенома людей, перенесших даже один полный курс АБТ

кларитромицином и метронидазолом, выявляется стойкое изменение его состава с персистенцией антибиотикорезистентных штаммов на протяжении 4 лет [13].

Таким образом, кишечный микробиом, являясь одним из наиболее доступных и изученных микробиотических сообществ тела человека, представляет собой оптимальную модель исследования для оценки влияния как персистирующего системного воспаления, так и различных фармакотерапевтических факторов (включая влияние повторяющихся курсов применения АБП) на характеристику микробиоты в целом.

1.5 Проблема обострений БА и ХОБЛ с позиции рациональной антибиотикотерапии

Основываясь на анализе исследований, изложенных выше, следует отметить, что далеко не каждое обострение БА и ХОБЛ является инфекционно-зависимым (особенно в случае обострения астмы). В связи с этим назначение АБТ при обострении БА и ХОБЛ в современных национальных [22] и международных рекомендациях [150, 153] рассматривается скорее как вынужденная мера, применяемая при наличии строгих показаний для назначения АБП.

В настоящее время АБП не рекомендованы для профилактики обострений хронических бронхообструктивных заболеваний, а одним из критериев качественной работы с больным ХОБЛ является ограничение в использовании антибиотиков [22].

Вопрос о целесообразности назначения АБП при ХОБЛ решается положительно только в случае неоспоримого доказательства инфекционной природы обострения. Так, достаточным аргументом для начала АБТ является появление гнойных элементов в отделяемой мокроте. Согласно рекомендаций GOLD (2015) назначение антибиотиков при обострении ХОБЛ является обоснованным в случае наличия у больного 3-х кардинальных симптомов – усиления одышки, увеличения продукции мокроты и появления гнойной мокроты (доказательность В), в случае наличия у больного 2-х кардинальных симптомов

при условии, что одним из них является появление признаков гнойности мокроты (доказательность С), а также в случае потребности в инвазивной или неинвазивной механической вентиляции легких (доказательность В). Рекомендованная длительность АБТ в случае обострения ХОБЛ составляет обычно 5-10 дней [153].

При этом выбор антибиотика проводится обычно эмпирически в сочетании с СКС и адекватной бронхолитической терапией исходя из сведений об эпидемиологической ситуации, предполагаемой чувствительности вероятных патогенов, ответственных за обострение, с учетом наличия факторов риска АР. Культуральное исследование мокроты не рекомендовано для рутинного проведения и показано в случае неэффективности стартовой эмпирической АБТ [22].

Следует отметить, что к антибиотику стартового эмпирического выбора предъявляется ряд требований: высокая активность в отношении патогенного микроорганизма, высокая концентрация в бронхолегочном регионе, удобство применения и минимальный риск побочных эффектов. При этом ориентирами для выбора являются данные о чувствительности к различным АБП *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *M. catarrhalis* в данном регионе [22].

Современные рекомендации по стартовой антибактериальной терапии больных с инфекционно-зависимым обострением ХОБЛ также учитывают тяжесть бронхиальной обструкции, определяющую характер микробной колонизации бронхиального дерева. Так, при ОФВ1 >50% наиболее часто в обострении ХОБЛ повинны *H. Influenza*, *M. catarrhalis* и *S. pneumoniae* с возможной резистентностью к бета-лактамам. При ОФВ1 <50% к числу наиболее вероятных патогенов присоединяется грамотрицательная флора – *Klebsiella pneumoniae*, а также возрастает риск резистентности к бета-лактамам. Постоянная продукция гнойной мокроты сопровождается высоким риском участия в воспалении *Enterobacteriaceae* и *P. Aeruginosa* [22].

При эмпирическом назначении АБП для лечения обострения ХОБЛ следует учитывать ряд так называемых модифицирующих факторов риска формирования АР:

1) для пневмококков – возраст старше 65 лет, терапия бета-лактамами на протяжении предшествующих 3 месяцев, алкоголизм, иммуносупрессия, наличие нескольких сопутствующих заболеваний;

2) для грамотрицательных энтеробактерий – проживание в доме престарелых, сопутствующая сердечно-сосудистая и легочная патология, наличие нескольких сопутствующих заболеваний и недавняя АБТ;

3) для *P. aeruginosa* – бронхоэктазы, терапия ГКС (10 мг и более преднизолона в сутки), терапия АБП широкого спектра действия на протяжении 7 дней в последний месяц, недоедание [22].

В качестве антибиотиков стартового эмпирического выбора в случае обострения ХОБЛ наиболее часто используются защищенные и незащищенные аминопенициллины, современные макролиды (азитромицин, кларитромицин), цефалоспорины и респираторные фторхинолоны [26].

В отношении назначения АБП для лечения обострений БА, в большинстве случаев, не связанных с бактериальной инфекцией, современные рекомендации, изложенные в GINA (2015), являются еще более жесткими. Антибактериальные препараты не рекомендованы к рутинному применению у больных БА. Возможность их назначения определяется наличием четких признаков легочной бактериальной инфекции, таких как лихорадка, гнойная мокрота или рентгенологические признаки пневмонии. При этом агрессивное вмешательство с применением ГКС рассматривается в качестве первоочередной меры, предшествующей решению о назначении АБП [150].

Данная позиция научно-медицинского сообщества направлена на сдерживание бесконтрольного назначения системных АБП, прежде всего, в связи с высокой вероятностью развития АР у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких, которые, в силу особенностей своего заболевания и

повторяющихся эпизодов обострения, находятся в группе повышенного риска нерационального использования антибиотиков.

Таким образом, вероятно, фенотипическое проявление БА и ХОБЛ тесно связано с составом микробиотического сообщества респираторного тракта. Данная взаимосвязь может быть обусловлена, с одной стороны, трансформацией качественного и количественного состава респираторной микробиоты на фоне персистирующего бронхолегочного воспаления и воздействия проводимой фармакотерапии (включая системную АБТ), а, с другой стороны, влиянием собственно модифицированной микробиоты дыхательных путей на особенности течения заболевания, частоту и тяжесть обострений, выраженность вентиляционных нарушений и прогрессирование болезни.

В связи с этим требует уточнения вклад респираторной микробиоты в развитие и прогрессирование БА и ХОБЛ, а также необходима оценка возможного значения проводимой фармакотерапии (включая АБТ) для системной трансформации микробиотических сообществ с определением ее роли в патогенезе заболевания.

Глава 2. Клинические группы и методы исследования

2.1 Протокол исследования

В соответствии с поставленными задачами по единому протоколу спланировано и выполнено одномоментное сравнительное неинтервенционное исследование в параллельных группах. Протокол исследования разработан в соответствии со стандартами «Надлежащей клинической практики» и другими актуальными нормативными актами [11].

В рамках протокола предусмотрен 1 визит, включающий оценку соответствия пациента критериям включения / исключения, подписание информированного согласия, сбор анамнестических данных и выполнение основных процедур исследования. Все требования данного исследования распространялись только на период Визита 1. Исследование не предполагало скрининга, лечебного периода и визитов последующего наблюдения (рис. 1).

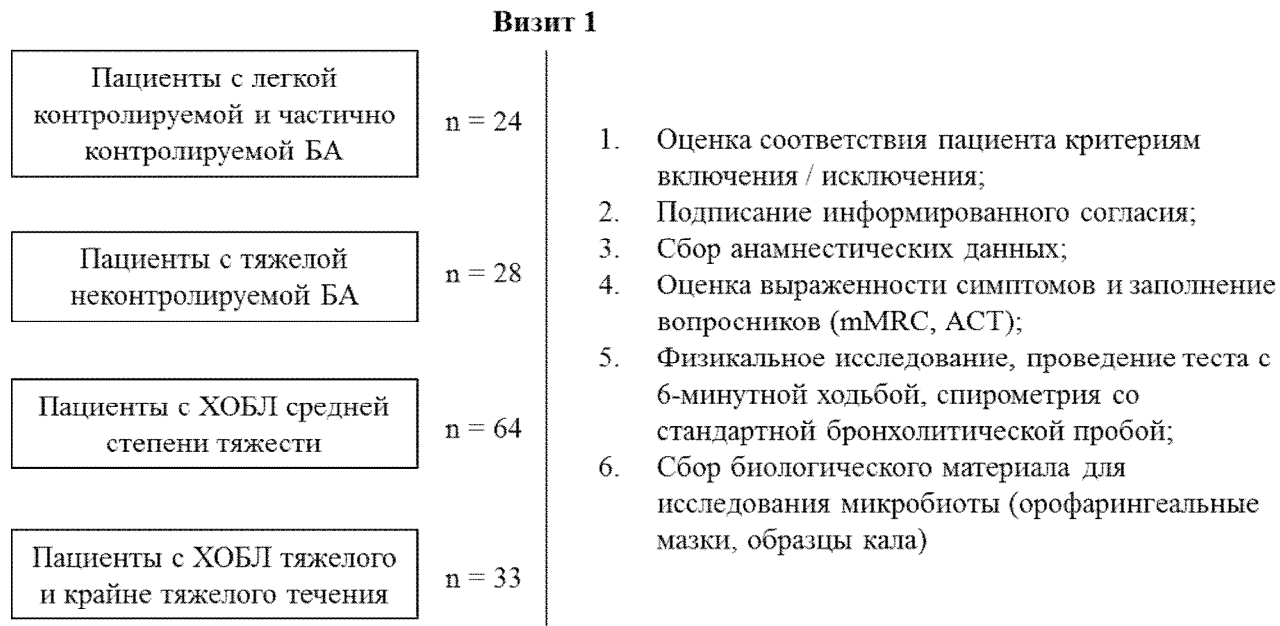


Рисунок 1 – Схема исследования

Отбор пациентов для участия в исследовании выполнен в соответствии с выбранными критериями включения и исключения.

Критерии включения для пациентов с БА:

1. Мужчины и женщины от 40 до 70 лет включительно, имеющие документально подтвержденный клинический диагноз персистирующей бронхиальной астмы длительностью как минимум 12 месяцев перед началом исследования;
2. Получение от пациента до участия в исследовании письменного информированного согласия, подписанного с указанием даты;
3. Отсутствие анамнеза курения или курение в прошлом с индексом курения <10 пачка/лет;
4. Наличие анамнеза базисной терапии ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС) в стабильной дозе на протяжении минимум 6 месяцев непосредственно перед моментом включения в исследование;
5. Стабильное течение заболевания на момент включения в исследование с отсутствием анамнеза обострений и системной антибиотикотерапии на протяжении 4-х недель и более;
6. Дополнительные критерии включения для легкой контролируемой БА:
 - достигнутый и сохраняющийся на протяжении 3-х и более месяцев контроль над заболеванием (табл. 3) [8];
 - объем терапии соответствует рекомендациям GINA по лечению больных легкой персистирующей БА – ступень 2 по GINA (табл. 4) [8];
7. Дополнительные критерии включения для легкой персистирующей, частично контролируемой БА:
 - течение заболевания соответствует критериям частично контролируемой БА на протяжении 3-х и более месяцев (табл. 3) [8];
 - объем терапии соответствует рекомендациям GINA по лечению больных легкой персистирующей БА – ступень 2 по GINA (табл. 4) [8];
8. Дополнительные критерии включения для тяжелой неконтролируемой БА:

- течение заболевания соответствует критериям неконтролируемой БА на протяжении 3-х и более месяцев (табл. 3) [8];
- объем терапии соответствует рекомендациям GINA по лечению больных тяжелой персистирующей БА – ступени 4-5 по GINA (табл. 4) [8];

Таблица 3 – Критерии контроля БА [8]

Симптомы	Контролируемая БА	Частично контролируемая БА	Неконтролируемая БА
Дневные	Нет (≤ 2 в неделю)	> 2 в неделю	Наличие 3-х или более признаков частично контролируемой БА в течение 1 недели
Ограничение активности	Нет	Любой выраженности	
Ночные/ пробуждения	Нет	Есть	
Потребность в препаратах «скорой помощи»	Нет (≤ 2 в неделю)	> 2 в неделю	
Показатели функции легких (ПСВ или ОФВ1)	Норма	$< 80\%$ от должного (или от наилучшего показателя для данного пациента)	
Обострения	Нет	1 или более в год*	
<i>Примечания:</i>			
* Каждое обострение требует немедленной переоценки адекватности терапии.			
** По определению неделя с обострением – это неделя неконтролируемой БА.			

Таблица 4 – Рекомендованный объем терапии для пациентов с БА в зависимости от степени тяжести (адаптировано из GINA 2011 под критерии включения/исключения на основании протокола исследования) [8]

	Объем базисной терапии у пациентов с легкой персистирующей БА (ступень 2 по GINA*)	Объем базисной терапии у пациентов с тяжелой БА (ступень 4 по GINA*)
--	--	--

Окончание таблицы 4

Группы препаратов и рекомендованные дозы	– низкие* дозы ИГКС	– средние** / высокие*** дозы ИГКС в комбинации с ДДБА; – высокие*** дозы ИГКС в комбинации с антагонистами рецепторов лейкотриена (АРЛ); – высокие*** дозы ИГКС в комбинации с препаратами теофиллина; – добавление к одному из вышеперечисленных режимов СКС в низких дозах, АРЛ, препаратов теофиллина, если не назначены ранее
<p><i>Примечания:</i></p> <p>* В пересчете на флутиказона пропионат (HFA) – 100-250 мкг/сутки.</p> <p>** В пересчете на флутиказона пропионат (HFA) – >250-500 мкг/сутки.</p> <p>*** В пересчете на флутиказона пропионат (HFA) – >500 мкг/сутки.</p>		

Критерии включения для пациентов с ХОБЛ:

1. Мужчины и женщины от 40 до 70 лет включительно, имеющие документально подтвержденный клинический диагноз ХОБЛ длительностью как минимум 12 месяцев перед началом исследования;
2. Получение от пациента до участия в исследовании письменного информированного согласия, подписанного с указанием даты;
3. Пациенты, курящие в настоящий момент или бывшие курильщики с индексом курения 10 пачка/лет и более;
4. Пациенты, имеющие по результатам исследования функции внешнего дыхания после стандартного бронходилатационного теста с сальбутамолом значение ОФВ1/ФЖЕЛ < 70% и значение ОФВ1, соответствующее 2-4 степени тяжести согласно GOLD 2011:
 - пациенты с ХОБЛ 2 степени тяжести (среднетяжелое течение) – ОФВ1 = <80-50% от должного,
 - пациенты с ХОБЛ 3 степени тяжести (тяжелое течение) – ОФВ1 = <50-30% от должного,

– пациенты с ХОБЛ 4 степени тяжести (очень тяжелое течение) – ОФВ1 = <30% от должного;

5. Стабильное течение заболевания на момент включения в исследование с отсутствием анамнеза обострений и системной антибиотикотерапии на протяжении 4-х недель и более.

Критерии исключения:

1. Отсутствие информированного согласия;
2. Курение 10 пачка/лет и более (для пациентов с БА);
3. Отсутствие анамнеза курения или индекс курения менее 10 пачка/лет (для больных ХОБЛ);
4. Признаки респираторной инфекции на момент включения больного в исследование;
5. Обострение заболевания (БА или ХОБЛ) на протяжении предшествующих 4-х недель до включения пациента в исследование;
6. Курсы антибактериальной терапии любой длительности в течение последних 4 недель до момента включения;
7. Курсы системной антибиотикотерапии любой длительности, не связанные с бронхолегочной инфекцией, на протяжении 12 месяцев, предшествующих Визиту 1;
8. Женщины в состоянии беременности и лактации;
9. Наличие любого онкологического заболевания;
10. Больные другими клинически значимыми заболеваниями бронхолегочной системы: дефицит α 1-антитрипсина, бронхэктатическая болезнь, буллезная эмфизема легких, саркоидоз органов дыхания, кисты легких, асбестоз, резекция части легкого или трансплантация (по данным анамнеза);
11. Больные с тяжелой сопутствующей патологией в стадии декомпенсации, которые, по мнению исследователя, могут повлиять на результаты исследования;
12. Гельминтная инвазия (в настоящее время);

13. Алкоголизм и наркомания в настоящее время или в прошлом (по данным анамнеза);
14. Психические расстройства, тяжелые поражения органов ЦНС в стадии декомпенсации (по данным анамнеза);
15. Потенциальная опасность от проведения функциональных тестов и инструментального обследования (по мнению врача исследователя);
16. Отказ пациента от участия в исследовании.

2.1.1 Этическая экспертиза

Данное исследование одобрено локальным комитетом по этике ГБОУ ВПО СибГМУ Минздра России г. Томска (№ 1927 от 28.03.2011 г.).

2.1.2 Мероприятия на Визите 1

Во время Визита 1 выполнен сбор следующих данных и проведены следующие процедуры:

1. Оценка соответствия критериям включения/исключения;
2. Подписание пациентом информированного согласия на участие в клиническом исследовании;
3. Сбор демографических данных (пол, возраст);
4. Отношение к курению (курение в настоящий момент, курение в прошлом, стаж курения и количество выкуриваемых сигарет в сутки);
5. Сбор анамнестических данных:
 - продолжительность заболевания (стаж заболевания);
 - регулярная поддерживающая терапия (препараты, дозы, кратность и способ введения);
 - симптоматическая терапия, обусловленная проявлениями БА или ХОБЛ (препараты экстренной помощи, кратность среднесуточного применения в дозах за последние 7 дней);
 - наличие / количество эпизодов обострения БА или ХОБЛ на протяжении предшествующих 12 месяцев;

- наличие / количество случаев госпитализации пациента в стационар в связи с обострением БА или ХОБЛ;
 - наличие / количество эпизодов системной антибиотикотерапии, ассоциированных и неассоциированных с бронхолегочной инфекцией / обострением БА или ХОБЛ, на протяжении предшествующих 12 месяцев;
 - анализ истории назначений антибактериальных препаратов, применяемых пациентом на протяжении предшествующих 12 месяцев;
 - наличие / количество эпизодов терапии системными кортикостероидами, ассоциированных с обострением БА или ХОБЛ, на протяжении предшествующих 12 месяцев;
 - сопутствующая патология и терапия, актуальные в настоящий момент;
 - семейный анамнез наследственной патологии, туберкулеза, онкопатологии и психических заболеваний;
6. Анализ жалоб пациента;
 7. Оценка выраженности одышки и тяжести симптомов по шкале «mMRC»;
 8. Оценка тяжести симптомов (кашель и продукция мокроты) по шкале Ю.Л. Куницыной и Е.И. Шмелева (2003) [15];
 9. Заполнение вопросника АСТ для пациентов с БА;
 10. Объективное обследование;
 11. Оценка параметров ФВД (спирометрия с проведением стандартной пробы на обратимость бронхообструкции);
 12. Тест на определение БГР для подтверждения БА у пациентов с $ОФВ1 > 75\%$, при отсутствии возможности проведения процедуры допускалось использование результатов теста, полученных в течение последних 6 месяцев при условии, что режим базисной терапии с момента обследования не изменялся;
 13. Проведение теста с 6-минутной ходьбой, включающего измерение АД, а также сатурации крови кислородом до и после теста;
 14. Взятие 2-х лабораторных образцов для выделения бактериальной ДНК (мазок с задней стенки глотки) стерильной ватной палочкой;

15. Забор образца кала в стерильный контейнер для выделения бактериальной ДНК;
16. Заполнение соответствующих разделов регистрационной карты.

2.2 Методы исследования

В соответствии с перечнем запланированных мероприятий на визите в данной работе применены следующие методы исследования.

2.2.1 Клинико-anamnestические методы

Для выяснения анамнеза выполнен анализ медицинской документации (выписки о госпитализациях, истории болезни, Ф112), проведено интервьюирование больных (анализ жалоб, информация о течении заболевания, выраженности симптомов, получаемой базисной терапии, истории антибиотикотерапии за предшествующие 12 месяцев, приеме СКС, частоте обострений и ассоциированных с ними госпитализаций, данные о сопутствующей патологии и проводимой по ее поводу терапии).

Сбор данных о сопутствующих заболеваниях и связанной с ними терапии выполнен прежде всего с целью определения соответствия пациента критериям исключения.

Проводилось детальное изучение анамнеза жизни. Особое внимание обращалось на отношение к курению, для каждого пациента с анамнезом курения рассчитан индекс курящего человека (пачка/лет) по формуле:

ИК (пачка/лет)=(количество выкуриваемых сигарет в день ^x стаж курения (годы)) / 20.

Оценка клинических симптомов проводилась в соответствии со шкалой, предложенной Ю.Л. Куницыной и Е.И. Шмелевым (2003) [15] (табл. 5). Выраженность симптомов кодировалась в баллах.

Таблица 5 – Оценка выраженности респираторных симптомов в баллах

Параметры	Баллы			
	1	2	3	4
Кашель	Только утром	Редкие эпизоды (2-3) в течение дня	Частые эпизоды (более 3 раз) в течение дня.	
Количество отделяемой мокроты	Скудное количество, непостоянный симптом	Скудное количество постоянно	Умеренное количество (до 50 мл) в течение дня	Более 50 мл в течение дня

Одышка оценивалась по шкале Medical Research Council Dyspnea Scale (MRC) [139] (табл. 6).

Таблица 6 – Шкала Medical Research Council Dyspnea Scale

Степень одышки	Тяжесть одышки	Описание симптомов
0	Нет	Одышка не беспокоит, за исключением очень интенсивной нагрузки
1	Легкая	Одышка при быстрой ходьбе или при подъеме на небольшое возвышение
2	Средняя	Одышка приводит к более медленной ходьбе по сравнению с другими людьми того же возраста или заставляет делать остановки при ходьбе в своем темпе по ровной поверхности
3	Тяжелая	Одышка заставляет делать остановки при ходьбе на расстояние до 100 метров или через несколько минут ходьбы по ровной поверхности
4	Очень тяжелая	Одышка делает невозможным выходить за пределы дома, возникает при одевании и раздевании

Также у всех пациентов оценивалась среднесуточная потребность в КДБА, рассчитываемая в количестве использованных для купирования симптомов заболевания доз препарата в сутки на протяжении предшествующих 7 дней.

Дополнительно для оценки контроля БА для данной категории больных использован вопросник АСТ. Результаты заполнения вопросника оценены с

использованием следующей градации баллов: менее 20 баллов – неконтролируемое течение; от 20 до 24 баллов – хороший контроль заболевания; 25 баллов – полный контроль; от 20 до 25 баллов – контролируемое течение астмы [4].

2.2.2 Функциональные методы

В соответствии с протоколом исследования выполнена оценка параметров ФВД методом спирометрии, оценка БГР (по показаниям) и стандартный тест с 6-минутной ходьбой.

2.2.2.1 Исследование ФВД методом спирометрии с проведением стандартной бронходилатационной пробы

Исследование ФВД выполнялось по стандартной методике (анализ кривой поток-объем и показателей спирометрии) с использованием спирографа MasterScreen, CareFusion, США в соответствии с рекомендациями Американского Торакального Общества [244].

Показания: оценка выраженности обструктивной и рестриктивной вентиляционной недостаточности.

Условия проведения исследования ФВД:

1. Перед проведением исследования пациент не должен применять:
 - изопреналин, орципреналин, сальбутамол, тербуталин, фенотерол на протяжении не менее 8 часов;
 - ипратропиума бромид, эуфиллин на протяжении не менее 24 часов;
 - сальметерол, формотерол, вилантерол и другие пролонгированные бета-2-агонисты (в том числе и в составе комбинированных препаратов) на протяжении не менее 48 часов;
 - теофиллины медленного высвобождения на протяжении не менее 48 часов;
 - в день исследования требовалось воздержаться от употребления кофе, чая, напитков на основе колы, шоколада.
2. Исследование выполнялось утром до приема любых препаратов;

3. 15 минут перед исследованием пациент должен провести спокойно;
4. Тест не проводился непосредственно после еды;
5. Перед исследованием каждый пациент проходил тщательный инструктаж (акцент на полноте вдоха и выдоха, максимальности усилий при выполнении форсированных маневров, предотвращении утечки воздуха), а процедура демонстрировалась;
6. Проведение процедуры выполнялось в положении пациента сидя;
7. Обязательно использовался носовой зажим;
8. Полученные значения в тесте округлялись до одного или двух знаков после запятой

В ходе исследования анализировались следующие показатели:

- форсированная жизненная емкость легких [ФЖЕЛ],
- объем форсированного выдоха за 1-ю секунду [ОФВ1],
- отношение ОФВ1/ФЖЕЛ.

Оценка спирометрических показателей проводилась по отношению к должным величинам в зависимости от возраста, пола и роста.

Для оценки обратимости бронхиальной обструкции применялась стандартная бронходилатационная проба с ингаляцией β_2 -агониста короткого действия (сальбутамол 400 мкг) с измерением бронходилатационного ответа через 15-30 минут. Оценивалось изменение величины ОФВ1.

2.2.2.2 Исследование БГР

Исследование БГР проводилось с целью верификации диагноза у пациентов с легкой контролируемой бронхиальной астмой.

Степень реактивности дыхательных путей оценивалась с помощью провокационного теста с метахолином при исходных значениях ОФВ1, превышающих 75% от должных величин. Исследование проводилось с использованием спирографа MasterScreen, CareFusion, США и небулайзера APSpro, CareFusion, США. Результаты определялись в виде значения концентрации метахолина, вызывающей 20% падение ОФВ1 у пациента (PC20).

РС20 вычисляли методом линейной интерполяции по общепринятой формуле [70].

Исследование проводилось с целью оценки уровня неспецифической БГР.

Относительные противопоказания: артериальная гипертензия, аневризма аорты, эпилепсия, требующая медикаментозного лечения.

Условия проведения:

– отсутствие признаков инфекции верхних и нижних дыхательных путей в течение не менее 4 недель;

– положительный настрой пациента к проведению теста;

– пациент проинструктирован о прекращении пробы при появлении беспокоящих его симптомов;

– пациент не применял изопреналин, орципреналин, сальбутамол, тербуталин, фенотерол за 8 часов до пробы, ипратропиума бромид – за 24 часа, сальметерол, формотерол – за 48 часов, окситропиум и тиотропиум – за 7 дней, эуфиллин – за 24 часа, теофиллины длительного действия – за 48 часов, пероральные бета-агонисты – за 12 часов, пероральные бета-агонисты длительного действия – за 24 часа, кромогликат натрия – за 8 часов, недокромил натрия – за 48 часов, гидроксозин и цетиризин – за 3 дня, антилейкотриеновые препараты – за 24 часа до исследования. Так же в день исследования пациент воздержался от употребления кофе, чая, напитков на основе колы, шоколада;

– рекомендуемое время проведения пробы – через 10 часов после приема вечерних лекарственных средств, до приема препаратов в утренние часы на голодный желудок или после легкого завтрака;

– не допускалось проведение других бронхопровокационных тестов в течение данных суток;

– обеспечено все необходимое для оказания неотложной помощи: кислород, ингаляционные и внутривенные бронходилататоры.

Необходимое оборудование и препараты: спироанализатор (MasterScreen, CareFusion), APS pro небулайзер (CareFusion), метахолин (в концентрациях 0,0625; 0,25; 1,0; 4,0; 8,0; 16,0 мг/мл), 0,9% раствор хлорида натрия,

высокообъемный спейсер, набор лекарственных средств (сальбутамол, эуфиллин 2,4%).

Перед началом пробы пациент находился в покое в течение 10 минут, после чего производилось трехкратное измерение исходных показателей ФВД (ОФВ1, ПСВ). Регистрировались максимальные значения показателей. Повторно исходные значения ФВД определялись через 15 минут непосредственно перед выполнением нагрузочной пробы.

Корректное проведение пробы с метахолином считалось возможным, если расхождения значений ОФВ1 (ПСВ) между попытками составляли $< 10\%$. При расхождении значений ОФВ1 (ПСВ) более чем на 10% (от большего значения к меньшему), результаты считались недостоверными. В этом случае повторялась регистрация исходных показателей ФВД еще через 15 минут. В случае расхождения результатов между сериями измерений ФВД $> 10\%$ проба прекращалась и переносилась на следующий день.

Техника выполнения пробы:

Ингаляция аэрозоля проводилась через APS pro небулайзер (5 глубоких спокойных вдохов продолжительностью 0,6 секунды). Вначале ингалировался чистый растворитель (0,9% раствор хлорида натрия), затем раствор метахолина (через другую насадку небулайзера) в возрастающих концентрациях: 0,0625 мг/мл, 0,25 мг/мл, 1 мг/мл, 4 мг/мл, 8 мг/мл, 16 мг/мл.

Показатели ФВД (ОФВ1 и ПСВ) определялись не ранее чем через 30 секунд после ингаляции аэрозоля и не позднее чем через 1,5 минуты рассчитывались в процентах по отношению к исходному значению, измеренному непосредственно перед началом пробы.

Тест начинался с ингаляции 0,9% раствора хлорида натрия. При снижении ОФВ1 (ПСВ) $< 20\%$ переходили на ингаляцию метахолина в концентрации 0,0625 мг/мл и т.д.

Прекращение теста происходило при снижении значения ОФВ1 (ПСВ) на 20% от исходного и более или по достижении концентрации метахолина 16 мг/мл.

Концентрация метахолина, приведшая к 20% снижению ОФВ₁, рассматривалась как бронхопровоцирующая – РС20. Значение РС20 регистрировалось.

Приготовленные рабочие разведения не хранились. Для проведения теста следующему пациенту выполнялось приготовление новых рабочих разведений.

После достижения бронхопровоцирующей концентрации метахолина (РС20) всем пациентам назначался КДБА (сальбутамол 4 дозы через спейсер). При неэффективности 4 доз сальбутамола (через спейсер) в течение 30 минут врач назначал целесообразную ситуации терапию. если бронхопровоцирующая концентрация метахолина не достигнута (РС20>16 мг/мл), то КДБА назначается пациенту по окончании пробы.

Пациент мог покинуть лечебное учреждение, если значение ОФВ₁ (ПСВ) достигло 90% от исходных значений. Всем пациентам давались инструкции на случай появления бронхоспазма в течение ближайших суток. Все тесты выполнялись в соответствии с требованиями ATS [244].

2.2.2.3 Тест 6-минутной ходьбы (6MWD — 6 min walking distance)

Тест с 6-минутной ходьбой выполнялся всем пациентам в соответствии со стандартным протоколом [130].

Пациенты инструктировались о целях теста. Им предлагалось ходить по измеренному коридору в собственном темпе, стараясь пройти максимальное расстояние в течение 6 минут. При этом пациентам разрешалось останавливаться и отдыхать во время теста, однако они должны были возобновить ходьбу, когда сочтут это возможным.

Перед началом и в конце теста оценивались сатурация крови кислородом, частота дыхания и пульс. Пациенты могли прекратить ходьбу при возникновении таких симптомов, как тяжелая одышка, боль в грудной клетке, головокружение, боль в ногах и при снижении сатурации крови кислородом до 86%.

Пройденный за 6 минут путь рассчитывался в метрах и обозначался как пройденная дистанция (D).

2.2.3 Статистический анализ клинико-функциональных данных

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.

2.2.4 Сбор орофарингеальных мазков и молекулярно-генетические методы исследования таксономического состава орофарингеальной микробиоты

Для реализации цели данной работы в соответствии с утвержденным протоколом клинического исследования всем пациентам с ХОБЛ и больным БА выполнено взятие биоматериала из ротоглотки с дальнейшим выделением бактериальной ДНК и молекулярно-генетической идентификацией орофарингеальной микробиоты.

2.2.4.1 Методика сбора орофарингеальных мазков для выделения бактериальной ДНК

Сбор орофарингеальных мазков осуществлялся согласно следующей методике.

Необходимое оборудование: стерильная палочка с ватным тампоном на конце в стерильной пробирке (в количестве 2-х штук), стерильные ножницы.

Техника проведения:

1. Приготовить 1 стерильную пробирку, содержащую ватную палочку для орофарингеального мазка.

2. Попросить пациента сесть на стул и слегка наклонить голову назад, широко открыть рот и высунуть язык вперед.

3. Открыть пробирку и осторожно извлечь палочку с ватным наконечником.

4. Не прикасаясь к посторонним поверхностям (включая язык пациента и другие органы ротовой полости), сразу после извлечения из пробирки провести несколько раз по поверхности задней стенки глотки в проекции орофарингса, слегка надавливая и вращая тампон без повреждения слизистой.

5. Незамедлительно поместить ватный тампон обратно в пробирку или в пробирку Аппендорфа на 2мл, предварительно отрезав палочку стерильными ножницами.

6. Плотно закрыть пробирку, приклеить наклейку с данными пациента (номер карты), датой взятия мазка и количеством образцов биоматериала, взятых у данного пациента.

7. Непродолжительное время (до 1 часа) образцы хранить при температуре от $+4^{\circ}\text{C}$ до -20°C . В дальнейшем все образцы до выделения ДНК хранить при оптимальной температуре -80°C .

Транспортировка образцов осуществлялась с использованием сухого льда.

Экстракция ДНК проводилась не позднее 3-х месяцев после забора биоматериала.

2.2.4.2 Экстракция ДНК из орофарингеальных мазков

Выделение ДНК из орофарингеляльного мазка проводилось на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России под руководством доктора медицинских наук Сазонова А.Э.

Условия проведения экстракции ДНК:

– температура воздуха: от 21 до 25 °C;

– относительная влажность: от 45 до 80 %.

Выделение ДНК выполнено с использованием наборов FastDNA® SPIN Kit for Soil (MPBIO, США). Протокол выделения был оптимизирован сотрудниками National Heart and Lung Institute (Лондон, Великобритания, руководитель – профессор Куксон В.О.) для повышения выхода ДНК.

Материально-техническое оснащение:

1. Микроцентрифуга MiniSpin (Eppendorf);
2. Автоматические дозаторы (Eppendorf);
3. Термостат «Гном» (ДНК-технологии, Россия);
4. Шейкер Bio RS-24 (BioSan);
5. Морозильная камера (условия хранения при -20°C).

Процедура экстракции ДНК выполнялась в несколько последовательных этапов.

Перед проведением экстракции замороженные образцы мазка со слизистой ротоглотки, хранившиеся при температуре -80°C , инкубировались при комнатной температуре в течение 30 минут.

Далее ватный тампон, содержащий пробу, аккуратно извлекался из пробирки, срезался стерильными ножницами и помещался в пробирку Lysing Matrix E (компонент набора). В пробирку последовательно добавлялось 300 мкл стерильного ТЕ-буфера, 978 мкл фосфатно-солевого буфера и затем 122 мкл МТ буфера (компоненты набора).

После этого пробирка помещалась в ротор встряхивателя (шейкер Bio RS-24, BioSan) и встряхивалась два раза при 6000×30 секунд.

После встряхивания пробирка центрифугировалась при 14 тыс. g 15 минут (микроцентрифуга MiniSpin, Eppendorf).

Полученный супернатант переносился в чистую 2 мкл микроцентрифужную пробирку, в которую добавлялось 250 мкл буфера PPS (часть набора). Пробирка подвергалась встряхиванию вручную 10 раз для перемешивания.

Затем пробирка центрифугировалась 5 минут при 14 тыс. g. Супернатант переносили в чистую 15 мл пробирку, в которую добавляли 1 мл ресуспензированного Binding Matrix (компонент набора).

Вручную или с помощью ротатора пробирку переворачивали в течение 2 минут и помещали на подставку на 3 минуты, чтобы осел силикатный связывающий материал.

Далее 500 мкл супернатанта аккуратно убирали из пробирки и выбрасывали. Оставшийся супернатант перемешивался с Binding Matrix. 800 мкл полученной смеси переносили на SPIN фильтр (компонент набора) и центрифугировали при 14 тыс. g в 1 минуту. Процедура повторялась два раза.

На фильтр добавляли 500 мкл SEWS-M (компонент набора) и осторожно проводили ресуспензирование и последующее центрифугирование в течение 1 минуты при 14 тыс. g.

Приемную пробирку выбрасывали и заменяли на новую. После этого, чтобы высушить силиконовую матрицу от остатков промывочного буфера, без добавления жидкости проводилось центрифугирование в течение 2 минут при 14 тыс. g.

Приемную пробирку снова выбрасывали и заменяли на новую. Фильтр подвергался высушиванию в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего аккуратно ресуспензировался Binding Matrix (не касаясь фильтра) в 100 мкл воды, не содержащей ДНКазу и пирогены.

Фильтр с приемной пробиркой центрифугировался 1 минуту при 14 тыс. g. Фильтр выбрасывался, а в пробирке оставалась ДНК, пригодная для проведения ПЦР и других процедур. Данную пробирку хранили при -20°C до использования.

2.2.4.3 Подготовка библиотек и секвенирование бактериальных генов 16S рРНК

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, на лабораторной базе ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» ФМБА

России под руководством доктора биологических наук, профессора Говоруна В.М.

Образцы ДНК разводили в 500 раз. Первый раунд амплификации переменных участков V3-V4 гена 16S рРНК осуществляли с использованием специфических праймеров: А (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG) и Б (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC) по программе амплификации (амплификатор DNA Engine Tetrad® 2, Bio Rad):

- 1) 95°C 3 минуты;
- 2) 25 циклов:
 - при температуре 95°C 30 секунд,
 - при температуре 55°C 30 секунд,
 - при температуре 72°C 30 секунд;
- 3) 72°C 5 минут;
- 4) охлаждение 4°C.

Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием бусин Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) в соответствии с протоколом.

Второй раунд амплификации для двойного индексирования образцов осуществляли с использованием комбинации специфических праймеров, позволяющих при всех возможных комбинациях пуллировать одновременно до 96 образцов. Программа амплификации (амплификатор DNA Engine Tetrad® 2, Bio Rad):

- 1) 95°C 3 минуты;
- 2) 8 циклов:
 - при температуре 95°C 30 секунд,
 - при температуре 55°C 30 секунд,
 - при температуре 72°C 30 секунд;
- 3) 72°C 5 минут;
- 4) Охлаждение 4°C.

Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием бусин Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) в соответствии с протоколом.

Концентрацию полученных библиотек 16S в растворе определяли с помощью флуориметра Qubit® (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. Очищенные ампликоны смешивали эквимольно в соответствии с полученными концентрациями. Качество приготовленной для секвенса библиотеки оценивали на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent) с использованием набора Agilent DNA 1000 Kit.

Дальнейшая подготовка образца к секвенированию и секвенирование пулированного образца осуществляли с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов) и прибора MiSeq (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя.

2.2.4.4 Биоинформатическая обработка данных анализа таксономического состава орофарингеальной микробиоты

Фильтрация ридов по качеству и таксономическая классификация проводились с использованием встроенного программного комплекса QIIME [225]. 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 (с англ. operational taxonomic units, OTU). Использование специальных программ выдача классификатора приведена к виду матрицы образцов и OTU с описанной филогенией последних.

Весь статистический анализ выполнен на языке программирования R, версия 3.1.0.

Для нахождения таксономических различий между бинарно разделенными группами образцов по различным критериям (ХОБЛ-БА, тяжелая БА-легкая БА, и т.д.) на уровне операционных таксономических единиц (OTU, operational taxonomic unit) использован чувствительный метод, основанный на линейном

регрессионном анализе и скорректированный под метагеномные данные, реализованный на статистическом языке R в пакете *metagenomeSeq* [215].

Для улавливания значимых трендов в изменении микробиоты на уровне родов и отделов под влиянием тех или иных факторов (особенности терапии, выраженность симптомов и т.д.) использована обобщенная линейная модель, позволяющая анализировать непрерывные регрессоры – *generalised linear model*, GLM [209] в ее реализации на программном языке R версии 3.1.0, пакет *glm2* [196]. Этот метод позволяет выявлять нелинейные взаимосвязи между данными, с распределением отличным от нормального. Модель применена в предположении Пуассоновского распределения величин. Результатом анализа с помощью данного метода является определение набора значений параметра оценки (англ. *Estimate*), отражающего влияние изменения регрессора – предикторной переменной (в данном случае клиничко-anamнестические факторы) на зависимую переменную (представленность той или иной операционной таксономической единицы) в логарифмическом масштабе. Рассчитываемый при этом коэффициент наклона прямой (КНП), определяющий направление и степень зависимости, является значением из выдачи команды *glm* в поле "*Estimate*" [196]. В физическом понимании, если провести прямую аппроксимации тренда зависимости исследуемых величин, то данный коэффициент определяет степень наклона данной прямой относительно горизонтальной оси.

2.2.5 Методы видовой идентификации и анализа генетических маркеров лекарственной устойчивости орофарингеальных стрептококков

Биоматериал, полученный методом орофарингеального мазка, выполненного стерильной палочкой с ватным тампоном на конце, использован для экстракции ДНК с помощью набора *FastDNA® SPIN Kit for Soil* (MPBIO, США).

Видовая идентификация и анализ генетических детерминант антибактериальной устойчивости 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.

Данный набор реализует принцип мультиплексной ПЦР в реальном времени, позволяя одновременно проводить четыре измерения в одной пробирке, регистрируя флуоресцентный сигнал от разных флуорофоров – FAM, HEX, ROX и Cy5 (рис. 2а, 2б).

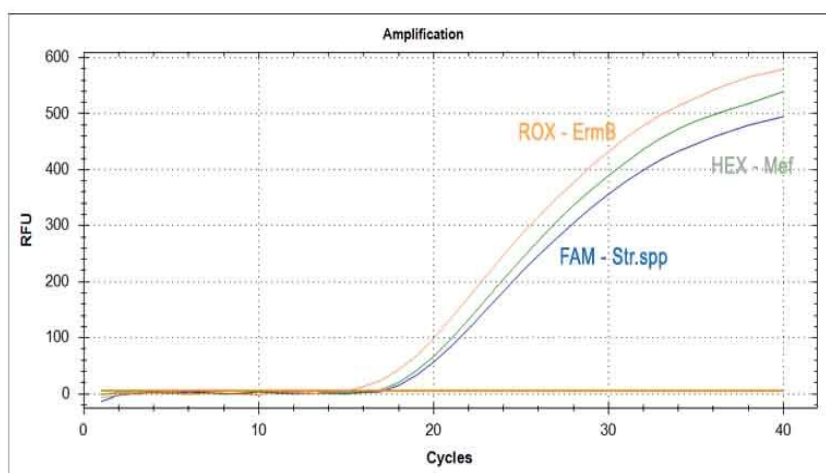


Рисунок 2а – Пример регистрации флуоресцентного сигнала при анализе набором «Стрептопол+» образца ДНК, контаминированного *S. pneumoniae*, несущим детерминанты резистентности *mef* и *ermB*

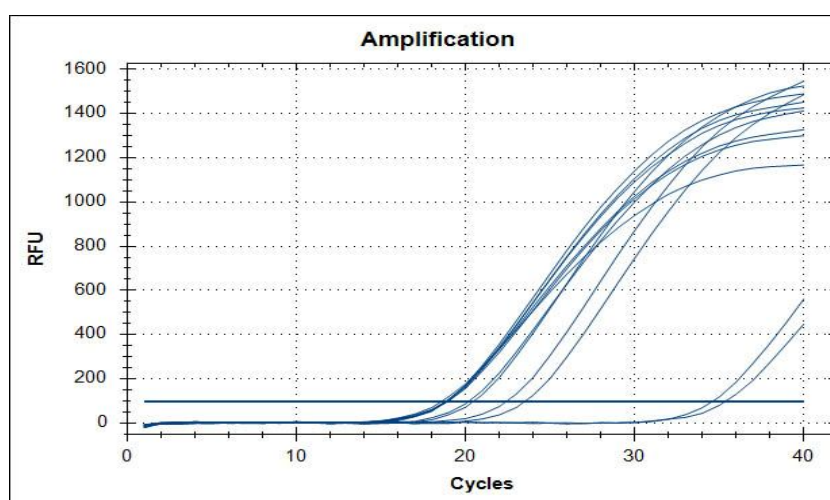


Рисунок 2б – Пример регистрации флуоресцентного сигнала при анализе набором «Стрептопол+» образцов ДНК инкапсулированного *S. pneumoniae* и бескапсульного пневмококка

Диагностическая тест-система «Стрептопол+» включает в себя два триплексных набора:

1. *Streptococcus spp.* (FAM)/*S. pyogenus* (HEX)/*S. agalacticae* (ROX)
2. *S. pneumoniae* (FAM)/ *Mef*(HEX)/*Erm*(ROX)

В каждом тестируемом образце амплифицируется внутренний контроль (детектируемый по каналу Cy5), что свидетельствует об адекватности проведенных процедур пробоподготовки и отсутствии ингибирования ПЦР.

Постановку ПЦР и интерпретацию полученных данных проводили с использованием прибора CFX-96 (BioRad, США) по программе:

1. При температуре 94⁰С - 1,5 минуты;
2. 40 циклов:
 - при температуре 95⁰С - 10 секунд (денатурация),
 - при температуре 64⁰С - 11 секунд (отжиг праймеров),
 - при температуре 72⁰С - 20 секунд (элонгация).

На стадии элонгации выполнялся отжиг зонда и высвобождение метки с последующей ее регистрацией на флуоресцентном детекторе. При этом детекция продуктов прибором осуществлялась автоматически в каждом цикле амплификации.

На основании полученных данных управляющая программа выстраивала кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналу.

Все образцы, цикл выхода которых был ниже 35, считались отрицательными. По завершении всех действий программой автоматически рассчитывались точки пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала для каждого образца с пороговой линией, что позволяло получить представление о наличии или отсутствии ДНК в исследуемых образцах.

Параметры диагностической специфичности (Sp) и чувствительности (Sn) рассчитывали согласно следующим формулам: $Sp=(Tn/(Tn+Fp))*100\%$, $Sn=(Tp/(Tp+Fn))*100\%$, где Tp - истинно-положительный результат, Tn - истинно-

отрицательный результат, F_p – ложноположительный результат, F_n – ложноотрицательный результат.

С целью анализа ассоциации выявляемости стрептококков с клиническими признаками рассчитывалась безразмерная величина (ΔSt), 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 Спирмену. Косвенно, величина, обратная значению цикла выхода, отражает степень представленности анализируемых генетических детерминант устойчивости.

2.2.6 Сбор образцов кала и молекулярно-генетические методы исследования таксономического состава кишечной микробиоты

Для реализации цели данной работы в соответствии с утвержденным протоколом клинического исследования всем пациентам с ХОБЛ и больным БА выполнен сбор образцов кала с дальнейшим выделением бактериальной ДНК и молекулярно-генетической идентификацией таксономического состава кишечной микробиоты.

2.2.6.1 Методика сбора кала для выделения бактериальной ДНК

Сбор биоматериала для молекулярно-генетического исследования состава кишечной микробиоты осуществлялся в соответствии с методикой сбора кала для проведения бактериологического исследования.

Все потенциальные кандидаты на участие в исследовании до посещения клиники получили одноразовый стерильный контейнер и прошли тщательный инструктаж по сбору кала в соответствии со следующей методикой:

1. Всем обследуемым пациентам за 1-3 дня до взятия пробы рекомендовано находиться на диете, исключая приём продуктов, усиливающих процессы брожения в кишечнике и молочно-кислые продукты, также алкоголь, антибиотики и бактериальные препараты (содержащие бифидобактерии, лактобактерии, кишечные палочки и т.д.).

2. Пациентам было разъяснено, что материалом служит кал после естественной дефекации, который необходимо собрать в стерильный одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой и ложечкой утром в день посещения клиники.

3. Пациентам даны строгие рекомендации не собирать кал из унитаза. Пациентам рекомендовано собрать кал с чистой поверхности, в качестве которой может быть использован чистый новый лист из полиэтилена или бумаги (этот способ является предпочтительным).

4. При использовании судна, даны рекомендации его предварительно хорошо промыть с мылом и губкой, ополоснуть многократно водопроводной водой, а потом обдать кипятком и остудить до комнатной температуры.

5. Рекомендовано взять кал преимущественно из средней порции специальной ложечкой, вмонтированной в крышку стерильного контейнера, в количестве не более 1/3 от объема контейнера, после чего необходимо тщательно закрыть крышку.

6. Пациенту напомнено, что до посещения клиники контейнер следует поместить в холодильник и возможно непродолжительное хранение при температуре от +4⁰С до -20⁰С.

2.2.6.2 Экстракция ДНК из образцов кала

Выделение ДНК из образцов кала проводилось на лабораторной базе ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» ФМБА России.

Образцы, хранящиеся при температуре -20⁰С, помещались в контейнер со льдом для разморозки в течение 30 минут. Стерильным шпателем отбирали

навеску образца массой 150 мг и помещали в пластиковые пробирки с закручивающимися крышками объемом 2 мл (SARSTEDT, Германия). Взвешивание образца осуществлялось с точностью до второго знака после запятой.

К навеске образца добавлялась смесь бусин ZIRCONIA/SILICA диаметром 0,1 мм (BioSpec, США) в количестве 300 мг и бусин ZIRCONIA/SILICA диаметром 0,5 мм (BioSpec, США) в количестве 100 мг с 1,2 мл лизирующего буфера (500 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 4% SDS). Непосредственно перед добавлением лизирующий буфер прогревали в течение 10 минут при 37°C в водяной бане. После добавления лизирующего буфера крышки пробирок плотно закручивали и пробирки вортиксовались до перехода содержимого в гомогенное состояние.

Далее образцы гомогенизировались с помощью механического гомогенизатора типа BeadBeater (Mini BeadBeater 16, BioSpec, США) в течение 3 минут в режиме максимальной интенсивности встряхивания. Полученные образцы инкубировали при 70°C в течение 15 минут, периодически перемешивая содержимое на вортексе, после чего центрифугировали при 14000 об/мин в течение 20 минут.

Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и хранили во льду, к осадку добавляли теплый лизирующий раствор в количестве 1200 мкл, после чего повторяли процедуру гомогенизации с использованием Mini BeadBeater 16.

Полученные фракции надосадочной жидкости объединялись, ДНК осаждали добавлением 2-х объемов этилового спирта и 1/10 объема 3M ацетата натрия в течение 1 часа при -20°C. Образцы центрифугировали при 14000 оборотов/мин в течение 20 минут, после чего отбрасывали надосадочную жидкость, осадок промывали в 1000 мкл 80% этилового спирта, подсушивали при комнатной температуре в течение 30 минут и суспендировали в 400 мкл TE-буфера.

Растворенные образцы ДНК дополнительно центрифугировались при 14000 оборотов/мин в течение 15 минут, надосадочную жидкость переносили в чистую

пробирку, добавляли 1 мкл раствора РНКазы А (5 мг/мл) и инкубировали при 37 градусах в течение 1 часа.

Полученные образцы ДНК замораживались и хранились при -20° . Количество ДНК измерялось с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США).

Качество ДНК оценивали посредством гель-электрофореза в 1% агарозном геле с окраской этидием бромидом. Для этого в лунки геля вносили 6 мкл образца в смеси с 6X буфером для нанесения образцов, содержащего лидирующий краситель бром-феноловый синий (5 мкл образца ДНК и 1 мкл 6X буфера). Гель-электрофорез проводили при напряженности электрического поля 5 В/см. Критерием качества выделяемого образца являлась сохранность ДНК в области высоких диапазонов масс (свыше 10000 пар нуклеотидов относительно маркера GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Литва).

2.2.6.3 Полногеномное (shotgun) метагеномное секвенирование с последующей идентификацией таксономического состава кишечной микробиоты

Для всех образцов кала после выделения тотальной ДНК и подготовки библиотек для секвенирования выполнено 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 подвергались стандартной фильтрации по качеству. Риды со средним значением баллов качества $QV < 15$ были отброшены. С целью минимизации ошибок секвенирования, оставшиеся риды были обработаны программой SAET (SOLiD Accuracy Enhancement Tool). Далее риды подверглись обрезанию по качеству: все позиции начиная с 5' были удалены вплоть до первой высококачественной позиции ($QV \geq 30$). Все риды, чья длина после фильтраций стала меньше 30 нуклеотидов, были удалены.

С целью фильтрации от возможного попадания человеческого генома, риды картировались на геном человека версии. Каждый рид картировался без допущения вставки или делеции, с максимальным количеством несовпадений, равным 3. В том случае, если рид мог картироваться в 2 и более мест, референс выбирался случайно и равновероятно. Некартировавшиеся риды поступили в дальнейший анализ.

Бактериальный состав метагеномных образцов определяли в результате картирования нуклеотидных прочтений на избыточный референсный каталог из репрезентативных геномов микроорганизмов, встречающихся в кишечнике человека. В качестве источников для составления каталога геномов использовались база проекта Human Microbiome Project и NCBI, а также другие общедоступные источники.

Для каждого выравненного набора ридов на референс была извлечена информация из файлов формата BAM о двух видах покрытия с использованием программного пакета BEDtools: суммарная длина ридов, картировавшихся на референс (покрытие в глубину) и суммарная длина позиций референса, оказавшейся покрытой (покрытие в ширину). Покрытие в ширину было использовано, как порог детектирования референса в метагеноме, по крайней мере 1% генома должен быть покрыт, чтобы признать его наличие. Покрытие каждого генома было нормализовано на общую длину картировавшихся ридов и его длину для получения его относительной представленности (рис. 3).

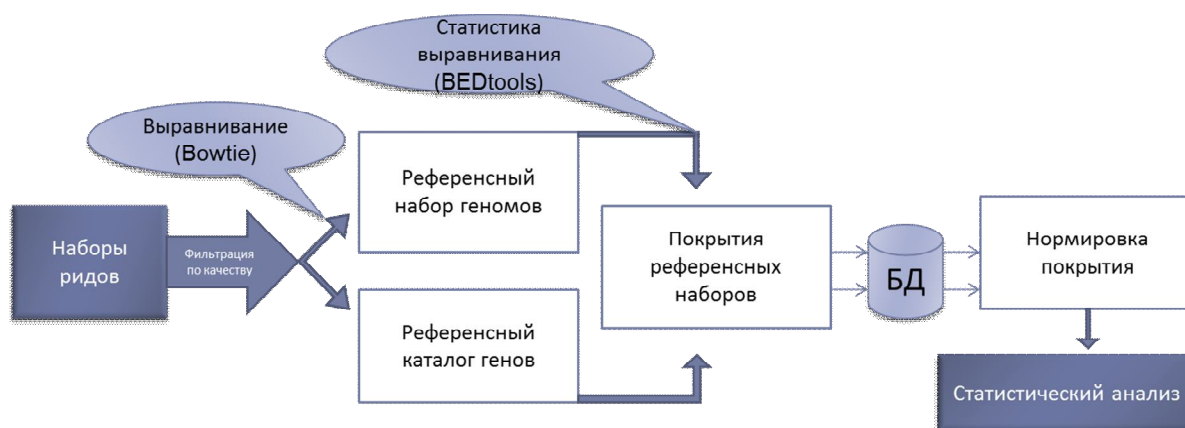


Рисунок 3 – Алгоритм поточной обработки метагеномных данных

2.2.6.4 Биоинформатическая обработка данных анализа таксономического состава кишечной микробиоты

Статистический анализ проводился на языке программирования R 3.1.0. Для подсчета матрицы расстояний между образцами использовано расстояние Брэй-Кертис. Поиск признаков, по которым различаются группы образцов, проводился тестом Манна-Уитни. Поправка на множественные сравнения производилась с помощью FDR (англ. False Discovery Rate).

Для поиска различающихся низкопредставленных таксонов была использована библиотека `metagenomeSeq` для языка программирования R.

Для выявления взаимосвязи между таксономическим составом метагеномов и их метаданными использована обобщенная линейная модель (Generalised Linear Model, GLM) [209] в ее реализации на программном языке R версии 3.1.0, пакет `glm2` [196]. Этот метод позволяет выявлять нелинейные взаимосвязи между данными с распределением, отличным от нормального. В качестве предикторных переменных использованы данные о диагнозе доноров образцов (как категориальные предикторные переменные), а также сведения о терапии, в том числе частота антибиотикотерапии, курсов СКС, и т.д. (как непрерывные предикторные переменные). В качестве ответных переменных использованы проценты представленности бактериальных видов или родов. Модель применена в предположении Пуассоновского распределения величин. Результатом анализа с помощью данного метода 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". В физическом понимании, если провести прямую аппроксимации тренда зависимости исследуемых величин, то данный коэффициент определяет степень наклона данной прямой относительно горизонтальной оси.

2.2.7 Методы анализа 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 антибиотикорезистентности двумя методами и по двум референсным базам данных соответственно.

В первом методе в качестве референсной базы использованы аминокислотные последовательности белков – предполагаемых продуктов трансляции генов антибиотикорезистентности, представленные в базе данных Antibiotic Resistance Database – ARDB [191]. После отбрасывания последовательностей, которые сами по себе не являются детерминантами резистентности, а становятся таковыми лишь вследствие точечных мутаций, база составила 7461 последовательность аминокислот, определяющих устойчивость к 83 антибиотикам и их семействам. Классификация генов включает в себя 378 классов, объединенных в 86 надклассов. Цветовые риды SOLiD переводились в нуклеотидный формат и выравнивались на референсную базу с помощью быстрого параллельного алгоритма RAPSearch [277]. За критерий успешного выравнивания рида на референсную последовательность было принято 80% тождество транслированной аминокислотной последовательности рида с аминокислотной последовательностью референсного белка в более чем 16 аминокислотных позициях. Для дальнейшего анализа сохранялась нормализованная величина – относительная представленность соответствующей последовательности, равная отношению числа ридов, отобразившихся на него, к общему числу ридов от данного метагенома. При сравнении относительных значений для каждого метагенома производилась нормировка данных путем деления на общее число его ридов, картировавшихся на каталог генов.

Во втором методе в качестве референсной базы использованы нуклеотидные последовательности генов, входящих в базу The Comprehensive Antibiotic Resistance Database – CARD [254]. Для количественно определения присутствия

генов лекарственной устойчивости в метагеноме проведено картирование метагеномных ридов на неизбыточный референсный каталог, включающий 353 генома кишечных бактерий. В геномах, входящих в каталог, идентифицированы открытые рамки считывания генов с проведением последующей аннотации полученных генов при помощи программы PROKKA 1.9. Среди полученных генов выполнен поиск потенциальных генов лекарственной устойчивости путем выравнивания их последовательностей на нуклеотидные последовательности генов, входящих в базу CARD с помощью алгоритма BLASTn. Критериями сходства являлись: процент сходства не менее 85%, отношение длины выравнивания к длине последовательности не менее 0,75, длина последовательности не менее 150 п.н. База включала 2361 последовательность генов, определяющих устойчивость к 22 семействам антибиотиков. В случае, если один и тот же ген из каталога геномов имел несколько схожих последовательностей в CARD, ген приписывался к гомологу, обладающим наибольшим сходством. Для каждого из исследуемых метагеномов определен уровень относительной представленности генов AP. Для этого суммарная длина ридов, покрывающих ген, умножалась на 10^9 , а затем полученное значение делилось на длину гена и суммарную длину ридов, покрывающих все геномы. Значения относительной представленности для группы генов AP определялись как сумма значений относительной представленности входящих в группу генов.

Дополнительно качественная детекция присутствия генов антибиотикорезистентности в образцах произведена для выборочных генов с помощью ПЦР реального времени анализа по специфичным праймерам в НПФ «Литех». Более подробная информация представлена в таблице (табл. 7), где для каждого гена указано число бактериальных нуклеотидных последовательностей, которые были использованы для подбора праймеров к данному гену.

Таблица 7 – Генетические детерминанты резистентности, тестируемые ПЦР в метагеномных образцах

Гены	Микроорганизмы	Биологический эффект	Праймеры	Длина ампликона
<i>bla_{TEM}</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Резистентность к пенициллинам и ранним цефалоспорином	TEMfor 5'сacccagaaacgctggtga3'; TEMrev 5'ccgggaagctagagtaagtagt3'.	540 b.p.
<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Acinetobacter spp.</i>	Резистентность к пенициллинам и цефалоспорином 1, 2, 3 поколений	CTXfor 5'ccagtaaagttatggcggc3'; CTXrev1 5'cggtttatcccccaaac3'; CTXrev2 5'cggcttatcacccacagt3'.	495 b.p.
<i>bla_{VIM}</i> <i>bla_{NDM}</i> <i>bla_{KPC}</i> <i>bla_{OXA-48}</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Acinetobacter spp.</i>	Резистентность ко всем бета-лактамам, антибиотикам, карбапенемам	NDMfor 5'agccgctgcattgatgctga3'; NDMrev 5'cggaatggctcatcacgat3';	700 b.p.
			VIMfor 5'tcgcaagtcggttagccattc3'; VIMrev 5'cccgggaatgacgacctct3';	660 b.p.

Окончание таблицы 7

			KPCfor 5'tcgaacaggactttg gcggt3'; KPCrev 5'cctcgctgtgcttgc atcctt 3';	720 b.p.
			OXAfor 5'ggcgaaccaagca ttttac3'; OXArev 5'ggcgcagccctaaa ccatc3'.	570 b.p.
<i>mecA</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	Резистентность ко всем бета- лактамным антибиотикам	MecAfor 5'ttatattcctaaaagcg ataatggt3'; MecArev 5'cctatctcatatgctgt tcctgt3'.	370 b.p.
<i>vanA</i> <i>vanB</i>	<i>Enterococcus faecalis,</i> <i>Enterococcus faecium.</i>	Резистентность к гликопептидам	Vanfor 5'cctatgtgggctgtg atattcaaac3'; VanArev 5'gccaacagctaacg cggcac3'; VanBrev 5'cctctgcatccaagc accg3'.	335 b.p. 500 b.p.
<i>ermB</i>	<i>Streptococcus spp.,</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	Резистентность к линказомидам, макролидам, стрептограмину В	ErmBfor 5'acaacagaggtata aaattgtggg3'; ErmBrev 5'ttactttggcgtgttc attgct3'.	390 b.p.
<i>mef</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	Резистентность к макролидам, стрептограмину В	Meffor 5'tgggtgctgtgattg catctatta3'; Mefrev 5'tttctctgaaaaag agctgttg3'.	490 b.p.

С целью сравнения результатов профилирования резистома между метагеномным и ПЦР подходами с помощью алгоритма BLASTX произведен поиск последовательностей генов, использованных для подбора ПЦР праймеров в базе ARDB. Критерий совпадения – более 80% сходства и $e\text{-value} < 0,001$). Для каждого метагенома, число отобразившихся ридов суммировалось по всем последовательностям каждого гена, приводилось к бинарному виду (нулевое число ридов – ген присутствует, ненулевое – отсутствует) и сравнивалось с результатами детекции по ПЦР.

Глава 3. Характеристика изучаемой популяции и результаты клинко-функциональных исследований

Целью данной работы является установление состава 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.

В соответствии с поставленной целью размер выборки является достаточным для достижения цели исследования и соотносится с данными мировых исследований [122, 251].

В соответствии с единым протоколом в исследование включены:

- 52 пациента с БА (24 пациента с легкой персистирующей контролируемой и частично контролируемой БА и 28 больных тяжелой неконтролируемой БА);
- 97 больных ХОБЛ (64 пациента с ХОБЛ 2 степени (средней степени) тяжести и 33 больных ХОБЛ 3-4 степени тяжести (тяжелого и очень тяжелого течения).

Сформированные группы сопоставимы по возрасту и неоднородны по гендерному признаку (табл. 8).

Таблица 8 – 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; $p < 0,0001$).

3.1 Исходная клинико-anamnestическая характеристика изучаемой популяции больных БА

В ходе исследования выполнен статистический анализ исходных данных для группы больных БА, включающей 52 пациента, средний возраст которых составил $56,61 \pm 7,26$ лет.

В соответствии с выбранными критериями в исследование включены пациенты с легкой контролируемой и частично контролируемой БА (Группа 1А) и больные тяжелой неконтролируемой БА (Группа 1В), данные по гендерным и возрастным характеристикам которых представлены в таблице (табл. 9).

Таблица 9 – Распределение пациентов с БА по полу и возрасту

Группы больных БА	Женщины		Мужчины		Средний возраст, лет*
	Абс.	%	Абс.	%	
Группа 1А (n=24)	19	79,17	5	20,83	$57,08 \pm 8,4$
Группа 1В (n=28)	19	67,86	9	32,14	$56,21 \pm 6,27$

*Примечание – * Различия по возрасту между пациентами с легкой и тяжелой БА не достоверны ($p > 0,05$)*

Среди пациентов с легкой формой БА, как и в общей группе больных астмой, преобладали женщины (OR 3,8; 95% CI 1,09-13,96; $p < 0,017$); в группе больных тяжелой неконтролируемой БА также включено больше женщин, чем мужчин, однако данные различия по отношению шансов не являлись статистически значимыми (OR 2,11; 95% CI 0,74-6,11; $p < 0,12$).

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) составило 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 НФА составляет 250-500 мкг/сутки или более 500 мкг/сутки соответственно).

3.1.1 Сравнительный анализ клинико-anamнестических данных пациентов с легкой персистирующей контролируемой / частично контролируемой БА и больных тяжелой неконтролируемой астмой

В соответствии с поставленной целью в исследование включены пациенты с различной степенью тяжести 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. Так, пациенты с легкой контролируемой/частично контролируемой астмой отличались от группы пациентов с БА тяжелого неконтролируемого течения менее выраженными симптомами заболевания (кашель, одышка, отделение мокроты), меньшей среднесуточной потребностью в КДБА, частотой обострений и госпитализаций за предшествующие 12 месяцев (табл. 10).

Пациенты с легкой формой заболевания достоверно реже на протяжении предшествующего года прибегали к использованию СКС, демонстрировали лучшую переносимость физической нагрузки в тесте с 6-минутной ходьбой, более высокие показатели сатурации кислорода до и после ходьбы. Различия, соответствующие уровню достигнутого контроля, выявлены по результатам заполнения вопросника АСТ (табл. 10).

Пациенты с тяжелой неконтролируемой БА характеризовались сниженными значениями ФВД (ОФВ1 и ФЖЕЛ) до и после бронходилатации (табл. 10).

Таблица 10 – Данные анамнеза и клинико-функциональная характеристика больных БА

Показатель	БА (Группа 1), n=52	БА легкая (Группа 1А), n=24	БА тяжелая (Группа 1В), n=28	P _{1А-1В}
------------	---------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	--------------------

Окончание таблицы 10

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
SatO ₂ до ходьбы, %	96,35±1,02	96,91±0,42	95,9±1,13	0,0002
SatO ₂ после ходьбы, %	96,23±1,27	96,8±0,29	95,68±1,49	0,0003
ОФВ ₁ до теста*, %	73,14±18,4	84,06±15,28	53,84±11,71	0,000032
ОФВ ₁ 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	-	-
<i>Примечание – * Стандартный бронходилатационный тест с сальбутамолом (400 мкг)</i>				

Следует отметить отсутствие различий между группами больных БА в частоте курсовой АБТ на протяжении предшествующего года и значениях индекса курения, что подчеркивает однородность сравниваемых групп и соответствие выполненного отбора критериям включения/исключения (табл. 10).

Для всех пациентов с легкой контролируемой БА и нормальной ФВД (ОФВ₁ составил $\geq 75\%$) выполнен анализ данных бронхопровокационного теста с метахолином в соответствии с критериями, установленными протоколом исследования, с целью подтверждения диагноза БА (табл. 10).

Таким образом, анализируемые группы пациентов с БА однородны по возрасту, но различны по показателям, определяющим клиническое течение заболевания, что соответствует цели и задачам протокола.

3.1.2 Корреляционный анализ

клинико-anamнестических данных больных астмой

Анализ корреляционных связей между анамнестическими и клинико-функциональными показателями выполнен по методу Спирмена. В работе представлены статистически значимые различия со значением коэффициента достоверности (p) $<0,05$.

Так, для группы больных БА выявлены статистически значимые положительные корреляции между частотой обострений заболевания на протяжении предшествующих 12 месяцев и такими характеристиками, как количество ассоциированных с обострениями госпитализаций, эпизодов курсовой терапии СКС и АБП, среднесуточной потребностью в КДБА. Более частые обострения свойственны больным астмой с выраженными симптомами (кашель, продукция мокроты), низким уровнем контроля над астмой (по результату АСТ) и сниженным показателем ОФВ₁, измеренным до бронходилатации. Пациентам с частыми обострениями свойственно снижение переносимости физической нагрузки (по данным 6-минутного теста с ходьбой), они демонстрировали меньшие значения периферической кислородной венозной крови до и после пробы с ходьбой (табл. 11).

Таблица 11 – Обострения, госпитализации и ассоциированные с ними клинико-анамнестические показатели у больных БА

Анализируемые пары показателей	R, p<0,05
Обострения за 12 мес. (n) и госпитализации за 12 мес. (n)	0,56
Обострения за 12 мес. (n) и эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n)	0,68
Обострения за 12 мес. (n) и эпизоды терапии АБП за 12 мес. (n)	0,46
Обострения за 12 мес. (n) и среднесуточная потребность к КДБА (дозы/сутки)	0,75
Обострения за 12 мес. (n) и ОФВ ₁ % от должного значения до бронходилатации	-0,44
Обострения за 12 мес. (n) и выраженность кашля (баллы)	0,75
Обострения за 12 мес. (n) и продукция мокроты (баллы)	0,66
Обострения за 12 мес. (n) и результат АСТ (баллы)	-0,75

Окончание таблицы 11

Обострения за 12 мес. (n) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	-0,63
Обострения за 12 мес. (n) и SatO ₂ до 6-мин. ходьбы (%)	-0,56
Обострения за 12 мес. (n) и SatO ₂ после 6-мин. ходьбы (%)	-0,49
Госпитализации за 12 мес. (n) и эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n)	0,58
Госпитализации за 12 мес. (n) и среднесуточная потребность к КДБА (дозы/сутки)	0,52
Госпитализации за 12 мес. (n) и ОФВ ₁ % от должного значения до бронходилатации	-0,44
Госпитализации за 12 мес. (n) и выраженность кашля (баллы)	0,41
Госпитализации за 12 мес. (n) и продукция мокроты (баллы)	0,34
Госпитализации за 12 мес. (n) и результат АСТ (баллы)	-0,53
Госпитализации за 12 мес. (n) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	-0,36
Госпитализации за 12 мес. (n) и SatO ₂ до 6-мин. ходьбы (%)	-0,33
Госпитализации за 12 мес. (n) и SatO ₂ после 6-мин. ходьбы (%)	-0,45
<i>Примечание – Корреляционный анализ по Спирмену.</i>	

Схожие закономерности выявлены и при анализе корреляций частоты госпитализации по поводу обострения БА с выраженностью симптомов, ФВД, данными вопросника АСТ и результатами теста с 6-минутной ходьбой. Частота госпитализаций прямо коррелировала с выраженностью кашля и продукцией мокроты, количеством эпизодов терапии СКС и среднесуточной потребностью в КДБА. Обратные корреляции выявлены между количеством госпитализаций за предшествующий год и добронходилатационным значением ОФВ₁, результатом АСТ, переносимостью физической нагрузки (по данным 6-минутного теста с ходьбой) и ассоциированными с ней значениями сатурации кислорода до и после теста с ходьбой (табл. 11).

Следует отметить, что больные БА с анамнезом частой курсовой терапии СКС отличались более высокой среднесуточной потребностью в КДБА, выраженностью кашля и продукции мокроты, демонстрировали худшие результаты АСТ и показатели ФВД (ОФВ₁ до и после сальбутамола, ФЖЕЛ до бронходилатации), характеризовались сниженной толерантностью к физической нагрузке и более низкими значениями сатурации до и после нее (по данным теста с 6-минутной ходьбой) (табл. 12).

Более часто к курсовой терапии АБП прибегали больные астмой с высоким индексом курения, выраженным кашлем и продукцией мокроты (табл. 12).

Таблица 12 – Особенности фармакотерапии и ассоциированные с ними клинико-функциональные и анамнестические показатели у больных БА

Анализируемые пары показателей	R, p<0,05
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и среднесуточная потребность к КДБА (дозы/сутки)	0,55
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и выраженность кашля (баллы)	0,52
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и продукция мокроты (баллы)	0,54
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и результат АСТ (баллы)	-0,68
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	-0,58
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и SatO2 до 6-мин. ходьбы (%)	-0,57
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и SatO2 после 6-мин. ходьбы (%)	-0,62
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации	-0,55
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и ФЖЕЛ% от должного значения до бронходилатации	-0,38
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и ОФВ1% от должного значения после бронходилатации	-0,51
Эпизоды терапии АБП за 12 мес. (n) и индекс курения (пачка/лет)	0,35
Эпизоды терапии АБП за 12 мес. (n) и выраженность кашля (баллы)	0,51
Эпизоды терапии АБП за 12 мес. (n) и продукция мокроты (баллы)	0,42
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и выраженность кашля (баллы)	0,64
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и продукция мокроты (баллы)	0,68
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и результат АСТ (баллы)	-0,74
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	-0,64
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и SatO2 до 6-мин. ходьбы (%)	-0,61
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и SatO2 после 6-мин. ходьбы (%)	-0,5
Потребность в КДБА и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации	-0,45
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и ФЖЕЛ% от должного значения до бронходилатации	-0,33
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и ОФВ1% от должного значения после бронходилатации	-0,35
<i>Примечание – Корреляционный анализ по Спирмену.</i>	

Среднесуточная потребность в КДБА у больных астмой отрицательно коррелировала с уровнем контроля над заболеванием (по данным АСТ),

переносимостью физической нагрузки, результатами ФВД (ОФВ1 до и после пробы с сальбутамолом, ФЖЕЛ до бронходилатации) и уровнем кислородной сатурации (табл. 12).

Больные БА с выраженным кашлем и продукцией мокроты характеризовались более высокой потребностью в КДБА (табл. 12), худшими результатами заполнения вопросника АСТ, меньшей переносимостью физической нагрузки, сниженными показателями сатурации кислорода и исходного ОФВ1 (табл. 13).

Таблица 13 – Симптомы БА и ассоциированные с ними клиничко-функциональные показатели

Анализируемые пары показателей	R, p<0,05
Выраженность кашля (баллы) и продукция мокроты (баллы)	0,74
Выраженность кашля (баллы) и результат АСТ (баллы)	-0,68
Выраженность кашля (баллы) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	-0,71
Выраженность кашля (баллы) и SatO2 до 6-мин. ходьбы (%)	-0,62
Выраженность кашля (баллы) и SatO2 после 6-мин. ходьбы (%)	-0,6
Выраженность кашля (баллы) и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации (%)	-0,41
Продукция мокроты (баллы) и результат АСТ (баллы)	-0,63
Продукция мокроты (баллы) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	-0,63
Продукция мокроты (баллы) и SatO2 до 6-мин. ходьбы (%)	-0,69
Продукция мокроты (баллы) и SatO2 после 6-мин. ходьбы (%)	-0,44
Продукция мокроты (баллы) и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации	-0,37
Показатель АСТ (баллы) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	0,76
Показатель АСТ (баллы) и SatO2 до 6-мин. ходьбы (%)	0,6
Показатель АСТ (баллы) и SatO2 после 6-мин. ходьбы (%)	0,65
Показатель АСТ (баллы) и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации	0,63
Показатель АСТ (баллы) и ФЖЕЛ% от должного значения до бронходилатации	0,41
Показатель АСТ (баллы) и ОФВ1% от должного значения после бронходилатации	0,34
<i>Примечание – Корреляционный анализ по Спирмену.</i>	

Значения результата АСТ положительно коррелировали с показателями ФВД, уровнем сатурации кислорода и величиной дистанции, пройденной пациентом в тесте с 6-минутной ходьбой (табл. 13).

Выраженность одышки по данным вопросника mMRC положительно ассоциирована у больных БА с частотой обострений астмы и связанных с ними госпитализаций, количеством курсов приема СКС и среднесуточной потребностью в КДБА, выраженностью кашля и продукции мокроты. Больные БА с низким значением mMRC отличались лучшим контролем астмы (по данным АСТ), более высокой толерантностью к физической нагрузке, лучшими показателями периферической кислородной сатурации, значениями ОФВ1 (до и после бронходилатации) и исходной ФЖЕЛ (табл. 14).

Таблица 14 – Выраженность одышки по данным вопросника mMRC и ассоциированные клинико-anamнестические показатели

Анализируемые пары показателей	R, p<0,05
mMRC (баллы) и обострения за 12 мес. (n)	0,74
mMRC (баллы) и госпитализации за 12 мес. (n)	0,51
mMRC (баллы) и эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n)	0,71
mMRC (баллы) и потребность в КДБА (дозы/сутки)	0,79
mMRC (баллы) и выраженность кашля (баллы)	0,75
mMRC (баллы) и продукция мокроты (баллы)	0,71
mMRC (баллы) и АСТ (баллы)	-0,81
mMRC (баллы) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	-0,88
mMRC (баллы) и SatO ₂ до 6-мин. ходьбы (%)	-0,78
mMRC (баллы) и SatO ₂ после 6-мин. ходьбы (%)	-0,75
mMRC (баллы) и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации	-0,68
mMRC (баллы) и ФЖЕЛ% от должного значения до бронходилатации	-0,44
mMRC (баллы) и ОФВ1% от должного значения после бронходилатации	-0,48
<i>Примечание – Корреляционный анализ по Спирмену.</i>	

Переносимость физической нагрузки – один из важнейших факторов, определяющих качество жизни пациентов с хроническими бронхообструктивными заболеваниями. Для больных БА выявлены

положительные корреляции величины дистанции, пройденной в тесте с 6-минутной ходьбой, и такими показателями, как значение сатурации кислорода до и после ходьбы, величина ОФВ1 (до и после пробы с сальбутамолом) и исходная ФЖЕЛ (табл. 15).

В свою очередь, показатели кислородной сатурации венозной крови, измеренной методом пульсоксиметрии, прямо коррелировали с величиной ОФВ1 до и после бронходилатации, а также с уровнем ФЖЕЛ до проведения стандартной пробы с сальбутамолом (табл. 15).

Таблица 15 – Статистически значимые ассоциации показателей ФВД и результатов теста с 6-минутной ходьбой

Анализируемые пары показателей	R, p<0,05
Путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м) и SatO2 до 6-мин. ходьбы (%)	0,79
Путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м) и SatO2 после 6-мин. ходьбы (%)	0,80
Путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м) и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации	0,64
Путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м) и ФЖЕЛ% от должного значения до бронходилатации	0,48
Путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м) и ОФВ1% от должного значения после бронходилатации	0,53
SatO2 до 6-мин. ходьбы (%) и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации	0,54
SatO2 до 6-мин. ходьбы (%) и ФЖЕЛ% от должного значения до бронходилатации	0,41
SatO2 до 6-мин. ходьбы (%) и ОФВ1% от должного значения после бронходилатации	0,42
SatO2 после 6-мин. ходьбы (%) и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации	0,64
SatO2 после 6-мин. ходьбы (%) и ФЖЕЛ% от должного значения до бронходилатации	0,44
SatO2 после 6-мин. ходьбы (%) и ОФВ1% от должного значения после бронходилатации	0,52
<i>Примечание – Корреляционный анализ по Спирмену.</i>	

3.2 Исходная клинико-anamнестическая характеристика изучаемой популяции больных ХОБЛ

В ходе исследования выполнен статистический анализ исходных данных для группы больных ХОБЛ, включающей 97 пациентов, средний возраст которых составил $58,33 \pm 9,46$ лет.

В соответствии с выбранными критериями в исследование включены пациенты со среднетяжелой ХОБЛ – ХОБЛ 2 степени тяжести (Группа 2А) и больные ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения – ХОБЛ 3-4 степени тяжести (Группа 2В), данные по гендерным и возрастным характеристикам которых представлены в таблице (табл. 16).

Таблица 16 – Распределение пациентов с ХОБЛ по полу и возрасту

Группы больных ХОБЛ	Женщины		Мужчины		Средний возраст, лет*
	Абс.	%	Абс.	%	
Группа 2А (n=64)	6	9,38	58	90,62	$56,7 \pm 9,32$
Группа 2В (n=33)	2	6,06	31	93,94	$61,48 \pm 9,02$

*Примечание – * Различия по возрасту между пациентами с ХОБЛ 2 степени тяжести и больными ХОБЛ 3-4 степени тяжести статистически значимы ($p=0,04$).*

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).

3.2.1 Сравнительный анализ клинико-anamnestических данных пациентов со среднетяжелой ХОБЛ и больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения

При сравнении клинико-anamnestических данных между группами больных ХОБЛ средней степени тяжести и пациентов с ХОБЛ тяжелого и крайне тяжелого течения выявлен ряд статистически значимых различий.

Так, пациенты с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания отличались более выраженной одышкой (по значению шкалы mMRC) и высокой суточной потребностью в КДБА. На протяжении предшествующего года данной группе больных были свойственны более частые обострения ХОБЛ и ассоциированные с ними госпитализации, курсы системной терапии глюкокортикостероидами (табл. 17).

Пациенты с ХОБЛ 2 степени тяжести в сравнении с группой более тяжелых больных характеризовались лучшими значениями показателей ФВД (ОФВ1 и ФЖЕЛ до и после стандартного теста на обратимость бронхиальной обструкции), а также лучше переносили физическую нагрузку, демонстрируя более высокий результат пройденной дистанции в тесте с 6-минутной ходьбой и значения сатурации кислорода (до и после пробы с ходьбой) (табл. 17).

Таблица 17 – Данные анамнеза и клинико-функциональная характеристика больных ХОБЛ

Показатель	ХОБЛ (Группа 2), n=97	ХОБЛ 2 ст. (Группа 2А), n=64	ХОБЛ 3-4 ст. (Группа 2В), n=33	P _{2А-2В}
------------	-----------------------------	------------------------------------	--------------------------------------	--------------------

Окончание таблицы 17

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>				
* Стандартный 6-минутный тест с ходьбой.				
** Стандартный бронходилатационный тест с сальбутамолом (400 мкг).				

Следует отметить, что представленные группы больных достоверно не различались по анамнезу табакокурения, выраженности кашля и продукции мокроты. Несмотря на различия в частоте обострений и госпитализаций, не выявлено достоверных отличий по частоте курсовой антибиотикотерапии между группами больных ХОБЛ средней степени тяжести и пациентами с ХОБЛ тяжелого и крайне тяжелого течения (табл. 17).

3.2.3 Особенности анамнестических данных и результатов клинико-функциональных исследований у больных ХОБЛ, получавших ИГКС в составе регулярной терапии

Регулярную терапию ИГКС на протяжении 6 и более месяцев получали 11 больных ХОБЛ средней степени тяжести и 15 пациентов с тяжелым и очень тяжелым течением заболевания.

В целом группа больных, применявших ИГКС в составе поддерживающей терапии, характеризовалась более тяжелым течением заболевания по сравнению с пациентами, не использовавшими ИГКС на регулярной основе, что соответствует современным трендам в назначении ИГКС пациентам с тяжелым и крайне тяжелым течением ХОБЛ (особенно на фоне высокого риска обострений).

Так, пациенты, применявшие ИГКС, характеризовались более выраженной одышкой (по шкале mMRC), чаще госпитализировались и получали СКС на протяжении предшествующих 12 месяцев, им свойственна более высокая потребность в КДБА. По сравнению с пациентами, не применявшими ИГКС, данная группа больных отличалась сниженной переносимостью физической нагрузки, уровнем сатурации кислорода после ходьбы, а также низкими значениями ОФВ1 (до и после бронходилатации) и ФЖЕЛ (до бронходилатации) (табл. 17).

Таблица 17 – Различия клинико-анамнестических данных у больных ХОБЛ в зависимости от факта использования ИГКС в составе поддерживающей терапии

Показатель	Регулярная терапия с ИГКС, n=26	Регулярная терапия без ИГКС, n=72	p
Госпитализации за 12 мес.	0,61±0,75	0,15±0,4	0,0002
Курсы СКС за 12 мес.	0,69±0,9	0,08±0,28	<0,0001
Потребность в КДБА, дозы/сутки	3,27±3,69	1,6±2,23	0,008
mMRC, баллы	2,08±1,13	1,28±1,1	0,002
Путь, м	350,73±187,84	440,9±177,9	0,03
SatO2 после ходьбы, %	95,0±2,24	96,4±1,88	0,002
ОФВ1 до теста*, %	48,1±14,31	59,96±12,99	0,0002
ОФВ1 после теста*, %	55,92±16,24	66,74±13,89	0,0016
ФЖЕЛ до теста*, %	69,97±16,52	80,99±15,12	0,002
<i>Примечание – * Стандартный бронходилатационный тест с сальбутамолом (400 мкг).</i>			

3.2.4 Особенности анамнестических данных и результатов клинко-функциональных исследований у больных ХОБЛ, получающих тиотропия бромид в составе регулярной терапии

Регулярную терапию ТБ на протяжении 6 и более месяцев получали 12 больных ХОБЛ средней степени тяжести и 14 пациентов с тяжелым и очень тяжелым течением заболевания. Данная группа пациентов отличалась от других больных ХОБЛ менее выраженным кашлем. В то же время больные, применявшие ТБ, характеризовались более тяжелым течением заболевания: более выраженной одышкой и потребностью в КДБА, меньшими значениями ОФВ1 до бронходилатации, более частым использованием курсовой терапии СКС по поводу обострений ХОБЛ (табл. 18).

Таблица 18 – Различия клинко-анамнестических данных у больных ХОБЛ в зависимости от факта использования тиотропия бромида (ТБ) в составе поддерживающей терапии

Показатель	Регулярная терапия с ТБ, n=26	Регулярная терапия без ТБ, n=72	p
Кашель, баллы	1,67±0,68	2,1±0,8	0,015
Курсы СКС за 12 мес.	0,44±0,75	0,16±0,5	0,031
Потребность в КДБА, дозы/сутки	3,18±3,84	1,46±1,73	0,003
mMRC, баллы	1,89±1,22	1,33±1,11	0,03
ОФВ1 до теста*, %	51,23±14,01	58,49±13,77	0,02
<i>Примечание – * Стандартный бронходилатационный тест с сальбутамолом (400 мкг).</i>			

3.2.5 Корреляционный анализ клинко-анамнестических данных больных ХОБЛ

Анализ корреляционных связей между анамнестическими и клинко-функциональными показателями выполнен по методу Спирмена. В работе представлены статистически значимые различия со значением коэффициента достоверности (p) <0,05.

Для группы больных ХОБЛ выявлены статистически значимые положительные корреляции между частотой обострений заболевания на протяжении предшествующих 12 месяцев и такими характеристиками, как количество ассоциированных с обострениями госпитализаций, эпизодов курсовой терапии СКС и АБП, среднесуточной потребностью в КДБА. Более частые обострения свойственны больным ХОБЛ с выраженными симптомами (кашель, продукция мокроты), сниженными показателями ОФВ₁, измеренными до и после бронходилатации, а также меньшим исходным значением ФЖЕЛ (табл. 19).

Таблица 19 – Обострения, госпитализации и ассоциированные с ними клинико-анамнестические показатели у больных ХОБЛ

Анализируемые пары показателей	R, p<0,05
Обострения за 12 мес. (n) и госпитализации за 12 мес. (n)	0,35
Обострения за 12 мес. (n) и эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n)	0,24
Обострения за 12 мес. (n) и эпизоды терапии АБП за 12 мес. (n)	0,77
Обострения за 12 мес. (n) и среднесуточная потребность к КДБА (дозы/сутки)	0,21
Обострения за 12 мес. (n) и ОФВ ₁ % от должного значения до бронходилатации	-0,21
Обострения за 12 мес. (n) и ОФВ ₁ % от должного значения после бронходилатации	-0,22
Обострения за 12 мес. (n) и ФЖЕЛ% от должного значения после бронходилатации	-0,2
Обострения за 12 мес. (n) и выраженность кашля (баллы)	0,32
Обострения за 12 мес. (n) и продукция мокроты (баллы)	0,35
Госпитализации за 12 мес. (n) и эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n)	0,73
Госпитализации за 12 мес. (n) и эпизоды терапии АБП за 12 мес. (n)	0,38
Госпитализации за 12 мес. (n) и среднесуточная потребность к КДБА (дозы/сутки)	0,41
Госпитализации за 12 мес. (n) и ОФВ ₁ % от должного значения до бронходилатации	-0,38
Госпитализации за 12 мес. (n) и ФЖЕЛ% от должного значения до бронходилатации	-0,27
Госпитализации за 12 мес. (n) и ОФВ ₁ % от должного значения после бронходилатации	-0,28
Госпитализации за 12 мес. (n) и ФЖЕЛ% от должного значения после бронходилатации	-0,3
<i>Примечание – * Корреляционный анализ по Спирмену.</i>	

Частота госпитализаций по поводу обострений ХОБЛ прямо коррелировала с количеством эпизодов терапии СКС, АБП и среднесуточной потребностью в КДБА. Обратные корреляции выявлены между количеством госпитализаций за предшествующий год и величиной ОФВ1 и ФЖЕЛ (табл. 19).

Следует отметить, что больные ХОБЛ с анамнезом частой курсовой терапии СКС также характеризовались и более частым назначением АБП, отличались более высокой среднесуточной потребностью в КДБА, демонстрировали худшие показатели ФВД (ОФВ1 до и после сальбутамола, ФЖЕЛ до бронходилатации), сниженную толерантность к физической нагрузке и более низкие значения сатурации до и после нее (по данным теста с 6-минутной ходьбой) (табл. 20).

Более часто в курсовой терапии АБП нуждались больные ХОБЛ с выраженным кашлем и продукцией мокроты (табл. 20).

Таблица 20 – Особенности фармакотерапии и ассоциированные с ними клинико-анамнестические показатели у больных ХОБЛ

Анализируемые пары показателей	R, p<0,05
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и эпизоды терапии АБП за 12 мес. (n)	0,27
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и среднесуточная потребность к КДБА (дозы/сутки)	0,35
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	-0,36
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и SatO2 до 6-мин. ходьбы (%)	-0,38
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и SatO2 после 6-мин. ходьбы (%)	-0,34
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации	-0,37
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и ФЖЕЛ% от должного значения до бронходилатации	-0,22
Эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n) и ОФВ1% от должного значения после бронходилатации	-0,24
Эпизоды терапии АБП за 12 мес. (n) и выраженность кашля (баллы)	0,35
Эпизоды терапии АБП за 12 мес. (n) и продукция мокроты (баллы)	0,46
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и выраженность кашля (баллы)	0,22

Окончание таблицы 20

Потребность в КДБА (дозы/сутки) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	-0,47
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и SatO2 до 6-мин. ходьбы (%)	-0,42
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и SatO2 после 6-мин. ходьбы (%)	-0,5
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и ОФВ1% от должного значения до бронходилатации	-0,56
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и ФЖЕЛ% от должного значения до бронходилатации	-0,28
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и ОФВ1% от должного значения после бронходилатации	-0,49
Потребность в КДБА (дозы/сутки) и ФЖЕЛ% от должного значения после бронходилатации	-0,33
<i>Примечание – * Корреляционный анализ по Спирмену.</i>	

Среднесуточная потребность в КДБА у больных ХОБЛ отрицательно коррелировала с переносимостью физической нагрузки, результатами ФВД (ОФВ1 до и после пробы с сальбутамолом, ФЖЕЛ до бронходилатации) и уровнем кислородной сатурации (табл. 20).

Выраженность кашля положительно коррелировала с потребностью в КДБА (табл. 20) и продукцией мокроты (табл. 21).

Выраженность продукции мокроты была более высокой у больных ХОБЛ с более высоким индексом курения (табл. 21).

Тяжесть одышки по данным вопросника mMRC положительно ассоциирована у больных ХОБЛ с частотой курсовой терапии СКС и среднесуточной потребностью в КДБА. Больные ХОБЛ с низким значением mMRC отличались более высокой толерантностью к физической нагрузке, лучшими показателями сатурации кислорода до и после теста с ходьбой (табл. 21).

Таблица 21 – Симптомы ХОБЛ и ассоциированные с ними клинико-функциональные показатели

Анализируемые пары показателей	R, p<0,05
Выраженность кашля (баллы) и продукция мокроты (баллы)	0,62
Продукция мокроты (баллы) и индекс курения (пачка/лет)	0,24
mMRC(баллы) и эпизоды терапии СКС за 12 мес. (n)	0,38
mMRC (баллы) и потребность в КДБА (дозы/сутки)	0,59
mMRC (баллы) и путь в тесте с 6-мин. ходьбой (м)	-0,81
mMRC (баллы) и SatO ₂ до 6-мин. ходьбы (%)	-0,7
mMRC (баллы) и SatO ₂ после 6-мин. ходьбы (%)	-0,78
<i>Примечание – * Корреляционный анализ по Спирмену.</i>	

Кроме того следует отметить статистически значимые прямые корреляционные связи между дистанцией, пройденной пациентами в тесте с 6-минутной ходьбой и показателями сатурации кислорода до и после ходьбы ($r=0,81$ и $r=0,76$ соответственно; $p<0,05$).

3.3 Сравнительная клинико-anamнестическая характеристика пациентов, страдающих БА, и больных ХОБЛ

При сравнении общих выборок больных БА и пациентов с ХОБЛ выявлено, что группа больных астмой статистически значимо отличалась существенно меньшим значением индекса курения, сравнительно редкими обострениями на протяжении предшествующих 12 месяцев, менее выраженным симптомом кашля (табл. 22).

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. 22).

Более сохранная ФВД определена для группы больных астмой, продемонстрировавшей более высокие значения ОФВ₁ (до и после теста с сальбутамолом) и исходной ФЖЕЛ (табл. 22).

Таблица 22 – Различия клинико-anamnestических 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>			

Следует отметить, что при сравнении групп пациентов с легкой БА и ХОБЛ 2 степени тяжести, а также групп пациентов с тяжелой неконтролируемой БА и ХОБЛ тяжелого течения не выявлено статистически значимых различий по анализируемым клинико-функциональным и анамнестическим параметрам.

3.4 Характеристика сопутствующей патологии у обследованных групп больных БА и ХОБЛ

В ходе исследования выполнено сравнение исследуемых групп больных БА и ХОБЛ на распространенность сопутствующей патологии.

Указанные группы пациентов характеризовались отсутствием заболеваний, противоречащих критериям включения / исключения. Так, согласно текущих анамнестических данных, полученных при изучении медицинской документации, а также результатов физикального исследования, ни один из обследованных пациентов не страдал как в прошлом так и на момент исследования онкологическими заболеваниями, туберкулезом, алкоголизмом и наркоманией в настоящее время или в прошлом (по данным анамнеза), психическими расстройствами, тяжелыми поражениями органов ЦНС в стадии декомпенсации (по данным анамнеза), а также другими (отличными от БА и ХОБЛ) клинически

значимыми заболеваниями бронхо-легочной системы – а дефицит α 1-антитрипсина, бронхэктатическая болезнь, буллезная эмфизема легких, саркоидоз органов дыхания, кисты легких, асбестоз, резекция части легкого или трансплантация.

Среди включенных в исследование пациентов отсутствовали больные БА и ХОБЛ, страдающие гельминтными инфекциями, тяжелой и/или декомпенсированной соматической патологией.

Сопутствующие заболевания у обследованных больных БА и ХОБЛ характеризовались клинически стабильным течением, отсутствием обострения и необходимости в коррекции проводимой терапии.

Среди наиболее распространенных сопутствующих заболеваний у сравниваемых групп больных БА и ХОБЛ зарегистрированы сердечно-сосудистые заболевания (гипертоническая болезнь и ИБС, нарушения ритма сердца и хроническая сердечная недостаточность), заболевания ЖКТ (ГЭРБ, хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и ДПК, хронический холецистит и желчнокаменная болезнь), заболевания опорно-двигательной системы (остеоартроз (включая остеохондроз позвоночника) и остеопороз) а также метаболический синдром, варикозная болезнь сосудов нижних конечностей и катаракта (табл. 23).

Таблица 23 – Сопутствующие заболевания у обследованных групп больных БА и ХОБЛ

Сопутствующая патология	Частота встречаемости, n		p
	БА, n=52	ХОБЛ, n=97	
Гипертоническая болезнь	12 (23,08 %)	23 (23,71 %)	0,93
ИБС: стенокардия напряжения	8 (15,4 %)	19 (19,59 %)	0,52
ИБС: инафаркт миокарда в анамнезе	0 (0 %)	1 (1,03 %)	-
Аритмия: экстрасистолии	3 (5,77 %)	7 (7,22 %)	0,92
Аритмия: хроническая форма фибрилляции предсердий	0 (0 %)	1 (1,03 %)	-
Хроническая сердечная недостаточность	3 (5,77 %)	6 (6,18 %)	0,91

Окончание таблицы 23

Хроническое легочное сердце	1 (1,92 %)	8 (8,25 %)	0,12
ГЭРБ	4 (7,69 %)	5 (5,15 %)	0,53
Язвенная болезнь желудка	5 (9,61 %)	6 (6,18 %)	0,44
Хронический гастрит	4 (7,69 %)	6 (6,18 %)	0,73
Язвенная болезнь ДПК	3 (5,77 %)	4 (4,12 %)	0,65
Хронический панкреатит	0 (0 %)	2 (2,06 %)	-
Хронический холецистит	2 (3,84 %)	5 (5,15 %)	0,72
Желчнокаменная болезнь	2 (3,84 %)	5 (5,15 %)	0,72
Постхолецистэктомический синдром	1 (1,92 %)	0 (0%)	-
Железодефицитная анемия легкой степени тяжести	0 (0 %)	1 (1,03 %)	-
Хронический пиелонефрит	4 (7,69 %)	4 (4,12 %)	0,36
Остеоартроз (включая остеохондроз позвоночника)	7 (13,46 %)	14 (14,4%)	0,21
Остеопороз	3 (5,77 %)	7 (7,22 %)	0,74
Сахарный диабет 2 типа	1 (1,92 %)	3 (3,09 %)	0,67
Метаболический синдром	4 (7,69 %)	9 (9,28 %)	0,74
Хронический тонзиллит	3 (5,77 %)	2 (2,06 %)	0,23
Хронический вазомоторный ринит	3 (5,77 %)	4 (4,12 %)	0,65
Хронический аллергический ринит	13 (25 %)	3 (3,09 %)	0,00004
Хронический облитерирующий эндартериит	0 (0%)	2 (2,06 %)	-
Атеросклероз сосудов (исключая коронарные)	3 (5,77 %)	8 (8, 25 %)	0,58
Диффузный/узловой зоб, эутиреоз	2 (3,84 %)	4 (4,12 %)	0,52
Атопический дерматит	3 (5,77 %)	0 (0%)	-
Экзема	1 (1,92 %)	0 (0%)	-
Хронический описторхоз	1 (1,92 %)	2 (2,06 %)	0,95
Варикозная болезнь нижних конечностей	4 (7,69 %)	7 (7,22 %)	0,91
Катаракта	5 (9,61 %)	9 (9,28 %)	0,95
Глаукома	0 (0 %)	1 (1,03 %)	-
Хроническая ишемия головного мозга	2 (3,84 %)	3 (3,09 %)	0,81

Следует отметить, что различия по распространенности сопутствующей патологии между группами больных БА и ХОБЛ не являлись статистически значимыми, за исключением хронического аллергического ринита, более высокой распространенностью которого характеризовалась группа больных БА ($p=0,00004$) (табл. 23).

Также в группе больных ХОБЛ в отличие от группы пациентов, страдающих БА, выявлен 1 больной постоянной формой фибрилляции предсердий, 1 пациент, перенесший инфаркт миокарда (давность более 3-х лет), 2 больных хроническим панкреатитом, 2 пациента, страдающих облитерирующим эндартериитом, 1 больной глаукомой а также пациентка с железодефицитной анемией легкого течения, обусловленной недостатком поступления железа с пищей (табл. 23).

В группе больных БА в отличие от пациентов с ХОБЛ зарегистрирован 1 случай постхолецистэктомического синдрома, 3 больных атопическим дерматитом и 1 пациент, страдающий экземой легкой степени тяжести в период ремиссии (табл. 23).

Важно, что среди зарегистрированной сопутствующей патологии отсутствовали заболевания или состояния, способные повлиять на результаты выполненного исследования.

Резюме

Таким образом, в соответствии с поставленной целью для сравнительной оценки таксономического состава и анализа генов антибактериальной устойчивости сформированы 2 репрезентативные выборки пациентов (больные БА и пациенты с ХОБЛ), сходные по возрасту и гендерному составу. Различия по ряду клиничко-anamnestических параметров, выявленные между группами пациентов с БА и ХОБЛ, не противоречат современным знаниям о механизмах, клинической характеристике и особенностях течения данных заболеваний, а также соотносятся с целью выполненной работы.

Внутри каждой из представленных групп на основании статистически значимых различий анамнестических и клиничко-функциональных данных четко дифференцируются 2 подгруппы больных:

– с более легким течением заболевания, редкими обострениями и госпитализациями, умеренным анамнезом применения СКС и АБП на протяжении последних 12 месяцев, более высокой переносимостью физической

нагрузки и лучшими показателями ФВД – больные легкой контролируемой и частично контролируемой БА и пациенты со среднетяжелой ХОБЛ;

– с более тяжелым течением заболевания, частыми обострениями, госпитализациями, более высокой частотой курсовой терапии СКС и АБП, хуже переносящие физическую нагрузку и демонстрирующие худшие результаты при оценке ФВД – пациенты с тяжелой неконтролируемой БА и больные тяжелой и очень тяжелой ХОБЛ.

Следует отметить схожесть групп пациентов с легкой БА и ХОБЛ 2 степени тяжести по анализируемым параметрам клинической картины и данных анамнеза. Также не получено статистически значимых различий при сравнении клинико-анамнестических данных между группами лиц с тяжелой неконтролируемой БА и больных ХОБЛ 3-4 степени тяжести. Отсутствие клинико-анамнестических различий позволило в дальнейшем проводить сравнение таксономического состава микробиоты и представленности генов антибиотикорезистентности между группами лиц, страдающих хоть и различными заболеваниями, но обладающими некоторым фенотипическим сходством клинического течения в пределах общих для БА и ХОБЛ параметров.

Закономерность межгрупповых и внутригрупповых различий подчеркнута выявленными ассоциациями клинических и анамнестических параметров. Так, например, пациентам с более тяжелым клиническим течением заболевания свойственны более частые обострения, госпитализации и ассоциированная с ними потребность в соответствующей терапии, а также худшие значения показателей ФВД и переносимости физической нагрузки.

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

Глава 4. Метагеномный анализ орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА по результатам секвенирования генов 16S рРНК

Идентификация состава сообщества микроорганизмов дыхательных путей у больных хронической обструктивной болезнью легких в сравнении с больными бронхиальной астмой является крайне актуальной задачей. Данные заболевания характеризуются полифенотипичностью течения, а также наличием эпизодов обострения, роль бактериальной контаминации в развитии которых по-прежнему остается дискуссионной.

С целью анализа таксономического состава микробиоты верхних дыхательных путей исследовали 138 орофарингеальных мазков. Среди них 88 образцов от больных ХОБЛ и 50 мазков от больных БА. Коллекция образцов, полученных от пациентов с БА, включала 23 мазка от пациентов с легкой персистирующей астмой (контролируемой и частично контролируемой) и 27 мазков больных тяжелой неконтролируемой астмой. Среди образцов, полученных от больных ХОБЛ, исследованы 57 орофарингеальных мазков от пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести и 31 мазок от больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения. В исследование включали больных БА и ХОБЛ стабильного течения с отсутствием анамнеза обострений и системной антибиотикотерапии на протяжении 4-х недель и более, предшествующих включению в работу.

Все образцы подвергнуты секвенированию по последовательностям 16S рРНК генов, V3-V4 переменные регионы на приборе Illumina MiSeq. Фильтрация ридов по качеству и их таксономическая классификация по байесовскому алгоритму против БД Greengenes V13.5 проведены с помощью программного обеспечения QIIME. Среднее число соотнесенных по таксономии ридов на образец составило 2151 ± 245 (среднее значение \pm стандартное отклонение (здесь и далее)).

4.1 Сходство таксономического состава орофарингеальной микробиоты у больных БА и пациентов, страдающих ХОБЛ

В ходе исследования выполнен анализ таксономического состава метагеномных образцов мазков ротоглотки пациентов с ХОБЛ в сравнении с больными БА, построенный по методу многомерного шкалирования – MDS – по метрике Bray-Curtis, где каждая точка соответствует 1 образцу. Чем точки ближе, тем ближе метагеномы по составу (рис. 3).

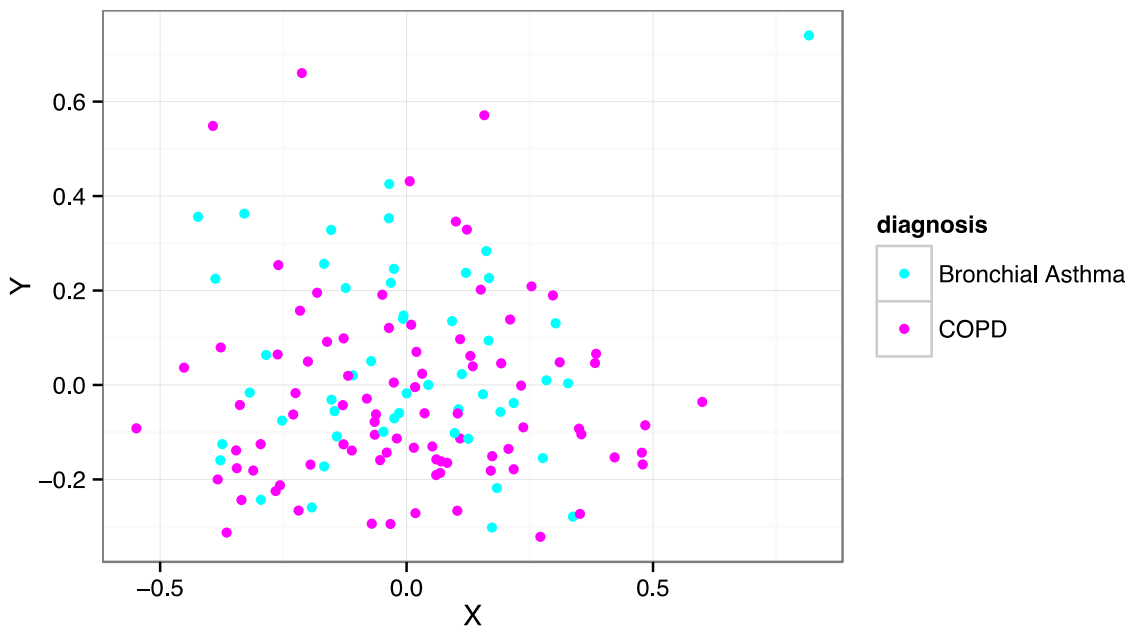


Рисунок 3 – График сходства таксономического состава метагеномов больных ХОБЛ (n=88) в сравнении с образцами больных БА (n=50)

Как видно на графике (рис. 3), при сравнении бактериального состава образцов от больных ХОБЛ с образцами пациентов с астмой существенные различия не выявлены, что подчеркивает схожесть таксономического состава исследуемых групп образцов.

Также выполнен анализ таксономического состава метагеномных образцов мазков ротоглотки внутри каждой из групп. Так, построен график сходства таксономического состава метагеномов больных ХОБЛ в зависимости от типа течения ХОБЛ согласно классификации GOLD 2011 (рис. 4). Однако значимые

различия по бактериальному составу между сравниваемыми группами образцов не выявлены.

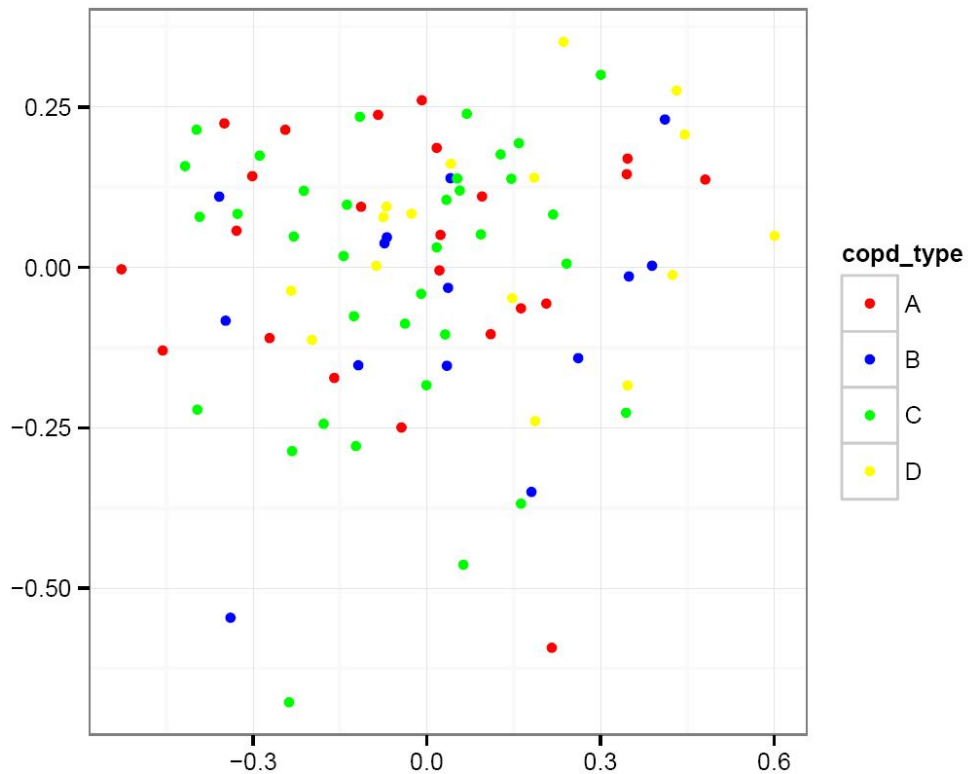


Рисунок 4 – График сходства таксономического состава метагеномов больных ХОБЛ (n=88)

Примечание – Тип А – пациенты с ХОБЛ 2 степени тяжести с невыраженными симптомами и редкими обострениями, тип В – больные ХОБЛ 2 степени тяжести с выраженными симптомами и редкими обострениями, тип С – больные ХОБЛ 3-4 степени тяжести с невыраженными симптомами и частыми обострениями, тип D – больные ХОБЛ 3-4 степени тяжести, выраженными симптомами и частыми обострениями.

При построении графика сходства таксономического состава метагеномов орофарингеальных мазков больных астмой в зависимости от тяжести заболевания также не обнаружено визуализированное разделение на группы. Таким образом, значимые различия по бактериальному составу между группами образцов от пациентов с легкой и тяжелой БА не выявлены (рис. 5).

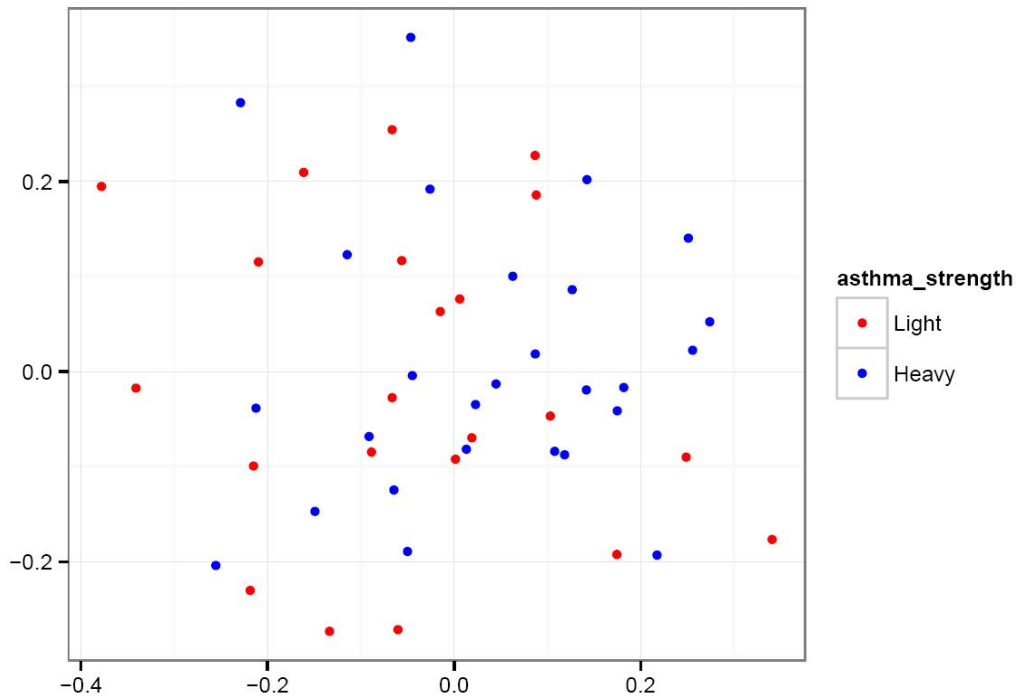


Рисунок 5 – График сходства таксономического состава метагеномов больных БА (n=50)

Примечание – «Light» – пациенты с легкой персистирующей БА, «heavy» – больные тяжелой неконтролируемой БА.

В ходе анализа таксономического состава выделены преобладающие таксоны, составляющие в сумме 95% представленности от общего числа бактерий по всем образцам. Данные таксоны приведены в соответствующих диаграммах таксономического состава. Строки в диаграмме соответствуют образцам (иерархически кластеризованы по сходству состава микробиоты), а столбцы – бактериальным таксонам (следуют в порядке убывания суммарного процента представленности по всей выборке слева направо).

Так, на рис. 6 отражена общая представленность преобладающих таксонов микроорганизмов в образцах мазков ротоглотки больных ХОБЛ и пациентов с БА. Очевидно, что наиболее представленными родами в образцах общей выборки являются *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* и *Fusobacterium*.

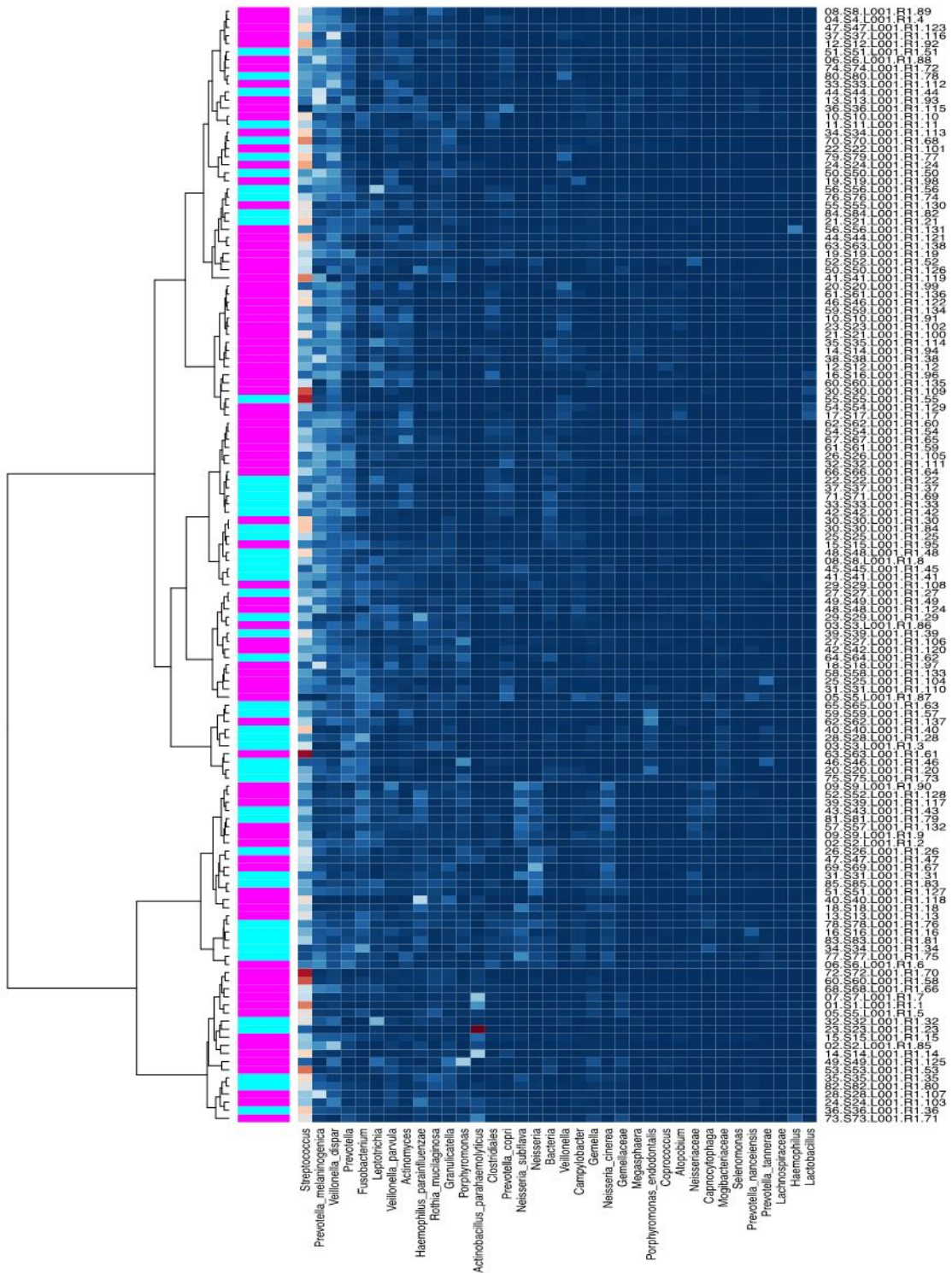


Рисунок 6 – Тепловая карта содержания найденных таксонов в образцах орофарингеальных мазков больных БА и пациентов с ХОБЛ, %.

Примечание – Циановым цветом отмечены образцы от больных БА, фиолетовым – от больных ХОБЛ, строки кластеризованы по сходству, столбцы отсортированы по убыванию суммы по строкам (т.е. первые таксоны – самые представленные по всем образцам).

На рис. 7 изображена тепловая карта представленности преобладающих таксонов микроорганизмов в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ с определением типа течения заболевания согласно классификации GOLD 2011. В группе образцов больных ХОБЛ *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* и *Fusobacterium* – наиболее представленные роды микроорганизмов. Следует отметить отсутствие явной кластеризации образцов по группам при сравнении образцов от пациентов с различным типом течения заболевания.

В свою очередь, на рис. 8 построена тепловая карта представленности преобладающих таксонов в образцах группы больных астмой с выделением пациентов с легким и тяжелым течением заболевания. Так же, как и в случае с ХОБЛ, наиболее представленными родами микроорганизмов в группе орофарингеальных образцов являются *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* и *Fusobacterium*, а кластеризация образцов по особенностям состава орофарингеальной микробиоты внутри группы больных астмой не визуализируется.

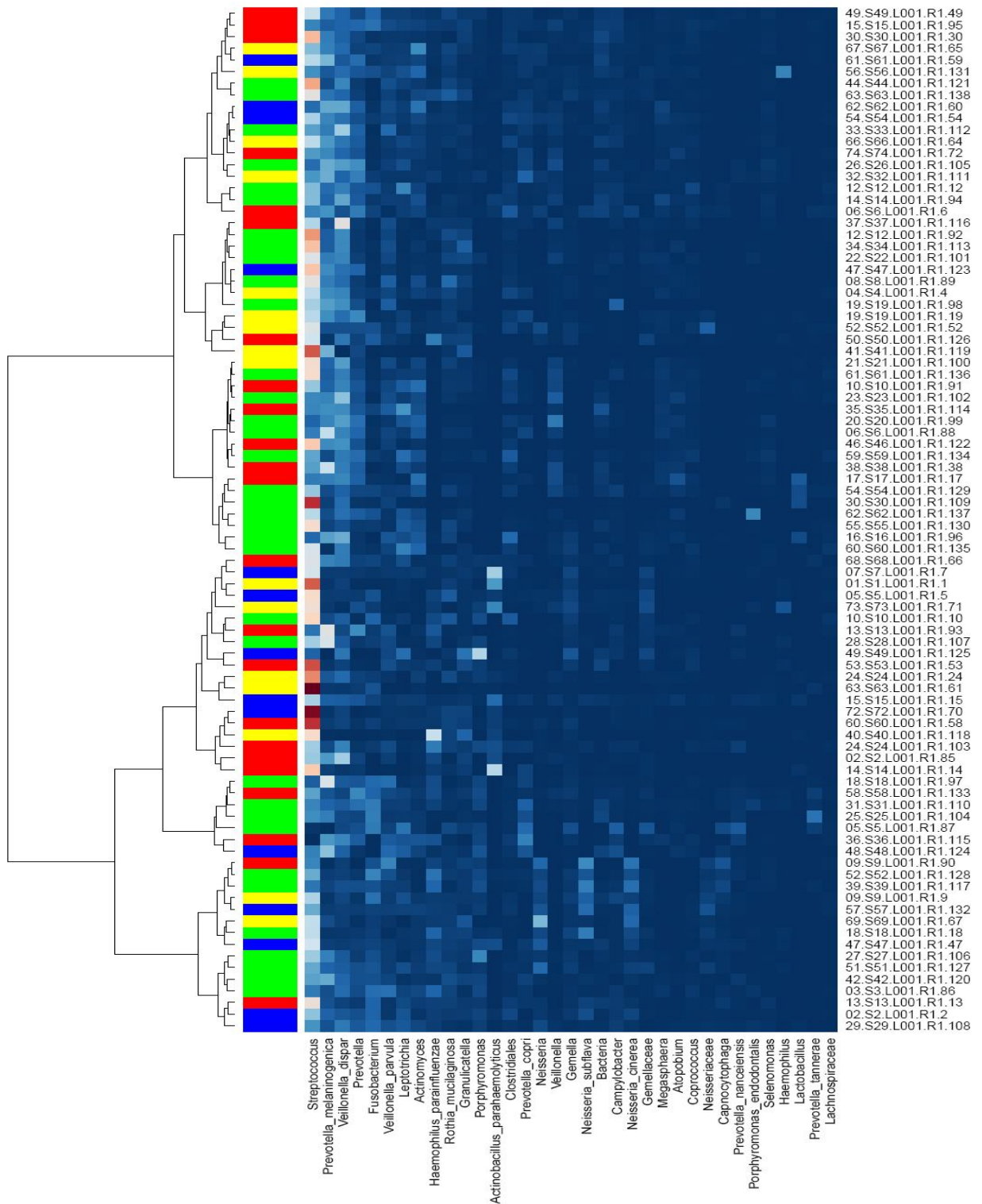


Рисунок 7 – Тепловая карта содержания найденных таксонов в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ, %

Примечание – Красным цветом отмечены образцы больных с типом А, синим – с типом В, зеленым – с типом С и желтым – с типом D. Строки кластеризованы по сходству, столбцы отсортированы по убыванию суммы по строкам (т.е. первые таксоны – самые представленные по всем образцам).

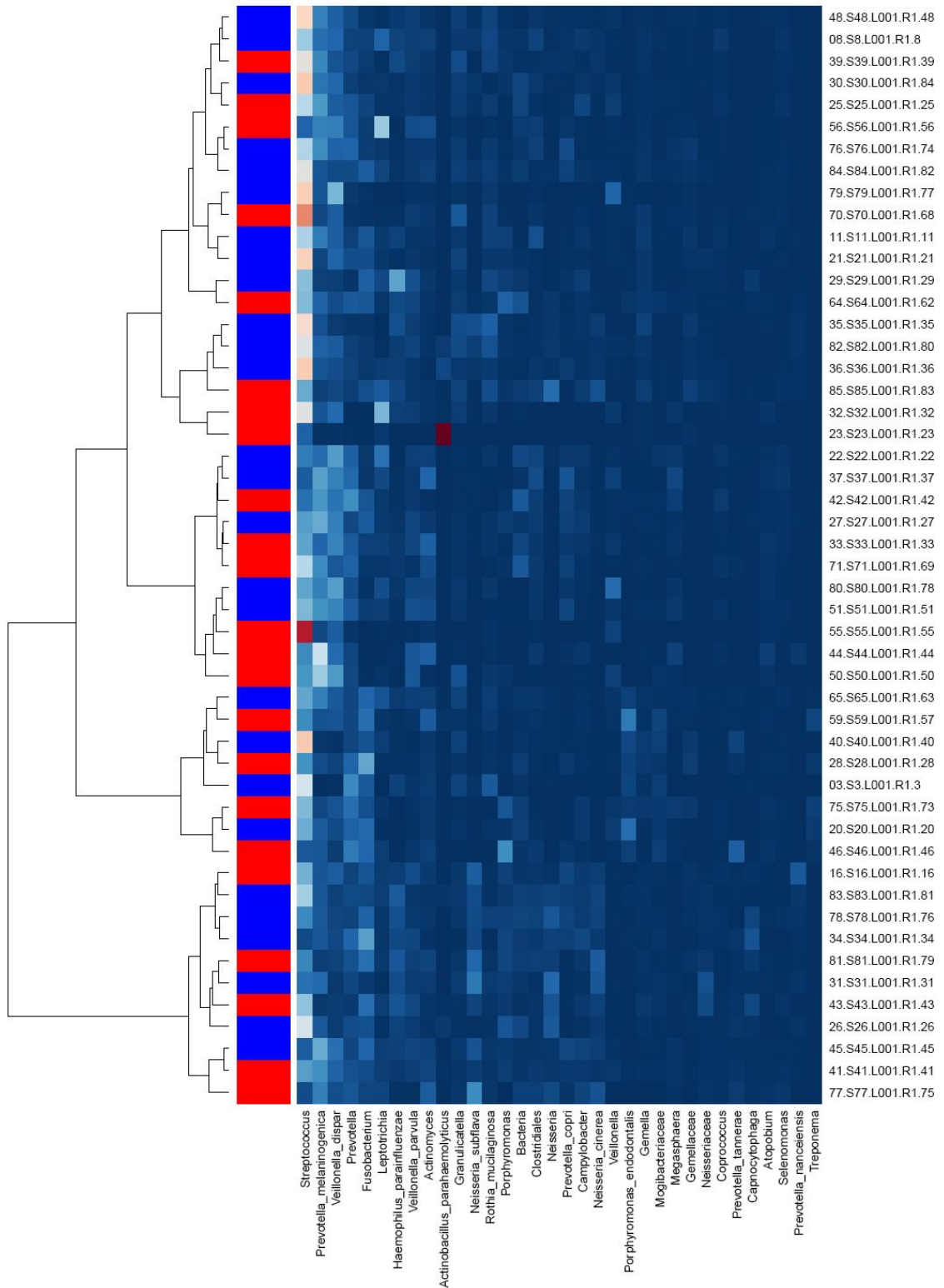


Рисунок 8 – Тепловая карта содержания найденных таксонов в образцах орофарингеальных мазков больных БА, %

Примечание – Красным цветом отмечены образцы больных легкой персистирующей астмой, синим – образцы пациентов с тяжелой неконтролируемой астмой. Строки кластеризованы по сходству, столбцы отсортированы по убыванию суммы по строкам (т.е. первые таксоны – самые представленные по всем образцам).

4.2 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 определены наиболее представленные роды микроорганизмов, составляющие в сумме 95% от всего микробиотического состава по всем образцам. Данные по этим преобладающим родам микроорганизмов у больных ХОБЛ и БА отражены в порядке уменьшения представленности их в группе образцов в табл. 24 и 25 соответственно.

Так, в число наиболее представленных микроорганизмов со значением 10% и более в структуре идентифицированного микробиотического генома в образцах больных ХОБЛ и пациентов с БА вошли роды *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veillonella* (табл. 24, 25).

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. 24), а в образцах пациентов с БА – роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Actinobacillus* (табл. 25).

Таблица 24 – 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

Окончание таблицы 24

<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 25 – 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 $M \pm m$.

При сравнении данных анализа таксономического состава орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ и пациентов с БА, полученных с использованием линейной регрессии, оптимизированной под метагеномные данные, выявлены статистически значимые различия в представленности некоторых отделов и родов микроорганизмов между группами. В частности, образцы орофарингеальных мазков больных БА в сравнении с образцами пациентов с ХОБЛ характеризуются достоверно более высоким содержанием микроорганизмов, относящихся к отделу *Bacteroidetes* ($23,26 \pm 11,0\%$ и $21,1 \pm 13,1\%$ соответственно; $p=0,0007$) (рис. 9).

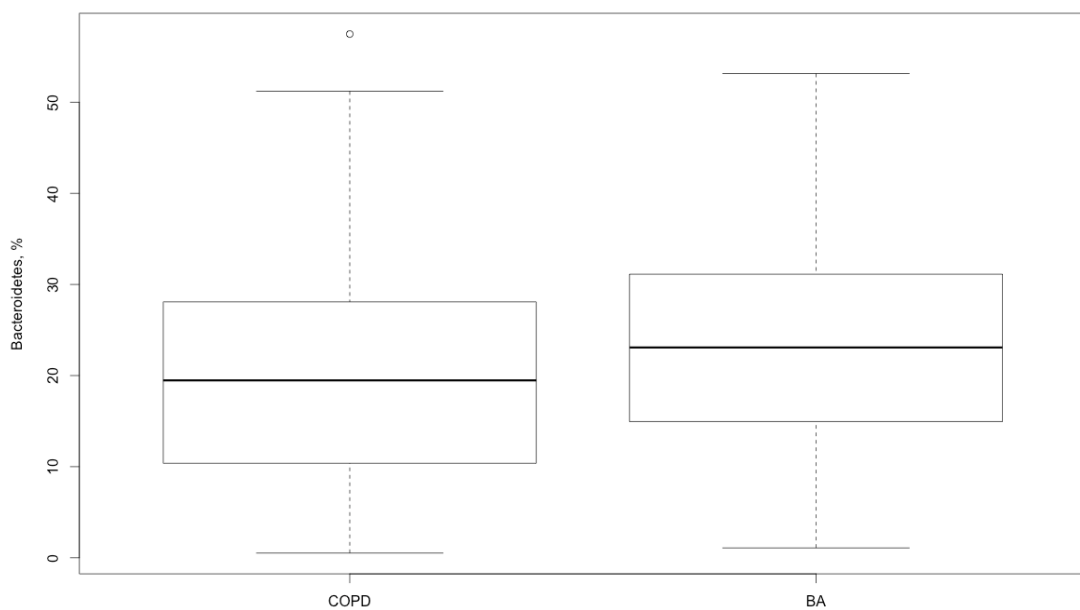


Рисунок 9 – Представленность отдела *Bacteroidetes* в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА

Примечание – COPD – группа мазков больных ХОБЛ; БА – группа мазков больных БА.

В то же время в группе образцов больных ХОБЛ по сравнению с группой образцов пациентов с БА выявлена более высокая представленность микроорганизмов родов *Veillonella* ($14,71 \pm 9,3\%$ и $11,79 \pm 7,9\%$ соответственно; $p=0,01$) (рис. 10) и *Actinomyces* ($2,84 \pm 3,0\%$ и $2,49 \pm 2,4\%$ соответственно; $p=0,01$) (рис. 11).

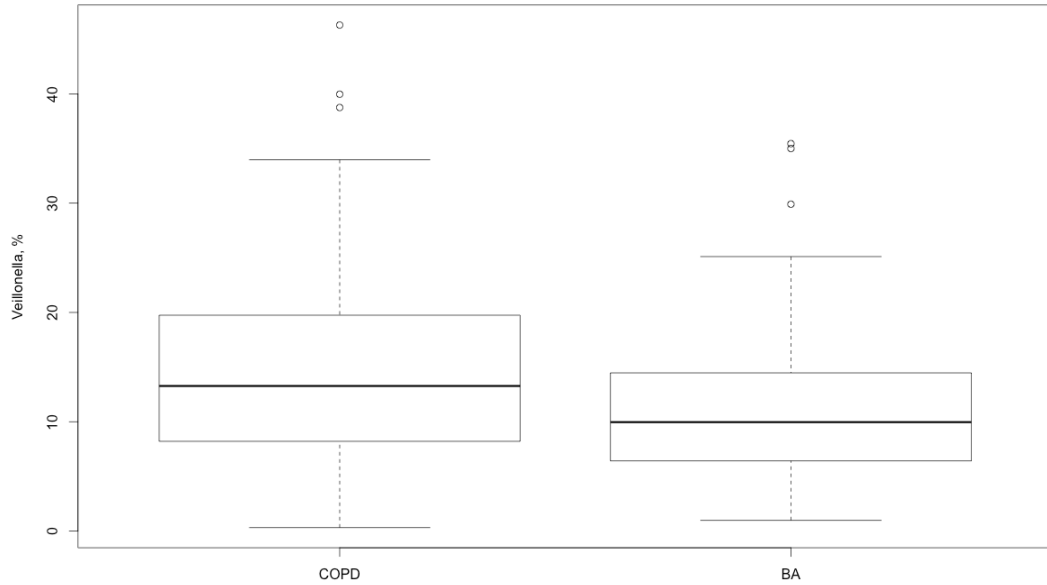


Рисунок 10 – Представленность рода *Veillonella* в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА

Примечание – COPD – группа мазков больных ХОБЛ; BA – группа мазков больных БА.

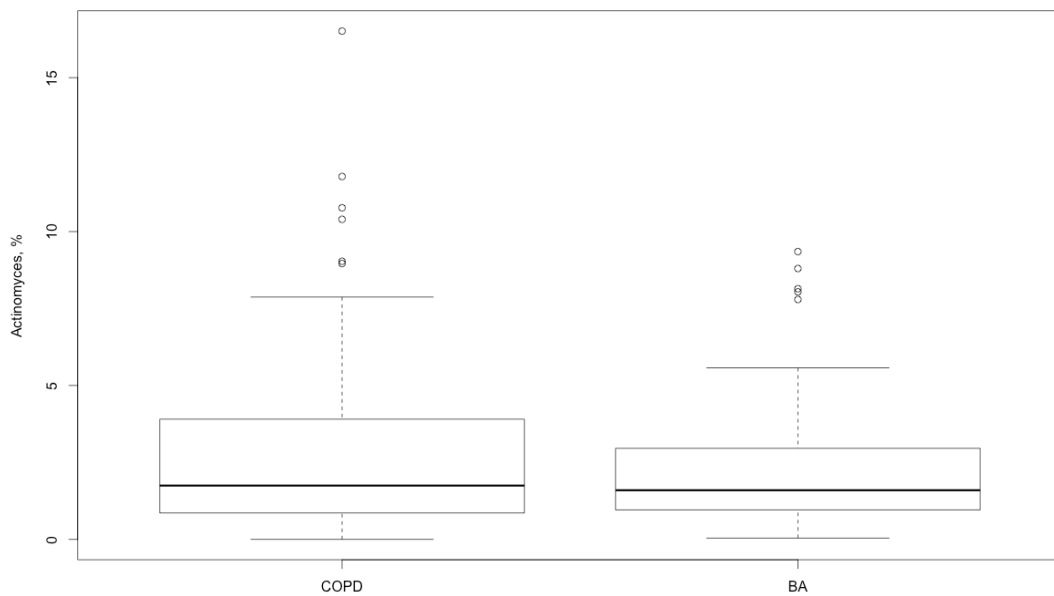


Рисунок 11 – Представленность рода *Actinomyces* в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА

Примечание – COPD – группа мазков больных ХОБЛ; BA – группа мазков больных БА.

Для обнаружения таксономических различий между бинарно разделенными группами образцов на уровне операционных таксономических единиц (OTU, operational taxonomic unit) использован чувствительный метод, основанный на линейном регрессионном анализе, скорректированный под метагеномные данные и реализованный на статистическом языке R в пакете metagenomeSeq [215].

Дополнительный анализ данных с помощью приложения metagenomeSeq позволил зарегистрировать ряд статистически значимых различий в таксономическом составе микробиоты между группами орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ. Так, 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*, а также меньшей представленностью *Prevotella nigrescens*, *Haemophilus influenzae* (рис. 12) и представителей родов *Aggregatibacter*, *Alcaligenaceae*, *Alloiococcus*, *Catonella*, *Mycoplasma* (рис. 13), *Peptoniphilus*, *Peptostreptococcaceae*, *Sediminibacterium* и *Bacteroides* (табл. 26).

Таблица 26 – 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 Haemophilus influenzae</i>	0,186	0,00013	0,89±0,706	0,706±1,11
	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
<p><i>Примечания:</i></p> <p>* Чем выше значение коэффициента наклона прямой по модулю, тем сильнее выявленное влияние (значительнее различие).</p> <p>** Представлены значения <i>p-value</i> с поправкой на множественное сравнение по формуле Бонферрони.</p>				

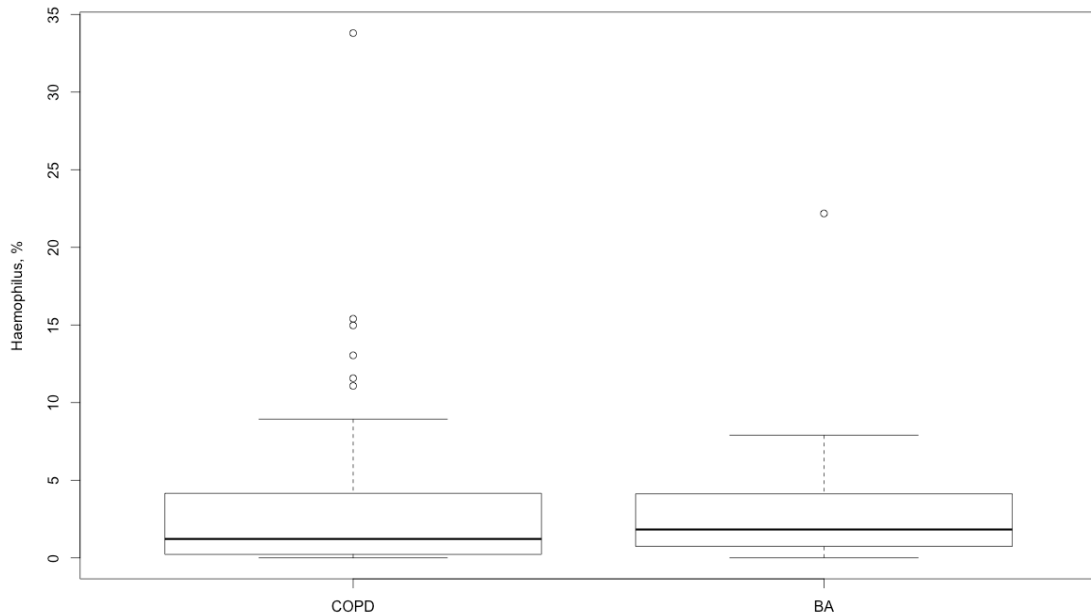


Рисунок 12 – Представленность *Haemophilus influenzae* в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА

Примечание – COPD – группа мазков больных ХОБЛ; BA – группа мазков больных БА.

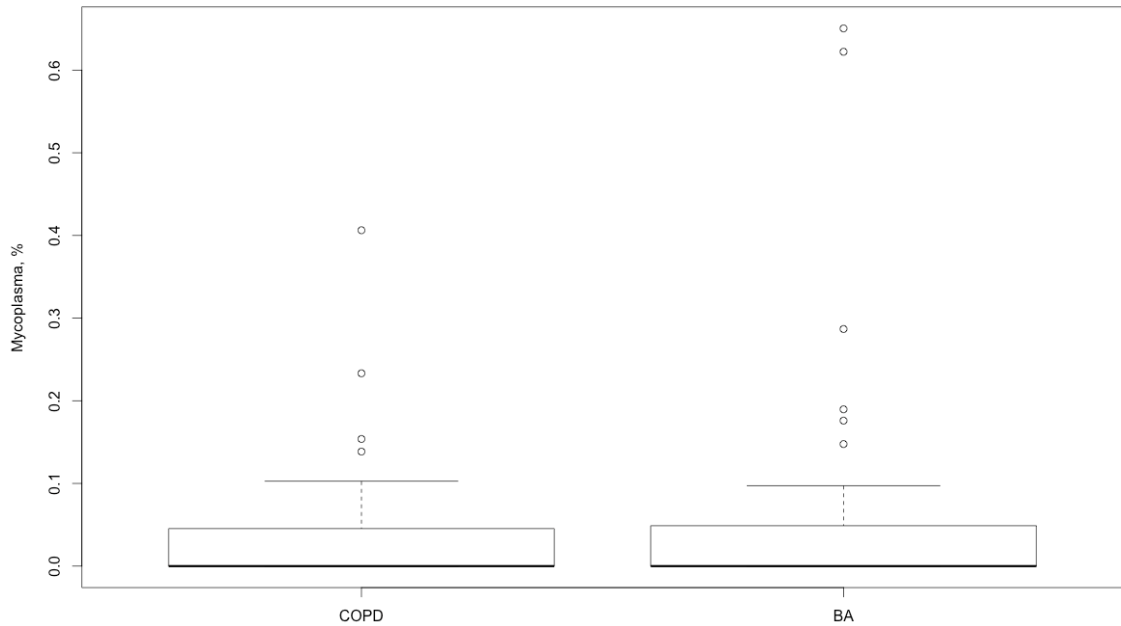


Рисунок 13 – Представленность рода *Mycoplasma* в образцах орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА

Примечание – COPD – группа мазков больных ХОБЛ; BA – группа мазков больных БА.

Исследование особенностей состава орофарингеальной микробиоты внутри группы больных БА в зависимости от тяжести заболевания с помощью пакета metagenomeSeq позволило установить, что, 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. 27).

Таблица 27 – 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)*	P**	% 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
<p><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.</p>				

Анализ таксономического состава орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ в зависимости от тяжести заболевания выявил, что 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±7,48% и 9,17±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. 28).

Таблица 28 – 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)*	P**	% 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
<p><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.</p>				

С помощью анализа методом обобщенных линейных моделей выполнена оценка сходства и различий таксономического состава орофарингеальной микробиоты между группами больных легкой персистирующей БА и ХОБЛ 2 степени тяжести, легкой персистирующей БА и ХОБЛ 3-4 степени тяжести, тяжелой БА и ХОБЛ 2 степени тяжести, а также тяжелой БА и ХОБЛ 3-4 степени

тяжести. В результате анализа 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 стадии.

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 ($p > 0,05$).

4.3 Анализ метагеномного состава орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ методом обобщенных линейных моделей с учетом клинико-anamnestических данных

Для выявления значимых трендов в изменении состава орофарингеальной микробиоты на уровне родов и отделов под влиянием различных клинико-anamnestических факторов (частота обострений и госпитализаций, количество эпизодов применения системных кортикостероидов (СКС) и антибактериальных препаратов, выраженность симптомов болезни (одышка, кашель, продукция мокроты)), применен метод обобщенных линейных моделей. Результатом анализа с помощью данного метода является определение набора значений параметра оценки (англ. Estimate), отражающего влияние изменения регрессора –

предикторной переменной (в данном случае клиничко-анамнестические факторы) на зависимую переменную (представленность той или иной операционной таксономической единицы) в логарифмическом масштабе. Рассчитываемый при этом коэффициент наклона прямой (КНП), определяющий направление и степень зависимости, является значением из выдачи команды `glm` в поле "Estimate".

В результате проведенного анализа выявлено, что орофарингеальным мазкам объединенной группы больных БА и ХОБЛ свойственно уменьшение содержания бактерий отдела *Proteobacteria* по мере повышения частоты обострений у пациентов за предшествующие 12 месяцев (КНП= -0,069; $p= 0,0023$) (рис. 14). Аналогичная отрицательная зависимость степени представленности *Proteobacteria* в орофарингеальных мазках и частоты обострений выявлена в изолированной группе больных ХОБЛ (КНП= -0,07; $p= 0,002$).

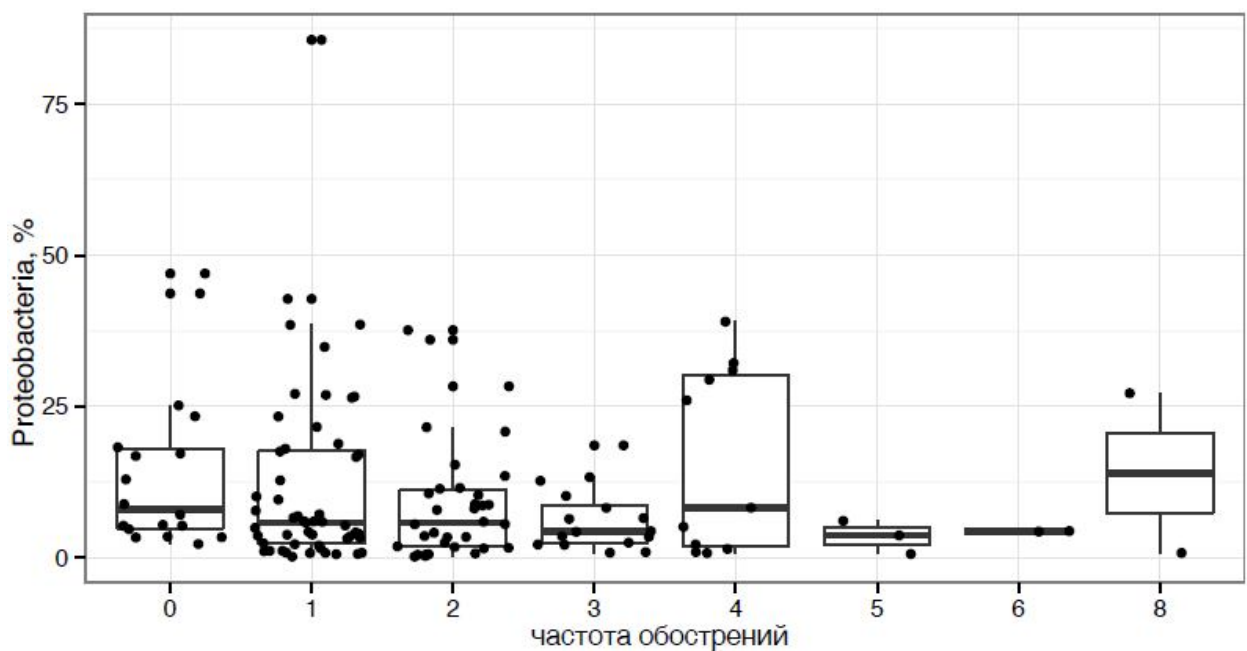


Рисунок 14 – Представленность отдела *Proteobacteria* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты обострений за предшествующие 12 месяцев

Примечание – *Proteobacteria, %* – представленность *Proteobacteria* в % бактериального генома. Точками обозначена представленность рода *Prevotella* у больных с различным количеством обострений. Графики «ящики с усами» отображают распределение значений представленности по группам, а именно среднее и стандартное отклонение.

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; $p= 0,005$) (рис. 15) и *Haemophilus* (КНП= -0,333; $p= 0,006$) (рис. 16), а также в увеличении представленности микроорганизмов отдела *Bacteroidetes* (КНП= 0,091; $p= 0,0087$) (рис. 17) и рода *Prevotella* (КНП= 0,176; $p= 0,005$) (рис. 18).

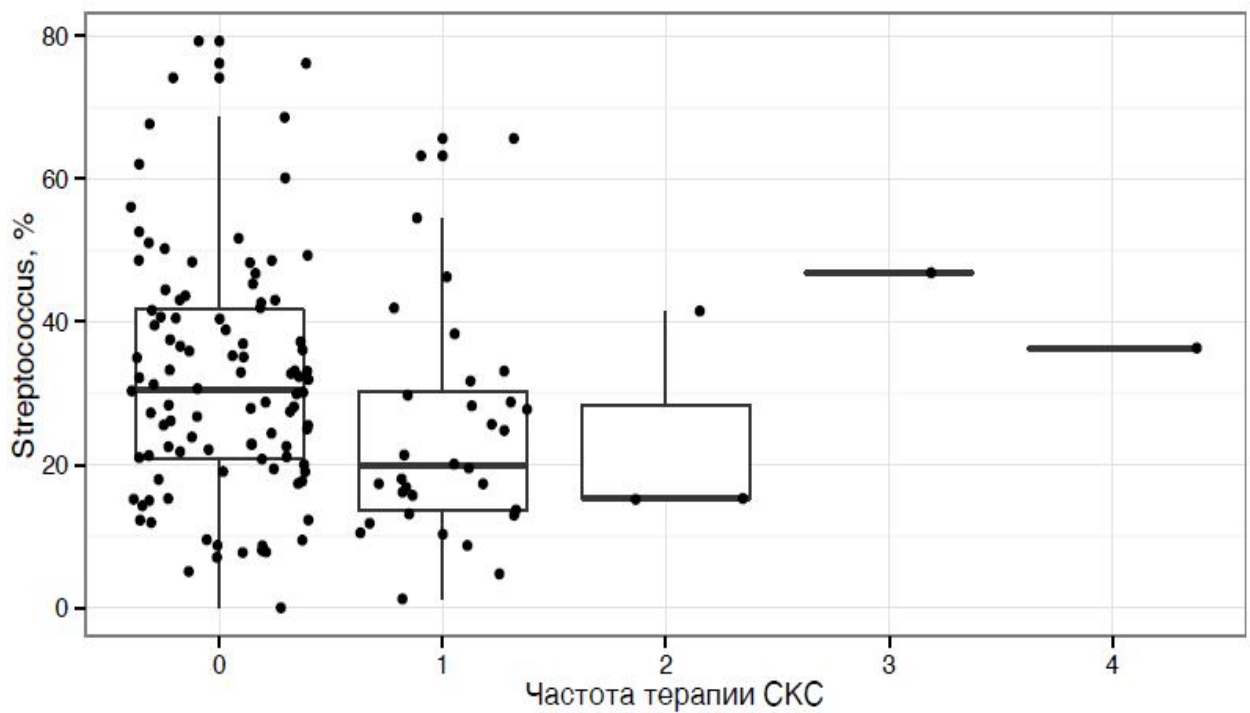


Рисунок 15 – Представленность рода *Streptococcus* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты эпизодов терапии СКС за предшествующие 12 месяцев

Примечание – *Streptococcus, %* – представленность *Streptococcus* в % бактериального генома.

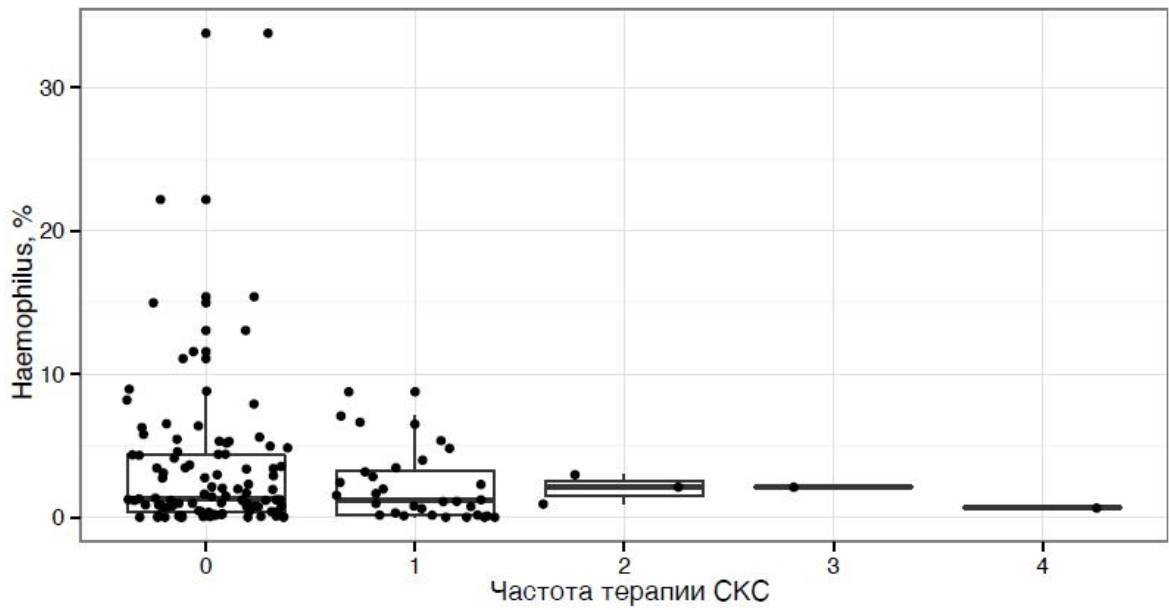


Рисунок 16 – Представленность рода *Haemophilus* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты эпизодов терапии СКС за предшествующие 12 месяцев

Примечание – *Haemophilus*, % – представленность *Haemophilus* в % бактериального генома.

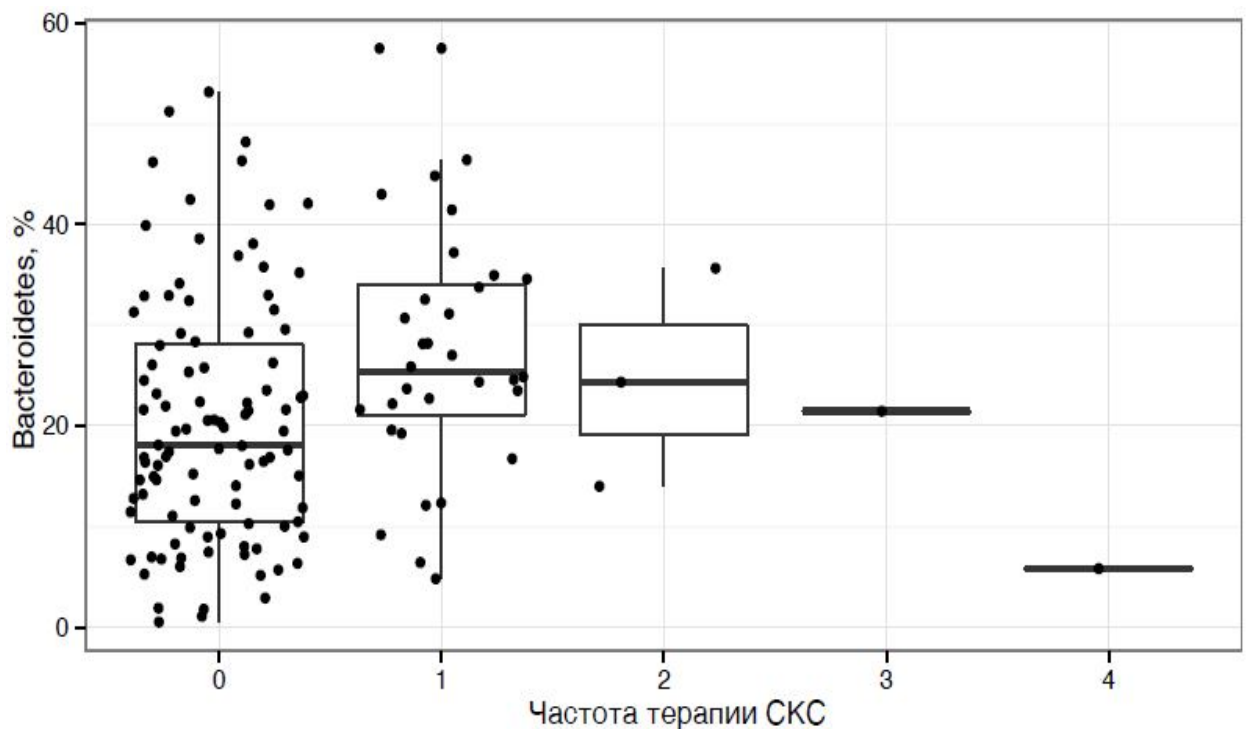


Рисунок 17 – Представленность отдела *Bacteroidetes* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты эпизодов терапии СКС за предшествующие 12 месяцев

Примечание – *Bacteroidetes*, % – представленность *Bacteroidetes* в % бактериального генома.

Несмотря на более высокую обсемененность представителями отдела *Bacteroidetes* образцов больных с анамнезом курсового приема СКС (в течение года до включения в исследование) по сравнению с пациентами без анамнеза применения СКС, по мере увеличения частоты приема глюкокортикостероидов намечается тренд к снижению содержания данных микроорганизмов в образцах (рис. 17).

Схожая закономерность наблюдается и на рисунке 18, отражающем динамику содержания бактерий рода *Prevotella* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты эпизодов терапии СКС за предшествующие 12 месяцев.

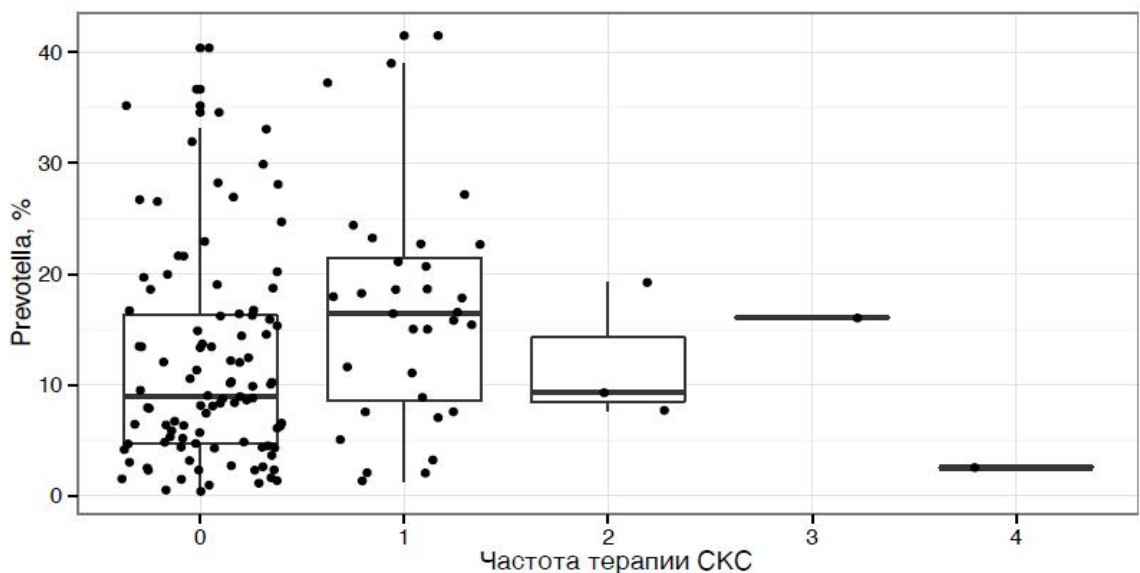


Рисунок 18 – Представленность рода *Prevotella* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты эпизодов терапии СКС за предшествующие 12 месяцев

Примечание – *Prevotella*, % – представленность *Prevotella* в % бактериального генома.

Возможно, при включении в исследование большего количества пациентов с частыми обострениями и ассоциированными с ними эпизодами курсового применения СКС, выявленный тренд был бы более значимым. Однако, на протяжении предшествующего года подавляющее большинство скринированных

в данной работе пациентов не применяло СКС (n=101), а 30 больным потребовался 1 курс приема глюкокортикостероидов в течение 12 месяцев. Небольшому количеству пациентов с наиболее тяжелым течением заболевания и частыми эпизодами обострения потребовалось 2 (3 больных тяжелой неконтролируемой БА и 1 пациент с ХОБЛ тяжелого течения), 3 (2 пациента с тяжелой неконтролируемой БА) и 4 (1 больной тяжелой неконтролируемой БА) курсовых приема преднизолона.

Следует отметить, что 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. 29) .

Таблица 29 – 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>Porphyromonas</i> (род)	-0,35	0,01
<i>Bacteroidetes</i> (тип)	0,09	0,01
<i>Prevotella</i> (род)	0,18	0,005

Для больных БА и ХОБЛ с более частыми госпитализациями характерна более высокая обсемененность орофарингеальных мазков бактериями рода *Actinomyces* (КНП= 0,334; p= 0,01) (рис. 19), а также снижение содержания представителей рода *Haemophilus* (КНП= -0,432; p= 0,01) (рис. 20).

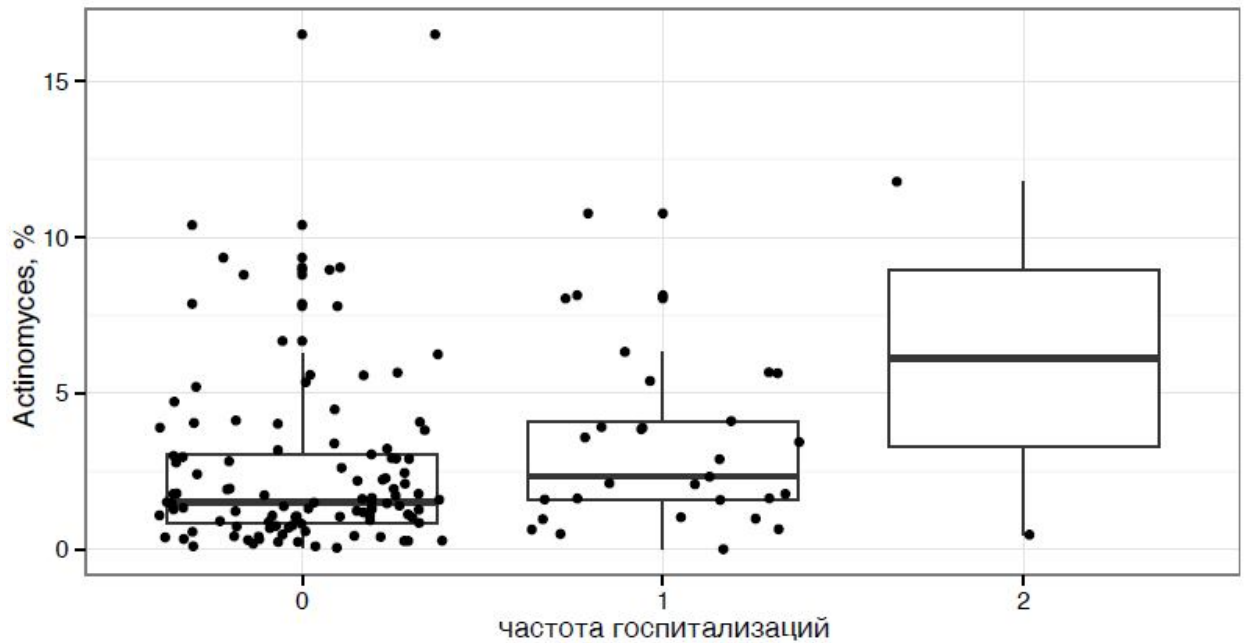


Рисунок 19 – Представленность рода *Actinomyces* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты госпитализаций за предшествующие 12 месяцев

Примечание – *Actinomyces*, % – представленность *Actinomyces* в % бактериального генома.

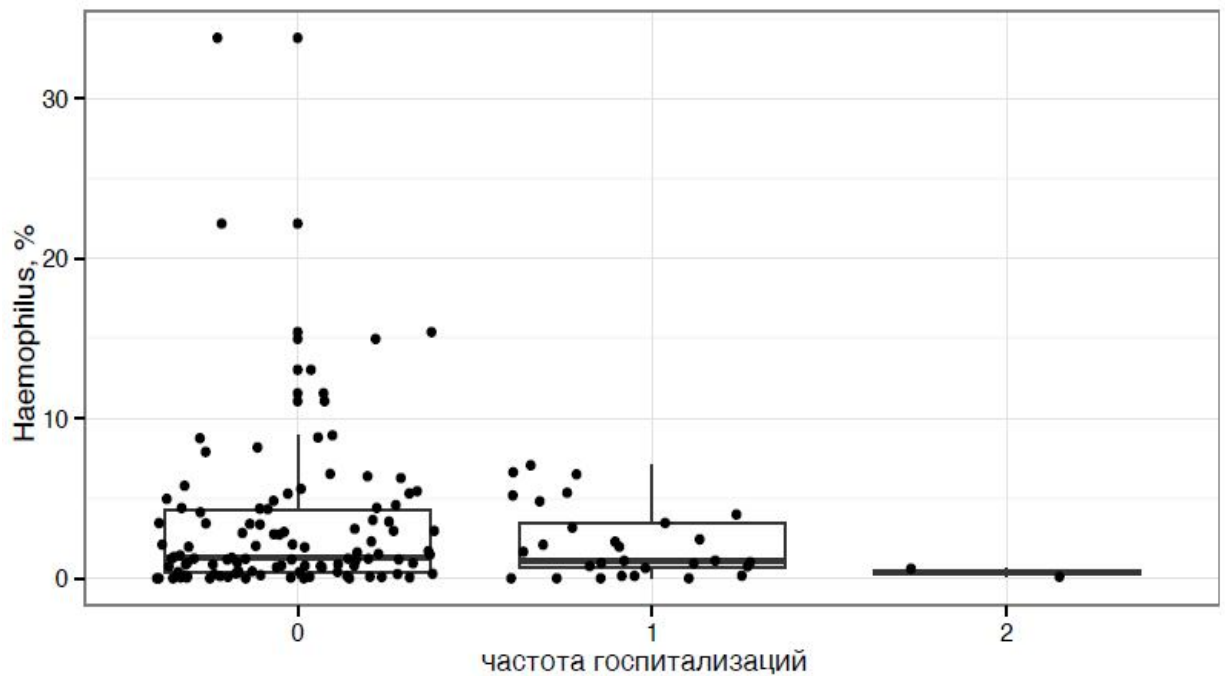


Рисунок 20 – Представленность рода *Haemophilus* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от частоты госпитализаций за предшествующие 12 месяцев

Примечание – *Haemophilus*, % – представленность *Haemophilus* в % бактериального генома.

Также как и для общей выборки (БА и ХОБЛ), у больных ХОБЛ частые госпитализации ассоциировались с более высокой обсемененностью орофарингеальных мазков бактериями рода *Actinomyces* (КНП= 0,33; $p= 0,01$), меньшей представленностью рода *Haemophilus* (КНП= -0,43; $p= 0,01$).

Более выраженная одышка (по результату заполнения опросника mMRC) у больных БА и ХОБЛ соотносилась со снижением представленности бактерий отдела *Proteobacteria* (КНП= -0,088; $p= 0,00094$) (рис. 21) и рода *Haemophilus* (КНП= -0,153; $p= 0,01$) (рис. 22). Указанные тренды сохраняли актуальность и для изолированной группы больных ХОБЛ – выявлена отрицательная зависимость между выраженностью одышки по шкале mMRC и содержанием в метагеномах образцов больных ХОБЛ *Proteobacteria* (КНП= -0,09; $p= 0,001$) и рода *Haemophilus* (КНП= -0,15; $p= 0,01$).

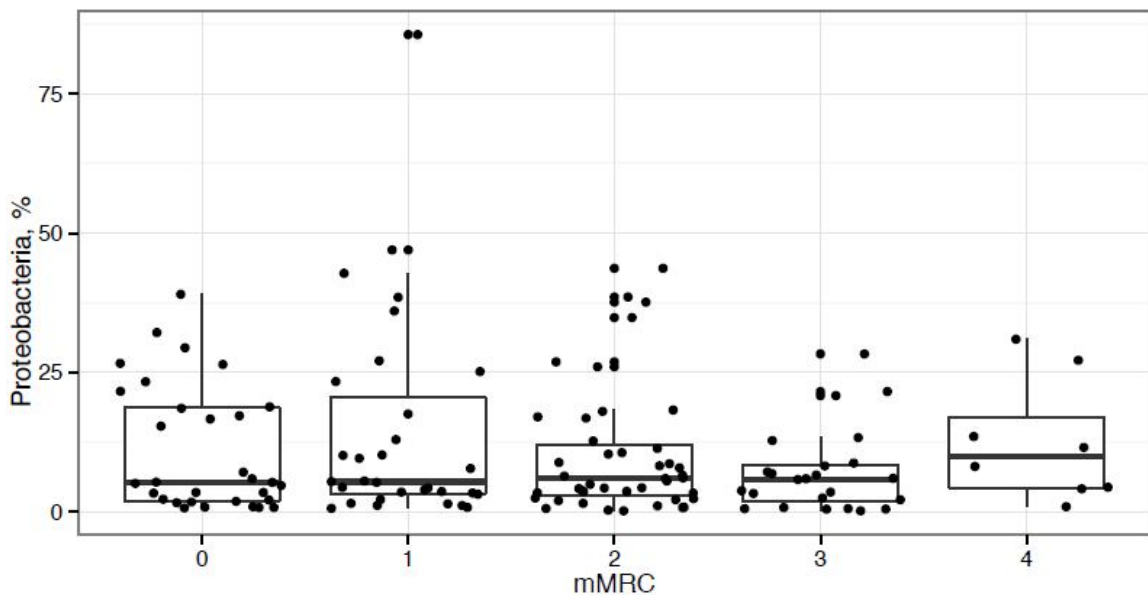


Рисунок 21 – Представленность отдела *Proteobacteria* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от выраженности одышки в баллах по опроснику mMRC

Примечание – *Proteobacteria*, % – представленность *Proteobacteria* в % бактериального генома; mMRC – выраженность одышки в баллах.

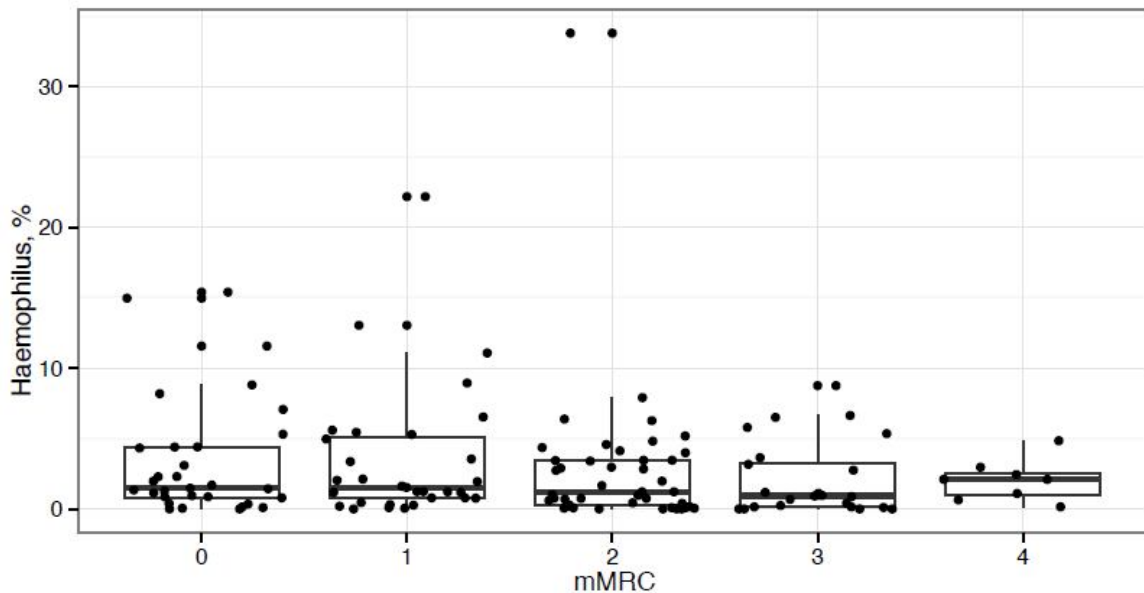


Рисунок 22 – Представленность рода *Haemophilus* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от выраженности одышки в баллах по опроснику mMRC

Примечание – *Haemophilus*, % – представленность *Haemophilus* в % бактериального генома; mMRC – выраженность одышки в баллах.

Следует отметить наличие статистически значимой ассоциации между выраженностью некоторых симптомов у больных БА и ХОБЛ и составом сообщества микроорганизмов орофарингеального региона. Так, 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) (рис. 23, 24) 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; $p= 0,0055$) (рис. 25).

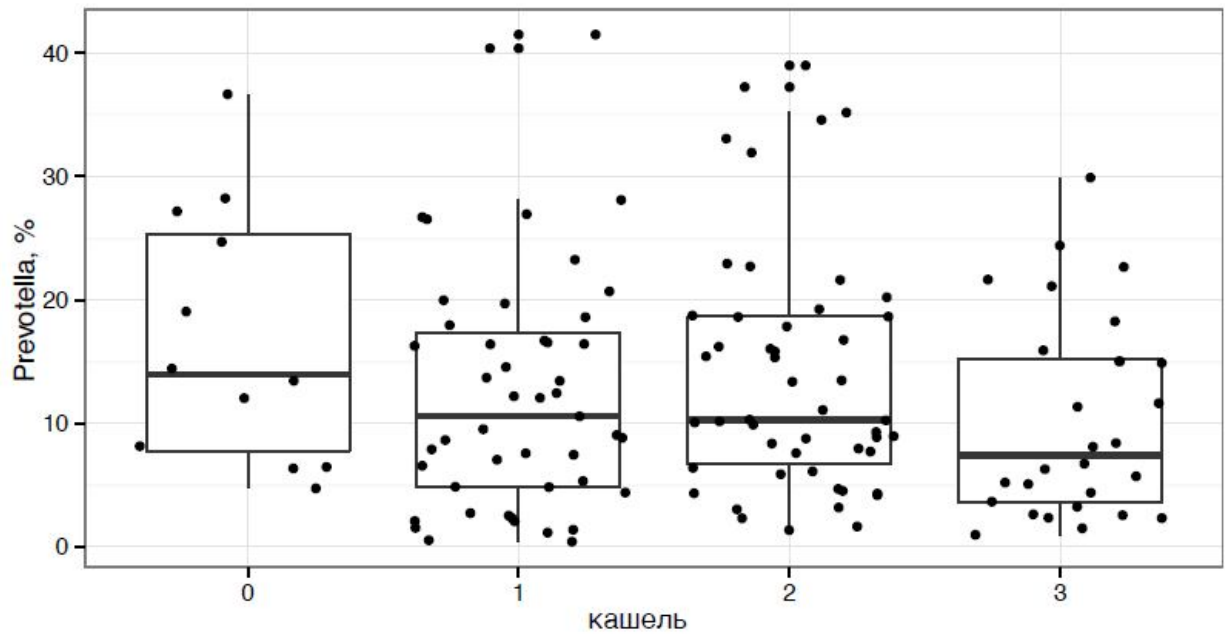


Рисунок 23 – Представленность рода *Prevotella* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от выраженности кашля

Примечание – *Prevotella*, % – представленность *Prevotella* в % бактериального генома; кашель – выраженность кашля в баллах по шкале Ю.Л. Куницыной и Е.И. Шмелева (2003) [15].

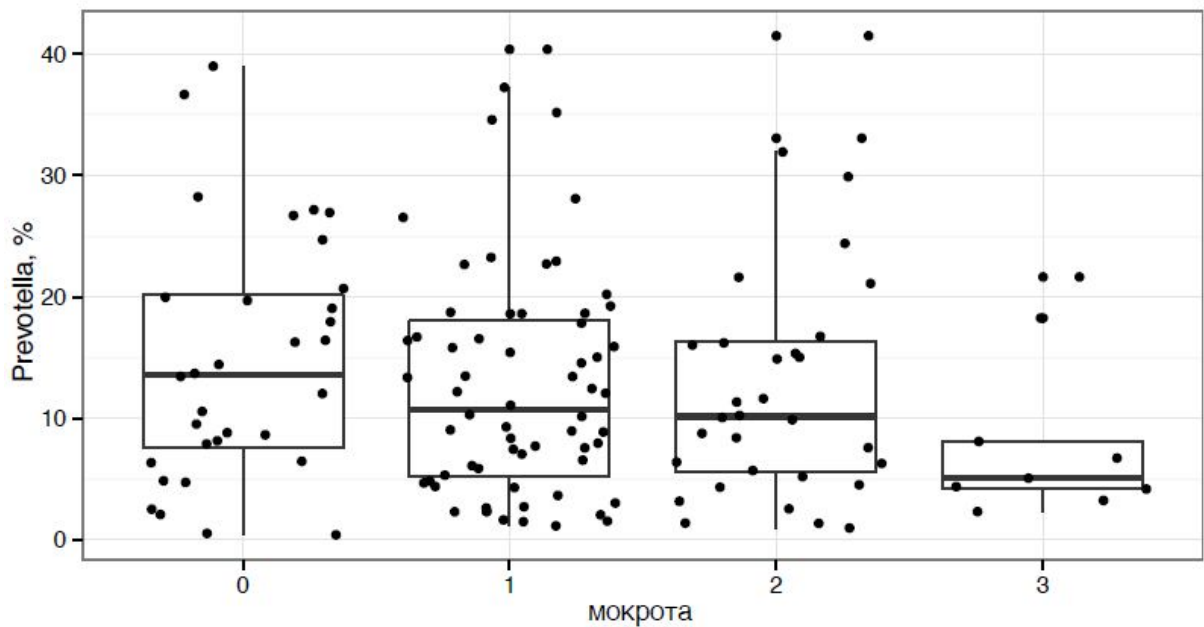


Рисунок 24 – Представленность рода *Prevotella* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от продукции мокроты

Примечание – *Prevotella*, % – представленность *Prevotella* в % бактериального генома; мокрота – продукция мокроты в баллах по шкале Ю.Л. Куницыной и Е.И. Шмелева (2003) [15].

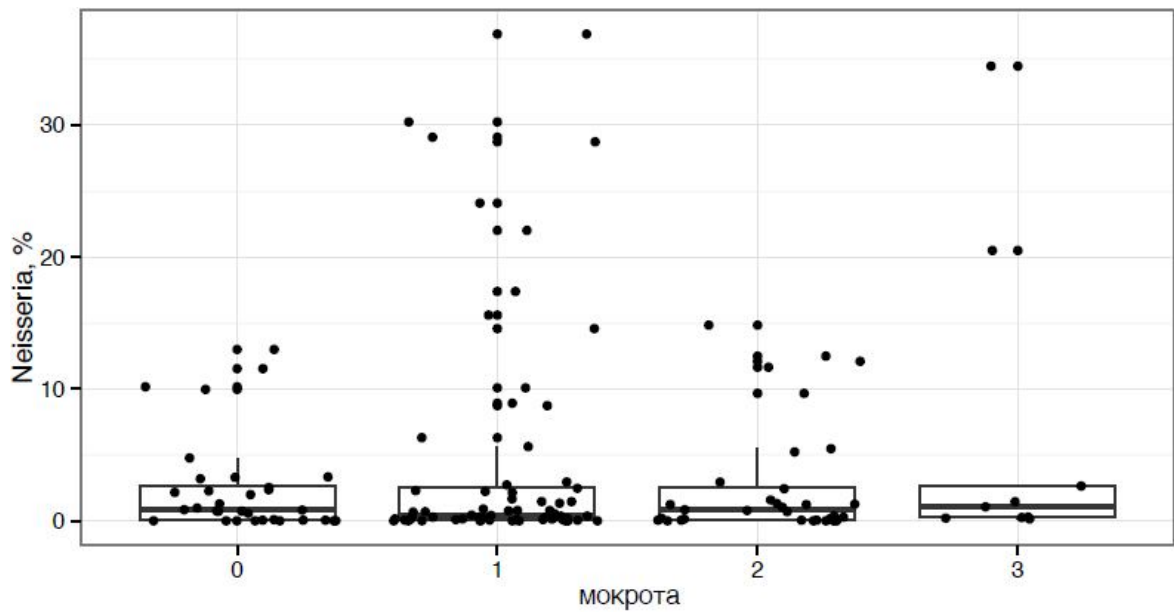


Рисунок 25 – Представленность рода *Neisseria* в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ в зависимости от продукции мокроты

Примечание – *Neisseria, %* – представленность *Neisseria* в % бактериального генома; *мокрота* – продукция мокроты в баллах по шкале Ю.Л. Куницыной и Е.И. Шмелева (2003) [15].

Также как и в общей группе больных БА и ХОБЛ, для изолированной группы пациентов с ХОБЛ, характеризующихся выраженным кашлем и продукцией мокроты свойственна меньшая обсемененность образцов бактериями рода *Prevotella* (КНП= -0,1; $p= 0,003$ и КНП= -0,12; $p= 0,001$ соответственно). Более высокое содержание в мазках представителей рода *Neisseria* характерно для больных ХОБЛ, отличающихся более выраженной продукцией мокроты (КНП= 0,17; $p= 0,006$).

4.4 Таксономическое разнообразие орофарингеальной микробиоты у больных БА и ХОБЛ

Известно, что менее разнообразная микробиота имеет меньший метаболический потенциал и обладает меньшей устойчивостью к воздействию патогенов. Учитывая, что больные ХОБЛ по сравнению с пациентами с БА характеризуются более частыми инфекционно-зависимыми обострениями с потребностью в системной антибиотикотерапии, способной оказывать влияние на

видовое многообразие микробиотических сообществ дыхательных путей, проведена оценка различий таксономического разнообразия (альфа-разнообразия) орофарингеальных микробиотических сообществ больных БА и ХОБЛ на основании сравнения значений индекса разнообразия Шеннона.

В результате проведенного анализа не выявлены статистически значимые различия в родовой представленности микроорганизмов, составляющих орофарингеальную микробиоту больных БА и ХОБЛ. На уровне родов орофарингеальная микробиота больных ХОБЛ характеризовалась столь же разнообразным таксономическим составом метагеномов, что и микробиота больных БА.

В то же время при сравнении показателей таксономического разнообразия орофарингеальной микробиоты у больных БА и ХОБЛ на уровне отделов 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; $p=0,031$) (рис. 26).

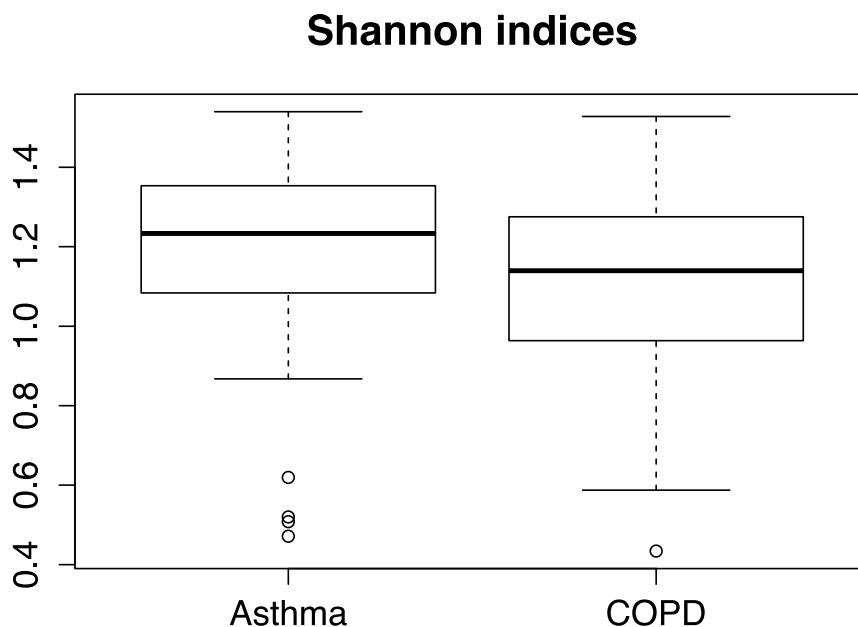


Рисунок 26 – Таксономическое разнообразие орофарингеальной микробиоты больных БА (n=50) и ХОБЛ (n=88)

Примечание – Asthma – образцы больных БА, COPD – образцы больных ХОБЛ).

Резюме

Таким образом, орофарингеальная микробиота пациентов с ХОБЛ в сравнении с больными БА отличается некоторым снижением таксономического разнообразия на уровне отделов бактерий, однако при сравнительном родовом анализе различия индекса альфа-разнообразия между группами образцов орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ не являются статистически значимыми.

В целом орофарингеальная микробиота больных БА и ХОБЛ характеризуется схожестью таксономического (качественного) состава как при межгрупповом анализе, так и при внутргрупповом сравнении таксономического состава исследуемых групп образцов больных легкой персистирующей и тяжелой БА, а также мазков пациентов со средне-тяжелой ХОБЛ в сравнении с орофарингеальными мазками больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения.

В число наиболее представленных микроорганизмов со значением 10% и более в структуре метагенома в образцах больных БА и ХОБЛ вошли роды *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veillonella*. Среди преобладающих микроорганизмов, составляющих от 2 до 10% микробиоты, в образцах больных ХОБЛ следует выделить роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Porphyromonas*, а в образцах пациентов с БА – роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Actinobacillus*.

При сравнении данных анализа таксономического состава орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ и пациентов с БА выявлен ряд статистически значимых количественных различий в представленности некоторых микроорганизмов. Так, образцы орофарингеальных мазков больных БА в сравнении с образцами пациентов с ХОБЛ характеризуются достоверно более высоким содержанием микроорганизмов, относящихся к отделу *Bacteroidetes*, более высокой представленностью *Prevotella melaninogenica* и микроорганизмов таких родов, как *Selenomonas*, *Granulicatella* и *Gemella*. В то же время в группе образцов больных ХОБЛ по сравнению с группой образцов пациентов с БА

выявлена более высокая представленность микроорганизмов родов *Veillonella* и *Actinomyces*, представителей родов *Aggregatibacter*, *Alcaligenaceae*, *Alloiococcus*, *Catonella*, *Mycoplasma*, *Peptoniphilus*, *Peptostreptococcaceae*, *Sediminibacterium* и *Bacteroides*, а также *Prevotella nigrescens* и *Haemophilus influenzae*.

Образцы больных легкой контролируемой и частично контролируемой астмой в отличие от образцов больных ХОБЛ среднетяжелого течения характеризуются более высокой представленностью как микроорганизмов рода *Fusobacterium*, так и в целом представителей отдела *Fusobacteria*. В то же время в образцах больных ХОБЛ 2 степени выше представленность бактерий отдела *Firmicutes* и рода *Veillonella* по сравнению с мазками пациентов с легкой БА. У больных тяжелой неконтролируемой БА содержание в орофарингеальных мазках микроорганизмов рода *Fusobacterium* достоверно выше, чем в образцах больных ХОБЛ среднетяжелого течения. В свою очередь, статистически значимые различия в составе орофарингеальной микробиоты у больных тяжелой неконтролируемой БА и ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения не выявлены.

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*.

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*.

В результате анализа значимых трендов в ассоциациях состава микробиоты с различными клинико-anamnestическими факторами выявлено, что

орофарингеальным мазкам объединенной группы пациентов с БА и ХОБЛ свойственно меньшее содержание бактерий отдела *Proteobacteria* при более высокой частоте обострений за предшествующие 12 месяцев.

Более высокой частоте курсового приема СКС больными БА и ХОБЛ на протяжении предшествующих 12 месяцев соответствовало меньшее содержание в орофарингеальных мазках представителей родов *Streptococcus* и *Haemophilus*, а также более высокая представленность микроорганизмов отдела *Bacteroidetes* и рода *Prevotella*.

Для больных БА и ХОБЛ с более частыми госпитализациями характерна более высокая обсемененность орофарингеальных мазков бактериями рода *Actinomyces*, а также менее выраженное содержание представителей рода *Haemophilus*.

Выраженная одышка (по результату заполнения опросника mMRC) у больных БА и ХОБЛ соотносилась с более низкой представленностью бактерий отдела *Proteobacteria* и рода *Haemophilus*.

Пациентам с выраженным кашлем и продукцией мокроты свойственна меньшая обсемененность образцов бактериями рода *Prevotella* по сравнению с образцами пациентов с менее выраженным кашлем. Более высокое содержание в мазках представителей рода *Neisseria* характерно для больных БА и ХОБЛ, отличающихся более выраженной продукцией мокроты.

Глава 5. Видовая идентификация и анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости орофарингеальных стрептококков у больных БА и ХОБЛ

Выраженные вентиляционные нарушения у больных ХОБЛ и БА представляют собой значимый фактор риска бактериальной контаминации респираторного тракта. Значение стрептококков – наиболее типичных бактерий-контаминантов дыхательных путей, обуславливающих по различным данным до половины случаев всех бактериальных инфекций респираторного тракта, – широко обсуждается в патогенезе хронических обструктивных заболеваний легких [7].

В настоящее время описаны два основных механизма формирования устойчивости стрептококков к макролидам (эритромицину, азитромицину и кларитромицину) – модификация мишени действия антибиотика и активный направленный эффлюкс. Первый вариант реализуется, как правило, за счет метилирования молекул 23SpРНК продуктом гена *ermB*, что приводит к устойчивости высокого уровня и обеспечивает перекрестную устойчивость к клиндамицину [201]. Другой путь связан с приобретением АТР-зависимых эффлюксных белков - продуктов *mef* генов. Наличие *mef* генов приводит к устойчивости низкого уровня, однако формирует перекрестную устойчивость к эритромицину, кларитромицину и азитромицину [200]. При этом резервуаром генетических детерминант устойчивости считаются непатогенные *S. mitis* и *S. oralis*.

В рамках данной работы в анализ включены 140 образцов орофарингеальных мазков от 89 больных ХОБЛ (средний возраст 58,03±8,6 лет) и 51 пациента с БА (средний возраст 51,55±12,25 лет). В исследовании участвовали 23 пациента с легкой контролируемой и частично контролируемой БА и 28 больных астмой тяжелого неконтролируемого течения, а также 58 пациентов со стабильной ХОБЛ 2 степени тяжести (средней степени тяжести по классификации GOLD, 2010), 31 пациент со стабильной ХОБЛ 3-4 степени (тяжелого и очень тяжелого течения по

классификации GOLD, 2010). Все пациенты на момент взятия мазков характеризовались стабильным течением заболевания с отсутствием анамнеза обострений и системной антибиотикотерапии на протяжении последних 4-х недель и более.

Биоматериал, полученный методом орофарингеального мазка, выполненного стерильной палочкой с ватным тампоном на конце, использован для экстракции ДНК с помощью набора FastDNA® SPIN Kit for Soil (MPBIO, США). Видовая идентификация и анализ генетических детерминант антибактериальной устойчивости стрептококков, изолированных из образцов орофарингеальных мазков пациентов со стабильным течением ХОБЛ и БА, выполнены с помощью экспериментальной диагностической панели «Стрептопол+» (ООО НПФ Литех) согласно протоколу производителя по принципу количественной ПЦР с регистрацией сигнала в реальном времени.

Проведение ПЦР и интерпретация полученных данных осуществлялись с помощью прибора CFX-96 (BioRad, США). Детекция продуктов прибором проводилась автоматически в каждом цикле амплификации. На основе этих данных при помощи управляющей программы построены кривые накопления флюоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналу.

Все образцы, цикл выхода которых был < 35 , считались отрицательными. По завершении всех действий при помощи программы автоматически рассчитаны точки пересечения кривых накопления флюоресцентного сигнала каждого образца с пороговой линией, что позволило идентифицировать наличие или отсутствие ДНК в исследуемых образцах.

Исходя из результатов лабораторной апробации, для мультиплексного набора «*Streptococcus spp / S. Pyogenus / S. agalacticae*» и для видоспецифичного набора на *S. pneumoniae* диагностическая чувствительность и специфичность составила 100%. Генетические тесты, направленные на предсказание устойчивости стрептококков к макролидам, продемонстрировали 100% чувствительность при диагностической специфичности 79 % [7].

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.

5.1 Генетические маркеры лекарственной устойчивости орофарингеальных стрептококков больных БА и ХОБЛ

В анализируемых образцах определялось наличие генетических детерминант устойчивости к макролидам (генов *mef* и *ermB*), реализующих два основных механизма формирования устойчивости стрептококков к макролидам (эритромицину, азитромицину и кларитромицину). Для определения степени представленности генов *mef* и *ermB* в орофарингеальных образцах выполнен анализ количественных данных по циклам выхода сигнала амплификации указанных генов. Косвенно, величина, обратная значению цикла выхода, отражает степень представленности анализируемых генетических маркеров устойчивости.

Присутствие генов *mef* зафиксировано у всех пациентов с ХОБЛ (в 89 образцах; 100 %), включая одного, в чьем образце стрептококки не найдены. Следует отметить, что в образце ДНК от этого пациента также обнаружен ген *ermB*. Данный факт вполне объясним возможностью распространения этих генов среди отличных от стрептококков бактерий, например микрококков.

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.

Поскольку наличие генов устойчивости орофарингеальной микробиоты у больных ХОБЛ может быть ассоциировано с высокой частотой инфекционно-зависимых обострений, ассоциированных с применением антибактериальных препаратов (АБП), выполнен детальный анализ больных ХОБЛ по таким клинико-анамнестическим характеристикам, как частота обострений и количество эпизодов системной терапии АБП. Так, только 6 пациентов из группы больных

ХОБЛ характеризовались отсутствием обострений на протяжении предшествующих 12 месяцев. Данные пациенты характеризовались среднетяжелым течением заболевания со слабо выраженными (<2 баллов по шкале mMRC) или выраженными (≥ 2 балла по шкале mMRC) симптомами и редкими обострениями (не более 1 в год). При этом у 5 из них орофарингеальные стрептококки характеризовались отсутствием гена *ermB*. В целом в группе больных 2 степени тяжести ХОБЛ частота обострений составила $1,81 \pm 1,2$ за год, а у пациентов с тяжелым и очень тяжелым течением – $2,6 \pm 1,7$ за год. При этом данные группы больных характеризовались статистически значимыми различиями по частоте обострений ($p=0,017$). У 34 обследованных пациентов с ХОБЛ (38,2 % больных) за предшествующий год зарегистрировано по 1 эпизоду обострения, у 19 пациентов (21,35 % больных) – по 2 эпизода, у 14 больных (15,73 % пациентов) на протяжении года развилось 3 эпизода обострения ХОБЛ и у 16 больных (17,97 %) – 4 и более эпизодов обострения заболевания. Следует отметить, что частота эпизодов применения АБП по поводу респираторных инфекций у больных ХОБЛ существенно варьировала – от 0 эпизодов при ХОБЛ средней степени тяжести до 5-6 эпизодов при тяжелом и очень тяжелом течении заболевания (средняя частота $1,69 \pm 1,48$ эпизодов в год).

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%). При этом больные БА, в образцах мазков которых отсутствовали гены *ermB*, демонстрировали вариабельность по тяжести заболевания и количеству обострений за прошедший год, однако этим больным не проводилась антибиотикотерапия на протяжении предшествующих 12 месяцев. 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 ($p>0,05$).

Поскольку ген *ermB* идентифицирован в образцах реже, чем ген *mef*, обнаруженный в 100% орофарингеальных мазков, в обобщенной выборке больных БА и ХОБЛ выделены 3 группы образцов в зависимости от результата выявления гена *ermB*: образцы с положительным результатом обнаружения гена *ermB* (группа *ermB* +; n=74), образцы со слабоположительным результатом обнаружения гена *ermB* (группа *ermB* +/-; n=49) и образцы с отрицательным результатом обнаружения (группа *ermB* -; n=17).

При сравнении клиничко-anamnestических данных между группами больных БА и ХОБЛ с отрицательным и слабоположительным результатом обнаружения гена *ermB* статистически значимые различия не выявлены ($p > 0,05$). В то же время выявлен ряд статистически значимых различий между группами *ermB* + и *ermB* -, *ermB* + и *ermB* +/-, а также *ermB* + и обобщенной группой, содержащей образцы *ermB* +/- и *ermB* - (табл. 30).

Таблица 30 – 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

Окончание таблицы 30

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± 29,3	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	$p_{1-2}=0,043$ $p_{1-3}=0,012$ $p_{1-4}=0,008$

Как видно из таблицы 30, больные БА и ХОБЛ с положительным результатом выявления гена *ermB* в орофарингеальных мазках достоверно отличались от других пациентов более выраженным содержанием орофарингеальных стрептококков в образцах и более высокой представленностью гена *mef*. Клинико-анамнестически данную группу больных (*ermB* +) можно охарактеризовать как наиболее злостных курильщиков с выраженной продукцией мокроты и высокой частотой курсовой терапии АБП, в частности макролидами.

Следует отметить, что изолированно среди больных ХОБЛ получены схожие различия при сравнении группы с положительным результатом определения гена *ermB* (*ermB* +; n=53) и обобщенной группы больных ХОБЛ со слабopоложительным и отрицательным результатами обнаружения гена *ermB* (*ermB* -; n=36).

Таблица 31 – Статистически значимые различия между группами больных 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> -	
n	53	36	
Представленность гена <i>mef</i> в мазках, расчетная величина	4,4±0,4	4,02±0,38	0,000043
Курсы АБП за год	2,14±1,59	1,0±1,16	0,0002
Курсы терапии макролидами за год	0,65±0,56	0,23±0,55	0,0012

Окончание таблицы 31

Обострения за 12 месяцев	2,53±1,8	1,71±1,34	0,036
Индекс курения, пачка/лет	65,45±34,9	42,26±22,6	0,0011

Примечательно, что группа больных ХОБЛ с положительным результатом детекции гена *ermB* в орофарингеальных мазках отличалась от пациентов с отсутствием данного гена или слабopоложительным результатом более высокой представленностью гена *mef*, более частыми курсами антибиотикотерапии, включая более частое применение макролидных АБП, выраженным риском обострений и характеризовались более существенным стажем курения (табл. 31).

При аналогичном анализе в группе больных БА пациенты, в образцах которых не обнаружено генов *ermB* (или же результат идентификации данного гена был слабopоложительным), отличались от больных с идентифицированным геном *ermB* существенно менее выраженной обсемененностью образцов стрептококками (2,7±3,49 и 6,94±4,03 соответственно) и представленностью гена *mef* (4,02±0,37 и 4,49±0,43 соответственно) (табл. 31).

5.2 Представленность генов *mef* и *ermB* в образцах орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ и клиничко-анамнестические 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* ($r=0,55$; $p=1,54E-11$). Схожий характер корреляционной связи сохранялся и при изолированном анализе по группе ХОБЛ ($r=0,55$; $p=3,09E-08$), а также в группе больных БА ($r=0,58$; $p=0,000088$).

В ходе исследования выполнен анализ корреляционных взаимодействий по Спирмену между уровнем представленности генов *mef*, *ermB* (по значениям циклов выхода сигнала амплификации данных генов) и некоторыми клиничко-функциональными характеристиками. Так, 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 антибактериальных препаратов (макролидов, в частности) и более выраженной продукцией мокроты (табл. 32).

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 антибактериальной терапии (в частности, эпизодов лечения макролидными АБП) за предшествующие 12 месяцев (табл. 32).

Таблица 32 – Анализ корреляционных связей между представленностью генов *mef* и *ermB* с клинико-анамнестическими характеристиками больных ХОБЛ

Представленность гена в образце	Клинико-амнестический 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
<i>Примечание</i> – n – количество исследованных образцов и пациентов; r – коэффициент корреляции; p – значение достоверности.				

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

5.3 Качественные и количественные особенности состава орофарингеальных стрептококков больных БА и ХОБЛ

Для определения ассоциации выраженности представленности 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. Для обобщенной выборки образцов орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ ($n = 140$) полученные значения варьировали от $-7,34$ до $19,9$. Анализ частот распределения позволил отнести 34 исследованных образца ($24,3\%$) в группу с низким обсеменением, 92 образца ($65,7\%$) попали в группу с высоким бактериальным обсеменением, а 14 (10%) образцов отнесены к «серой» зоне.

При проведении корреляционного анализа в обобщенной группе больных БА и ХОБЛ выявлено, что уровень обсемененности орофарингеальных мазков стрептококками положительно коррелирует с представленностью генов *mef* ($r=0,51$; $p=0,0000000001$) и *ermB* ($r=0,29$; $p=0,001$). При изолированном анализе в группе БА значение ΔCt также прямо коррелировало с представленностью генов *mef* ($r=0,57$; $p=0,000019$) и *ermB* ($r=0,57$; $p=0,0001$); у пациентов с ХОБЛ большее значение ΔCt в образцах соотносилось с более высокой представленностью гена *mef* ($r=0,45$; $p=0,000009$).

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. Так, у одного из этих больных на протяжении 12 месяцев зарегистрированы шесть эпизодов обострения ХОБЛ, ассоциированных с назначением АБТ. При этом в двух случаях обострения у данного больного применяли макролидные антибиотики (азитромицин и кларитромицин). 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. У двух пациентов со средней

степенью тяжести ХОБЛ риск обострений определен как низкий, и АБТ не протяжении предшествующих 12 месяцев не проводили.

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 ингаляционные глюкокортикостероиды (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. pyogenes* 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*.

Резюме

Таким образом, по результатам идентификации состава микроорганизмов, изолированных из образцов орофарингеальных мазков больных БА и ХОБЛ, стрептококки, являясь одним из наиболее типичных представителей бактерий, контаминирующих слизистую дыхательных путей у больных БА и ХОБЛ,

достоверно идентифицированы в 93,3% образцов пациентов с ХОБЛ и в 98% мазков больных БА.

Образцы орофарингеальных мазков имели различную степень обсемененности стрептококками. Так, 24,3% мазков больных БА и ХОБЛ отнесены в группу с низким обсеменением, 65,7% образцов сформировали группу с высоким бактериальным обсеменением, а 10% образцов отнесены к, так называемой, «серой» зоне.

В подавляющем большинстве идентифицированные стрептококки представлены зелеными стрептококками группы *mitis*.

Вне обострения заболевания *S. pneumoniae* в составе орофарингеальной микробиоты выявлен лишь у небольшой группы пациентов с БА (7,8%) и ХОБЛ (6,74%). Общей характеристикой этих больных является склонность к тяжелому течению заболевания и наличие повторяющихся эпизодов обострения с потребностью в назначении антибактериальных препаратов.

В 42,9% случаев в орофарингеальных мазках у больных БА и ХОБЛ вне обострения обнаружен *S. pyogenes*. При этом статистически значимые различия по частоте его идентификации между группами отсутствуют.

Идентифицированные стрептококки являются резервуаром генетических детерминант антибактериальной устойчивости – генов *mef* и *ermB*, кодирующих, в том числе, механизмы лекарственной резистентности стрептококков к воздействию макролидов (эритромицин, азитромицин и кларитромицин). Уровень представленности этих генов в мазках различается между пациентами и положительно коррелирует с выраженностью обсемененности образца стрептококками, при этом степени представленности генов *mef* и *ermB* находятся в прямой зависимости друг от друга.

Гены *mef* обнаружены в орофарингеальных мазках у всех обследованных больных БА и ХОБЛ, в то время как ген *ermB* встречался у 91% пациентов с ХОБЛ и несколько реже – у 82,4% пациентов с астмой. Примечательно, что образцы мазков с отсутствием гена *ermB* принадлежали больным ХОБЛ с низким риском обострений (по классификации GOLD, 2011), а также пациентам с БА и

ХОБЛ, не получавшим на протяжении предшествующих 12 месяцев антибиотикотерапию.

Следует отметить, что группа больных БА и ХОБЛ с положительным результатом определения гена *ermB* в образцах характеризовалась достоверно более высоким содержанием в мазках стрептококковой ДНК и представленностью гена *mef* по сравнению с пациентами, у которых ген *ermB* не выявлен или результат его идентификации был слабоположительным. Также больные с положительным результатом анализа на ген *ermB* отличались высоким индексом курения, выраженной продукцией мокроты и более частым применением АБП (в частности, класса макролидов) на протяжении предшествующих 12 месяцев.

Результаты исследования взаимосвязи наличия генов антибиотикорезистентности *mef* и *ermB* в образцах орофарингеальных мазков у больных ХОБЛ и БА с клинико-anamnestическими данными также подтверждают, что уровень представленности указанных генов положительно коррелирует с частотой эпизодов приема антибактериальных препаратов в целом и количеством курсов терапии макролидными АБП в частности.

Степень представленности генов антибиотикорезистентности *mef* и *ermB* в образцах орофарингеальных мазков соотносится с некоторыми клинико-anamnestическими особенностями течения заболевания. Так, при ХОБЛ выявлен положительный характер корреляции степени представленности гена *ermB* с выраженностью продукции мокроты и индексом курения, а генов *mef* и *ermB* с частотой обострений заболевания.

Глава 6. Результаты таксономического исследования кишечной микробиоты у пациентов с ХОБЛ, больных БА и здоровых лиц

Идентификация состава сообщества микроорганизмов кишечника у больных ХОБЛ в сравнении с микробиотическими сообществами больных БА и здоровых лиц представляет значительный интерес, поскольку данное заболевание сопряжено с системным воспалением и повторяющимися эпизодами курсовой антибактериальной терапии, что может влиять на качественный и количественный состав кишечной микробиоты.

С целью анализа таксономического состава кишечной микробиоты исследовано 58 образцов кала больных ХОБЛ (средний возраст $56,22 \pm 7,6$ лет), из них 34 пациента со среднетяжелой ХОБЛ и 24 больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения. Степень тяжести определяли в соответствии со спирометрической классификацией GOLD, 2010 [151].

Также исследованы 32 образца кала пациентов с БА (средний возраст $54,3 \pm 7,7$ лет), из них 10 образцов больных легкой контролируемой и частично контролируемой БА и 22 образца пациентов, страдающих тяжелой неконтролируемой астмой. Степень тяжести и контроля определены в соответствии с классификациями GINA [8, 147, 148, 149].

В исследование включены больные БА и пациенты с ХОБЛ стабильного течения с отсутствием анамнеза обострений и системной антибиотикотерапии на протяжении 4-х недель и более.

Для всех образцов кала после выделения тотальной ДНК и подготовки библиотек для секвенирования выполнено 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. Предварительный биоинформационный анализ данных заключался в фильтрации ридов по качеству. В результате фильтрации данных выяснено, что качество секвенирования соответствует требованиям качества по протоколу, - доля отфильтрованных

низкокачественных ридов составила $23,2 \pm 0,7\%$ (среднее \pm стандартное отклонение здесь и далее), доля ридов, отфильтрованных на геном человека, составила $1,5 \pm 1,7\%$. С целью определения таксономического состава микробиоты кишечника риды отражены на представительный каталог, содержащий 353 генома кишечных бактерий. Для каждого бактериального таксона (вида, рода) его относительная доля в числе всех бактерий вычислена, исходя из суммарной длины ридов, картированных на геномы, принадлежащие к таксону, и приведена к процентному представлению. Доля идентифицированных ридов составила $25 \pm 12,5\%$, что соответствует популяционной норме по протоколу метагеномного анализа.

В качестве дополнительной группы сравнения (контроля) использовали результаты открытой базы данных, содержащей исследованные по аналогичной методике образцы кала 402 здоровых добровольцев из 6 стран мира, включая 96 добровольцев из России [172], 137 из США [246], 85 из Дании [41], 69 из Китая [42], 5 из Малави и 10 из Венесуэлы [171].

В ходе исследования выполнен анализ таксономического состава метагеномных образцов кала больных ХОБЛ и БА в сравнении со здоровыми добровольцами, построенный по методу многомерного шкалирования – MDS – по метрике Bray-Curtis, где каждая точка соответствует 1 образцу. Чем точки ближе, тем ближе метагеномы по составу (рис. 27).

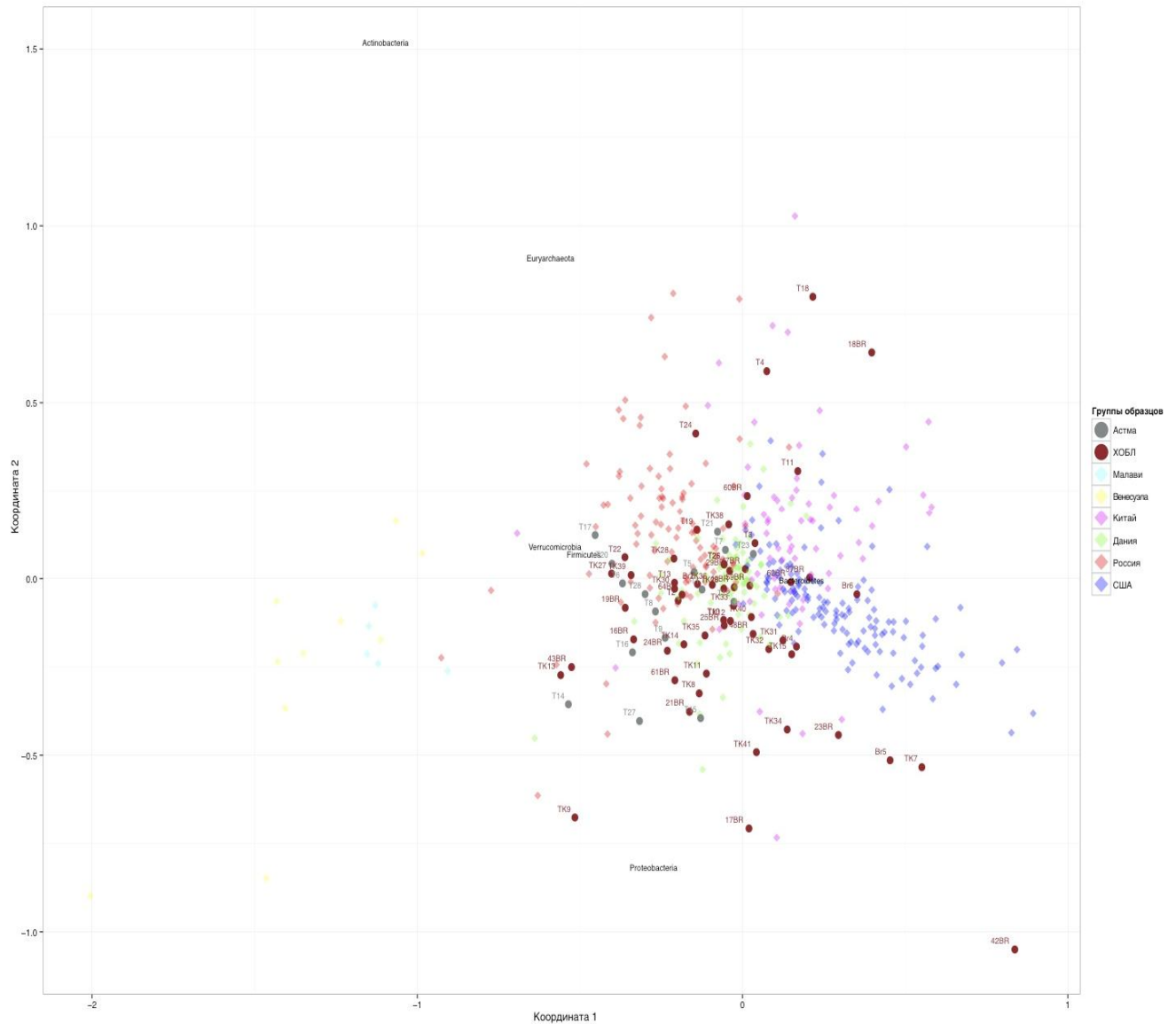


Рисунок 27 – График сходства таксономического состава метагеномов больных ХОБЛ (n=58), больных БА (n=32) в сравнении с образцами здоровых добровольцев (открытой базы данных из 402 образцов) с наложенным расстоянием по преобладающим бактериальным и архейным отделам

Примечание – Чем ближе точка (образец) к отделу, тем выше представленность данного отдела микроорганизмов в этом образце.

Как видно на рисунке 27, 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 не

выявлены существенные различия, которые позволили бы выделить анализируемые образцы в независимые группы.

При более детальном рассмотрении выделены преобладающие таксоны, составляющие не менее 2% от общего числа бактерий хотя бы в одном образце кала больных БА и пациентов с ХОБЛ. Данные таксоны приведены в диаграммах таксономического состава образцов кала больных ХОБЛ и БА на уровне рода (рис. 28) и вида (рис. 29), где строки диаграммы соответствуют соответствующим образцам (иерархически кластеризованы по сходству состава), а столбцы – бактериальным таксонам (следуют в порядке увеличения средней представленности по всей выборке слева направо).

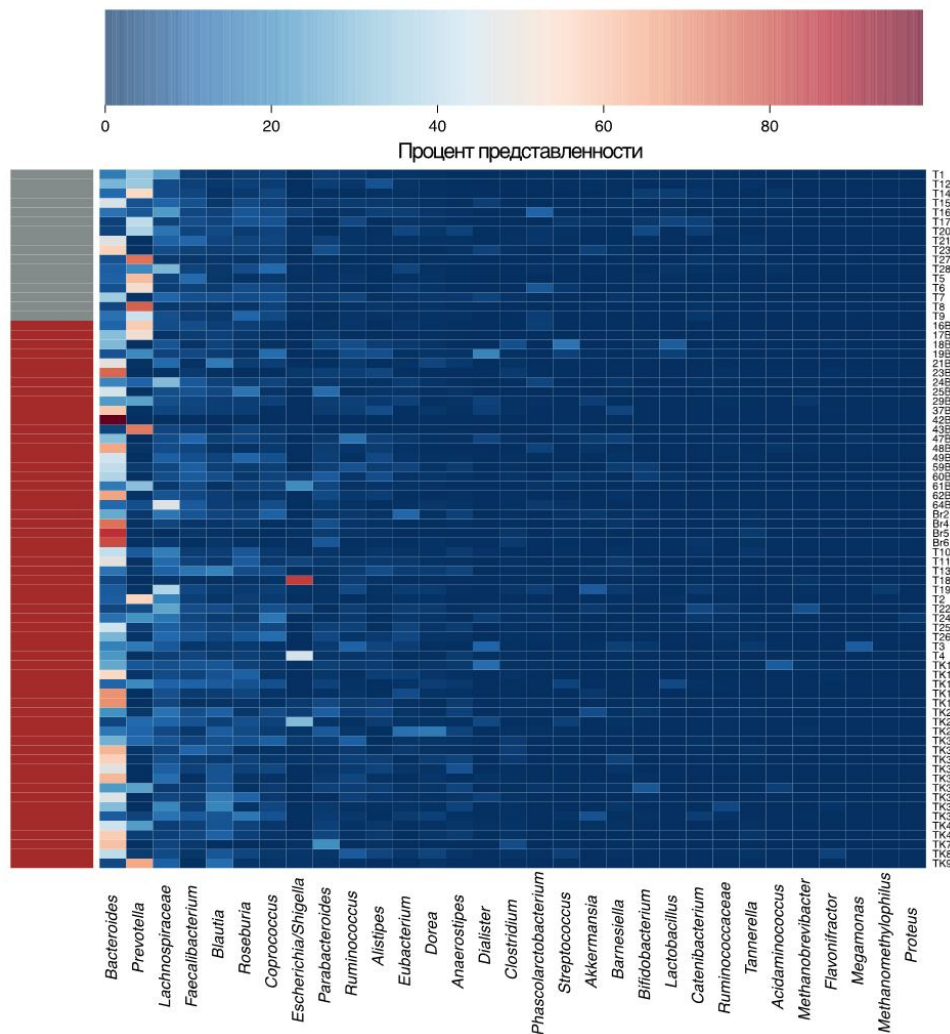


Рисунок 28 – Диаграмма (тепловая карта) таксономического состава образцов больных ХОБЛ (коричневый) и БА (серый) на уровне родов (которые представлены хотя бы в одном образце более чем на 2%)

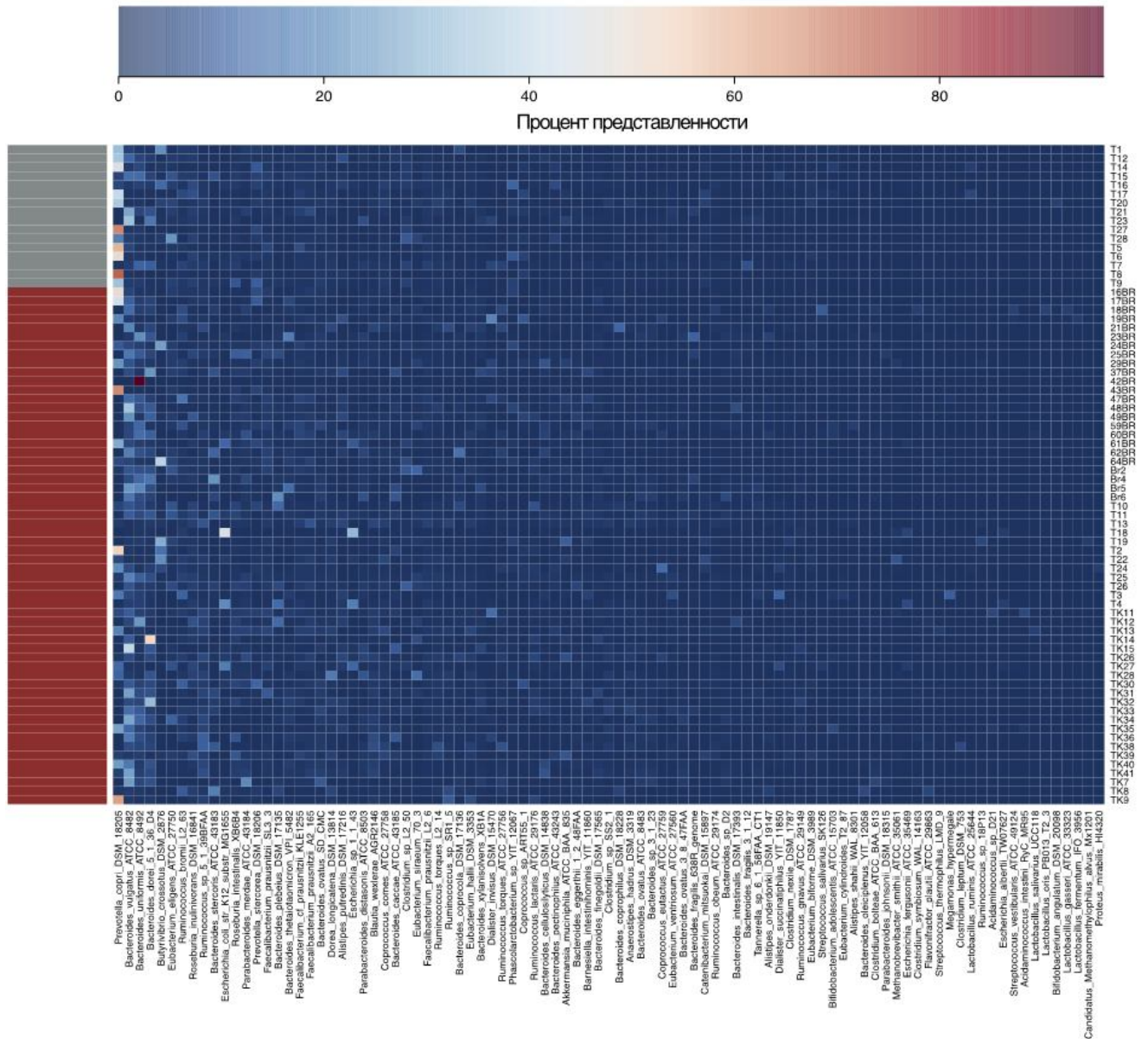


Рисунок 29 – Диаграмма (тепловая карта) таксономического состава образцов больных ХОБЛ (коричневый) и БА (серый) на уровне отдельных видов (которые представлены хотя бы в одном образце более чем на 2%)

В данных диаграммах обращает на себя внимание высокая представленность двух бактериальных родов. В одних образцах преобладают бактерии из рода *Prevotella*, а именно *Prevotella copri*, что соответствует так называемому второму энтеротипу, ассоциированному с диетой, богатой сложными углеводами [176]. В других образцах преобладают бактерии рода *Bacteroides*, что более характерно

для людей, придерживающихся так называемой «западной диеты», богатой белком и животными жирами [131, 176].

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 33 и 34 соответственно.

Таблица 33 – 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
<i>Примечание</i> – * Здесь и далее данные, представленные в виде $M \pm m$, означают среднее значение \pm стандартное отклонение.	

Следует отметить, что 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 ($7,7\pm 16,5\%$ и $4,1\pm 4,6\%$ 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* ($12,53\pm 10,2\%$ и $8,12\pm 7,9\%$ соответственно; $p=0,0001$).

Таблица 34 – 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

Окончание таблицы 34

<i>Barnesiella</i>	0,35±0,35
<i>Clostridium</i>	0,28±0,29
<i>Примечание</i> – * Здесь и далее данные, представленные в виде $M \pm m$, означают среднее значение \pm стандартное отклонение.	

При сравнении представленности идентифицированных геномов микроорганизмов в 2-х независимых группах (образцы больных легкой контролируемой и частично контролируемой БА и образцы больных тяжелой неконтролируемой БА) по методу Манна-Уитни статистически значимые различия не получены.

Анализ таксономического состава микроорганизмов в кале больных ХОБЛ позволил выделить ряд образцов, отличающихся высоким уровнем обсемененности представителями группы *Proteobacteria*, большинство из которых в норме отсутствует или слабо представлено в микробиоте кишечника. Наиболее ярко по содержанию *Proteobacteria* выделяются образцы Т4 (мужчина 70 лет со 2 степенью тяжести ХОБЛ) и Т18 (мужчина 77 лет с 3 степенью тяжести ХОБЛ), которые содержат чрезвычайно высокую долю бактерий рода *Escherichia coli* – 45% и 81%, соответственно, что нетипично для здорового кишечника и может указывать на вероятность наличия воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта [42].

Среди других протеобактерий, обнаруженных в образцах кала больных ХОБЛ и БА, обычно не детектируемых при метагеномном анализе у здоровых людей, следует отметить *Citrobacter* (найлены в 16 образцах), *Klebsiella* (в 13 образцах), *Enterobacter* (в 10 образцах), *Eggerthella* (в 11 образцах), *Proteus* (в 3 образцах), *Salmonella* (в 9 образцах), *Anaerococcus* (в 1 образце), *Clostridium difficile* (в 10 образцах), *Pseudomonas* (в 1 образце). Однако в ряде случаев уровень их представленности был невысок, что может отражать картирование на консервативные участки (табл. 35).

Таблица 35 – Группа *Proteobacteria*, представленная в образцах кала больных ХОБЛ и пациентов с БА

Роды бактерий	Количество образцов	% в составе метагенома
<i>Citrobacter</i>	16	0,03-0,93
<i>Klebsiella</i>	13	0,02-1,42
<i>Enterobacter</i>	10	0,01-1,57
<i>Eggerthella</i>	11	0,02-0,16
<i>Proteus</i>	3	0,05-2,3
<i>Salmonella</i>	9	0,02-0,13
<i>Anaerococcus</i>	1	0,05
<i>Clostridium difficile</i>	10	0,01-0,1
<i>Pseudomonas</i>	1	0,02

У двух пациентов, страдающих ХОБЛ в образцах кала (Т4 и ТК15) обнаружены условно-патогенные бактерии рода *Fusobacterium* (*Fusobacterium* sp. 2 1 31 – 0,011% и *Fusobacterium mortiferum* ATCC 9817 – 0,088%). По данным Kostic et al их наличие может быть ассоциировано с развитием кишечных опухолей [143]. В образце больного ХОБЛ Т19 обнаружен одноклеточный паразит *Blastocystis hominis* (0,14%).

6.1 Различия таксономического состава кишечной микробиоты у пациентов с ХОБЛ и здоровых добровольцев

Данный анализ выполнен для тех родов и видов идентифицированных микроорганизмов, представленность которых хотя бы в 1 образце из обеих групп больных (БА и ХОБЛ) превышает порог в 1%, различия в представленности таксонов считались статистически значимыми при уровне $p < 0,01$.

С помощью теста Манна-Уитни выявлены статистически значимые различия в представленности 5 родов (табл. 36) и 15 видов (табл. 37) между 58 образцами пациентов с ХОБЛ и 88 образцами метагенома кала здоровых жителей Российской Федерации ($p < 0,01$).

Таблица 36 – 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. 36, 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 37 – 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

Окончание таблицы 37

<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

При детальном анализе по видам и штаммам, результаты которого представлены в табл. 37, установлено, что в образцах кала больных ХОБЛ по сравнению со здоровыми добровольцами регистрируется статистически значимо более высокий уровень таких бактерий, как *Butyrivibrio crossotus* DSM 2876 (в 1,28 раза), *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503 (в 2,45 раза), *Bacteroides coprophilus* DSM 18228 (в 2,14 раза). Также в образцах кала больных ХОБЛ отмечено более высокое содержание *Paraprevotella xyliniphila* YIT 11841 (в 1,54 раза). Данные бактерии, как известно, производят из ксилана сукцинат, необходимый для питания и нормальной жизнедеятельности микроорганизма *Bacteroides coprophilus*, продуктом жизнедеятельности которых является пропионат [271].

В то же время у больных ХОБЛ в сравнении с группой контроля в образцах кала существенно снижается покрытие такими микроорганизмами, как *Prevotella copri* DSM 18205 (в 1,7 раза), *Dorea longicatena* DSM 13814 (в 1,28 раза), *Phascolarctobacterium* sp. YIT 12067 (в 2,18 раза), *Dialister succinatiphilus* YIT 11850 (в 1,49 раза), *Clostridium leptum* DSM 753 (в 1,1 раза). Также в кале больных ХОБЛ в сравнении с группой контроля выявлено снижение содержания таких потенциально полезных микроорганизмов, составляющих часть нормальной микробиоты кишечника, как *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA 835 (в 2,8 раза), бутират-продуцирующих *Ruminococcus obeum* ATCC 29174 (в 1,8 раза), *Ruminococcus obeum* A2 162 (в 1,5 раза), *Eubacterium cylindroides* T2 87 (в 1,37 раза) и *Roseburia inulinivorans* DSM 16841 (в 1,34 раза) (табл. 37).

В основном анализе использован порог, согласно которому геном микроорганизма должен быть покрыт метагеномными ридами образца хотя бы на 1% своей длины. Для низкопокрытых геномов микроорганизмов дополнительно выполнен анализ различий таксономического состава микробиотических сообществ между сравниваемыми группами образцов больных ХОБЛ и здоровых лиц путем построения линейной регрессионной модели по значениям количества

картировавшихся ридов на референсные геномы с использованием программного пакета для языка R metagenomeSeq.

Особого внимания заслуживает *Candida dubliniensis* для которой выявлены наиболее значимые различия между группами больных ХОБЛ и здоровыми добровольцами по значению коэффициента наклона прямой (силе вклада микроорганизма в различия между метагеномами сравниваемых групп образцов) – 7,93. И, хотя определяемое количество этих микроорганизмов мало (покрывается менее 1% генома), использованный высокочувствительный статистический метод выявил значимые различия между группами (p-value с поправкой по FDR составило $<0,00001$).

График, демонстрирующий более высокую обсемененность образцов кала больных ХОБЛ штаммом *Candida dubliniensis* CD36 1 по сравнению со здоровыми добровольцами представлен на рис. 30.

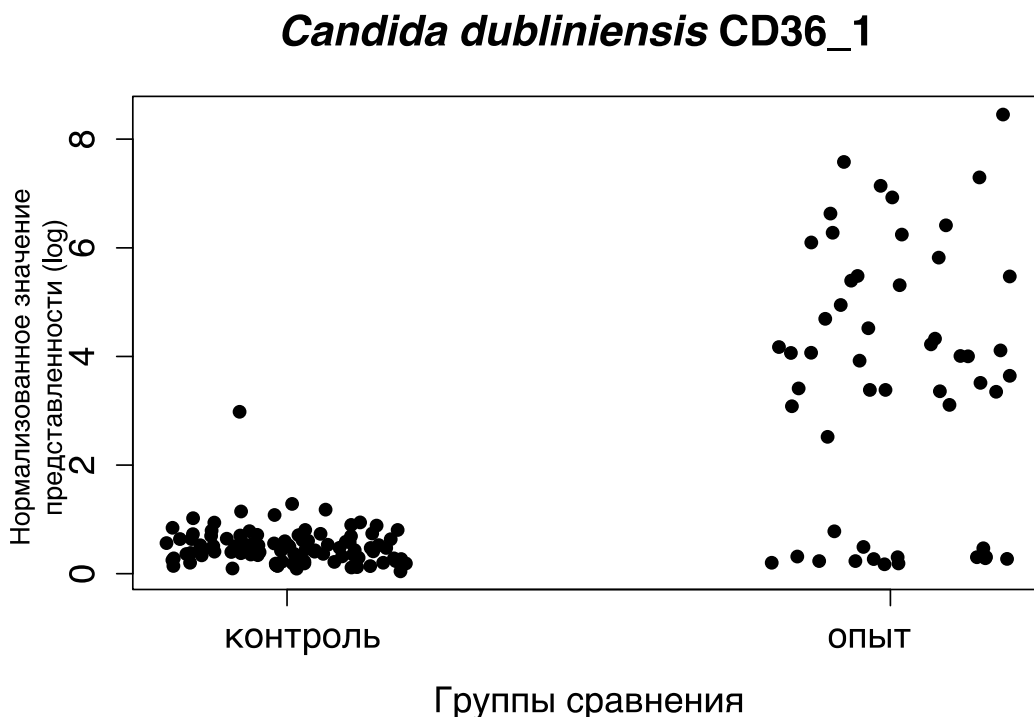


Рисунок 30 – Различия по обсемененности *Candida dubliniensis* CD36 1 исследуемых образцов кала больных ХОБЛ и здоровых лиц

Примечание – Контроль – образцы здоровых добровольцев, опыт – образцы больных ХОБЛ)

Схожий характер распределения различий между группами больных ХОБЛ и здоровых лиц получен в представленности *Candida albicans* – коэффициент наклона прямой 6,23; p-value с поправкой по FDR составило <0,00001 (рис. 31).

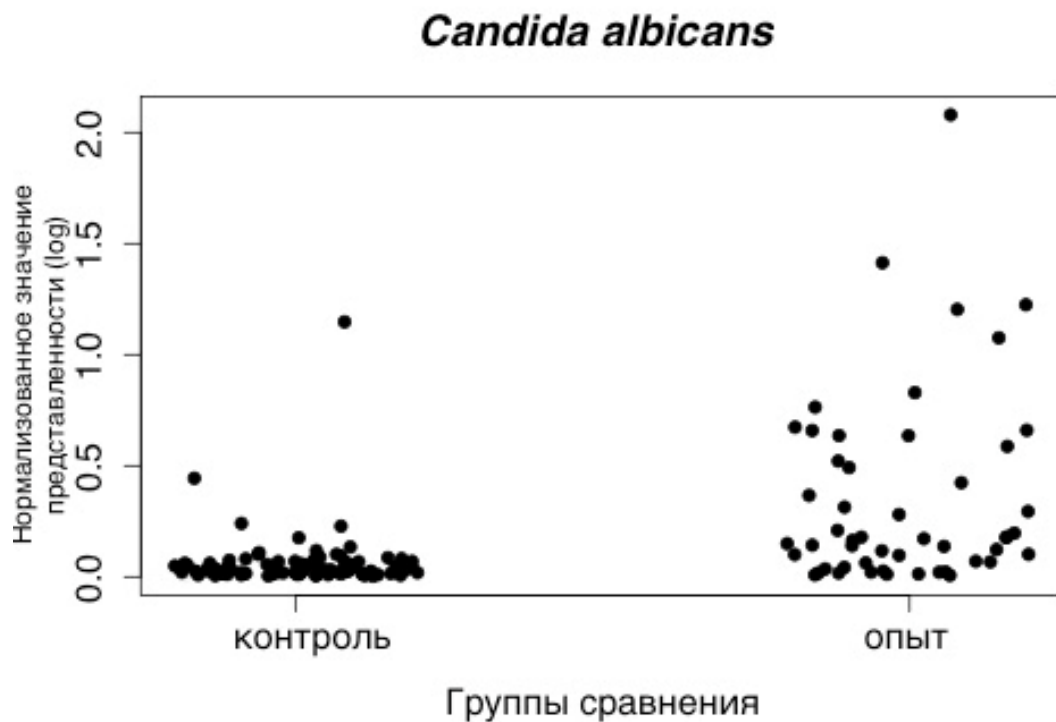


Рисунок 31 – Различия по обсемененности *Candida albicans* W60 исследуемых образцов кала больных ХОБЛ и здоровых лиц

Примечание – Контроль – образцы здоровых добровольцев, опыт – образцы больных ХОБЛ)

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.

6.2 Различия таксономического состава кишечной микробиоты у больных БА и здоровых добровольцев

Данный анализ выполнен для тех родов и видов идентифицированных микроорганизмов, представленность которых хотя бы в 1 образце из обеих групп

больных (БА и ХОБЛ) превышает порог в 1%, различия в представленности таксонов считались статистически значимыми при уровне $p < 0,01$.

С помощью теста Манна-Уитни выявлены статистически значимые различия в представленности 5 родов (табл. 38) и 1 вида (табл. 39) между 32 образцами пациентов с БА и 88 образцами метагенома кала здоровых жителей Российской Федерации ($p < 0,01$).

Таблица 38 – 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. 38).

Таблица 39 – 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-test)	% у больных БА	% в группе контроля
<i>Ruminococcus sp. 5 1 39BFAA</i>	0,0075	0,76±2,2	2,34±3,7
<i>Faecalibacterium prausnitzii A2 165</i>	0,0073	1,14±1,2	2,89±3

Окончание таблицы 39

<i>Bacteroides ovatus</i> SD CMC	0,0078	0,95±1,3	0,51±0,5
<i>Blautia wexlerae</i> AGR2146	0,0079	0,49±1,3	1,53±2,4
<i>Coprococcus catus</i> GD 7	0,0073	0,38±0,3	0,81±0,6
<i>Eubacterium cylindroides</i> T2 87	0,0093	0,18±0,3	0,37±0,25
<i>Clostridium bolteae</i> ATCC BAA 613	0,0051	0,02±0,6	0,09±0,15
<i>Collinsella aerofaciens</i> ATCC 25986	0,0073	0,1±0,2	0,34±0,4
<i>Acidaminococcus</i> sp. D21	0,009	0,02±0,6	0,07±0,07
<i>Lachnospiraceae bacterium</i> 3 1 57FAA CT1	0,0073	0,07±0,2	0,11±0,1
<i>Acidaminococcus fermentans</i> DSM 20731	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. 5 1 39BFAA (в 3,08 раза), *Faecalibacterium prausnitzii* A2 16 (в 2,53 раза), *Blautia wexlerae* AGR2146 (в 3,12 раза), *Coprococcus catus* GD 7 (в 2,13 раза), *Eubacterium cylindroides* T2 87 (в 2,05 раза), а также некоторым снижением представленности *Clostridium bolteae* ATCC BAA 613 (в 4,5 раза), *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 (в 3,4 раза), *Acidaminococcus* sp. D21 (в 3,5 раза) и *Lachnospiraceae bacterium* 3 1 57FAA CT1 (в 1,57 раза). В то же время кишечная микробиота пациентов, страдающих БА отличалась более высокой представленностью *Acidaminococcus fermentans* DSM 20731 (в 1,15 раза) и *Bacteroides ovatus* SD CMC (в 1,86 раза) (табл. 39).

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.

6.3 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* (в 2,95 раз). В то же время образцы кала больных БА уступали образцам больных ХОБЛ по уровню представленности бактериального рода *Parabacteroides* (в 2,03 раза ниже) (табл. 40).

Таблица 40 – Роды микроорганизмов, статистически значимо различающиеся по представленности в образцах кала у больных БА (n=32) и пациентов с ХОБЛ (n=58)

Роды микроорганизмов	p (U-тест)	% у больных БА	% у пациентов с ХОБЛ
<i>Parabacteroides</i>	0,0066	1,48±1,6	3,01±3,5
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,00054	1,68±3,1	0,57±0,95

При сравнении видового состава метагеномов кала больных ХОБЛ и БА выявлено, что образцы кала больных БА отличались достоверно более высоким содержанием *Prevotella stercorea DSM 18206* (в 2,55 раз выше) и *Phascolarctobacterium sp. YIT 12067*(в 2,95 раз выше) (табл. 41).

В то же время у больных ХОБЛ метагеномы кала характеризовались более высоким содержанием геномов *Bacteroides vulgatus ATCC 8482* (в 1,63 раза), *Bacteroides dorei 5 1 36 D4* (в 1,91 раза), *Escherichia coli str. K12 substr. MG1655* (в 5,5 раз) и *Escherichia sp. 1 1 43* (в 5, 34 раза) (табл. 41).

Таблица 41 – 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 ATCC 8482</i>	0,0013	5,19±9,6	8,47±8,9
<i>Bacteroides dorei 5 1 36 D4</i>	0,003	2,48±4,15	4,75±8,3

Окончание таблицы 41

<i>Escherichia coli str. K12 substr. MG1655</i>	0,001	0,4±0,4	2,21±6,9
<i>Prevotella stercorea DSM 18206</i>	0,00023	2,69±2,8	1,05±2
<i>Escherichia sp. 1 1 43</i>	0,008	0,29±0,3	1,55±4,7
<i>Phascolarctobacterium sp. YIT 12067</i>	0,0014	1,68±3,1	0,57±0,95

При сравнении представленности идентифицированных геномов микроорганизмов между группой образцов кала больных легкой контролируемой и частично контролируемой БА и метагеномами кала пациентов с ХОБЛ 2 степени тяжести по методу Манна-Уитни выявлен ряд статистически значимых различий (табл. 42).

Так, 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 типовых штаммов микроорганизмов *Bacteroides dorei 5 1 36 D4* (в 7,38 раз) и *Butyrivibrio crossotus DSM 2876* (в 5,15 раз) (табл. 42).

В то же время метагеномы кала пациентов с ХОБЛ средней степенью тяжести характеризовались менее выраженным содержанием *Prevotella stercorea DSM 18206* (в 4,82 раза) и представителей рода *Bifidobacterium* (в 8,19 раз) (табл. 42).

Таблица 42 – 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-test)	% 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			

Окончание таблицы 42

<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

Также выявлены различия в представленности микроорганизмов между группами образцов кала больных тяжелой неконтролируемой БА и ХОБЛ 2 степени тяжести. Так у больных среднетяжелой ХОБЛ по сравнению с группой пациентов, страдающих тяжелой неконтролируемой БА метагеномы кала характеризовались существенно более высокой представленностью бактерий рода *Escherichia* ($3,73 \pm 10,85$ и $0,59 \pm 0,5\%$ соответственно; $p=0,0005$) и менее выраженным содержанием *Eubacterium eligens* ATCC 27750 ($1,5 \pm 2,1$ и $3,13 \pm 5,5\%$ соответственно; $p=0,008$).

6.4 Результаты обобщенного линейного регрессионного анализа представленности микроорганизмов в образцах кала здоровых добровольцев, больных БА и пациентов с ХОБЛ

Известно, что тест Манн-Уитни позволяет сравнить только две выборки одновременно. Поэтому 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) [195].

Данный анализ выполнен для тех родов и видов идентифицированных микроорганизмов, представленность которых хотя бы в 1 образце из групп больных БА и ХОБЛ превышает порог в 1%, различия в представленности таксонов считались статистически значимыми при уровне $p < 0,01$.

В результате данного анализа выявлены 5 родов бактерий, достоверно различающихся между всеми выборками образцов (табл. 43). При этом рассчитанный коэффициент наклона прямой (КНП) в случае положительного значения демонстрирует увеличение степени обсемененности конкретными

микроорганизмами в ряду сравниваемых групп от образцов здоровых добровольцев (n=88) к метагеномам кала больных БА (n=32) и далее к образцам пациентов с ХОБЛ (n=58). В случае отрицательного значения КНП выраженность представленности анализируемого таксона микроорганизмов в указанном ряду снижается.

Таблица 43 – 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
<p><i>Примечания:</i> * 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.</p>		

Таким образом, 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 (табл. 43).

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. 43).

При аналогичном анализе различий представленности отдельных видов микроорганизмов в ряду образцов «образцы здоровых лиц – образцы больных БА – образцы больных ХОБЛ» выявлены статистически значимые различия между всеми выборками по 15 видам бактерий (табл. 44).

Таблица 44 – 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</i> sp. 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</i> sp. 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</i> sp. 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><i>Примечания:</i> * 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 p-value даны с поправкой FDR.</p>		

Согласно данным, приведенным в табл. 44, образцы кала больных ХОБЛ по сравнению с образцами здоровых лиц и пациентов с БА характеризовались наибольшей представленностью таких микроорганизмов, как *Eubacterium siraeum*

70 3, *Dialister invisus* DSM 15470, *Ruminococcus torques* ATCC 27756, *Parabacteroides johnsonii* DSM 18315 а также ряда представителей рода *Bacteroides* (*Bacteroides coprophilus* DSM 18228, *Bacteroides ovatus* 3 8 47FAA, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides intestinalis* DSM 17393, *Bacteroides oleiciplenus* YIT 12058). 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. 6 1 58FAA CT1 и *Escherichia fergusonii* ATCC 35469 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. 44; рис. 32, 33).

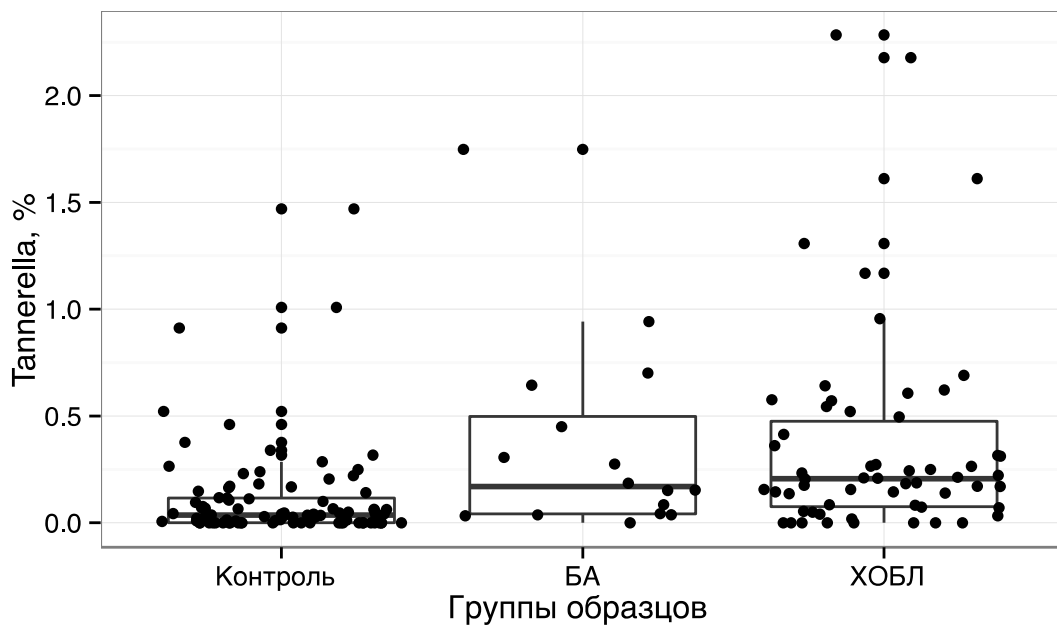


Рисунок 32 – Различия в содержании *Tannerella* sp. 6 1 58FAA CT1 в образцах кала здоровых лиц, больных БА и пациентов с ХОБЛ по данным обобщенного линейного регрессионного анализа ($\beta=0,55$; $p=0,0065$)

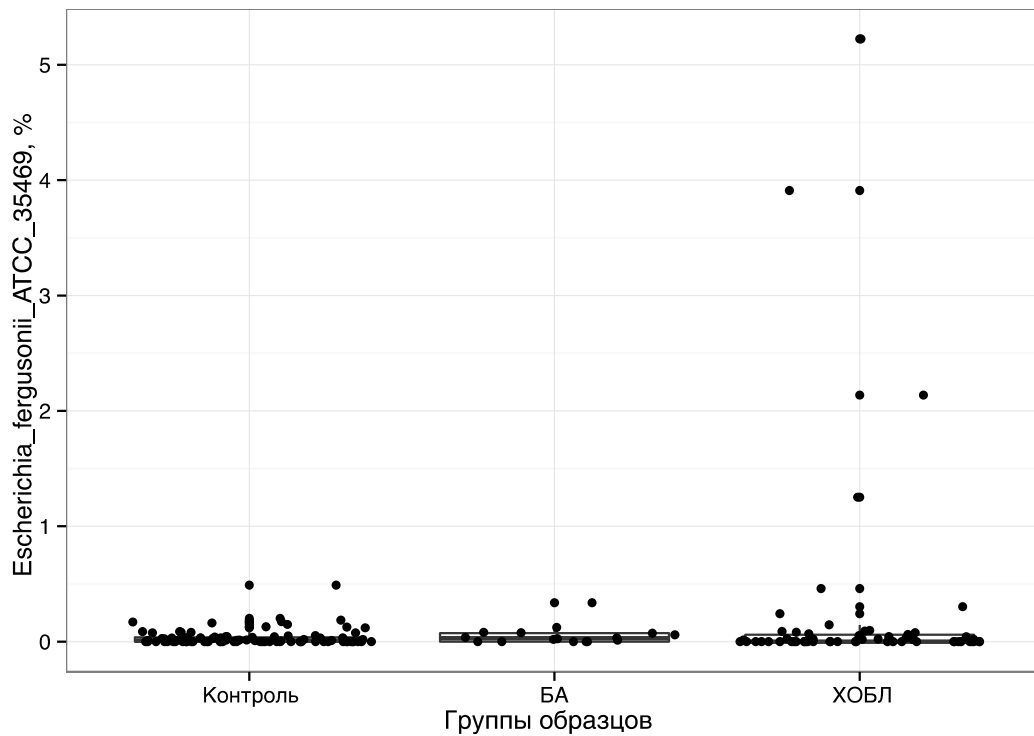


Рисунок 33 – Различия в содержании *Escherichia fergusonii* ATCC 35469 в образцах кала здоровых лиц, больных БА и пациентов с ХОБЛ по данным обобщенного линейного регрессионного анализа ($\beta=1,0$; $p=0,0038$)

Противоположные результаты представленности между сравниваемыми группами получены для таких микроорганизмов, как *Phascolarctobacterium sp. YIT 12067*, *Coprococcus catus GD 7*, *Eubacterium bifforme DSM 3989*, *Lactobacillus ruminis ATCC 25644*, *Bifidobacterium catenulatum DSM 16992* и продуцирующие бутират *Ruminococcus torques L2 14*. Максимальное содержание данных бактерий зарегистрировано в образцах кала здоровых лиц, промежуточное – у больных БА, и минимальное – в образцах пациентов с ХОБЛ (табл. 44).

Для обобщенной выборки образцов кала больных ХОБЛ и БА выполнен корреляционный анализ взаимосвязи между уровнем представленности различных бактериальных геномов в метагеномах кала и некоторыми клинико-анамнестическими характеристиками. В результате анализа выявлено, что частота приема антибактериальных препаратов на протяжении предшествующих 12 месяцев прямо коррелирует с выраженностью обсеменения образцов кала такими микроорганизмами, как *Bacteroides vulgatus ATCC 8482*, *Bacteroides uniformis ATCC 8492*, *Bacteroides dorei 5 1 36 D4*, *Bacteroides stercoris ATCC*

43183, *Bacteroides caccae* ATCC 43185, *Bacteroides xylanisolvens* XB1A и обратно коррелирует с представленностью *Clostridium* sp. L2 50 и бактерий рода *Coprococcus* (табл. 45).

Таблица 45 – 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</i> sp. 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

6.5 Таксономическое разнообразие кишечной микробиоты у больных ХОБЛ и пациентов с БА в сравнении со здоровыми добровольцами

Снижение таксономического разнообразия кишечной микробиоты (альфа-разнообразие) наблюдается при различных воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, а также у лиц, применяющих антибиотики или получающих химиотерапию. Менее разнообразная микробиота имеет меньший метаболический потенциал и обладает меньшей устойчивостью к воздействию патогенов. Учитывая неизбежность обострений у больных ХОБЛ, увеличение их частоты по мере прогрессирования болезни и потребность в антибиотикотерапии для их купирования, мы предположили возможность подобного снижения альфа-разнообразия в образцах кала больных ХОБЛ в сравнении с группой контроля и пациентами с БА. Однако статистически значимые различия по индексу альфа-разнообразия не получены (p (U-test) = 0,85 в сравнении с образцами здоровых добровольцев и p (U-test) = 0,04 в сравнении с образцами больных БА (различия не учтены в связи с заданным пороговым значением $p < 0,01$) – кишечная

микробиота больных ХОБЛ характеризовалась столь же разнообразным таксономическим составом метагеномов, что и микробиота кишечника пациентов с БА, а также здоровых добровольцев (рис. 34).

Статистически значимых различий по индексу альфа-разнообразия между кишечной микробиотой больных БА и здоровых добровольцев также не получено (p (U-тест) = 0,05) (рис. 34).

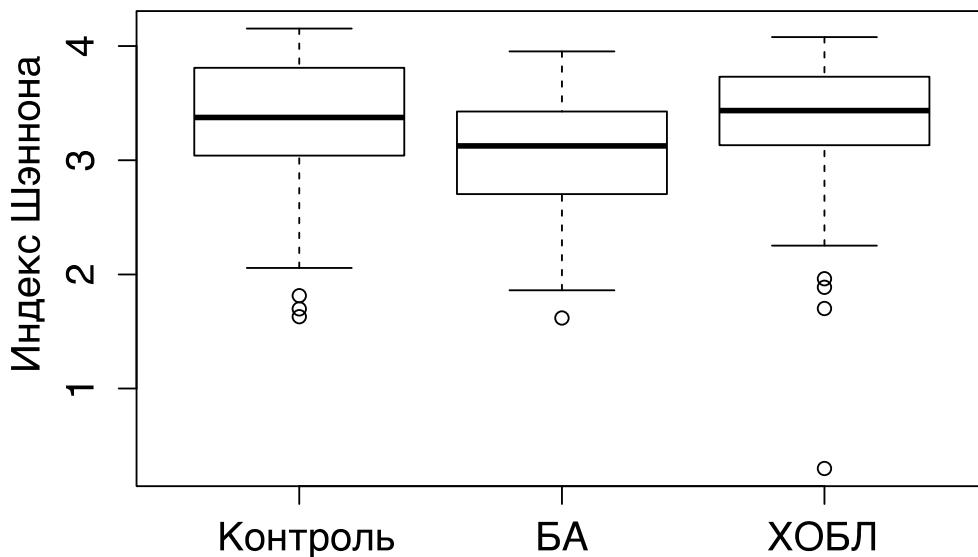


Рисунок 34 – Таксономическое разнообразие кишечной микробиоты у больных ХОБЛ (n=58), пациентов с БА (n=32) и здоровых добровольцев (n= 88)

Примечание – Контроль – образцы здоровых добровольцев, БА – образцы больных БА, ХОБЛ – образцы больных ХОБЛ

Следует отметить один образец кала, полученный от больного ХОБЛ (42 группы ХОБЛ), для которого значение индекса альфа разнообразия составило 0,11. Данный образец характеризовался рекордным содержанием микроорганизмов рода *Bacteroides* – 98,5%.

Резюме

Таким образом, сообщество микроорганизмов кишечника у больных ХОБЛ и пациентов, страдающих БА, характеризуется столь же разнообразным

таксономическим составом метагеномов, что и микробиота здоровых добровольцев. Между собой группы образцов больных БА и ХОБЛ по значению индекса альфа-разнообразия также не различались.

Образцы кала больных ХОБЛ, пациентов, страдающих БА, и здоровых лиц по качественному составу микробиотических сообществ обладают сходными чертами и не имеют крайне значимых различий, которые позволили бы выделить те или иные образцы в независимую группу.

В то же время состав кишечной микробиоты у больных ХОБЛ и пациентов с БА характеризуется рядом качественных и количественных особенностей в сравнениями с микробиотическими сообществами кишечника здоровых лиц. Об этом свидетельствуют статистически значимые различия в представленности 5 родов и 15 видов микроорганизмов в образцах кала больных ХОБЛ, а также различия в количественном содержании микроорганизмов 5 родов и 1 вида бактерий в образцах кала больных БА в сравнении со здоровыми добровольцами.

Так, по сравнению с метагеномами кала здоровых лиц, образцы пациентов с БА характеризовались более низкой представленностью бутират-продуцирующих бактерий рода *Ruminococcaceae*, а также бактерий рода *Blautia*, *Clostridium*, *Subdoligranulum*, *Collinsella*. Существенно более низким в образцах больных БА было содержание таких микроорганизмов, как *Ruminococcus sp. 5 1 39BFAA*, *Faecalibacterium prausnitzii A2 16*, *Blautia wexlerae AGR2146*, *Coprococcus catus GD 7*, *Eubacterium cylindroides T2 87*, установлено некоторое снижение представленности *Clostridium bolteae ATCC BAA 613*, *Collinsella aerofaciens ATCC 25986*, *Acidaminococcus sp. D21* и *Lachnospiraceae bacterium 3 1 57FAA CT1*. В то же время метагеномы кала пациентов с БА в отличие от здоровых лиц отличались более высокой представленностью *Acidaminococcus fermentans DSM 20731* и *Bacteroides ovatus SD CMC*.

Кишечная микробиота больных ХОБЛ достоверно отличалась от сообщества микроорганизмов здоровых добровольцев пониженным содержанием бактерий-комменсалов, составляющих нормофлору кишечника (бактерии рода *Dorea*, *Phascolarctobacterium*, *Akkermansia*), сниженным покрытием такими

микроорганизмами, как *Prevotella copri* DSM 18205, *Dorea longicatena* DSM 13814, *Phascolarctobacterium* sp. YIT 12067, *Dialister succinatiphilus* YIT 11850, *Clostridium leptum* DSM 753. В кале больных ХОБЛ в сравнении с группой контроля выявлено снижение содержания таких потенциально полезных микроорганизмов, составляющих часть нормальной микробиоты кишечника, как *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA 835, бутират-продуцирующих *Ruminococcus obeum* ATCC 29174, *Ruminococcus obeum* A2 162, *Eubacterium cylindroides* T2 87 и *Roseburia inulinivorans* DSM 16841.

В образцах кала больных ХОБЛ наблюдалась более выраженная представленность микроорганизмов рода *Odoribacter* и *Paraprevotella*, типовых бактериальных штаммов *Butyrivibrio crossotus* DSM 2876, *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503, *Bacteroides coprophilus* DSM 18228, а также сукцинат производящих *Paraprevotella xylaniphila* YIT 11841.

Более тяжелые пациенты с ХОБЛ (3-4 степень тяжести) характеризовались меньшим содержанием микроорганизмов рода *Lachnospiraceae* и более выраженной представленностью *Bacteroides uniformis* ATCC 8492 образцах кала по сравнению с образцами больных ХОБЛ 2 степени тяжести.

Ряд образцов кала больных БА и ХОБЛ отличался наличием в норме отсутствующих или слабо представленных микроорганизмов группы Proteobacteria таких, как *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Eggerthella*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*.

Ряд статистически значимых различий выявлен при сравнении метагеномов кала больных БА и пациентов с ХОБЛ. Так, образцы кала больных БА в сравнении с образцами пациентов с ХОБЛ характеризовались достоверно более высоким содержанием микроорганизмов, относящихся к роду *Phascolarctobacterium* (включая *Phascolarctobacterium* sp. YIT 12067) и *Prevotella stercorea* DSM 18206.

В то же время образцы кала больных БА уступали образцам больных ХОБЛ по уровню представленности бактерий рода *Parabacteroides*, а также

микроорганизмов *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, *Bacteroides dorei* 5 1 36 D4, *Escherichia coli* str. K12 substr. MG1655 и *Escherichia* sp. 1 1 43.

Отметим, что образцы больных ХОБЛ 2 степени тяжести отличались от образцов кала пациентов с легкой БА более высокой представленностью бактериальных родов *Lachnospiraceae*, *Escherichia* и *Parabacteroides*, а также типовых штаммов микроорганизмов *Bacteroides dorei* 5 1 36 D4 и *Butyrivibrio crossotus* DSM 2876, но при этом менее выраженным содержанием *Prevotella stercorea* DSM 18206 и представителей рода *Bifidobacterium*. У больных среднетяжелой ХОБЛ по сравнению с образцами кала пациентов с БА отмечена более высокая представленность бактерий рода *Escherichia* и менее выраженное содержание *Eubacterium eligens* ATCC 27750.

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 низким содержанием представителей рода *Lachnospiraceae*, *Blautia*, *Phascolarctobacterium* и *Lactobacillus*, но также наивысшей среди сравниваемых групп образцов представленностью потенциально патогенных бактерий рода *Tannerella* (*Tannerella* sp. 6 1 58FAA CT1) и *Escherichia fergusonii* ATCC 35469.

Образцы кала больных ХОБЛ по сравнению с образцами здоровых лиц и пациентов с БА характеризовались наибольшей представленностью таких микроорганизмов, как *Eubacterium siraeum* 70 3, *Dialister invisus* DSM 15470, *Ruminococcus torques* ATCC 27756, *Parabacteroides johnsonii* DSM 18315, а также ряда представителей рода *Bacteroides* (*Bacteroides coprophilus* DSM 18228, *Bacteroides ovatus* 3 8 47FAA, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides intestinalis* DSM 17393, *Bacteroides oleiciplenus* YIT 12058). При этом наименьшее содержание указанных бактерий наблюдалось в образцах здоровых добровольцев, а образцы больных БА занимали промежуточное положение в ряду анализируемых групп.

Противоположные результаты представленности между сравниваемыми группами получены для таких микроорганизмов, как *Phascolarctobacterium* sp. YIT

12067, *Coprococcus catus* GD 7, *Eubacterium bifforme* DSM 3989, *Lactobacillus ruminis* ATCC 25644, *Bifidobacterium catenulatum* DSM 16992 и продуцирующие бутират *Ruminococcus torques* L2 14. Максимальное содержание данных бактерий зарегистрировано в образцах кала здоровых лиц, промежуточное – у больных БА, и минимальное – в образцах пациентов с ХОБЛ.

Выявлена положительная корреляция частоты приема антибактериальных препаратов и увеличения представленности в образцах микроорганизмов рода *Bacteroides* (*Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, *Bacteroides uniformis* ATCC 8492, *Bacteroides dorei* 5 1 36 D4, *Bacteroides stercoris* ATCC 43183, *Bacteroides caccae* ATCC 43185, *Bacteroides xylanisolvens* XB1A). Установлена обратная корреляция между представленностью *Clostridium sp.* L2 50 и бактерий рода *Coprococcus* в образцах кала и количеством курсов приема антибактериальных препаратов на протяжении предшествующего года.

Глава 7. Анализ антибиотикорезистентности кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ

В ходе исследования секвенированные и проанализированные метагеномы кала 58 пациентов с ХОБЛ и 16 больных бронхиальной астмой рассмотрены на предмет относительной представленности генов антибиотикорезистентности (АР) совокупно по всему метагеномному набору данных для каждого пациента.

В качестве группы сравнения (контроля) использовались результаты исследованных по аналогичной методике образцов кала 96 здоровых добровольцев из России [172].

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 антибиотикорезистентности двумя методами и по двум референсным базам данных соответственно:

- Antibiotic Resistance Database – ARDB;
- The Comprehensive Antibiotic Resistance Database – CARD.

Дополнительно качественная детекция присутствия генов антибиотикорезистентности в образцах проведена для выборочных генов с помощью ПЦР реального времени анализа по специфичным праймерам.

7.1 Профилирование генов АР кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ в сравнении со здоровыми добровольцами относительно

Antibiotic Resistance Database – ARDB

В метагеномах групп пациентов с БА и ХОБЛ, а также контрольной группы оценен уровень относительной представленности генов антибиотикорезистентности. В результате анализа обнаружено значительное разнообразие представленных генов резистентности к антибактериальным препаратам: ненулевое покрытие ридами получили 2074 аминокислотных

последовательности транслированных генов устойчивости (89 классов генов AP), соответствующих 14 группам АБП.

7.1.1 Суммарная относительная представленность генов AP и различия по уровням резистоста к отдельным АМП и их группам между выборками образцов здоровых лиц и больных ХОБЛ, а также здоровых лиц и пациентов, страдающих БА

Суммарная относительная представленность генов AP значительно различалась между тремя группами (критерий Краскела-Уоллиса $p=1,335e-10$). При этом для группы БА данная величина значимо выше, чем для контрольной группы (односторонний тест Манна-Уитни, $p=0,008596$, отношение медиан двух групп 1,3), и ниже, чем для группы ХОБЛ ($p=0,004087$, отношение медиан двух групп 1,4). На рис. 35 эти различия отражаются как смещение распределения метагеномов группы здоровых добровольцев в нижнюю часть диаграммы, а групп больных БА и ХОБЛ – в верхнюю. Различия сохраняются при альтернативном способе нормировки данных - не на число ридов, картировавшихся на каталог генов, а на общее число ридов после фильтрации по качеству ($p=0,003624$ и $p=0,04573$ для двух попарных сравнений соответственно).

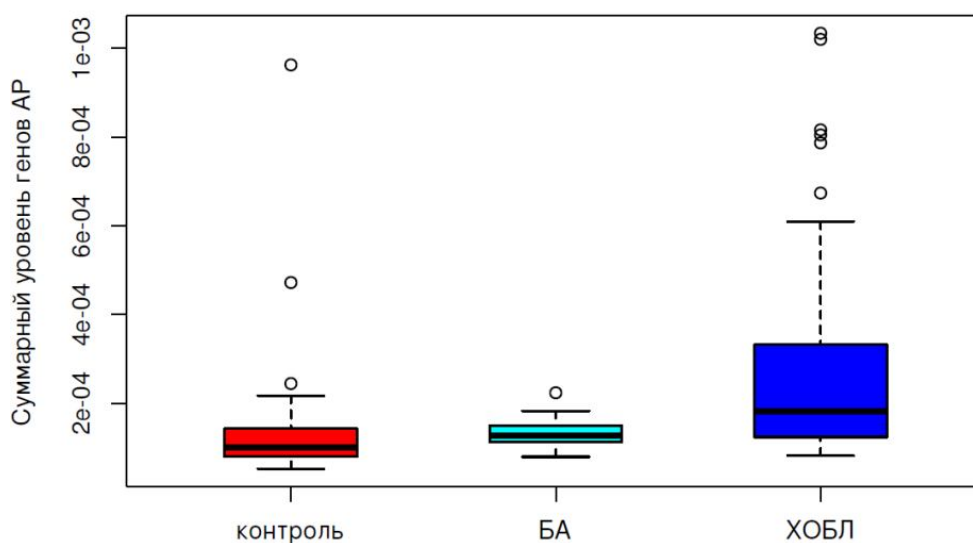


Рисунок 35 – Суммарная относительная представленность генов AP для образцов кала здоровых добровольцев, больных БА и ХОБЛ (по базе ARDB)

Относительная представленность детерминант устойчивости к каждому антибиотику по группам представлена на рис. 36, где вертикальная цветовая полоса обозначает группу (красный цвет - контрольная группа, бирюзовый цвет – группа пациентов с БА, синий цвет - группа больных ХОБЛ). Столбцы иерархически кластеризованы методом Уорда по метрике 1 – корреляция Спирмена, строки упорядочены в порядке уменьшения суммы сверху вниз.

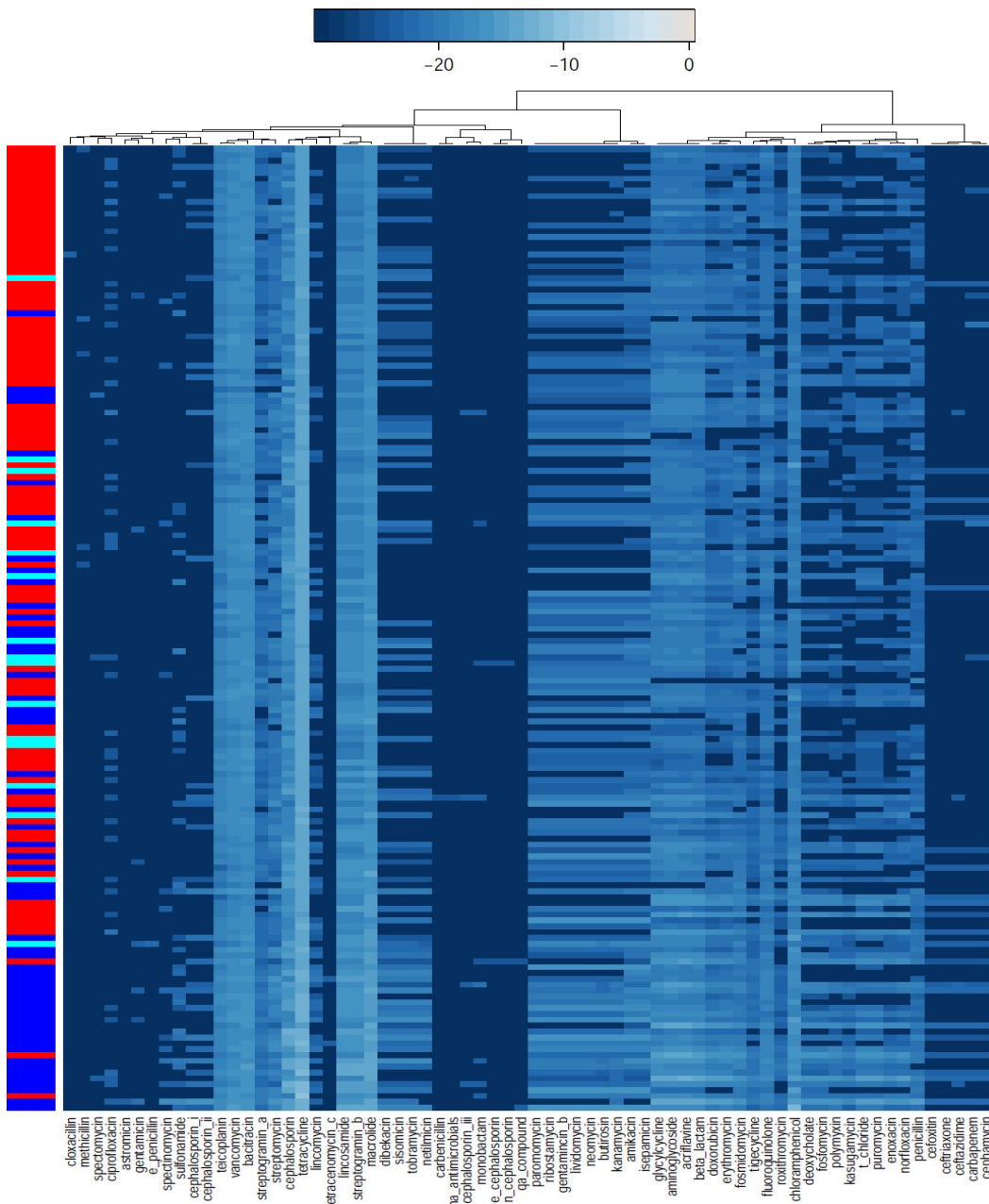


Рисунок 36 – Тепловая карта относительной представленности групп генов резистентности к отдельным антибиотикам (в двоичном логарифмическом масштабе) для трех групп: контроль (n=96, красный), ХОБЛ (n=58, синий), БА (n=16, бирюзовый).

Относительный уровень соответствующих генов антибиотикорезистентности выше в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с группой контроля (односторонний тест Манна-Уитни, скорректированное Р-значение $< 0,05$) для таких групп антибактериальных препаратов, как бета-лактамы (пенициллины и цефалоспорины), аминогликозиды, макролиды, сульфаниламиды, фторхинолоны и препараты других групп. Данные по этим группам АМП и 24-м отдельным антибиотикам, гены резистентности к которым перепредставлены (более представлены) у больных ХОБЛ по сравнению со здоровыми лицами, приведены в табл. 46 в соответствии с классификацией АМП, предложенной в справочнике по антимикробной терапии под ред. Р.С. Козлова и А.В. Дехнича [26].

Таблица 46 – Антибиотики, гены резистентности к которым избыточно представлены в группе образцов кишечной микробиоты пациентов, страдающих ХОБЛ, по сравнению с образцами группы контроля

Антибактериальные препараты	р	Отношение медиан (ОМ) двух групп*
I. Бета-лактамные антибиотики	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

Окончание таблицы 46

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>		

При сравнении метагеномов кала больных БА с контрольной выборкой также выявлены группы АМП согласно номенклатуры ARDB, для которых уровень соответствующих генов резистентности был выше у больных БА. Данные по антибиотикам, гены резистентности к которым повышено представлены у больных БА по сравнению со здоровыми лицами, приведены в табл. 47 в соответствии с классификацией АМП, предложенной в справочнике по антимикробной терапии под ред. Р.С. Козлова и А.В. Дехнича [26].

Таблица 47 – 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 антибиотики	0,0093	0,3983
Цефалоспорины	0,0037	0,2837
II. Аминогликозиды	0,0143	0,4633

Окончание таблицы 47

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>		

7.1.2 Детализированный анализ структуры генов AP, избыточно представленных в кишечных метагеномах больных БА и ХОБЛ по сравнению с образцами здоровых лиц с использованием базы данных ARDB

При детализированном анализе в соотношении с данными базы ARDB указанные выше различия суммарного уровня резистома между сравниваемыми группами метагеномов нашли отражение и в особенностях представленности различных классов генов. Так, в результате анализа выяснено, что из 78 классов, представленных во всех метагеномах, 29 классов генов имеют более высокую относительную представленность в группе пациентов с ХОБЛ (табл. 48) и 8 классов генов повышено представлены у больных астмой (табл. 49). При этом ни один из данных классов не представлен избыточно в контрольной группе.

Отметим, что из различающихся классов генов, избыточно представленных у больных ХОБЛ и БА, наиболее крупная группа – тип “Resistance-nodulation-cell division transporter system. Multidrug resistance efflux pump” (RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости) – (n=15).

Таблица 48 – 29 классов генов AP, относительная представленность которых значимо повышена в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с контролем (перечислены в порядке уменьшения статистической значимости)

Класс генов AP	Описание из базы ARDB	p	Отношение медиан (ОМ) двух групп
Классы неспецифических генов			
<i>acr</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0	0,29
<i>amr</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0	0
<i>mdtef</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0	0,25
<i>mexef</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0	0,28
<i>mexvw</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0	0,26
<i>mls mfs</i>	Транспортер макролидов, линкозамидов, стрептограмина В	0	0,11
<i>macab</i>	RND транспортер. Транспортер мультилекарственной устойчивости	0,00001	0,71
<i>smeabc</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,00001	0,44
<i>adeabc</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,00001	0
<i>mls abc</i>	ABC транспортер, Транспортер макролидов, линкозамидов стрептограминов В	0,00003	0,76
<i>mexab</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0032	0,37
<i>ceo</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0073	0,52

Окончание таблицы 48

<i>mexcd</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0083	0,4
<i>mexhi</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0104	0,34
Классы специфических генов			
<i>bla a</i>	Бета-лактамаза класса А. Этот фермент разрывает бета-лактамное кольцо антибиотика и деактивирует антибактериальные свойства молекулы	0	0,22
<i>erm</i>	N-6-метилтрансфераза аденина рРНК, которая метилирует аденин 23S рРНК в положении 2058, обеспечивая резистентность к эритромицину	0	0,28
<i>lnu</i>	Линкозамид-нуклеотидилтрансфераза	0	0
<i>rosab</i>	Калиевый антипортер, <i>rosA</i> , <i>rosB</i>	0	0,39
<i>tet mod</i>	НАДФ-зависимая оксидоредуктаза, модифицирующая тетрациклин	0	0
<i>aph</i>	Аминогликозид О-фосфотрансфераза	0,00001	0,26
<i>catb</i>	Ацетилтрансфераза хлорамфеникола	0,00001	0
<i>tet rpp</i>	Рибосомальный защитный белок, защищающий рибосомы от ингибиции трансляции тетрациклином	0,00001	0,76
<i>ant</i>	Аминогликозид О-нуклеотидилтрансфераза	0,0043	0,54
<i>aac</i>	Аминогликозид N-ацетилтрансфераза	0,0056	0
<i>tet flavo</i>	Флавобелок	0,0109	0,47
<i>tet efflux</i>	Транспорт тетрациклина	0,0173	0,64
<i>vanb</i>	Ванкомицин <i>vanB</i>	0,0189	0,73
<i>vat</i>	Ацетилтрансфераза виргиниамицина А	0,0242	0,57
<i>cata</i>	Ацетилтрансфераза хлорамфеникола А	0,0298	0,79

Таблица 49 – 8 классов генов AP, которые избыточно представлены в группе образцов пациентов с БА по сравнению с образцами здоровых лиц (перечислены в порядке уменьшения статистической значимости)

Класс генов AP	Описание из базы ARDB	p	Отношение медиан (ОМ) двух групп
Классы неспецифических генов			
<i>mls mfs</i>	Транспортер макролидов, линкозамидов, стрептограмина В	0,0032	0,21
<i>acr</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0065	0,34
<i>mexef</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,014	0,58
<i>mexcd</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0178	0,3
<i>mexhi</i>	RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости	0,0386	0,35
Классы специфических генов			
<i>bla a</i>	Бета-лактамаза класса А. Этот фермент разрывает бета-лактамное кольцо антибиотика и деактивирует антибактериальные свойства молекулы	0,0032	0,28
<i>tet flavo</i>	Флавопротеины. Детальный механизм неизвестен. Только один подобный белок обнаружен в оральном метагеноме	0,0032	0,17
<i>rosab</i>	Система «эффлюксная помпа / калиевый антипортер»: <i>rosA</i> – транспортер; <i>rosB</i> – калиевый антипортер.	0,0065	0,41

7.1.3 Особенности представленности генов устойчивости к отдельным АМП и группам антибиотиков, характеризующимся наиболее высоким уровнем резистента в образцах здоровых лиц, больных БА и пациентов, страдающих ХОБЛ

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 (Табл. 50).

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 (Табл. 50).

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. 50).

Таблица 50 – Различия представленности генов устойчивости к отдельным АМП и группам антибиотиков согласно номенклатуры ARDB с наиболее высоким средним уровнем резистента между образцами здоровых лиц, больных БА и пациентов, страдающих ХОБЛ

АМП, группы АМП	Уровень резистента в образцах здоровых лиц (n=96)	Уровень резистента в образцах больных БА (n=58)	Уровень резистента 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

Окончание таблицы 50

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-y означают: x – числовое значение мантиссы, E-y – 10 в отрицательной степени, y – величина порядка отрицательной степени.*

Указанные выше данные наглядно изображены на рис. 37.

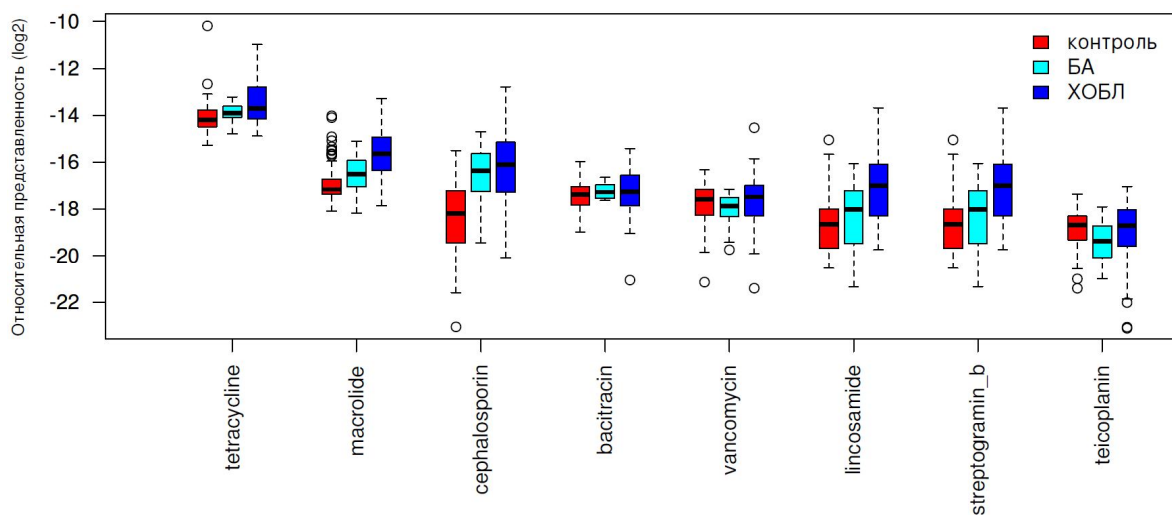


Рисунок 37 – Антибиотики с наиболее высокой средней представленностью относящихся к ним генов АР в образцах кала больных БА и пациентов, страдающих ХОБЛ (в двоичном логарифмическом масштабе).

Схожие тенденции в отношении более высокого содержания резистома к указанным АБП в кишечных метагеномах больных ХОБЛ сохранялись и при детальном сравнении степени представленности отдельных генов к конкретным антибиотикам.

Так, 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* (рис. 38).

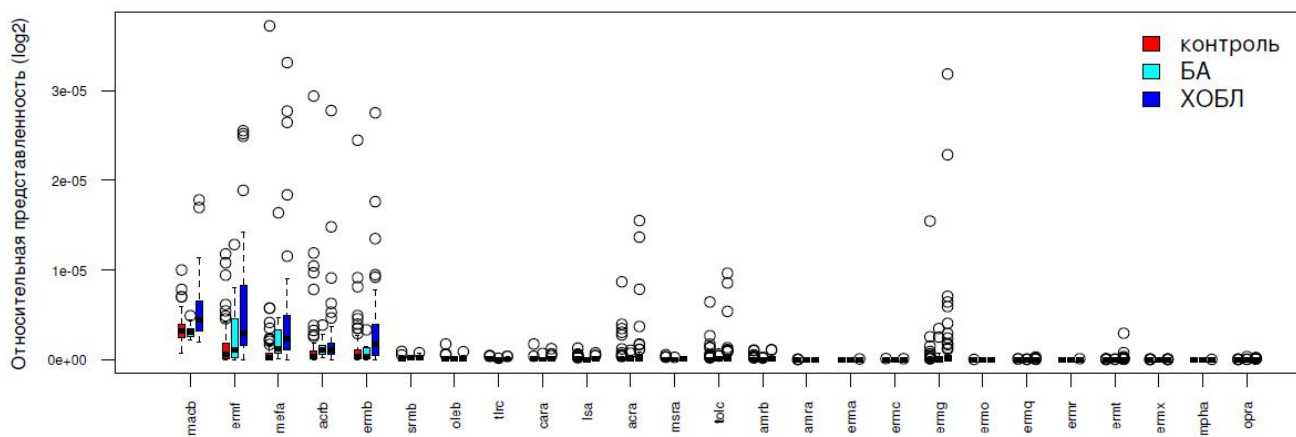


Рисунок 38 – Состав генов АР к макролидам и уровень их относительной представленности в образцах кишечных метагеномов больных БА, ХОБЛ и здоровых лиц

Отметим, что гены *ermf* и *ermb* (наиболее высоко представленные у больных ХОБЛ) являются неспецифическими, поэтому помимо резистентности к макролидам участвуют в формировании АР к стрептограмину В и линкозамидам (рис. 39).

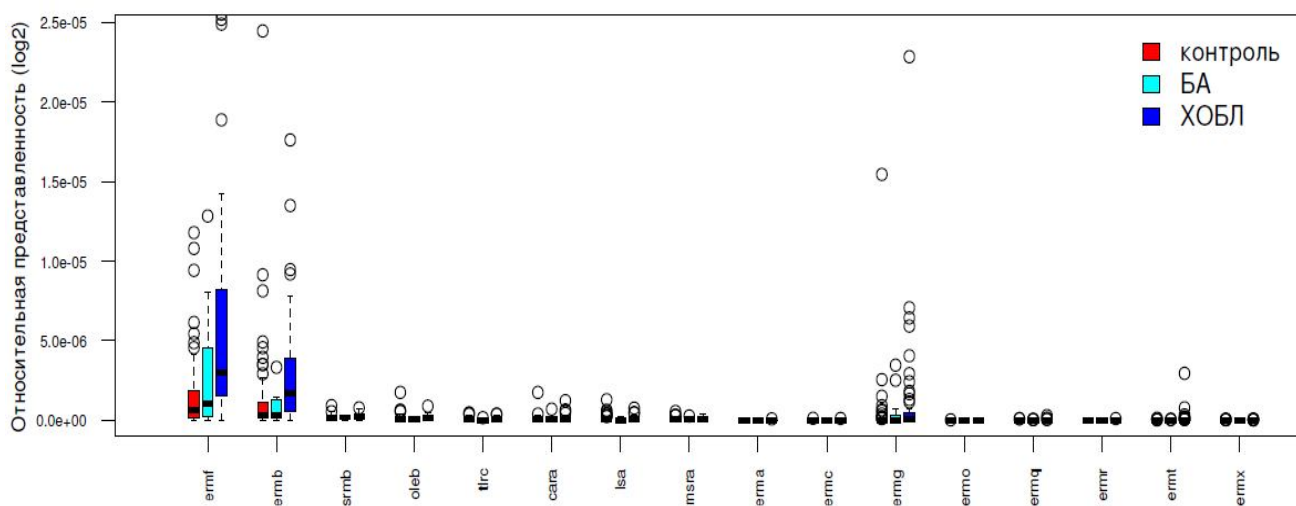


Рисунок 39 – Состав генов АР к линкозамидам и стрептограмину В и уровень их относительной представленности в образцах кишечных метагеномов больных БА, ХОБЛ и здоровых лиц

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 (рис. 40). Указанные гены участвуют в формировании бактериальной АР к цефалоспоринам.

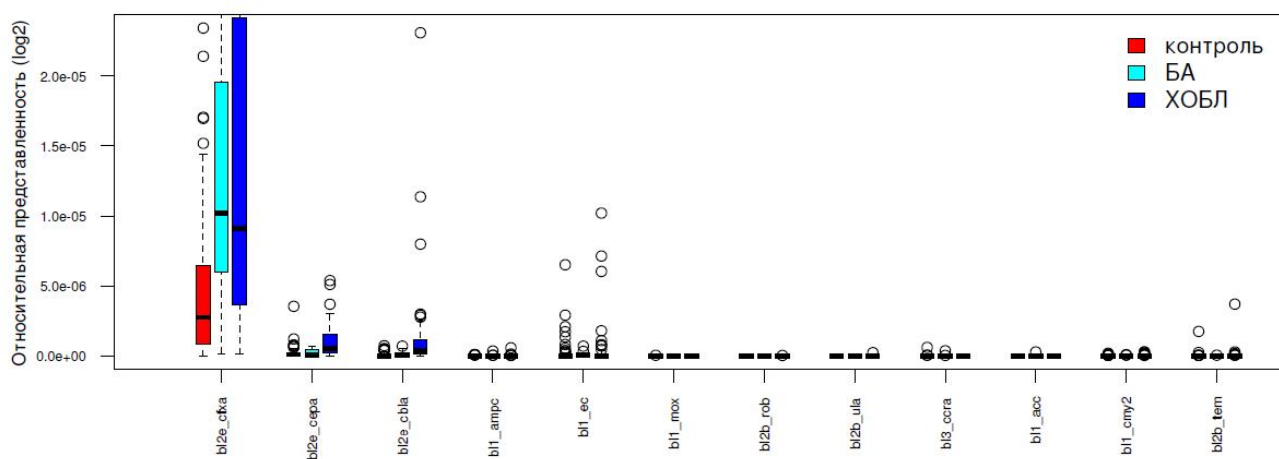


Рисунок 40 – Состав генов АР к цефалоспоринам и уровень их относительной представленности в образцах кишечных метагеномов больных БА, ХОБЛ и здоровых лиц

Следует отметить, что идентифицированные нами гены резистентности к цефалоспоринам (*bl2e cfxa*, *bl2e sera* и *bl2e cbla*) присущи представителям *Bacteroidetes*. В связи с этим выявленное увеличение представленности данного типа бактерий в кишечных метагеномах больных БА и ХОБЛ может объяснить и повышение представленности данных генов в образцах кала больных БА и ХОБЛ.

Также выявлены различия по представленности некоторых генов устойчивости к тетрациклиновым АБП в образцах больных ХОБЛ в отличие от метагеномов кала больных БА и здоровых лиц. Так, образцы пациентов, страдающих ХОБЛ, отличались более высокой представленностью генов *tetw* и *teto*. Также в образцах больных БА и ХОБЛ по сравнению с метагеномами здоровых лиц наблюдалось более высокое содержание генов *tetq* (рис. 41).

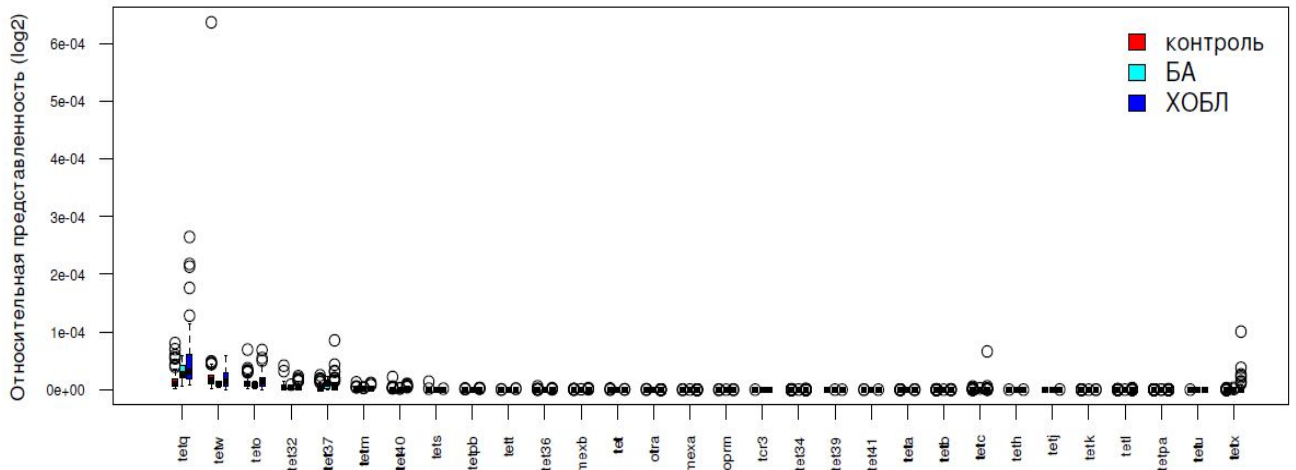


Рисунок 41 – Состав генов АР к тетрациклам и уровень их относительной представленности в образцах кишечных метагеномов больных БА, ХОБЛ и здоровых лиц

Аналогичное исследование проведено для представителей группы гликопептидных АБП (тейкопланин и ванкомицин) (рис. 42, 43). Следует отметить, что в целом уровень представленности генов АР к гликопептидам в образцах больных ХОБЛ и БА не был выше по сравнению с представленностью данных генов в образцах здоровых лиц (рис. 37).

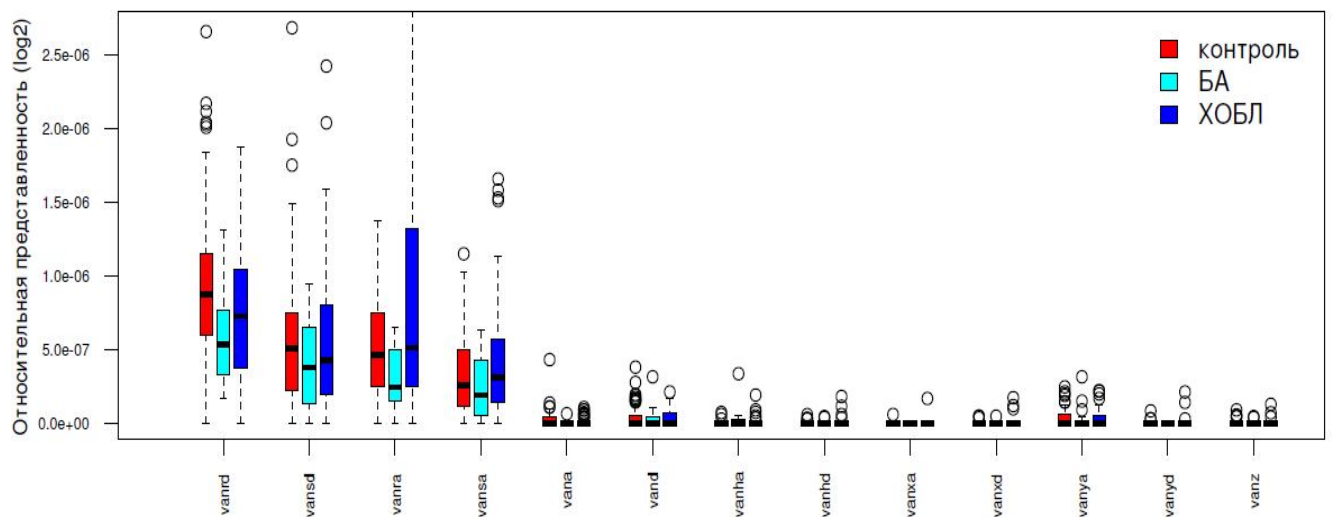


Рисунок 42 – Состав генов АР к тейкопланину (гликопептидный АБП) и уровень их относительной представленности в образцах кишечных метагеномов больных БА, ХОБЛ и здоровых лиц

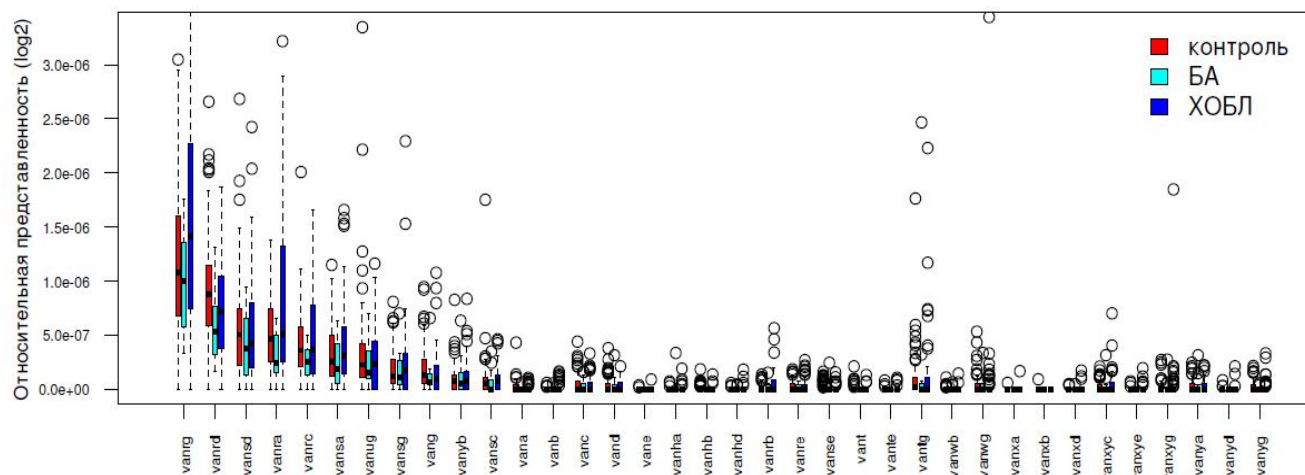


Рисунок 43 – Состав генов AP к ванкомицину (гликопептидный АБП) и уровни их относительной представленности в образцах кишечных метагеномов больных БА, ХОБЛ и здоровых лиц

7.2 Сравнительный анализ профилирования резистоста для выборочных генов с помощью метагеномного метода

с использованием базы данных ARDB и ПЦР реального времени

Для 47 образцов ДНК, выделенных из кала группы пациентов с ХОБЛ, проведен поиск маркеров устойчивости к антибиотикам в формате ПЦР реального времени. Результатом стала положительная детекция генов *ermB* и *mef* во всех образцах. Соотнесение последовательностей генов, по которым подбирались ПЦР праймеры, с базой ARDB, показало, что в данной базе представлены все гены, кроме *OXA-48* и *NDM*. По остальным генам проведено сравнение детекций, полученных метагеномным и ПЦР методами (табл. 51).

Таблица 51 – Сравнительный анализ профилирования резистоста для выборочных генов с помощью метагеномного метода и ПЦР реального времени

№ образца	Гены, определенные ПЦР	<i>CTX-M</i>	<i>mefA</i>	<i>ermB</i>	<i>vanb</i>
BR-2	<i>ermB, mef</i>	0	48	24	0
BR-3	<i>ermB, mef</i>	NA	NA	NA	0
BR-4	<i>ermB, mef</i>	0	124	22	0

Продолжение таблицы 51

BR-5	<i>ermB, mef, CTX-M</i>	0	53	19	0
BR-6	<i>ermB, mef</i>	NA	NA	NA	0
BR-7	<i>ermB, mef</i>	0	26	28	0
BR-8	<i>ermB, mef</i>	0	23	156	0
BR-9	<i>ermB, mef, CTX-M</i>	1	14	34	0
BR-11	<i>ermB, mef</i>	0	54	258	1
BR-12	<i>ermB, mef</i>	0	119	134	0
BR-13	<i>ermB, mef</i>	0	9	39	0
BR-14	<i>ermB, mef</i>	0	2	69	1
BR-15	<i>ermB, mef</i>	0	454	185	0
BR-16	<i>ermB, mef</i>	0	9	0	0
BR-17	<i>ermB, mef</i>	0	16	0	0
BR-18	<i>ermB, mef</i>	0	19	13	0
BR-19	<i>ermB, mef</i>	0	2	10	0
BR-21	<i>ermB, mef</i>	0	3	6	0
BR-23	<i>ermB, mef</i>	0	1	39	0
BR-24	<i>ermB, mef</i>	0	21	2	0
BR-25	<i>ermB, mef</i>	0	6	12	0
BR-26	<i>ermB, mef</i>	0	131	59	1
BR-27	<i>ermB, mef</i>	0	34	116	0
BR-28	<i>ermB, mef</i>	0	54	823	1
BR-29	<i>ermB, mef</i>	0	61	176	0
BR-30	<i>ermB, mef</i>	0	109	23	0
BR-31	<i>ermB, mef</i>	0	200	10	0
BR-32	<i>ermB, mef</i>	0	747	48	1
BR-33	<i>ermB, mef</i>	0	70	120	0
BR-34	<i>ermB, mef</i>	0	69	121	0
BR-35	<i>ermB, mef</i>	0	89	67	3
BR-36	<i>ermB, mef</i>	0	83	125	0
BR-37	<i>ermB, mef</i>	0	37	18	0
BR-38	<i>ermB, mef</i>	0	99	77	3
BR-39	<i>ermB, mef</i>	0	1	40	0
BR-40	<i>ermB, mef</i>	0	35	18	1
BR-41	<i>ermB, mef</i>	0	10	11	1
BR-42	<i>ermB, mef</i>	0	134	5	0
BR-43	<i>ermB, mef</i>	0	0	2	0
BR-47	<i>ermB, mef</i>	0	10	29	0
BR-48	<i>ermB, mef</i>	0	14	0	0
BR-49	<i>ermB, mef</i>	0	8	20	0
BR-59	<i>ermB, mef</i>	0	113	20	0
BR-60	<i>ermB, mef</i>	0	50	5	0
BR-61	<i>ermB, mef</i>	0	21	2	0

Окончание таблицы 51

BR-62	<i>ermB, mef</i>	0	176	111	0
BR-64	<i>ermB, mef, vanB</i>	0	7	4	0

Как видно из таблицы, для некоторых из генов выявлена высокая согласованность двух методов. Так, из 47 образцов для гена *ermB* совпали положительные результаты по 44 образцам, а по гену *mefA* – по 46 образцам. Гены *KPC*, *VIM* и *CTX-M* не были детектированы ни в одном образце ни одним из двух методов (за исключением положительной метагеномной детекции гена *CTX-M* в 1 образце).

Для гена *tesA* метагеномный подход оказался более чувствительным и обнаружил его присутствие в 8 образцах. В то же время, ПЦР результаты по данному гену были отрицательными по всей группе.

Различия между методами обнаружены для генов *vanA* и *vanB*. Так, по гену *vanA* положительный результат согласно метагеномному подходу зарегистрирован в 6 образцах и отрицательный результат согласно ПЦР по всей группе. Для гена *vanB* несовпадение результатов, полученных двумя способами, зарегистрировано в 10 случаях. При этом ген *vanB* согласно ПЦР зарегистрирован в 1 образце (по результатам метагеномного метода в данном образце ген *vanB* не определяется), в то время как согласно метагеномному методу – в 9 других образцах, где метод ПЦР его не идентифицировал.

7.3 Профилирование генов антибиотикорезистентности кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ в сравнении со здоровыми добровольцами относительно The Comprehensive Antibiotic Resistance Database – CARD

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 антимикробным препаратам. Суммарная относительная представленность генов антибиотикорезистентности (АР) у группы контроля не оказалась статистически ниже, чем у группы БА (односторонний тест Манна-Уитни, $p=0,14$, отношение

медиан 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) (рис. 44).

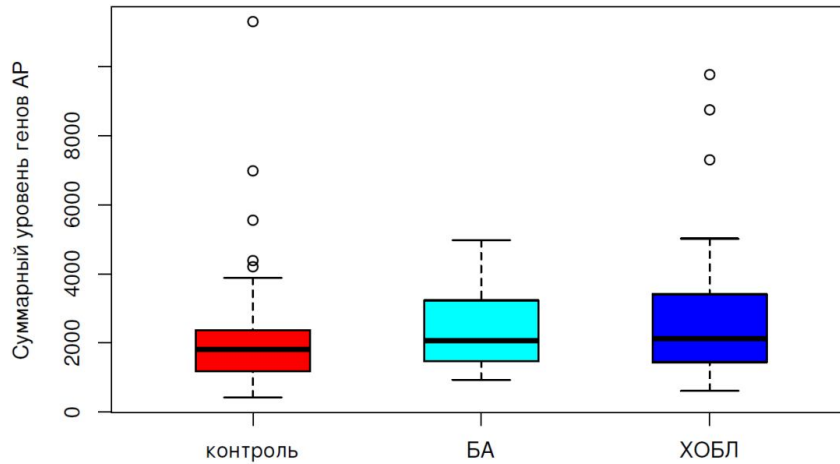


Рисунок 44 – Суммарная относительная представленность генов антибиотикорезистентности для образцов кала здоровых добровольцев и больных ХОБЛ и БА (по базе CARD)

В среднем, наиболее представленными по содержанию генов резистентности во всех метагеномах оказались тетрациклины, бета-лактамы, макролиды, цефалоспорины, линкозамиды и другие АБП (рис. 45).

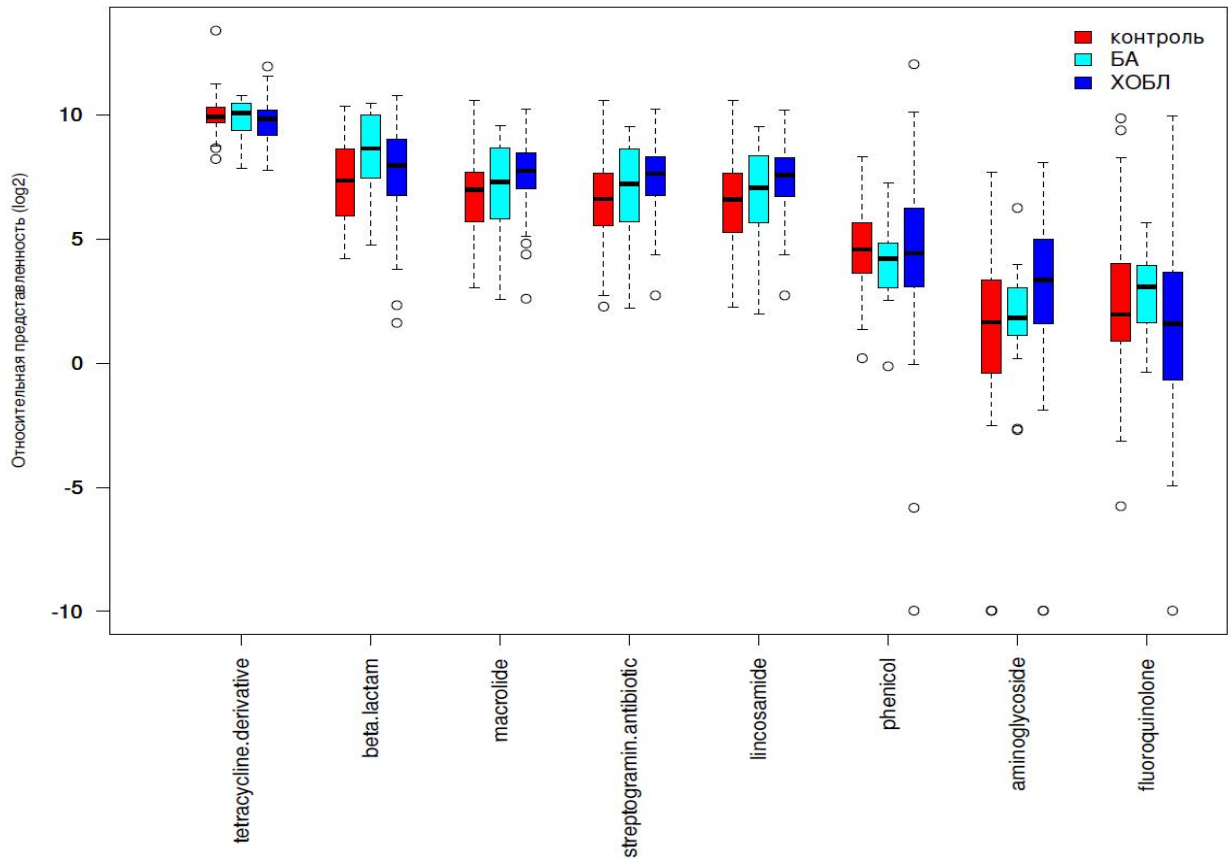


Рисунок 45 – Семейства антибиотиков с наиболее высокой средней представленностью относящихся к ним генов антибиотикорезистентности (в двоичном логарифмическом масштабе).

Для аминогликозидов, линкозамидов, макролидов а также стрептограминов относительный уровень соответствующих им генов АР 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. 52 в порядке уменьшения статистической значимости. Ни для одного из семейств представленность не оказалась статистически различной между группой БА и контрольной группой.

Таблица 52 – 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
Стрептограминны	0,00056	0,49

Различия в уровне резистенции между группами сравнения наблюдаются и в уровнях представленности генов, кодирующих тот или иной механизм антибактериальной устойчивости. Из 82 генов, представленных во всех метагеномах, содержание 12 генов значимо выше в метагеномах кала пациентов с ХОБЛ (табл. 53).

Таблица 53 – Гены АР, относительная представленность которых значимо повышена в группе кишечных метагеномов пациентов, страдающих ХОБЛ, по сравнению с образцами контрольной группы (перечислены в порядке уменьшения статистической значимости)

Ген	Название	АБП, к которым определяет АР	р	ОМ 2-х групп
<i>ermG</i>	23S рРНК метилтрансфераза	Макролиды, линкозамиды	0	0,14
<i>mel</i>	Протеины эффлюксной помпы, определяющие устойчивость к макролидам	Макролиды, стрептограминны	0	0,085
<i>tetX</i>	Белок-инактиватор тетрациклина	Тетрациклины	0	0,0001
<i>AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia</i>	Ацетилтрансферазы аминогликозидов, кодируемые плазмидами и транспозонами <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> и <i>Staphylococcus warneri</i>	Аминогликозиды	0,0001	0,073
<i>cblA-1</i>	Бета-лактамазы типа А	Бета-лактамы	0,0001	0,17

Окончание таблицы 53

<i>cfxA4</i>	Бета-лактамазы типа А	Бета-лактамы	0,0026	0,31
<i>ermB</i>	23S рРНК метилтрансфераза	Макролиды, линкозамиды	0,0026	0,42
<i>cfxA2</i>	Бета-лактамазы типа А	Бета-лактамы	0,0052	0,49
<i>tetQ</i>	Белок, защищающий рибосомы от воздействия тетрациклинов	Тетрациклины	0,0052	0,73
<i>catP</i>	Хлорамфеникол ацетилтрансфераза	Хлорамфеникол	0,0064	0,09
<i>ermF</i>	23S рРНК метилтрансфераза	Макролиды, линкозамиды	0,0078	0,54
<i>APH(3')- IIIa</i>	Кодируемая плазмидами фосфотрансфераза аминогликозидов, выявленная у <i>S. aureus</i> и <i>Enterococcus spp.</i>	Аминогликозиды	0,023	0,45

По ряду генов уровень резистоста в метагеномах больных ХОБЛ уступал образцам здоровых лиц. Так, среди генов антибиотикорезистентности, представленность которых выше в группе контроля, присутствуют гены резистентности к тетрациклину – *tetW*, *tetM*, *tetK*, *tetB(P)*, *tetA(P)*, *tetS*, *tetO*, *tet32* (табл. 54).

Таблица 54 – Гены AP, относительная представленность которых значимо ниже в группе метагеномов пациентов, страдающих ХОБЛ, по сравнению с образцами контрольной группы (перечислены в порядке уменьшения статистической значимости)

Ген	Название	АБП, к которым определяет AP	p	ОМ 2-х групп
<i>tetW</i>	Белок, защищающий рибосомы от воздействия тетрациклинов	Тетрациклины	0	2,85
<i>tetM</i>	Белок, защищающий рибосомы от воздействия тетрациклинов	Тетрациклины	0,0003	3,75

Окончание таблицы 54

<i>tetK</i>	Белок, защищающий рибосомы от воздействия тетрациклинов	Тетрациклины	0,0013	1,0
<i>tetB(P)</i>	Белок, защищающий рибосомы от воздействия тетрациклинов	Тетрациклины	0,0045	275.9
<i>tetA(P)</i>	Белок, защищающий рибосомы от воздействия тетрациклинов	Тетрациклины	0,0058	206,61
<i>tetS</i>	Белок, защищающий рибосомы от воздействия тетрациклинов	Тетрациклины	0,011	37,97
<i>tetO</i>	Белок, защищающий рибосомы от воздействия тетрациклинов	Тетрациклины	0,013	1,74
<i>tet32</i>	Белок, защищающий рибосомы от воздействия тетрациклинов		0,021	1,4
<i>ACT-15</i>	Бета-лактамазы	Бета-лактамы	0,021	1,0
<i>vanWG</i>	Кластер <i>vanG</i> генов устойчивости к гликопептидам	Гликопептиды	0,032	6,91

Отметим, что в метагеномах группы больных БА по сравнению с образцами здоровых лиц выявлена более высокая представленность гена *mel* (ОМ 2,2, $p=0,0067$), кодирующих механизмы резистентности к макролидам и стрептограминам, и менее выраженный уровень гена *tetW* (ОМ 2,18; $p= 0,039$), кодирующего устойчивость к тетрациклинам.

7.4 Качественный состав АБТ и различия в представленности соответствующих генов AP по базе ARDB

С помощью одностороннего критерия Манна-Уитни в обобщенной выборке метагеномов кала больных БА и ХОБЛ выполнен сравнительный анализ уровня представленности различных генов AP к наиболее часто используемым группам АБП в зависимости от факта применения их на протяжении 12 месяцев, предшествующих включению пациентов в исследование. 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.

В ходе анализа значимые различия между группами, выделенными по приему определенных групп АБП, обнаружены для генов, представленных в базе ARDB. Так, 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 (OM) 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 резистенции по генам, относящимся в базе ARDB к формированию резистентности к цефалоспорином (OM 0,33, $p=0,0028$), а также к линкозамидам и стрептограмину В (OM 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).

7.5 Корреляционный анализ уровня представленности генов AP в метагеномах больных ХОБЛ в зависимости от клиничко-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 резистомы 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 антибиотикотерапии за предшествующие 12 месяцев статистически значимые результаты также не получены.

Также при использовании базы данных CARD не выявлено корреляции между уровнем резистомы по отдельным классам антибактериальных препаратов и частотой антибиотикотерапии (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. 55).

Таблица 55 – Корреляции уровня антибиотикорезистентности по отдельным классам препаратов и частоты случаев приема антибактериальных препаратов 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

Установлена прямая корреляционная связь между уровнем резиста по отдельным классам генов антибактериальных препаратов (по классификации ARDB) и частотой антибиотикотерапии (табл. 56). Выявленные корреляционные взаимодействия так же, как и в случае классов антибиотиков, не являются сильными ($r=0,31-0,38$), однако уровень статистической значимости различий высок ($p < 0,05$).

Таблица 56 – Корреляции уровня антибиотикорезистентности по отдельным классам генов и частоты случаев приема антибактериальных препаратов за предшествующие 12 месяцев ($p < 0,05$)

Классы генов антибиотикорезистентности	r	p
<i>tet mod</i>	0,38264	0,0067
<i>mdtI</i>	0,34556	0,015
<i>erm</i>	0,33054	0,0204
<i>sul</i>	0,33018	0,0205
<i>mls mfs</i>	0,31166	0,0293
<i>emrd</i>	0,2934	0,0408
<i>bla a</i>	0,2919	0,0418

Резюме

В результате выполненного анализа антибактериальной резистентности кишечной микробиоты больных БА, ХОБЛ и здоровых добровольцев с помощью метагеномного метода (по базам данных ARDB и CARD) и дополнительной качественной детекции присутствия генов AP для выборочных генов методом ПЦР реального времени выявлено значительное разнообразие набора генов

резистентности к антибактериальным препаратам во всех метагеномах (по данным баз ARDB и CARD). Всего для трех групп детектировано присутствие метагеномных ридов, соответствующих более чем 2000 транслированным последовательностям генов устойчивости (89 классов генов AP по базе ARDB), принадлежащим к 14 группам АБП.

В целом, сравнение результатов, полученных методом, основанным на анализе представленности генов из базы CARD, по сравнению с данными базы ARDB, демонстрирует согласованность большинства результатов. Метод детекции различий по уровням резистенции между группами образцов, выполненный с использованием базы CARD, характеризовался меньшей чувствительностью. Вероятно, это связано с пониженным разнообразием детектированных по CARD генов, что, в свою очередь, может быть обусловлено как использованием данных о покрытии ограниченного каталога референсных геномов, который содержит лишь часть известных генов AP, так и тем, что данный метод основан на поиске нуклеотидного сходства (по сравнению с поиском аминокислотного свойства в случае ARDB, что повышает чувствительность детекции).

При сравнении представленности генов антибиотикорезистентности (с использованием базы ARDB) между группами обнаружено, что суммарная относительная представленность генов AP для группы больных БА значимо выше, чем для контрольной группы, но ниже, чем для группы пациентов с ХОБЛ. При анализе с использованием базы данных CARD статистически значимых различий по уровню общей относительной представленности генов AP между кишечными метагеномами групп сравнения не выявлено.

По данным анализа с использованием базы генов ARDB относительный уровень соответствующих генов антибиотикорезистентности выше в группе пациентов с ХОБЛ по сравнению с группой контроля для таких групп АБП, как бета-лактамы (пенициллины и цефалоспорины), аминогликозиды, макролиды, сульфаниламиды, фторхинолоны, а также для 24 отдельных наименований антибиотиков (включая представителей группы линкозамидов). Согласованные результаты получены и с использованием базы генов CARD – в группе образцов

больных ХОБЛ выявлена более высокая представленность генов AP к аминогликозидам, линкозамидам, макролидам и др.

По сравнению с группой контроля кишечная микробиота больных БА характеризовалась более высокой представленностью генов AP (по базе ARDB) для бета-лактамов (включая цефалоспорины), макролидных, фторхинолоновых, аминогликозидных, тетрациклиновых АБП и некоторых препаратов других групп, то есть, фактически, для всех фармакотерапевтически значимых групп антибиотиков, наиболее широко применяемых в самых различных областях клинической практики, включая лечение респираторных заболеваний.

В дополнение к сказанному выше отметим, что в список АБП и групп АБП с наиболее высоким уровнем представленности генов AP в метагеномах кала больных ХОБЛ и БА по результатам выполненного исследования (с учетом базы ARDB) попали тетрациклины, макролиды, цефалоспорины, линкозамиды, а также ванкомицин, тейкопланин, бацитрацин и стрептограмин В.

По ряду АБП между группами метагеномов кала больных БА и ХОБЛ выявлены статистически значимые различия. Так в группе больных ХОБЛ относительный уровень генов AP был выше по сравнению с метагеномами кала больных БА к макролидам, линкозамидам, ванкомицину, тейкопланину и стрептограмину В.

Обращает на себя внимание установленный нами факт присутствия гликопептидных антибиотиков (ванкомицина и тейкопланина) в списке препаратов с наиболее высокой средней представленностью генов AP (по данным ARDB) как у больных БА и ХОБЛ, так и у относительно здоровых лиц. Формирование AP для ванкомицина и тейкопланина обеспечивается не за счет отдельных генов, а кодируется целым опероном генов, ключевыми из которых являются гены лигаз (*vanA*, *vanB* и т.д.). В исследованных кишечных метагеномах больных БА и ХОБЛ наиболее представлены не гены лигаз, а второстепенные гены, что коррелирует с данными литературы [109]. Важно, что уровни представленности идентифицированных генов AP к гликопептидам в метагеномах кишечной микробиоты больных бронхообструктивными заболеваниями и здоровых лиц статистически значимо не различались.

В результате исследования резистома выявлено, что во всех образцах кишечной микробиоты больных ХОБЛ присутствуют гены антибактериальной устойчивости к макролидам, стрептограминам и линкозамидам – *ermB* и *mef*, что подтверждается как метагеномным методом, так и методом ПЦР реального времени.

Различия в уровне резистома между группами, наблюдаемые при анализе с использованием базы ARDB, отражаются и в уровнях представленности классов генов AP. Так, 29 из классов генов, описанных в ARDB, по сравнению с контролем оказались достоверно более представленными в группе метагеномов пациентов, страдающих ХОБЛ, в то время как у больных астмой в сравнении с контрольной группой перепредставлены только 8 классов генов AP. При этом из различающихся классов генов AP, наиболее крупная группа – тип “Resistance-nodulation-cell division transporter system. Multidrug resistance efflux pump” (RND транспортер. Транспортные белки множественной лекарственной устойчивости). В свою очередь, из 82 генов из базы CARD, представленных во всех метагеномах, содержание 12 генов было значимо выше в метагеномах кала пациентов с ХОБЛ.

Следует отметить более высокий уровень генов AP к макролидам, цефалоспорином, линкозамидам и фторхинолонам в метагеномах кала больных ХОБЛ, применявших соответственно макролидные, цефалоспориновые, линкозамидные или фторхинолоновые АБП на протяжении года, предшествующего включению в исследование (по данным анализа с использованием ARDB).

Выявлена прямая корреляционная связь между уровнем резистома по отдельным классам антибактериальных препаратов и частотой антибиотикотерапии (линкозамиды, стрептограмин В, цефалоспорины, макролиды, сульфонамиды). Также более высокой частоте приема антибактериальных препаратов соответствовал более высокий уровень резистома по отдельным надклассом генов резистентности (*tet mod*, *medtl*, *erm*, *sul*, *mls mfs*, *emrd*, *bla a*).

Глава 8. Обсуждение результатов

Традиционно БА и ХОБЛ относятся к числу наиболее распространенных заболеваний бронхолегочной системы среди взрослого населения, приводящих к существенному снижению качества жизни, ранней инвалидизации и высокой смертности больных.

В наиболее типичных случаях БА и ХОБЛ различаются по вкладу этиологических факторов в развитие болезни (преимущественно атопия при БА и длительное вдыхание аэрополлютантов при ХОБЛ), особенностям бронхиального воспаления (преимущественно ассоциированное с активацией тучных клеток, эозинофилов, Th2 (CD4⁺) иммунным ответом при БА и нейтрофильное, связанное с особенностями макрофагального иммунного ответа, активацией CD8⁺ Т-лимфоцитов при ХОБЛ) и механизмов формирования бронхиальной обструкции (преимущественно бронхоспазм при БА и фиброз дистальных бронхов с эмфиземой при ХОБЛ). Данные заболевания различаются по характеру клинического течения (значительная вариабельность симптомов при БА, их приступообразный характер и прогрессирующее по мере утяжеления болезни, стабильное наличие респираторных симптомов при ХОБЛ), причинам возникновения обострений и их значению в патогенезе заболевания (преимущественно неинфекционного генеза при БА и ассоциированные с развитием инфекционного процесса, приводящие к неуклонному снижению функции легких при ХОБЛ). В типичных случаях больные БА демонстрируют хороший ответ на применение топических кортикостероидов, в то время как у больных ХОБЛ ключевая роль в поддерживающей терапии принадлежит ингаляционным бронходилататорам [150, 153].

Несмотря на то, что размах фенотипического разнообразия является генетически лимитированным, развитие тех или иных патогенетических особенностей, тяжесть клинических проявлений заболевания, степень ответа на проводимую терапию, частота и тяжесть обострений, влекущих за собой ухудшение ФВД, прогноз заболевания во многом определяются характером

взаимоотношений, развивающихся между организмом больного и внешними факторами. В частности, все большее внимание исследователей привлечено к микробиотическим сообществам, формирующим респираторный микробиом, и их роли в развитии и эволюции хронических обструктивных заболеваний дыхательных путей [83].

В современном представлении респираторный тракт человека, как и другие регионы тела, поддерживает хрупкое равновесие между жизнедеятельностью населяющих его микроорганизмов и активностью факторов иммунной защиты. В норме функциональная активность клеточных и гуморальных элементов иммунной системы, поддержание эффективного мукоцилиарного клиренса и высокая степень аэрации бронхиального дерева на всем его протяжении обеспечивают уникальное постоянство малочисленного состава сообщества микроорганизмов, которое характеризуется принципиальной общностью основного состава в связи с единым происхождением вследствие микроаспирации из верхних отделов респираторного тракта [267]. По аналогии с желудочно-кишечным трактом, можно предположить, что сохранение в дыхательных путях естественного состава микробиома само по себе является важным фактором защиты органов дыхания от развития бронхолегочных инфекций [75].

Выраженные вентиляционные нарушения у больных БА и ХОБЛ представляют собой значимый фактор риска бактериальной контаминации дыхательных путей. На фоне персистирующего бронхолегочного воспаления и ослабления локальных механизмов иммунной защиты, нарушения дренажной и вентиляционной функции бронхов вследствие бронхоконстрикции, обтурации периферических отделов бронхиального дерева слизью и увеличения площади слабовентилируемых участков легких создаются оптимальные условия для модификации естественного состава респираторного микробиома с закреплением в нем представителей условно-патогенной и патогенной микробиоты [157, 168].

В настоящее время роль респираторной микробиоты в развитии и прогрессировании хронических обструктивных заболеваний легких по-прежнему остается открытой. Проводимые микробиологические и молекулярно-

генетические исследования в этой области демонстрирует совокупные различия состава микробиоты дыхательных путей у больных БА и ХОБЛ относительно здоровых добровольцев [122]. Однако, несмотря на отдельные успехи в области исследования микробиоты дыхательных путей (как в норме, так и при патологии), сохраняются значительные пробелы в детализации различий состава респираторных микробиотических сообществ у больных БА и ХОБЛ с учетом клиничко-функциональных факторов (тяжесть течения болезни и выраженность симптомов, частота обострений, особенности поддерживающей терапии, сохранность вентиляционной функции, переносимость физической нагрузки и т.д.) и данных анамнеза, включающих количественный и качественный состав проводимой АБТ, – т.е. в связи с вариабельностью клинических фенотипов болезней.

Больные хроническими обструктивными заболеваниями легких, как известно, представляют собой группу повышенного риска обоснованного и необоснованного назначения АБП, что более актуально для больных ХОБЛ тяжелого течения с частыми обострениями. Повторяющиеся эпизоды системной АБТ сопряжены с потенциальным риском развития молекулярно-генетических механизмов антибактериальной устойчивости у бактерий, колонизирующих не только дыхательные пути [84], но и различные регионы организма человека, включая микробные популяции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), представляющие интерес для исследования в качестве наиболее изученной и стабильной модели микробиома, отражающей общий (системный) характер модификаций в микробиотических сообществах на фоне персистирующего воспаления и воздействия агрессивных факторов фармакотерапии. Кроме того, благодаря значительному таксономическому разнообразию и высокой количественной представленности микроорганизмов, кишечные микробиотические сообщества (в отличие от респираторных) являются наиболее доступными как для исследования особенностей состава, так и для анализа генов АР с профилированием уровней их представленности [115].

Выполненное нами одномоментное сравнительное неинтервенционное исследование в параллельных группах является инновационным в связи с одновременной оценкой состояния орофарингеальной (респираторной) и кишечной микробиоты, включающей глубинное изучение качественного (таксономического) и количественного состава микроорганизмов с профилированием уровней генов AP, в ассоциации с клинико-anamnestической характеристикой больных БА и ХОБЛ с использованием современных высокотехнологичных молекулярно-генетических методов.

Ключевым результатом данного исследования стало доказательство того, что даже обоснованное, но частое применение системных АБП широкого спектра действия на фоне обострений у больных ХОБЛ и БА, а также нерациональное использование антибиотиков, нарушая нормальный рост респираторного и кишечного микробиомов со снижением их устойчивости к внедрению условно-патогенных и патогенных микроорганизмов и способствуя накоплению 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 сопряжено с ростом потребности в терапии СКС и антибиотиками.

Валидность полученных данных обусловлена последовательным выполнением всех этапов данной диссертационной работы, строгим соответствием единому протоколу и используемым методикам молекулярно-генетических исследований. Так, для сравнительной оценки таксономического состава и анализа генов антибактериальной устойчивости на клиническом этапе исследования сформированы 2 репрезентативные выборки пациентов (больные БА и пациенты с ХОБЛ), сходные по возрасту. При этом больные ХОБЛ, в отличие от пациентов, страдающих БА, реже использовали КДБА, характеризовались более частым применением АБП на протяжении года, однако меньшим количеством эпизодов терапии СКС по поводу обострения заболевания, демонстрировали менее сохранную ФВД по значениям ОФВ1 (до и после теста с сальбутамолом) и исходной ФЖЕЛ. Отметим, что различия по указанным

клинико-anamнестическим параметрам, выявленные между группами пациентов, страдающих БА и ХОБЛ, не противоречат современным знаниям о механизмах и особенностях клинического течения данных заболеваний [149, 154], а также соотносятся с целью выполненной работы.

Клинический этап исследования установил схожесть групп больных легкой БА и ХОБЛ 2 степени тяжести по анализируемым параметрам клинической картины и данных анамнеза. Также не получено статистически значимых различий при сравнении клинико-anamнестических данных между группами лиц с тяжелой неконтролируемой БА и больных ХОБЛ 3-4 степени тяжести. Отсутствие клинико-anamнестических различий между указанными подгруппами позволило в дальнейшем выполнить сравнение таксономического состава микробиоты и представленности генов антибиотикорезистентности между группами лиц, страдающих хоть и различными заболеваниями, но обладающими некоторым фенотипическим сходством клинического течения в пределах общих для БА и ХОБЛ параметров.

Закономерность межгрупповых и внутригрупповых различий подчеркнута выявленными ассоциациями клинических иanamнестических показателей. Так, например, пациентам с более тяжелым клиническим течением заболевания (БА и ХОБЛ) свойственны более частые обострения, госпитализации и ассоциированная с ними потребность в соответствующей терапии СКС и АБП, а также худшие значения показателей ФВД, переносимости физической нагрузки и кислородной сатурации периферической крови.

Интересные результаты получены при сравнении клинико-anamнестических данных у больных ХОБЛ, принимавших и не принимавших ИГКС в составе регулярной терапии. Так, оказалось, что пациенты, использовавшие ИГКС в составе комбинированной терапии с бета-2-агонистами длительного действия, характеризовались более тяжелым течением заболевания (более выраженной одышкой (по шкале mMRC) и потребностью в КДБА, большей частотой госпитализаций и эпизодов терапии СКС на протяжении предшествующих 12 месяцев, сниженной переносимостью физической нагрузки, уровнем сатурации

кислорода после ходьбы, а также низкими значениями ОФВ1 и ФЖЕЛ). Очевидно, что выявленные различия скорее характеризуют не особенности влияния ИГКС на тяжесть течения ХОБЛ, а подчеркивают адекватность врачебных рекомендаций, которые (согласно GOLD, 2011-2014) предполагают назначение комбинированных препаратов ИГКС и ДДБА больным ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения с высоким риском обострений [154].

На этапе молекулярно-генетических исследований выполнена таксономическая идентификация кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ в сравнении с кишечным микробиомом здоровых лиц с целью оценки модифицирующего влияния характера течения указанных заболеваний и анамнеза фармакотерапии на состав микробиотических сообществ и формирование АР. Большинство данных, полученных нами при сравнительном изучении кишечной микробиоты у больных БА, ХОБЛ и здоровых лиц, до сих пор описано не было, в связи с чем существенная часть результатов данного раздела исследования представляется как приоритетная.

По данным проведенного исследования, сообщества микроорганизмов кишечника больных ХОБЛ и БА обладают столь же разнообразным составом метагеномов, что и микробиота здоровых добровольцев, демонстрируя принципиальное качественное (таксономическое) сходство с ней, но различаясь количественной представленностью ряда таксонов микроорганизмов.

Так, 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) [161]. Среди них у больных БА оказались сниженными по содержанию основные ацетат-продуцирующие бактерии семейства *Ruminococcaceae* (включая *Ruminococcus sp.*), бактерии рода *Blautia* (включая *Blautia wexlerae*), *Subdoligranulum*, *Collinsella* (включая *Collinsella aerofaciens*), крайне значимые бутират продуцирующие бактерии – *Coprococcus catus*,

Eubacterium cylindroides, *Acidaminococcus* sp., *Lachnospiraceae* bacterium, представители рода *Clostridium* (включая *Clostridium bolteae*), а также *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 [137].

Так же как и в образцах кишечных метагеномов больных БА, микробиота кишечника больных ХОБЛ по сравнению с метагеномами кала здоровых лиц характеризовалась снижением содержания бактерий-комменсалов типа *Firmicutes*, составляющих нормофлору кишечника – бактерии родов *Dorea* (включая *Dorea longicatena*), *Phascolarctobacterium*, *Akkermansia* (*Akkermansia muciniphila*), сниженным покрытием такими микроорганизмами, как *Dialister succinatiphilus*, *Clostridium leptum*, бутират-продуцирующих *Ruminococcus obeum*, *Eubacterium cylindroides* и *Roseburia inulinivorans*.

В то же время метагеномы кала больных БА и ХОБЛ в отличие от здоровых лиц характеризовались тенденцией к увеличению представленности типа *Bacteroidetes*. Так, кишечные метагеномы больных БА отличались более высокой представленностью *Bacteroides ovatus*. В образцах кала больных ХОБЛ наблюдалась более выраженная представленность микроорганизмов рода *Odoribacter* и *Paraprevotella* (включая сукцинат производящие *Paraprevotella xylaniphila*), *Butyrivibrio crossotus*, *Parabacteroides distasonis*, *Bacteroides coprophilus*. При этом более тяжелые больные ХОБЛ (3-4 степень тяжести) характеризовались меньшим содержанием бутират-продуцирующих микроорганизмов рода *Lachnospiraceae* и более выраженной представленностью *Bacteroides uniformis* в образцах кала по сравнению с образцами больных ХОБЛ 2 степени тяжести.

Установленные в данной диссертационной работе особенности кишечной микробиоты больных БА и ХОБЛ в сравнении с образцами кала здоровых лиц могут быть объяснены с учетом данных Guilloteau P. и соавторов (2010),

описавших повышение представленности *Bacteroidetes* как закономерное отражение снижения численности бутират-продуцирующей микрофлоры *Firmicutes* на фоне повышения рН в просвете кишечника [142]. Результатом подобного замещения может быть снижение способности кишечной нормобиоты конкурировать с условно-патогенными бактериями за питательные вещества, продуцировать антибактериальные пептиды и улучшать состояние интестинального барьера [207, 233, 239].

Отметим, что 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. Так, образцы кала больных ХОБЛ отличаются наиболее низким содержанием представителей типа *Firmicutes* (бактерии рода *Lachnospiraceae*, *Blautia*, *Phascolarctobacterium* и *Lactobacillus* (включая *Lactobacillus ruminis*), а также *Coprococcus catus*, *Eubacterium bifforme*, *Bifidobacterium catenulatum* и *Ruminococcus torques*), но наивысшей среди сравниваемых групп образцов представленностью потенциально патогенных бактерий рода *Tannerella* (*Tannerella sp.*), а также других представителей типа *Bacteroidetes* – *Parabacteroides johnsonii*, бактерий рода *Bacteroides* (*Bacteroides coprophilus*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides oleiciplenus*). При этом образцы больных БА как по степени представленности указанных *Firmicutes*, так и по содержанию *Bacteroidetes* занимают промежуточное положение в ряду анализируемых групп.

Поскольку, согласно приоритетным результатам данной работы, выявлена положительная корреляция частоты приема АБП и увеличения представленности

в образцах микроорганизмов рода *Bacteroides* (*Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides xylanisolvens*), 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. Значительное уменьшение продукции бутирата и других КЦЖК приводит к дефициту энергообеспечения и дистрофическим изменениям покровного эпителия кишечника, повышается проницаемость кишечного барьера по отношению к антигенам пищевого микробного происхождения, нарушается всасывание воды и электролитов. Все это способствует развитию хронических воспалительных заболеваний толстого кишечника, значительно усугубляющих дисбаланс в кишечной микробиоте [2].

В свою очередь, нарушения в структуре нормальной кишечной микробиоты, характеризующиеся угнетением симбионтной микрофлоры и активацией условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, у больных хроническими бронхообструктивными заболеваниями (особенно ХОБЛ) вследствие персистирующего системного воспаления и частых обоснованных или необоснованных курсов антибиотикотерапии, сопровождаются развитием выраженного ослабления как местного кишечного, так и системного иммунитета, что приводит к снижению резистентности организма, увеличению частоты обострений основного заболевания и, вероятно, ускорению его прогрессирования (что особенно значимо для ХОБЛ).

Выдвинутое нами предположение о глобальном и повсеместном характере микробиотических модификаций, происходящих у больных хроническими бронхообструктивными заболеваниями на фоне повторяющейся

антибиотикотерапии, подтверждается сравнением полученных данных анализа кишечной и орофарингеальной микробиоты.

Согласно результатам исследования, выполненного в рамках данной диссертационной работы, орофарингеальная микробиота больных БА и ХОБЛ характеризуется схожестью таксономического (качественного) состава как при межгрупповом анализе, так и при внутригрупповом сравнении исследуемых образцов больных легкой персистирующей и тяжелой БА, а также при сравнении мазков пациентов, страдающих средне-тяжелой ХОБЛ с орофарингеальными мазками больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения.

В данной работе показано, что орофарингеальная микробиота больных БА и ХОБЛ характеризуется практически идентичным составом преобладающих родов микроорганизмов. В число наиболее представленных микроорганизмов со значением 10% и более в структуре метагенома в образцах больных БА и ХОБЛ вошли роды *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veillonella*, что коррелирует с результатами зарубежных исследований по анализу респираторной микробиоты при БА и ХОБЛ [59], а также соотносится с данными состава наиболее представленных микроорганизмов в микробиотических сообществах дыхательных путей здоровых лиц [83, 122]. В выполненном нами исследовании среди преобладающих микроорганизмов, составляющих от 2 до 10% микробиоты, в образцах больных БА и ХОБЛ, следует выделить роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia*. Также в группу наиболее представленных микроорганизмов у больных ХОБЛ входит род *Porphyromonas*, а в образцах пациентов, страдающих БА, – род *Actinobacillus*, что также не противоречит результатам международных исследований в этой области [72].

Согласно результатам данного диссертационного исследования образцы орофарингеальных мазков больных ХОБЛ в сравнении с образцами больных БА характеризуются более низким содержанием микроорганизмов, относящихся к отделу *Bacteroidetes* (в частности *Prevotella melaninogenica*), а также сниженной представленностью микроорганизмов таких родов, как *Selenomonas*, *Granulicatella* и *Gemella*. 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 [122]. 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 [199].

При этом *Prevotella melaninogenica* как и микроорганизмы родов *Selenomonas*, *Granulicatella* и *Gemella* традиционно воспринимаются как компоненты оральной микробиоты у относительно здоровых лиц [159, 261], однако данные по различиям указанных бактерий в респираторной микробиоте у больных БА и ХОБЛ приводятся нами впервые.

Нами установлено, что орофарингеальная микробиота пациентов с тяжелой БА по сравнению с больными легкой астмой, характеризуется снижением общего количества бактерий рода *Prevotella* (отдел *Bacteroidetes*), большинство из которых является компонентой нормальной микробиоты дыхательных путей и, предположительно, обладает протективным эффектом по отношению к развитию легочного воспаления [95], в частности эозинофильной природы [119], поэтому снижение представленности бактерий рода *Prevotella*, вероятно, может служить одним из механизмов, модифицирующих течение астмы. В обобщенной выборке исследованных мазков больных БА и ХОБЛ наименьшая представленность бактерий рода *Prevotella* свойственна образцам пациентов с выраженным кашлем и продукцией мокроты, что также подтверждает комменсальный характер взаимоотношений бактерий данного рода с организмом человека.

Уникальные данные, полученные нами, свидетельствуют о том, что представленность *Prevotella* положительно коррелирует с частотой курсовой терапии СКС у больных БА и ХОБЛ. Возможно, выявленные особенности подчеркивают модифицирующее влияние глюкокортикостероидов, назначенных при обострении ХОБЛ, на состав микробиоты респираторного тракта.

Важно отметить, что влияние отдельных представителей граммотрицательных бактерий рода *Prevotella* на бронхиальное воспаление у больных БА и ХОБЛ, по-прежнему остается дискуссионным. Так, в сравнительном исследовании Larsen J.M. et al (2015) продемонстрирована способность синантропных штаммов *Prevotella* (*Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nanceiensis* и *Prevotella salivae*) инициировать развитие умеренной бронхиальной нейтрофилии, ассоциированной с TLR2 рецепторами. Авторы рассматривают данные синантропные штаммы *Prevotella* в качестве относительно приемлемых для иммунного реагирования микроорганизмов, к жизнедеятельности которых иммунная система способна формировать и поддерживать определенную толерантность в естественных условиях [95]. В то же время, выявленное нами существенное повышение представленности *Prevotella nanceiensis* 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).

В работе установлено, 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 [199].

Также показано увеличение представленности *Firmicutes* во фрагментах легочной паренхимы у больных ХОБЛ по мере прогрессирования болезни [258].

В то же время, по результатам выполненного нами исследования в орофарингеальных мазках у больных ХОБЛ 3-4 степени тяжести по сравнению с больными ХОБЛ 2 степени тяжести наблюдается снижение отдельных семейств типа *Firmicutes* – *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae* (в частности, род *Dialister*), значение которых в патогенезе ХОБЛ в настоящее время не выяснено.

В рамках данной диссертации показано, что у больных ХОБЛ в сравнении с больными БА орофарингеальная микробиота характеризовалась более высокой представленностью рода *Mycoplasma*, среди которых *Mycoplasma pneumoniae*, как известно, — частый возбудитель респираторных инфекций, ассоциированный, в том числе, с развитием обострений БА и ХОБЛ, а также более выраженной представленностью типа *Proteobacteria* (*Aggregatibacter*, *Alcaligenaceae* и *Haemophilus influenzae*), которые по данным Larsen J.M. et al (2015) могут индуцировать выраженное TLR2 (Toll-like receptor 2) - независимое нейтрофильное воспаление у больных ХОБЛ [95].

Известно, что орофарингеальная микробиота больных БА и ХОБЛ отличается повышенной представленностью микроорганизмов отдела *Proteobacteria* по сравнению с образцами здоровых лиц [122]. Выполненное нами исследование продемонстрировало у больных тяжелой БА по сравнению с астмой легкого течения более высокую обсемененность орофарингеальных образцов протеобактериями семейства *Moraxellaceae*, включающего несколько патогенных видов (например, *Moraxella catarrhalis*, с колонизацией которой ряд исследователей связывает развитие нейтрофильного воспаления на слизистой бронхов [95, 214]), условно патогенных *Neisseria cinerea* и *Aggregatibacter segnis* [208].

Результаты выполненного нами сравнения орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ 3-4 степени тяжести и группы образцов больных ХОБЛ 2 степени тяжести продемонстрировали снижение содержания протеобактерий и конкретно рода *Haemophilus* в группе более тяжелых пациентов, что, на первый взгляд,

кажется противоречащим сказанному выше о значении протеобактерий в патогенезе бронхообструктивных заболеваний. Однако, ряд исследователей отмечает менее значимую представленность *Proteobacteria* у больных тяжелой ХОБЛ, орофарингеальная микробиота которых сохраняет достаточную степень разнообразия состава [44, 258], что согласуется с данными нашего исследования, поскольку различий по уровню альфа-разнообразия между орофарингеальной микробиотой обследованных нами больных ХОБЛ не выявлено.

Полученные нами данные о снижении представленности *Proteobacteria* у больных ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения также подкрепляются результатами корреляционного анализа, выявившего снижение *Proteobacteria* в совокупной выборке орофарингеальных мазков больных ХОБЛ и БА по мере увеличения частоты обострений, и на фоне выраженной одышки (по значению mMRC). Также повышение выраженности одышки (по данным вопросника mMRC) и частоты госпитализаций обратно коррелировало с долей *Haemophilus* в структуре микробиома. Таким образом, пациентам, страдающим тяжелой / очень тяжелой ХОБЛ и характеризующимся высоким риском обострений, в стабильный период свойственно снижение представленности протеобактерий в дыхательных путях. Полученные сведения не противоречат результатам международных исследований [51] и, вероятно, подчеркивают высокую частоту использования АБП, направленных на эрадикацию у данной группы больных патогенных видов *Proteobacteria* (в частности бактерий рода *Haemophilus*), что приводит к снижению содержания указанного типа бактерий и способствует повышению разнообразия респираторной микробиоты за счет других таксонов.

Обсуждая *Proteobacteria*, следует отметить бактерии рода *Neisseria*, ассоциированные по данным литературы как с патогенезом ХОБЛ в целом, так и с развитием обострений данного заболевания. Выполненное исследование продемонстрировало, что больные БА и ХОБЛ с более выраженной продукцией мокроты имеют более выраженную представленность рода *Neisseria* в орофарингеальной микробиоте.

Как показало данное исследование, у больных тяжелой неконтролируемой астмой наблюдалось более высокое содержание представителей родов бактерий *Alloiococcus*, ассоциируемых с развитием среднего отита и назофарингита у детей [141], *Parvimonas*, демонстрирующих антагонистическую направленность роста с бактериями рода *Prevotella* [123]. Также больным тяжелой БА свойственна более высокая представленность рода *Lactobacillus*, который по данным Sze et al. (2012) вносит существенный вклад в увеличение содержания бактерий типа *Firmicutes* у больных тяжелой ХОБЛ [258]. 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.

Новые данные получены нами в рамках ассоциативного анализа представленности различных микроорганизмов в орофарингеальной микробиоте больных БА и ХОБЛ и анамнеза фармакотерапии. Так, влияние частоты эпизодов приема СКС, назначенных по поводу обострения у больных БА и ХОБЛ, нашло отражение в снижении содержания в орофарингеальных мазках таких родов протеобактерий, включающих патогенные микроорганизмы, как *Streptococcus* и *Haemophilus*.

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.

В рамках представленного нами исследования для образцов орофарингеальной микробиоты больных БА и ХОБЛ выполнена видовая идентификация и анализ генетических детерминант антибактериальной устойчивости стрептококков, которые, являясь одним из наиболее типичных контаминантов слизистой дыхательных путей у больных БА и ХОБЛ, также формируют естественный резервуар генов AP, в частности, *ermB* и *ermF*, определяющих в том числе и устойчивость к макролидам [200]. По результатам выполненного исследования 65,7% всех образцов характеризовались высокой степенью бактериального обсеменения, несмотря на отсутствие обострения. Стрептококки (преимущественно зеленающие стрептококки группы *mitis*) идентифицированы в 93,3% образцов пациентов с ХОБЛ и в 98% мазков больных БА. В то же время *S. Pneumoniae* выявлен лишь у небольшой группы пациентов с БА (7,8%) и ХОБЛ (6,74%), общей характеристикой для которых является склонность к тяжелому течению заболевания и наличие повторяющихся эпизодов обострения с потребностью в назначении АБП. В 42,9% случаев в орофарингеальных мазках у больных БА и ХОБЛ вне обострения обнаружен *S. pyogenus*. Полученные результаты систематизируют и дополняют единичные данные международных исследований по представленности указанных видов стрептококков в респираторных образцах больных БА и ХОБЛ [77].

Новые данные, полученные нами, свидетельствуют о высокой распространенности генов AP *mef* и *ermB* в образцах орофарингеальной микробиоты больных хроническими обструктивными заболеваниями. Гены *mef* обнаружены в орофарингеальных мазках у всех обследованных больных БА и ХОБЛ, в то время как ген *ermB* встречался у 91% пациентов с ХОБЛ и несколько реже – у 82,4% пациентов с астмой. Примечательно, что образцы мазков с отсутствием гена *ermB* принадлежали больным ХОБЛ с низким риском обострений (по классификации GOLD, 2011), а также пациентам с БА и ХОБЛ, не получавшим на протяжении предшествующих 12 месяцев АБТ. Впервые

выяснено, что уровень представленности этих генов в орофарингеальных мазках больных БА и ХОБЛ положительно коррелирует с выраженностью обсемененности образца стрептококками, а степени представленности генов *mef* и *ermB* находятся в прямой зависимости друг от друга.

В данном диссертационном исследовании впервые показано, что группа больных с положительным результатом анализа на ген *ermB* отличалась более высоким индексом курения, выраженной продукцией мокроты и более частым применением АБП (в частности, класса макролидов) на протяжении предшествующих 12 месяцев, что также подкрепляется положительной корреляцией уровня представленности генов *mef* и *ermB* в орофарингеальных образцах больных ХОБЛ и БА с частотой эпизодов приема АБП в целом и макролидов в частности.

Также при ХОБЛ выявлен положительный характер корреляции степени представленности гена *ermB* с выраженностью продукции мокроты и индексом курения, а генов *mef* и *ermB* с частотой обострений заболевания.

Таким образом, наиболее высокий уровень представленности указанных генов АР, 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 [21, 31, 153].

Сравнение данных о составе и степени представленности генов АР в орофарингеальных и кишечных метагеномах больных БА и ХОБЛ также подтверждает системный характер модификаций, происходящих в микробиотической среде под влиянием повторяющихся эпизодов активной фармакотерапии с использованием АБП.

Результаты сравнительного анализа генов АР кишечной микробиоты больных БА, ХОБЛ и здоровых добровольцев с помощью метагеномного метода (по базам данных ARDB и CARD) и дополнительной качественной детекции присутствия генов АР для выборочных генов методом ПЦР реального времени, свидетельствующие о значительном разнообразии набора генов резистентности к АБП во всех метагеномах, являются приоритетными.

При использовании базы данных ARDB нами впервые обнаружено, что суммарная относительная представленность генов АР кишечной микробиоты для группы образцов кала больных БА значимо выше, чем для здоровых лиц, но ниже, чем для группы пациентов с ХОБЛ.

При этом относительный уровень соответствующих генов АР выше у больных БА и ХОБЛ по сравнению со здоровыми лицами для таких групп АБП, как бета-лактамы (пенициллины и цефалоспорины), макролиды, и фторхинолоны, то есть, фактически, для всех фармакотерапевтически значимых групп антибиотиков, наиболее широко применяемых в терапии респираторных заболеваний, включая лечение инфекционно зависимых обострений хронических обструктивных заболеваний легких [22, 26]. Также по сравнению со здоровыми лицами в метагеномах больных ХОБЛ был избыточным относительный уровень представленности генов АР к сульфаниламидам, аминогликозидам и линкозамидам, а в группе образцов больных БА – к аминогликозидным, тетрациклиновым АБП и некоторым препаратам других групп.

Важно отметить, что из числа наиболее значимых для пульмонологии антибиотиков у обследованных нами больных БА и ХОБЛ макролиды и цефалоспорины оказались в числе препаратов с наиболее высоким уровнем представленности генов АР в кишечных метагеномах.

По ряду АБП между группами метагеномов кала больных БА и ХОБЛ 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, а также к гликопептидным АБП (ванкомицину и тейкопланину).

Обращает на себя внимание выявленный нами факт присутствия гликопептидных антибиотиков (ванкомицина и тейкопланина) в списке препаратов с наиболее высокой средней представленностью генов AP (по данным ARDB) как у больных БА и ХОБЛ, так и у относительно здоровых лиц. Формирование AP для ванкомицина и тейкопланина обеспечивается не за счет отдельных генов, а кодируется целым опероном генов, ключевыми из которых являются гены лигаз (*vanA*, *vanB* и т.д.). В полученных нами результатах наиболее представлены не гены лигаз, а второстепенные гены, что корреспондирует с данными литературы [109]. Важно, что уровни представленности идентифицированных нами генов AP к гликопептидам в метагеномах кишечной микробиоты больных бронхообструктивными заболеваниями и здоровых лиц статистически значимо не различались.

Различия в уровне резиста между группами больных БА и ХОБЛ, наблюдаемые при анализе с использованием базы ARDB, отражаются и в уровнях представленности классов генов AP. Так, 29 из классов генов, описанных в ARDB, по сравнению с контролем оказались достоверно более представленными в группе метагеномов пациентов, страдающих ХОБЛ, в то время как у больных астмой в сравнении с контрольной группой избыточно представлены только 8 классов генов AP. Выявленные нами особенности указывают на более частое применение АБП при лечении больных ХОБЛ, что обусловлено более высокой значимостью инфекционного фактора в развитии обострений у данной группы пациентов и подтверждается сравнительным анализом среднегодовой частоты курсов применения АБП у больных ХОБЛ и БА ($1,69 \pm 1,48$ и $0,31 \pm 0,78$ эпизодов соответственно).

В результате исследования резиста выявлено, что во всех образцах кишечной микробиоты больных ХОБЛ присутствуют гены *ermB* и *mef*, определяющие формирование антибактериальной устойчивости к макролидам, стрептограминам и линкозамидам. Значительная представленность данных генов в образцах кишечной микробиоты соответствует высокому уровню их содержания в орофарингеальных образцах. Это подчеркивает системный характер

накопления генов лекарственной устойчивости к макролидным АБП, как к одним из наиболее часто применяемых антибиотиков по данным годичного анамнеза АБТ у обследованных нами больных ХОБЛ.

Следует отметить более высокий уровень генов АР к макролидам, цефалоспорином, линкозамидам и фторхинолонам в метагеномах кала больных ХОБЛ, применявших соответственно макролидные, цефалоспориновые, линкозамидные или фторхинолоновые АБП на протяжении года, предшествующего включению в исследование (по данным анализа с использованием ARDB). Также выявлена прямая корреляционная связь между частотой курсовой АБТ и уровнем резиста по отдельным классам АБП (линкозамиды, стрептограмин В, цефалоспорины, макролиды, сульфониламиды) у больных БА и ХОБЛ.

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 АР по сравнению с микробиомом кишечника здоровых лиц и характеризуется наиболее высоким уровнем резиста по отношению к АБП, ассоциированным с терапией респираторных инфекций, включая обострения хронических обструктивных заболеваний легких, - макролидам, бета-лактамам и фторхинолонам. Величина представленности генов АР 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 АР 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.

Таким образом, данное диссертационное исследование, основанное на высокотехнологичном молекулярно-генетическом анализе орофарингеальных и кишечных микробиотических сообществ больных БА и ХОБЛ, а также идентификации генов АР с профилированием уровней их представленности в ассоциации с клинико-anamnestическими 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 АР, 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 (преимущественно нейтрофильным в случае ХОБЛ и эозинофильным при астме), которое лежит в основе развития, поддержания и усугубления вентиляционных нарушений, связанных с обратимой (в следствие бронхоспазма и отека слизистой) в случае БА и преимущественно необратимой (за счет развития фиброза дистальных бронхов и эмфиземы) при ХОБЛ бронхиальной обструкцией, дисфункцией бронхиального эпителия, гиперпродукцией вязкой слизи, обтурирующей мелкие бронхи [150, 153]. 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 [76].

В основе развития обострений, как явлений закономерных и повторяющихся при бронхообструктивных болезнях, далеко не всегда главенствующая роль

принадлежит фактору бактериальной инфекции [22, 25]. 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 [122, 153].

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 [55, 188].

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 (рис. 46).

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 (рис. 46).

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.



* Более выраженные изменения в респираторной микробиоте больных ХОБЛ в сравнении с больными БА;

** Более выраженные изменения в кишечной микробиоте больных ХОБЛ в сравнении с больными БА и здоровыми лицами.

Рисунок 46 – Схема концепции исследования

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 (рис. 47).

В свою очередь, орофарингеальные микробиотические сообщества пациентов, страдающих тяжелой неконтролируемой БА и ХОБЛ тяжелого и крайне тяжелого течения, характеризуются 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 (рис. 47).

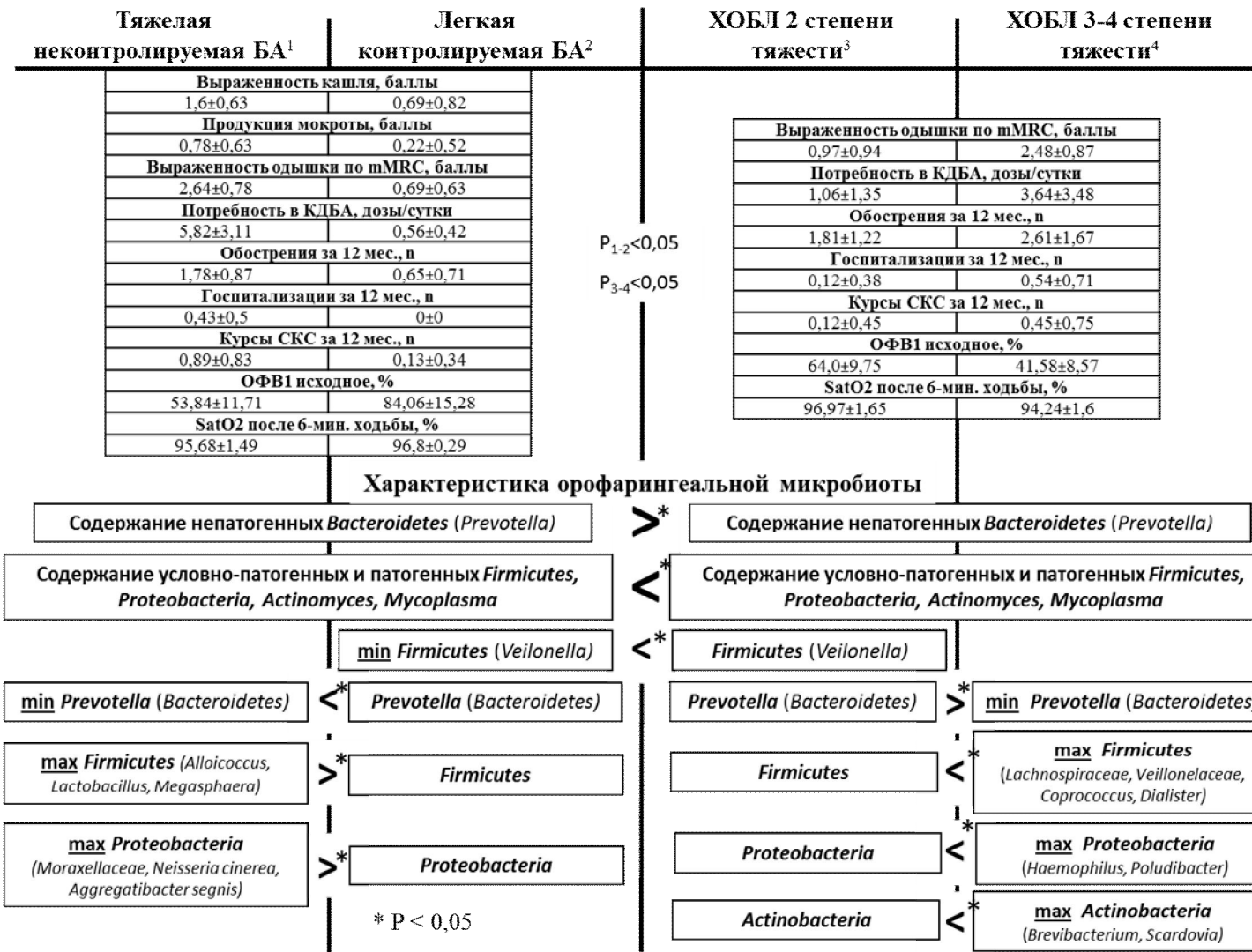


Рисунок 47 – Клинико-функциональные фенотипы БА и ХОБЛ с характеристикой состава орофарингеальной микробиоты

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.

2. 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 сокращений и условных обозначений

АБП	антибактериальные препараты
АБТ	антибактериальная терапия
АД	артериальное давление
АМП	антимикробные препараты
АР	антибиотикорезистентность
БА	бронхиальная астма
БГР	бронхиальная гиперреактивность
ГКС	глюкокортикостероиды
ГЭРБ	гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь
ДДБА	длительно действующие бета-2-агонисты
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖЕЛ	жизненная емкость легких
ИБ	ипратропия бромид
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИКС, ИГКС	ингаляционные глюкокортикостероиды
ИЛ, IL	интерлейкин
ИМ	индуцированная мокрота
КДБА	коротко действующие бета-2-агонисты
КЗ	коэффициент зависимости
КИ	клинический индекс
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
ТБ	тиотропия бромид

ФВД	функция внешнего дыхания
ФЖЕЛ	форсированная жизненная емкость легких
ФП	флутиказона пропионат
ХОБЛ	хроническая обструктивная болезнь легких
цАМФ	циклический аденозинмонофосфат
ARDB	Antibiotic Resistance Data Base (База данных по антибактериальной устойчивости)
ATS	American Thoracic Society (Американское торакальное общество)
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»)
HFA	гидрофторалкан
ICH GCP	International Conference on harmonization, Good Clinical Practice (Международная конференция по гармонизации, Качественная клиническая практика)
IgE	иммуноглобулины класса E
$M \pm m$	вариант представления данных, где M означает среднее значение, а m – стандартное отклонение
n	количество
NO	оксид азота
OR	odds ratio (отношение шансов)
PC20	мера бронхиальной гиперреактивности (предельная концентрация метахолина, вызывающая падение ОФВ1 на 20%)
SatO ₂	периферическая кислородная сатурация венозной крови

TGF β	Transforming growth factor beta (трансформирующий ростовой фактор бета)
Th	Т хелпер
TNF- α	tumor necrotic factor alfa (тумор-некротический фактор альфа)
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)

Список литературы

1. Ардатская, М. Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта : автореф. дис. ... д-р. мед. наук: 14.00.05 / Ардатская Мария Дмитриевна. – М., 2003. – 45 с.
2. Ардатская, М. Д. Масляная кислота и инулин в клинической практике: теоретические аспекты и возможности клинического применения: пособие / М. Д. Ардатская; под ред. М. Д. Ардатской. – М. : Форте принт, 2014. – С. 64.
3. Белевский, А. С. Глобальная инициатива по ХОБЛ – пересмотр 2006 г. / А. С. Белевский // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2006. – №4. – С. 28–30.
4. Белевский, А. С. Оценка уровня контроля бронхиальной астмы с помощью АСТ-теста / А. С. Белевский, Н. П. Княжеская, Ю. К. Новиков // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2007. – № 1. – С. 43–47.
5. Биличенко, Т. Н. Бронхиальная астма : в 2 т. / Т. Н. Биличенко; под ред. А. Г. Чучалина. – М. : Агар, 1997. – Т. 1: Эпидемиология бронхиальной астмы. – С. 400–423.
6. Бронхиальная астма в России: результаты национального исследования качества медицинской помощи больным бронхиальной астмой / А. Г. Чучалин, А. Н. Цой, В. В. Архипов и др. // Пульмонология. – 2006. – №6. – С. 94–102.
7. Видовая идентификация и анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости стрептококков с помощью количественной мультиплексной полимеразной цепной реакции у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / Л. Н. Икрянникова, М. Е. Сенина, Е. С. Лисицина и др. // Пульмонология. – 2014. – № 6. – С. 40–48.
8. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2011 г.) / Пер. с англ. под ред. А. С. Белевского. – М. : Российское респираторное общество, 2012. – 108 с.

9. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2014 г.) / Пер. с англ. под ред. А. С. Белевского. – М. : Российское респираторное общество, 2014. – 92 с.
10. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2003 г.) / Пер. с англ. под ред. А. Г. Чучалина. – М. : Изд-во «Атмосфера», 2003. – 96 с.
11. ГОСТ Р 52379–2005. Надлежащая клиническая практика. – Введ. 2006–01–04. – М. : Изд-во стандартов, 2006. – 39 с.
12. Готтшалк, Г. Метаболизм бактерий. – Пер. с англ. – М. : Мир, 1982. – 445 с.
13. Корниенко, Е. А. Микробиота кишечника и возможности пробиотической терапии при воспалительных заболеваниях кишечника / Е. А. Корниенко // Фарматека. – 2015. – №2. – С. 39–43.
14. Красноголовец, В. Н. Дисбактериоз кишечника. – 2-е изд. – М.: Медицина, 1989. – С. 51–78.
15. Куницина, Ю. Л. Противовоспалительная терапия при ХОБЛ / Ю. Л. Куницина, Е. И. Шмелев // Пульмонология. – 2003. – №2. – С. 111–116.
16. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М. : Мир, 1984. – 478 с.
17. Минушкин, О. Н. Дисбактериоз кишечника / О. Н. Минушкин, М. Д. Ардатская, В. Н. Бабин и др. // Российский Медицинский журнал. – №3. – 1999. – С. 40–45.
18. Мирзабеков, А. Д. Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и медицине / А. Д. Мирзабеков, Д. В. Прокопенко, В. Р. Чечеткин // Информационные медико-биологические технологии. – М. : ГЭОТАР-Мед, 2002. – С. 166–198.
19. Многоликая бронхиальная астма, диагностика, лечение и профилактика / Под ред. Г. Б. Федосеева, В. И. Трофимова, М. А. Петровой. – СПб.: Нордмедиздат, 2011. – 344 с.

20. Олескин, А. В. Биополитический подход к реабилитологии: потенциальная роль микробной нейрoхимии / А. В. Олескин, Б. А. Шендеров // Вестник восстановительной медицины. – 2013. – №1. – С. 60–67.
21. Пульмонология. Национальное руководство / Под ред. А. Г. Чучалина. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 768 с.
22. Пульмонология. Национальное руководство. Краткое издание / Под ред. А. Г. Чучалина. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 800 с.
23. Распространенность и клинико-аллергическая характеристика бронхиальной астмы в Восточной Сибири / А. Г. Чучалин, Б. А. Черняк, С. Н. Буйнова и др. // Пульмонология. – 1999. – № 1. – С. 42–49.
24. Распространенность бронхиальной астмы и аллергического ринита среди взрослого населения Санкт-Петербурга / Г. Б. Федосеев, А. В. Емельянов, Г. Р. Сергеева и др. // Терапевтический архив. – 2003. – № 1. – С. 21–27.
25. Синопальников, А. И. Обострение хронической обструктивной болезни легких. Современные подходы к лечению / А. И. Синопальников, Э. З. Маев // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – №4. – С. 35–38.
26. Справочник по антимикробной терапии. Выпуск 3 / Под ред. Р. С. Козлова, А. В. Дехнича. – Смоленск : Макмах, 2013. – 480 с.
27. Тец, В. В. Справочник по клинической микробиологии / В. В. Тец. – М. : Стройлеспечать, 1994. – 224 с.
28. Фенотипы больных хронической обструктивной болезнью легких / А. В. Аверьянов, А. Г. Чучалин, А. Э. Поливанова и др. // Терапевтический архив. – 2009. – № 3. – С. 9–15.
29. Хроническая обструктивная болезнь легких / Под ред. А. Г. Чучалина. – М. : Атмосфера, 2008. – 568 с.
30. Хроническая обструктивная патология легких у взрослых и детей: Руководства / Под ред. А. Н. Кокосова. – СПб. : СпецЛит, 2004. – 304 с.
31. Чучалин, А. Г. Рациональная фармакотерапия заболеваний органов дыхания: Руководство для практикующих врачей / А. Г. Чучалин, С. Н. Авдеев, В. В. Архипов и др. – М. : Изд-во «Литтерра», 2004. – 874 с.

32. Чучалин, А. Г. Система оксиданты-антиоксиданты и пути медикаментозной коррекции / А.Г. Чучалин // Пульмонология. – 2004. – №4. – С. 111–115.
33. Чучалин, А. Г. Тяжелая бронхиальная астма / А.Г. Чучалин // Русский медицинский журнал. – 2000. – №12. – С. 482–486.
34. Чучалин, А. Г. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания. Часть 2. ХОБЛ и некардиальные поражения / А. Г. Чучалин // Русский медицинский журнал. – 2008. – №5. – С. 246–249.
35. Чучалин, А. Г. Хронические обструктивные болезни легких / А. Г. Чучалин. – М. : ЗАО «Изд-во БИНОМ», 2000. – 510 с.
36. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. В 3 т. Т. 1. Микрофлора человека и животных и ее функции / Б. А. Шендеров. – М. : ГРАНТЬ, 1998. – С. 288.
37. Шендеров, Б. А. Омик-технологии и их значение в современной профилактической и восстановительной медицине / Б. А. Шендеров // Вестник восстановительной медицины. – 2012. – №3(49). – С. 70-78.
38. Шендеров, Б. А. Роль питания и кишечной микрофлоры в программировании и реализации эпигенома здоровых и больных людей / Б. А. Шендеров // Вестник восстановительной медицины. – 2013. Специальный выпуск. – С. 102–107.
39. Шмелев, Е. И. Воспаление – ключевой элемент прогрессирования хронической обструктивной болезни легких / Е. И. Шмелев // Consilium medicum. – 2003. – №4. – С. 5–7.
40. A catalog of reference genomes from the human microbiome / K. E. Nelson, G. M. Weinstock, S. K. Highlander et al. // Science. – 2010. – Vol. 328. – P. 994–999.
41. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin, R. Li, J. Raes et al. // Nature. – 2010. – Vol. 464. – P. 59–65.
42. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes / J. Qin, Y. Li, Z. Cai et al. // Nature. – 2012. – Vol. 490, N 7418. – P. 55–60.

43. A novel technique to explore the functions of bronchial mucosal T cells in chronic obstructive pulmonary disease: application to cytotoxicity and cytokine immunoreactivity / M. W. Lethbridge, D. M. Kemeny, J. C. Ratoff et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2010. – Vol. 161, N 3. – P. 560–569.
44. A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations / Y. J. Huang, E. Kim, M. J. Cox // *OMICS.* – 2010. – Vol. 14, N 1. – P. 9–59.
45. A poke into the diversity and associations within human anterior nare microbial communities / M. L. Wos-Oxley, I. Plumeier, C. von Eiff et al. // *ISME J.* – 2010. – Vol. 7. – P. 839–851.
46. Acid denaturation of alpha1-antitrypsin: characterization of a novel mechanism of serpin polymerization / G. L. Devlin, M. K. Chow, G. J. Howlett et al. // *J. Mol. Biol.* – 2002. – N 324. – P. 859–870.
47. Active detection of chronic obstructive pulmonary disease and asthma in the general population. Results and economic consequences of the DIMCA program / G. van den Boom, C. P. van Schayck, M. P. van Mollen et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1998. – Vol. 158, N 6. – P. 1730–1738.
48. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers / M. Bafadhel, S. McKenna, S. Terry S. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 184, N 6. – P. 662–71.
49. Airway Inflammation and Bronchial Bacterial Colonization in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / S. Sethi, J. Maloney, L. Grove et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 173, N 9. – P. 991–998.
50. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease / N. Soler, S. Ewig, A. Torres et al. // *Eur. Respir. J.* – 1999. – Vol. 14, N 5. – P. 1015–1022.
51. Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / Y. J. Huang, S. Sethi, T. Murphy // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52, N 8. – P. 2813–2823.

52. Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients / M. J. Cox, M. Allgaier, B. Taylor et al. // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, N 6. – e11044.
53. Airways obstruction, chronic expectoration and rapid decline in FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils / D. Stanescu, A. Sanna, C. Veriter et al. // *Thorax*. – 1996. – Vol. 51, N 3. – P. 267–271.
54. Ait-Khaled, N. Chronic respiratory diseases in developing countries: the burden and strategies for prevention and management / N. Ait-Khaled, D. Enarson, J. Bousquet // *Bull. World Health Organ*. – 2001. – Vol. 79, N 10. – P. 971–979.
55. Al-Ani, S. Predictors of treatment with antibiotics and systemic corticosteroids for acute exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in primary care / S. Al-Ani, M. Spigt, J. Laue // *BMC Fam. Pract.* – 2015. – Vol. 6, N 1. – P. 40.
56. Allergy: Principles and Practice / Ed. by E. Middleton Jr. – 5th ed. – St. Louis, MO : Mosby Yearbook, 1998. – 1249 p.
57. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers / R. Finkelstein, R. S. Fraser, H. Ghezzi, M. G. Cosio // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1995. – Vol. 152. – P. 1666–1672.
58. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection / I. Retamales, W. M. Elliot, B. Meshi et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2001. – Vol. 164, N 3. – P. 469–473.
59. Analysis of the bacterial community in chronic obstructive pulmonary disease sputum samples by denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR / D. Wu, C. Hou, Y. Li et al. // *BMC Pulm. Med.* – 2014. – Vol. 14. – P. 179.
60. Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients / D. Worlitzsch, C. Rintelen, K. Böhm et al. // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2009. – Vol. 15, N 5. – P. 454–460.
61. Anto, J. M. Chronic obstructive pulmonary disease / J. M. Anto, P. Vermeire, J. Sunyer // *Eur. Respir. Monograph: Respir. epidemiology in Europe*. – 2000. – Vol. 5, № 15. – P. 1–22.

62. Arocha-Sandoval, F. Oropharyngeal bacteria in asthmatic patients in the city of Maracaibo, Venezuela / F. Arocha-Sandoval, K. Parra-Quevedo // *Invest. Clin.* – 2002. – Vol. 43, N 3. – P. 145–155.
63. Artis, D. The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis / D. Artis, Abt MC // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 25, N 6. – P. 496–502.
64. Assessing the diagnostic importance of nonviable bacterial cells in respiratory infections / G. B. Rogers, F. A. Stressmann, G. Koller et al. // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 62. – P. 133–141.
65. Assessment of airway inflammation using sputum, BAL, and endobronchial biopsies in current and ex-smokers with established COPD / Y. Wen, D. W. Reid, D. Zhang et al. // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2010. – Vol. 5, N 5. – P. 327–334.
66. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis / A. T. Hill, E. J. Campbell, S. L. Hill // *Am. J. Med.* – 2000. – Vol. 109, N 4. – P. 288–295.
67. Association of bacteria and viruses with wheezy episodes in young children: prospective birth cohort study / H. Bisgaard, M. N. Hermansen, K. Bonnelykke et al. // *BMJ.* – 2010, N 341. – P. 4978–4984.
68. Association of *Mycoplasma pneumoniae* antigen with initial onset of bronchial asthma / T. Yano, Y. Ichikawa, S. Komatu et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1994. – Vol. 149, N 5. – P. 1348–1353.
69. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial / R. H. Green, C. E. Brightling, S. McKenna et al. // *Lancet.* – 2002. – Vol. 360, N 9347. – P. 1715–1721.
70. Asthma guidelines: an assessment of physician understanding and practice / K. C. Doerschug, M. W. Peterson, C. S. Dayton et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1999. – Vol. 159, N 6. – P. 1735–1741.

71. Asthma Phenotypes, Risk Factors, and Measure of Severity in National Sample of US Children / F. C. Kelley, D. M. Mannino, D. M. Homa // *Pediatrics*. – 2005. – Vol. 115, N 3. – P. 726–731.
72. Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum / P. R. Marri, D. A. Stern, A. L. Wright // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2013. – Vol. 131, N 2. – P. 346–352.
73. Ayres, J. G. Brittle asthma / J. G. Ayres, J. F. Miles, P. J. Barnes // *Thorax*. – 1998. – Vol. 53, N 4. – P. 315–321.
74. Backhed, F. Programming of host metabolism by the gut microbiota / F. Backhed // *Ann. Nutr. Metab.* – 2011. – Vol. 58, Suppl. 2. – P. 44–52.
75. Bacterial community variation in human body habitats across space and time / E. K. Costello, C. L. Lauber, M. Hamady et al. // *Science*. – 2009. – Vol. 326, N 5960. – P. 1694-1697.
76. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease: a study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush / E. Monso, J. Ruiz, A. Tosell et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1995. – Vol. 152. – P. 1316–1320.
77. Bacteriological and clinical profile of Community acquired pneumonia in hospitalized patients / B. A. Shah, G. Singh, M. A. Naik et al. // *Lung India*. – 2010. – Vol. 27, N 2. – P. 54–57.
78. Banerjee, D. Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD / D. Banerjee, O. A. Khair, D. Honeybourne // *Eur. Respir. J.* – 2004. – N 23. – P. 685-691.
79. Barben, J. Current management of acute bronchiolitis in Switzerland / J. Barben, J. Hammer // *Swiss. Med. Wkly.* – 2003. – N 133. – P. 9–15.
80. Barnes, P. J. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: molecular and cellular mechanisms / P. J. Barnes, S. D. Shapiro, R. A. Pauwels // *Eur. Respir. J.* – 2003. – N 22. – P. 627–688.
81. Barnes, P. J. Difficult asthma / P. J. Barnes, A. J. Woolcock // *Eur. Respir. J.* – 1998. – Vol. 12, N 5. – P. 1209–1218.

82. Barnes, P. J. Small airways in COPD / *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350, N 26. – P. 2635–2637.
83. Beck, J. M. The microbiome of the lung / J. M. Beck, V. B. Young, G. B. Huffnagle // *Transl. Res.* – 2012. – Vol. 160, N 4. – P. 258–266.
84. Bennett, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria / P. M. Bennett // *Br. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 153, Suppl. 1. – P. 347–357.
85. Bilde, L. The cost of treating patients with COPD in Denmark – A population study of COPD patients compared with non-COPD controls / L. Bilde, A. Rud Svenning, J. Dollerup // *Respir. Med.* – 2007. – Vol. 101, N 3. – P. 539–546.
86. Blasi, F. The role of antibiotics in asthma / F. Blasi, S. L. Johnston // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2007. – N 29. – P. 485–493.
87. Bouler, L. P. Near fatal asthma: clinical and physiologic features, perception of bronchoconstriction and psychologic profile / L. P. Bouler // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1997. – Vol. 88, N 6. – P. 838–846.
88. Bronchoscopic evaluation of severe asthma: Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids / S. E. Wenzel, S. J. Szeffler, D. Y. M. Leung et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1997. – Vol. 156. – P. 737–743.
89. Busse, W. W. Respiratory infections: their role in airway responsiveness and the pathogenesis of asthma / W. W. Busse // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1990. – Vol. 85, N 4. – P. 671–683.
90. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease / M. Saetta, A. Di Stefano, G. Turato et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1998. – Vol. 157. – P. 822–826.
91. Celli, B. Improvement in resting inspiratory capacity and hyperinflation with tiotropium in COPD patients with increased static lung volumes / B. Celli, R. ZuWallchack, S. Wang // *Chest.* – 2003. – Vol. 124, N 5. – P. 1743–1748.
92. Characteristics of COPD phenotypes classified according to the findings of HRCT / Y. Kitaguchi, K. Fujimoto, K. Kubo et al. // *Respir. Med.* – 2006. – Vol. 100, N 10. – P. 1742–1752.

93. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates / H. Bisgaard, M. N. Hermansen, F. Buchvald et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – N 357. – P. 1487–1495.
94. Chlamydia pneumoniae and newly diagnosed asthma: a case-control study in 1 to 6-year-old children / M. Korppi, M. Paldanius, A. Hyvarinen et al. // *Respirology.* – 2004. – Vol. 9, N 2. – P. 255–259.
95. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma-associated Proteobacteria, but not commensal Prevotella spp., promote Toll-like receptor 2-independent lung inflammation and pathology / J. M. Larsen, H. S. Musavian, T. M. Butt // *Immunology.* – 2015. – Vol. 144, N 2. – P. 333–342.
96. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study / A. M. Menezes, R. Perez-Padilla, J. R. Jardim et al. // *Lancet.* – 2005. – Vol. 366, N 9500. – P. 1875–1881.
97. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD / M. K. Han, A. Agusti, P. M. Calverley et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – Vol. 182, N 5. – P. 598–604.
98. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections / A. D. Lopez, K. Shibuya, C. Rao et al. // *Eur. Respir. J.* – 2006. – Vol. 27, N 2. – P. 397–412.
99. Chronic Pseudomonas aeruginosa infection in chronic obstructive pulmonary disease / L. Martínez-Solano, M. D. Macia, A. Fajardo et al. // *Clin. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 47, N 12. – P. 1526–1533.
100. Clinical Practice Guidelines for Pulmonary Therapies Committee. Review Cystic fibrosis pulmonary guidelines: treatment of pulmonary exacerbations / P. A. Flume, P. J. Mogayzel, K. A. Robinson et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2009. – Vol. 180, N 9. – P. 802–808.
101. Cluster analysis in severe emphysema subjects using phenotype and genotype data: an exploratory investigation / M. H. Cho, G. R. Washko, T. J. Hoffmann et al. // *Respir. Res.* – 2010. – Vol. 16. – P. 11–30.

102. Collins, M. D. Comparative sequence analysis of the 16 S rRNA genes of *Lactobacillus miuitus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus*: proposal for the creation of a new genus *Atopobium* / M. D. Collins, S. Walbanks // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1992. – N 95. – P. 235–240.
103. Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies / D. C. Grootendorst, J. K. Sont, L. N. Willems et al. // *Clin. Exp. Allergy.* – 1997, N 27. – P. 769–779.
104. Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease / A. Bhowmik, T. A. Seemungal, R. J. Sapsford et al. // *Thorax.* – 1998. – Vol. 53, N 11. – P. 953–956.
105. Connon, S. A. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates / S. A. Connon, S. J. Giovannoni // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – Vol. 68, N 8. – P. 3878–3885.
106. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage / O. Beja, M. T. Suzuki, E. V. Koonin et al. // *Environ. Microbiol.* – 2000. – N 2. – P. 516–529.
107. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study / Y. Fukuchi, M. Nishimura, M. Ichinose et al. // *Respirology.* – 2004. – N 9. – P. 458–465.
108. Correlation between clinical parameters and health-related quality of life in women with COPD / N. M. Manguera, I. L. Viega, M. A. Manguera et al. // *J. Bras. Pneumol.* – 2009. – Vol. 35, N 3. – P. 248–255.
109. Courvalin, P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci / P. Courvalin // *CID.* – 2006. – Vol. 42, N 1. – P. 25–34.
110. Cox, G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes / G. Cox // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 154. – P. 4719–4725.
111. Cummings, J. Y. *Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids* / J. Y. Cummings, J. L. Rombeau, T. Sakata. – Cambridge : CUP, 2004. – 596 p.

112. Decreased levels of myeloperoxidase in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease after treatment with oral glucocorticoids / A. Barczyk, E. Sozańska, M. A. Trzaska et al. // *Chest.* – 2004. – Vol. 126, N 2. – P. 389–393.
113. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity / J. A. Aas, B. J. Paster, L. N. Stokes et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol 43, N 11. – P. 5721–5732.
114. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis / M. M. Tunney, T. R. Field, T. F. Moriarty et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 177, N 9. – P. 995–1001.
115. Determining the Long-term Effect of Antibiotic Administration on the Human Normal Intestinal Microbiota Using Culture and Pyrosequencing Methods / M. U. Rashid, E. Zaura, M. J. Buijs et al. // *Clin. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 60, Suppl 2. – S77–84.
116. Dickson, R. P. The role of the bacterial microbiome in lung disease / R. P. Dickson, J. R. Erb-Downward, G. B. Huffnagle // *Expert Rev. Respir. Med.* – 2013. – Vol. 7, N 3. – P. 245–257.
117. Didierlaurent, A. The impact of successive infections on the lung microenvironment / A. Didierlaurent, J. Goulding, T. Hussell // *Immunology.* – 2007. – N 122. – P. 457–465.
118. Differences in IL-8 and TN factor α in induced sputum from patients with COPD or asthma / V. M. Keating, P. D. Collins, D. M. Scott et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1996. – Vol. 153. – P. 530–534.
119. Differential activation of eosinophils by bacteria associated with asthma / K. Hosoki, A. Nakamura, K. Kainuma // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2013. – Vol. 161, N 2. – P. 16–22.
120. Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma / J. L. Simpson, R. J. Scott, M. J. Boyle et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2005. – Vol. 172, N 5. – P. 559–565.
121. Difficult asthma / Ed. by S. Holgate. – Dunitz: Martin LTD, 1999. – 567 p.

122. Disordered microbial communities in asthmatic airways / M. Hilty, C. Burke, H. Pedro et al. // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, N 1. – e8578.
123. Disordered Microbial Communities in the Upper Respiratory Tract of Cigarette Smokers / E. S. Charlson, J. Chen, R. Custers-Allen // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, N 12. – e15216.
124. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation / C. Miranda, A. Busacker, S. Balzar et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 113, N 1. – P. 101–108.
125. Donnelly, D. Outcomes in children treated for persistent bacterial bronchitis / D. Donnelly, A. Critchlow, M. L. Everard // *Thorax*. – 2007. – N. 62. – P. 80–84.
126. Dornhorst, A. C. Respiratory insufficiency / A. C. Dornhorst // *Lancet*. – 1955. – Vol. 268, N 6876. – P. 1185–1187.
127. Dyspnoea at rest and at the end of different exercises in patients with near-fatal asthma / E. Barreiro, J. Gea, C.J. Sanjuas et al. // *Eur. Respir. J.* – 2004. – Vol. 24. – P. 219–225.
128. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma / M. M. Kusel, N. H. De Klerk, T. Kebabze et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 119, N5. – P. 1105–1110.
129. Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD / T. M. Wilkinson, J. R. Hurst, W. R. Perera et al. // *Chest*. – 2006. – Vol. 129, N 2. – P. 317–324.
130. Enright, P. L. Reference equations for the six-minute walk in healthy adults / P. L. Enright, D. L. Sherill // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1998. – Vol. 158. – P. 1384–1387.
131. Enterotypes of the human gut microbiome / M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier et al. // *Nature*. – 2011. – Vol. 473, N 7346. – P. 174–180.
132. Eosinophilic inflammation in asthma / J. Bousquet, P. Chanez, J. Y. Lacoste et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1990. – Vol. 323. – P. 1033–1039.
133. European Lung White Book [Electronic resource] / European Respiratory Society. – 2003. – URL : <http://www.erswhitebook.org>.

134. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) Investigators / A. Agusti, P. M. A. Calverley, B. Celli et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 16, N 12. – P. 1128–1138.
135. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics / S. E. Wenzel, L. B. Schwartz, E. L. Langmack et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1999. – Vol. 160. – P. 1001–1008.
136. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma / A. T. Brinke, A. H. Zwinderman, P. J. Sterk et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2001. – Vol. 164. – P. 744–748.
137. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients / H. Sokol, B. Pigneur, L. Watterlot et al. // *PNAS.* – 2008. – Vol. 105, N 43. – P. 16731–16736.
138. Fiocchi, C. The multifactorial pathogenesis of inflammatory bowel disease / C. Fiocchi // *Diagnostic and therapeutic strategies.* – 2006. – P. 21–22.
139. Fletcher, C. M. Medical Research Council Dyspnea Scale (MRC) / C. M. Fletcher, P. C. Elmes, C. H. Wood // *BMJ.* – 1959. – Vol. 1. – P. 257–266.
140. Fodor, A. A. The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations / A. A. Fodor, E. R. Klem, D. F. Gilpin // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, N 9. – e45001.
141. Four bacterial studies on children with chronic otitis media with effusion / X. Deng, L. Hui, N. Yang // *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* – 2014. – Vol. 28, N 19. – P. 1457–1460.
142. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate / P. Guilloteau, L. Martin, V. Eeckhaut // *Nutr. Res. Rev.* – 2010. – Vol. 23, N 2. – P. 366–384.

143. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma / A. D. Kostic, D. Gevers, C. S. Pedomallu et al. // *Genome Res.* – 2012. – Vol. 22, N 2. – P. 292–298.
144. Gern, J. E. Infectious triggers of pediatric asthma / J. E. Gern, R. F. Lemanske // *Jr. Pediatr. Clin. North Am.* – 2003. – Vol. 50, N 3. – P. 555–575.
145. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis / R. J. Halbert, J. L. Natoli, A. Gano et al. // *Eur. Respir. J.* – 2006. – Vol. 28, N 3. – P. 523–532.
146. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Electronic resource] // Global Initiative for Asthma. – 2006. – Vol. 2006. – URL : http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_072007_1.pdf.
147. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Electronic resource] // Global Initiative for Asthma. – 2010. – Vol. 2010. – URL : http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2010_1.pdf.
148. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Electronic resource] // Global Initiative for Asthma. – 2012. – Vol. 2012. – URL : http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_March13_1.pdf.
149. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Electronic resource] // Global Initiative for Asthma. – 2014. – Vol. 2014. – URL : http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2014_Aug12_1.pdf.
150. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [Electronic resource] // Global Initiative for Asthma. – 2015. – Vol. 2015. – URL : http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2015.pdf.
151. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Electronic resource] // Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. – 2010. – Vol. 2010. – URL : http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLDReport_April12011.pdf.
152. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Electronic resource] // Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. – 2011. – Vol. 2011. – URL : http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf.

153. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Electronic resource] // Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. – 2015. – Vol. 2015. – URL : http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2015_Apr2.pdf.
154. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Russian [Electronic resource] // Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. – 2014. – Vol. 2014. – URL : http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_Russian_2014.pdf.
155. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Electronic resource] // WHO. – 2006. – Vol. 2006. – URL : http://www.who.int/respiratory/copd/GOLD_WR_06.pdf.
156. Goldbeck, L. Monitoring quality of life in outpatients with cystic fibrosis: feasibility and longitudinal results / L. Goldbeck, S. Zerrer, T. G. Schmitz // *J Cyst. Fibros.* – 2007. – Vol. 6, N 3. – P. 171–178.
157. Gollwitzer, E. S. Microbiota abnormalities in inflammatory airway diseases – Potential for therapy / E. S. Gollwitzer, B. J. Marsland // *Pharmacol. Ther.* – 2014. – Vol. 141, N 1. – P. 32–39.
158. Górska, K. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease / K. Górska, M. Maskey-Warzechowska, R. Krenke // *Curr. Opin. Pulm. Med.* – 2010. – Vol. 16, N 2. – P. 89–96.
159. Granulicatella infection: diagnosis and management / J. S. Cargill, K. S. Scott, D. Gascoyne-Binzi et al. // *J. Med. Microbiol.* – 2012. – Vol. 61. – P. 755–761.
160. Green, R. H. Stability of inflammatory phenotypes in asthma / R. H. Green, I. Pavord // *Thorax.* – 2012. – Vol. 67, N 8. – P. 665–667.
161. Gut microbiota community and its assembly associated with age and diet in Chinese centenarians [Electronic resource] / F. Wang, T. Yu, G. Huang et al. // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – URL : <http://www.jmb.or.kr/journal/024/&num=6774>.

162. H. influenzae potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression / U. S. Sajjan, Y. Jia, D. C. Newcomb et al. // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, N 12. – P. 2121–2123.
163. Hahn, D. L. Association of Chlamydia pneumoniae (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma / D. L. Hahn, R. W. Dodge, R. Golubjatnikov // *JAMA.* – 1991. – Vol. 266, N 2. – P. 225–230.
164. Henson, P. M. Fingering IL-12 with apoptotic cells / P. M. Henson // *Immunity.* – 2004. – Vol. 21, N 5. – P. 604–606.
165. Hetzel, M. R. Brittle asthma: fiend or phantom? / M. R. Hetzel // *Thorax.* – 1998. – Vol. 53, N 4. – P. 235–236.
166. Holgate, S. T. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults / S. T. Holgate, R. Polosa // *Lancet.* – 2006. – Vol. 368. – P. 780–793.
167. Hooper, L. V. Commensal host-bacterial relationships in the gut / L. V. Hooper, J. I. Gordon // *Science.* – 2001. – Vol. 292. – P. 1115–1118.
168. Host-microbe interactions in distal airways: relevance to chronic airway diseases / C. Martin, P. R. Burgel, P. Lepage et al. // *Eur. Respir. Rev.* – 2015. – Vol. 24, N 135. – P. 78–91.
169. Hove, H. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract / H. Hove, H. Norgaard, P. B. Mortensen // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 1999. – Vol. 53, N 5. – P. 339–350.
170. Huang, Y. J. The emerging relationship between the airway microbiota and chronic respiratory disease: clinical implications / Y. J. Huang, S. V. Lynch // *Expert Rev. Respir. Med.* – 2011. – Vol. 5, N 6. – P. 809–821.
171. Human gut microbiome viewed across age and geography / T. Yatsunenko, F. E. Rey, M. J. Manary et al. // *Nature.* – 2012. – Vol. 486. – P. 222–227.
172. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia / A. V. Tyakht, E. S. Kostyukova, A. S. Popenko et al. // *Nat. Commun.* – 2013. – N 4. – P. 2469.

173. Hussell, T. Bacterial complications during pandemic influenza infection / T. Hussell, E. Wissinger, J. Goulding // *Future Microbiol.* – 2009. – Vol. 4, N 3. – P. 269–272.
174. Hviid, A. Antibiotic use and Inflammatory bowel disease in childhood / A. Hviid, H. Svanstrom, M. Frisch // *Gut.* – 2011. – Vol. 60, N 1. – 49–54.
175. Immune mechanisms and the impact of the disrupted lung microbiome in chronic bacterial lung infection and bronchiectasis / R. J. Boyton, C. J. Reynolds, K. J. Quigley et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2013. – Vol. 171, N 2. – P. 117–123.
176. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa / C. D. Filippo, D. Cavalieri, M. D. Paola et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107, N 33. – P. 14691–14696.
177. Increase in airway neutrophils after oral but not inhaled corticosteroid therapy in mild asthma / L. T. Nguyen, S. Lim, T. Oates et al. // *Respir. Med.* – 2005. – Vol. 99, N 2. – P. 200–207.
178. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema / M. Tanino, T. Betsuyaku, K. Takeyabu et al. // *Thorax.* – 2002. – Vol. 57, N 5. – P. 405–411.
179. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations / A. Papi, C. M. Bellettato, F. Braccioni et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 173, N 10. – P. 1114–1121.
180. Inflammatory profile of new bacterial strain exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / S. Sethi, C. Wrona, K. Eschberger et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 177, N 5. – P. 491–497.
181. Johnston, S. L. Viruses and asthma / S. L. Johnston // *Allergy.* – 1998. – Vol. 53, N 10. – P. 922–932.
182. Keatings, V. M. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between COPD, asthma, and normal subjects / V. M. Keatings, P. J. Barnes // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1997. – Vol. 155, N 2. – P. 449–453.

183. Kharitonov, S. A. Exhaled markers of pulmonary disease / S. A. Kharitonov, P. J. Barnes // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2001. – Vol. 163, N 7. – P. 1693–1772.
184. Kraft, M. The role of bacterial infections in asthma / M. Kraft // *Clin. Chest. Med.* – 2000. – Vol. 21. – P. 301–313.
185. Kuehni, C. E. Phenotype specific treatment of obstructive airways disease in infancy and childhood: new recommendation of the Swiss Paediatric Pulmonology Group / C. E. Kuehni // *Swiss Med. Wkly.* – 2005. – Vol. 135. – P. 95–100.
186. Lacoste, J. Y. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease / J. Y. Lacoste, J. Bousquet, P. J. Chanez // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1993. – Vol. 92, N 4. – P. 537–548.
187. Langen, R. C. ROS in the local and systemic pathogenesis of COPD / R. C. Langen, S. H. Korn, E. F. Wouters // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 35, N 3. – P. 226–235.
188. Leuppi, J. D. Management of an acute exacerbation of asthma and COPD / J. D. Leuppi, S. R. Ott // *Ther. Umsch.* – 2014. – Vol. 71, N 5. – P. 289–293.
189. Lewis, J. D. Nutrition, gut microbiota and immunity: therapeutic targets for IBD / Lewis J. D., Ruemmele F. M., Wu G. D. // *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* – 2014. – Vol. 79. – P. 161–162.
190. Lipuma, J. J. Review the changing microbial epidemiology in cystic fibrosis / J. J. Lipuma // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2010. – Vol. 23, N 2. – P. 299–323.
191. Liu, B. Antibiotic Resistance Genes Database / B. Liu, M. Pop // *Nucleic. Acids Res.* – 2009. – Vol. 37 (Database Issue). – D443–7.
192. Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant / E. S. Charlson, K. Bittinger, J. M. Diamond // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2012. – Vol. 186, N 6. – P. 536–545.
193. Macfarlane, S. Regulation of short-chain acid production / S. Macfarlane, G. T. Macfarlane // *Proc. Nutr. Soc.* – 2003. – Vol. 62, N 1. – P. 67–72.

194. Maloy, K. J. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease / K. J. Maloy, F. Powrie // *Nature*. – 2011. – Vol. 474, N 7351. – P. 298–330.
195. Marschner, I. Package 'glm2': Fitting Generalized Linear Models With Convergence Problems / I. Marschner. – Wien : Technische Universität, 2011.
196. Marschner, I. Package 'glm2': Fitting Generalized Linear Models. R package. Version 1.1.2 / I. Marschner. – Sydney : MLP, 2014.
197. Marsland, B. J. Influences of the microbiome on the early origins of allergic asthma / B. J. Marsland // *Ann. Am. Thorac. Soc.* – 2013. – Vol. 10, Suppl. – S165–9.
198. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis / D. A. Hill, C. Hoffmann, M. C. Abt et al. // *Mucosal. Immunol.* – 2010. – Vol. 3. – P. 148–158.
199. Microbial Communities in the Upper Respiratory Tract of Patients with Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease / H. Park, J. W. Shin, S-G. Park et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, N 10. – e109710.
200. Molecular Epidemiology of Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Europe / R. R. Reinert, A. Ringelstein, M. van der Linden et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43, N 3. – P. 1294–1300.
201. Molecular Epidemiology of Multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with Both erm(B)- and mef(A)-Mediated Macrolide Resistance / D. J. Farrell, I. Morrissey, S. Bakker et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42, N 2. – P. 764–768.
202. *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response / T. F. Murphy, A. L Brauer, B. J. Grant et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2005. – Vol. 172, N 2. – P. 195–199.
203. Morbidity and Mortality Chart Book on cardiovascular, lung and blood diseases [Electronic resource] // US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. – 2009. – URL : <http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/cht-book.htm>.

204. Morens, D. M. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness / D. M. Morens, J. K. Taubenberger, A. S. Fauci // *J. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 198, N 7. – P. 962–970.
205. Morris, A. Review Pneumocystis: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? / A. Morris, F. C. Sciurba, K. A. Norris // *COPD.* – 2008. – Vol. 5, N 1. – P. 43–51.
206. Murphy T. F. The role of bacteria in exacerbations of COPD: a constructive view / T. F. Murphy, S. Sethi, M. S. Niederman // *Chest.* – 2000, Vol. 118. – P. 204–209.
207. Nava, G. M. Diversity of the autochthonous colonic microbiota / G. M. Nava, T. S. Stappenbek // *Gut Microbes.* – 2011. – Vol. 2, N 2. – P. 99–104.
208. Neisseria-cinerea-induced pulmonary cavitation in a renal transplant patient / N. Kamar, V. Chabbert, D. Ribes // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2007. – Vol. 22, N 7. – P. 2099–2100.
209. Nelder, J. Generalized linear models / J. Nelder, R. Wedderburn // *J. R. Stat. Soc. Series A.* – 1972. – Vol. 135, N 3. – P. 370–384.
210. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma / P. A. Wark, S. L. Johnston, I. Moric et al. // *Eur. Respir. J.* – 2002. – Vol. 19, N 1. – P. 68–75.
211. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / S. Sehti, N. Evans, B. J. Grant et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 347, N 7. – P. 465–471.
212. Nguyen, L. D. The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome / L. D. Nguyen, E. Viscogliosi, L. Delhaes // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6, N 89.
213. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke / S. R. Rutgers, D. S. Postma, N. H. ten Hacken et al. // *Thorax.* – 2000. – Vol. 55, N 1. – P. 12–18.

214. Pathogenic bacteria colonizing the airways in asymptomatic neonates stimulates topical inflammatory mediator release / N. V. Følsgaard, S. Schjørring, B. L. Chawes et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2013. – Vol. 15. – P. 589–595.
215. Paulson, J. N. *MetagenomeSeq: Statistical analysis for sparse high-throughput sequencing* / J. N. Paulson. – Collage Park : UMD, 2014. – 25 p.
216. Persi, A. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease / A. Persi // *Eur. Respir. J.* – 1998. – Vol. 12, N 2. – P. 380–386.
217. Persistent airflow limitation in adult-onset nonatopic asthma is associated with serologic evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection / A. T. Brinke, J. T. van Dissel, P. J. Sterk et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2001. – Vol. 107, N 3. – P. 449–454.
218. Persistent sputum eosinophilia in patients with severe asthma: a 5-year follow-up study / H.P. van Veen, A. T. Brinke, S.A. Gauw et al. // *Am. Thorac. Soc. Ann. M.* – 2005. – A241.
219. Phenotypic Heterogeneity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease / J. Garcia-Aymerich, A. Agustí, J. A. Barbera et al. // *Arch. Bronconeumol.* – 2009. – N 45. – P. 133–142.
220. Phenotypic heterogeneity of chronic obstructive pulmonary disease / J. Garcia-Aymerich, A. Agustí, J. A. Barberà et al. // *Arch. Bronconeumol.* – 2009. – Vol. 45, N 3. – P. 129–138.
221. Prebiotic effects: metabolic and health benefits / M. Roberfroid, G. R. Gibson, L. Hoyles et al. // *Br. J. Nutr.* – 2010. – Vol. 104, Suppl. 2. – S1–63.
222. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease / T. F. Murphy, A. L. Brauer, K. Eschberger et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 177, N 8. – P. 853–860.
223. *Pseudomonas aeruginosa* population biology in chronic obstructive pulmonary disease / E. Rakhimova, L. Wiehlmann, A. L. Brauer et al. // *J. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 200, N 12. – P. 1928–1935.

224. Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis with negative bacterial cultures / E. T. Zemanick, B. D. Wagner, J. K. Harris et al. // *Pediatr. Pulmonol.* – 2010. – Vol. 45, N 6. – P. 569–577.
225. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data / J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh et al. // *Nat. Methods.* – 2010. – Vol. 7, N 5. – P. 335–336.
226. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD / R. A. O'Donnell, C. Peebles, J. A. Ward et al. // *Thorax.* – 2004. – Vol. 59, N 10. – P. 837–842.
227. Relevance of lower airway bacterial colonization, airway inflammation, and pulmonary function in the stable stage of chronic obstructive pulmonary disease / M. Zhang, Q. Li, X. Y. Zhang et al. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 29, N 12. – P. 1487–1493.
228. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005 / S. Razvi, L. Quittell, A. Sewall et al. // *Chest.* – 2009. – Vol. 136, N 6. – P. 1554–1560.
229. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner / V. Avadhanula, C. A. Rodriguez, J. P. Devincenzo et al. // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80, N 4. – P. 1629–1636.
230. Respiratory viruses in children with cystic fibrosis: viral detection and clinical findings / J. L. Burns, J. Emerson, J. Kuypers // *Influenza Other Respi Viruses.* – 2012. – Vol. 6, N 3. – P. 218–223.
231. Review article: the role of butyrate on colonic function / H. M. Hamer, D. Jonkers, K. Venema et al. // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2008. – N 27. – P. 104–119.
232. Risk factors for lower airway colonization in chronic bronchitis / E. Monso, A. Rosell, G. Bonet et al. // *Eur. Respir. J.* – 1999. – Vol. 13, N 2. – P. 338–342.

233. Ruminococcin A, a new lantibiotic produced by a Ruminococcus gnavus strain isolated from human feces / J. Dabard, C. Bridonneau, C. Phillippe et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – N 67. – P. 4111–4118.
234. Savage, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract / D. C. Savage // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1977. – Vol. 31. – P. 107–133.
235. Sethi, S. Review Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease / S. Sethi, T. F. Murphy // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – Vol. 359, N 22. – P. 2355–2365.
236. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers / A. D. Stefano, A. Capelli, M. Lusuardi et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1998. – Vol. 158, N 4. – P. 1277–1285.
237. Shenderov, B. A. Food Engineering – Probiotics and Functional Foods [Electronic resource] // *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. – 2011. – URL : <http://www.eolss.net/sample-chapters/c03/e5-10-14.pdf>.
238. Shenderov, B. A. Probiotic (symbiotic) bacterial languages / B. A. Shenderov // *Anaerobe*. – 2011. – N 17. – P. 490–557.
239. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood / J. H. Cummings, E. W. Pomare, W. J. Branch et al. // *Gut*. – 1987. – Vol. 28, N 10. – P.1221–1227.
240. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease / A. G. Agusti, J. Sauleda, C. Miralles et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2002. – Vol. 166, N 4. – P. 485–489.
241. Spatial distribution of microbial communities in the cystic fibrosis lung / D. Willner, M. R. Haynes, M. Furlan et al. // *ISME J.* – 2012. – Vol. 6, N 2. – P. 471–474.
242. Specjalski, K. Role of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae infections in the course of asthma / K. Specjalski // *Pneumonol. Alergol. Pol.* – 2010. – Vol. 78, N 4. – P. 284–295.

243. Staley, J. T. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats / J. T. Staley, A. Konopka // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1985. – Vol. 39. – P. 321–346.
244. Standardisation of spirometry / M. R. Miller, J. Hankinson, V. Brusasco et al. // *Eur. Respir. J.* – 2005. – Vol. 26. – P. 319–338.
245. Stoller, J. K. Alpha1-antitrypsin deficiency / J. K. Stoller, L. S. Aboussouan // *Lancet.* – 2005. – Vol. 365, N 9478. – P. 2225–2236.
246. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome / Human Microbiome Project Consortium // *Nature.* – 2012. – Vol. 486. – P. 207–214.
247. Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair / S. E. Wenzel, S. Balzar, M. Cundall et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 111, N 6. – P. 1345–1352.
248. Surveillance Summaries / Centers for Disease Control and Prevention // *MMWR.* – 2002. – Vol. 51, N SS-6. – P. 1–18.
249. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease / J. R. Hurst, J. Vestbo, A. Anzueto et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 363, N 12. – P. 1128–1138.
250. Sutherland, E. R. Asthma and atypical bacterial infection / E. R. Sutherland, R. J. Martin // *Chest.* – 2007. – Vol. 132. – P. 1962–1966.
251. Sze, M. A. Bacterial microbiome of lungs in COPD / M. A. Sze, J. C. Hogg, D. D. Sin // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2014. – N 9. – P. 229–238.
252. The active human gut microbiota differs from the total microbiota / F. Peris-Bondia, A. Latorre, A. Artacho et al. // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, N 7. – e22448.
253. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease / R. A. Peleman, P. H. Ryttila, J. C. Kips et al. // *Eur. Respir. J.* – 1999. – Vol. 13, N 4. – P. 839–843.

254. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database / A. G. McArthur, N. Wagglechner, F. Nizam et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57, N 7. – P. 3348–3357.
255. The ENFUMOSA cross-sectional European multicenter study of the clinical phenotype of severe asthma / S. T. Holgate, D. S. Postma, M. Romagnoli et al. // *Eur. Respir. J.* – 2003. – Vol. 22, N 3. – P. 470–477.
256. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report / M. Masoli, D. Fabian, S. Holt // *Allergy.* – 2004. – Vol. 59, N 5. – P. 469–478.
257. The Influence of Radiographic Phenotype and Smoking Status on Peripheral Blood Biomarker Patterns in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / J. M. Bon, J. K. Leader, J. L. Weissfeld et al. // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4, N 8. – e6865.
258. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease / M. A. Sze, P. A. Dimitriu, S. Hayashi et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2012. – Vol. 185, N 10. – P. 1073–1080.
259. The microbe – derived short chain fatty acid butyrate targets miRNA-dependent p21 gene expression in human colon cancer / S. Hu, T. S. Dong, S.R. Dalai et al. // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6, N 1. – e16221.
260. The NIH Human Microbiome Project / NIH HMP Working Group // *Genome Res.* – 2009. – Vol. 19, N 12. – P. 2317–2323.
261. The relationship of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella melaninogenica* in the supragingival plaque of children, caries and oral malodor / S. Tanaka, M. Yoshida, Y. Murakami et al. // *J. Clin. Pediatr. Dent.* – 2008. – Vol. 32, N 3. – P. 195–200.
262. The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men / D. Sparrow, R. J. Glynn, M. Cohen et al. // *Chest.* – 1984. – Vol. 86. – P. 383–386.
263. The role of the lung microbiome in health and disease. A national heart, lung, and blood institute workshop report / Y. J. Huang, E. S. Charlson, R. G. Collman // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2013. – Vol. 187, N 12. – P. 1382–1387.

264. The *Streptococcus milleri* population of a cystic fibrosis clinic reveals patient specificity and intraspecies diversity / C. D. Sibley, K. A. Sibley, T. A. Leong et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48, N 7. – P. 2592–2594.
265. Thompson, A. B. Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters / A. B. Thompson, D. Daughton, R. A. Robbins // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1989. – Vol. 140, N 6. – P. 1527–1537.
266. Time to death, airway wall inflammation and remodelling in fatal asthma / A.L. James, J.G. Elliot, M.J. Abramson et al. // *Eur. Respir. J.* – 2005. – Vol. 26, N 3. – P. 429–434.
267. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract / E. S. Charlson, K. Bittinger, A. R. Haas // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 184, N 8. – P. 957–963.
268. Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease / E. Holmes, J. V. Li, T. Athanasiou et al. // *Trends Microbiol.* – 2011. – N 19. – P. 349–359.
269. Use of culture and molecular analysis to determine the effect of antibiotic treatment on microbial community diversity and abundance during exacerbation in patients with cystic fibrosis / M. M. Tunney, E. R. Klem, A. A. Fodor et al. // *Thorax.* – 2011. – Vol. 66, N 7. – P. 579–584.
270. Viral and bacterial infection in acute asthma & chronic obstructive pulmonary disease increases the risk of readmission / P. Wark, M. Tooze, H. Powell et al. // *Respirology.* – 2013. – Vol. 18, N 6. – P. 996–1002.
271. Watanabe, Y. Characterization of *Phascolarctobacterium succinatutens* sp. nov., an Asaccharolytic, Succinate-Utilizing Bacterium Isolated from Human Feces / Y. Watanabe, F. Nagai, M. Morotomi // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – Vol. 78, N 2. – P. 511–518. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
272. Weel, C. Comorbidity and guidelines: conflicting interests / C. Weel, F. G. Schellevis // *Lancet.* – 2006. – Vol. 367, N 9510. – P. 550–551.

273. Wenzel, S. E. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes / S. E. Wenzel // *Lancet*. – 2006. – Vol. 368. – P. 804–813.
274. Wenzel, S. E. The phenotypes of severe asthma. Evidence for heterogeneity of the disease // *Lancet*. – 2000. – Vol. 34. – P. 518–524.
275. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children / D. J. Jackson, R. E. Gangnon, M. D. Evans et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2008. – Vol. 178, N 7. – P. 667–672.
276. World Health Statistics 2010 [Electronic resource] // World Health Organisation. – 2010. – URL : http://www.who.int/whosis/whostat/RU_WHS10_Full.pdf.
277. Zhao, Y. RAPSearch2: a fast and memory-efficient protein similarity search tool for next-generation sequencing data / Y. Zhao, H. Tang, Y. Ye // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28, N 1. – P. 125–126.
278. Zoentendal, E. G. A microbial world within us / E. G. Zoentendal, E. E. Vaughan, W. M. Vos // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59, N 6. – P. 1639–1650.