

На правах рукописи

ЗОЛЬНИКОВА

Оксана Юрьевна

**МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА И ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ КАК
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗВЕНО БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ**

Внутренние болезни - 14.01.04

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Научный консультант:

Академик РАН, д.м.н., профессор **Ивашкин Владимир Трофимович**.

Официальные оппоненты:

Ненашева Наталья Михайловна – д.м.н., профессор, ФГБОУ ДПО «Российская Медицинская Академия Непрерывного Профессионального Образования» Минздрава России, кафедра аллергологии и иммунологии, заведующая кафедрой;

Курбачева Оксана Михайловна – д.м.н., профессор, ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, отделение бронхиальной астмы, заведующая отделением;

Минушкин Олег Николаевич – д.м.н., профессор, ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации г. Москва, кафедра гастроэнтерологии, заведующий кафедрой;

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России

Защита диссертации состоится «27» октября 2020 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета ДСУ 208.001.11 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул.Трубецкая, д.8, стр. 2 С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте www.sechenov.ru

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Дроздов Владимир Николаевич



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Бронхиальная астма (БА) относится к наиболее часто встречающимся заболеваниям респираторного тракта, сопровождается высокой частотой инвалидизации и смертности пациентов (Чучалин А.Г. 2015, Ненашева Н.М. 2018)

Основные этапы патогенеза БА и механизмы, лежащие в его основе, изучаются в течение длительного периода времени. Было показано, что БА развивается в результате сложных взаимодействий целого ряда генетических и внешних факторов, определяющих его гетерогенность (Дранник Г.Н. 2010, Чучалин А.Г. 2015, Lotvall J. 2011, GINA 2018). Однако, неуклонный рост заболеваемости БА, а также недостаточно эффективная терапия у ряда пациентов диктует необходимость дальнейшего изучения особенностей течения заболевания и факторов его патогенеза (Moore W. 2007, Lotvall J. 2011, GINA 2018). В настоящее время, исследователями во всем мире уделяется большое внимание роли естественной микробиоты человека в возникновении и прогрессировании ряда заболеваний внутренних органов (Gollwitzer E.S. 2014, Kumar M. 2015). Дисбаланс в составе кишечного и респираторного биотопа рассматривается как один из значимых факторов, участвующих и в патогенезе БА. Определено, что снижение нескольких пробиотических видов и потенциальное увеличение патогенных бактерий может лежать в основе восприимчивости, хронизации и прогрессировании заболевания, способствуя сенсibilизации организма, усиливая бронхообструкцию и влияя на результативность лечения (Canì P. 2018, Kumar M. 2015, Parker D. 2016, Segal L.N. 2014). Установлено, что нарушение состава микробиоты кишечника и ее метаболической активности способствует развитию иммунологической интолерантности, с формированием IgE-опосредованного иммунного ответа (Clemente J.C. 2012, Frati F. 2019, Kährström C.T. 2016), развитие которого, в первую очередь связано с взаимодействием бактерий с Toll-подобными рецепторами, дендритными клетками, T - регуляторными лимфоцитами и цитокинами. Все вместе взятое, в конечном итоге приводит к

изменению пула противовоспалительных и провоспалительных цитокинов в пользу последних, в ответ на изменение микробной композиции (Kumar M. 2015, Kuwahara A. 2014). Эта новая область исследований демонстрирует, что различия в микробиоте, могут быть ассоциированы с важными клиническими проявлениями БА (например: частота обострений и чувствительность к кортикостероидам) (Носырева С.Ю 2016, Федосенко С.В. 2014, Durack J. 2016).

Микробиота органов дыхания в настоящее время мало изучена, сопоставление микробного состава кишечника и легких в литературе практически не представлены. Нет достаточных данных о возможном системном характере микробиотических модификаций и их вкладе в формирование клинико-функциональных характеристик БА. Указанный комплекс нерешенных вопросов определил актуальность и необходимость проведенного исследования.

Цель исследования - установить значение микробиоты дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта в патогенезе бронхиальной астмы, разработать критерии диагностики изменений микробиоты и показания для ее коррекции, доказать взаимосвязь микробиоты дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, оценить эффект коррекции состава кишечной микробиоты в составе комплексной терапии на течение бронхиальной астмы.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать состав микробиоты кишечника у пациентов с БА.
2. Изучить связь изменений микробиоты кишечника с основными проявлениями БА.
3. Сопоставить клинический вариант течения БА с особенностями качественных и количественных изменений состава кишечной микробиоты.
4. Определить частоту выявления синдрома избыточного бактериального роста (СИБР) в тонкой кишке у пациентов с БА, в зависимости от фенотипа течения заболевания.
5. Определить связь СИБР с основными патогенетическими механизмами формирования БА.
6. Охарактеризовать состав орофарингеальной микробиоты у больных БА.

7. Изучить связь изменений орофарингеальной микробиоты с основными проявлениями БА.
8. Сопоставить клинический вариант течения БА с особенностями качественных и количественных изменений состава орофарингеальной микробиоты.
9. Сопоставить состав микробиоты орофарингеальной зоны и микробиоты кишечника у пациентов с БА.
10. Выявить профиль биомаркеров (метаболитов микробиоты), характерных для пациентов БА.
11. Оценить влияние назначений антибактериального и пробиотических препаратов в составе комплексного лечения БА на уровень бактериальных метаболитов и частоту обострений в течение года наблюдений.

Научная новизна

Впервые в России изучалась роль нарушений микробиоты и ее метаболической активности у больных БА. Охарактеризован состав микробиоты кишечника и орофарингеальной зоны у пациентов с БА. Определено состояние метаболической активности микробиоты кишечника. Установлена взаимосвязь изменений в составе микрофлоры и ее метаболитов с клинико-функциональными особенностями течения БА, а так же проанализирована роль качественных и количественных нарушений микробиоты в патогенезе БА (уровень аллергического ответа, нарушение функции внешнего дыхания). Проведен сравнительный анализ эффективности назначения в комплексной терапии БА препаратов, влияющих на состав микробиоты (антибактериального препарата и мультиштаммовых пробиотиков). Исследовано их влияния на клинико-лабораторные проявления БА и течение заболевания.

Практическая значимость

Получены новые данные о роли микробных сообществ в развитии БА, что имеет фундаментальное значение и вносит существенный вклад в понимание патогенеза заболевания.

Показана возможность неинвазивной оценки состояния микробиоты, в том числе, с использованием водородного дыхательного теста с лактулозой, с определением метаболической активности микробиоты по синтезу короткоцепочечных жирных кислот и верификации состава микрофлоры с использованием секвенирования бактериальных 16S рРНК.

Сформулированы клинические рекомендации для коррекции выявленных нарушений микробиоты.

Доказано, что назначение препаратов, влияющих на состав микрофлоры, пациентам с atopическим фенотипом БА патогенетически обосновано и существенно повышает эффективность стандартной терапии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Анализ состояния микробиоты у пациентов с БА свидетельствует, что изменение микробиоты служит важным патогенетическим звеном в развитии заболевания. Наблюдаются количественные и качественные различия в составе кишечной микрофлоры у пациентов БА в сравнении со здоровыми добровольцами: увеличение типа *Proteobacteria*, изменения внутри бактериальных типов *Firmicutes* (снижение *Faecalibacterium* и *Anaerostipes*) и *Bacteroidetes* (снижение *Alistipes*).
2. Изменение содержания отдельных бактерий кишечного биотопа (*Anaerostipes*, *Faecalibacterium*, *Bacilli*, *Proteobacteria*) у пациентов с БА, ассоциировано с длительностью заболевания, повышением уровня эозинофилов крови и мокроты, увеличением IgE и снижением функции внешнего дыхания (уменьшение ОФВ₁). При неатопическом фенотипе длительность анамнеза так же взаимосвязана со снижением содержания бактерий рода *Alistipes* и увеличением семейства *Moraxellaceae*.
3. СИБР в тонкой кишке, определяемый водородным дыхательным тестом с лактулозой, у пациентов atopической БА встречается значительно чаще, чем при неатопическом фенотипе заболевания, и служит фактором утяжеляющим течение заболевания.

4. Наличие СИБР в тонкой кишке ассоциировано с основными патогенетическими механизмами заболевания. При atopической астме наличие СИБР связано с более высокими титрами общего IgE и количеством эозинофилов мокроте, выраженным снижением функции внешнего дыхания; при неатопической астме - с изменением функции внешнего дыхания.
5. Клинические проявления нарушений микробиоты кишечника у пациентов БА не специфичны и не связаны с фенотипом заболевания.
6. Снижение метаболической активности кишечной микробиоты у больных БА характеризуется уменьшением содержания количества и изменением спектра короткоцепочечных жирных кислот в кале, изменением значений анаэробного индекса. У большинства обследованных пациентов, выявлен анаэробный спектр короткоцепочечных жирных кислот.
7. Изменение метаболической активности кишечной микробиоты ассоциировано с повышением уровня общего IgE, эозинофилов крови и снижением ОФВ₁, при неатопическом фенотипе прослеживается взаимосвязь с возрастом пациентов.
8. Наблюдаются количественные и качественные различия в составе орофарингеальной микробиоты у пациентов БА в сравнении со здоровыми добровольцами: изменения внутри бактериальных типов *Firmicutes* (снижение класса *Clostridia* за счет *Peptostreptococcaceae* и *Oribacterium*), *Bacteroidetes* (снижение *Flavobacteriaceae* и *Porphyromonadaceae*) и типа *Fusobacteria* (снижение класса *Fusobacteriia*, рода *Fusobacterium*).
9. Снижение содержания отдельных бактерий орофарингеального биотопа, относящихся к типам *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, у пациентов БА связано с длительностью заболевания, повышением уровня эозинофилов крови и мокроты, увеличением IgE и снижением функции внешнего дыхания (уменьшение ОФВ₁).
10. Микробиота кишечного и орофарингеального биотопа пациентов БА не отличается по биоразнообразию представленных видов бактерий от группы здоровых добровольцев.

11. Соотношение типов *Bacteroides/Firmicutes* у пациентов atopической БА, по сравнению со здоровыми добровольцами, увеличивается в кишечном и орофарингеальном биотопе. При неатопической астме соотношение типов *Bacteroides/Firmicutes* снижается в кишечной микробиоте и увеличивается в орофарингеальном биотопе.

12. Включение в схему лечения БА препаратов, способных регулировать состав микробиоты (антибиотик, мультиштаммовые пробиотики), патогенетически обосновано и приводит к уменьшению выраженности основных клинико-лабораторных проявлений заболевания, способствует улучшению метаболической активности микробиоты и снижению частоты госпитализаций.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов, полученных в ходе исследования, определяется большим объемом клинического и лабораторного материала, использованием современных высокотехнологичных методик, позволяющих решить поставленные в исследовании задачи. Выводы и практические рекомендации диссертационной работы логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам исследования.

Апробация результатов исследования

Материалы диссертации доложены на заседании кафедры пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии Первого МГМУ им. И.М.Сеченова 9 января 2020 года, конференциях НСОИМ (2018, 2019, 2020 гг, Москва), Российских гастроэнтерологических неделях (2018, 2019 гг. Москва), на сессиях Нац. Школы Гастроэнтерологии, Гепатологии РГА (2018, 2019 гг, Москва, Казань), XXVIII Нац. конгрессе по болезням органов дыхания (2018г, Москва), Всероссийской конференции “УралГастро” (2019г, Екатеринбург), Сибирской межрегиональной конференции “Патология органов пищеварения. Современные стандарты диагностики и лечения” (2019г, Красноярск). V Невском конгрессе “Реалии 2019 и новые горизонты в гастроэнтерологии и гепатологии”

(2019г, Санкт Петербург), на конференции “Мультидисциплинарный подход в лечении заболеваний пищеварительной и дыхательной систем” (2019г, Казань).

Личное участие автора в получении результатов

Автор принимал непосредственное участие во всех этапах проводимого исследования. Автором проведен обзор отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования, сформулированы цели и задачи работы, обобщены и проанализированы результаты клинического и лабораторно-инструментального обследования пациентов. Самостоятельно проведена статистическая обработка полученных результатов исследования, сделаны научные выводы, изложены практические рекомендации, подготовлены материалы к публикациям.

Внедрение результатов работы в практику

Основные положения диссертационной работы нашли практическое применение в отделении пульмонологии клиники пропедевтики внутренних болезней и используются в учебно-методической работе со студентами и курсантами факультета последипломного образования на кафедре пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии Института клинической медицины имени Н.В.Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует шифру специальности: 14.01.04 – Внутренние болезни – область медицинской науки, изучающая этиологию, патогенез, семиотику, диагностику, прогноз и профилактику заболеваний внутренних органов, а также области исследования, согласно п.п. 1-5.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 25 научных работ, в том числе 20 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из них 7 публикаций также индексируется в базах Scopus, Web of Science, и 5 публикации в международных изданиях, индексируемых в базах Scopus, Web of Science.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 209 страницах машинописного текста. Работа включает: введение, 8 глав (обзор литературы, характеристика пациентов и описание методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводы и практические рекомендации, 4 приложения. Библиографический указатель содержит 259 источников литературы (38 отечественных и 221 зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 42 таблицами, 7 рисунками, 22 диаграммами, 3 схемами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 197 пациентов с установленным диагнозом «бронхиальная астма атопическая (син. аллергическая по МКБ - J45.0) и неатопическая (син. неаллергическая по МКБ - J45.1) форма»; с объемом форсированного выдоха за 1 сек (ОФВ₁) менее 80% от должного и выявленной положительной пробой с бронходилататором (прирост ОФВ₁ более чем на 15% от исходных показателей); с неконтролируемой БА (клинически, согласно рекомендациям GINA); отказавшиеся от курения в течение последних 3 лет, и не принимавшие 3 предыдущих месяца антибиотики, пробиотики, пребиотики, сахароснижающие препараты, ингибиторы протонной помпы, прокинетики, слабительные средства. Все пациенты подписали информированное согласие и проходили лечение в отделении пульмонологии клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Работа утверждена локальным этическим комитетом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (№ 05-18 от 16.05.2018).

Среди обследованных больных было 105 (53%) женщин и 92 (47%) мужчин. В группе больных атопической БА (АБА) обследовано 53 (48%) мужчины и 57 (52%) женщин, средний возраст составил 42,36 [33,17; 51,82] года. Длительность анамнеза заболевания 19,86 [15,96; 23,32] лет. В группе пациентов с неатопической астмой (НБА) было 39 (45%) мужчин и 48 (55%) женщин, средний

возраст 40,39 [31,18; 52,03] лет, длительность анамнеза 16,17 [12,94; 21,41] лет. Различия по данным показателям между группами не достигали статистически значимого уровня ($p > 0,05$).

Для лечения БА (на амбулаторном этапе) пациенты получали стандартную базисную терапию, включающую комбинированные препараты, содержащие β_2 -адреномиметики длительного действия и ингаляционные кортикостероиды: Salmeterol + Fluticasone (Серетид Мультидиск), Budesonide + Formoterol (Симбикорт турбухалер, Форадил комби), Beclometasone + Formoterol (Фостер). В условиях стационара проводилась терапия системными стероидами в течение (в среднем) 7-9 дней: Десаметазон 4 - 8 мг (Преднизолон 30-60 мг). Значимых различий между группами по проводимой терапии не получено ($p > 0,05$).

На двух этапах исследования, к стандартной терапии БА добавлялось лечение, направленное на модуляцию состава микрофлоры. На этапе исследования патогенетического и клинического значения СИБР пациенты были рандомизированы: - с учетом фенотипа БА и наличия СИБР; - с учетом схемы лечения СИБР: получавшие рифаксимин в дозе 600 мг в сутки, на протяжении 7 дней или же рифаксимин в той же дозе, с последующим приемом пробиотика Флорасан Д, содержащего не менее 1×10^9 КОЕ *B.bifidum* Ac 2773D, *B.longum* Ac 2775D, *B.infantis* Ac 2774D, *L.rhamnosus* B3170D, по 1 капсуле 3 раза в день 1 месяц. На этапе исследования метаболической активности кишечной микробиоты у пациентов с БА для определения эффективности воздействия на кишечную микробиоту пациенты с atopической БА рандомизированы: с учетом наличия и схемы лечения СИБР: рифаксимин в дозе 600 мг в сутки на протяжении 7 дней; рифаксимин в той же дозе, с последующим приемом по 1 капсуле 2 раза в день 1 месяц пробиотика Лактобаланс®, содержащего не менее $3,0 \times 10^9$ КОЕ/капс.: *L.gassery* KS-13, *L. gasser* LAC-343, *L. ramnosus* LCS-742, *B.bifidum* G9-1, *B. longum* MM-2, *B. longum* BB536 Strain M, *B. infantis* M-63, *B. breve* M16V mun T, *B.lactis* B1-04; Подгруппа пациентов atopической БА без СИБР в составе стандартной терапии для лечения БА принимала пробиотик Лактобаланс®.

Характеристика контрольных групп. В качестве респондентов контрольных групп приглашались клинически здоровые добровольцы (42 человека), не принимающие на протяжении предшествующих 3 месяцев антибактериальные препараты, пробиотики, пребиотики, сахароснижающие препараты, ингибиторы протонной помпы, прокинетики, слабительные средства, не курящие как минимум 3 года и имеющие отрицательный результат водородного дыхательного теста на СИБР. Респонденты группы контроля достоверно не отличались от пациентов основной группы по полу и возрасту, индексу массы тела ($p > 0,05$).

Всем больным проведены общепринятые клиничко-лабораторные исследования: клинический анализ крови, мокроты и мочи, биохимическое исследование крови, определение общего IgE, а так же IgA, IgM, IgG, С-реактивного белка, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, электрокардиография. Лабораторные исследования проводились до начала терапии и спустя один месяц после начала лечения. Исследование ФВД проводилось перед включением в исследование, затем через 14 дней и 30 дней от момента начала терапии. В последующий год наблюдения за пациентами оценивали количество обострений БА, требующих госпитализации. До и после лечения 34 пациента основной группы заполнили тест по контролю над астмой - АСТ-тест (Asthma Control Test). У всех больных отмечались: ежедневные симптомы заболевания, ночные пробуждения, вызванные бронхиальной астмой, ограничение физической активности и необходимость использования препаратов «неотложной помощи» (сальбутамол, ипратропия бромид, фенотерола гидробромид) чаще 2 раз в неделю. Т. обр., в исследование были включены пациенты с неконтролируемой БА среднетяжелого и тяжелого течения. Выявлена прямая положительная корреляционная связь результатов опросника и значений функции внешнего дыхания пациентов ($ОФВ_1$) ($r_s = 0,68$, $p < 0,01$), а также результатов опросника и уровня контроля БА по мнению лечащего врача ($r_s = 0,67$, $p < 0,01$). Выявлена прямая слабая корреляция результатов опросника с длительностью заболевания ($r_s = 0,19$, $p = 0,28$). Всем испытуемым был выполнен

водородный дыхательный тест с лактулозой (препарат Дюфалак сироп) до лечения и через 14 дней с целью определения СИБР. Положительным тест считался при увеличении концентрации водорода в выдыхаемом воздухе на 12 ppm выше исходного уровня, хотя бы однократно, в период проведения теста. Исследование проводилось на приборе Gastro + Gastrolyzer (№HG001019 Bedfont Scientific Ltd.). **Спирометрия с бронхолитической пробой** проводилась при помощи спирографа MasterScreen[®] производства компании VIASYS Healthcare. Пациенты обследовались в утренние часы, натощак. **Секвенирование бактериальной 16S рРНК** проводилось в образцах кала и орофарингеальных мазках. Метагеномный анализ образцов кала и орофарингеальных мазков осуществлялся на базе ЦКП "Геном" ФГБУ "Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта" РАН, г. Москва (руководитель ЦКП "Геном" - Кудрявцева А.В, биоинформатик - Краснов Г.С.). Тотальную ДНК выделяли с помощью комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала "АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ" (НекстБио, Россия) согласно протоколу производителя. Выделенную ДНК хранили при -20°C. Для качественной и количественной оценки ДНК использовали NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). **Газожидкостная хроматография** проводилась в образцах кала с целью определения короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК). Исследование осуществлялось в соответствии с стандартной медицинской технологией "Способ определения короткоцепочечных жирных кислот (фракции C₂-C₆ с изомерами) в различных биологических субстратах методом газожидкостной хроматографии" (Рег. уд: № ФС-2006/030-у). Исследование проводилось в лаборатории "ДНКом" на газовом хроматографе "Хромос ГХ-1000 с детектором ионизации в пламени".

Дополнительная информация о свойствах бактерий (тип дыхания, продукты ферментации и др.) получена из справочника - Определитель бактерий Берджи (Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria). **Статистический анализ результатов** проводился с помощью программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Качественные признаки описывались при помощи абсолютных и относительных

(%) величин, количественные с использованием медианы (Me) и 95% доверительного интервала (ДИ) (Me [-ДИ_{95%}; +ДИ_{95%}]). При сравнении количественных показателей двух независимых групп использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. При сравнении более двух независимых групп - критерий Краскела-Уоллиса. При сравнении категориальных переменных использовался двусторонний точный тест Фишера и тест χ^2 Пирсона. Значимость различий оценивалась как вероятность совершить ошибку первого рода (p), при этом $p \leq 0,05$ считалось значимым. Для проведения корреляционного анализа количественных показателей использовалась корреляция Спирмена (r_s).

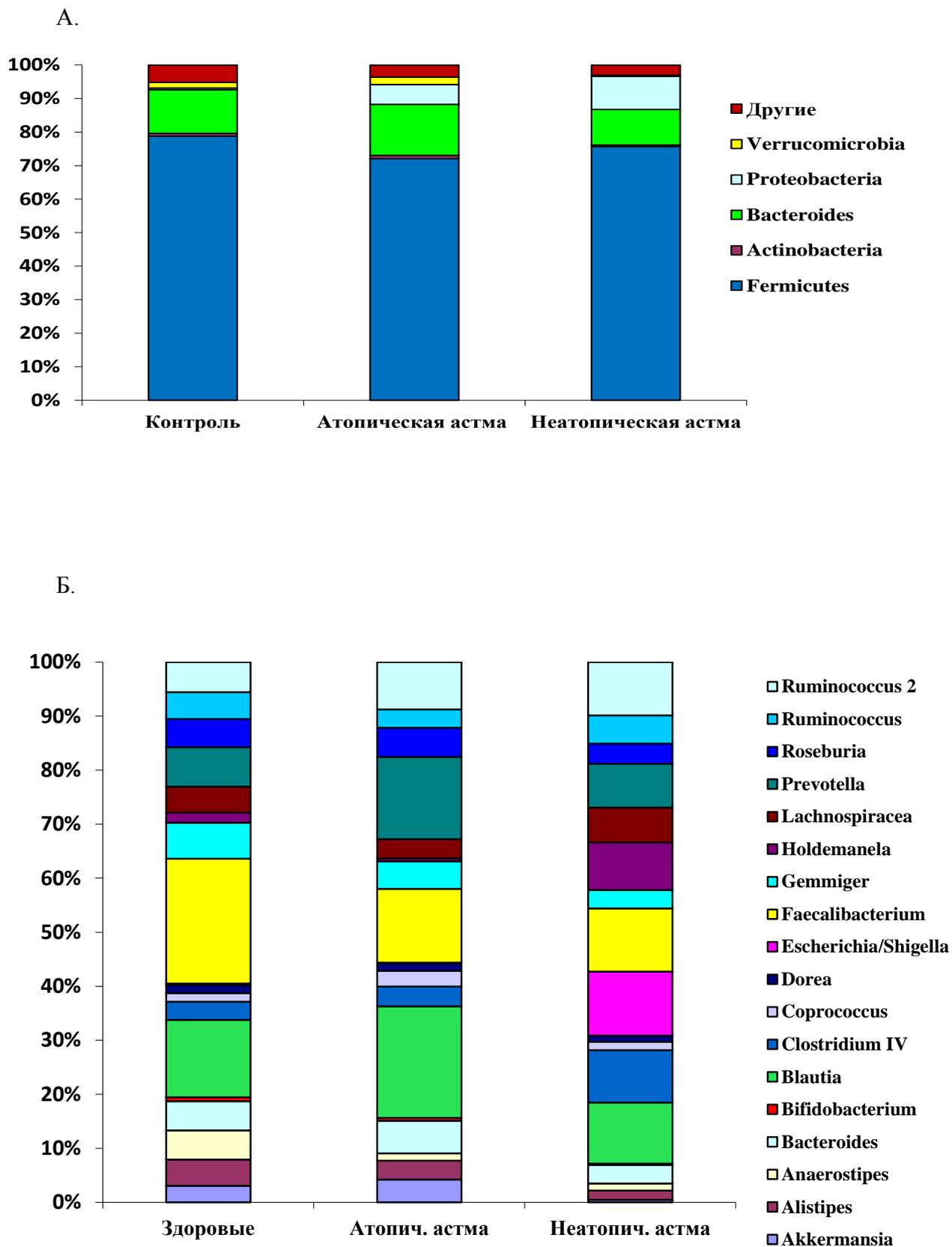
Результаты исследования

Состояние микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой

У пациентов с БА установлено статистически значимое увеличение в составе микробиоты кишечника доли бактерий, относящихся к типу *Proteobacteria* (соответственно 5,91 [0,0; 11,91] vs. 9,90 [0,0; 24,99] vs. 0,54 [0,06; 1,03], $p = 0,002$) (диагр.1). У пациентов с АБА рост *Proteobacteria* наблюдался за счет классов *Betaproteobacteria* и *Gamma**proteobacteria*. В бактериальном спектре при НБА - преимущественно за счет класса *Gamma**proteobacteria*. Тип *Proteobacteria* объединяет большинство грамотрицательных микроорганизмов, относящихся к факультативным или облигатным анаэробам. *Proteobacteria* имеют в структуре своей бактериальной стенке липополисахаридный комплекс, инициирующий воспалительный каскад реакций через Толл-подобные рецепторы с активацией реакций Th-2 опосредованного иммунного ответа. *Proteobacteria* так же участвуют в индукции воспаления слизистой оболочки кишки, способствуя повышению ее проницаемости и развитию иммунологической интолерантности.

Наиболее часто встречающийся тип бактерий, в исследуемых группах представлен филумом *Firmicutes*, объединяющий множество грамположительных бактерий, относящихся к аэробам и анаэробам. У больных АБА (20 человек) и НБА (20 человек) по сравнению с группой контроля (15 человек) отмечено

Диаграмма 1. Изменение структуры микробиоты кишечника у пациентов бронхиальной астмой на уровне А) типа, Б) рода бактерий



увеличение бактерий класса *Bacilli* (соответственно 1,57 [0,0; 3,69] vs. 0,23 [0,04; 0,42] vs. 0,07 [0,02; 0,12], $p \leq 0,05$). Выявлено снижение рода *Anaerostipes* (0,69 [0,33; 1,04] vs. 0,73 [0,0; 1,51] vs. 2,92 [0,98; 4,86], $p \leq 0,05$) (семейство *Lachnospiraceae*) и рода *Faecalibacterium* (7,0 [6,01; 8,11] vs. 6,74 [6,01; 7,98] vs. 12,4 [7,65; 17,14], $p \leq 0,05$) (семейство *Ruminococcaceae*), которые служат важнейшими продуцентами КЦЖК, а именно бутирата.

Следующий по распространенности тип бактерий микробиоты кишечника представлен филумом *Bacteroidetes*, включающий в себя грамтрицательные неспорообразующие строгие анаэробы, обладающие сахаролитической активностью. У пациентов АБА и НБА, по сравнению с группой контроля, выявлено снижение представителей семейства *Rikenellaceae* (род *Alistipes*) (соответственно 1,82 [0,95; 2,7] vs. 0,96 [0,12; 1,80] vs. 2,56 [1,0; 4,16], $p \leq 0,05$). Род бактерий *Alistipes*, относящий к семейству *Rikenellaceae*, продуцирует в толстой кишке в качестве основной КЦЖК - ацетат, а так же изовалериановую и янтарную кислоты. Известно, что уменьшение производства КЦЖК способствует поляризации иммунного ответа в сторону Т-хелперов 2 типа и формированию провоспалительных иммунных реакций.

Другие типы бактерий (*Verrucimicrobia* и *Actinobacteria*) обнаруживаются в кишечной микробиоте в значительно меньшем количестве, как у здоровых лиц, так и у больных БА ($p > 0,05$).

Средняя доля таксонов кишечной микробиоты, относящихся к грамтрицательным бактериям, отличалась в группе контроля и пациентов с БА ($p = 0,037$), составляя у здоровых лиц 11%, а при АА и НА - 23% и 22%.

Учитывая, что БА представляет собой хроническое заболевание с высоким риском развития обострений и, следовательно, потенциально более высокой частотой терапии глюкокортикостероидами, мы предположили возможность снижения бактериального биоразнообразия. Однако в ходе исследования установлено, что микробиота кишечника, при БА, характеризовалась разнообразным таксономическим составом метагеномов, как и микробиота

здоровых добровольцев. Индексы Шеннона, Чао1 и ACE были в широких пределах во всех группах. Индекс Шеннона, характеризующий разнообразие и выравненность сообщества, составил 1,27 [1,07; 1,43] в группе контроля и 1,23 [1,01; 1,36] у пациентов с БА ($p > 0,05$). Индексы Чао1 и ACE (*Abundance Coverage Estimator*), отражающие видовое разнообразие представленных образцов, составили 22,32 [19,22; 25,43] и 20,22 [18,10; 22,74] у здоровых лиц, а при БА 32,58 [28,39; 36,77] и 27,65 [24,83; 30,46] соответственно, в обоих случаях получены значимые различия ($p=0,0002$ и $p=0,001$). Этот факт можно объяснить увеличением представленности *Proteobacteria* в группе лиц, страдающих БА. Различий бактериального разнообразия в зависимости от фенотипа БА получено не было ($p>0,05$).

Учитывая задачи исследования, проводился корреляционный анализ изменений таксономического состава бактерий и основных клинко-лабораторных проявлений БА. Для пациентов с АБА результаты представлены в таблице 1. При НБА выявлены обратные корреляционные зависимости длительности анамнеза и уровня *Anaerostipes* ($r_s = -0,27$), *Faecalibacterium* ($r_s = -0,30$), *Bacilli* ($r_s = -0,35$), *Alistipes* ($r_s = -0,46$). Получена прямая корреляция анамнеза заболевания с *Proteobacteria* ($r_s=0,30$) и Moraxellaceae ($r_s=0,57$). Величина ОФВ₁ имела обратную зависимость от *Proteobacteria* ($r_s = -0,29$).

Таблица 1. Корреляции выявленных изменений в составе кишечной микробиоты с клинко-лабораторными проявлениями атопической БА

Тип- класс-порядок- семейство-род	Клинко-лабораторные проявления астмы				
	Анамнез	IgE	ОФВ ₁	Эозиноф. крови	Эозиноф. мокроты
Род <i>Anaerostipes</i>	-0,28	0,26	0,24	- 0,46	- 0,45
Род <i>Faecalibacterium</i>	-0,29	0,29		0,25	0,31
Класс <i>Bacilli</i>					-0,55
Филум <i>Proteobacteria</i>	0,33		-0,25		

Нами поведено сравнение таксономического состава метагеномных образцов кала у пациентов с БА в зависимости от выявленного СИБР, обнаружены

достоверные различия на уровне отдельных классов, семейств и родов. Так, у пациентов группы АА СИБР (+) при сопоставлении с АА СИБР (-) отмечено снижение относительного количества бактерий, относящихся: к классам *Negativicutes* ($p=0,0008$), *Erysipelotrichia* ($p=0,01$), *Bacteroidia* ($p=0,05$); к семействам *Erysipelotrichaceae* ($p=0,01$), *Pseudomonadaceae* ($p=0,02$), *Rhodospirillaceae* ($p=0,04$), *Bacillaceae* ($p=0,02$), увеличение *Porphyromonadaceae* ($p=0,02$); было снижено количество таксонов, относящихся к родам *Barnesiella* ($p=0,02$), *Paraprevotella* ($p=0,01$), *Pyrolobus* ($p=0,008$), *Bifidobacterium* ($p=0,05$), *Pseudomonas* ($p=0,02$), *Coprobacter* ($p=0,04$), *Bacillus* ($p=0,02$). В то время как у пациентов НА, при наличии СИБР (+) в сравнении с подгруппой СИБР (-), выявлено повышение относительного количества бактерий, относящихся к семейству *Bacteroidaceae* ($p=0,04$); к родам *Paraprevotella* ($p=0,04$), *Odoribacter* ($p=0,04$), *Bacteroides* ($p=0,04$), *Butyricicoccus* ($p=0,04$), *Parasutterella* ($p=0,03$).

Патогенетическое и клиническое значение СИБР в тонкой кишке у больных с БА*

Избыточный бактериальный рост в тонкой кишке выявлялся чаще у пациентов, страдающих IgE опосредованной БА ($p<0,05$) (диагр. 2). Основные клинические проявления СИБР у пациентов имели стертую симптоматику, требовали специального уточнения при расспросе и не отличались в зависимости от фенотипа БА (табл. 2). В группе пациентов с атопической БА и подтвержденным СИБР (АА СИБР (+)) длительность анамнеза БА составила 20,06 [15,28; 24,85] лет, возраст пациентов 40,40 [30,99; 49,80] лет. У пациентов с неатопическим фенотипом заболевания и избыточным бактериальным ростом в тонкой кишке (НА СИБР(+)) длительность анамнеза - 14,0 [12,77; 15,22] лет, возраст 43,00 [28,41; 57,58] лет. В ходе проведения водородного дыхательного теста обращало на себя внимание различие в динамике прироста H_2 у пациентов группы АА СИБР(+) по сравнению с группой НА СИБР(+) (табл. 3).

*Результаты исследования были получены в ходе совместной работы с Поцхверашвили Н.Д. и были опубликованы в научной литературе (см. список публикаций 3,4,6,7,16)

Диаграмма 2. Частота выявления СИБР у пациентов с бронхиальной астмой

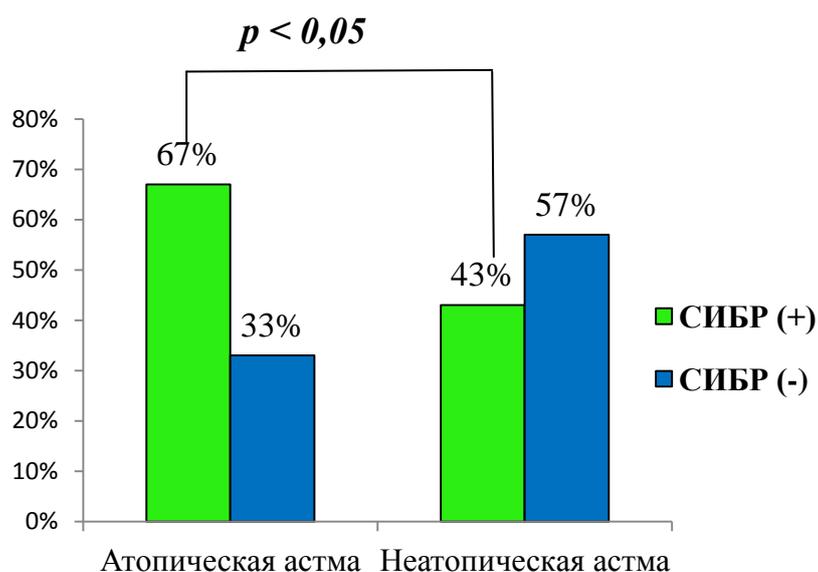


Таблица 2. Симптомы СИБР у больных бронхиальной астмой

Признаки	Атопическая n = 45	Неатопическая n = 35	p
Наличие СИБР (%)	30 (67%)	15 (43%)	0,028
Бессимптомное течение	13 (43%)	5 (33%)	> 0,05
Вздутие живота	11 (37%)	6 (40%)	> 0,05
Кашицеобразный стул до 2-3 раз в день (тип 6 по Бристольской шкале)	6 (20%)	4 (27%)	> 0,05

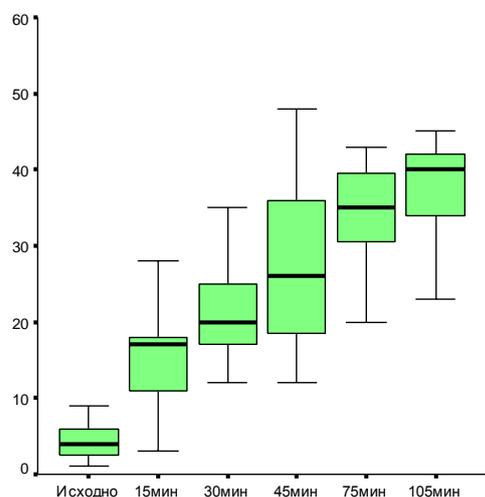
Таблица 3. Сравнение уровней водорода у лиц с БА, полученных в ходе выполнения водородного дыхательного теста

Концентрация H ₂ , ppm	АА СИБР (+), 95% ДИ	НА СИБР (+), 95% ДИ	P
Исходно	4,7 [3,00; 6,32]	3,0 [1,58; 4,41]	0,09
15 мин	15,2 [11,69; 18,70]	5,42 [3,58; 7,26]	0,00039
30 мин	20,8 [16,16; 25,43]	7,0 [2,13; 11,86]	0,00036
45 мин	28,2 [21,57; 34,83]	18,85 [7,84; 29,87]	0,05
75 мин	35,0 [30,20; 39,79]	27,71 [15,47; 39,95]	0,068
105 мин	38,3 [33,71; 42,82]	29,0 [18,24; 39,75]	0,02

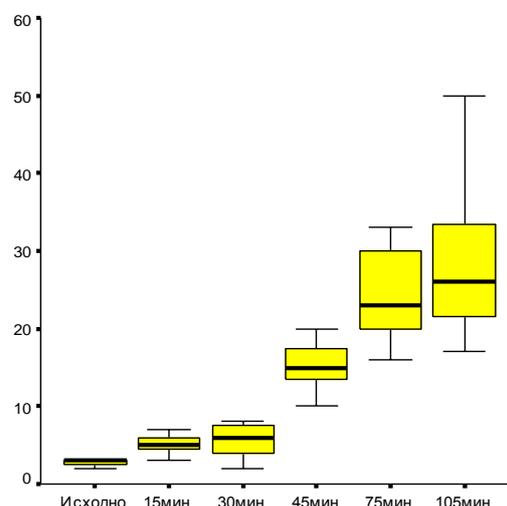
Исходный уровень водорода в выдыхаемом воздухе, полученный до приема лактулозы, не имел достоверных различий ($p > 0,05$) в исследуемых группах. В дальнейшем по мере выполнения исследования теста на 15-ой, 30-ой, 45-ой минуте значения H_2 у пациентов группы АА СИБР(+) достоверно превышали аналогичные показатели группы НА СИБР(+) (табл. 3, диагр. 3).

Диаграмма 3. Динамика уровня водорода в выдыхаемом воздухе у пациентов БА (А - группа АА СИБР (+), Б - группа НА СИБР (+), В - пациенты БА (атопической и неатопической) при отсутствии СИБР (группа СИБР (-)). по вертикали – концентрация H_2 , ppm; по горизонтали - время исследования, мин. (линия внутри прямоугольника - медиана, прямоугольник – интерквартильный размах, конечные планки - размах без выбросов)

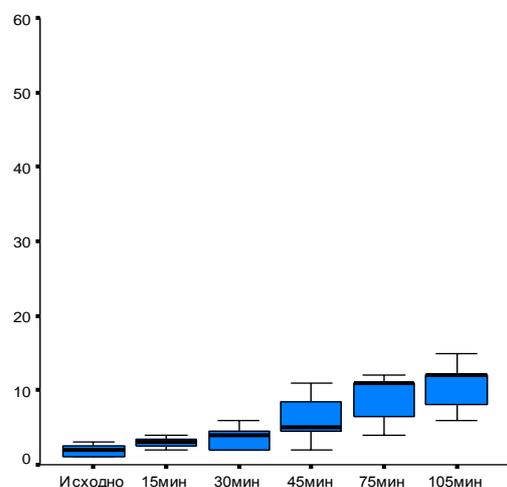
А.



Б.



В.



По всей видимости, это может быть, во-первых, отражением разной продолжительности заболевания БА, свидетельствуя об отличающейся степени бактериальной обсемененности тонкой кишки. Во-вторых, возможно связано с особенностями микрофлоры, контаминирующей тонкую кишку, а именно видоспецифическими и штаммоспецифическими различиями. У пациентов, не имеющих СИБР (-), вне зависимости от фенотипа БА особенностей в динамике H_2 не выявлено ($p > 0,05$). Таким образом, более быстрое повышение градиента H_2 наблюдалась у пациентов АБА, имеющих в нашем исследовании более длительный анамнез заболевания. Представляется, что при разных фенотипах БА СИБР в тонкой кишке имеет ряд особенностей и как показали результаты нашего исследования, имеет различную кривую водородного теста.

При сравнительном анализе основных клинико-лабораторных проявлений атопической БА, в зависимости от СИБР статуса, нами были выявлены в подгруппе пациентов, АА СИБР (+) более высокие титры общего IgE 348,4 [297,02; 399,96] МЕ/мл vs. 237,1 [162,16; 312,10] МЕ/мл ($p < 0,01$), уровень эозинофилов мокроты 7,4 [5,79; 9,00] ед. vs. 3,06 [1,98; 4,14] ед. ($p < 0,001$), а также более выраженные нарушения функции внешнего дыхания в виде снижения ОФВ₁ 64,6 [62,10; 67,16]% vs. 69,6 [65,90; 73,43]% ($p < 0,01$) по сравнению с группой АА СИБР (-). Выявленные изменения подтверждают гипотезу о взаимосвязи микробиоценоза кишечника и аллергических реакций, свидетельствуя в пользу выраженной аллергической активности у больных с выявленным нарушением кишечной микробиоты.

В группе больных с НА СИБР (+) выявлено статистически достоверное 60,06 % [59,39; 62,73] vs. 62,45 % [57,37; 67,52] ($p < 0,05$) снижение ОФВ₁, что свидетельствует в пользу значимости СИБР в формировании более выраженных нарушений вентиляционной функции легких. Остальные лабораторные показатели у пациентов с НБА определялись в пределах референсных значений и не изменились в процессе лечения и наблюдения за пациентами.

Установлено, что в случае АБА одновременное назначение пациентам базисной терапии для лечения астмы, и терапии, направленной на нормализацию кишечной микробиоты, уровень общего IgE достоверно снизился по сравнению с исходными значениями ($p < 0,01$). В группе пациентов, не имеющих СИБР и получавших по условиям исследования только базисную терапию, снижения общего IgE в ходе наблюдения достигнуто не было ($p > 0,05$) (табл. 4).

Таблица 4. Уровень общего IgE в группе пациентов с atopической БА на фоне лечения

Показатель (МЕ/мл)	СИБР (+), n = 30		p	СИБР (-), n = 15		p
	До лечения	После лечения		До лечения	После лечения	
IgE	348,4 [297,02; 399,91]	249,0 [208,89; 289,67]	0,0016	237,1 [162,16; 312,10]	241,0 [176,45; 306,87]	0,46

Из 30 пациентов АА СИБР (+) для лечения СИБР 15 человек получали терапию рифаксимин + Флорасан Д и 15 человек только рифаксимин. Значения общего IgE в обеих группах до начала терапии были сопоставимы (308,4 [188,51; 428,28] МЕ/мл vs. 368,5 [312,33; 424,66] МЕ/мл; $p = 0,13$). Уровень IgE на фоне лечения СИБР достоверно снизился в обеих подгруппах (табл. 5).

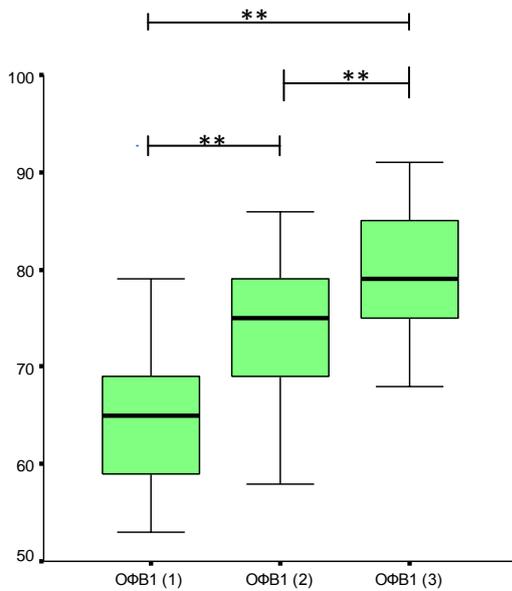
В исследовании нам удалось проследить потенцирующий эффект пробиотика. Было выявлено, что добавление к терапии пробиотического препарата привело к статистически значимому уменьшению общего IgE по сравнению с подгруппой, получавшей только антибактериальный препарат (соответственно 192,5 [136,19; 248,80] МЕ/мл vs. 280,83 [228,67; 332,99] МЕ/мл, $p = 0,014$).

Таблица 5. Уровень общего IgE в группе пациентов atopической БА (АА СИБР (+)) до и после лечения СИБР

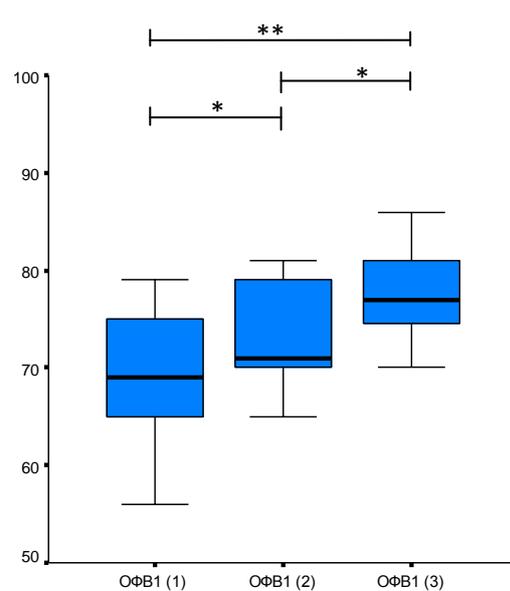
Лечение	IgE до лечения (МЕ/мл)	IgE после лечения (МЕ/мл)	p
Рифаксимин+ Флорасан Д (n = 15)	308,4 [188,51; 428,28]	192,5 [136,19; 248,80]	0,031
Рифаксимин (n = 15)	368,5 [312,33; 424,66]	280,83 [228,67; 332,99]	0,011

Диаграмма 4. Показатели спирометрии до и после лечения (А – АА СИБР (+), Б – АА СИБР (-), В- НА СИБР (+), Г – НА СИБР (-)). $p < 0,001$, $*p < 0,05$; по горизонтали - $ОФВ_1(1)$ – результаты до лечения, $ОФВ_1(2)$ – результаты через 2 недели лечения, $ОФВ_1(3)$ – результаты через 4 недели лечения; по вертикали – значения объема форсированного выдоха за 1 секунду в %. (линия внутри прямоугольника - медиана, прямоугольник – интерквартильный размах, конечные планки - размах без выбросов)**

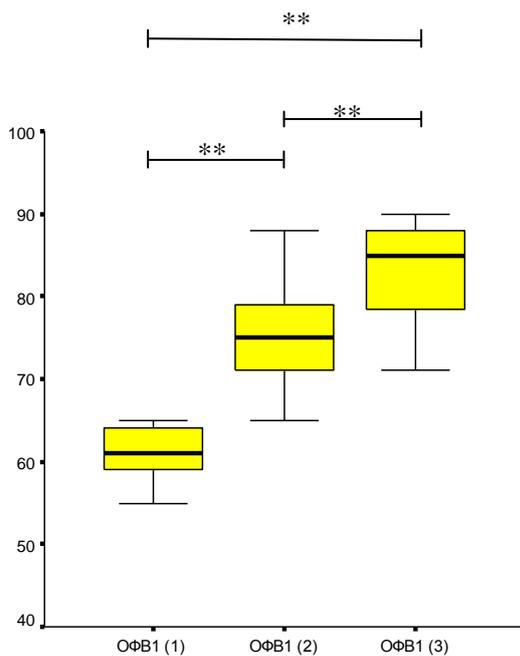
А.



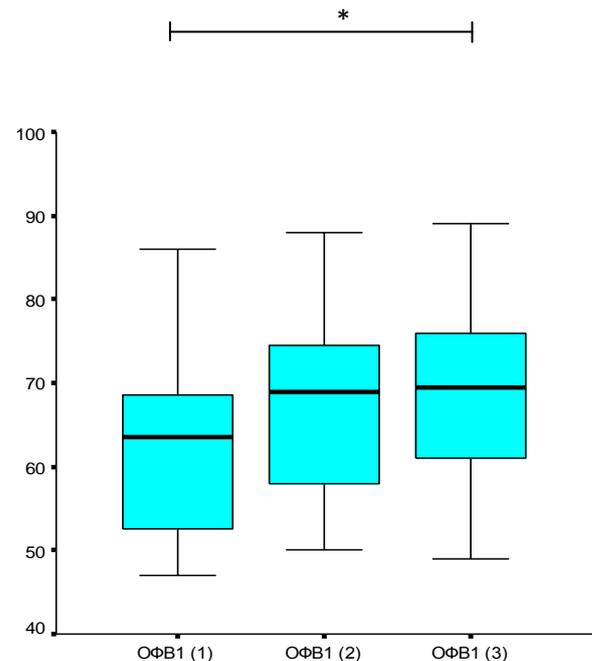
Б.



В.



Г.



В результате проведенной терапии отмечено улучшение вентиляционной функции легких в обеих группах, определяемое как увеличение объема форсированного выдоха за 1-ю секунду (диагр. 4) ($p \leq 0,05$). Увеличение ОФВ₁ мы расценивали, в первую очередь, как положительный результат медикаментозного лечения в условиях стационара. Однако, более значимое улучшение ФВД было после коррекции СИБР, что служит подтверждением вклада нарушений состава микрофлоры в развитии основных проявлений БА.

Наблюдение за пациентами в течение последующего года показало, что лечение СИБР в тонкой кишке способствовало снижению частоты обострений заболевания, требующих стационарного лечения в среднем до 1-2 раз в год, при сравнении с 2-3 ежегодными госпитализациями до проведения терапии. В группе АБА СИБР (+) в течение последующего года однократная госпитализация потребовалась лишь 19 больным (63% от общего числа пациентов группы АБА СИБР (+)). Все эти пациенты имели длительный анамнез БА от 15 до 40 лет и одна пациентка была с 50 летним стажем заболевания.

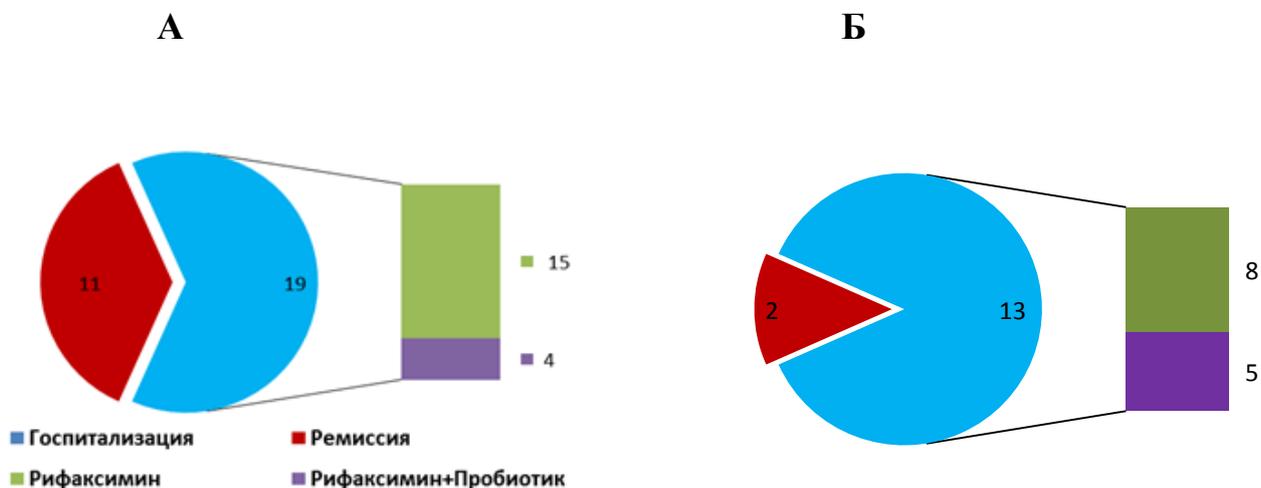
Установлено, что среди госпитализированных, 15 человек (79%) для лечения СИБР принимали только рифаксимин, а 4 пациента (21%) получали рифаксимин + Флорасан Д (диагр. 5А). Таким образом, добавление к терапии пробиотика способствовало более длительной ремиссии заболевания (критерий Фишера = 0,00002, $p < 0,05$; $\chi^2 = 17,37$, $p < 0,001$). 11 пациентам (37% группы АБА СИБР (+)) госпитализация в течение года не потребовалась, их состояние расценивалось как ремиссия. Для лечения СИБР эти больные получали терапию рифаксимин + Флорасан Д. Длительность БА в этом случае была несколько меньше - до 10 лет, и лишь у одного пациента анамнез составил 20 лет.

Пациенты АА СИБР (-), получавшие по условиям исследования только основную терапию, направленную на лечение БА, в 100% случаев (15 человек) были госпитализированы 2 и более раз в течение года.

У пациентов НБА после лечения СИБР так же выявлена тенденция снижения частоты госпитализаций (в среднем с 2-3 до 1-2 раз в год) в течение

года наблюдения. В группе НБА СИБР (+) необходимость стационарного лечения в течение года возникла у 13 больных, с длительностью анамнеза БА до 10 лет (86% от общего числа НБА СИБР (+)) (диагр. 5Б). 5 человек (38,5%) в качестве терапии СИБР получали рифаксимин + Флорасан Д, а 8 (61,5%) человек - только рифаксимин. Статистических различий при сравнении этих подгрупп не получено $p > 0,05$ ($p = 0,2$ по критерию Фишера; $p = 0,10$ по критерию χ^2). Лишь 2 пациентам, с длительностью анамнеза до 5 лет (14% от общего числа больных группы НА СИБР (+)) стационарное лечение в течение года не потребовалось, все они получали терапию рифаксимин + Флорасан Д. 50% пациентов (10 человек) НА СИБР (-), получавшие по условиям исследования только основную терапию, направленную на лечение БА, в последующий год были госпитализированы 2 и более раз. Таким образом, выявлена тенденция уменьшения числа обострений БА в случае пролонгированной терапии с пробиотическим препаратом, особенно у пациентов с продолжительностью анамнеза менее 10 лет.

Диаграмма 5. Течение атопической (А) и неатопической (Б) БА в последующий год наблюдения, после лечения СИБР в тонкой кишке



Метаболическая активность кишечной микробиоты у пациентов с БА

У всех пациентов с БА установлено значительное снижение общего содержания КЦЖК в кале по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). Выявлено снижение абсолютных концентраций ацетата, пропионата, бутирата ($p < 0,001$) и

суммарного содержания изокислот ($p < 0,001$), вне зависимости от фенотипа БА (табл. 6, диагр.6).

Таблица 6. Уровень бактериальных метаболитов в исследуемых группах

Параметр	Гр. контроля 2 (n = 17)	Атопическая астма (n = 30)	Неатопическая астма (n = 20)	p
Общ. содержание, мг/г	10,33[9,45;11,11]	2,56 [1,53;3,60]	2,94 [1,75;4,12]	$< 0,001^{1,2}$
Ацетат (C ₂), мг/г	5,87 [5,57;6,16]	1,31 [0,77;1,84]	1,41[0,86;1,97]	$< 0,001^{1,2}$
Пропионат (C ₃), мг/г	1,77[1,67; 1,87]	0,56 [0,31;0,84]	0,64 [0,29;0,98]	$< 0,001^{1,2}$
Бутират (C ₄), мг/г	1,73 [1,62;1,84]	0,39 [0,21;0,56]	0,57 [0,35;0,78]	$< 0,001^{1,2}$
Изокислоты (C _n), мг/г	0,62 [0,58;0,60]	0,31[0,16;0,47]	0,19 [0,13;0,25]	$< 0,001^{1,2}$
ИзоC _n /C _n , ед.	0,45 [0,35; 0,54]	0,52 [0,36;0,67]	0,37 [0,22;0,51]	0,07

Критерий Манна-Уитни при сравнении: ¹ АА и здоровых добровольцев; ² НА и здоровых добровольцев.

Диаграмма 6. Уровень КЦЖК в исследуемых группах

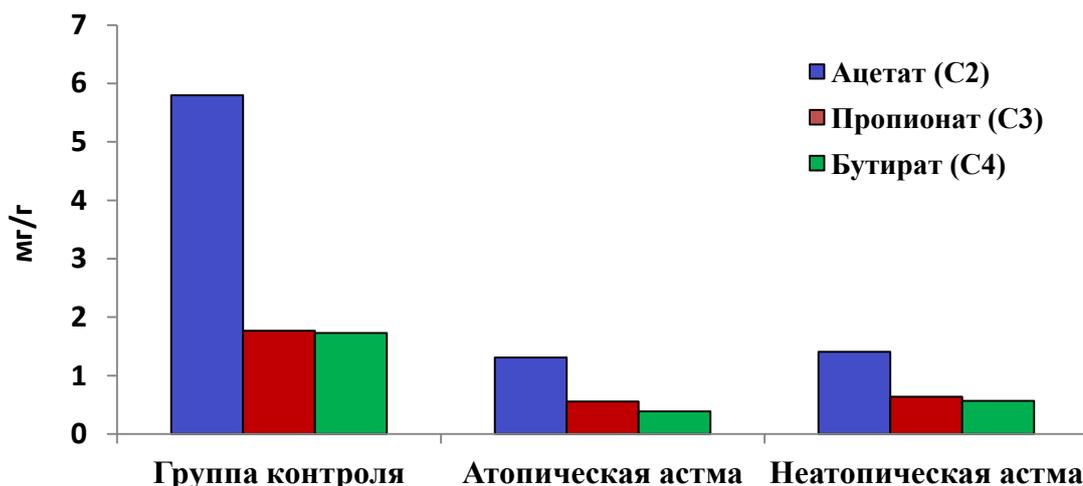


Таблица 7. Профиль КЦЖК у пациентов с БА и группы контроля

Монокорбоновые кислоты	Группа контроля 2 (n = 17)	Тип 1 (n = 31)	Тип 2 (n = 11)	Тип 3 (n = 8)
Ацетат (C ₂), ед	0,64 [0,55; 0,73]	0,53*** [0,50; 0,55]	0,51* [0,37; 0,65]	0,69 [0,59 ; 0,78]
Пропионат (C ₃), ед	0,19 [0,17; 0,2]	0,28*** [0,26; 0,29]	0,16** [0,13; 0,18]	0,21* [0,18; 0,26]
Бутират (C ₄), ед	0,17 [0,14; 0,21]	0,19 [0,17; 0,21]	0,33 [0,17;0,49]	0,11* [0,0; 0,25]

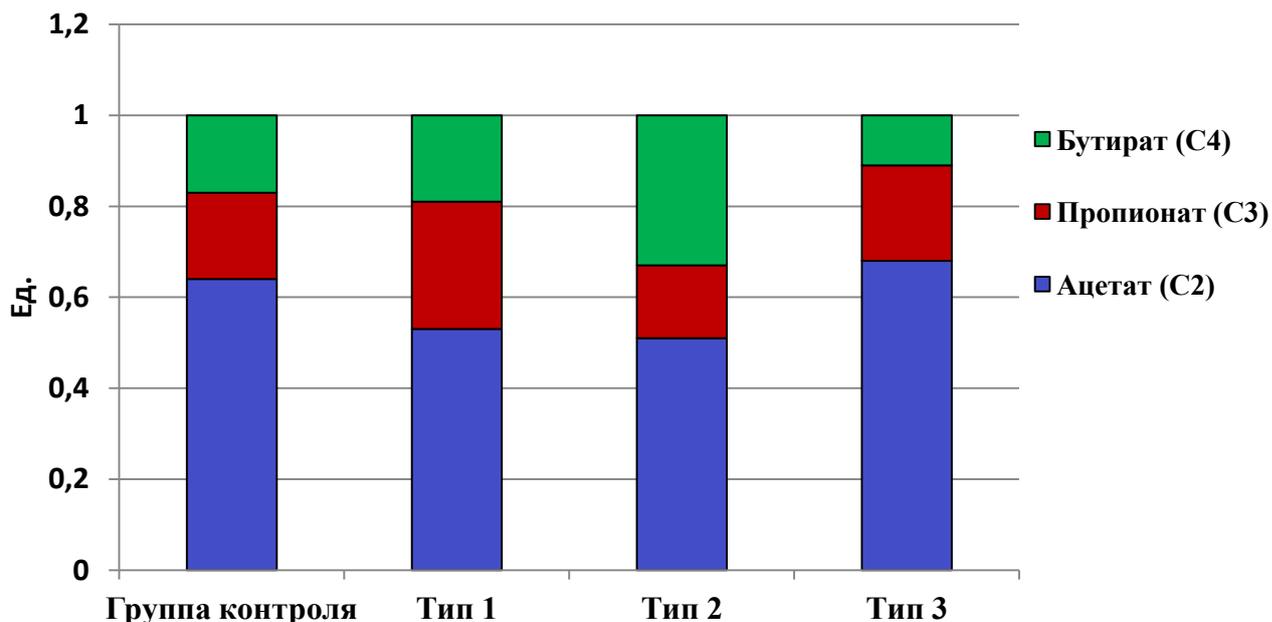
*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля

У пациентов БА по сравнению с группой контроля выявлено изменение соотношения КЦЖК (C₂-C₄) (табл. 7, диагр. 7). В большинстве случаев, у 84% обследованных пациентов (42 человека) выявлен анаэробный спектр КЦЖК. В таблице 7 и диаграмме 7 он соответствует 1 и 2 типам профилей КЦЖК.

Анаэробный профиль бактериального метаболизма характеризовался (тип 1) снижением доли ацетата при бóльшем содержании доли пропионата и бутирата. Такое соотношение КЦЖК наблюдалось у 62% обследованных пациентов (31 человек). В первую очередь это подтверждает снижение активности аэробных микроорганизмов (*E.coli*, *Streptococcus*, *Staphilococcus*) при одновременном росте активности условно-патогенных бактерий и строгих анаэробов (*Eubacteria*, *Fusobacterium*, *Coprococcus*, др.).

Профиль типа 2 также характеризовался снижением ацетата и увеличением бутирата, лишь содержание пропионата по сравнению с 1 типом были ниже. Уменьшение доли пропионата может быть связано, как со снижением активности аэробной флоры, так и повышением его абсорбции в кишечнике. В целом, этот спектр КЦЖК соответствует анаэробному и выявлен у 22% обследованных пациентов (11 человек).

Диаграмма 7. Спектр КЦЖК в исследуемых группах



При 3-ем варианте метаболического спектра обнаружено преобладание в профиле

кислот ацетата и пропионата, на фоне снижения содержания бутирата. Тип 3 выявлен у 16% обследованных пациентов (8 человек). В целом, такое соотношение КЦЖК ближе к аэробному типу метаболизма. Рост доли ацетата может быть связан с активацией патогенной и условно-патогенной аэробной микрофлоры кишечника, например: *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Campylobacter* и др. Их активность в толстой кишке напрямую связана с угнетением популяции анаэробных микроорганизмов (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Eubacteria*, *Fusobacterium*), при сохранении численности пропионовокислых бактерий (*Propionibacterium*), служащих основными продуцентами пропионата.

Изокислоты (изоформы КЦЖК) в норме образуются в минимальных количествах. Увеличение их относительного содержания свидетельствует об увеличении активности протеолитической микрофлоры, развивающейся на фоне нарушений состава кишечного биотопа. Субстратом для образования изокислот служат белки слизи кишечника. Сумма концентраций изокислот C₄-C₆ (ИзоCn) и отношение изокислот C₄-C₆ ко всем неразветвленным кислотам C₄-C₆ (ИзоCn/Cn) позволяет оценить протеолитическую активность микроорганизмов. В исследовании выявлено достоверное увеличение этих показателей ($p < 0,001$) у пациентов, имеющих аэробный спектр метаболического профиля КЦЖК, по сравнению с группой контроля. В случаях анаэробного метаболизма прослеживалась тенденция к увеличению относительного содержания изокислот и снижению отношения изокислоты/кислоты ($p < 0,05$) (таблица 8).

При разных метаболических типах существенно различались значения анаэробного индекса (табл.8, диагр.8). Анаэробный индекс отражает значения окислительно-восстановительного потенциала внутрипросветной среды, обеспечивающего рост и функциональную активность бактерий кишечника. При анаэробном типе метаболизма зарегистрировано резкое смещение индекса в сторону отрицательных значений ($p < 0,01$), и в зону противоположных значений –

при аэробном типе. Это свидетельствует о росте, соответственно, либо анаэробных или аэробных бактерий на фоне снижения активности облигатной флоры кишечного биотопа.

Таблица 8. Содержание изокилот (относительные концентрации), отношение суммы изокилот к кислотам и анаэробного индекса в соответствии с профилем короткоцепочечных жирных кислот

Параметр	Группа контроля 2	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Изокилоты (Cn), ед	0,059 [0,05; 0,06]	0,067* [0,05; 0,07]	0,094 * [0,0; 0,22]	0,14*** [0,06; 0,21]
ИзоCn/Cn, ед.	0,45 [0,35; 0,54]	0,35 * [0,27; 0,44]	0,37 [0,09; 0,66]	0,9*** [0,52; 1,28]
Анаэробный индекс, ед.	-0,55 [-0,64; -0,46]	-0,87*** [-0,95; -0,78]	-1,07** [-1,74; -0,39]	-0,46 [-0,68; 0,26]

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля

Диаграмма 8. Результаты анаэробного индекса у пациентов с БА при разных метаболических профилях короткоцепочечных жирных кислот

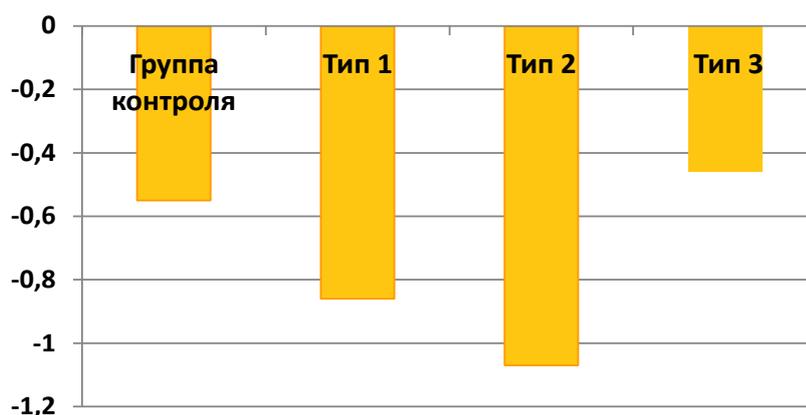


Таблица 9. Корреляция клинико-лабораторных проявлений БА и метаболической активности микробиоты

Параметры	Метаболическая активность	Атопическая астма, r_s	Неатопическая астма, r_s
	Возраст	Бутират (C ₄)	
	Изокилоты/кислоты		0,40
IgE	Изокилоты/кислоты	-0,66*	
	Анаэробный индекс	-0,45*	
ОФВ ₁	Изокилоты		-0,77
	Изокилоты/кислоты	-0,36	
Эозинофилы крови	Изокилоты/кислоты	-0,53*	
	Анаэробный индекс	-0,70**	

различия достигли статистически значимого уровня ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

При корреляционном анализе клинико-лабораторных проявлений БА с показателями метаболической активности микробиоты кишечника (таблица 9) получены результаты, достигшие статистически значимого уровня, подтверждающие взаимосвязь активности иммунного ответа и метаболизма кишечной микробиоты у пациентов с АБА. При НБА, полученные корреляции же демонстрируют тенденцию, подтверждающую связь с микробиотой.

Пациенты с АБА были дополнительно протестированы на наличие СИБР в тонкой кишке. По результатам водородного дыхательного теста пациенты рандомизированы на три подгруппы. Контрольное исследование КЦЖК проводилось по окончании приема пробиотика, фактически через 1,5 месяца после первичного анализа. Результаты исследования позволили выявить ряд изменений метаболической активности микробиоты, полученные в ходе медикаментозной терапии. Таблица 10 и диаграмма 9 демонстрируют уровень КЦЖК и изокилот у пациентов после лечения СИБР, в сравнении с исходными значениями. Вне зависимости от схемы терапии СИБР, выявлено достоверное уменьшение абсолютного количества изокилот ($p < 0,05$), а так же снижение уровня пропионата ($p < 0,01$) в подгруппе пациентов, принимающих пролонгированную терапию (рифаксимин + Лактобаланс). Уровень остальных КЦЖК и общее их содержание в этих подгруппах не изменились.

Таблица 10. Экспрессия КЦЖК у пациентов АА до и после лечения СИБР

Параметр	Атопическая астма СИБР (+), до лечения	Атопическая астма СИБР (+), после лечения	
		рифаксимин + Лактобаланс	рифаксимин
Общее содержание, мг/г	3,28 [1,14; 5,43]	2,59 [2,05; 3,13]	2,07 [1,95; 4,05]
Ацетат (C ₂), мг/г	1,66 [0,54; 2,78]	1,58 [1,23; 1,92]	1,25 [0,04; 4,5]
Пропионат (C ₃), мг/г	0,76 [0,26; 1,25]	0,19** [0,15; 0,23]	0,24 [0,02; 0,73]
Бутират (C ₄), мг/г	0,54 [0,20; 0,87]	0,56 [0,42; 0,69]	0,42 [0,01; 1,6]
Изокилоты (C _n), мг/г	0,23 [0,1; 0,37]	0,12* [0,08; 0,15]	0,11* [0,08; 0,12]

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ при сравнении с группой до лечения

У пациентов третьей подгруппы, которым не требовалось назначение антибактериального препарата, ввиду отсутствия СИБР, выявлено достоверное увеличение общего содержания КЦЖК ($p < 0,001$), ацетата ($p < 0,001$) и бутирата ($p < 0,001$), отмечено снижение количества изокислот ($p < 0,05$) (табл.11, диагр.10).

Диаграмма 9. Уровень КЦЖК у пациентов атопической астмой после лечения в исследуемых подгруппах

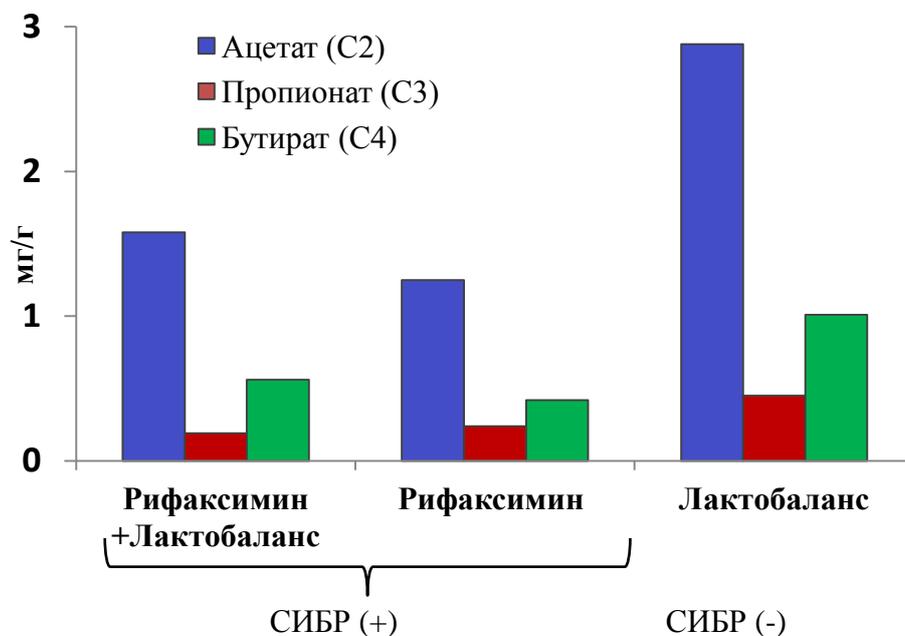


Таблица 11. Экспрессия КЦЖК у пациентов атопической БА СИБР (-) до и после лечения пробиотиком

Параметр	Атопическая астма СИБР (-), до лечения	Атопическая астма СИБР (-), после лечения	p
Общ. содержание, мг/г	1,84 [1,48; 2,21]	4,42 [3,8; 5,01]	< 0,001
Ацетат (C ₂), мг/г	0,95 [0,62; 1,29]	2,88 [1,15; 4,62]	< 0,001
Пропионат (C ₃), мг/г	0,36 [0,19; 0,52]	0,45 [0,02; 0,88]	0,29
Бутират (C ₄), мг/г	0,23 [0,11; 0,35]	1,01 [0,06; 1,96]	< 0,001
Изокислоты (C _n), мг/г	0,39 [0,07; 0,71]	0,03 [0,0; 0,05]	< 0,05

После лечения, направленного на коррекцию состава кишечной микрофлоры, соотношение КЦЖК во всех исследуемых подгруппах не отличалось от группы контроля (табл. 12, диагр. 11).

Диаграмма 10. Увеличение общего содержания КЦЖК у пациентов АА СИБР(-) через 1 месяц терапии пробиотиком

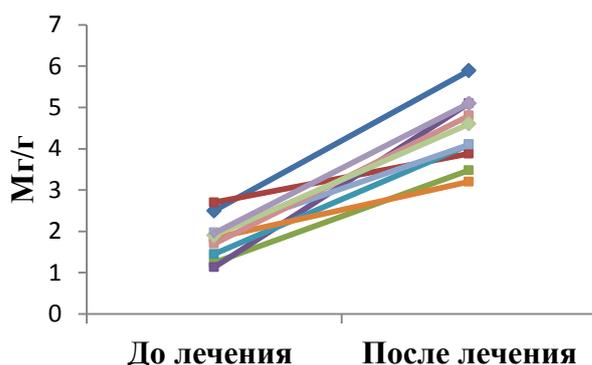


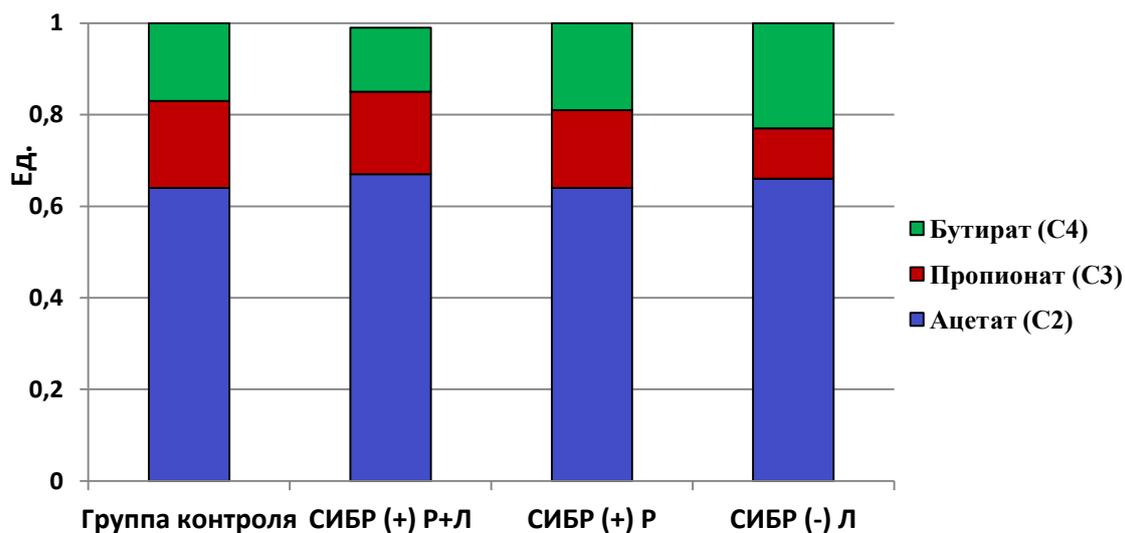
Таблица 12. Содержание КЦЖК, изокилот, анаэробного индекса

Монокарбонов. кислоты	Группа контроля	АА СИБР (+)		АА СИБР (-), лактобаланс
		рифаксимин + лактобаланс	рифаксимин	
Ацетат (C ₂), ед.	0,64 [0,55; 0,73]	0,67 [0,66; 0,68]	0,64 [0,56; 0,71]	0,66 [0,59; 0,73]
Пропионат (C ₃), ед.	0,19 [0,17; 0,2]	0,18 [0,17; 0,19]	0,17 [0,12; 0,19]	0,11 [0,08; 0,12]
Бутират (C ₄), ед.	0,17 [0,14; 0,21]	0,14 [0,12; 0,15]	0,19 [0,11; 0,28]	0,23 [0,18; 0,27]
Изокилоты (C _n), ед	0,059 [0,05; 0,06]	0,04** [0,03; 0,05]	0,09[^] [0,06; 0,26]	0,008*** [0,002; 0,001]
ИзоC _n /C _n , ед.	0,45 [0,35; 0,54]	0,17*** [0,12; 0,23]	0,50[^] [0,4; 1,4]	0,035*** [0,01; 0,06]
Анаэробный индекс, ед.	-0,55 [-0,64; -0,46]	- 0,48 [- 0,49; - 0,46]	- 0,55 [- 0,74; - 0,36]	- 0,50 [- 0 ,65; - 0,34]

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, при сравнении с группой контроля [^] $p < 0,05$ при сравнении Рифаксимин+Лактобаланс

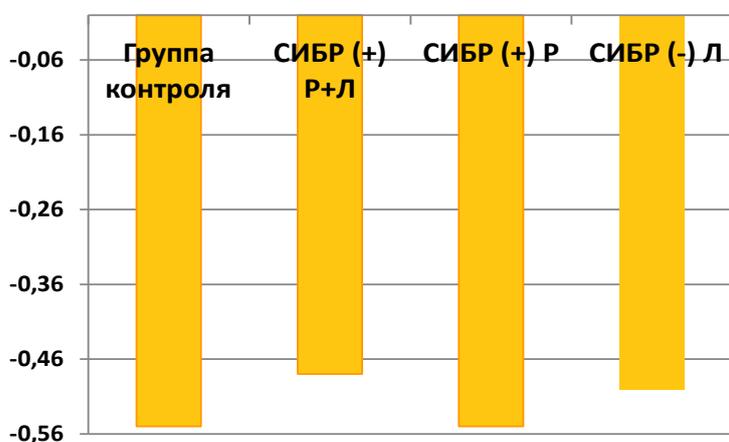
Значимые изменения выявлены в подгруппе пациентов, принимающих рифаксимин + Лактобаланс. Отмечено снижение содержание изокилот и соотношения изокилоты/кислоты, как по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$), так и с группой лиц, принимающих только рифаксимин ($p < 0,05$). Достоверное снижение изокилот ($p < 0,001$) и соотношения изокилоты/кислоты ($p < 0,001$) отмечено и у пациентов, принимающих только пробиотик Лактобаланс. Этот факт весьма значим, и доказывает, описанный в литературе, положительный эффект пробиотического препарата на преэпителиальный и эпителиальный уровень кишки.

Диаграмма 11. Спектр КЦЖК после проведенного лечения



Согласно полученным данным, во всех исследуемых подгруппах после лечения, значения анаэробного индекса не отличались от группы контроля ($p > 0,05$) (диагр. 12).

Диаграмма 12. Результаты анаэробного индекса у пациентов с БА после лечения в исследуемых подгруппах



Таким образом, выявленные изменения метаболической активности микробиоты кишечника и ее динамика на фоне проводимой терапии, служат отражением выраженных дисбиотических процессов, происходящих у пациентов с БА, и могут выступать в качестве их биомаркеров, отражающих функциональное состояние оси «кишка-легкие» (рис.1).

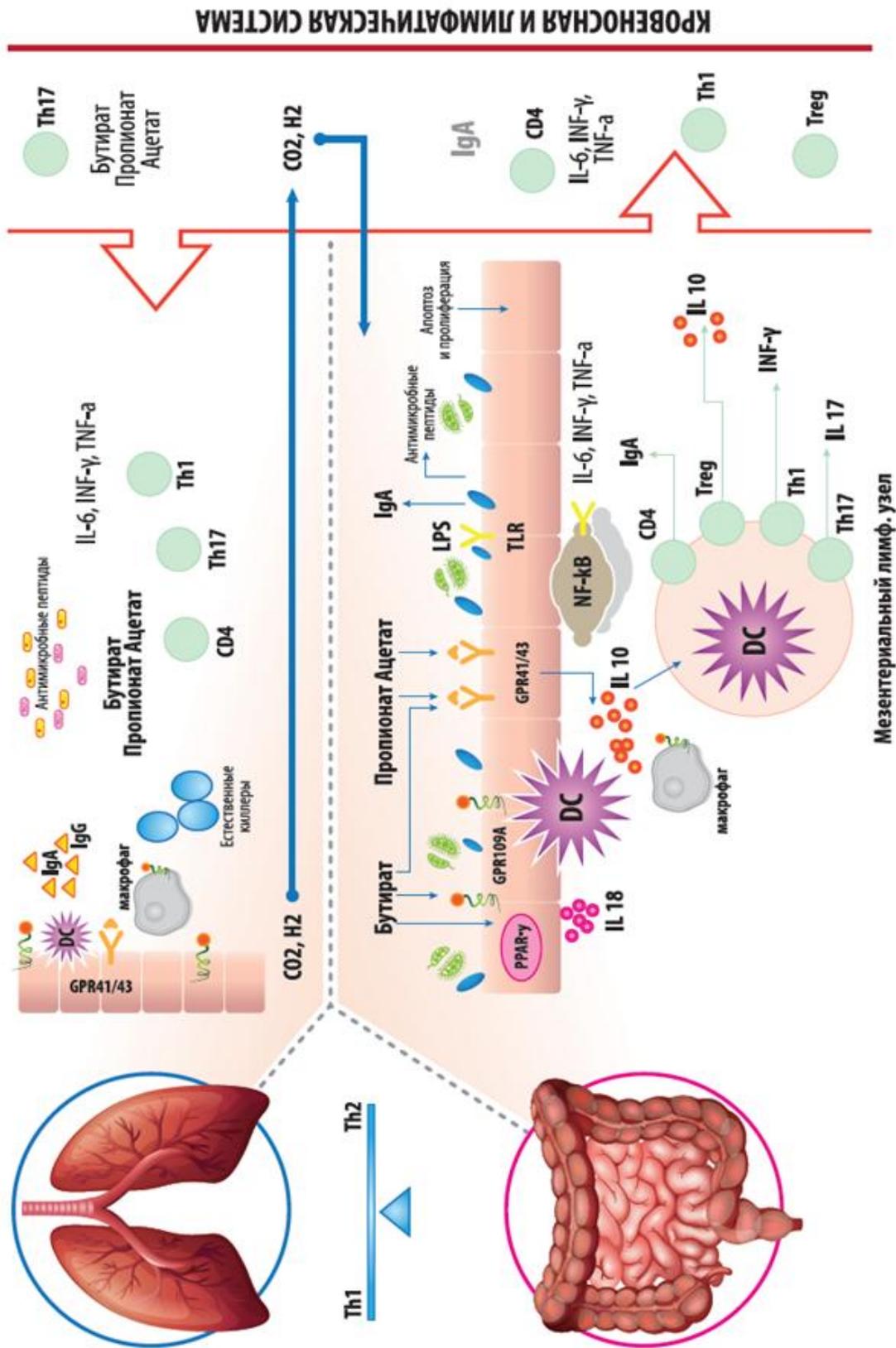


Рисунок 1. Модель регулирующего влияния КЦЖК на иммунологический ответ респираторного тракта

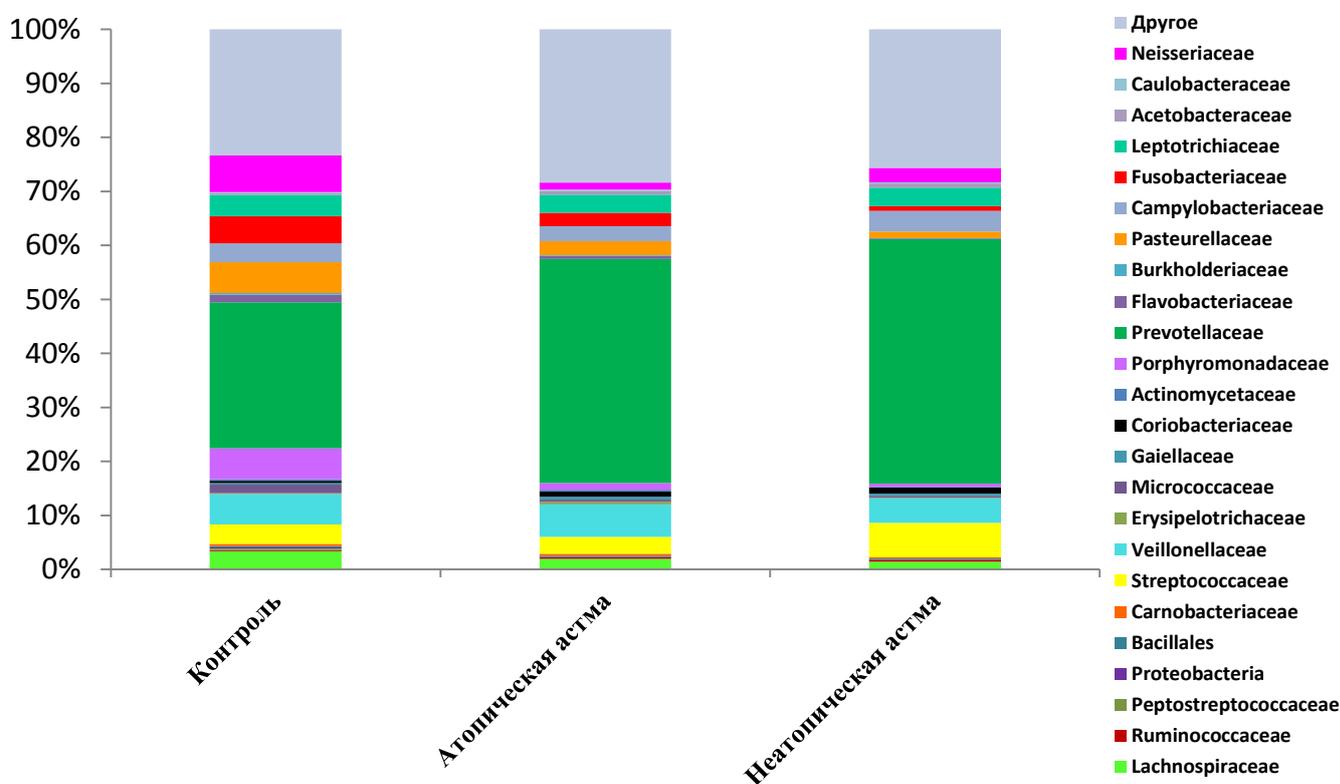
Состояние орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой

Наиболее часто встречающийся тип бактерий, в исследуемых группах, на основании секвенирования бактериальной 16S рРНК представлен филумом *Bacteroidetes*, объединяющим сахаролитические анаэробные бактерии (диаграмма 13). Внутри этого типа у больных атопической (15 человек) и неатопической (12 человек) БА, по сравнению с группой контроля (10 человек), выявлено статистически значимое снижение представленности семейств *Porphyromonadaceae* (соответственно 1,21 [0,0; 3,40] vs. 0,56 [0,0; 1,17] vs. 5,6 [0,0; 15,01], $p < 0,05$), *Flavobacteriaceae* (0,57 [0,0; 1,44] vs. 0,14 [0,0; 0,28] vs. 1,38 [0,0; 3,03], $p < 0,01$) и входящих в них родов *Porphyromonas* (0,55 [0,0; 2,15] vs. 0,04 [0,0; 0,13] vs. 0,66 [0,0; 1,77], $p < 0,05$), *Tannerella* (0,15 [0,06; 0,23] vs. 0,13 [0,004; 0,25] vs. 1,18 [0,0; 2,73], $p < 0,05$) и *Capnocytophaga* (0,13 [0,001; 0,26] vs. 0,04 [0,0; 0,1] vs. 0,83 [0,0; 2,01], $p < 0,01$). Семейство *Flavobacteriaceae* объединяет комменсальные (в частности грамотрицательные *Capnocytophaga*) и условно-патогенные бактерии, многие из которых продуцируют флавоцин, обладающий выраженным антибактериальным действием. *Porphyromonas*, относящиеся к семейству *Porphyromonadaceae*, представляют собой грамотрицательные анаэробные бактерии, привлекающие внимание исследователей в виду их возможного участия в канцерогенезе желудка и поджелудочной железы. *Tannerella* относят к грамотрицательным анаэробам, снижение, которых, свидетельствует об улучшении состояния пародонта и десен.

Следующий по распространенности тип бактерий орофарингеальной микрофлоры представлен *Firmicutes*. Тип *Firmicutes* характеризуется, у пациентов с БА, статистически значимым снижением в составе орофарингеальной микробиоты бактерий, относящихся к классу *Clostridia* (соответственно 2,09 [0,58; 3,6] vs. 1,84 [0,46; 3,23] vs. 4,02 [1,02; 7,03], $p < 0,05$), семейству *Peptostreptococcaceae* (0,03 [0,0; 0,7] vs. 0,01 [0,0; 0,02] vs. 0,28 [0,0; 0,65], $p < 0,05$), роду *Oribacterium* (семейство *Lachnospiraceae*) (0,34 [0,02; 0,87] vs. 0,22

[0,08; 0,37] vs. 1,32 [0,29; 2,79], $p < 0,05$). Бактерии, входящие в класс *Clostridia*, представляют собой в большей степени бутират продуцирующие микроорганизмы. В этой связи, снижение их количества неблагоприятным образом может отразиться на состоянии метаболической активности микробиоты и способствовать росту условно-патогенной флоры. Грамположительные анаэробы *Peptostreptococcus*, входящие в класс *Clostridia*, в норме призваны продуцировать H_2O_2 , способствуя поддержанию внутрипросветной рН среды, а так же участвовать в ферментации молочных белков и углеводов.

Диаграмма 13. Изменение состава орофарингеальной микробиоты у пациентов с БА на уровне семейств бактерий



Доля бактерий, относящихся к типу *Proteobacteria*, примерно соответствует доле *Firmicutes*. Тип *Proteobacteria* объединяет большинство грамотрицательных микроорганизмов, относящихся к факультативным или облигатным анаэробам. И демонстрирует, в случае НБА, снижение по сравнению с группой контроля семейства *Burkholderiaceae* ($p < 0,05$) и рода *Haemophilus* (семейство *Pasteurellaceae*) ($p < 0,05$). Этот факт, вряд ли стоит рассматривать с позиции неблагоприятного действия на микробиом, поскольку, условно-патогенные виды

названных микроорганизмов в случае роста могут способствовать развитию оппортунистических инфекций у человека.

Филум *Fusobacteria*, включающий в себя грамотрицательные анаэробы, определялся во всех исследуемых группах. У пациентов с БА, выявлено снижение представленности класса *Fusobacteriia* (2,58[1,34; 8,76] vs. 4,60[0,01; 12,22] vs. 9,17[4,05; 17,28] $p < 0,05$), рода *Fusobacterium* (1,19[0,0; 2,96] vs. 0,65[0,0; 1,4] vs. 3,85[0,0; 9,48] $p < 0,05$). Эти изменения наблюдались, как при АБА, так и в случае НБА. Представители рода *Fusobacterium* признаны важнейшими продуцентами КЦЖК – бутирата и ацетата. Таким образом, у пациентов с БА установлено снижение в составе орофарингеальной микробиоты доли таксонов, продуцирующих ключевые микробные метаболиты, необходимые для полноценной функциональной активности.

Другие типы бактерий (*Verrucimicrobia*, *Acidobacteria* и *Actinobacteria*) обнаруживаются в орофарингеальной микробиоте в значительно меньшем количестве, как у здоровых лиц, так и у больных бронхиальной астмой ($p > 0,05$).

Разнообразие бактериальных метагеномов у лиц страдающих БА не отличалось от группы здоровых добровольцев ($p > 0,05$). Индексы Шеннона, Чао1 и ACE были в широких пределах во всех группах. Индекс Шеннона составил 3,40 [3,09; 3,70] в группе контроля и 3,18 [2,95; 3,41] у пациентов с БА. Индексы Чао1 и ACE (*Abundance Coverage Estimator*), отражающие видовое разнообразие бактериального сообщества, составили 452,0 [261,01; 642,98] и 406,38 [242,85; 569,90] у здоровых лиц, а при БА 443,85 [333,59; 554,11] и 392,14 [289,80; 494,48], статистически значимых различий не получено ($p > 0,05$). Фенотип заболевания так же не оказал влияние на бактериальное разнообразие орофарингеального биотопа ($p > 0,05$).

В ходе корреляционного анализа полученных результатов, у пациентов с АБА получена значимая корреляция между представителями рода *Carnocytophaga* и ОФВ₁ ($r_s = 0,93$, $p < 0,01$); *Fusobacterium* и длительностью анамнеза и возрастом пациентов ($r_s = -0,83$, $p < 0,01$); *Oribacterium* ($r_s = -0,63$,

$p < 0,05$) и уровнем эозинофилов крови. Изменение ОФВ₁ продемонстрировало прямую корреляцию со значением *Clostridia* ($r_s = 0,61$), *Oribacterium* ($r_s = 0,61$), *Peptostreptococcaceae* ($r_s = 0,62$), *Porphyromonas* ($r_s = 0,73$). Обратная корреляционная зависимость, с анамнезом заболевания и возрастом пациентов, выявлена для семейств *Porphyromonadaceae* ($r_s = -0,81$) и *Flavobacteriaceae* ($r_s = -0,8$), класса *Fusobacteriia* ($r_s = -0,8$). Уровень общего IgE коррелировал с представленностью рода *Tannerella* ($r_s = -0,8$), *Flavobacteriia* ($r_s = -0,6$) и *Fusobacterium* ($-0,8$). С уровнем эозинофилов крови обратно взаимосвязаны значения *Peptostreptococcaceae* ($r_s = -0,31$), *Porphyromonadaceae* ($r_s = -0,4$), *Flavobacteriaceae* ($r_s = -0,4$), *Fusobacteriia* ($r_s = -0,4$), *Fusobacterium* ($r_s = -0,6$), а с уровнем эозинофилов мокроты - *Flavobacteriia* ($r_s = -0,63$).

При НБА значимая корреляция получена между *Fusobacterium* анамнезом, возрастом пациентов ($r_s = -0,53$, $p < 0,05$). Изменение ОФВ₁ продемонстрировало прямую корреляцию со значением *Clostridia* ($r_s = 0,59$), *Oribacterium* ($r_s = 0,64$), *Peptostreptococcaceae* ($r_s = 0,62$), *Porphyromonas* ($r_s = 0,71$), *Capnocytophaga* ($r_s = 0,8$). Обратная корреляционная зависимость, с анамнезом и возрастом пациентов, выявлена для семейств *Porphyromonadaceae* ($r_s = -0,69$ и $r_s = -0,65$) и *Flavobacteriaceae* ($r_s = -0,75$ и $r_s = -0,68$), класса *Fusobacteriia* ($r_s = -0,67$ и $r_s = -0,64$ соответственно).

Взаимосвязь кишечной и орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой

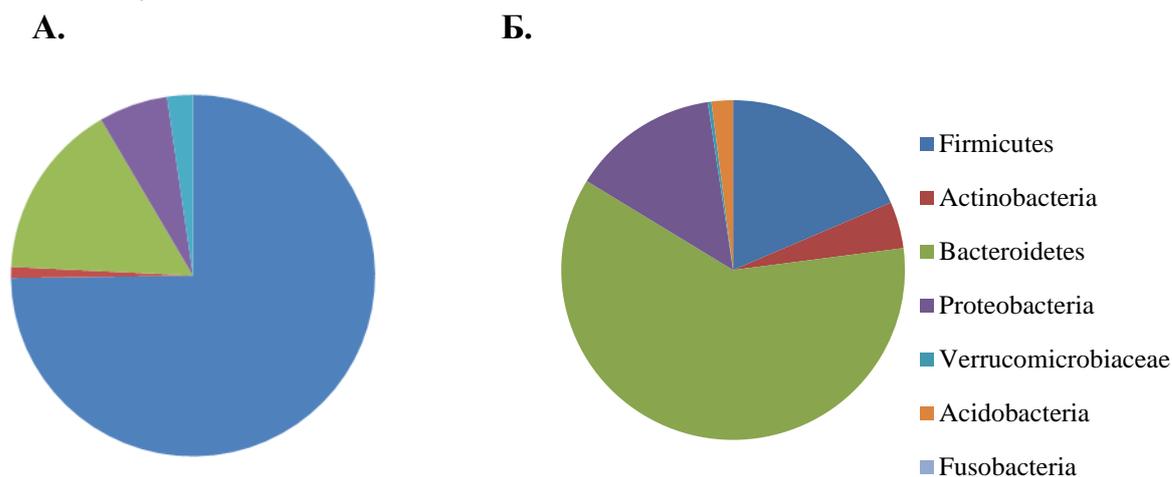
Анализ микробиоты кишечника у пациентов АБА и НБА позволил выявить 5 наиболее распространённых типов бактерий: *Firmicutes* (72,07% и 75,69% соответственно), *Bacteroidetes* (15,22% и 10,59%), *Proteobacteria* (5,91% и 9,90%), *Verrucimicrobia* (2,21% и 0,29%), *Actinobacteria* (0,95% и 0,44%). Определены 9 классов, 3 порядка, 14 семейств, 17 родов (диаграмма 14).

Микробиота орофарингеальной зоны при АБА и НБА астме представлена 7-ю, наиболее часто выявляемыми, типами бактерий: *Firmicutes* (15,55% и 17,39% соответственно), *Bacteroidetes* (51,12% и 52,90%), *Proteobacteria* (11,64% и

12,40%), *Verrucimicrobia* (0,29% и 0,26%), *Actinobacteria* (3,72% и 3,35%), *Fusobacteria* (5,90% и 4,40%), *Acidobacteria* (1,70% и 1,79%). Определены 13 классов, 5 порядков, 23 семейства, 22 рода.

Все выше перечисленные типы, семейства и рода бактерий так же обнаружены в составе метагеномных образцов кала и мазка задней стенки глотки у группы здоровых добровольцев. Спектр кишечной и орофарингеальной микробиоты на уровне типа бактерий, на примере пациентов атопической БА, представлен на диаграмме 14. Состав бактерий, населяющих орофарингеальную область, был более многообразен во всех исследуемых группах. Подтверждением этому служит расчет индексов бактериального разнообразия метагеномных образцов изучаемых биотопов, обсуждаемых выше.

Диаграмма 14. Состав кишечной (А) и орофарингеальной (Б) микробиоты на уровне типа у пациентов с атопической астмой



Мы проанализировали и сравнили количественное содержание бактерий орофарингеальной и кишечной микробиоты на уровне типа-класса-порядка-семейства-рода. Выявлено значительное преобладание кишечного биотопа на всех таксономических уровнях. В таблице 13 показана представленность семейств бактерий в образцах кала и орофарингеального мазка пациентов с IgE-ассоциированной БА. Аналогичная ситуация по количественному преобладанию бактерий кишечного компартмента на всех таксономических уровнях наблюдается у пациентов с НА и в группе контроля. Таким образом, несмотря на

разнообразии бактериального состава орофарингеальной микробиоты, ее количественное содержание заметно уступает микробиоте кишечника.

Таблица 13. Сравнительный анализ представленности некоторых семейств бактерий в образцах кала и орофарингеального мазка пациентов атопической БА *LogFC* – двоичный логарифм отношения средней доли бактерий, относящихся к данному семейству. *LogFC* < 0 соответствуют снижению численности таксона в мазке по сравнению с калом, и наоборот

Семейство бактерий	LogFC	Кал	Мазок	t-test, p	Mann-Wh., p	Spearman. r _s	Pearson r
Ruminococcaceae	-7,52	8161,1	34,7	1,59E-07	0,0003	-0,79	-0,89
Lachnospiraceae	-3,52	9146,0	789,0	4,07E-06	0,0003	-0,79	-0,80
Bacteroidaceae	-5,95	750,5	2,3	0,002	0,0003	-0,79	-0,54
Rikenellaceae	-6,05	762,9	1,6	0,007	0,002	-0,79	-0,48
Leptotrichiaceae	6,54	0,0	919,6	0,03	0,0001	0,98	0,82
Prevotellaceae	2,35	1208,5	6214,5	0,03	0,006	0,66	0,55
Veillonellaceae	4,18	61,8	1290,3	0,06	0,0006	0,76	0,73
Campylobacteraceae	6,29	0,2	786,8	0,08	0,0008	0,86	0,70
Fusobacteriaceae	6,84	0,1	1144,3	0,1	0,0008	0,86	0,65
Flavobacteriaceae	5,05	0,1	324,9	0,08	0,002	0,80	0,69
Bifidobacteriaceae	-3,69	164,3	3,5	0,09	0,01	-0,61	-0,29
Pasteurellaceae	6,77	2,0	1300,8	0,1	0,002	0,80	0,61
Streptococcaceae	5,30	11,4	835,0	0,1	0,0003	0,79	0,62

Мы проанализировали соотношение типов *Bacteroides/Firmicutes* обоих биотопов. У пациентов с IgE-опосредованной БА по сравнению с группой здоровых добровольцев соотношение *Bacteroides/Firmicutes* среди бактерий населяющих кишечник имело тенденцию к увеличению (от 0,16 до 0,21 соответственно). Аналогичная тенденция наблюдалась и среди бактерий орофарингеальной зоны - соотношение *Bacteroides/Firmicutes* в группе контроля составило 2,30, в то время как у пациентов атопической астмой 3,28. При неатопической форме заболевания этот индекс имел тенденцию к снижению в кишечной микробиоте (до 0,13), а среди микроорганизмов, контаминирующих заднюю стенку глотки, составил 3,04. Таким образом, сопоставление и сравнение

кишечной и орофарингеальной микробиоты свидетельствует в пользу видоспецифичности каждого из изучаемых биотопов.

Выявленные в ходе исследования изменения состава микробиоты кишечного и орофарингеального биотопов, изменение метаболической активности микробиоты могут служить биологическими детерминантами формирования заболевания. Таким образом, есть все основания утверждать, что изменение состава микробиоты человека служит одним из звеньев патогенеза БА.

Выводы

1. Анализ результатов секвенирования 16S рРНК бактерий позволил определить количественные и качественные различия в составе кишечной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой в сравнении со здоровыми добровольцами. У больных атопической и неатопической астмой по сравнению со здоровыми добровольцами преобладали бактерии типа *Proteobacteria* ($p < 0,01$). При атопической астме увеличение *Proteobacteria* наблюдалось за счет *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*, при неатопическом фенотипе заболевания - преимущественно за счет класса *Gammaproteobacteria*. Выявлены существенные различия внутри бактериальных типов *Firmicutes* (снижение *Faecalibacterium* и *Anaerostipes*, $p < 0,05$) и *Bacteroidetes* (*Alistipes*, $p < 0,05$), связанные со снижением представленности бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты у пациентов с бронхиальной астмой.

2. Выявлено, что изменение содержания отдельных бактерий кишечного биотопа (уменьшение рода *Anaerostipes* и *Faecalibacterium*, увеличение класса *Bacilli* и типа *Proteobacteria*) у пациентов с БА ассоциировано с длительностью заболевания (*Anaerostipes* $r_s = -0,28$, *Faecalibacterium* $r_s = -0,29$, *Proteobacteria* $r_s = 0,33$), повышением уровня эозинофилов крови (*Anaerostipes* $r_s = -0,46$, *Faecalibacterium* $r_s = 0,25$) и мокроты (*Anaerostipes* $r_s = -0,45$, *Faecalibacterium* $r_s = 0,31$, *Bacilli* $r_s = -0,55$), увеличением IgE (*Anaerostipes* $r_s = 0,26$, *Faecalibacterium* $r_s = 0,29$) и снижением функции внешнего дыхания (уменьшение ОФВ₁) (*Anaerostipes* $r_s = 0,24$, *Proteobacteria* $r_s = -0,25$). При неатопическом фенотипе,

длительность анамнеза так же взаимосвязана со снижением содержания бактерий рода *Alistipes* ($r_s = -0,46$) и увеличением семейства *Moraxellaceae* ($r_s = 0,57$).

3. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке, определяемый водородным дыхательным тестом с лактулозой, у пациентов с atopической БА встречается значительно чаще, чем при нетопическом фенотипе заболевания (67% vs 33%; $p < 0,05$). Установлено, что у лиц страдающих atopической астмой с наличием СИБР снижено содержание относительного количества бактерий классов *Negativicutes*, *Erysipelotrichia*, *Bacteroidia*, семейств *Erysipelotrichaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Bacillaceae*, родов *Barnesiella*, *Paraprevotella*, *Pyrolobus*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Coprobacter*, *Bacillus* ($p < 0,05$). При неатопическом фенотипе, в случае наличия СИБР, отмечалось повышение представленности семейства *Bacteroidaceae* и родов *Paraprevotella*, *Odoribacter*, *Bacteroides*, *Butyricoccus*, *Parasutterella* ($p < 0,05$).

4. Клинические проявления нарушений микробиоты кишечника у больных с астмой не специфичны и не связаны с фенотипом заболевания ($p > 0,05$). Вместе с тем, у больных бронхиальной астмой наличие СИБР ассоциировано с основными патогенетическими механизмами заболевания: при atopической астме выявлены более высокие титры общего IgE ($p < 0,01$), бо'льшее количество эозинофилов мокроте ($p < 0,001$) и более выраженное снижение объема форсированного выдоха за 1 сек. ($p < 0,01$); при нетопической астме, наличие СИБР связано только с изменением функции внешнего дыхания (снижение ОФВ₁ ($p < 0,01$)).

5. У больных с бронхиальной астмой изменена метаболическая активность кишечной микробиоты: снижено общее содержание короткоцепочечных жирных кислот в кале ($p < 0,001$), снижены абсолютные концентрации ацетата, пропионата и бутирата ($p < 0,001$), а так же суммарное содержание изокислот ($p < 0,001$). У большинства обследованных пациентов (84%) выявлен анаэробный спектр короткоцепочечных жирных кислот, у 16% больных - аэробный.

6. Снижение метаболической активности бактерий кишечного биотопа у пациентов atopической бронхиальной астмой сопровождается повышением

уровня общего IgE ($r_s = -0,66$, $p < 0,05$) и содержания эозинофилов крови ($r_s = -0,53$, $p < 0,05$), снижением ОФВ₁ ($r_s = -0,36$). При неатопическом фенотипе бронхиальной астмы прослеживается взаимосвязь с возрастом пациентов ($r_s = 0,40$) и снижением ОФВ₁ ($r_s = -0,77$).

7. Анализ результатов секвенирования 16S рНК бактерий позволил выявить количественные и качественные различия в составе орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой. Внутри типа *Firmicutes* выявлено снижение метагеномных образцов класса *Clostridia* ($p < 0,05$), преимущественно за счет *Peptostreptococcaceae* ($p < 0,05$) и *Oribacterium* ($p < 0,05$). Тип *Bacteroidetes* в свою очередь характеризовался снижением семейств и входящих в них родов *Flavobacteriaceae* ($p < 0,01$) и *Porphyromonadaceae* ($p < 0,05$). Внутри типа *Fusobacteria* выявлено снижение представленности класса *Fusobacteriia* ($p < 0,05$), рода *Fusobacterium* ($p < 0,05$). Изменения микробных популяций у пациентов с атопический и неатопическим фенотипом бронхиальной астмы были однонаправленные ($p > 0,05$).

8. Микробиота кишечного и орофарингеального биотопа пациентов с бронхиальной астмой не отличается по разнообразию представленных видов бактерий от группы здоровых добровольцев ($p > 0,05$). Снижение содержания отдельных бактерий орофарингеального биотопа (типов *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*) у пациентов с атопической бронхиальной астмой ассоциировано с длительностью заболевания (под *Fusobacterium* $r_s = -0,83$, $p < 0,01$), повышением уровня эозинофилов крови (под *Oribacterium* $r_s = -0,63$, $p < 0,05$) и мокроты (кл. *Flavobacteriia* $r_s = -0,63$), увеличением IgE (под *Fusobacterium* $r_s = -0,8$, под *Tannerella* $r_s = -0,8$), и снижением функции внешнего дыхания (уменьшение ОФВ₁) (под *Capnocytophaga* $r_s = 0,93$, $p < 0,01$). При неатопическом фенотипе бронхиальной астмы прослеживается взаимосвязь с возрастом пациентов (под *Fusobacterium* $r_s = -0,53$, $p < 0,05$), длительностью анамнеза (под *Fusobacterium* $r_s = -0,53$, $p < 0,05$, сем *Flavobacteriaceae* $r_s = -0,68$) и снижением ОФВ₁ (под *Capnocytophaga* $r_s = 0,8$, под *Oribacterium* $r_s = 0,64$, под *Porphyromonas* $r_s = 0,71$).

9. Соотношение типов *Bacteroides/Firmicutes* у пациентов с atopической БА имело тенденцию к увеличению в кишечном и орофарингеальном биотопе (0,21 и 3,28) по сравнению со здоровыми добровольцами (0,16 и 2,3). При неатопической астме соотношение снижалось в кишечной микробиоте (до 0,13) и увеличивалось в орофарингеальном биотопе (3,04).

10. В случае наличия СИБР, назначение в составе комплексной терапии пациентам с бронхиальной астмой препаратов, модулирующих состав микробиоты, способствовало нормализации иммунного ответа в виде снижения уровня общего Ig E ($p < 0,01$), улучшения вентиляционной функции легких (ОФВ₁), снижения частоты госпитализаций в последующий год наблюдения (с 2-3 раз в год до 1-2 раз). При atopической астме реже госпитализировались пациенты в случае лечения комбинацией препаратов рифаксимин+пробиотик, включающий *B.bifidum* Ac2773D, *B.longum* Ac2775D, *B.infantis* Ac2774D, *L. rhamnosus* B3170D, и с длительностью анамнеза до 10 лет ($p < 0,05$). У больных неаллергической астмой достоверных различий в эффективности пробиотика не выявлено ($p > 0,05$).

11. Включение в схему лечения больным с БА мультиштаммового пробиотика, содержащего *L.gassery* KS-13, *L.gasser* LAC-343, *L.ramnosus* LCS-742, *B.bifidum* G9-1, *B.longum* MM-2, *B.longum* BB536 Strain M, *B.infantis* M-63, *B.breve* M16V *mun* T, *B.lactis* B1-04 приводит к увеличению количества короткоцепочечных жирных кислот, нормализации их спектра, нормализации анаэробного индекса и отношения изокилот к кислотам ($p < 0,05$), что служит признаком восстановления метаболической активности микробиоты кишечника.

Практические рекомендации

1. Нарушение в составе микробиоты – значимый фактор в развитии и течении бронхиальной астмы. Пациентам с бронхиальной астмой необходимо скрининговое обследование, с целью диагностики изменений микробиоты, в том числе проведение водородного дыхательного теста для выявления избыточного бактериального роста в тонкой кишке, определения уровня и спектра короткоцепочечных жирных кислот, секвенирование бактериальной 16S рРНК.

2. Принимая во внимание наличие взаимосвязи основных патогенетических механизмов бронхиальной астмы, с изменением состава микробиоты, пациентам показано назначение мультиштаммового пробиотика, содержащего *B.bifidum* Ac2773D, *B.longum* Ac2775D, *B.infantis* Ac2774D, *L.rhamnosus* B3170D или же препарата содержащего *L.gassery* KS-13, *L.gasser* LAC-343, *L.ramnosus* LCS-742, *B.bifidum* G9-1, *B.longum* MM-2, *B.longum* BB536 Strain M, *B.infantis* M-63, *B.breve* M16V *mun* T, *B. lactis* B1-04 курсом не менее 1 месяца.
3. В случае выявления СИБР, вне зависимости от его клинических проявлений (или отсутствия таковых), целесообразно проведение селективной деконтаминации кишки.
4. Для лечения СИБР необходимо назначение антибактериального препарата рифаксимин в дозе 600 мг в сутки сроком на 7 дней и последующим назначением мультиштаммового пробиотического препарата, содержащего *B. bifidum* Ac2773D, *B.longum* Ac2775D, *B.infantis* Ac2774D, *L.rhamnosus* B3170D или же препарата содержащего *L.gassery* KS-13, *L.gasser* LAC-343, *L.ramnosus* LCS-742, *B.bifidum* G9-1, *B.longum* MM-2, *B.longum* BB536 Strain M, *B.infantis* M-63, *B.breve* M16V *mun* T, *B.lactis* B1-04 (не менее 1 месяца).
5. Контроль эффективности коррекции изменений микробиоты кишечника целесообразно проводить водородным дыхательным тестом, определением уровня и спектра короткоцепочечных жирных кислот.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Evsyutina Y., Komkova I., **Zolnikova O.**, Tkachenko P., Ivashkin V. Lung microbiome in healthy and diseased individuals // **World J Respirol.** – 2017-№2 – P.39 - 47.
2. **Zolnikova O.**, Komkova I., Potskherashvili N., Ivashkin V. Application of probiotics for acute respiratory tract infections // **Ital. J. Med.**–2018.–№1.–P. 32 - 38.
3. Ivashkin V., **Zolnikova O.**, Potskherashvili N., Trukhmanov A., Kokina N., Dzhakhaya N. A correction of a gut microflora composition for the allergic bronchial asthma complex therapy // **Ital. J. Med.** - 2018. – Vol. 12 (4). – P. 260 – 264.

4. Ivashkin V., **Zolnikova O.**, Potskherashvili N., Trukhmanov A., Kokina N., Dzhakhaya N., Sedova A., Bueverova E. A metabolic activity of the intestinal microflora in patients with bronchial asthma // **Clinics and Practice**—2019 -N9 –P.18–22.
5. Гуревич К.Г., Никитюк Д.Б., Никонов Е.Л., Заборова В.А., Веселова Л.В., **Зольникова О.Ю.** Роль пробиотиков и микробиоты в пищеварении, метаболизме нутриентов, гормонов и в поддержании гормонального фона. // **Профилактическая медицина.** – 2018. - № 3. - С. 45 - 50.
6. Поцхверашвили Н.Д., **Зольникова О.Ю.**, Кокина Н.И., Джахая Н.Л., Седова А.В., Бueверова Е.Л. Трухманов А.С., Ивашкин В.Т. Синдром избыточного бактериального роста у больных бронхиальной астмой// **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии.** - 2018. – №4. – С. 47 – 54.
7. **Зольникова О.Ю.**, Поцхверашвили Н.Д., Кокина Н.И., Трухманов А.С., Ивашкин В.Т. Тест контроля бронхиальной астмы как способ оценки течения заболевания. // **Клиническая медицина.** - 2018. – Т. 96, № 10. – С. 914 - 917.
8. Ивашкин В.Т., **Зольникова О.Ю.**, Поцхверашвили Н. Д., Кокина Н.И., Бueверова Е.Л., Седова А.В., Трухманов А.С. Перспективы применения пробиотиков при острых инфекциях респираторного тракта. // **Пульм онология.** – 2019. Т. 29, № 5. – С. 612 – 619.
9. Гуревич К.Г., Никитюк Д.Б., Никонов Е.Л., Заборова В.А., Шелехова Т.Ю., **Зольникова О.Ю.** Применение пробиотиков в составе комплексной терапии дисбиотических нарушений при некоторых заболеваниях кишечника // **Вопросы питания.** - 2019. - Т. 88, № 1. - С. 77 – 84.
10. Ивашкин В.Т., **Зольникова О.Ю.** Синдром раздраженного кишечника с позиций изменений микробиоты. // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.** – 2019. – Т. 29, № 1. - С. 87 – 95.
11. **Зольникова О.Ю.**, Поцхверашвили Н.Д., Кокина Н.И., Трухманов А.С., Ивашкин В.Т. Короткоцепочечные жирные кислоты кишечника у пациентов с

бронхиальной астмой. // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.** – 2019. – Т. 29, № 2. С. 53 - 59.

12. **Зольникова О.Ю.**, Ивашкин К.В., Буеверова Е.Л., Ивашкин В.Т. Микробиота кишечника, нутриенты и пробиотики с позиции взаимодействия оси "кишка-легкие" // **Вопросы питания.** - 2019. - Т. 88, № 3. - С. 13 - 22.

13. **Зольникова О.Ю.**, Ивашкин В.Т. Спектр метаболитов кишечной микрофлоры у пациентов астмой // **Российский иммунологический журнал.** - 2019. -№2.-С.276 - 277.

14. Ивашкин В.Т., **Зольникова О.Ю.** Избыточный бактериальный рост в тонкой кишке – фактор утяжеляющий течение атопической астмы // **Российский иммунологический журнал.** - 2019. – Т. 13, №2. – С. 887 - 289.

15. **Зольникова О.Ю.**, Поцхверашвили Н.Д., Трухманов А.С., Кокина Н.И., Ивашкин В.Т. Пробиотические бактерии как составляющая противовирусного иммунитета.// **Российский аллергологический журнал.**–2019.-№ 1. – С. 65 – 67.

16. **Зольникова О.Ю.**, Поцхверашвили Н.Д., Трухманов А.С., Кокина Н.И., Ивашкин В.Т. Результаты применения пробиотиков в комплексной терапии бронхиальной астмы// **Российский аллергологический журнал.**–2019.-№1.– С.68–70.

17. **Зольникова О.Ю.**, Поцхверашвили Н.Д., Кокина Н.И., Трухманов А.С., Ивашкин В.Т. Изменение кишечной микробиоты как фактор риска развития бронхиальной астмы // **ВРАЧ.** – 2020. – Т. 31, № 1. – С. 3 – 7.

18. **Зольникова О.Ю.**, Поцхверашвили Н.Д., Кокина Н.И., Трухманов А.С., Ивашкин В.Т. Влияние синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке на течение бронхиальной астмы// **Молекулярная медицина.**–2020 - №1.– С. 48–52.

19. Ivashkin V., Fadeeva M., Skhirtladze M., **Zolnikova O.** Intestinal microbiota in the pathogenesis of chronic heart failure// **Italian Journal of Medicine.**- 2020. - Vol.14.- P.1-8.

20. **Зольникова О.Ю.**, Поцхверашвили Н.Д., Кокина Н.И., Трухманов А.С., Ивашкин В.Т. Изменение орофарингеального микробиома при бронхиальной астме. // **ВРАЧ.** – 2020. - № 2. – С. 37 – 41.
21. **Зольникова О.Ю.**, Поцхверашвили Н.Д., Кокина Н.И., Трухманов А.С., Ивашкин В.Т. Восстановление метаболической активности микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.**– 2020.– № 1. - С. 26 – 33.
22. **Зольникова О.Ю.**, Поцхверашвили Н.Д., Кудрявцева А.В., Краснов Г.С., Гуватова З.Г., Трухманов А.С., Кокина Н.И., Ивашкин В.Т. Изменение кишечного микробиома при бронхиальной астме// **Терапевтический архив** - 2020. - №1.– С.56–60.
23. Ивашкин К.В., Решетова М.С., **Зольникова О.Ю.**, Ивашкин В.Т., Корнеева В.Р., Широкова Е.Н. Место пробиотиков в комплексной терапии различных заболеваний ЖКТ // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.** – 2020. – Т. 30, № 1. - С. 42 – 48.
24. **Зольникова О.Ю.**, Ивашкин К.В., Корнеева В.Р., Ивашкин В.Т. Микробиота желудочно-кишечного тракта и аллергические заболевания: что известно? // **Вопросы детской диетологии.** – 2020.- № 1.- С.48 –55.
25. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Абдулганиева Д.И., Алексеенко С.А., Ивашкина Н.Ю., Корочанская Н.В., Маммаев С.Н., Полуэктова Е.А., Трухманов А.С., Успенский Ю.П., Цуканов В.В., Шифрин О.С., **Зольникова О.Ю.**, Ивашкин К.В., Лапина Т.Л., Масленников Р.В., Ульянин А.И. Практические рекомендации Научного сообщества по содействию клиническому изучению микробиома человека (НСОИМ) и Российской гастроэнтерологической ассоциации (РГА) по применению пробиотиков для лечения и профилактики заболеваний гастроэнтерологического профиля у взрослых. // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.** 2020. - №2.-С. 76-89.