

УДК 579.61

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОМА РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ*

© 2020 О.Л. Воронина^{1**.***}, Н.Н. Рыжова¹, М.С. Кунда¹, Э.В. Лосева¹,
Е.И. Аксенова¹, Е.Л. Амелина², Г.Л. Шумкова², О.И. Симонова³, А.Л. Гинцбург¹

¹ Национальный исследовательский центр им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России,
123098 Москва, Россия; электронная почта: olv550@gmail.com

² Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, 115682 Москва, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России,
119296 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.06.2019

После доработки 29.07.2019

Принята к публикации 10.09.2019

Микробиота – неотъемлемая часть организма человека, которую активно исследуют, в т.ч. методами массового параллельного секвенирования. Однако микробиомы легких и пазух носа стали объектами пристального внимания лишь в последнем десятилетии. Для пациентов с муковисцидозом контроль состояния микроорганизмов дыхательных путей важен для сохранения функции легких. Выяснение роли пазух носа и наличия полипов в формировании микробиома дыхательных путей стало целью нашего исследования. Мы показали, что уже в детском возрасте в пазухах носа присутствуют протеобактерии, обнаруженные также в образцах из нижних дыхательных путей. В ряде случаев им сопутствуют потенциально опасные базидиомицеты. Однако наличие полипов не влияет на формирование микробиома пазух носа. Протеобактерии являются определяющими в снижении биоразнообразия микробиомов легких и пазух носа, что коррелирует с ухудшением показателей функции легких. Мягкие мутации в гене *CFTR* даже в гетерозиготном состоянии в сочетании с мутацией I класса способствуют формированию более благополучного микробиома.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микробиом, муковисцидоз, респираторный тракт, хронический риносинусит, *Proteobacteria*.

DOI: 10.31857/S0320972520010017

Микробиоту – совокупность микроорганизмов – в настоящее время рассматривают как неотъемлемую составную часть организма человека, оказывающую влияние на пищеварительную, иммунную, нервную и др. системы. XXI век привнес новый термин – микробиом, определяющий суммарный геном микроорганизмов экологической ниши или конкретного образца. Однако в большинстве исследований под микробиомом понимают совокупность генов рибосомальной РНК (рРНК) микробиоты.

Woese et al. доказали универсальность этих генов и возможность рассмотрения их как мо-

лекулярных часов для филогенетики [1]. Особое внимание Stackebrandt и Woese уделяли роли рРНК в филогении и таксономии прокариот [2]. В 1970-е гг. началось накопление данных о последовательностях генов рРНК, чему содействовали работы Sanger, предложившего в 1977 г. метод расшифровки первичной структуры ДНК. Накопленные данные нуждались в систематизации, и в 1982 г. GenBank NCB1 начал работу в качестве базы данных последовательностей нуклеиновых кислот [3]. В 1990-е гг. Woese et al. выполнили проекты по формированию базы данных последовательностей рРНК [4]. Пере-

Принятые сокращения: МВ – муковисцидоз; CFTR – трансмембранный регулятор проводимости (cystic fibrosis transmembrane regulator); MLST – мультилокусное секвенирование (MultiLocus Sequence Typing); ST – генотип в контексте генов MLST (Sequence Type); ITS – внутренний транскрибируемый спейсер (internal transcribed spacer); OTU – операционная таксономическая единица (Operational Taxonomic Unit); SRA – Архив секвенированных прочтений (Sequence Read Archive); PCoA – анализ главных координат (Principal Coordinate Analysis); ОФВ1 – объем форсированного выдоха в первую секунду; PERMANOVA – пермутационный многомерный анализ дисперсии (PERmutational Multivariate ANalysis Of Variance); FDR – доля ложных отклонений (false discovery rate).

* Статья посвящается 80-летию кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (см. том 84, вып. 11, 2019).

** Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

*** Адресат для корреспонденции.

численные события содействовали тому, что дальнейшая автоматизация процесса секвенирования нуклеиновых кислот, разработка секвенаторов нового поколения, обеспечивших получение большого массива данных, не привели к хаосу, а позволили пополнить созданные базы новой информацией. Поскольку биология в XX веке, по меткому выражению Woese, стала инженерной наукой [1], процессы компьютеризации затронули ее в полной мере. Разработанное и постоянно совершенствуемое программное обеспечение, развитие компьютерной техники позволяют анализировать результаты секвенирования и сопоставлять их с базами данных.

Подготовленная информационная среда и опыт секвенирования, полученный в процессе выполнения проекта «Геном человека», позволили в 2008 г. запустить новый проект «Микробиом человека» (The Human Microbiome Project, HMP) [5]. В процессе оптимизации исследования основной мишенью для секвенирования был выбран ген *16S rDNA*, а в дальнейшем – его фрагмент, включающий несколько переменных областей (как правило, V1–V4 или меньше, в зависимости от возможностей платформы, применяемой для секвенирования). Таким образом, исследование микробиома в контексте фрагментов генов *16S rDNA*, строго говоря, позволяет получить представление о бактериоме, т.е. о филогенетическом разнообразии бактерий.

Метагеномные исследования, предоставляющие возможность изучить метаболизм микробного сообщества, пока дороги и могут быть выполнены только в рамках отдельных высокофинансируемых проектов.

Следует отметить, что первый проект «Микробиом человека» был нацелен на исследование бактерий кишечника, кожи, урогенитального тракта и, исходя из господствовавших представлений о стерильности легких, не включал эту область в поле зрения своих интересов [5, 6]. Только к следующему проекту «Интегративный геном человека» (The Integrative Human Microbiome Project, iHMP), начавшемуся в 2014 г., это предубеждение удалось преодолеть [5]. Таким образом, активное изучение микробиома легких и ряда отделов верхних дыхательных путей в норме и при патологиях с применением методов массового параллельного секвенирования началось только в 10-е гг. XXI века.

В норме формирование микробиома легких определяют два основных процесса: аспирация микроорганизмов ротовой полости и мукоцилиарный клиренс, удаляющий большинство «пришельцев» из нижних дыхательных путей. Так

формируется сбалансированное сообщество, находящееся под контролем клеток иммунной системы, способных уничтожить патогенные микробы, благодаря работе фаголизосомы.

При моногенном заболевании муковисцидоз (МВ) мутации в гене трансмембранного регулятора проводимости (cystic fibrosis transmembrane regulator, CFTR) приводят к нарушению транспорта ионов хлора, последствиями которого являются мультиорганные поражения. В центре внимания врачей, прежде всего, находится состояние нижних дыхательных путей пациентов с МВ, поскольку снижение функции легких сказывается на качестве жизни пациентов и определяет продолжительность жизни.

Следует отметить, что при повреждении хлорного канала нарушается мукоцилиарный клиренс не только в легких, бронхах, трахее, но и в полостях носа, в т.ч. в пазухах. Секрет становится все более плотным, создавая препятствие для работы реснитчатого эпителия. Накапливаются микроорганизмы, их атакуют клетки иммунной системы, но не могут уничтожить, поскольку нарушение работы хлорного канала не позволяет должным образом закислить полость фаголизосомы. В ответ на сигналы макрофагов приходят нейтрофилы, у которых также не работает хлорный канал. Некроз клеток иммунной системы способствует формированию дезинтегрированного воспалительного процесса при хронической инфекции, обусловленной размножающимися микроорганизмами [7].

Изменения в составе микробиома у больных МВ начинаются с ранних лет [8], выявить триггер этих изменений позволят последовательные исследования микробиома пациентов в течение всей их жизни. Накопленные в настоящий момент знания сформировали представление о так называемом «здоровом микробиоме» нижних дыхательных путей, в который входят представители трех основных филумов: Actinobacteria, Bacteroidetes и Firmicutes [9]. Несмотря на то что протеобактерии присутствуют в сбалансированном микробиоме здоровых людей [10], их появление в микробном сообществе легких больных МВ являетсястораживающим фактором, поэтому протеобактерии, прежде всего, подлежат регулярному контролю в нижних дыхательных путях пациентов с МВ. Данные о пациентах с хронической инфекцией легких отражаются в национальном и международных регистрах больных МВ [11, 12].

При сопоставлении микробиомов легких здоровых добровольцев и пациентов с МВ в первую очередь необходимо обратить внимание на такой параметр, как бактериальная нагрузка.

Она низка у здоровых людей в течение всей жизни и у детей с МВ в раннем возрасте. Начало изменений в микробиоме пациентов с МВ, выражающееся в увеличении бактериальной нагрузки, росте количества протеобактерий и снижении разнообразия микробного сообщества, зависит от многих параметров, ключевой из которых пока не определен [13].

Протеобактерии, попадающие в организм человека из окружающей среды, заслуживают особого внимания в отношении больных МВ. За годы наблюдений с 1950-х гг. доказано, что *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp. и *Stenotrophomonas maltophilia*, относящиеся к условно-патогенным микроорганизмам, являются патогенами при муковисцидозе [14]. При инфицировании этими микроорганизмами нижних дыхательных путей снижается функция легких, сокращается 5-летняя выживаемость [15], возникает опасность заселения этими бактериями трансплантата легких [16].

Обострения заболевания легких, антибиотикотерапия, класс мутаций в гене *CFTR* и другие факторы влияют на состояние микробиоты, сдерживание патогенных микроорганизмов и снижение функции легких [17–19].

Однако даже после успешной антибиотикотерапии протеобактерии появляются в легких вновь, причем бактерии того же генотипа, что и колонизировавшие ранее нижние дыхательные пути. Наблюдения за пациентами, инфицированными *Burkholderia* и перенесшими трансплантацию легких, показали, что в зависимости от состояния пациента и патогенных свойств бактерии *Burkholderia* прежнего генотипа заселяла новые легкие сразу после пересадки, через 3 месяца, через год и более, но через 2,5 года после операции *Burkholderia* была выявлена у всех исследованных пациентов [20].

Эти факты заставили обратить внимание на верхние дыхательные пути, а именно пазухи носа, как возможный резервуар инфекции. В пилотном исследовании мы показали, что у всех пациентов, для которых были одновременно взяты образцы лаважа пазух носа и мокроты, совпали генотипы патогенных микроорганизмов в обоих образцах [21].

Поскольку хронический риносинусит, нарушение мукоцилиарного клиренса пазух носа наблюдаются у всех пациентов с МВ, но только у доли больных разрастаются полипы назальных пазух и средней раковины, мы предприняли следующий этап исследования для выяснения роли морфологических образований носа в формировании микробиома верхних дыхательных путей и его влияния на микробиом легких.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал. В анализе были 53 образца от 21 пациента с МВ (15 взрослых, медиана возраста 27,3 года; 6 детей, медиана возраста 8,7 лет): 22 образца мокроты, 14 образцов лаважа верхнечелюстных пазух носа, 2 назофарингеальных смыва, 8 трахеальных аспиратов и 7 фрагментов полипов, полученных во время полипэктомии. По состоянию верхних дыхательных путей отоларинголог всем пациентам поставил диагноз хронический риносинусит преимущественно тяжелого течения с полипами или без них.

Забор образцов осуществляли специалисты лечебных учреждений, в которых наблюдались пациенты. Информированные согласия на исследование образцов были получены врачами от взрослых больных МВ, пациентов старше 15 лет, а также от родителей и опекунов несовершеннолетних пациентов младше 15 лет. Цикл исследований биологических образцов пациентов, больных МВ и врожденным пороком развития легких, был одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (протокол № 1 от 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).

Основной микроорганизм биологического образца определяли с помощью амплификации и секвенирования фрагмента гена *16S rDNA*, как описано ранее Voronina et al. [22]. Экспресс-диагностику бактерий порядка Burkholderiales, поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом, выполняли согласно схеме для молекулярно-генетического типирования, предложенной Ворониной с соавт. [23]. Для выявления *Pseudomonas aeruginosa* использовали наиболее вариабельную мишень схемы мультилокусного секвенирования (MLST, MultiLocus Sequence Typing) *trpE*, следуя методике Curran et al. [24] с нашими модификациями.

Идентификацию гена *mecA* в составе стафилококковой хромосомной кассеты (staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*), определяющей устойчивость к метициллину, проводили с праймерами *Mec_10-11_For* 5'-ATGTATGCTTTGGTCTTTCT-3' и *Mec_10-11_Rev* 5'-TACACATATCGTGAGCAATGA-3', разработанными нами. Для амплификации фрагмента гена *mecA* использовали следующую программу: 95 °C – 10 мин; (95 °C – 30 с, 52 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин) × 35; 72 °C – 5 мин. В положительных образцах размер продукта амплификации составлял 584 п.н.

Выявление возбудителей микозов проводили на основе амплификации и секвенирования региона ITS1_5.8S ITS2 согласно протоколу, опубликованному Ворониной с соавт. [25].

Для определения состава микробиома различных отделов респираторного тракта проводили массовое параллельное секвенирование ампликонов гена *16S rDNA* на платформе MiSeq Illumina, как описано Рыжовой с соавт. [19].

Полученные данные анализировали с помощью модуля Microbial Genomics программы CLC Genomic Workbench v.11 – 12. Для определения OTU (Operational Taxonomic Unit) использовали базу данных Greengenes v.13_8 с уровнем сходства 97%.

Данные секвенирования депонировали в SRA (Sequence Read Archive) NCBI: BioProject accession number PRJNA544655 для микробиомов взрослых, PRJNA544933 – для микробиомов детей.

Для оценки альфа-разнообразия (таксономическое разнообразие микробиоты в конкретном образце) использовали коэффициент филогенетического разнообразия, а также Simpson's index, показатели 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 также различных метрик UniFrac (Unweighted UniFrac, Weighted UniFrac, Weighted UniFrac not normalized, D_0 UniFrac, D_0.5 UniFrac), учитывающих филогенетическую структуру сообщества [26].

Для подробного анализа сходства между образцами использовали Principal Coordinate Analysis (PCoA), основанный на многомерном рассмотрении данных [27]. Подгруппы взрослых пациентов формировали с учетом следующих параметров: 1) возраст: 18–25, 26–30 лет; 2) значение ОФВ1 (объем форсированного выдоха в первую секунду): 70–115%, 40–69%, <40%; 3) тип образца: из верхних или нижних дыхательных путей; 4) степень тяжести болезни легких: легкое течение, средней тяжести, тяжелое течение; 5) основной микроорганизм, выявленный в микробиоме (восемь групп); 6) класс мутации в гене *CFTR* (Cystic Fibrosis Transport Regulator). Для определения класса мутаций использовали базу данных МГНЦ LOVD v.0.1 [28].

Анализ статистической значимости различий между группами образцов производили с помощью метода PERMANOVA (PERmutational Multivariate ANalysis Of Variance) [29]. Для каждой пары групп рассчитывали псевдо-f статистику, величину уровня значимости p и скорректированные по Бонферрони p -значения. Досто-

верными признавали только различия для групп с $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение микроорганизмов верхних и нижних дыхательных путей в группе детей с МВ. Исследования последнего десятилетия доказали необходимость контроля микроорганизмов верхних дыхательных путей у больных МВ. Однако неясно, в каком возрасте пациента опасные для функции легких микроорганизмы колонизируют верхние дыхательные пути, особенно пазухи, среднюю и верхнюю раковины носа. Получение образцов такого рода у детей затруднено болезненностью процедуры. Источником материала могут служить фрагменты полипов, удаленных при полипэктомии.

При анализе материала от пяти пациентов с МВ было показано, что у четырех детей полипы содержали *Staphylococcus aureus*, являющийся аутохтонным микроорганизмом для носовой полости. Отсутствие генов *mecA* в образцах подтвердило чувствительность *S. aureus* к метициллину, что также свидетельствовало в пользу аутохтонного происхождения выявленных бактерий. Пациент 3-СНР, у которого в полипах был выявлен только *S. aureus*, при дальнейшем наблюдении демонстрировал нормальную функцию легких и отсутствие протеобактерий в трахеальном аспирате при преобладании *Streptococcus* spp.

У четырех пациентов и в полипах, и в трахеальном аспирате выявили *P. aeruginosa*. Генотипы бактерий в нижних и верхних дыхательных путях совпали у всех пациентов. Следует отметить, что у ребенка 2-СНР с 9 до 12 лет в трахеальном аспирате из протеобактерий обнаруживали только *Achromobacter xylosoxidans* ST251, однако после его эрадикации в образцах из нижних дыхательных путей детектировали *P. aeruginosa* того же генотипа, что ранее был выявлен в полипах носа.

У близнецов 4-СНР и 5-СНР помимо одинаковых *P. aeruginosa* в полипах были обнаружены грибы *Auriculariopsis ampla* (Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Schizophyllaceae), тогда как в трахеальном аспирате обоих пациентов присутствовали дрожжеподобные грибы *Candida albicans*. В то же время даже у близнецов наблюдали отличия в микробиомах: если основным микробом полипов пациента 4-СНР был *S. aureus*, то в полипах 5-СНР преобладал *Haemophilus influenzae*, ранее обнаруженный в образцах трахеального аспирата.

Таким образом, полученные данные подтверждают, что уже в детском возрасте у пациентов с МВ верхние дыхательные пути могут служить резервуаром бактерий, инфицирующих легкие.

Сравнение альфа-разнообразия бактерий в микробиомах ребенка и взрослых с диагнозом МВ. Протеобактерии порядка Burkholderiales опасны для больных МВ способностью формировать эпидемические штаммы, распространяемые воздушно-капельным путем. Для российских пациентов наиболее значимыми являются *B. cenocepacia* ST709 (Sequence Type) и *A. ruhlandii* ST36 [21]. При хронизации инфекции не отмечено эрадикации этих бактерий из дыхательных путей. Поэтому когда у ребенка 82-CF в возрасте 4 г. 9 мес. была выявлена *B. cenocepacia* ST709, врачами стационара была применена интенсивная терапия, а также проведена операция по промыванию пазух носа. Анализ лаважа пазух показал, что даже после очистки легких от буркхолдерии в пазухах носа сохранялись различные представители порядка Burkholderiales, а также другие протеобактерии. Несмотря на то что антибиотикотерапия оказала влияние на фирмикутов, индекс альфа-разнообразия (max 12) для образцов трахеального аспирата и пазух носа пациента 82-CF был достаточно высоким (рис. 1) и значительно превышал соответствующий показатель (max 7) для образцов взрослых даже у самого благополучного пациента 61-CF с сохранной функцией легких и чистыми пазухами носа при легкой форме хронического риносинусита.

Эти данные подтверждают, что регулярные обострения и курсы антибиотикотерапии сокращают разнообразие микробиома легких пациен-

тов с МВ, что снижает способность здоровой части микробиома противостоять патогенным микроорганизмам.

Сопоставление микробиомов пазух носа и нижних дыхательных путей у взрослых пациентов с МВ. Взрослых пациентов, вошедших в анализ микробиома респираторного тракта, можно разделить на три группы по тяжести заболевания легких: легкая форма, средняя и тяжелая. Только у одного пациента первой группы – 61-CF – отсутствовали протеобактерии в мокроте в период наблюдения. У всех остальных пациентов вне зависимости от тяжести заболевания легких в мокроте были выявлены представители родов *Burkholderia*, *Achromobacter* и *Pseudomonas*.

В лаваже пазух носа бактерии и грибы отсутствовали у пациента 61-CF. Лишь следы *Burkholderia* обнаружены у пациента 74-CF в образце лаважа пазух носа, полученного в процессе полипотомии и полисинусотомии носа (рис. 2). В образце преобладал *S. aureus*, тогда как в легких 90% всего микробиома составляла *B. cenocepacia* ST709. Объяснение такого исключения врачи видят в чрезвычайно затрудненном носовом дыхании из-за разрастания полипов.

У пациентов 70-CF и 71-CF преобладание фирмикутов в образцах из верхних дыхательных путей («п») определили проблемы взятия материала. У пациентов в силу тяжести состояния был выполнен только прокол пазух, и смыв включал не только вытекший гной, но и бактерии носоглотки, поэтому эти два образца следует считать назофарингеальными смывами, обогащенными содержимым пазух. Как видно из рис. 2, в образцах «п» этих пациентов 80–90%

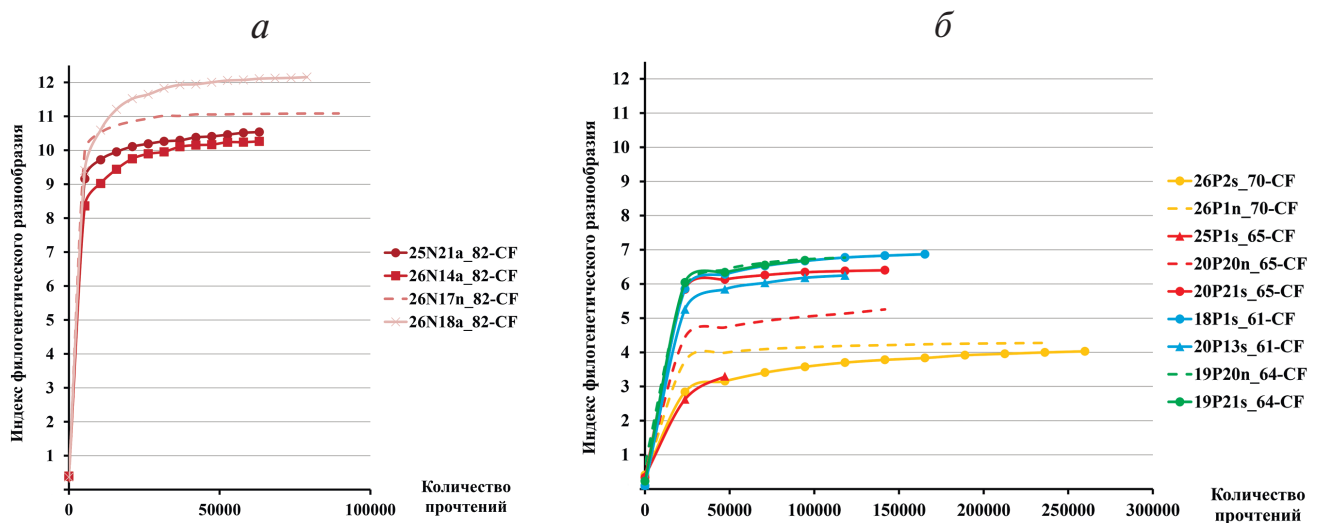


Рис. 1. Альфа-разнообразие микробиомов в образцах пациентов с муковисцидозом. а – Образцы ребенка 82-CF: а – трахеальный аспират, п – лаваж пазух носа; б – образцы взрослых пациентов: s – мокрота, n – лаваж пазух носа

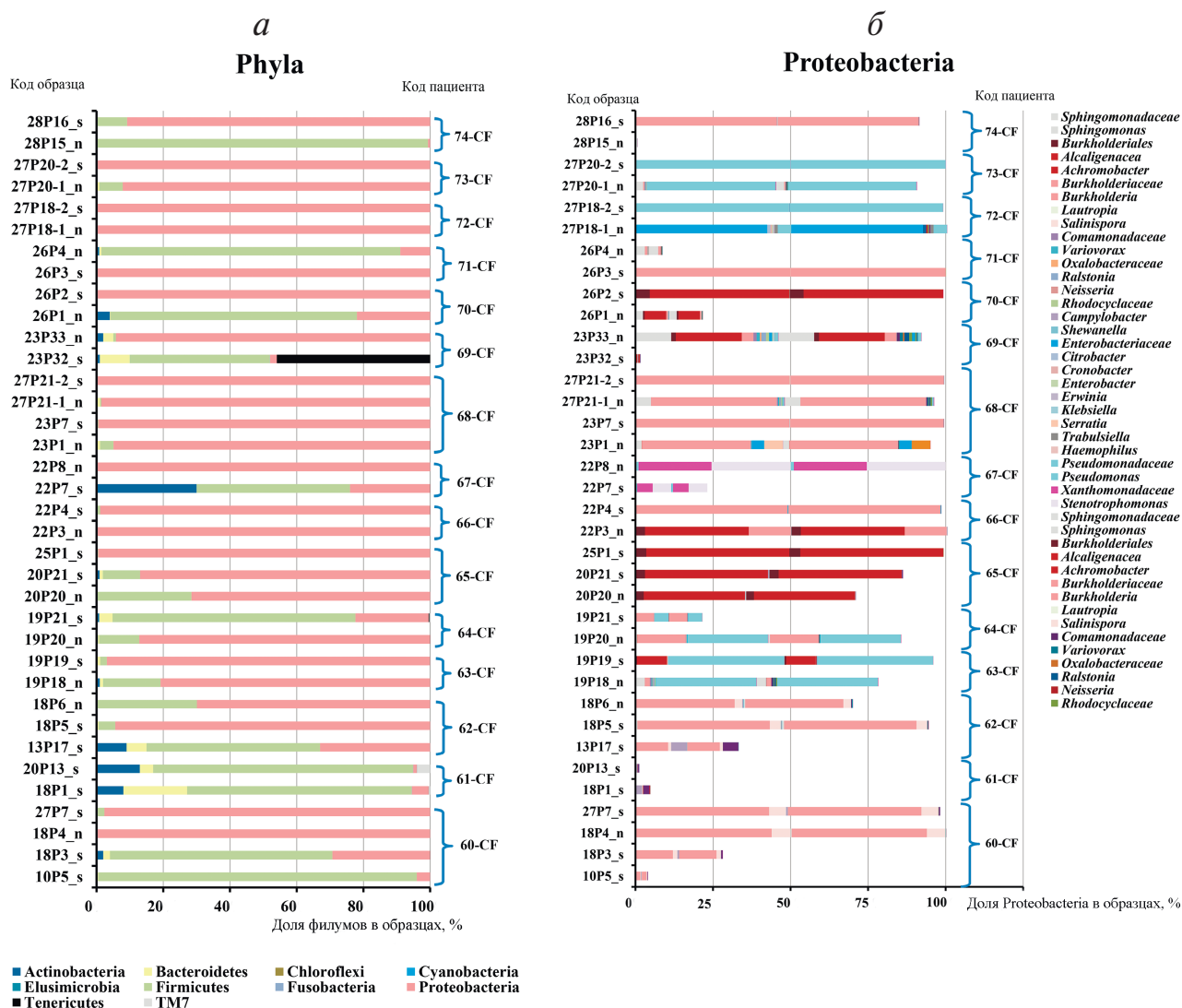


Рис. 2. Представленность филумов бактерий (а) и таксонов Proteobacteria (б) в образцах респираторного тракта взрослых пациентов с муковисцидозом: n – лаваж верхнечелюстных пазух (для пациентов 70-CF и 71-CF – назофарингеальные смывы, обогащенные содержимым пазух), s – мокрота. Фигурными скобками объединены образцы одного пациента

всех бактерий составляли фирмикуты, однако обнаруженные протеобактерии соответствовали по генотипу выявленным в мокроте.

У остальных пациентов протеобактерии преобладали в микробиоме пазух носа даже в период благополучного состояния микробиома легких, например, у пациентов 60-CF и 64-CF.

При сравнении всех образцов мокроты со всеми образцами лаважа пазух носа достоверное отличие было получено по индексам Unweighted UniFrac ($p = 0,00118$) и D_0 UniFrac ($p = 0,0001$) (рис. 3). Фракции фирмикутов, а также минорных актинобактерий и бактериоидов отличались по составу между микробиомами пазух носа и мокроты (параметры достоверности для отмеченных на рис. 3 таксонов представлены в табли-

це). Среди фирмикутов пазух носа ожидаемо лидировали *Staphylococcus*, а в мокроте – *Streptococcus*. Бактероиды *Prevotella* и *Capnocytophaga*, представленные в микробиоме мокроты, практически отсутствовали в пазухах носа. Для филума актинобактерий в образцах мокроты были характерны *Actinomyces* и *Atopobium*, а в пазухах носа был выявлен *Propionibacterium*. В то же время протеобактерии, преобладавшие как в микробиоме пазух, так и в микробиоме легких, практически не отличались по составу. Дополнительный таксон в пазухах носа представляли энтеробактерии. Таким образом, мы получили еще одно подтверждение характеристики пазух носа как резервуара протеобактерий, способных поддерживать инфекцию в легких у пациентов с МВ.

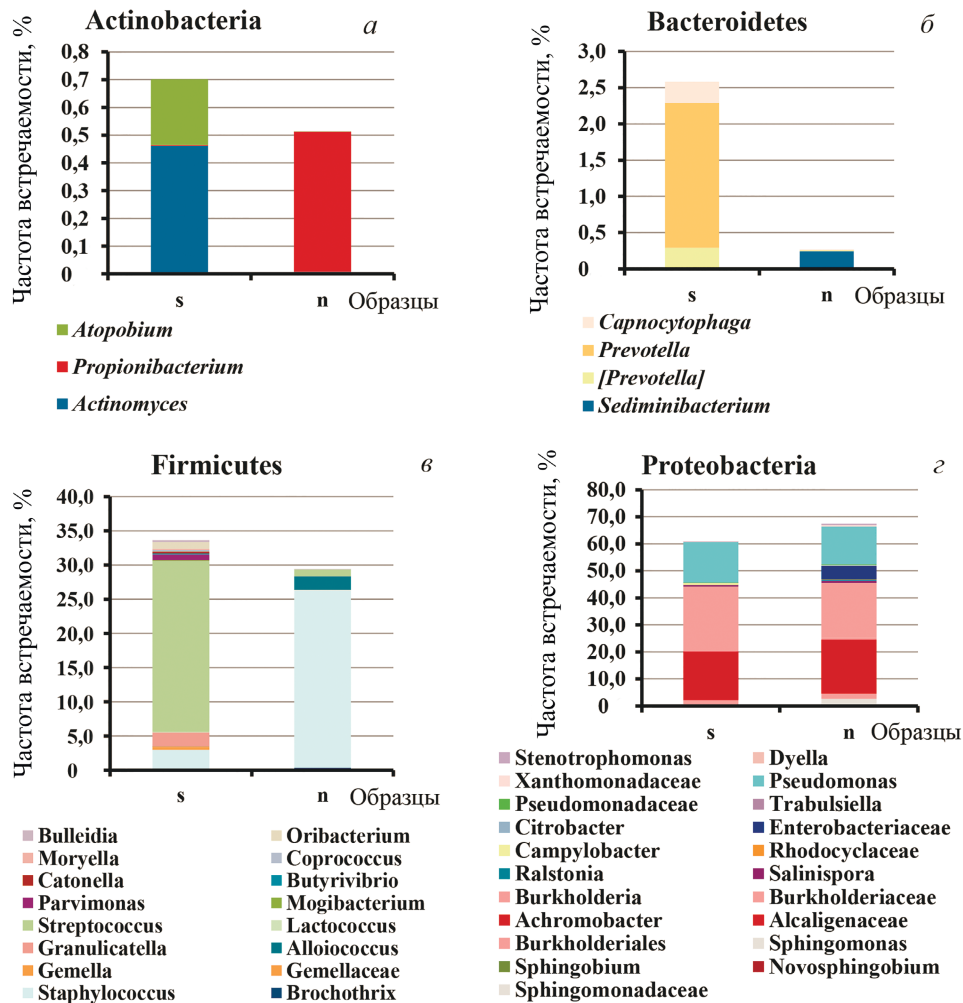


Рис. 3. Сопоставление состава филумов Actinobacteria (а), Bacteroidetes (б), Firmicutes (в) и Proteobacteria (г) в мокроте и образцах из верхних дыхательных путей взрослых пациентов с муковисцидозом: s – 21 образец мокроты, n – 13 образцов лаважа верхнечелюстных пазух носа и 2 назофарингеальных смыва, обогативших содержимым пазух

Сравнение микробиомов пазух носа взрослых пациентов с МВ с полипами и без полипов. У всех взрослых пациентов, взятых в исследование, отоларингологом диагностирован хронический риносинусит. Только у пациента 61-CF отмечено легкое течение, остальные 14 пациентов характеризовались тяжелым течением риносинусита. У восьми пациентов полипы отсутствовали, у шести обнаружены полипы второй степени с обеих сторон. У пациента 68-CF были проанализированы два образца из пазух носа: один образец был взят до, а второй – после полипо- и полисинусотомии. У пациента 72-CF лаваж пазух носа был получен через два месяца после третьей за последние 16 лет операции полипо- и полисинусотомии.

Результаты РСoA микробиомов образцов пазух носа представлены на рис. 4, а. Как видно на рисунке, группировка образцов по признаку на-

Достоверность отличий по содержанию таксонов актинобактерий, бактериоидов и фирмикотов в образцах мокроты и лаважа пазух носа

Род, OTU	p	FDR p
<i>Prevotella</i> , 530206	8,84E-09	2,43E-07
<i>Actinomyces</i> , 875735	4,28E-11	2,44E-09
<i>Atopobium</i> , 4451251	4,04E-11	2,41E-09
<i>Capnocytophaga</i> , 1106150	1,88E-12	2,07E-10
<i>Staphylococcus</i> , 1084906	2,93E-11	1,99E-09
<i>Streptococcus</i> , 561636	7,14E-11	3,71E-09

Примечание. FDR – false discovery rate (доля ложных отклонений).

личия/отсутствия полипов не наблюдается. Достоверно различаются микробиомы двух групп: I – с доминирующей *Burkholderia* и II – с преобладающим *Pseudomonas*. Причем в группу I входят оба образца пациента 68-СФ. У пациента 72-СФ даже после третьей операции протеобактерии составляли 100% микробиома, среди которых лидировала *E. coli*, а *P. aeruginosa*, преваляровавший в микробиоме легких, составлял < 10% (рис. 2). Таким образом, для эрадикации протеобактерий недостаточно только оперативного вмешательства, необходима длительная антибиотикотерапия посредством ингаляций и приверженность пациентов к лечению.

Сопоставление микробиомов респираторного тракта в подгруппах сравнения взрослых пациентов. Результаты PCoA всех образцов респираторного тракта (рис. 4, б) выявили три достоверно отличающиеся группы по доминирующему микроорганизму. Наиболее многочисленная группа I *Burkholderia* отличалась от группы II *Achromobacter* по всем восьми использованным индексам (Bray–Curtis $p = 0,00016$), от группы III *Pseudomonas* – по всем, кроме Euclidean (Bray–Curtis $p = 0,000116$). Отличие группы II от группы III подкреплено восемью индексами (Bray–Curtis $p = 0,00433$).

Обращает на себя внимание положение образцов пациента 61-СФ с самым здоровым микробиомом (наиболее удаленные точки по оси PCo3 12%). Увеличение доли фирмикутов и со-

крашение доли протеобактерий до 30% в образцах мокроты пациентов 60-СФ и 62-СФ в благополучный период приводит к смещению образцов вверх по оси PCo2 19%.

В то же время образцы лаважа пазух носа со сложным сочетанием нескольких протеобактерий выстроились вдоль оси PCo1 31%: 22P3, 22P8, 19P20, а образцы мокроты с комбинацией протеобактерий сместились по оси PCo2 19%: 19P21 и 22P7.

При сравнении микробиомов в подгруппах по ОФВ1 было получено достоверное отличие подгруппы 1 с ОФВ1 70–115% от подгруппы 3 с ОФВ1 < 40% (Bray–Curtis $p = 0,00899$).

Сравнение подгрупп по классам мутаций показало, что достоверные отличия наблюдаются между подгруппами Class II/Class I и Class V/Class I (Bray–Curtis $p = 0,02857$), а также между Class II/Class II и Class V/Class I (Euclidean $p = 0,02573$). Эти данные подчеркивают вклад мягких мутаций (Class V) даже в гетерозиготном состоянии в сочетании с мутацией I класса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Персонализированная медицина, учитывающая влияние генетических особенностей и окружающей среды на состояние здоровья человека [30], не может не принимать во внимание еще один «весомый» комплекс генов – микробиом. Поскольку муковисцидоз – заболевание, затра-

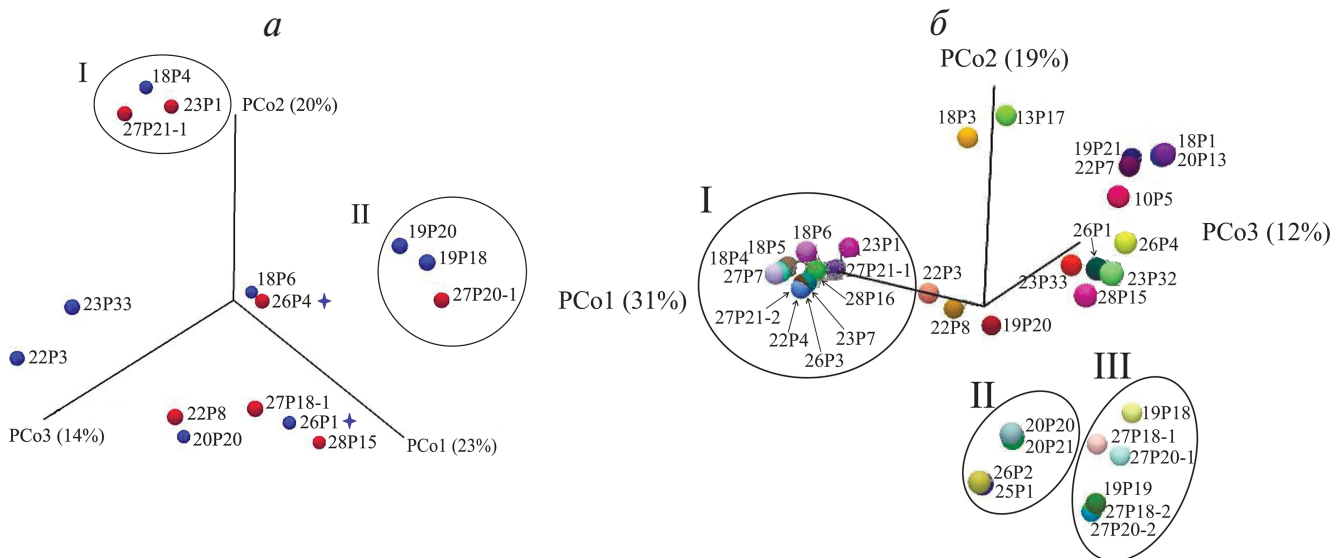


Рис. 4. Результаты PCoA микробного разнообразия образцов взрослых пациентов с муковисцидозом. а – Образцы лаважа верхнечелюстных пазух (13 образцов) и назофарингеальных смывов (2 образца). Красные круги – образцы пациентов с полипами, синие круги – образцы пациентов без полипов. Подгруппа I – образцы с *Burkholderia*, подгруппа II – образцы с *Pseudomonas*. Звездочкой отмечены образцы назофарингеальных смывов; б – все образцы от взрослых пациентов. Подгруппа I – образцы с *Burkholderia*, подгруппа II – образцы с *Achromobacter*, подгруппа III – образцы с *Pseudomonas*

гивающее многие органы и ткани, системный подход к его лечению сложился и в детских, и во взрослых Центрах муковисцидоза. Один из компонентов этого подхода – микробиологическая диагностика. Обоснованный забор образцов, выполненный под наблюдением пульмонологов и отоларингологов, пролонгированное наблюдение, учитывающее применяемую антибиотико- и физиотерапию, питание, географию перемещений пациента и др. факторы, помогают в трактовке изменений микробиома дыхательных путей пациента, что обеспечивает своевременную корректировку терапии и стабилизацию состояния больного.

Включение в наблюдение верхних дыхательных путей способствовало выявлению еще одного резервуара инфекции, а также содействовало обоснованию и активному внедрению ингаляционной терапии. Морфологические изменения в носовой полости – полипы, снижающие в т.ч. эффективность ингаляций, оказались в поле зрения отоларингологов и микробиологов.

По данным Pletcher et al., полипы носа и пазух носа выявляют более чем у 40% детей с МВ [18]. Полипотомия в детском возрасте приводит к улучшению синоназального кровотока, что опосредованно улучшает качество жизни пациента, но не гарантирует от повторного появления полипов. Пациенту 72-СФ, включенному в наше исследование, полипотомию проводили трижды.

Исследование микробного состава смывов с полипов, удаленных при операции, показало, что уже в возрасте семи лет пазухи пациента с МВ инфицированы *P. aeruginosa*. В нашей небольшой выборке образцов детей этот патогенный микроорганизм встречался чаще всего. Настораживает также выявление грибов *Auriculariopsis ampla* в образцах близнецов. Это базидиомицеты семейства Schizophyllaceae. Представитель другого рода этого семейства, *Schizophyllum commune*, известен как возбудитель инфекций человека с 1950 г. В большинстве случаев *S. commune* поражал органы дыхания: в 63% регистрировали бронхолегочное заболевание, в 31% – синусит [31].

Следует отметить, что у близнецов были выявлены индивидуальные отличия в микробиомах дыхательных путей. Наблюдение за нижними дыхательными путями пациентов в течение трех лет позволило детектировать эти отличия еще до появления в микробиоме *P. aeruginosa*, тогда маркером микробиома одного из близнецов был *H. influenzae*, обнаруженный теперь в пазухах. В последних образцах трахеальных аспиратов при сходстве большинства идентифицированных

микроорганизмов преобладающие флавобактерии отличались: у 4-СНР выявлен *Capnocytophaga* spp., а у 5-СНР – *Chryseobacterium* spp.

В группе взрослых пациентов полипы отмечены у 40% больных. Сопоставление филогенетического разнообразия микробиомов пазух носа двух групп не выявило отличий между ними. Полипо- и полисинусотомия не оказала краткосрочного влияния на состав микробиома пазух носа двух прооперированных пациентов, возможно, длительная антибиотикотерапия при соблюдении пациентом рекомендаций врача будет более эффективно воздействовать на микробы пазух носа. В настоящее время мы можем констатировать, что нарушение мукоцилиарного клиренса является определяющим в развитии инфекций пазух носа.

Заметим, что у пациентов с хроническим риносинуситом, но без диагноза МВ, Biswas et al. не выявили отличий между группами с полипами и без полипов ни по филогенетическому разнообразию микробиомов, ни по маркерам воспаления [32].

Протеобактерии, как наиболее опасные патогенные микроорганизмы, у 13 из 15 взрослых пациентов были обнаружены в двух отделах дыхательных путей и совпали по генотипу. У десяти пациентов протеобактерии в пазухах носа составили 70–100% микробиома. У троих пациентов такое изобилие протеобактерий в пазухах носа отмечено даже в период сравнительного благополучия в микробиоме легких. В нашей выборке были выявлены *Burkholderia*, *Pseudomonas* и *Achromobacter*, их комбинации, а также *Stenotrophomonas* и *E. coli* в сочетании с *Pseudomonas*. В работе Biswas et al. снижение биоразнообразия микробиома пазух отмечали в образцах с такими протеобактериями, как *Pseudomonas*, *Haemophilus* и *Achromobacter* [32].

Сопоставляя микробиомы пазух носа и легких, отметим, что у восьми из 14 взрослых пациентов мы наблюдали существенно перекрывающиеся по составу микробиомы. Однако у шести пациентов в пазухах носа были выявлены отдельные микроорганизмы, отсутствующие в легких, например, *E. coli* у пациента 72-СФ. По мнению одних исследователей, Lucas et al., наличие патогенной бактерии в пазухах носа не является предиктором появления ее в легких [33]; по мнению других, Fothergill et al., в пазухах носа *Pseudomonas* приобретает адаптивные признаки, которые обеспечивают эффективную колонизацию нижних дыхательных путей [34].

Таким образом, дальнейшая колонизация легких микроорганизмами из пазух носа является лишь вопросом времени, однако правильно

выбранная стратегия лечения может стать сдерживающим фактором.

В настоящее время с появлением таргетных препаратов, позволяющих частично восстановить функцию хлорного канала, стратегию лечения определяет мутация в гене *CFTR*. В нашем исследовании показана корреляция между классом мутации и разнообразием микробного сообщества отделов респираторного тракта. Мягкая мутация (Class V) даже в сочетании с мутацией I класса улучшала состояние микробиома. Самые необычные микробиомы мы наблюдали у пациента 67-CF с мутациями [Δ]F508/P205S (Class II/Class V). В легких у этого пациента были обнаружены Actinobacteria (*Rothia* – 29%), Firmicutes (*Lactobacillus* – 6%, *Lactococcus* – 2%, *Streptococcus* – 37%), Proteobacteria (*Pseudomonas* – 1%, Xanthomonadaceae – 10, *Stenotrophomonas* – 12%), в то время как в пазухах носа выявлены Proteobacteria (*Pseudomonas* – 2%, Xanthomonadaceae – 47%, *Stenotrophomonas* – 51%).

Таким образом, наши данные поддерживают концепцию микробной транслокации в дыхательных путях у пациентов с МВ, однако отвергают роль полипов в формировании состава и разнообразия микробных сообществ респираторного тракта. По всей видимости, определяющую роль играют индивидуальное состояние слизистого слоя и мукоцилиарного клиренса, а также анатомические особенности пазух носа пациентов. Отсутствие патогенных микроорганизмов в одном из сайтов респираторного тракта при их наличии в другом сайте, по всей видимости, можно считать временным

явлением, связанным с антибиотикорезистентностью патогена и примененной стратегией лечения.

Проведенное исследование показало необходимость контроля микробиома пазух носа пациентов наряду с микробиомом легких, большую информативность молекулярно-генетических методов исследования по сравнению с культуральными. Подробный пролонгированный анализ микробиомов, в т.ч. их минорных компонентов, приблизит нас к пониманию триггеров развития инфекции.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 056-00108-18-00 на 2018 г. и на плановый период 2019 и 2020 гг. и Государственного задания № 056-00078-19-00 на 2019 г. и на плановый период 2020 и 2021 гг. для НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.

Конфликт интересов. Авторы статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов в научной и финансовой сферах.

Соблюдение этических норм. Информированные согласия на исследование образцов были получены врачами от взрослых больных МВ, пациентов старше 15 лет, а также от родителей и опекунов несовершеннолетних пациентов младше 15 лет. Цикл исследований биологических образцов пациентов, больных МВ и врожденным пороком развития легких, был одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (протокол № 1 от 17.05.2012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Woese, C.R. (2004) A new biology for a new century, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 173–186, doi: 10.1128/MMBR.68.2.173-186.2004.
2. Stackebrandt, E., and Woese, C.R. (1984) The phylogeny of prokaryotes, *Microbiol. Sci.*, **1**, 117–122.
3. Land, M., Hauser, L., Jun, S.R., Nookaew, I., Leuze, M.R., Ahn, T.H., Karpinets, T., Lund, O., Kora, G., Wassenaar, T., Poudel, S., and Ussery, D.W. (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing, *Funct. Integr. Genomics*, **15**, 141–161, doi: 10.1007/s10142-015-0433-4.
4. Olsen, G.J., Larsen, N., and Woese, C.R. (1991) The ribosomal RNA database project, *Nucleic Acids Res.*, **19 Suppl.**, 2017–2021, doi: 10.1093/nar/19.suppl.2017.
5. NIH Human Microbiome Project (URL: <https://hmpdacc.org/>).
6. Proctor, L.M. (2011) The Human Microbiome Project in 2011 and beyond, *Cell Host Microbe*, **10**, 287–291, doi: 10.1016/j.chom.2011.10.001.
7. Nichols, D.P., and Chmiel, J.F. (2015) Inflammation and its genesis in cystic fibrosis, *Pediatr. Pulmonol.*, **50 (Suppl. 40)**, S39–S56, doi: 10.1002/ppul.23242.
8. Salsgiver, E.L., Fink, A.K., Knapp, E.A., LiPuma, J.J., Olivier, K.N., Marshall, B.C., and Saiman, L. (2016) Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis, *Chest*, **149**, 390–400, doi: 10.1378/chest.15-0676.
9. Dickson, R.P., Erb-Downward, J.R., Martinez, F.J., and Huffnagle, G.B. (2016) The microbiome and the respiratory tract, *Annu. Rev. Physiol.*, **78**, 481–504, doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105238.
10. Zakharkina, T., Heinzl, E., Koczulla, R.A., Greulich, T., Rentz, K., Pauling, J.K., Baumbach, J., Herrmann, M., Grunewald, C., Dienemann, H., von Muller, L., and Bals, R. (2013) Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing, *PLoS One*, **8**, e68302, doi: 10.1371/journal.pone.0068302.
11. Воронкова А.Ю., Амелина Е.Л., Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И., Красовский С.А., Старинова Н.И., Капранов Н.И. (2019) В кн. *Регистр больных муковис-*

- цидозом в Российской Федерации. 2017 год (под ред. Воронковой А.Ю.), Медпрактика-М, Москва, 68 с.
12. European Cystic Fibrosis Society Patient Registry. Annual data report (year 2016), version 1.2018 (URL: www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-images/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report2016_06062018.pdf).
 13. Einarsson, G.G., Zhao, J., LiPuma, J.J., Downey, D.G., Tunney, M.M., and Elborn, J.S. (2019) Community analysis and co-occurrence patterns in airway microbial communities during health and disease, *ERJ Open Res.*, **5**, 00128–2017, doi: 10.1183/23120541.00128-2017.
 14. Caverly, L.J., and LiPuma, J.J. (2018) Cystic fibrosis respiratory microbiota: unraveling complexity to inform clinical practice, *Exp. Rev. Respir. Med.*, **12**, 857–865, doi: 10.1080/17476348.2018.1513331.
 15. Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P., and Levison, H. (1984) *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem, *J. Pediatr.*, **104**, 206–210, doi: 10.1016/s0022-3476(84)80993-2.
 16. Lobo, L.J., Tulu, Z., Aris, R.M., and Noone, P.G. (2015) Pan-resistant *Achromobacter xylosoxidans* and *Stenotrophomonas maltophilia* infection in cystic fibrosis does not reduce survival after lung transplantation, *Transplantation*, **99**, 2196–2202, doi: 10.1097/TP.0000000000000709.
 17. Voronina, O., Ryzhova, N., Kunda, M., Sharapova, N., Aksenova, E., Amelina, E., Shumkova, G., Simonova, O., Egorov, M., Kondratyeva, E., Chuchalin, A., and Gintsburg, A. (2018) Changes in airways bacterial community with cystic fibrosis patients' age and lung function decline. 41st European Cystic Fibrosis Conference, *J. Cystic Fibrosis*, **17** (Suppl. 3), S78, doi: 10.1016/S1569-1993(18)30366-7.
 18. Pletcher, S.D., Goldberg, A.N., and Cope, E.K. (2019) Loss of microbial niche specificity between the upper and lower airways in patients with cystic fibrosis, *Laryngoscope*, **129**, 544–550, doi: 10.1002/lary.27454.
 19. Рыжова Н.Н., Воронина О.Л., Лосева Э.В., Аксенова Е.И., Кунда М.С., Шарапова Н.Е., Шерман В.Д., Гинцбург А.Л. (2019) Микробиом респираторного тракта детей с муковисцидозом, *Сибирское медицинское обозрение*, **2**, 19–28, doi: 10.20333/2500136-2019-2-19-28.
 20. Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Шарапова Н.Е., Амелина Е.Л., Лазарева А.В., Черневич В.П., Симонова О.И., Жуховицкий В.Г., Жилина С.В., Семькин С.Ю., Поликарпова С.В., Ашерова И.К., Орлов А.В., Кондратенко О.В. (2019) Основные тенденции в изменении разнообразия буркхолдерий, инфицирующих российских больных муковисцидозом, *Сибирское медицинское обозрение*, **2**, 80–88, doi: 10.20333/2500136-2019-2-80-88.
 21. Voronina, O.L., Kunda, M.S., Ryzhova, N.N., Aksenova, E.I., Sharapova, N.E., Semenov, A.N., Amelina, E.L., Chuchalin, A.G., and Gintsburg, A.L. (2018) On Burkholderiales order microorganisms and cystic fibrosis in Russia, *BMC Genomics*, **19** (Suppl. 3), 74, doi: 10.1186/s12864-018-4472-9.
 22. Voronina, O.L., Kunda, M.S., Ryzhova, N.N., Aksenova, E.I., Semenov, A.N., Lasareva, A.V., Amelina, E.L., Chuchalin, A.G., Lunin, V.G., and Gintsburg, A.L. (2015) The variability of the order Burkholderiales representatives in the healthcare units, *BioMed Res. Int.*, 2015, 680210, doi: 10.1155/2015/680210.
 23. Воронина О.Л., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Орлова А.А., Чернуха М.Ю., Лунин В.Г., Амелина Е.Л., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. (2013) Экспресс-диагностика микроорганизмов, поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом, *Клиническая лабораторная диагностика*, **11**, 53–57.
 24. Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., and Dowson, C.G. (2004) Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5644–5649, doi: 10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004.
 25. Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Овчинников Р.С., Федосова Н.Ф., Амелина Е.Л., Лунин В.Г., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. (2015) Разработка подходов к идентификации возбудителей микозов легких у больных муковисцидозом непосредственно в клинических образцах из респираторного тракта, *Лабораторная служба*, **4**, 11–17.
 26. Chen, J., Bittinger, K., Charlson, E.S., Hoffmann, C., Lewis, J., Wu, G.D., Collman, R.G., Bushman, F.D., and Li, H. (2012) Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances, *Bioinformatics*, **28**, 2106–2113, doi: 10.1093/bioinformatics/bts342.
 27. Консенсус по клиническим эффектам генетических вариантов МГНЦ, Leiden Open Variation Database, v.3.0 (URL: <http://seqdb.med-gen.ru/>).
 28. Clustering and classification methods for biologists. Manchester Metropolitan University (URL: <http://www.angelfire.com/planet/biostats/upload.htm>).
 29. Anderson, M.J. (2001) A new method for non parametric multivariate analysis of variance, *Austral. Ecology*, **26**, 32–46, doi: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.
 30. Ginsburg, G.S., and Willard, H.F. (2009) Genomic and personalized medicine: foundations and applications, *Transl. Res.*, **154**, 277–287, doi: 10.1016/j.trsl.2009.09.005.
 31. Chowdhary, A., Randhawa, H.S., Gaur, S.N., Agarwal, K., Kathuria, S., Roy, P., Klaassen, C.H., and Meis, J.F. (2013) *Schizophyllum commune* as an emerging fungal pathogen: a review and report of two cases, *Mycoses*, **56**, 1–10, doi: 10.1111/j.1439-0507.2012.02190.x.
 32. Biswas, K., Cavubati, R., Gunaratna, S., Hoggard, M., Waldvogel-Thurlow, S., Hong, J., Chang, K., Wagner Mackenzie, B., Taylor, M.W., and Douglas, R.G. (2019) Comparison of subtyping approaches and the underlying drivers of microbial signatures for chronic rhinosinusitis, *mSphere*, **4**, e00679-18, doi: 10.1128/mSphere.00679-18.
 33. Lucas, S.K., Yang, R., Dunitz, J.M., Boyer, H.C., and Hunter, R.C. (2018) 16S rRNA gene sequencing reveals site-specific signatures of the upper and lower airways of cystic fibrosis patients, *J. Cyst. Fibros.*, **17**, 204–212, doi: 10.1016/j.jcf.2017.08.007.
 34. Fothergill, J.L., Neill, D.R., Loman, N., Winstanley, C., and Kadioglu, A. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* adaptation in the nasopharyngeal reservoir leads to migration and persistence in the lungs, *Nat. Commun.*, **5**, 4780, doi: 10.1038/ncomms5780.

CHARACTERISTICS OF THE AIRWAY MICROBIOME OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS*

O. L. Voronina^{1**,*}, N. N. Ryzhova¹, M. S. Kunda¹, E. V. Loseva¹, E. I. Aksenova¹,
E. L. Amelina², G. L. Shumkova², O. I. Simonova³, and A. L. Gintsburg¹

¹ *Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology,
Ministry of Health of Russia, 123098 Moscow, Russia; E-mail: olv550@gmail.com*

² *Pulmonology Research Institute, Federal Medical-Biological Agency, 115682 Moscow, Russia*

³ *National Medical Research Center for Children's Health, Ministry of Health of Russia, 119296 Moscow, Russia*

Received June 4, 2019

Revised July 29, 2019

Accepted September 10, 2019

Microbiota as an integral component of human body is actively investigated, including by massively parallel sequencing. However, microbiomes of lungs and sinuses have become the object of scientific attention only in the last decade. For patients with cystic fibrosis, monitoring the state of respiratory tract microorganisms is essential for maintaining lung function. Here, we studied the role of sinuses and polyps in the formation of respiratory tract microbiome. We identified Proteobacteria in the sinuses and samples from the lower respiratory tract (even in childhood). In some cases, they were accompanied by potentially dangerous basidiomycetes. The presence of polyps did not affect formation of the sinus microbiome. Proteobacteria are decisive in reducing the biodiversity of lung and sinus microbiomes, which correlated with the worsening of the lung function indicators. Soft mutations in the *CFTR* gene contribute to the formation of safer microbiome even in heterozygotes with class I mutations.

Keywords: microbiome, cystic fibrosis, airway, chronic rhinosinusitis, Proteobacteria