

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОРОФАРИНГЕАЛЬНЫЕ ПАТТЕРНЫ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФЕНОТИПАМИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

DOI: 10.17691/stm2018.10.2.11

УДК 616.24–002.2–008.87

Поступила 27.04.2017 г.

© **М.А. Карнаушкина**, к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии №2<sup>1</sup>;  
**С.В. Федосенко**, д.м.н., ассистент кафедры общей врачебной практики и поликлинической терапии<sup>2</sup>;  
**А.Э. Сазонов**, д.б.н., старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории<sup>2</sup>;  
**В.А. Петров**, младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории<sup>2</sup>;  
**Д.Ю. Овсянников**, д.м.н., зав. кафедрой педиатрии<sup>3</sup>;  
**Л.М. Огородова**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. кафедрой факультетской педиатрии  
с курсом детских болезней лечебного факультета<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова  
(Сеченовский Университет), Москва, 119991, ул. Трубецкая, 8/2;

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050, Московский тракт, 2;

<sup>3</sup>Российский университет дружбы народов, Москва, 117198, ул. Миклухо-Маклая, 6

Персистирующее бронхиальное воспаление при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) является причиной развития вентиляционных нарушений и ассоциированной с ними контаминации условно-патогенными микроорганизмами, которую рассматривают с позиции риска ее трансформации в инфекционный процесс, т.е. в качестве потенциального источника развития обострений и прогрессирующего течения заболевания.

**Цель исследования** — оценить зависимость вариабельности состава орофарингеальной микробиоты у пациентов от клинико-функциональных особенностей течения ХОБЛ, ассоциированных с прогнозом заболевания.

**Материалы и методы.** В исследование включены 64 больных ХОБЛ, для которых предусмотрено 2 визита, включающих сбор анамнестических данных и выполнение основных процедур исследования: оценки функции внешнего дыхания, данных 6-минутного шагового теста, степени одышки по опроснику Medical Research Council scale; проведения бодиплетизмографии; исследования диффузионной способности легких; компьютерной томографии органов грудной клетки. Второй визит проводился через 12 мес после первого для оценки динамики заболевания. Она считалась отрицательной, если при повторном обследовании пациент был отнесен к группе ХОБЛ с более тяжелым течением. Образцы орофарингеальных мазков всех больных подвергнуты секвенированию по последовательностям гена 16S рРНК, V3–V4 вариабельным регионам.

**Результаты.** Установлено, что вариабельность бактериального состава микробиологических орофарингеальных паттернов у больных ХОБЛ ассоциирована с источником микроаспирации. Кроме того, вариабельность орофарингеальной микробиоты связана с тяжестью и прогнозом течения заболевания, а также с фенотипической принадлежностью пациента с ХОБЛ. На основании данных, полученных методом секвенирования по последовательностям гена 16S рРНК, уточнены состав и роль орофарингеальной микробиоты в определении характера и прогноза течения ХОБЛ.

**Заключение.** Представленные клинико-функциональные характеристики больных ХОБЛ, ассоциированные с особенностями качественного и количественного состава орофарингеальной микробиоты, позволяют констатировать, что микроаспирация из определенного источника не только влияет на особенности состава орофарингеальной микробиоты у конкретного пациента с ХОБЛ, но и имеет важное прогностическое значение.

**Ключевые слова:** ХОБЛ; орофарингеальная микробиота; секвенирование; фенотипы ХОБЛ; степень тяжести.

**Как цитировать:** Karnaushkina M.A., Fedosenko S.V., Sazonov A.E., Petrov V.A., Ovsyannikov D.Yu., Ogorodova L.M. Microbiological oropharyngeal patterns in patients with different phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(2): 101–109, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.11>

**Для контактов:** Карнаушкина Мария Александровна, e-mail: kar3745@yandex.ru

## Microbiological Oropharyngeal Patterns in Patients with Different Phenotypes of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

**M.A. Karnaushkina**, MD, PhD, Associate Professor, Department of Hospital Therapy No.2<sup>1</sup>;  
**S.V. Fedosenko**, MD, Assistant, Department of General Practice and Polyclinic Therapy<sup>2</sup>;  
**A.E. Sazonov**, PhD, Senior Researcher, Central Research Laboratory<sup>2</sup>;  
**V.A. Petrov**, Junior Researcher, Central Research Laboratory<sup>2</sup>;  
**D.Yu. Ovsyannikov**, MD, DSc, Head of the Department of Pediatrics<sup>3</sup>;  
**L.M. Ogorodova**, MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Pediatrics with the Course of Childhood Diseases, Faculty of Medicine<sup>2</sup>

<sup>1</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia;

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, 2 Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia;

<sup>3</sup>Peoples' Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117198, Russia

Persistent bronchial inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is considered the cause of ventilation disorders and related contamination with conditionally pathogenic microorganisms; the latter can proceed and transform into a full infection, which can aggravate and exacerbate COPD.

**The aim of the study** was to evaluate the relations between the oropharyngeal microbiota in patients with COPD and the clinical, functional, and prognostic parameters of the disease.

**Materials and Methods.** 64 patients with COPD were included in the study; the participants were scheduled to visit our clinic on two occasions. In the first visit, their medical history was studied in detail and the major examination procedures were conducted. Those included an assessment of the respiratory function, the 6-minute walk test, the degree of dyspnea by the Medical Research Council scale, body plethysmography, the diffusion capacity of the lungs, and a chest CT scan. The second visit took place 12 months after the first one to assess the changes in the course of the disease. The result was considered negative if, in the second examination, the patient's condition was found more severe. Oropharyngeal samples of all patients were sequenced to identify the V3–V4 variable sites of the 16S rRNA gene.

**Results.** It is found that the microbiological oropharyngeal patterns in COPD patients depend on the source of micro-aspiration. In addition, the changes in the oropharyngeal microbiota correlate with the severity and prognosis of the disease, as well as the patient phenotype. Based on the data obtained by sequencing parts of the 16S rRNA gene, the role of oropharyngeal microbiota in determining the course and prognosis of COPD has been elucidated.

**Conclusion.** The presented clinical and functional characteristics associated with oropharyngeal microbiota indicate that micro-aspirations from other body compartments not only affect the composition of oropharyngeal microbiota in patients with COPD but also have an important prognostic significance.

**Key words:** COPD; oropharyngeal microbiota; sequencing; COPD phenotypes; severity.

### Введение

Развитие вентиляционных нарушений при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) проявляется прогрессирующим снижением скорости воздушного потока, ассоциированным с аномальным воспалительным ответом легких на воздействие вредных частиц [1, 2], в том числе микроорганизмов [1]. В то же время хроническое бронхолегочное воспаление и ограничение скорости воздушного потока создают условия для контаминации дыхательных путей условно-патогенной и патогенной флорой и изменения состава респираторной микробиоты [1, 3]. В настоящее время появились публикации, авторы которых рассматривают бактериальную контаминацию бронхиального дерева при ХОБЛ с позиции риска ее трансформации в инфекционный процесс, т.е. в качестве фактора риска

развития обострений и прогрессирования заболевания [3, 4]. Однако роль в этом процессе особенностей состава микробиотических сообществ респираторного тракта, ассоциированных с фенотипом ХОБЛ, в настоящий момент остается дискуссионной.

Так, D.C. Chambers с соавт. [5] продемонстрировали, что состав микробиоты респираторного тракта у пациентов с ХОБЛ преимущественно тяжелого течения значимо отличается от бактериального пейзажа дыхательных путей здоровых лиц за счет снижения уровня *Bacteroides* и повышения представленности *Firmicutes* и *Proteobacteria*. Аналогичные результаты получили в ходе своих исследований E.S. Charlson с соавт. [6]. Высказываются предположения, что аномальный состав микробиоты может формироваться начиная с перинатального периода. E. Puscinska и соавт. [7] проанализировали особенности состава

микробиоты респираторного тракта новорожденного, изменение его в зависимости от характера вскармливания ребенка, применения матерью антибиотиков, предположив, что такое исследование прольет свет на причины формирования хронической легочной патологии. Однако ни одно из опубликованных исследований не предлагает анализ состава микробиоты респираторного тракта с учетом характера прогрессирования и клинико-функциональных особенностей течения заболевания [8–11]. Это связано прежде всего с тем, что, во-первых, ХОБЛ является клинически гетерогенным заболеванием, во-вторых, определение состава микробиоты с применением классических микробиологических методов исследований не дает полноценной картины о ее составе.

В своей работе мы использовали фенотипическую классификацию ХОБЛ, основанную на клинико-функциональных различиях между пациентами. В сравнении с изолированным определением объема форсированного выдоха за 1 с (ОФВ1) она лучше отражает тяжесть и прогноз течения болезни. Состав микробиоты в ходе исследования определяли с использованием современных методов молекулярно-генетической идентификации микроорганизмов [1,4], что существенно изменило объем наших знаний об орофарингеальном микробиоме. Полученные результаты дали возможность разработать прогностическую модель тяжести течения и прогрессирования ХОБЛ в зависимости от таксономического состава орофарингеальной микробиоты.

**Цель исследования** — оценить зависимость вариабельности состава орофарингеальной микробиоты у пациентов от клинико-функциональных особенностей течения хронической обструктивной болезни легких, ассоциированных с прогнозом заболевания.

## Материалы и методы

Выполнено проспективное неинтервенционное исследование, в которое включены 64 пациента с ХОБЛ. Средний возраст составил 57 (50–63) лет.

Все больные характеризовались наличием подтвержденного согласно критериям GOLD 2015 диагноза ХОБЛ [1, 2], установленного не менее чем за 12 мес перед включением в исследование, имели индекс курения более 10 пачка/лет. На протяжении 4 нед, предшествующих включению в исследование, им не назначалась антибактериальная терапия.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013) и одобрено локальным этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (протокол №1927 от 28.03.2011 г.). От каждого пациента получено информированное согласие.

Исследование включало два визита пациентов. Во время первого визита всем больным проводили клиническое обследование со сбором анамнеза (в дальнейшем будем называть их группой расширенного

обследования). Толерантность к физической нагрузке определяли при помощи 6-минутного шагового теста. Степень одышки оценивали по опроснику MRC (Medical Research Council scale) в баллах, проводили исследование функции внешнего дыхания с бронхолитической пробой и диффузионной способности легких (бодиплетизмографию). Исследование выполняли на оборудовании MasterScreen Body (Erich Jaeger, Германия). Полученные данные сопоставляли с должными величинами, рассчитанными по общепринятым формулам, рекомендованным Европейским респираторным и Американским торакальным обществами. Всем пациентам также проводили компьютерную томографию органов грудной клетки (КТ ОГК) на спиральном компьютерном томографе Somatom Sensation 40 (Siemens, Германия). Для денситометрической оценки легочной ткани и структуры бронхов использовали программу Pulmo CT (Siemens, Германия). У всех больных во время первого визита взяты орофарингеальные мазки.

На основании клинико-функциональных показателей, полученных при обследовании, пациенты разделены на группы в соответствии с тремя фенотипами заболевания: «хронический бронхит» (n=30), «эмфизема» (n=14) и «смешанный» фенотип (n=20). В основу стратификации положена классификация эмфизематозного и бронхитического фенотипов Burrows (1966) и Dornhorst (1955) в нашей модификации.

К фенотипу «хронический бронхит» отнесены пациенты, у которых вне обострения ведущим клиническим симптомом являлся кашель со слизисто-гнойной мокротой, при аускультации выслушивалось жесткое дыхание, разнотембровые хрипы, при проведении КТ ОГК преобладали признаки бронхита, показатель диффузионной способности легких имел нормальные значения.

К фенотипу «эмфизема» отнесены пациенты, у которых вне обострения ведущим клиническим симптомом являлась одышка, кашель носил незначительный малопродуктивный характер, при аускультации выслушивалось ослабленное везикулярное дыхание с единичными свистящими хрипами, при КТ ОГК выявлялись признаки эмфиземы, обязательно была снижена диффузионная способность легких.

К «смешанному» фенотипу отнесены пациенты, у которых вне обострения ХОБЛ не выявлялось преобладания клинико-функциональных показателей бронхита или эмфиземы.

Во время второго визита, состоявшегося через 12 мес после первого, всем больным проводили клинико-функциональное обследование с оценкой частоты обострений ХОБЛ, определяли толерантность к физической нагрузке, оценивали степень одышки по шкале MRC, исследовали функцию внешнего дыхания с бронхолитической пробой. Была выполнена комплексная оценка динамики течения ХОБЛ за 12 мес наблюдения, учитывающая тяжесть симптомов, постбронходилатационное значение ОФВ1 и риск развития

обострений (GOLD 2015). Динамика заболевания считалась отрицательной, если при повторном обследовании пациент был отнесен к группе ХОБЛ с более тяжелым течением. Взятие орофарингеальных образцов во время второго визита не проводилось.

Для статистической обработки данных анамнеза и клиничко-функциональных показателей использован пакет программ Statistica 10.0. При сравнении частот качественных признаков применялся критерий  $\chi^2$ . Для оценки различия средних в попарно не связанных выборках использован U-критерий Манна–Уитни. Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) величин, количественные — с учетом вида распределения данных: при распределении, отличном от нормального, — в виде Me [Q25; Q75]; при нормальном распределении — в виде  $M \pm SD$ , где M — среднее арифметическое, SD — стандартное отклонение. Проверку нормальности распределений полученных данных проводили по критерию  $\chi^2$ . Статистически значимой считали разницу значений при  $p < 0,05$ . При выполнении корреляционного анализа использован коэффициент Спирмена. Силу корреляционной связи оценивали следующим образом: сильная — от  $\pm 0,7$  до  $\pm 1$ ; средняя — от  $\pm 0,3$  до  $\pm 0,699$ ; слабая — от 0 до  $\pm 0,299$ .

Образцы орофарингеальных мазков всех больных подвергали секвенированию по последовательностям гена 16S рПНК и V3–V4 варибельным регионам согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, рекомендованному фирмой Illumina (США) для секвенатора MiSeq. Таксономическую классификацию проводили по базе последовательностей гена 16S рПНК Greengenes v. 13.5 с помощью байесовского классификатора и программного комплекса QIIME (Quantitative insights into microbial ecology). Для нахождения таксономических различий между разделенными по фенотипам группами образцов на уровне операционной таксономической единицы (OTU) использовали метод, основанный на линейном регрессионном анализе и скорректированный под метагеномные данные, реализованный с применением пакета metagenomeSeq [12]. Для выявления кластеров микроорганизмов использовали плагин CoNet версии 1.1.beta [13] программного обеспечения Cytoscape. Корреляцию между представленностями отдельных микроорганизмов определяли по методу Спирмена, учитывали корреляционные связи с коэффициентом корреляции 0,05 и более. С целью определения вклада особенностей состава орофарингеальной микробиоты в формирование прогрессирующего течения ХОБЛ разработана прогностическая модель с использованием пакета caret, в которой применили рекурсивное исключение переменных при 10-кратной кросс-валидации.

## Результаты и обсуждение

В ходе исследования проведен сравнительный межгрупповой анализ клиничко-функциональных пара-

метров пациентов с различными фенотипами ХОБЛ. Получены важные с клиничко-функциональной точки зрения данные, свидетельствующие о том, что пациенты со «смешанным» фенотипом ХОБЛ характеризуются наиболее тяжелым течением заболевания. Так, в сравнении с фенотипами «хронический бронхит» и «эмфизема», больные со «смешанным» фенотипом ХОБЛ отличались большим количеством обострений за год, более высоким значением индекса BODE. Показатели ОФВ1 при «смешанном» фенотипе были статистически значимо ниже, чем при двух других фенотипах (см. таблицу).

Пациенты, относящиеся к группе со «смешанным» фенотипом ХОБЛ, получали схемы ингаляционной терапии, рекомендованные больным с тяжелым и крайне тяжелым течением ХОБЛ: длительно действующие антихолинергические препараты + длительно действующие  $\beta_2$ -агонисты + ингаляционные глюкокортикоиды. Количество курсов антибактериальной терапии в течение года у них было значимо выше в сравнении с другими группами.

С целью выявления особенностей состава орофарингеальной микробиоты у пациентов с различными клиничко-функциональными типами течения ХОБЛ был проведен сравнительный анализ состава бактериальных представителей. Установлено, что наиболее представленными родами микроорганизмов (10% и более) в структуре идентифицированного микробиома ротоглотки во всех фенотипах (высокопредставленные таксоны) были роды *Streptococcus*, *Veillonella* и *Prevotella* (рис. 1). Полученные нами результаты согласуются с данными мировых исследований [14–17].

Анализ с использованием пакета metagenomeSeq низкопредставленных таксонов (менее 10% в структуре идентифицированного орофарингеального микробиома) выявил у больных с фенотипом «эмфизема» более высокое содержание бактерий-комменсалов, относящихся к бактериям типа *Firmicutes* (*Acidaminococcus* LogFC 1,865; *Anaerovibrio* LogFC 2,653; *Leuconostoc* LogFC 1,727; *Oceanobacillus* LogFC 1,107; *Phascolarctobacterium* LogFC 2,915; *Tetragenococcus* LogFC 1,513); к бактериям типа *Actinobacteria* (*Micrococcus* LogFC 1,002; *Dermacoccus* LogFC 2,191) и к бактериям типа *Proteobacteria* (*Cardiobacterium* LogFC 1,002; *Novosphingobium* LogFC 1,561) ( $p < 0,001$ ).

Анализ таксономического состава микробиоты низкопредставленных таксонов у больных с фенотипом «хронический бронхит» выявил достоверно более высокое содержание бактерий, относящихся к типам *Fusobacterium*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Bacteroides*, преимущественно за счет более высокого содержания условно-патогенных бактерий, относящихся к родам *Haemophilus* (LogFC 8,662), *Actinomyces* (LogFC 9,813), *Lactobacillus* (LogFC 4,758), *Leptotrichia* (LogFC 10,556), *Porphyromonas* (LogFC 5,896), *Bacillus* (LogFC 3,161),

*Gemella* (LogFC 8,303) ( $p < 0,001$ ). Также у этих пациентов обнаружена высокая обсемененность ротоглотки условно-патогенными бактериями видов *Prevotella melaninogenica* (LogFC 11,738), *Rothia mucilaginosa* (LogFC 9,257) и *Veillonella parvula* (LogFC 10,631) ( $p < 0,001$ ).

Образцы орофарингеальных мазков больных ХОБЛ со «смешанным» фенотипом демонстрировали наибольшую представленность бактерий типов *Firmicutes* и *Bacteroides* ( $p < 0,001$ ) при низком видовом разнообразии микробиоты в сравнении с другими фенотипами.

Для выявления у больных ХОБЛ паттернов респираторной микробиоты, ассоциированных с конкретными клинико-функциональными характеристиками, был выполнен анализ корреляционных связей по методу Спирмена.

При анализе таксономического состава орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ с фенотипом «хронический бронхит» выявлен кластер условно-патогенных бактерий с сильной положительной корреляцией между представленностью микроорганизмов внутри кластера: *Fusobacterium* + *Prevotella* + *Mycoplasma* + *Bulleidia* ( $r = 0,701$ ;  $p < 0,05$ ).

При анализе таксономического состава орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ с фенотипом «эмфизема» получен кластер бактерий орофарингеальной нормобиоты типа *Firmicutes*, а также кластер *Actinobacteria* с условно-патогенными бактериями желудочно-кишечной микробиоты рода *Enterococcus* с сильной положительной корреляцией между представленностью микроорганизмов внутри кластера ( $r > 0,08$ ;  $p < 0,001$  и  $r > 0,08$ ;  $p < 0,05$  соответственно).

При анализе таксономического состава орофарингеальной микробиоты больных ХОБЛ со «смешанным» фенотипом получены два кластера условно-патогенных орофарингеальных бактерий с сильной положительной корреляцией: *Porphyromonas* + *Fusobacterium* + *Prevotella* ( $r = 0,832$ ;  $p < 0,05$ ) и *Streptococcus* + *Rothia* ( $r = 0,761$ ;  $p < 0,05$ ).

Таким образом, у больных ХОБЛ выявлено три микробиологических орофарингеальных паттерна с индивидуальными клинико-функциональными характеристиками. Для пациентов с фенотипом «хронический бронхит» — орофарингеальный микробиологический паттерн с преобладающими родами бактерий — пред-

**Сравнительная характеристика больных группы расширенного обследования с различными фенотипами хронической обструктивной болезни легких (Me [Q1; Q3])**

Параметры	Фенотипы ХОБЛ (n=64)			p <sub>1-2</sub> p <sub>1-3</sub> p <sub>2-3</sub>
	1. «Хронический бронхит» (n=30)	2. «Эмфизема» (n=14)	3. «Смешанный» (n=20)	
Обострения за 12 мес	2,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,6; 2,0]	5,0 [3,8; 5,0]	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> <0,0001
Наличие коморбидных заболеваний, n/%	7,0/23,3	3,0/21,4	16,0/80,0	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> <0,001
«Тройная терапия» (в течение года), n/%	1,0/3,3	1,0/7,1	9,0/45,0	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>2-3</sub> <0,0001
Курсы антибактериальной терапии (в течение года)	2,0 [1,0; 3,0]	1,0 [1,0; 1,8]	3,0 [1,8; 5,0]	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> <0,0001
Индекс BODE, баллы	2,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,8]	5,0 [4,0; 6,0]	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> <0,05
MRC, баллы	2,0 [1,0; 2,0]	2,0 [1,0; 2,8]	3,0 [2,0; 4,0]	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>2-3</sub> =0,015
6-минутный шаговый тест, м	500 [426; 518]	380 [348; 398]	308 [224; 376]	p <sub>1-2</sub> <0,05 p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> <0,0001
ОФВ1 после пробы с бронхолитиком, % от должного	68,5 [59,0; 71,0]	68,0 [58,0; 75,0]	48,0 [45,0; 49,0]	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> <0,05
SpO <sub>2</sub> после 6-минутного шагового теста, %	98,0 [97,0; 99,0]	96,0 [95,0; 99,0]	94,0 [93,0; 95,0]	p <sub>1-2</sub> >0,05 p <sub>1-3</sub> <0,05 p <sub>2-3</sub> <0,05

ставителей условно-патогенной орофарингеальной флоры. Для пациентов с фенотипом «эмфизема» — орофарингеальный микробиологический паттерн с преобладающими родами бактерий — представителей орофарингеальной нормобиоты и кишечной микробиоты (в том числе условно-патогенной). Для пациентов со «смешанным» фенотипом — орофарингеальный микробиологический паттерн, характеризующийся низким видовым разнообразием с преобладанием представителей желудочно-кишечной условно-патогенной микробиоты, относящейся к типу *Firmicutes*, в сочетании с орофарингеальным условно-патогенным кластером бактерий *Porphyromonas* + *Prevotella* + *Fusobacterium*.

Впервые было установлено, что клинико-функциональный фенотип ХОБЛ и соответствующий ему микробиологический паттерн определяют характер и прогноз течения заболевания.

На основании полученных результатов нами разработана прогностическая модель, которая дает возможность оценить вклад особенностей состава

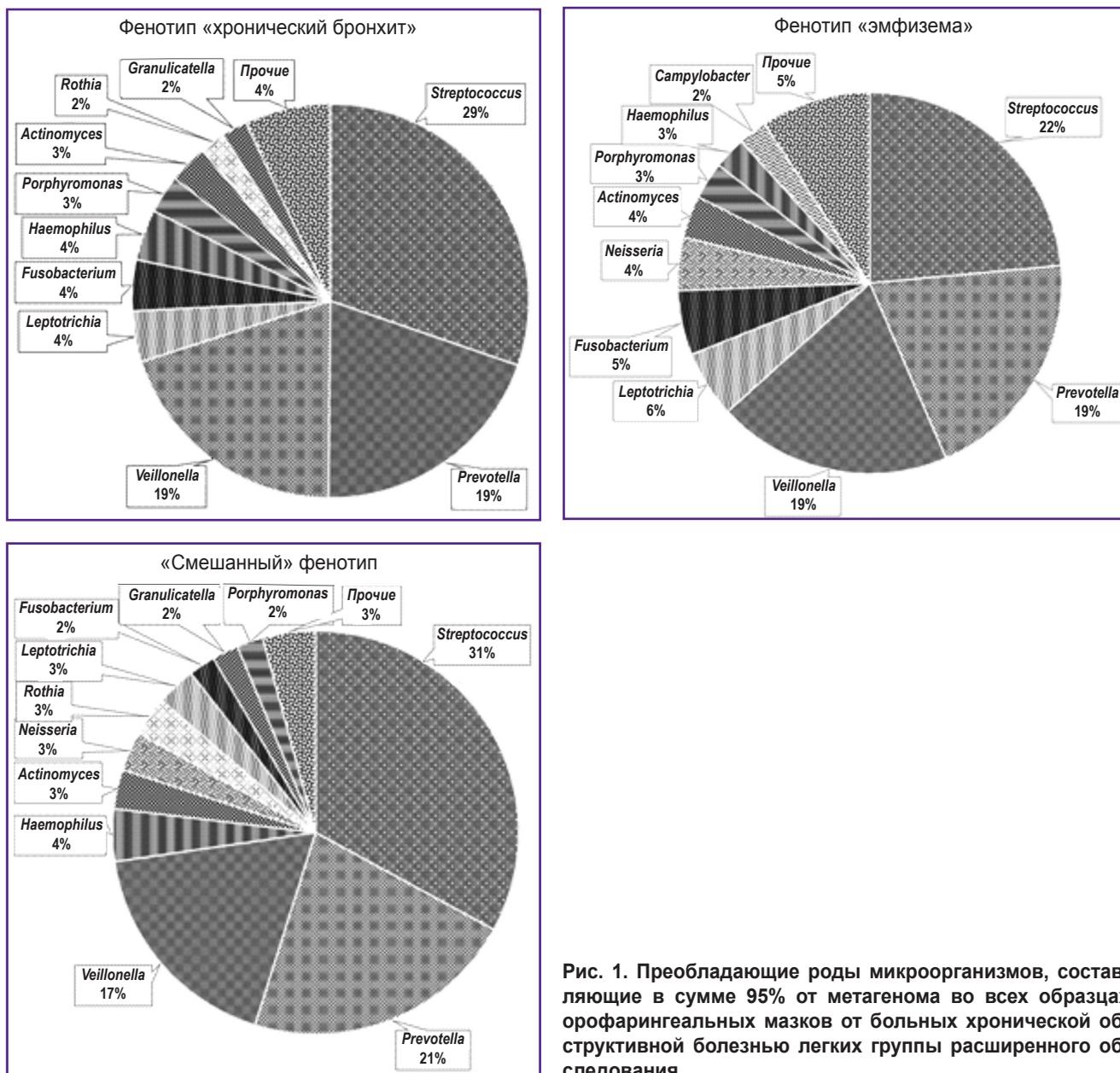


Рис. 1. Преобладающие роды микроорганизмов, составляющие в сумме 95% от метагенома во всех образцах орофарингеальных мазков от больных хронической обструктивной болезнью легких группы расширенного обследования

ва орофарингеальной микробиоты в формировании прогрессирующего течения ХОБЛ. Отбор классифицирующих признаков — семейств и видов микроорганизмов — и их анализ продемонстрировали, что повышение представленности в орофарингеальной микробиоте больных ХОБЛ бактерий семейств *Moraxellaceae*, *Peptococcaceae*, *Eubacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Staphylococcaceae* и *Actinomycetaceae* является прогностически неблагоприятным фактором прогрессирующего течения заболевания. На валидационной выборке созданная модель показала чувствительность 0,67 и специфичность 1, точность прогноза 75% при площади под ROC-кривой в 0,72 (рис. 2).

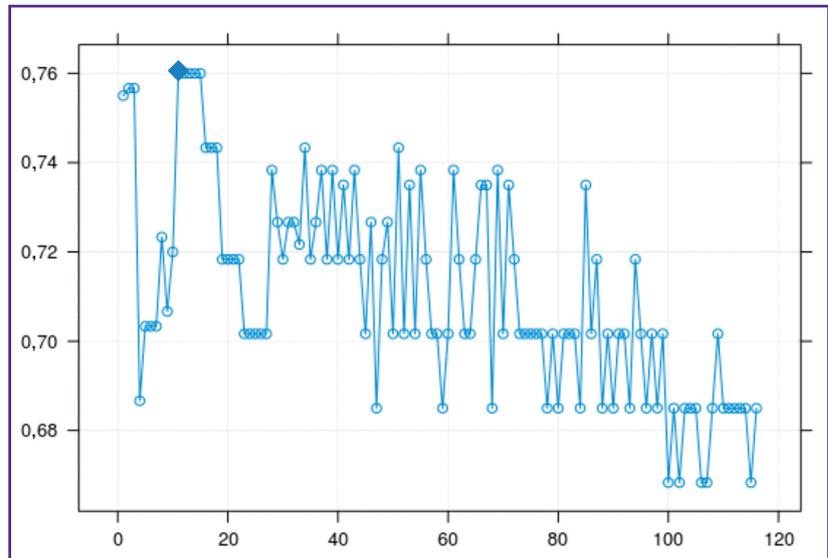
Таким образом, можно утверждать, что определен-

ные изменения состава орофарингеальной микробиоты являются значимым фактором прогрессирования ХОБЛ.

Для интерпретации полученных результатов исследования мы предположили, что бактериальный состав орофарингеальных микробиологических паттернов зависит от источника микроаспирации (желудочно-кишечный тракт, носоглотка, полость рта). В многочисленных исследованиях [15, 18, 19] продемонстрирована роль в риске развития пневмоний и обострений хронических бронхолегочных заболеваний условно-патогенных орофарингеальных бактерий, которые поступают в нижние дыхательные пути посредством микроаспирации очагов хронической инфекции, локализованных в верхних дыхатель-

**Рис. 2. Корреляционная сеть представленности микроорганизмов в орофарингеальной микробиоте больных с различным прогнозом течения хронической обструктивной болезни легких**

В выборку включались переменные с наличием корреляции по Спирмену 0,05 и более при  $p < 0,05$  после применения поправки Беньямини–Хохберга на множественные сравнения. Синим ромбом на графике отмечена оптимальная подвыборка переменных, позволяющая классифицировать пациентов с точностью 76%



ных путях. По данным нашего исследования, 40% пациентов с фенотипом «хронический бронхит» и 70% — со «смешанным» фенотипом страдали тонзиллитом, синуситом или пародонтозом. При данных фенотипах выявлено формирование кластеров орофарингеальных условно-патогенных бактерий: *Fusobacterium* + *Prevotella* + *Mycoplasma* + *Bulleidia*, *Porphyromonas* + *Prevotella* + *Fusobacterium* и *Porphyromonas* + *Prevotella* + *Streptococcus minor*. Это подтверждает возможную роль условно-патогенной орофарингеальной микрофлоры в трансформации бактериального состава микробиома дыхательных путей у пациентов со «смешанным» фенотипом и фенотипом «хронический бронхит» путем микроаспирации.

В ходе исследования также продемонстрировано высокое содержание бактерий — представителей желудочно-кишечной микробиоты в орофарингеальных мазках от пациентов с фенотипом «эмфизема» с выделением микробиологического кластера бактерий орофарингеальной нормофлоры *muva Firmicutes* и родов *Actinobacteria* + *Enterococcus* (условно-патогенная желудочно-кишечная микробиота). Область ротоглотки больных со «смешанным» фенотипом также характеризовалась контаминацией представителями желудочно-кишечной микробиоты. В опубликованных [20, 21] работах продемонстрировано, что гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ) ассоциирована с хроническими заболеваниями бронхолегочной системы, в том числе с ХОБЛ, способствуя более тяжелому течению заболевания. В ходе проведенного нами исследования ГЭРБ выявлена у 11 пациентов (78,6%) с фенотипом «эмфизема», у 15 (75%) — со «смешанным» фенотипом, и лишь у 6 (20%) — с фенотипом «хронический бронхит». Известно [14–17], что наличие кластера патогенных бактерий родов *Porphyromonas* и *Prevotella*, выявляемых у больных со «смешанным» феноти-

пом, клинически высокозначимо в развитии гнойно-воспалительных процессов, а изменения, вносимые желудочно-кишечной микробиотой в микробный состав дыхательных путей, усиливают повреждающее воздействие «привычной» для пациента условно-патогенной микрофлоры на легочную ткань. Низкое видовое разнообразие микробиоты у этого фенотипа способствует меньшей ее устойчивости к воздействию патогенов [17] и может обуславливать наиболее тяжелое течение ХОБЛ у больных со «смешанным» фенотипом в сравнении с другими.

Представленные клиническо-функциональные характеристики больных ХОБЛ, ассоциированные с особенностями качественного и количественного состава орофарингеальной микробиоты, позволяют констатировать, что микроаспирация из определенного источника не только влияет на состояние орофарингеальной микробиоты у конкретного пациента, но и участвует в формировании фенотипа и прогнозе течения ХОБЛ. В настоящее время сложно определить, что первично в формировании определенного клинико-функционального фенотипа ХОБЛ. Первичными могут стать как фенотипические особенности заболевания человека с учетом установленного вклада ГЭРБ и патологии верхних дыхательных путей, так и особенности состава орофарингеальной микробиоты.

Установленное в ходе проведенной работы низкое видовое разнообразие орофарингеальной микробиоты, характерное для пациентов с ХОБЛ со «смешанным» фенотипом, способствует более тяжелому, прогрессирующему течению заболевания.

## Заключение

Установлено, что каждому фенотипу хронической обструктивной болезни легких, характеризующемуся отдельными клинико-функциональными особенностями

ми, соответствует свой специфический орофарингеальный паттерн, определяющий тяжесть и прогноз заболевания. Вариабельность бактериального состава микробиологических паттернов у больных хронической обструктивной болезнью легких ассоциирована с источником микроаспирации (верхние отделы желудочно-кишечного тракта или носоглотка). Кроме того, вариабельность орофарингеальной микробиоты ассоциирована с тяжестью заболевания, а также с фенотипической принадлежностью пациента с хронической обструктивной болезнью легких, которая определяет характер течения заболевания.

**Финансирование исследования.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (ГК №14.604.21.0075, уникальный идентификатор RFMEFI60414X0075).

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие финансовых и других конфликтных интересов, способных оказать влияние на их работу.

#### Литература/References

1. Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р., Белевский А.С., Лещенко И.В., Мещерякова Н.Н., Овчаренко С.И., Шмелев Е.И. Российское респираторное общество. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких. Пульмонология 2014; 3: 15–36. Chuchalin A.G., Avdeev S.N., Aysanov Z.R., Belevskiy A.S., Leshchenko I.V., Meshcheryakova N.N., Ovcharenko S.I., Shmelev E.I. Russian respiratory society. Federal guidelines on diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Russian Pulmonology* 2014; 3: 15–36, <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-3-15-54>.
2. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. *Global strategy for diagnosis, management, and prevention of COPD*. Updated 2015.
3. Федосенко С.В., Огородова Л.М., Попенко А.С., Петров В.А., Тяхт А.В., Салтыкова И.В., Камалтынова Е.М., Деев И.А., Куликов Е.С., Кириллова Н.А., Говорун В.М., Кострюкова Е.С., Карнаушкина М.А. Качественные и количественные особенности состава орофарингеальной микробиоты больных хронической обструктивной болезнью легких. Лечение и профилактика 2015; 2(14): 92–99. Fedosenko S.V., Ogorodova L.M., Popenko A.S., Petrov V.A., Tyakht A.V., Saltykova I.V., Kamaltynova E.M., Deev I.A., Kulikov E.S., Kirillova N.A., Govorun V.M., Kostryukova E.S., Karnauzhkina M.A. The qualitative and quantitative characteristics of content of oro-pharyngeal microbiota of patients with chronic obstructive disease of lungs. *Lechenie i profilaktika* 2015; 2(14): 92–99.
4. Авдеев С.Н. Клинические симптомы и качество жизни пациентов с хронической обструктивной болезнью легких: субъективно оцениваемые показатели или факторы, определяющие прогноз? Пульмонология 2016; 26(2): 231–237. Avdeev S.N. Symptoms and quality of life in patients

with chronic obstructive pulmonary disease: are there patient-defined outcomes or predictive factors? *Russian Pulmonology* 2016; 26(2): 231–237, <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2016-26-2-231-237>.

5. Chambers D.C., Gellatly S.L., Hugenholtz P., Hansbro P.M. JTD special edition ‘Hot Topics in COPD’ — the microbiome in COPD. *J Thorac Dis* 2014; 6(11): 1525–1531, <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.11.08>.

6. Charlson E.S., Bittinger K., Haas A.R., Fitzgerald A.S., Frank I., Yadav A., Bushman F.D., Collman R.G. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 957–963, <https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0655oc>.

7. Górecka D., Puścińska E. Microbiome of the lung. *Pneumonol Alergol Pol* 2014; 82(6): 481–485, <https://doi.org/10.5603/PiAP.2014.0063>.

8. Park H., Shin J.W., Park S.G., Kim W. Microbial communities in the upper respiratory tract of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2014; 9(10): e109710, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109710>.

9. Molyneaux P.L., Mallia P., Cox M.J., Footitt J., Willis-Owen S.A., Homola D., Trujillo-Torralbo M.B., Elkin S., Kon O.M., Cookson W.O., Moffatt M.F., Johnston S.L. Outgrowth of the bacterial airway microbiome following rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188(10): 1224–1231, <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0341oc>.

10. Patel A.R., Hurst J.R. Extrapulmonary comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease: state of the art. *Expert Rev Respir Med* 2011; 5(5): 647–662, <https://doi.org/10.1586/ers.11.62>.

11. Hurst J.R. Upper airway. 3: Sinonasal involvement in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2010; 65(1): 85–90, <https://doi.org/10.1136/thx.2008.112888>.

12. Paulson J.N., Olson N.D., Wagner J., Talukder H., Pop M., Bravo H.C. *Statistical analysis for sparse high-throughput sequencing*, <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.metagenomeSeq>.

13. Faust K., Sathirapongsasuti J.F., Izard J., Segata N., Gevers D., Raes J., Huttenhower C. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol* 2012; 8(7): e1002606, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002606>.

14. Pragman A.A., Kim H.B., Reilly C.S., Wendt C., Isaacson R.E. The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2012; 7(10): e47305, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047305>.

15. Sze M.A., Dimitriu P.A., Hayashi S., Elliott W.M., McDonough J.E., Gosselink J.V., Cooper J., Sin D.D., Mohn W.W., Hogg J.C. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(10): 1073–1080, <https://doi.org/10.1164/rccm.201111-2075oc>.

16. Sin D., Sze M., Hogg J. Bacterial microbiome of lungs in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2014; 9: 229–238, <https://doi.org/10.2147/copd.s38932>.

17. Huang Y.J., Sethi S., Murphy T., Nariya S., Boushey H.A., Lynch S.V. Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 2014; 52(8): 2813–2823, <https://doi.org/10.1128/jcm.00035-14>.

18. Ghannoum M.A., Jurevic R.J., Mukherjee P.K., Cui F., Sikaroodi M., Naqvi A., Gillevet P.M. Characterization of the

oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* 2010; 6(1): e1000713, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713>.

19. Hsiao W.W., Li K.L., Liu Z., Jones C., Fraser-Liggett C.M., Fouad A.F. Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics* 2012; 13: 345, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-345>.

20. Pei Z., Yang L., Peek R.M., Jr Levine S.M., Pride D.T.,

Blaser M.J. Bacterial biota in reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol* 2005; 11(46): 7277–7283, <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i46.7277>.

21. Sakae T.M., Pizzichini M.M., Teixeira P.J., Silva R.M., Trevisol D.J., Pizzichini E. Exacerbations of COPD and symptoms of gastroesophageal reflux: a systematic review and meta-analysis. *J Bras Pneumol* 2013; 39(3): 259–271, <https://doi.org/10.1590/s1806-37132013000300002>.