© РЫЖОВА Н. Н., ВОРОНИНА О. Л., ЛОСЕВА Э. В., АКСЕНОВА Е. И., КУНДА М. С., ШАРАПОВА Н. Е., ШЕРМАН В. Д., ГИНЦБУРГ А. Л.

УДК 579.61

DOI: 10.20333/2500136-2019-2-19-28

МИКРОБИОМ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА ДЕТЕЙ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

Н. Н. Рыжова¹, О. Л. Воронина¹, Э. В. Лосева², Е. И. Аксенова¹, М. С. Кунда¹, Н. Е. Шарапова¹, В. Д. Шерман³, А. Л. Гинцбург¹

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи, Москва 123098, Российская Федерация

² Институт биологии и химии Московского педагогического государственного университета, Москва 129164, Российская Федерация

³ Медико-генетический научный центр, Москва 115478, Российская Федерация

Цель исследования. Изучение влияния комплекса факторов на состав микробиоты респираторного тракта детей и выявление маркеров клинических состояний пациента.

Материал и методы. 94 образца от 60 пациентов в возрасте 3 мес. – 18 лет были исследованы методом массового параллельного секвенирования ампликонов гена 16S rDNA на платформе MiSeq Illumina. Полученные данные анализировали с помощью Microbial Genomics Module программы CLC Genomic Workbench v.9 – 11.

Результаты. Показаны значительные отличия микробных сообществ носовых пазух, зева и легких. Для образцов из зева продемонстрирована связь состава микробиоты с возрастом, ОФВ1, клиническим состоянием и классом мутации. В старшей возрастной группе (13-18 лет) в микробиоме зева, повышается доля Proteobacteria и снижается количество «здоровых» таксонов, относящихся к Actinobacteria и Bacteroidetes. В группе с пониженной функцией легких наблюдали более высокий уровень Firmicutes в зеве (83 %), при снижении Proteobacteria и Actinobacteria. Анализ взаимосвязи тяжести состояния пациента и микробиоты зева выявил, что в период обострения происходит повышение доли Proteobacteria (до 46 %) и снижение доли Firmicutes (до 38 %). Обратную тенденцию наблюдали для образцов из легких. Показано, что применение антибиотиков как в отсутствии обострения, так и в стабильном состоянии изменяет состав микробиомного сообщества. На примере одного пациента установлено, что переход в состояние обострения может быть связан с минорными изменениями некультивируемых анаэробных таксонов.

Заключение. Таким образом, полученные данные показывают, что исследования микробиома являются одним из наиболее перспективных направлений для выявления надежных биомаркеров состояния респираторного тракта пациентов с МВ, оценки результатов терапии и прогнозирования клинических исходов.

Ключевые слова: муковисцидоз, микробиом, бактериальное сообщество, респираторный тракт, обострение, секвенирование нового поколения.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Рыжова НН, Воронина ОЛ, Лосева ЭВ, Аксенова ЕИ, Кунда МС, Шарапова НЕ, Шерман ВД, Гинцбург АЛ. Микробиом респираторного тракта детей с муковисцидозом. *Сибирское медицинское обозрение*. 2019;(2):19-28. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-19-28

RESPIRATORY TRACT MICROBIOME IN CHILDREN WITH CYSTIC FIBROSIS

N. N. Ryzhova¹, O. L. Voronina¹, E. V. Loseva², E. I. Aksenova¹, M. S. Kunda¹, N. E. Sharapova¹, V. D. Sherman³, A. L. Gintsburg¹

¹ N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow 123098, Russian Federation

² Moscow Pedagogical State University, Moscow 129164, Russian Federation

³ Research Centre for Medical Genetics, Moscow 115478, Russian Federation

The aim of the research is to study the influence of complex of factors on respiratory tract microbiota composition in children and to identify markers of patient's clinical conditions.

Material and methods. 94 samples from 60 patients aged from 3 months to 18 years were studied by mass parallel sequencing of 16S rDNA amplicons on MiSeq Illumina platform. The obtained data was analysed by means of Microbial Genomics Module of CLC Genomic Workbench v.9 – 11 programs.

Results. Significant differences between microbial communities of nasal sinuses, pharynx and lungs are shown. In samples taken from pharynx, the bond of microbiota composition with age, FEV1, clinical status and mutation class was demonstrated. In the older age group (13-18 years) in pharyngeal microbiome, proportion of Proteobacteria increases and number of “healthy” taxa belonging to Actinobacteria and Bacteroidetes decreases. In group with the reduced lung function, the levels of Firmicutes in the throat were higher (83%) with the decrease of Proteobacteria and Actinobacteria. Analysis of correlation between the severity of patient's condition and pharyngeal microbiota revealed that during the acute period, there is an increase in proportion of Proteobacteria (up to 46%) and a decrease in proportion of Firmicutes (up to 38%). A reverse trend was observed in samples taken from lungs. The use of antibiotics both in non-acute period and in a stable state changes the composition of microbial community. By the example of one patient, it was established that minor changes in uncultivated anaerobic taxa can lead to acute period.

Conclusion. Thus, the obtained data show that microbiome studies are one of the most promising areas for identifying reliable biomarkers of respiratory tract condition in patients with CF, evaluating the results of therapy and predicting clinical outcomes.

Key words: cystic fibrosis, microbiome, bacterial community, respiratory tract, acute state, new generation sequencing.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Ryzhova NN, Voronina OL, Loseva EV, Aksenova EI, Kunda MS, Sharapova NE, Sherman VD, Gintsburg AL. Respiratory tract microbiome in children with cystic fibrosis. *Siberian Medical Review*. 2019;(2):19-28. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-19-28

Введение

Муковисцидоз (МВ) (кистозный фиброз, cystic fibrosis, CF) является одним из наиболее распространенных аутосомно-рецессивных заболеваний, при котором мутации в гене трансмембранного регулятора (cystic fibrosis transmembrane regulator, CFTR) обуславливают нарушения транспорта ионов хлора, приводящие к мультиорганным поражениям [1]. Продолжительность жизни таких пациентов тесно связана, в первую очередь, с сохранением дыхательной функции, которая серьезно страдает из-за нарушений мукоцилиарного клиренса, что приводит к развитию тяжелых хронических инфекций дыхательных путей с раннего возраста и нарастанию дыхательной недостаточности [2].

Изменения в составе микробиоты дыхательных путей больных МВ начинаются уже в самом раннем возрасте [3]. Для контроля микробиоты и выбора антибактериального препарата рекомендованы классические культуральные методы, которые позволяют выявлять ограниченный спектр известных микроорганизмов, колонизирующих дыхательные пути больных МВ. Несмотря на применение агрессивной антибиотикотерапии, хронические инфекции и воспаление по-прежнему приводят к прогрессирующему снижению функции легких и ранней смертности большинства пациентов с МВ [4]. Примерно в четверти всех случаев обострений легочных инфекций у пациентов так и не удается восстановить базовый уровень дыхательной функции при внутривенной антибиотикотерапии против возбудителей, выделенных в микробиологической культуре [5]. Кроме того, обострения могут протекать в отсутствие идентифицируемых в культуре возбудителей («культурально-отрицательные обострения») [6].

Отсутствие корреляции между результатами классических микробиологических анализов и клиническим состоянием у пациентов с МВ побудило исследователей к использованию молекулярно-генетических методов, позволяющих оценить многообразие сложного микробного сообщества респираторного тракта [7, 8]. Применение секвенирования нового поколения для анализа образцов взрослых больных МВ показало ограниченное разнообразие микробного сообщества у пациентов с прогрессирующим заболеванием легких [9, 10]. Однако изучение микробиома респираторного тракта детей с МВ осложняется проблемами получения биологических образцов.

В последнее время обращено внимание на таксоны, составляющие минорные доли в микробиоме респираторного тракта. Роль таких микроорганизмов все еще слабо исследована и может быть связана с бактериальный синергизмом или антагонизмом в дыхательных путях при МВ [8].

Изучение микробного разнообразия дыхательных путей у больных МВ, находящихся под постоянным наблюдением врачей, а нередко – во время и после

антибиотикотерапии, позволяет оценивать эффективность проводимых процедур или принимаемых препаратов на все микробное сообщество в динамике, в том числе на представителей «здоровой» его части, а также прогнозировать состояние пациента [11].

Целью настоящего исследования стал многофакторный анализ микробного разнообразия нескольких отделов респираторного тракта у детей разных возрастных групп методом массового параллельного секвенирования фрагментов гена 16S rDNA.

Материал и методы

Материал: 94 образца от 60 пациентов с МВ в возрасте от 3 месяцев до 18 лет, взятые специалистами Центра муковисцидоза Московской области: 16 образцов мокроты, 57 орофарингеальных мазков на третьем кашлевом толчке, 21 назофарингеальный мазок.

Врачи Центра получили информированные согласия на исследование образцов от родителей и опекунов несовершеннолетних пациентов и от самих совершеннолетних пациентов. Цикл исследований биологических образцов пациентов, больных муковисцидозом и врожденным пороком развития легких, был одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ НИИ микробиологии и эпидемиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России (протокол № 1, 17.05.2012).

Методы: ДНК из образцов мокроты выделяли согласно инструкции к набору реактивов Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit на приборе Maxwell MDX Instrument (Promega, США). Для выделения ДНК из мазков использовали лизирующий буфер (0,25 % SDS, 0,05N NaOH). Пробу инкубировали в буфере 15 мин при 95 °C, для осаждения ДНК добавляли 0,8 объема изопропанола и 0,1 объема 5M ацетата аммония. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в воде. Для амплификации подбирали разведение в зависимости от концентрации ДНК в пробе. Амплификацию проводили, как описано ранее [10].

Для определения состава микробиома различных отделов респираторного тракта проводили массовое параллельное секвенирование ампликонов гена 16S rDNA на платформе MiSeq Illumina. Ампликоны включали гипервариабельные области V1-V4 гена 16S rDNA (753 bp). Библиотеки готовили по протоколу Nextera XT DNA Library Prep Kit. Для секвенирования использовали MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles).

Полученные данные анализировали с помощью Microbial Genomics Module программы CLC Genomic Workbench v.9 – 11. Для определения Операционных Таксономических Единиц (Operational Taxonomic Unit, OTU) использовали базу данных Greengenes v13_8 с уровнем сходства 97 %.

Для оценки альфа-разнообразия (таксономическое разнообразие микробиоты в конкретном образце) использовали коэффициент филогенетического разнообразия, а также индексы Simpson's index, показатель Shannon entropy и Chao 1 bias-corrected. Бета-разнообразие (степень попарного сходства таксономического

состава микробиоты разных проб) было оценено с помощью индексов Jaccard, Bray-Curtis, Euclidean distance, а так же различных метрик UniFrac (Unweighted UniFrac, Weighted UniFrac, Weighted UniFrac not normalized, D_0 UniFrac, D_0.5 UniFrac), учитывающих филогенетическую структуру сообщества [12].

Для подробного анализа сходства между образцами использовали Principal Coordinate Analysis (PCO или PCoA), основанный на многомерном рассмотрении данных [13].

Подгруппы пациентов для анализа учитывали возраст: 0-6 лет, 7-12 лет, 13-18 лет; значение ОФВ₁ (объема форсированного выдоха в первую секунду): > 101 %, 80-100 %, <80 %, нет данных; клиническое состояние: обострение и лечение (антибиотикотерапия), обострение, стабильное и лечение, дополнительные симптомы осложнения дыхательных путей (признаки ОРЗ, усиление кашля, увеличение количества мокроты, отделяемое из носа, заложенность носа, острый аденоидит) и лечение, дополнительные симптомы осложнения дыхательных путей; класс мутации в гене CFTR (Cystic Fibrosis Transport Regulator). Для определения класса мутаций использовали базу данных МГНЦ LOVD v0.1 [14].

Анализ статистической значимости различий между группами образцов производили с помощью метода PERMANOVA (PERmutational Multivariate ANalysis Of Variance) [15]. Для каждой пары групп рассчитывались pseudo-f statistic, p-value и Bonferroni-corrected p-values. Достоверными признавали только различия для групп с p-value < 0.05.

Результаты и обсуждение

Отличия в микробном составе проб из легких, зева, носа пациентов с МВ

Данные по микробиому были сгруппированы в соответствии с отделом респираторного тракта, из которого получали образец. По каждому таксону бактерий был рассчитан средний показатель в 3-х группах условно названных: нос (назофарингеальный мазок), зев (орофарингеальный мазок на третьем кашлевом толчке), легкие (мокрота).

Сравнение значений по составу микробиома трех групп показало существенные различия микробных сообществ этих отделов респираторного тракта. Все использованные метрики позволяли различать микробиомы легких, зева и носа с высокой достоверностью. Так, при использовании расстояния D_0.5 UniFrac все три группы отличались с вероятностью ошибки при отклонении нулевой гипотезы $p=0,00001$.

Детальный анализ таксонов, специфичных для трех отделов респираторного тракта (рис. 1) показал, что в микробиоте зева преобладали *Firmicutes* (64 %); уровень *Actinobacteria* (18 %) в среднем превышал уровень *Actinobacteria* в носу (11 %) и легких (5 %). В образцах из носа преобладали *Proteobacteria* (58 %). В легких *Proteobacteria* и *Firmicutes* находились в приблизительно равных соотношениях 42 % и 48 %, соответственно.

Уровень *Bacteroidetes* в легких был в 2 раза выше, чем в зеве. В носу *Bacteroidetes* практически отсутствовали.

В основных филумах мы рассмотрели родовой состав. В филуме *Actinobacteria* пробы из зева и легких были приблизительно сходным с преобладанием представителей *Micrococcaceae* (*Rothia*). В пазухах носа среди *Actinobacteria* преобладали представители *Corynebacteriaceae* (*Corynebacterium*) (рис. 2A).

В филуме *Bacteroidetes* *Prevotellaceae* (*Prevotella*) и *Flavobacteriaceae* (*Capnocytophaga*) в легких были представлены примерно в равных соотношениях: по 2 %. В зеве вся фракция *Bacteroidetes* составляла менее 2 % с преобладанием *Prevotellaceae* и *Weeksellaceae*. (рис. 2B).

В филуме *Firmicutes* в зеве и легких лидировали представители *Streptococcaceae*: 49 % и 22 %, соответственно. В легких также наблюдали значимый процент *Staphylococcaceae* (13 %). В образцах из носа *Streptococcaceae* (11 %), *Staphylococcaceae* (9 %) и *Aerococcaceae* (7 %) находились в приблизительно равном соотношении (рис. 2C).

Филум *Proteobacteria* в образцах из носа был, главным образом, представлен *Xanthomonadaceae* (*Stenotrophomonas*) (43 %), следующим по количеству таксоном была *Moraxella* (6 %). В легких и зеве преобладал *Pseudomonas*, 31 % и 8 %, соответственно. В небольшом, но значимом количестве в этих двух отделах были представлены *Enterobacteriaceae* (2 %), *Alteromonadaceae* (*Cellvibrio*), *Campylobacteraceae* (*Campylobacter*), *Alcaligenaceae* (*Achromobacter*) (рис. 2D).

В целом микробные сообщества зева были более сходны с микробиотой легких. Микробные сообщества носа значительно отличались от микробиоты зева и легких (рис. 1B).

Отличия в микробном составе проб из респираторного тракта для групп пациентов

Пробы из носа, зева и легких, в свою очередь, были разделены на подгруппы в зависимости от возраста пациента, клинического состояния/лечения, ОФВ₁ и класса мутации. Значимые отличия в микробном составе по выделенным группам были обнаружены только для проб из зева, что связано со сравнительно хорошей представленностью выборки (57 образцов). На рисунке 3 представлен состав микробиома зева, характерный для каждой из подгрупп пациентов.

В подгруппах по возрасту (рис. 3A) выделяется старшая возрастная подгруппа (13-18 лет). В образцах этой подгруппы повышается доля *Proteobacteria* и снижается количество «здоровых» таксонов, относящихся к *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*.

В подгруппах по ОФВ₁ (рис. 3B) менее выражены различия в составе микробиома. По ряду метрик отличался микробный состав между подгруппой ОФВ₁ >101 % и ОФВ₁ < 80 %. Подгруппа «нет данных», преимущественно включающая детей младше 6 лет, отличалась по составу микробиоты от под-

Рисунок 1. Сопоставление микробиомов трех отделов респираторного тракта.

А – Филумы микроорганизмов, характерные для различных отделов респираторного тракта пациентов с МВ (Z-зев, М-легкие, N-нос).

В – PCo анализ сходства таксономического состава микроорганизмов из разных проб (синие точки – пробы из зева, зеленые точки – пробы из легких, красные точки – пробы из носа).

Figure 1. Comparison of three sections of respiratory tract microbiomes.

A – Microorganisms phylums typical for different parts of respiratory tract in patients with CF (Z-pharynx, M-lungs, N-nose),

B – PCo analysis of taxonomic composition of microorganisms' similarity taken from different samples (blue dots – samples taken from pharynx, green dots – samples taken from lungs, red dots – samples taken from nose).

групп < 80% и 80-100 %. В целом подгруппа с пониженной функцией легких характеризовалась более высокой представленностью *Firmicutes* в зеве (83 %), более низким уровнем *Actinobacteria* с повышенной долей *Actinomycetaceae* (5 %), снижением *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*. Однако такие результаты пока следует признать предварительными в силу низкой представленности этой подгруппы в анализе (3 образца от трех пациентов).

Для всех подгрупп мутаций, кроме I/I, было характерно высокое содержание *Firmicutes*. Для подгруппы I/I выявлена высокая по сравнению с другими подгруппами доля *Proteobacteria* и низкая доля *Actinobacteria*. Необходимо отметить, что класс мутации I/I в гомозиготе характеризуется критическим нарушением синтеза CFTR, при котором функциональный белок не вырабатывается.

Наиболее мягкий класс мутации – V – в гетерозиготе в данной выборке встречался у 4 пациентов. При этом классе мутации синтезируется нормальный CFTR белок, способный двигаться к мембране, но количество белка недостаточно. Для этой подгруппы пациентов характерно более низкое содержание *Proteobacteria* в микробиоме зева.

Наиболее контрастные данные были получены по составу микробиома зева в подгруппах по клиническому состоянию пациентов (рис. 3D). Подгруппа «обострение» характеризовалась более высоким уровнем *Proteobacteria* (до 46 %) и низким уровнем *Firmicutes* (до 38 %) в отличие от подгруппы

«стабильное состояние», когда *Proteobacteria* составляли 8 %, а *Firmicutes* – 72 % микробиома. В подгруппе «стабильное состояние» отмечены самые высокие уровни TM7 (0,23-0,24 %) – филума, выделенного из *Bacteroidetes*. Соотношение филумов в подгруппе «дополнительные симптомы воспаления дыхательных путей» было сходно с состоянием «обострение»: *Proteobacteria* достигали 43 %, а *Firmicutes* в среднем составляли 41 % микробиома.

Отметим, что антибиотикотерапия, как в стабильном состоянии, так и в периоды обострения также изменяла соотношение филумов бактерий (рис. 3d). Применение антибиотиков в подгруппе «стабильное состояние» приводило к существенному увеличению уровня *Proteobacteria* (в среднем с 8 % до 23 %), небольшому снижению доли *Firmicutes* (с 72 % до 64 %) и доли *Actinobacteria* (с 19 % до 12 %).

Эффект антибиотиков в подгруппе «обострение» был противоположным в отношении *Proteobacteria*: их количество резко снижалось (в среднем с 46 % до 3 %). При этом возрастала доля *Firmicutes* (с 38 % до 87 %). «Здоровые» филумы существенно снижались в составе микробиома: *Actinobacteria* с 14 % до 9 %, а *Bacteroidetes* с 2 % до 0,79 %.

Анализ дифференциального изобилия микроорганизмов в группах пациентов выявил таксоны, характерные для разных состояний. Так в подгруппе «обострение», по сравнению с подгруппой «обострение и лечение» и «стабильное состояние», превалировал *Pseudomonas* (рис. 4D).

Рисунок 2. Таксономический состав отдельных филумов, характерных для различных отделов респираторного тракта пациентов с МВ.

A – Actinobacteria, B – Bacteroidetes, C – Firmicutes, D – Proteobacteria.

Figure 2. Taxonomic composition of individual phyla typical for different parts of respiratory tract in patients with CF

A – Actinobacteria, B – Bacteroidetes, C – Firmicutes, D – Proteobacteria.

В свою очередь в подгруппе «стабильное состояние», по сравнению с подгруппой «обострение», отмечали больший процент актинобактерии рода *Atopobium* (Coriobacteriaceae) (рис. 4A), по сравнению с подгруппой «обострение и лечение» – увеличение *Streptococcus infantis*, *Enterococcus*, *Planococcaceae*, *Paenibacillus*, *Sphingobium* (рис. 4C), а по сравнению с подгруппой «стабильное состояние и лечение» – рост доли *Stenotrophomonas* (Xanthomonadaceae), *Actinomyces* и *Gemella*.

Следует отметить, что в подгруппе «дополнительные симптомы воспаления дыхательных путей», по сравнению с подгруппой «обострение», отмечали увеличение *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Moraxellaceae*, *Coxiellaceae*, *Gemellaceae*, а по сравнению с группой

«обострение и лечение» – увеличение *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Coxiellaceae*, *Klebsiella*, [Weeksellaceae], *Enterobacter*, *Serratia*, *Gemellaceae*, *Lactobacillus*. Такое разнообразие микроорганизмов в группе «дополнительные симптомы воспаления дыхательных путей» может говорить об неоднородности группы и включении в нее пациентов со значительными отличиями в состоянии.

Подобный анализ образцов мокроты (16 шт) от 15 пациентов в возрасте от 8 до 18 лет (рис. 3D) показал, что в подгруппе «стабильное состояние» наблюдался баланс между *Proteobacteria* (26 %) и *Firmicutes* (57 %), количество *Bacteroidetes* составляло 8 %, а *Actinobacteria* – 2 %, и высока доля филума TM7: 6 %.

Рисунок 3. Филумы микроорганизмов в образцах из зева и в мокроте для подгрупп, сформированных по разным параметрам.

1 – обострение и лечение; 2 – обострение; 3 – стабильное состояние и лечение; 4 – стабильное состояние; 5 – дополнительные симптомы воспаления дыхательных путей и лечение; 6 – дополнительные симптомы воспаления дыхательных путей.

А – возрастные подгруппы пациентов (зев).

В – подгруппы по ОФВ1 (зев).

С – подгруппы клинических состояний (зев).

Д – подгруппы клинических состояний (мокрота).

Figure 3. Microorganism's phylums in samples taken from pharynx and sputum in subgroups formed by different parameters.

1 – exacerbation and treatment; 2 – exacerbation; 3 – stable condition and treatment; 4 – stable condition; 5 – additional symptoms of airway inflammation and treatment; 6 – additional symptoms of airway inflammation.

A – age subgroup of patients (pharynx).

B – subgroups based on FEV1 (pharynx).

C – subgroup based on clinical conditions (pharynx).

D – subgroups based on clinical conditions (sputum).

В подгруппе «стабильное состояние и лечение» увеличивалась доля *Proteobacteria* (63 %) и снижалась доля *Firmicutes* (34 %).

Состояние «обострение» характеризовалось высоким уровнем *Firmicutes* (91 %), среди которых преобладали *Streptococcaceae* (46 %) и *Staphylococcaceae* (34 %), и низким уровнем *Proteobacteria* (1 %). В тоже время в подгруппе «обострение и лечение» повышалось количество *Proteobacteria* (38 %) и *Actinobacteria* (10 %).

Отметим, что в подгруппах «обострение», «стабильное состояние и лечение», «дополнительные симптомы воспаления дыхательных путей» в мокроте появлялись *Cyanobacteria* семейства *Acaryochloridaceae* (рис. 3D).

РСо анализ образцов мокроты показал значительное разнообразие состава микробиоты легких у пациентов. Сложносоставные микробиомы (*Streptococcaceae* и *Actinobacteria*) трех пациентов в состоянии «обострение» формировали небольшую

Рисунок 4. Таксономический состав филумов, идентифицированных в пробах из зева при различных клинических состояниях пациентов с МВ.

1 – обострение и лечение; 2 – обострение; 3 – стабильное состояние и лечение; 4 – стабильное состояние; 5 – дополнительные симптомы воспаления дыхательных путей и лечение; 6 – дополнительные симптомы воспаления дыхательных путей.

A – Actinobacteria, B – Bacteroidetes, C – Firmicutes, D – Proteobacteria.

Figure 4. Taxonomic composition of phylums identified in samples taken from pharynx in different clinical conditions of patients with CF.

1 – exacerbation and treatment; 2 – exacerbation; 3 – stable condition and treatment; 4 – stable condition; 5 – additional symptoms of airway inflammation and treatment; 6 – additional symptoms of airway inflammation.

A – Actinobacteria, B – Bacteroidetes, C – Firmicutes, D – Proteobacteria

группу в центре графика, остальные микробиомы как в стабильном состоянии, так и в состоянии «обострение» были удалены от этой группы на различные расстояния. Это может быть связано со специфическими особенностями состава микробиоты этих проб.

Для одного пациента старшей возрастной группы образцы мокроты были взяты при разных клинических состояниях: «стабильное состояние и лечение» и «обострение и лечение» (рис. 5). В микробиомах обоих состояний лидировали 2 таксона: *Pseudomonadaceae* и *Streptococcaceae*. В стабильном состоянии *Pseudomonadaceae* – 48 %, *Streptococcaceae* –

42 %, а при обострении *Pseudomonadaceae* – 46 % и *Streptococcaceae* – 36 %. Однако отличия были выявлены по минорным таксонам. При обострении появлялись такие представители *Firmicutes*, как *Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Aerococcaceae*, а в филуме *Proteobacteria* – семейство *Enterobacteriaceae*. При обострении увеличивалась также доля *Actinobacteria* до 3,3 %, в том числе *Micrococcaceae* (*Rothia*), а также *Actinomycetaceae*, *Microbacteriaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Streptomyetaceae* (изменения менее 1 %). А вот доля *Bacteroidetes* падала практически до нуля (рис. 5B).

Рисунок 5. Таксономический состав филумов, идентифицированных в образцах мокроты пациента в двух клинических состояниях.

1 – обострение и лечение; 2 – обострение; 3 – стабильное состояние и лечение; 4 – стабильное состояние; 5 – дополнительные симптомы воспаления дыхательных путей и лечение; 6 – дополнительные симптомы воспаления дыхательных путей.

A – Actinobacteria, B – Bacteroidetes, C – Firmicutes, D – Proteobacteria.

Figure 5. Taxonomic composition of phylums identified in patient's sputum samples in two clinical conditions.

1 – exacerbation and treatment; 2 – exacerbation; 3 – stable condition and treatment; 4 – stable condition; 5 – additional symptoms of airway inflammation and treatment; 6 – additional symptoms of airway inflammation.

A – Actinobacteria, B – Bacteroidetes, C – Firmicutes, D – Proteobacteria.

Acosta et al. также обращали внимание на минорные фракции микробиома [11]. Авторы исследовали микриом легких более старших пациентов с МВ: 18-22 лет и обнаружили корреляцию между более высоким уровнем ($\geq 0,75$ %) *Granulicatella* и *Gemella* с замедлением прогрессии заболевания, а присутствие *Stenotrophomonas* (<1 %) было ассоциировано с ранним наступлением конечной стадии МВ и необходимости пересадки легких. В нашем исследовании доля *Gemella* (Gemellaceae) была более высокой в зеве у пациентов в стабильном состоянии, по сравнению с обострением.

Другое наблюдение Acosta et al. касалось таксона актинобактерий. У пациентов с медленно прогрессирующим заболеванием авторы наблюдали обогащение микробиома легких *Rothia* и *Veillonella*. В нашем исследовании увеличение доли Micrococcaceae, в том числе *Rothia*, было отмечено при обострении (рис. 5). У пациентов в стабильном состоянии как в зеве, так и в мокроте мы отмечали появление кандидатного таксона TM7.

Превалирующие таксоны *Pseudomonas* и *Streptococcaceae*, отмеченные выше, также требуют дальнейшего изучения динамики в разных клинических

состояниях пациентов. Например, в периоды обострения мы наблюдали в зеве высокую долю *Pseudomonas* (41 %), в то время как в легких повышенная доля этого микроорганизма не была строго ассоциирована с обострением в исследуемой выборке, которая включала детей. По данным Acosta et al., критическим было повышение доли *Pseudomonas* до 50 % и более, что было ассоциировано с риском раннего наступления конечной стадии заболевания и необходимостью трансплантации [11]. Наши исследования микробиома легких у взрослых показали, что у пациентов с низкими показателями ОФВ₁, находящихся в листе ожидания трансплантации, доля *Pseudomonas* может достигать 99 % [1].

Род *Streptococcus* включает виды по-разному влияющие на макроорганизмы. *Streptococcus milleri* и стрептококки группы А, по наблюдениям Parkins et al. [16] и Skolnik et al. [17], причастны к легочным обострениям и являются ключевыми факторами, влияющими на прогрессию заболевания легких при МВ.

Оценивая род *Streptococcus* в целом, Sherrard и Bell [8] отмечали, что микробиомы с более высокой относительной численностью *Streptococcus* (≥ 25 %) были ассоциированы с замедлением прогрессии заболевания, указывая на возможную защитную роль этого рода микроорганизмов.

В нашем исследовании *Streptococcaceae* преобладали в зеве и легких большинства пациентов младшего возраста. При этом однако, если в зеве высокий процент *Streptococcaceae* был ассоциирован со стабильным состоянием (54 %), то во в легких наиболее высокая доля этого таксона наблюдалась в периоды обострения (46 %).

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало значительные отличия микробиомов носа, зева и легких. Для образцов из зева продемонстрирована связь состава микробиоты с возрастом, ОФВ₁, клиническим состоянием и классом мутации.

Показано, что в старшей возрастной группе (13-18 лет) в микробиоме зева повышается доля *Proteobacteria* и снижается количество «здоровых» таксонов, относящихся к *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*.

В группе с пониженной функцией легких наблюдали более высокий уровень *Firmicutes* в зеве (83 %), при снижении *Proteobacteria* и *Actinobacteria*.

У пациентов с наиболее критическим нарушением синтеза CFTR (класс мутации I/I), при котором функциональный белок не вырабатывается, также наблюдали более высокий уровень *Proteobacteria* и снижение доли *Actinobacteria*.

Анализ взаимосвязи тяжести состояния пациента и состава микробиоты зева выявил повышение доли *Proteobacteria* (до 46 %) и снижение доли *Firmicutes* (до 38 %) в период обострения. В свою очередь при стабильном состоянии пациента *Proteobacteria* составляли всего 8 % микробиома, а *Firmicutes* – 72 %.

Обратную тенденцию наблюдали для образцов мокроты. Состояние «обострение» в данной выборке пациентов было ассоциировано с высоким уровнем *Firmicutes* (91 %) и низким уровнем *Proteobacteria* (1 %).

Показано, что применение антибиотиков влияет на состав микробиома как в стабильном состоянии, так и при обострении.

Особого внимания заслуживают минорные таксоны. Мы заметили, что в стабильном состоянии в образцах из зева присутствовал таксон TM7 (0,23-0,24 %). В образцах мокроты при обострении появлялась *Cyanobacteria* (2 %). На примере одного пациента было показано, что переход в состояние обострения может быть связан с минорными изменениями некультивируемых анаэробных таксонов.

Таким образом, полученные данные показывают, что исследования микробиома респираторного тракта пациентов с МВ являются одним из наиболее перспективных направлений для выявления надежных биомаркеров состояния пациентов, оценки результатов терапии и прогнозирования клинических исходов.

Литература/References

- Капранов НИ, Каширская НЮ. Муковисцидоз. Современные достижения и актуальные проблемы. М.; 2011. 92 с. [Kapranov NI, Kashirskaya. Cystic Fibrosis. Current achievements and current issues. M.; 2011. 92 с. (In Russian).
- Caverly LJ, LiPuma JJ. Cystic fibrosis respiratory microbiota: unraveling complexity to inform clinical practice. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2018;12(10): 857-865. DOI: 10.1080/17476348.2018.1513331
- Salsgiver EL, Fink AK, Knapp EA, LiPuma JJ, Olivier KN, Marshall BC, Saiman L. Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2016;149(2):390-400. DOI: 10.1378/chest.15-0676
- Cystic Fibrosis Foundation (US) Patient Registry Annual Data Report 2017. Accessed March 13, 2019. <https://www.cff.org/>
- Sanders DB, Bittner RC, Rosenfeld M, Hoffman LR, Redding GJ, Goss CH. Failure to recover to baseline pulmonary function after cystic fibrosis pulmonary exacerbation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010;182(5):627-32. DOI: 10.1164/rcm.200909-1421OC
- Zemanick ET, Wagner BD, Harris JK, Wagener JS, Accurso FJ, Sagel SD. Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis with negative bacterial cultures. *Pediatric Pulmonology*. 2010;45(6):569-77. DOI: 10.1002/ppul.21221
- Rogers GB, Bruce KD, Hoffman LR. How can the cystic fibrosis respiratory microbiome influence our clinical decision-making? *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2017; 23(6):536-543. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000419

8. Sherrard LJ, Bell SC. Lower airway microbiota for 'biomarker' measurements of cystic fibrosis disease progression? *Thorax* 2018;(73):1001-1003.

9. Bacci G, Paganin P, Lopez L, Vanni C, Dalmas-tri C, Cantale C, Daddiego L, Perrotta G, Dolce D, Morrelli P, Tuccio V, De Alessandri A, Fiscarelli EV, Taccetti G, Lucidi V, Bevivino A, Mengoni A. Pyrosequencing Unveils cystic Fibrosis lung Microbiome Differences associated with a Severe lung Function Decline. *PLoS One* 2016;(11):e0156807. DOI: 10.1371/journal.pone.0156807

10. Voronina OL, Kunda MS, Ryzhova NN, Aksenova EI, Sharapova NE, Semenov AN, Amelina EL, Chuchalin AG, Gintsburg AL. On Burkholderiales Order Microorganisms and Cystic Fibrosis in Russia. *BMC Genomics*. 2018, 19(3):74. DOI 10.1186/s12864-018-4472-9

11. Acosta N, Heirali A, Somayaji R, Surette MG, Workentine ML, Sibley CD, Rabin HR, Parkins MD. Sputum microbiota is predictive of long-term clinical outcomes in young adults with cystic fibrosis. *Thorax*. 2018;73(11):1016-1025. DOI: 10.1136/thorax-jnl-2018-211510

12. Chen J, Bittinger K, Charlson ES, Hoffmann C, Lewis J, Wu GD, Collman RG, Bushman FD, Li H. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics*. 2012;28(16):2106-2113.

13. Clustering and Classification methods for Biologists. Manchester Metropolitan University. Accessed March 13, 2019. <http://www.alanfielding.co.uk/multivar/pco.htm>

14. Консенсус по клиническим эффектам генетических вариантов МГНЦ. Ссылка активна на 13.03.2019. [Consensus of clinical effects of genetic variants MGNTs. Accessed March 13, 2019. (In Russian)] <http://seqdb.medgen.ru/>

15. Anderson MJ. A new method for non parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*. 2001; 26(1):32-46.

16. Parkins MD, Sibley CD, Surette MG, Rabin HR. The *Streptococcus milleri* group--an unrecognized cause of disease in cystic fibrosis: a case series and literature review. *Pediatric Pulmonology*. 2008;43(5):490-497. DOI: 10.1002/ppul.20809

17. Skolnik K, Nguyen A, Somayaji R, Thornton CS, Waddell B, Surette MG, Rabin HR, Parkins MD. Clinical implications and characterization of Group A *Streptococcus* infections in adults with cystic fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine*. 2015;(15):161. DOI: 10.1186/s12890-015-0157-1

Сведения об авторах

Рыжова Наталья Николаевна, к.б.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(949)1933001; e-mail: rynatalia@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5361-870X>

Воронина Ольга Львовна, к.б.н., доцент, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(916)2248683; e-mail: olv550@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

Лосева Эвелина Викторовна, магистрант, Институт биологии и химии Московского педагогического государственного университета; адрес: Российская Федерация, 129164, г. Москва, ул. Кибальчича, д. 6, к. 1; тел.: +7(495) 683-16-07; e-mail: loseva.ewelina@yandex.ru

Аксенова Екатерина Ивановна, к.б.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(949)1933001; e-mail: aksenova16@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>

Кунда Марина Сергеевна, к.б.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(949)1933001; e-mail: markunda99@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-1945-0397>

Шарапова Наталья Евгеньевна, к.б.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(949)1933001; e-mail: natasharapova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8384-2822>

Шерман Виктория Давыдовна, к.м.н., Медико-генетический научный центр, Российская Федерация, 115478, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1; тел.: +7(495) 1110303; e-mail: tovika@yandex.ru

Гинцбург Александр Леонидович, д.б.н., академик РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи; адрес: Российская Федерация, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел.: +7(949)1933001; e-mail: gintsburg@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0002-6182-3866>

Author information

Natalia N. Ryzhova, Cand.Biol.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(949)1933001; e-mail: rynatalia@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5361-870X>

Olga L. Voronina, Cand.Biol.Sci., assistant professor, N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(916)2248683; e-mail: olv550@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-7206-3594>

Evelina V. Loseva, master student, Moscow Pedagogical State University; Address: 6, Kibalkhicha Str., Moscow, Russian Federation 129164; Phone: +7(495) 6831607; e-mail: loseva.ewelina@yandex.ru

Ekatrina I. Aksenova, Cand.Biol.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(949)1933001; e-mail: aksenova16@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2704-6730>

Marina S. Kunda, Cand.Biol.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(949)1933001; e-mail: markunda99@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-1945-0397>

Natalia E. Sharapova, Cand.Biol.Sci., N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(949)1933001; e-mail: natasharapova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8384-2822>

Victoriya D. Sherman, Cand.Med.Sci., Research Centre for Medical Genetics; Address: 1, Moskvorechie Str., Moscow, Russian Federation 115478; Phone: +7(495)1110303; e-mail: tovika@yandex.ru

Alexandr L. Gintsburg, Dr.Biol.Sci., Academician of RAS, N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Address: 18, Gamaleya Str., Moscow, Russian Federation 123098; Phone: +7(949)1933001; e-mail: gintsburg@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0002-6182-3866>

Поступила 31.12.2018 г.

Принята к печати 13.02.2019 г.

Received 31 December 2018

Accepted for publication 13 February 2019