

ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Федосенко С.В.¹, Огородова Л.М.¹, Попенко А.С.², Тяхт А.В.², Деев И.А.¹, Куликов Е.С.¹, Кириллова Н.А.¹, Говорун В.М.², Кострюкова Е.С.²

¹ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России», 634050, Томск, Московский тр., д.2; ²ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» ФМБА России, 107023, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, e-mail: s-fedosenko@mail.ru

В работе представлена характеристика микробиоты дыхательных путей в зависимости от тяжести заболевания и других клинико-анамнестических особенностей. Цель исследования: сравнительное исследование таксономического состава орофарингеальной микробиоты у больных ХОБЛ различной степени тяжести. С помощью секвенирования консервативных участков бактериальной 16S рРНК исследованы орофарингеальные мазки 57 пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести и 31 пациента с тяжелой и очень тяжелой ХОБЛ, со стажем болезни 12 месяцев и более, отсутствием обострений и системной терапии антибиотиками на протяжении предшествующих 4 недель и более. Орофарингеальная микробиота больных ХОБЛ независимо от степени тяжести характеризовалась сходным таксономическим составом. Среди наиболее представленных бактериальных родов в структуре исследованных метабеномов определены *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* и *Fusobacterium*. Микробиота больных ХОБЛ 2-й степени тяжести в сравнении с образцами ХОБЛ 3–4-й степени отличалась меньшим содержанием *Prevotella melaninogenica*, более высокой представленностью типа *Proteobacteria*, а также *Brevibacterium aureum*, представителей родов *Scardovia*, *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*, *Coprococcus*, *Gemellaceae*, *Haemophilus*, *Moryella*, *Dialister*, *Paludibacter* и *Leptotrichiaceae*. Выявлена отрицательная связь содержания *Proteobacteria* с частотой обострений, госпитализаций и выраженностью одышки. Представленность *Prevotella* отрицательно коррелировала с выраженностью кашля и продукцией мокроты.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, ХОБЛ, различия в составе орофарингеальной микробиоты, *Proteobacteria*, 16S рРНК секвенирование

CHARACTERISTIC OF OROPHARYNGEAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Fedosenko S.V.¹, Ogorodova L.M.¹, Popenko A.S.², Tyacht A.V.², Deev I.A.¹, Kulikov E.S.¹, Kirillova N.A.¹, Govorun V.M.², Kostrykova E.S.²

¹ Siberian State Medical University, 634050, Tomsk, 2 Moskovsky avenue; ² Scientific research institute of physical and chemical medicine, 107023, Moscow, 1e Malaya Pirogovskaya str. e-mail: s-fedosenko@mail.ru

This work is an actual description of the respiratory microbiota, depending on the severity of the disease and other clinical and anamnestic features. Objective: a comparative study of the oropharyngeal microbiota taxonomic composition in patients with COPD of varying severity. Using sequencing of conserved regions of bacterial 16S rRNA were investigated oropharyngeal swabs of 57 patients with COPD of moderate severity and 31 patients with severe and very severe COPD, with the experience of the disease 12 months or more, the absence of exacerbations and systemic antibiotic therapy within the previous 4 weeks or more. Oropharyngeal microbiota in patients with COPD, regardless of the severity characterized by similar taxonomic (qualitative) structure. Among the most represented in the structure of bacterial genera were identified *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* and *Fusobacterium*. Microbiota in patients with COPD severity 2 in comparison with samples of COPD 3-4 degrees are less content *Prevotella melaninogenica*, higher representation of the type of *Proteobacteria*, and *Brevibacterium aureum*, the genera *Scardovia*, *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*, *Coprococcus*, *Gemellaceae*, *Haemophilus*, *Moryella*, *Dialister*, *Paludibacter* and *Leptotrichiaceae*. There was a negative relationship between the *Proteobacteria* content and exacerbation frequency, quantity of hospitalizations and dyspnea. Representation of *Prevotella* negatively correlated with the severity of cough and sputum production.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, COPD, oropharyngeal microbiota differences, *Proteobacteria*, 16S rRNA sequencing.

Организм человека представляет сложную систему, симбиотически взаимодействующую с населяющими его микроорганизмами, в совокупности именуемыми

микробиотой. Микробиота — комплекс взаимосвязанных сообществ микроорганизмов, населяющих различные биотопы тела человека, одним из которых является респираторный тракт [1].

В настоящий момент установлено, что бронхиальное дерево на всем его протяжении вплоть до терминальных бронхиол и альвеолярных ходов, так же как и верхние дыхательные пути, в норме колонизировано разнообразными микроорганизмами. Изменения их качественного и количественного состава возникают при различных болезнях органов дыхания, включая хронические обструктивные заболевания легких [3, 9]. В настоящее время роль микробиотических сообществ дыхательных путей в развитии и прогрессировании бронхообструктивных заболеваний остается неопределенной. Проводимые микробиологические исследования демонстрируют различия состава микробиоты дыхательных путей у больных БА и ХОБЛ и у относительно здоровых добровольцев. Так, например, выявлено увеличение количества микроорганизмов типа *Proteobacteria* в респираторном тракте у больных БА и ХОБЛ. Потенциально значимыми патогенами в развитии и прогрессировании ХОБЛ, по мнению M. Hilty и соавт. (2010), являются *Haemophilus*, *Moraxella* и *Neisseria spp.* [4].

Известно, что дыхательные пути у больных ХОБЛ (особенно тяжелого и очень тяжелого течения) часто колонизированы бактериями. При этом наиболее высока вероятность обсемененности респираторного тракта при ХОБЛ такими микроорганизмами, как *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, на поздних стадиях заболевания присоединяются *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* [1].

Несмотря на существенные успехи в изучении патогенетических механизмов развития ХОБЛ, остается по-прежнему неоднозначной роль как отдельно взятых микроорганизмов, так и респираторной микробиоты в целом, в формировании заболевания и реализации тех или иных особенностей течения у конкретного пациента (фенотипические особенности, тяжесть заболевания, частота обострений, ответ на проводимую терапию и т.д.) [7].

Цель исследования: сравнительное исследование таксономического состава орофарингеальной микробиоты у больных ХОБЛ средней степени тяжести и пациентов с ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения.

Материалы и методы. В соответствии с поставленной целью в исследование включено 88 больных ХОБЛ — 57 пациентов с ХОБЛ средней степени тяжести (2-й степени тяжести по спирометрической классификации GOLD, 2014) и 31 пациент с тяжелой и очень тяжелой ХОБЛ (3–4-й степени тяжести по спирометрической классификации GOLD, 2014). Все участники характеризовались отсутствием обострений и приема системных антибактериальных препаратов (АБП) на протяжении предшествующих 4 недель и более.

Клинические методы исследования включали анализ выраженности одышки, продукции и цвета мокроты, выраженности кашля, наличие приступов удушья. Также оценивали симптомы сопутствующих заболеваний, выясняли среднесуточную потребность в короткодействующих бета-2-агонистах (КДБА) за последние 7 дней, определяли индекс курения, стаж заболевания, частоту обострений ХОБЛ и ассоциированных с ними курсов терапии системными кортикостероидами (СКС) и АБП.

Для получения микробиоты верхних дыхательных путей использован метод орофарингеальных мазков по стандартной методике с применением стерильного ватного тампона, помещенного в пробирку. После процедуры экстракции ДНК для исследования таксономического состава микробиоты выполнено секвенирование по переменным регионам V3-V4 последовательности генов 16S рРНК на приборе Illumina MiSeq [2]. Для статистического анализа представленности бактериальных таксонов в образцах использован метод обобщенных линейных моделей, реализованный в пакете glm2 программного языка R версии 3.1.0 с предположением распределения данных по Пуассону. Производился поиск зависимости представленности таксона от того или иного фактора. Для полученных значений p-value была использована поправка FDR. Коэффициент зависимости, определяющий направление и степень зависимости, является значением из выдачи команды glm в поле «Estimate» [5].

Результаты и обсуждение. В результате исследования таксономического состава микробиоты орофарингеальной области у больных ХОБЛ выявлено, что в числе наиболее представленных (более 10% в структуре метабенома) выделены бактериальные роды *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veillonella*, что коррелирует с результатами зарубежных исследований по данной тематике [10].

Далее определены наиболее представленные роды микроорганизмов, составляющие в сумме 95% от всего микробиотического состава по всем образцам. Среди наиболее представленных бактериальных родов со значением 10% и более в структуре идентифицированных метабеномов определены *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veillonella*. Микроорганизмы, составляющие от 2 до 10% микробиоты, — роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Porphyromonas*.

Последние исследования клинически стабильных пациентов с ХОБЛ показали большое разнообразие микробиоты дыхательных путей. Huang Y.J. et al (2010) отмечает закономерность, что индивидуумам с высоким видовым разнообразием микробиоты дыхательных путей свойственна выраженная представленность *Firmicutes*, в то время как у лиц с низким таксономическим разнообразием микробиоты наблюдается рост протеобактерий [8].

Результаты выполненного нами исследования продемонстрировали снижение содержания протеобактерий (тип *Proteobacteria*) в орофарингеальной микробиоте, полученной в стабильный период заболевания больных ХОБЛ 3–4-й степени тяжести в сравнении с группой образцов пациентов с ХОБЛ 2-й степени тяжести ($9,17 \pm 7,53\%$ и $11,67 \pm 7,48\%$ соответственно; $p=0,0037$). Полученные данные подкрепляются результатами корреляционного анализа, выявившего снижение *Proteobacteria* у больных ХОБЛ по мере увеличения частоты обострений (коэффициент зависимости (КЗ) = $-0,07$; $p=0,002$). Таким образом, пациентам, страдающим тяжелой / очень тяжелой ХОБЛ и характеризующимся высоким риском обострений, в стабильный период свойственна наиболее низкая представленность протеобактерий. Полученные сведения не противоречат результатам международных исследований и, вероятно, подчеркивают высокую частоту использования АБП, направленных на эрадикацию патогенных видов *Proteobacteria* у данной группы больных, что приводит к снижению содержания данного типа бактерий и способствует повышению разнообразия респираторной микробиоты за счет других таксонов.

Отмечено, что в группе образцов больных среднетяжелой ХОБЛ по сравнению с мазками больных ХОБЛ 3–4-й степени тяжести наблюдалось более высокое содержание бактерий рода *Haemophilus* (табл. 1).

Таблица 1

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

ОТЕ – операционная таксономическая единица	Коэффициент наклона прямой (КНП)*	Pvalue**	% от состава метагенома (M±m) в образцах больных ХОБЛ 2-й степени	% от состава метагенома (M±m) в образцах больных ХОБЛ 3–4-й 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

* 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.

При этом у больных ХОБЛ повышение выраженности одышки (по данным вопросника mMRC) и частоты госпитализаций обратно коррелировало с долей указанных микроорганизмов в структуре микробиома ($K3 = -0,15$; $p = 0,01$ и $K3 = -0,43$; $p = 0,01$ соответственно), а более выраженной одышке (по mMRC) соответствовала меньшая представленность *Proteobacteria* в целом ($K3 = -0,09$; $p = 0,001$). Госпитализации по поводу обострения ХОБЛ, как известно, в большинстве случаев сопряжены с назначением системных АБП, в связи с чем полученные данные могут рассматриваться в качестве подтверждения модифицирующего влияния антибактериальной терапии на качественный и количественный состав бактериального сообщества *Proteobacteria* и совокупной бронхолегочной микробиоты у пациентов с ХОБЛ.

Говоря о типе *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 показало, что больные ХОБЛ с более выраженной продукцией мокроты имели большую долю представителей рода *Neisseria* в орофарингеальной микробиоте ($K3 = 0,17$; $p = 0,006$).

По результатам анализа с использованием пакета приложений metagenomeSeq выявлено, что орофарингеальной микробиоте больных ХОБЛ 2-й степени тяжести в сравнении с образцами ХОБЛ 3–4-й степени тяжести на фоне снижения представленности *Prevotella melaninogenica* свойственно более высокое содержание *Brevibacterium aureum* и представителей родов *Scardovia*, *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*, *Coprococcus*, *Gemellaceae*, *Moryella*, *Dialister*, *Paludibacter* и *Leptotrichiaceae* (табл. 1).

В литературе последних лет обсуждается колонизация бронхиального дерева отдельными грамотрицательными бактериями рода *Prevotella* spp., составляющими комменсальную микробиоту человека. Иммунологическая роль этих бактерий в дыхательных путях остается до конца неизвестной. В исследовании Larsen J.M. et al (2015) продемонстрирована способность синантропных штаммов *Prevotella* (*Prevotella*

melaninogenica, *Prevotella nanceiensis* и *Prevotella salivae*) инициировать умеренную бронхиальную нейтрофилию, ассоциированную с TLR2-зависимым воспалением [6]. Выявленное нами повышение содержания *Prevotella melaninogenica* в респираторном тракте у больных тяжелой и очень тяжелой 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.

Отметим тот факт, что по данным нашей работы представленность *Prevotella* взаимосвязана с частотой курсовой терапии ИГКС у больных. Так, доля бактерий *Prevotella* в орофарингеальных мазках пациентов с наличием эпизодов терапии СКС по поводу обострений ХОБЛ на протяжении предшествующего года была статистически значимо выше, чем у больных, не получавших СКС. Пациентам с выраженным кашлем и продукцией мокроты свойственна меньшая обсемененность образцов бактериями рода *Prevotella* по сравнению с образцами пациентов с менее выраженным кашлем и меньшим количеством отделяемой мокроты ($K3 = -0,1$; $p = 0,003$ и $K3 = -0,12$; $p = 0,001$ соответственно). Возможно, выявленные особенности подчеркивают как комменсальность *Prevotella* во взаимоотношениях с организмом человека, так и модифицирующее влияние глюкокортикостероидов, назначенных при обострении ХОБЛ, на состав микробиоты респираторного тракта.

Влияние частоты эпизодов приема СКС, назначенных по поводу обострения ХОБЛ, нашло отражение в снижении содержания в орофарингеальных мазках таких родов протеобактерий, включающих патогенные микроорганизмы, как *Streptococcus* ($K3 = -0,09$; $p = 0,005$) и *Haemophilus* ($K3 = -0,33$; $p = 0,006$).

Важным, на наш взгляд, является достоверный тренд к увеличению доли микроорганизмов типа *Bacteroidetes* ($K3 = 0,09$; $p = 0,01$) и представляющих его бактерий класса *Porphyromonas* ($K3 = -0,35$; $p = 0,01$) – типичных обитателей ротовой полости человека — в орофарингеальных мазках у больных ХОБЛ, использовавших СКС при обострениях, в отличие от образцов пациентов, не применявших СКС на протяжении предшествующего года. Следует отметить, что снижение представленности *Bacteroidetes* в дыхательных путях у больных бронхообструктивными заболеваниями в сравнении со здоровыми добровольцами, по мнению Hilty M. Et al (2010), может быть проявлением модификации нормального микробиома на фоне болезни [4]. По мере увеличения количества эпизодов приема СКС (свидетельствовавших о большей частоте обострений) наблюдалось падение содержания *Bacteroidetes* в мазках, однако их содержание по-прежнему было статистически более высоким, чем в образцах пациентов, не применявших СКС.

Больные ХОБЛ с частыми госпитализациями имели более высокую обсемененность орофарингеальных мазков бактериями рода *Actinomyces* (тип актиномицеты), представляющих собой часть микробиома ротовой полости ($K3 = 0,33$; $p = 0,01$). Их роль в отношениях с организмом человека до конца не ясна. Некоторые *Actinomyces* вызывают заболевания у человека и животных, в том числе и развитие относительно редкого аспирационного легочного актиномикоза.

Заключение. Таким образом, в сравнительном аспекте орофарингеальная микробиота больных ХОБЛ средней степени тяжести и пациентов с ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения сохраняет относительную стабильность качественного состава, демонстрируя в то же время ряд существенных отличий в соотношении различных ее представителей.

Трансформация состава респираторной микробиоты по мере утяжеления ХОБЛ, вероятно, является не только следствием прогрессирования болезни, но и важным фактором, активно вовлеченным в патогенез ХОБЛ, определяющим выраженность и характер воспаления, а также его фенотипические особенности, включая тяжесть течения заболевания, частоту развития обострений и эффективность проводимых лечебных мероприятий.

В свою очередь любое агрессивное фармакотерапевтическое вмешательство с использованием системных антибактериальных препаратов и глюкокортикостероидов оказывает драматическое влияние на динамичное равновесие в системе респираторного микробиома у больных ХОБЛ, инициируя ряд качественных и количественных трансформаций, значение которых в долгосрочной эволюции заболевания требует уточнения.

Список литературы

1. Федосенко С.В., Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Салтыкова И.В., Куликов Е.С., Деев И.А., Кириллова Н.А., Селиванова П.А., Балашева И.И. Состав сообщества микроорганизмов нижних дыхательных путей при хронической обструктивной болезни легких. – Клиническая медицина. – 2014. – 8: 26–32.
2. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. – Nature Methods. – 2010. – doi:10.1038/nmeth.f.303.
3. Cénit M.C., Matzaraki V., Tigchelaar E.F., Zhernakova A. Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. – Elsevier. – 2014. – V. 1842: 1981–1992.
4. Hilty M., Burke C., Pedro H., Cardenas P., Bush A., Bossley C., Davies J., Ervine A., Poulter L., Pachter L., Moffatt M.F., Cookson W.O. Disordered microbial communities in asthmatic airways. – PLoS One. – 2010. – 5(1):e8578.

5. Huang Y.J., Kim E., Cox M.J., Brodie E.L., Brown R., Wiener-Kronish J.P., Lynch S.V. A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. — OMICS. — 2010. — 14(1):9–59.
6. Larsen J.M., Musavian H.S., Butt T.M., Ingvorsen C., Thysen AH, Brix S. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma-associated Proteobacteria, but not commensal Prevotella spp., promote Toll-like receptor 2-independent lung inflammation and pathology. — Immunology. 2015. — 144(2):333-42.
7. Lee Y.M. Chronic obstructive pulmonary disease: respiratory review of 2014. — Tuberc Respir Dis (Seoul). — 2014. — 77(4):155–60.
8. Paulson J.N., Pop M., Bravo H.C. MetagenomeSeq: Statistical analysis for sparse high-throughput sequencing. Bioconductor package: 1.6.0.
9. Sze M.A., Hogg J.C., Sin D.D. Bacterial microbiome of lungs in COPD. — Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. — 2014. — 9: 229–238.
10. Wu D., Hou C., Li Y., Zhao Z., Liu J., Lu X., Shang X., Xin Y. Analysis of the bacterial community in chronic obstructive pulmonary disease sputum samples by denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. - BMC Pulm Med. — 2014. — 14:179.

Рецензенты:

Федорова О.С., д.м.н., профессор кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск;

Камалтынова Е.М., д.м.н., доцент кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.