

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М.
СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Зольникова Оксана Юрьевна

**Микробиота кишечника и дыхательных путей как патогенетическое звено
бронхиальной астмы**

14.01.04 – Внутренние болезни

Диссертация
на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
Академик РАН, д.м.н.
профессор Ивашкин В.Т.

Москва – 2020

Оглавление

Введение.....	6
Актуальность и степень разработанности темы исследования.....	6
Цель настоящей работы.....	7
Задачи исследования.....	7
Научная новизна	9
Теоретическая и практическая значимость работы	9
Основные положения, выносимые на защиту.....	10
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	12
Личное участие автора в получении результатов	13
Внедрение результатов в практику.....	14
Объём и структура диссертации	14
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	14
Глава 1. Обзор литературы.....	15
1.1 Микробиота кишечника.....	15
1.2 Микробиота легких.....	24
1.3 Ось “кишка – легкие”.....	29
1.4 Бронхиальная астма и микробиота.....	32
1.5 Эффект пробиотиков в лечении респираторных заболеваний.....	44
1.6 Эффект пробиотиков в лечении бронхиальной астмы и аллергии.....	47
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	52
2.1 Дизайн исследования.....	52
2.2 Характеристика пациентов.....	53
2.3 Характеристика контрольных групп.....	59
2.4 Методы обследования.....	63
2.5 Статистическая обработка результатов	70
Глава 3. Состояние микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой.....	71

3.1 Состав микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы.....	71
3.2 Определение бактериального разнообразия микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы.....	78
3.3 Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рРНК бактерий в образцах кала с клинико-лабораторными проявлениями атопической бронхиальной астмы	79
3.4 Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рРНК бактерий в образцах кала с клинико-лабораторными проявлениями неатопической бронхиальной астмы.....	81
3.5 Сравнение состава микробиоты кишечника пациентов с атопической бронхиальной астмой с учетом их СИБР статуса.....	83
3.6 Сравнение состава микробиоты кишечника пациентов с неатопической бронхиальной астмой с учетом их СИБР статуса.....	87
Глава 4. Патогенетическое и клиническое значение синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке у пациентов с бронхиальной астмой	91
4.1 Частота выявления и основные проявления синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке (СИБР), у больных бронхиальной астмой.....	92
4.2 Сравнительный анализ основных клинико-лабораторных проявлений атопической бронхиальной астмы с/без СИБР.....	98
4.3 Сравнительный анализ основных клинико-лабораторных проявлений неатопической бронхиальной астмы с/без СИБР.....	100
4.4 Эффективность лечения СИБР у больных с атопической бронхиальной астмой.....	103
4.5 Эффективность лечения СИБР у больных с неатопической бронхиальной астмой.....	107

4.6 Течение атопической бронхиальной астмы в последующий год наблюдения после лечения СИБР.....	109
---	-----

4.7 Течение неатопической бронхиальной астмы в последующий год наблюдения после лечения СИБР	111
--	-----

Глава 5. Метаболическая активность кишечной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой.....114

5.1 Содержание бактериальных кворум-молекул - короткоцепочечных жирных кислот в кале у пациентов, страдающих бронхиальной астмой и здоровых лиц.....	114
--	-----

5.2 Сравнительный анализ экспрессии короткоцепочечных жирных кислот в группах с атопической и неатопической бронхиальной астмой.....	117
--	-----

5.3 Спектр короткоцепочечных жирных кислот у пациентов, страдающих бронхиальной астмой и здоровых лиц.....	118
--	-----

5.4 Корреляция клинико-лабораторных проявлений заболевания и метаболической активности микробиоты кишечника.....	121
--	-----

5.5 Эффективность коррекции кишечной микробиоты у пациентов с атопической бронхиальной астмой.....	123
--	-----

Глава 6. Состояние орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой.....129

6.1 Состав орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы.....	129
--	-----

6.2 Сравнение состава орофарингеальной микробиоты пациентов с атопической и неатопической астмой.....	136
---	-----

6.3 Определение бактериального разнообразия орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы.....	136
---	-----

6.4 Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рРНК бактерий в образцах мазка задней стенки глотки с клинико-лабораторными проявлениями атопической бронхиальной астмы.....	137
--	-----

6.5 Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рРНК бактерий в образцах мазка задней стенки глотки с клинико-лабораторными проявлениями неатопической бронхиальной астмы.....	139
Глава 7. Взаимосвязь кишечной и орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой.....	141
7.1 Сравнение качественных и количественных характеристик кишечной и орофарингеальной микробиоты.....	141
7.2 Определение соотношения типов <i>Bacteroides/Firmicutes</i> кишечной и орофарингеальной микробиоты у пациентов с atopической и неатопической бронхиальной астмой и группы контроля.....	147
Глава 8. Обсуждение результатов.....	154
Выводы.....	171
Практические рекомендации.....	175
Список сокращений.....	177
Список литературы	179
Приложение 1. Классификация бронхиальной астмы по клиническому течению заболевания.....	206
Приложение 2. Критерии контролируемости бронхиальной астмы.....	207
Приложение 3. АСТ - тест по контролю над астмой (Asthma Control Test).....	208
Приложение 4. Интерпретация результатов АСТ-теста.....	209

Введение

Актуальность темы

Бронхиальная астма (БА) относится к наиболее часто встречающимся заболеваниям респираторного тракта, сопровождается высокой частотой инвалидизации и смертности пациентов [23, 24, 31, 37, 235].

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 [15, 23, 24, 31, 37, 235]. Однако, неуклонный рост заболеваемости БА, а также недостаточно эффективная терапия у ряда пациентов диктует необходимость дальнейшего изучения особенностей течения заболевания и факторов его патогенеза [171, 186, 235]. В настоящее время, исследователями во всем мире уделяется большое внимание роли естественной микробиоты человека в возникновении и прогрессировании ряда заболеваний внутренних органов [124, 159]. 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 [67, 159, 195, 220]. Установлено, что нарушение состава микробиоты кишечника и ее метаболической активности способствует развитию иммунологической интолерантности, с формированием IgE-опосредованного иммунного ответа [30, 78, 111, 153], развитие которого, в первую очередь, связано с взаимодействием бактерий с Toll-подобными рецепторами, дендритными клетками, Т - 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 [159, 160]. Эта новая область исследований

демонстрирует, что различия в микробиоте, могут быть так же ассоциированы с важными клиническими проявлениями БА (например: частота обострений и чувствительность к кортикостероидам) [26, 34, 96, 200].

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 клинко-функциональных характеристик бронхиальной астмы.

Таким образом, все вышеизложенное определяет актуальность изучения микробиоты кишечного и респираторного биотопа у пациентов с БА; выявление патогномоничных изменений состава микробиоты в соответствии с клиническим вариантом течения БА; оценки их вклада в патогенез бронхиальной астмы; определение оптимальных схем лечения, направленных на коррекцию состава микробиоты.

Цель настоящей работы

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 бронхиальной астмой.
2. Изучить связь изменений микробиоты кишечника с основными проявлениями бронхиальной астмы.

3. Сопоставить клинический вариант течения бронхиальной астмы с особенностями качественных и количественных изменений состава кишечной микробиоты.
4. Определить частоту выявления синдрома избыточного бактериального роста (СИБР) в тонкой кишке у пациентов с бронхиальной астмой, в зависимости от фенотипа течения заболевания.
5. Определить связь СИБР с основными патогенетическими механизмами формирования бронхиальной астмы.
6. Охарактеризовать состав орофарингеальной микробиоты у больных бронхиальной астмой.
7. Изучить связь изменений орофарингеальной микробиоты с основными проявлениями бронхиальной астмы.
8. Сопоставить клинический вариант течения бронхиальной астмы с особенностями качественных и количественных изменений состава орофарингеальной микробиоты.
9. Сопоставить состав микробиоты орофарингеальной зоны и микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой.
10. Выявить профиль биомаркеров (метаболитов микробиоты), характерных для пациентов бронхиальной астмой.
11. Оценить влияние назначений антибактериального и пробиотических препаратов в составе комплексного лечения бронхиальной астмы 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 бронхиальной астмой. 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 бронхиальной астмы, а также проанализирована роль качественных и количественных нарушений микробиоты в патогенезе бронхиальной астмы (уровень аллергического ответа, нарушение функции внешнего дыхания).

Проведен сравнительный анализ эффективности назначения в комплексной терапии БА препаратов, влияющих на состав микрофлоры (антибактериального препарата и мультиштаммовых пробиотиков). Исследовано их влияния на клинико-лабораторные проявления БА и течение заболевания.

Практическая значимость работы

Получены новые данные о роли микробных сообществ в развитии бронхиальной астмы, 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 микробиоты, пациентам с атопическим фенотипом БА патогенетически обосновано и существенно повышает эффективность стандартной терапии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Анализ состояния микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой свидетельствует, что изменение микробиоты служит важным патогенетическим звеном в развитии заболевания. Наблюдаются количественные и качественные различия в составе кишечной микрофлоры у пациентов бронхиальной астмой 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 бронхиальной астмой, 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. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке, определяемый водородным дыхательным тестом с лактулозой, у пациентов атопической БА встречается значительно чаще, чем при неатопическом фенотипе заболевания, и служит фактором утяжеляющим течение заболевания.

4. Наличие синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке ассоциировано с основными патогенетическими механизмами заболевания. При атопической 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 (уменьшение ОФВ₁).

5. Клинические проявления нарушений микробиоты кишечника у больных с астмой не специфичны и не связаны с фенотипом заболевания.

6. Снижение метаболической активности кишечной микробиоты у больных бронхиальной астмой 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 бронхиальной астмой 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 бронхиальной астмой 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 бронхиальной астмы не отличается по биоразнообразию, представленных видов бактерий от группы здоровых добровольцев.

11. Соотношение типов *Bacteroides/Firmicutes* у пациентов atopической бронхиальной астмой, 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 бронхиальной астмы препаратов, способных регулировать состав микробиоты (антибиотик, мультиштаммовые пробиотики), патогенетически обосновано и приводит к уменьшению выраженности основных клинко-лабораторных проявлений заболевания, способствует улучшению метаболической активности микробиоты и снижению частоты госпитализаций.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

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.

Материалы диссертации доложены на конференциях НСОИМ “Патофизиология, клиника и последствия нарушения микробиоты” (2018, 2019 гг, Москва), Российских гастроэнтерологических неделях (2018, 2019 гг. Москва), на сессиях Национальной Школы Гастроэнтерологии, Гепатологии РГА (2018, 2019 гг, Москва, Казань), XXVIII Национальном конгрессе по болезням органов дыхания (2018 г, Москва), Всероссийской научно-практической конференции “УралГастро” (2019 г, Екатеринбург), Сибирской межрегиональной научно-

практической конференции “Патология органов пищеварения. Современные стандарты диагностики и лечения” (2019, Красноярск). V научно-практическом Невском конгрессе “Реалии 2019 и новые горизонты в гастроэнтерологии и гепатологии” (2019, Санкт Петербург). На конференции “Мультидисциплинарный подход в диагностике и лечении заболеваний пищеварительной и дыхательной систем” (2019, Казань).

По теме диссертационного исследования опубликовано 18 научных работ, в том числе 14 работ в изданиях, рекомендованных ВАК Российской Федерации, из них 5 публикаций также индексируется в базах Scopus и Web of Science; 4 публикации в международных изданиях, индексируемых в базах Scopus и Web of Science

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 в практику

Основные положения диссертационной работы нашли практическое применение в отделение пульмонологии Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии Первого МГМУ имени И. М. Сеченова (директор клиники – академик РАН, профессор В. Т. Ивашкин), а также используются в учебно-методической работе со студентами и курсантами факультета последиplomного образования на кафедре пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины имени Н.В.Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Объём 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, обсуждения полученных результатов), выводы и практические рекомендации список сокращений, 4 приложения. Библиографический указатель содержит 259 источников литературы (38 отечественных и 221 зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 42 таблицами, 7 рисунками, 22 диаграммами, 3 схемами.

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.

Глава I.

Обзор литературы

Введение

В последние годы внимание мирового медицинского сообщества обращено к исследованиям микробиома человека. Изучается роль симбиотных микроорганизмов в развитии многих социально-значимых нозологических форм. Признано, что нарушение состава кишечной микробиоты служит одной из причин заболеваний не только желудочно-кишечного тракта, но и ассоциировано с развитием атопических реакций, ожирения, сердечно-сосудистых и психических заболеваний и др. В том числе, установлена возможность взаимодействия посредством микробиоты между кишечником и легкими, получившая название ось “кишка – легкие”. Это позволяет рассматривать вероятность участия микрофлоры в развитии заболеваний респираторного тракта, таких как бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких и др.

1.1 Микробиота кишечника

Наибольшее количество бактерий, населяющих организм человека, обитает в кишечнике, составляя порядка 70% от всех представителей бактериальной флоры человека [142, 153, 159]. По-видимому, формирование микробиоты происходит в период внутриутробного развития. Эта гипотеза находит все больше подтверждений, поскольку бактериальные сообщества выявлены в плаценте и меконии, ранее считавшиеся стерильными [39, 40, 202, 206]. Основное становление кишечного биотопа приходится на ранний постнатальный период и подвержено влиянию большого количества факторов (способ родоразрешения, особенности питания, прием лекарственных препаратов, физическая активность, регион проживания и др.) [49, 51, 56]. Многие авторы обсуждают, что способ родоразрешения играет в этом процессе ключевую роль [19, 43, 51]. Установлено,

что младенцы, рожденные при помощи кесарева сечения, как правило, имеют в составе кишечной микрофлоры больше видов *Staphylococcus*, *Bacillales*, *Propionobacterineae*, *Corynebacterineae*, *Firmicutes* и *Acinetobacter* с меньшим количеством *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, в то время как в случае естественных родов выявляется усиление колонизации кишечного биотопа *Clostridium* [56, 211, 219]. Клостридии, в последующем, активно метаболизируют пищевые волокна в короткоцепочечные жирные кислоты, которые обладают системными противовоспалительными эффектами, как будет описано ниже [139]. Развитие аллергических заболеваний, в том числе бронхиальной астмой, среди детей, родившихся с помощью кесарева сечения, встречается чаще, составляя порядка 9,5%, тогда как среди детей, родившихся естественным путем, заболеваемость составляет около 7,9% [56, 234]. В ряде клинических исследований показано, что прием беременными и кормящими женщинами *Lactobacillus rhamnosus* GG и *Lactobacillus fermentum* в пренатальном и раннем постнатальном периодах может быть эффективным при лечении и профилактики атопических заболеваний у детей [87, 94].

80-90% бактериальных видов кишечной микрофлоры человека относят к типам *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*. Типы *Cyanobacteria*, *Lentisphaerae*, *Spirochaetes*, *Synergistetes* присутствуют в кишечном биотопе в меньших количествах [142, 143, 164]. Бактериальный состав разных отделов кишечника специфичен [3, 78, 153, 203]. Желудок, двенадцатиперстная кишка и проксимальная тонкая кишка, в основном, колонизированы аэробными бактериями, включая *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Enterobacteriaceae*, в то время как, в дистальной части тонкой кишки и толстой кишке доминируют анаэробы, такие как *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* и *Clostridium* [56, 57, 219]. Резидентная микрофлора участвует в поддержании физико-химических параметров гомеостаза этирелиоцитов, в том числе pH и окислительно-восстановительного потенциала внутрипросветной среды.

В литературе обсуждается возможность разделения кишечного биотопа на энтеротипы [47, 77, 92, 156]. Однако, эта гипотеза имеет все меньше сторонников и часто подвергается критике. Возлагавшиеся надежды на использование энтеротипа для диагностики и прогноза заболеваний, в настоящее время, не подтвердились [78, 156, 164, 257]. В большей степени в литературе обсуждается существование филонетаболического ядра микробиоты, включающее в себя около 80 основных бактерий, способных поддерживать функциональный гомеостаз микрофлоры [32, 143, 159, 253]. Однако, и эту гипотезу можно критиковать ввиду сложности выделения “ядра микробиоты” из-за больших колебаний в зависимости от генетических особенностей, возраста, пола, образа жизни и воздействия факторов окружающей среды [253, 255]. Основные положения, которые сейчас определены в отношении характеристики кишечного биотопа, касаются его видового разнообразия, относительной стабильности и так называемой функциональной избыточности, когда схожие метаболические функции выполняют филогенетически разные бактерии [1-3, 32, 153, 164]. Все вышесказанное, по мнению исследователей, и позволяет сохранять функциональную стабильность биотопов.

В настоящее время бактерии, населяющие тот или иной биотоп, рассматривают как единое целостное сообщество [153, 164]. Взаимоотношения микроорганизмов внутри сообщества определяет их поведение и направленность, вызываемых ими биохимических процессов. Относительно недавно, было предложено межбактериальные взаимодействия определять как “ощущение кворума” (Quorum Sensing) [153, 142, 143]. В систему кворум-сенсинга вовлечен синтез бактериями биологически активных веществ и метаболитов, позволяющий осуществлять им “общение” на разных уровнях: внутривидовом, межвидовом и для взаимодействия с организмом хозяина. На сегодняшний день известно около 25000 микробных низкомолекулярных соединений, служащих эффекторами, кофакторами, сигнальными молекулами, регулирующих скорость и выраженность протекания разнообразных физиологических функций [142, 143].

Микробиота признана определяющим фактором правильного развития, созревания и реактивности иммунной системы человека. В первую очередь, это связано с тем, что микроорганизмы служат неиссякаемым источником молекулярных структур (MAMPs – microbe-associated molecular patterns) и патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMP- pathogen-associated molecular patterns), включая липополисахарид, пептидогликаны, флагеллин, липотейхоевую кислоту и др. [43, 78, 207, 215]. Молекулярные структуры распознаются в клетках хозяина благодаря рецепторам распознавания образов (PRR - pattern recognition receptors), которые в свою очередь активируют Toll-подобные рецепторы (TLR) и нуклеотидсвязывающие рецепторы (NOD), лектины С-типа, рецепторы, связанных с G-белками (GPR) и ретиноевой кислотой (RIG) [43, 56, 67, 143, 159].

Активация различных типов G-белковых рецепторов (GPR) происходит посредством взаимодействия с основными бактериальными кворум-молекулами (основными метаболитами кишечной микрофлоры) - короткоцепочечными жирными кислотами (КЦЖК), образующимися под влиянием сахаролитической флоры при ферментации сложных растительных полисахаридов [1-3, 130, 207, 215]. В настоящее время, известно три G-белковых рецептора взаимодействующих с КЦЖК: GPR41 (FFAR3), GPR43(FFAR2), GPR109A [65, 130, 160]. Бутират в большей степени взаимодействует с рецептором GPR41, а ацетат и пропионат обладают аффинностью к GPR43 [44, 160]. От взаимодействия КЦЖК с GPR43 зависит ряд важнейших для организма человека физиологических функций, включая продукцию активных форм кислорода, хемотаксис нейтрофилов, модуляцию Т-регуляторных клеток [66, 72, 165, 172].

Короткоцепочечные жирные кислоты, включая изомеры, образуются бактериями определенного вида, демонстрируя их функциональную активность [1-3, 30, 33, 254]. Уровень и соотношение КЦЖК представляет собой важный параметр функционального гомеостаза кишечной микробиоты [1-3, 147, 150, 152]. Прослеживается корреляция между бактериальным разнообразием кишки, уровнем производства КЦЖК и направленностью иммунологического ответа [67,

113, 159, 162, 207, 244, 248]. Установлено, что низкое разнообразие микробиоты ассоциировано со снижением производства КЦЖК и способствует поляризации иммунного ответа в сторону Т-хелперов 2-го типа, влияя на функциональное состояние респираторного тракта [45, 113, 114, 147, 162, 167, 207, 209, 244]. Одно из оригинальных исследований, часто цитируемых в современных обзорах литературы, подтверждает взаимосвязь роста аллергических реакций бронхолегочной системы со снижением уровня КЦЖК на фоне пищевого рациона с низким содержанием клетчатки [238]. Авторы обнаружили, что содержание ферментируемых пищевых волокон изменяет состав микробиоты кишечника и легких у мышей, изменяя отношение бактерий *Firmicutes* к *Bacteroidetes*. Мыши, получавшие рацион с высоким содержанием клетчатки, имели высокие уровни КЦЖК (в частности пропионата) и были защищены от аллергического воспаления, за счет усиления функции дендритных клеток [238]. Концентрация КЦЖК варьирует в кишечнике. Наиболее интенсивно их образование происходит в проксимальных отделах толстой кишки с постепенным снижением количества КЦЖК в дистальных отделах [81, 158, 160]. Подсчитано, что общее количество КЦЖК в проксимальной части толстой кишки колеблется от 70 до 140 мМ и падает до 20–70 мМ в ее дистальной части [1-3, 228].

Наряду с активацией G-белковых рецепторов, КЦЖК взаимодействуют с клетками и при помощи пассивной диффузии, а также посредством активации генов SMCT1/Slc5a8 и MCT1/Slc16a1 [228]. Обнаружено, что КЦЖК регулируют функции почти каждого типа иммунных клеток, изменяя активность гистоновых деацетилаз, экспрессию генов, дифференцировку, хемотаксис, пролиферацию и апоптоз [67, 81, 158, 160, 228].

Имеется подтверждение, что КЦЖК стимулируют CD4⁺Foxp3 регуляторные клетки, снижая тем самым продукцию провоспалительных цитокинов и способствуя поляризации иммунного ответа в сторону Т хелперов 1 типа [46, 113, 117]. Бутират и пропионат влияют на активацию дендритных клеток посредством подавления индуцированной липополисахаридным комплексом (ЛПС) экспрессии костимулирующей молекулы CD40 и секреции IL-6 и IL-12p40 [158, 190]. Кроме

того, ацетат может ингибировать индуцированную ЛПС секрецию $\text{TNF}\alpha$ как у мышей, так и у человека путем регуляции цитокинов мононуклеарными клетками [174]. Показано, что у мышей, выращенных в стерильных условиях, лишенных микробиоты и, как следствие, КЦЖК отмечались низкие уровни IgA, CD_4^+ T-клеток и высокие значения IgE [148, 152].

Взаимодействие бактерий, а так же продуктов их метаболизма с Toll-подобными рецепторами (TLR) признано ключевым звеном инициации иммунных реакций. На примере метаболического синдрома было показано, что Toll-подобные рецепторы в некоторых случаях сами могут оказывать влияние на состав микробиоты. Так, в отсутствие TLR5 рецептора, у мышей наблюдаются изменения в составе микробиоты, ассоциированные с развитием метаболического синдрома [117].

Стимуляция TLR запускает сигнальный каскад реакций, приводящий к активации ядерного фактора транскрипции (NF- κ B), который влияет на клеточный барьер и плотность межклеточных контактов, и дальнейшее стимулирование иммунологических клеток в собственной пластинке слизистой оболочки [67, 153, 158]. NF- κ B выступает в качестве регулятора генов, ответственных за синтез провоспалительных белков, в том числе, синтазы оксида азота, фактора некроза опухоли-альфа, интерлейкинов -1β , 6, циклооксигеназы второго типа [43, 59, 66, 67]. Наряду с этим, комменсальные бактерии и их производные (например, КЦЖК) могут непосредственно стимулировать эпителиоциты кишечника или взаимодействовать с дендритными клетками и макрофагами в собственной пластинке слизистой оболочки и переноситься в брыжеечные лимфатические узлы, оказывая влияние на дифференцировку В и Т-клеток [43, 66, 67, 73, 75]. Что, в конечном итоге, вызывает различные иммунологические реакции, в зависимости от типа клетки, лиганда и самого рецептора, с преобладанием провоспалительных или противовоспалительных цитокинов (см. рисунок 1).

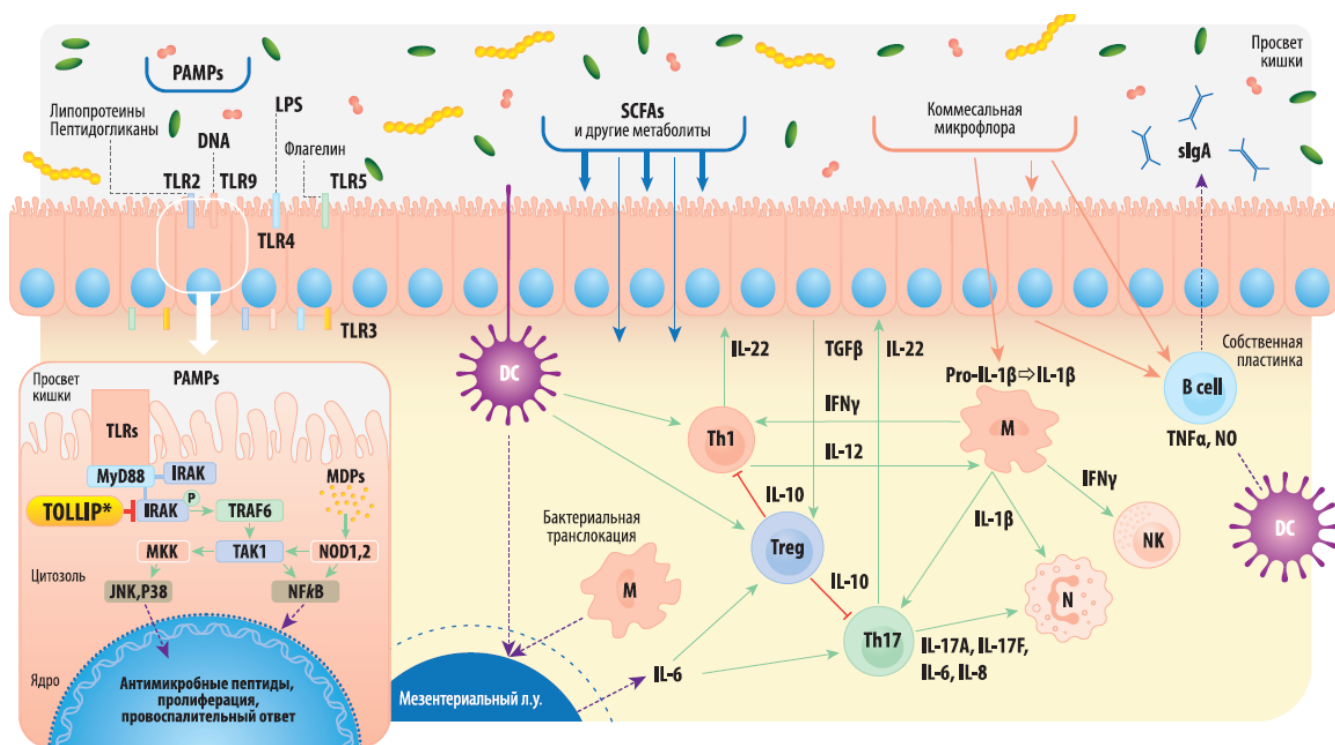


Рисунок 1. Взаимодействие микробиоты и слизистой оболочки кишечника (адаптировано R. Bingula, M. Filaire [59]). Молекулярные структуры бактерий распознаются при помощи рецепторов распознавания образов с последующей активацией Toll-подобных и нуклеотидсвязывающих рецепторов (NOD). Toll и NOD рецепторы активируют ядерный фактор транскрипции (NF-κB), который в свою очередь регулирует экспрессию генов, кодирующих провоспалительные белки, влияет на клеточный барьер, плотность межклеточных контактов и дальнейшее стимулирование иммунологических клеток в собственной пластинке слизистой оболочки.

NOD - нуклеотидсвязывающие рецепторы, NFκB – ядерный фактор транскрипции κB; TAK1, JNK, P38 - митоген-активируемые протеинкиназы; TRAF6 - ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей, фактор 6; IRAK - киназа, связанная с рецептором интерлейкина-1; MyD88 - цитозольный адаптерный белок; TOLLIP – Толл-взаимодействующий белок; PAMPs - патоген-ассоциированные молекулярные структуры; LPS – липополисахарид; TLRs – Толл-подобные рецепторы; DNA –ДНК; SCFAs – короткоцепочечные жирные кислоты; М – макрофаги; IL – интерлейкины; Pro-IL-1β – проинтерлейкин 1; T-reg – T регуляторные лимфоциты; Th1 – T-хелперы 1 типа; Th17 – T-хелперы 17; TGFβ – трансформирующий фактор роста; IFNγ – интерферон гамма; N – нейтрофилы; DC – дендритные клетки; NO – оксид азота; TNFα – фактор некроза опухоли альфа; IgA – иммуноглобулин A; B cell – B лимфоциты

Изменение микробиоты кишечника, с нарушением качественного и количественного состава бактерий толстой кишки или же избыточным бактериальным ростом в тонкой кишке, способствует развитию большого количества нежелательных явлений. В том числе, посредством бактериальной транслокации, способствует общей сенсibilизации слизистой оболочки, поддерживая в ней иммунное воспаление [8, 18, 21, 22, 25, 26, 95, 198]. На сегодняшний день, данных о распространённости нарушений микрофлоры в литературе не представлено. Причины СИБР чрезвычайно различны [8, 18, 20-22, 30, 33, 173]. Опубликованы исследования, свидетельствующие о частом обнаружении избыточного бактериального роста в тонкой кишке у пациентов с различными заболеваниями, например, при болезни Крона - у 25% пациентов, язвенном колите - 81%, синдроме раздраженного кишечника - до 78%, с циррозом печени - до 50%, при ожирении 17 - 41%, а также до 20% среди здоровых лиц [125].

Нарушение биопленки и межмикробных взаимодействий приводит к увеличению проницаемости кишечной стенки, получившей название в литературе “протекающая кишка” (“leaky gut”) [7, 8, 27, 28, 87, 159]. К настоящему времени, известно около 40 мембранных (клаудины и окклюдины) и цитоплазматических (зонулинов) белков, отвечающих за межклеточные контакты [10, 11, 16, 27, 105]. Посредством межклеточных контактов осуществляется транспорт молекул, влияющих на формирование иммунного ответа и иммунологической толерантности [105]. Известно, что плотные межклеточные контакты могут быть подвержены воздействию ряда бактериальных патогенов, в том числе *Clostridium perfringens*, *Helicobacter pylori* и др., формируя “протекающую кишку” [115]. В этом случае транслокация липополисахаридных комплексов, входящих в структуру бактериальной стенки грамотрицательных бактерий (ЛПС), активирует Toll-подобные рецепторы 4 типа эпителиоцитов с развитием последовательных иммунных событий [8, 115].

Развитие повышенной кишечной проницаемости изучается при многих заболеваниях [78, 153, 164]. Нарушение барьерной функции толстой кишки

хорошо изучено и описано у пациентов с синдромом раздраженного кишечника, воспалительных заболеваниях кишечника, у больных циррозом печени и играет значимую роль при хронической сердечной недостаточности [8, 14, 20]. Известно также, что СИБР сопровождается увеличением уровня эндотоксинов и бактериальных компонентов в крови, опосредуя стимуляцию провоспалительных цитокинов [20]. В том числе, СИБР в тонкой кишке способствует сенсibilизации слизистой оболочки бронхиального дерева через механизмы бактериальной транслокации [8].

В 2011 году в журнале Nature опубликована статья, где приведены веские доказательства участия *Bacteroides* в риске развития ожирения, отмечена роль *Prevotella* в формировании язв и показано значение *Ruminococcus* в развитии сахарного диабета [47]. Виды бактерий, которые связаны с возникновением респираторных заболеваний, пока не установлены, и активно изучаются. Исследования в детской популяции свидетельствуют о связи снижения численности *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Rothia* и *Veillonella* с риском развития бронхиальной астмы, а повышение содержания *Enterobacteriaceae* и *Bacteriodes* коррелирует с развитием пищевой сенсibilизации [107]. В ряде работ показана взаимосвязь низкого бактериального разнообразия толстой кишки в раннем постнатальном периоде и развития бронхиальной астмы [45, 54-56, 63, 78, 183]. Подтверждена взаимосвязь снижения уровня КЦЖК (в первую очередь бутирата и пропионата) и развития атопической экземы [77, 78].

В литературе приводятся данные о том, что бактерии кишечника взаимосвязаны с циркадными биоритмами человека и влияют на продукцию нейротрансмиттеров (серотонина, допамина, мелатонина) [166], что, по мнению J. Gibbs, влияет на иммунный ответ респираторного тракта и, вероятно, определяет эффективность применения глюкокортикостероидов у пациентов [120].

Таким образом, способность бактерий влиять на регуляторное звено иммунной системы, в частности, на пул Т регуляторных клеток, фундаментально

изменило представления о том, какое значение микробиота имеет в возникновении и прогрессировании иммуноопосредованных заболеваний.

1.2 Микробиота легких

Существующая ранее догма о том, что здоровые легкие человека стерильны, привела к отсутствию в течение долгого времени исследований микробиоты респираторного тракта. Одно из первых исследований, посвященных изучению микробиоты легких, было выполнено группой авторов под руководством E.S. Charlson. Они провели всесторонний количественный и качественный анализ состава микробиоты верхних и нижних дыхательных путей у практически здоровых добровольцев, опровергнув гипотезу о стерильности легких [70]. Секвенирование бактериальных геномов показало, что в легких здоровых людей присутствует разнообразное микробное сообщество, имеющее важные функциональные особенности. Установлено, что самая высокая плотность бактерий находится в верхних дыхательных путях, достигая до 10^3 жизнеспособных бактерий в мазках из полости носа и носоглотке, в ротоглотке же выявляется до 10^6 / мл жизнеспособных клеток [54, 69-71, 177]. В трахее и легких, предполагаемое количество бактерий ниже и составляет приблизительно 10^2 бактериальных клеток на 1 мл, обнаруженных в бронхоальвеолярном лаваже у здоровых лиц [140, 177, 220]. В большей степени в микробиоте лёгких представлены *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria* и *Actinobacteria* [86, 140, 259].

В настоящее время нет стандартизированной методики забора проб для исследований, в качестве материала чаще всего выступают назофарингеальный мазок, орофарингеальный мазок, бронхо-альвеолярный лаваж, браш-биопсия, индуцированная мокрота [113, 140, 195, 259]. Установлено, что состав микробиоты легких определяется балансом трех факторов [90, 192]. Во-первых, это - микробная иммиграция: вдыхание воздуха, микроаспирация и прямая

дисперсия бактерий по слизистой дыхательных путей. Во-вторых, микробная элиминация – связанная с мукоцилиарным клиренсом, кашлем и антимикробными механизмами иннатного и адаптивного иммунитета. Третий фактор – это локальные условия микробного роста в дыхательных путях, представляющие собой гетерогенную группу, в которой прослеживаются различия в температуре, рН, продукции слизи. Важную роль играют особенности эпителия и мукоцилиарный клиренс, а так же концентрации кислорода и доступность питательных веществ, что существенно влияет на воспроизводство бактериальных сообществ [142, 220, 252, 259]. У здоровых субъектов состав микробиоты легких в большей степени похож на микробиоту ротоглотки и преобладают представители типов *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* [76, 140, 143]. Три наиболее распространенных рода, обнаружены в легких, - это *Prevotella*, *Veillonella* и *Streptococcus*, они также представляют собой наиболее распространенные роды бактерий в ротоглотке [69-71, 88, 90, 91, 187]. Это сходство было объяснено в системном подходе R. Dickson. Он показал, что микроаспирация из полости рта служит основным источником иммиграции микроорганизмов в здоровые легкие, и легкие здоровых людей, на самом деле, являются средой обитания с низкой бактериальной биомассой, которая постоянно обновляется [88-91]. Микробиом носоглотки, как второй основной путь проникновения для бактерий, вносит сравнительно небольшой вклад в микробиоту легких и имеет микробный состав, более характерный для кожи [90, 91].

Одно из первых исследований, по изучению бактериального состава респираторного тракта проведено M. Hilty. Автором исследовались браш-биопсии и образцы бронхоальвеолярного лаважа нижних дыхательных путей. Было выявлено, что тип *Proteobacteria* и особенно виды *Haemophilus* чаще присутствуют у пациентов бронхиальной астмой и ХОБЛ, чем у здоровых лиц [135].

Микробиота легких, как и флора кишечника, подвержена влиянию большого количества разнообразных факторов, в том числе, значимую роль играют изменения в питании, инфекции, вакцинация [79, 124, 142, 222, 233, 248, 252]. Постоянные взаимодействия микробиоты с врожденными и адаптивными иммунными клетками, обучают иммунную систему реагировать на различные триггерные факторы [88, 141, 143, 240]. IgA, секретируемый В-клетками, присутствует в слизистом слое, покрывающем респираторный тракт, где он избирательно захватывает патогенные микроорганизмы, предотвращая возможную колонизацию ими слизистой оболочки. Установлено, что синтез IgA регулируется комменсальной микробиотой, поддерживая гармоничное взаимодействие между хозяином и микробом. Эта роль IgA наиболее широко исследована в желудочно-кишечном тракте [103, 143], но недавние результаты показывают, что подобные механизмы существуют и в бронхолегочной системе [58,104].

При обострении хронических заболеваний, изменению микробиоты легких способствует целый ряд состояний: гипервентиляция (ускоряется приток бактерий из воздуха и значительно снижается температура поступающего воздуха), кашель (усиливается микробная элиминация и повышается активность воспалительных клеток), гиперпродукция провоспалительных цитокинов, катехоламинов, глюкозы и свободных форм кислорода (создаются благоприятные условия для роста некоторых бактерий), бронхоконстрикция (изменяются концентрация кислорода и pH), повышение сосудистой проницаемости и увеличение продукции слизи (происходит усиление нутритивной поддержки бактерий и создаются дополнительные градиенты локальной гипоксии и гипертермии) [91, 220, 251]. Dickson R. предложена модель нарушения респираторной микробиоты при обострении заболеваний бронхолегочной системы (см. рисунок 2).



Рисунок 2. Модель изменений микробиоты легких при обострении респираторных заболеваний (адаптировано по Dickson R., [89])

В ответ на воспалительные триггеры (вирусная, бактериальная инфекция, аллергены) запускается каскад воспалительных реакций с вовлечением альвеолярных макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, дендритных клеток, лимфоцитов, что резко изменяет микробный рост. Так, к примеру, избыточная продукция провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли альфа, интерлейкина-1, 6, 8) напрямую активирует рост таких бактерий как *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumonia*, *Burkholderia cepacia* [199, 216, 217, 222, 233, 251]. Важно отметить, что некоторые из микробов имеют модифицированные факторы вирулентности, делающие их более агрессивными, и повышающие их иммуногенность. Эти факторы способствуют развитию дальнейшего воспаления путем увеличения экспрессии патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (липополисахаридов, флагеллинов), которые активируют рецепторы, распознающие патогены (к примеру, толл-подобные рецепторы) [83, 175]. Так, например, в литературе очень активно обсуждается колонизация бронхиального дерева грамотрицательными бактериями рода *Prevotella spp*, составляющими комменсальную микробиоту человека. Установлено, что некоторые штаммы

Prevotella вызывают нейтрофильную инфильтрацию бронхиального дерева, связанную с активацией TLR2 [161]. Кроме того, *Prevotella* чаще выявлялась у лиц с тяжелым течением ХОБЛ, и у больных, получавших глюкокортикостероиды [54]. Их роль в иммунном ответе нуждается в уточнении. Поскольку в экспериментах было обнаружено, что *Prevotella* может уменьшать уровень IL-12p70, индуцированного гемофильной инфекцией, но не влияет на уровень IL-10. Данный факт, по мнению авторов, может указывать на возможную связь субклинического течения воспалительных изменений легких с *Prevotella* spp. [54, 162].

Имеющиеся на сегодняшний день работы, сосредоточены, как правило, на бактериальном компоненте микробиоты. Однако, следует учитывать, что стабильность и разнообразие микробной популяции поддерживается симбиотическими отношениями не только бактерий, но и вирусов и грибов. Так, вирусно-бактериальное взаимодействие может влиять на состав резидентной микробиоты и запускать переход колонизирующих потенциальных патогенов в возбудители заболеваний [62, 259]. Присутствие респираторных вирусов, увеличивает частоту колонизации респираторного тракта *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *M. catarrhalis*. Например, было установлено, что риновирус и RSV связаны с повышенным риском колонизации *H. influenzae* [48]. Потенциальные механизмы, лежащие в основе вызванных вирусом изменений бактериального спектра, были исследованы *in vitro* и в экспериментальных животных моделях. Результаты работ демонстрируют усиление бактериальной адгезии и транслокации через прямое повреждение эпителиального барьера [48, 62, 213, 242], подавляя различные компоненты врожденной иммунной системы [182, 224, 227].

Изучение микробиоты легких находится еще только в самом начале исследовательского пути, и стремительное растущее число публикаций служит тому подтверждением. Согласно анализу литературных данных, связь микробиоты дыхательных путей и хронических респираторных заболеваний была

подтверждена изучением образцов нижних дыхательных путей, полученных при помощи браш-биопсии и бронхоальвеолярного лаважа [116]. При этом, микробные сообщества верхних отделов респираторного тракта у пациентов с бронхолегочными заболеваниями охарактеризованы недостаточно. Изучению бактериального состава орофарингеальной микрофлоры молекулярными методами посвящено ограниченное число исследований. Известно, что на разнообразие микробиоты полости рта может влиять прием антибактериальных препаратов и пробиотиков, особенности пищевого рациона, а так же состояние микробиоты кишечника [119, 142, 163]. Таким образом, учитывая значимый вклад микробиоты полости рта в формирование бактериальных сообществ респираторного тракта, орофарингеальную микрофлору следует рассматривать в качестве важного компонента в развитии заболеваний органов дыхания. На сегодняшний день существуют противоречивые данные о составе орофарингеальной микрофлоры. Результаты одних исследователей свидетельствуют в пользу имеющих различий в составе микробиоты пациентов с бронхиальной астмой и здоровых лиц, наряду с этим, имеются работы, опровергающие эти данные и свидетельствующие в пользу отсутствия принципиальной разницы состава орофарингеальной микрофлоры [26, 63, 196].

1.3 Ось “кишка – легкие”

В настоящее время установлена возможность взаимодействия посредством микробиоты между кишечником и легкими. Этот своеобразный “диалог между органами” получил название ось “кишка – легкие” и предполагает, что изменения в одном из биотопов могут повлиять на другой, как в отношении микробного состава, так и функциональной активности респираторного и желудочно-кишечного тракта (см. рисунок 3).

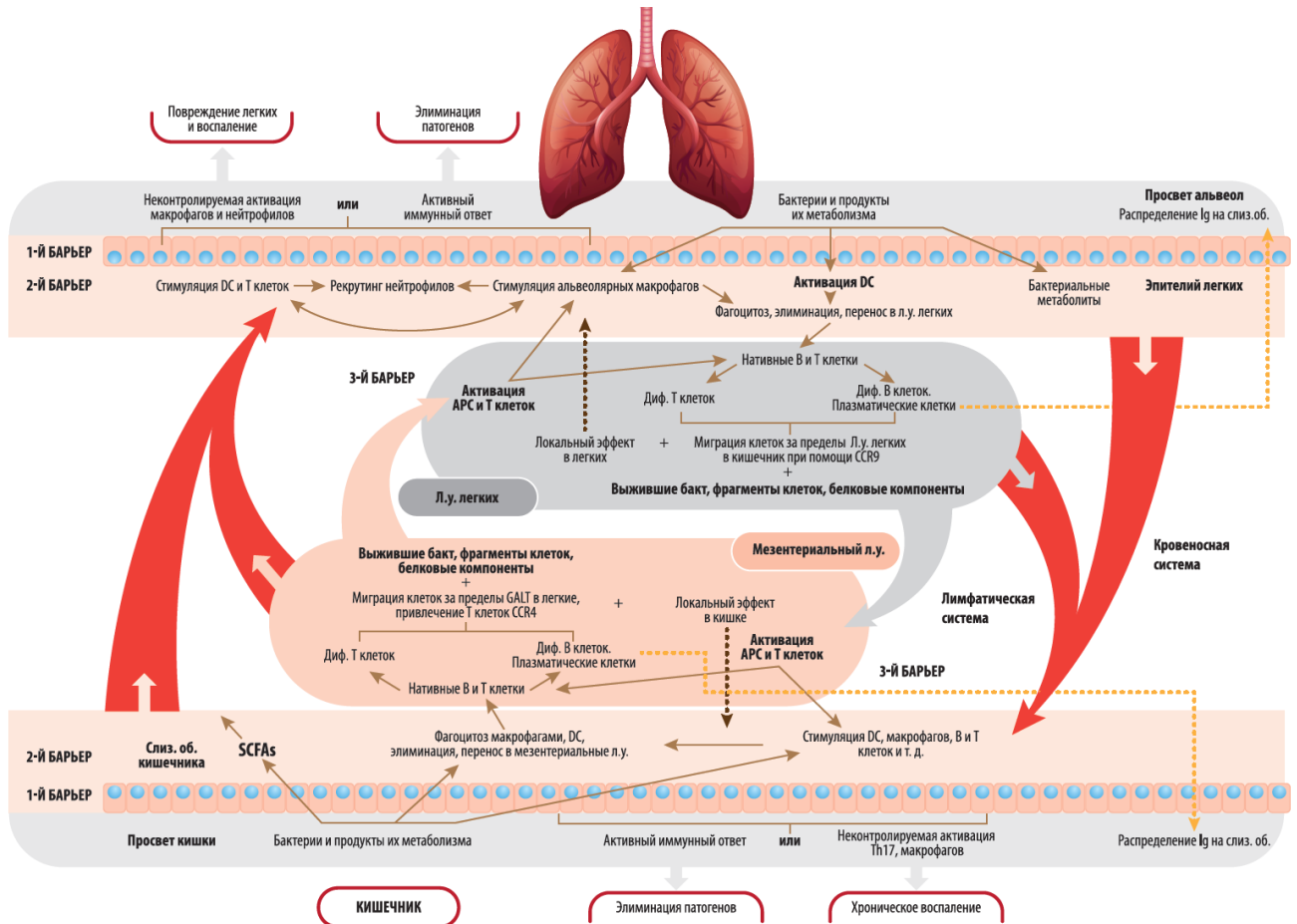


Рисунок 3. Основные этапы взаимодействия оси кишка-легкие (адаптировано R. Bingula, M. Filaire [59]) Симбиотные бактерии и продукты их метаболизма (КЦЖК) индуцируют активность иммунных клеток в кишечнике. Распространяясь системно, через кровоток и лимфатическую систему, пул активированных регуляторных цитокинов влияет на поляризацию провоспалительного или противовоспалительного иммунного ответа бронхолегочной системы. Микробиота легких, в свою очередь, схожим образом оказывает влияние на иммунный ответ в кишечнике.

Взаимодействие между компартментами может быть реализовано следующим образом. Микробиота и продукты ее метаболизма, а так же иммунные клетки, активированные в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника,

мигрируют в мезентериальные лимфатические узлы, с последующей активацией и изменением дифференцировки Т регуляторных лимфоцитов и В клеток. В дальнейшем, благодаря системной циркуляции (с током крови и лимфы), иммунные клетки получают доступ, как в лимфатические узлы легких, так и непосредственно к легочной паренхиме. Это дополнительно приводит к активации дендритных клеток, макрофагов, Т лимфоцитов и изменению их дифференцировки. Таким образом, эффекты, вызванные микробиотой кишечника, достигают бронхиального эпителия и модифицируют иммунный ответ, который зависит от индуцированного профиля клеток (Th1, Th2) [67, 78, 140, 153, 159, 160, 160, 19, 259].

Хотя эта теория объясняет одностороннее взаимодействие, разумно предположить, что эта ось работает точно так же и в обратном направлении. Установлено, что легочные дендритные клетки взаимодействуют с рецепторами транслокации лейкоцитов (интегринами), которые определяют миграцию клеток к слизистой оболочки кишечника и ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани, участвуя, таким образом, в формировании и поддержании мукозального иммунитета [55, 75, 111, 140, 153, 197]. В 2017 г опубликовано исследование У. Не и соавторов, в котором, было показано, что пневмония, вызванная синегнойной палочкой (*Pseudomonas aeruginosa*), приводит к снижению пролиферации кишечного эпителия и блокирует М-фазу клеточного цикла эпителиоцитов [80, 131]. В более ранних экспериментальных работах установлено увеличение *Enterobacteriaceae* и уменьшение количества *Lactobacillus*, *Lactococcus* в микробиоте кишечника при заражении лабораторных мышей вирусом гриппа [169]. Ингаляционное введение липополисахарида мышам так же инициировало изменения таксономического состава микробиоты кишечника [232].

Оригинальное исследование, выполненное Т. Ichiohe, показало участие бактерий кишечного биотопа в противовирусном иммунном ответе респираторного тракта. Измененная микробиота кишечника, что достигалось длительным назначением антибиотиков (в течение 3 недель), снижала устойчивость лабораторных животных к инфицированию вирусом гриппа А [144].

Это проявлялось высокими вирусными титрами, снижением IgA, IgG, CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток. Введение пептидогликанов комменсальных бактерий, служащих лигандами TLR, восстанавливало противовирусный иммунный ответ у этих лабораторных животных [144]. Таким образом, все вышеупомянутые результаты подтверждают, что ось “кишка-легкие” представляет собой двунаправленную связь, которая сопровождается изменениями в иммунном ответе обоих биотопов.

По мнению J. Allaire, “бактерии в иммунном ответе играют общую роль, без явных приоритетов местного (дыхательного) микробиома или микробиома, присутствующего в дистальных участках, таких как кишечник. Однако, следует учитывать, что бактериальный генофонд кишечника значительно превосходит таковой дыхательных путей и этот факт может свидетельствовать в пользу его преобладающего значения” [43].

В литературе обсуждается гипотеза, что легкие и кишечник могут иметь схожий бактериальный спектр, сформированный в раннем постнатальном периоде, что оказывает влияние на развитие в последующем тех или иных заболеваний бронхолегочной системы [111]. Однако, убедительных данных, подтверждающих эту гипотезу, в настоящее время не представлено.

1.4 Бронхиальная астма и микробиота

Заболеваемость бронхиальной астмой растёт во всем мире и по оценкам экспертов к 2025 году составит около 400 миллионов человек [31, 235]. Астма характеризуется хроническим воспалением дыхательных путей, в котором согласно определению экспертов ВОЗ принимают участие различные клеточные элементы, благодаря чему, хроническое воспаление опосредует развитие гиперреактивности бронхов, с последующей бронхообструкцией в ответ на раздражитель [235]. История изучения патогенеза бронхиальной астмы (БА) насчитывает не одно столетие. За это время было доказано, что заболевание развивается в результате сложных взаимодействий генетических и экологических факторов, определяющих гетерогенность фенотипических проявлений [4, 15, 31,

37, 235]. В разных этнических группах определен ряд ассоциированных с астмой генов (см. таблица 1), некоторые из них функционально взаимосвязаны между собой [31, 235].

Таблица 1. Гены, ассоциированные с развитием астмы

Страны	Гены
Европа	ORMDL3, GSDMB, DENND1B, PDE4D, RAD50, IL1RL1/IL18R1, HLA-DQ, IL33, IL6R, SMAD3, IL2RB
Африка	ADRA1B, PRNP, DPP10
Мексика	TLE4
Корея	CTNNA3
Япония	TSLP, WDR36

Выделены разные фенотипы бронхиальной астмы, учитывающие время появления симптомов, степень тяжести заболевания, тип воспалительной реакции, ответ на проводимую терапию [15, 23, 24, 31, 37, 235]. Атопическая (син. аллергическая по МКБ - J45.0) и неатопическая (син. неаллергическая по МКБ - J45.1) формы бронхиальной астмы, аспириновая, астма физических усилий, с поздним дебютом и фиксированной обструкцией дыхательных путей и др. имеют разные клинические и лабораторные проявления, различные подходы к медикаментозной терапии [23, 24, 31, 37, 38, 235]. В последние годы проведена масштабная работа по детальному изучению особенностей проявлений БА, в том числе с позиции кластерного анализа и возможному выявлению эндотипов заболевания [23, 24, 171, 186]. В арсенале современной медицины существует ряд значимых фармакологических препаратов, позволяющих облегчить течение бронхиальной астмы. Ингаляционные кортикостероиды, антагонисты лейкотриеновых рецепторов, β_2 агонисты и препараты моноклональной терапии служат неотъемлемой частью современной терапии [13, 15, 23, 31, 37, 235].

Базисная терапия бронхиальной астмы подразумевает, согласно GINA (Global Initiative for Asthma) [235] и национальным рекомендациям Российского респираторного общества [31], “ступенчатый” подход, основная задача которого

состоит в коррекции медикаментозного лечения в зависимости от контролируемости заболевания и наличия факторов риска. Согласно регламентирующим документам [31, 235], пациентам с интермиттирующей астмой (1-я ступень) лечение начинается с назначения “по требованию” β_2 -агонистов, иногда в комбинации с тиотропием бромидом; обсуждается возможность назначения им малых доз ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС). Развитие легкой персистирующей формы заболевания (2-я ступень) подразумевает назначение малых доз ИГКС, возможно антагонистов лейкотриеновых рецепторов или теофиллина. В случае прогрессирования заболевания с развитием персистирующей бронхиальной астмы (3-я ступень) назначаются низкие, средние или высокие дозы ИГКС или длительно действующие β_2 -адреноагонисты (ДДБА), комбинации ИГКС с антилейкотриеновыми препаратами и теофиллином. Тяжелое персистирующее течение (4-я ступень) требует средних или высоких дозы ИГКС/ДДБА. Возможно назначение комбинаций с тиотропием бромида или высокими дозами антагонистов лейкотриеновых рецепторов, а так же теофиллином пролонгированного действия. Неуклонно прогрессирующее заболевание (5-я ступень) предполагает постоянное диспансерное наблюдение, в качестве терапии обсуждается назначение: тиотропия бромида, омализумаба, низких доз оральных ГКС [31, 235].

Главная цель ступенчатой терапии заключается в достижении максимального контроля над бронхиальной астмой [29, 31, 38, 235]. В качестве самоконтроля пациентам предлагается, наряду с пикфлоуметрией, прибегать к заполнению валидизированных опросников, например: АСТ (Asthma Control Test), АТАК (Asthma Therapy Assessment Questionnaire) и АСК (Asthma Control Questionnaire) [184, 235, 243]. Простые в использовании и интерпретации результатов тесты позволяют четко верифицировать изменения контролируемости заболевания и вовремя корректировать медикаментозную терапию [29].

В последние годы, внимание ученых сфокусировано на изучении роли микробиоты человека в возникновении и развитии бронхиальной астмы [14, 100, 112, 210].

Эпидемиологические исследования показали, что воздействие микробов в детском возрасте служит определяющим фактором в индукции аллергических заболеваний [193, 194, 204, 237]. В свою очередь атопия в молодом возрасте, характеризующаяся поляризацией иммунного ответа в сторону Т-хелперов 2-го типа (Th2), выступает фактором риска развития астмы [193, 210, 222, 226, 233, 241]. Проведенные исследования позволили выявить критический период новорожденности, в течение которого присутствие микробных сигналов оказывает защитное действие против аллергической сенсibilизации. Было показано, что микробная колонизация дыхательных путей необходима для индукции регуляторных Т-клеток посредством экспрессии лигандов PD-L1 на дендритных клетках легких в первые недели жизни, обеспечивая тем самым защиту от аллергии [124]. У исследователей даже появился термин – “окно ранней жизни”, отражающий период активного становления иммунной системы, который попадает на первые 3 месяца жизни ребенка [197, 204, 229]. По мнению J. Stokholm и соавторов, наиболее значимые изменения в микробиоте кишечника происходят на первом и 12-ом месяцах жизни ребенка, сопровождаясь изменением биоразнообразия микробной композиции. Таким образом, предполагается, что иммунологическое созревание во многом обусловлено воздействием микробов окружающей среды и формированием микробиоты (см. рисунок 4). В данном случае речь идет как о микробиоте кишечника, так и о респираторном биотопе. В свое время это послужило развитию так называемой “гигиенической гипотезы” [67, 78, 143, 153, 169, 193, 210, 230]. Суть, которой заключается в том, что уменьшение воздействия патогенов приводит к неадекватному иммунному ответу. Известно также, что применение антибиотиков в раннем возрасте потенцирует развитие аллергии, сенсibilизации и

бронхиальной астмы. Большое количество экспериментальных исследований служат тому подтверждением [76-78, 153, 181, 210, 220, 239, 240].

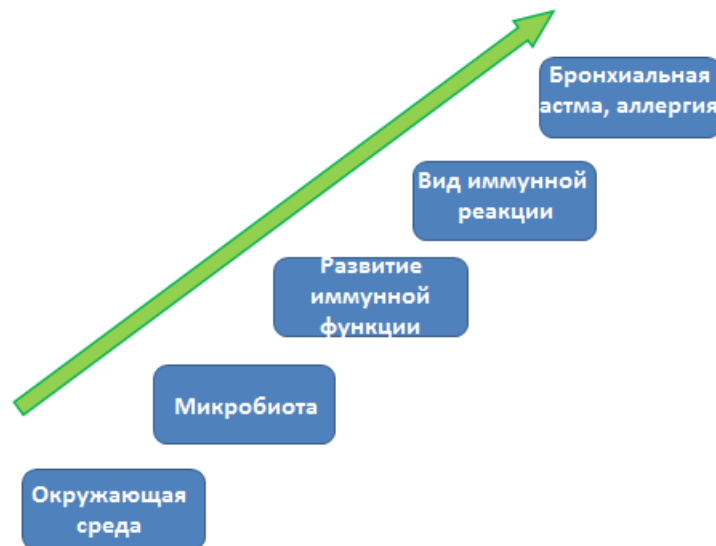


Рисунок 4. Взаимосвязь развития микробиоты и астмы. *Воздействие окружающей среды влияет на состав микробиоты; микробиота формирует скорость и характер развития иммунной функции; различие в иммунной функции определяет характер и интенсивность реакции к аллергенам и встречающимся вирусам.*

Таким образом, многих ученых интересует вопрос, может ли “ранний” микробиом быть основным инструктором иммунного созревания? В этом направлении активно ведутся исследования, так как утвердительный ответ предоставит многообещающую возможность повлиять на иммунную систему посредством воздействия на микробиоту, что может принести огромную пользу здоровью в более позднем возрасте.

Одно из первых клинических исследований, подтвердивших роль микробиоты в развитии бронхиальной астмы, было проведено в Дании. Выявлена

взаимосвязь наличия *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в ротоглотке новорожденных и последующего развития БА [60, 61, 221]. Несколькими годами позже М. Hilty при помощи секвенирования 16S рибосомальной РНК установил, что у пациентов с БА в сравнении со здоровыми лицами, достоверно выше число патогенных *Proteobacteria* (например, *Haemophilus*) и значительно меньше *Bacteroidetes*, особенно рода *Prevotella* [135]. О преобладании *Proteobacteria* (*Pseudomonas*, *Haemophilus*) у больных с БА говорит и работа Y. J. Huang и соавторов [137]. Авторам так же удалось показать, что преобладание семейств *Comamonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Oxatobacteraceae* (относятся к *Proteobacteria*) коррелирует с гиперреактивностью бронхов [137].

Интересно, что колонизация определенными патогенными бактериями строго ассоциирована с иммунным ответом [100, 112, 189, 195]. Так, при высоком количестве *M. catarrhalis* и *H. influenzae* увеличивается продукция ИЛ-1, ИЛ-17, что свидетельствует о развитии Th1 и Th 17 иммунных ответов, а при преобладании *S. aureus* происходит гиперпродукция преимущественно ИЛ-17 [109, 221]. Предполагается, что бактериальные сообщества могут играть роль в управлении поляризацией эндотипа астмы, регулируя баланс между паттернами Th2 и Th17 клеток [41].

Состав микробиоты различается у пациентов в зависимости от тяжести заболевания. Так, у пациентов с тяжелой персистирующей БА, в сравнении с лицами с легкой и умеренной тяжестью заболевания, было описано обогащение респираторного биотопа (в 7-8 раз) *Klebsiella* (тип *Proteobacteria*) [86, 138]. В недавно опубликованном исследовании Q. Zhang, так же была изучена взаимосвязь между тяжестью БА и составом микробиоты нижних дыхательных путей [258]. Проведенный анализ показал, что у пациентов с нетяжелой БА по сравнению со здоровыми добровольцами, было выше число *Fusobacteria* и *Bacteroidetes*, представленных, в основном, грамотрицательными анаэробами, такими как *Prevotella spp.* Наблюдалось также двукратное повышение патогенных

Proteobacteria, в том числе *Neisseria* и *Moraxella spp.* В группе пациентов с тяжелой БА, по сравнению с контрольной группой, напротив, число *Bacteroidetes* (отношение шансов (ОШ) 0,62) и *Fusobacteria* (ОШ = 0,38) были снижены. Так же обращало на себя внимание достоверное повышение *Firmicutes*, состоящих преимущественно из стрептококков как в сравнении со здоровыми лицами, так и больными с нетяжелой астмой (ОШ = 2,15 для обоих сравнений). Корреляционный анализ выявил положительную связь между тяжестью БА и уровнем *Streptococcus* (*Streptococcus spp.*, *Streptococcus_23* и *Streptococcus_155*) и отрицательную между *Prevotella spp.* [258].

Канадские исследователи, определили четыре бактериальных таксона у новорожденных которые, по их мнению, предотвращают развитие астмы во взрослом возрасте. Речь идет об изменении содержания *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Veillonella* и *Rothia (FLVR)* [46]. Добавление этих бактерий экспериментальным животным демонстрировало снижение аллергического воспаления дыхательных путей по сравнению с группой контроля. Колонизация *FLVR* также способствовала увеличению количества короткоцепочечных жирных кислот, и преимущественно ацетата [46], который, по мнению А. Trompette, предотвращает развитие астмы [238]. Значимость *Faecalibacterium*, *Lachnospira* в развитии бронхиальной астмы обсуждают в своем исследовании J. Stokholm и соавторы, делая вывод о высокой прогностической значимости этих микроорганизмов [231].

Установлено, что состав бактериальных сообществ респираторного тракта связан как со степенью обструкции, так и с гиперчувствительностью у пациентов с астмой [26, 34, 35]. Сообщается, что *Neisseriaceae*, *Comamonadaceae*, *Pseudomonadaceae* и *Sphingomonadaceae* коррелируют со степенью гиперчувствительности бронхов [137, 138], а более низкое бактериальное разнообразие - с выраженными нарушениями воздушного потока [137]. В свою очередь наличие *Actinobacteria* коррелирует с улучшением вентиляционной функции легких [138]. Кроме того известно, что микробиота в образцах мокроты плохо контролируемой нейтрофильной астмы менее разнообразна, по сравнению

с таксономическим составом микробиоты пациентов, страдающих IgE-опосредованным (атопическим) фенотипом БА [86]. Таким образом, представляется, что микробные сообщества в дыхательных путях астматиков отличаются при различных фенотипах астмы.

В одном из исследований подтверждена взаимосвязь чувствительности к терапии глюкокортикостероидами и присутствием некоторых бактерий [26, 34, 35, 96, 97, 200]. Так, у пациентов с кортикостероид-резистентной астмой в микробиоте нижних дыхательных путей выявлены *Haemophilus*, *Campylobacter* и *Leptotrichia*, чего не отмечалось у чувствительных к кортикостероидам пациентов [123]. Продemonстрировано, что использование комбинации ингаляционных и пероральных кортикостероидов связано с увеличением численности *Proteobacteria* и *Pseudomonas* и уменьшением численности *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* и *Prevotella* [86]. Наряду с этим, имеются работы, свидетельствующие, что количество *Proteobacteria* увеличивается у астматиков, вне зависимости от проводимой медикаментозной терапии [26, 34, 35, 137, 189, 195, 200]. Таким образом, авторы делают вывод о том, что увеличение численности *Proteobacteria* связано по большей мере с самим заболеванием, а не с эффектом кортикостероидов [35, 86, 123, 176]. То, что состав микробиоты может влиять на восприимчивость к лечению, показано в исследовании E. Goleva [123]. У пациентов с астмой, у которых не наблюдалось улучшения функции легких после недельной терапии преднизолоном в бронхоальвеолярном лаваже выявлялась *H. Influenzae*. По мнению авторов, макрофаги бронхоальвеолярного лаважа, активированные *H. Influenzae*, индуцировали выработку провоспалительных цитокинов IL8 и формировали сниженный ответ на терапию кортикостероидами [123]. Индукция стероидной резистентности *H. influenzae* была также продемонстрирована на мышинной модели астмы [102, 126]. Интересно, что лечение кортикостероидами также оказывает прямое влияние на активность *H. influenzae*, вызывая образование микроорганизмом биопленки и устойчивости к азитромицину [98, 99, 223].

Недавно исследователи обнаружили механизм, с помощью которого комменсальные бактерии регулируют функции базофилов, влияя на восприимчивость Th2 иммунного ответа. Было обнаружено, что прием пероральных антибиотиков увеличивает сывороточные концентрации IgE и уровень циркулирующих базофилов, вызывая чрезмерное Th2 воспаление. Экспрессия В-клетками митоген-активируемой протеинкиназы MyD88 служит важным шагом в повышении сывороточных уровней IgE и базофилов через активацию Toll-подобных рецепторов и ядерного фактора транскрипции (NF- κ B). Экспрессия MyD88 обычно блокируется здоровой микробиотой и развитие аллергического воспаления дыхательных путей не происходит [133, 136].

Механизм, с помощью которого производимые микробиотой КЦЖК уменьшают гиперреактивность и аллергическое воспаление респираторного тракта, остается не всегда понятным. Установлено, что низкие концентрации ацетата (уксусной кислоты) в фекалиях у трехмесячных младенцев ассоциируются с повышенным риском развития БА [113]. В экспериментальных моделях выявлена корреляционная зависимость между значениями КЦЖК и уровнем эозинофилов, продукцией провоспалительных цитокинов и степенью бронхоконстрикции [244]. Некоторые авторы считают, что все КЦЖК имеют одинаковый эффект в отношении легких [46, 113, 158]. По мнению других, масляная кислота (бутират) обладает более выраженным противоаллергическим эффектом [236]. Обсуждается и необходимость взаимодействия пропионата с GPR41 для защиты от аллергического воспаления [65, 238]. Кроме того, известно влияние КЦЖК на изменение уровня цитокинов и экспрессию костимулирующих молекул дендритных клеток (CD80, CD86, CD40), что приводит к изменению способности последних взаимодействовать с регуляторными Т лимфоцитами [162].

В литературе приводятся сведения об участии бактерий кишечника в метаболизме биогенных аминов, а именно гистамина. Было показано, что происходит увеличение количества бактерий с высокой декарбоксилирующей

активностью, т.е. способных образовывать гистамин из гистидина в кишечнике у пациентов с астмой [25, 52, 53, 151, 180]. Наряду с этим известно, что измененная на фоне дисбиоза слизистая оболочка кишки не продуцирует в нужном количестве гистаминазу и диаминооксидазу, т.е. ферменты, участвующие в метаболизме пищевого гистамина [151, 180]. На фоне повышенной проницаемости кишечника гистамин активно всасывается [5, 6, 17, 25, 151, 180] (см. рисунок 5).

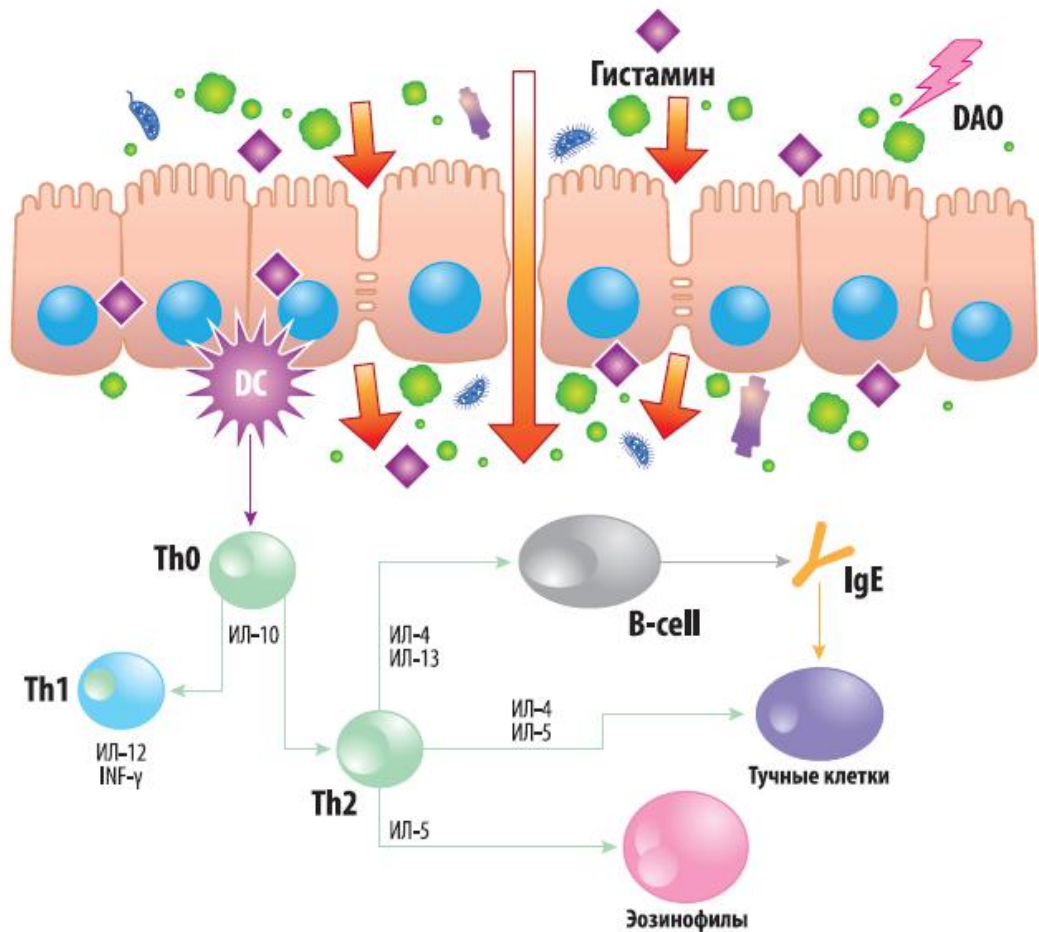


Рисунок 5. Модель развития иммунологической интолерантности у пациентов с бронхиальной астмой. Изменение состава кишечной микрофлоры способствует повышению кишечной проницаемости на фоне снижения экспрессии белков плотных контактов и способствует активации Th2 клеток. Снижение активности диаминооксидазы (DAO) приводит к изменению метаболизма гистамина.

Увеличению уровня гистамина у пациентов с БА способствует так же снижение активности фермента гистамин-N-метилтрансферазы, который отвечает за катаболизм гистамина в эпителии бронхов [15, 17, 180, 225]. Однако, пока не ясно, с какими из рецепторов (H_1 , H_2 , H_3 , H_4) этот гистамин взаимодействует и следовательно какой эффект оказывает [5, 106]. Ряд авторов все же склонны предполагать его участие в развитии и усилении бронхоспазма у астматиков на фоне нарушения состава микрофлоры [5, 6, 180].

Важным фактором, требующим отдельного обсуждения, представляется изменение вентиляционно-перфузионных отношений в легких, которые развиваются у пациентов с БА [31, 235]. Происходящее, в результате этого, снижение выведения углекислого газа и водорода, приводит к их обратному всасыванию и оказывает влияние на величину окислительно-восстановительного потенциала внутрипросветной среды (E_h) [1-3]. Из литературы известно, что развитие и активное существование определенного вида бактерий происходит при соответствующих значениях окислительно-восстановительного потенциала внутрипросветной среды [57]. Таким образом, снижение или повышение E_h определяет рост конкретных микроорганизмов (см. рисунок 6).

Окислительно-восстановительный потенциал представляет собой важную экологическую характеристику, на которую влияют как организм хозяина, так и микробные воздействия. В толстой кишке, как в «анаэробном органе», благодаря ряду факторов поддерживается отрицательный E_h . Его значение определяет работа натриевых насосов на плазматической мембране эпителиоцитов, поверхностные гликопротеиды, а так же различные газообразные молекулярные бактериальные метаболиты (N_2 , O_2 , H_2 , CH_4 , CO_2 , H_2S , NH_3 , CO).

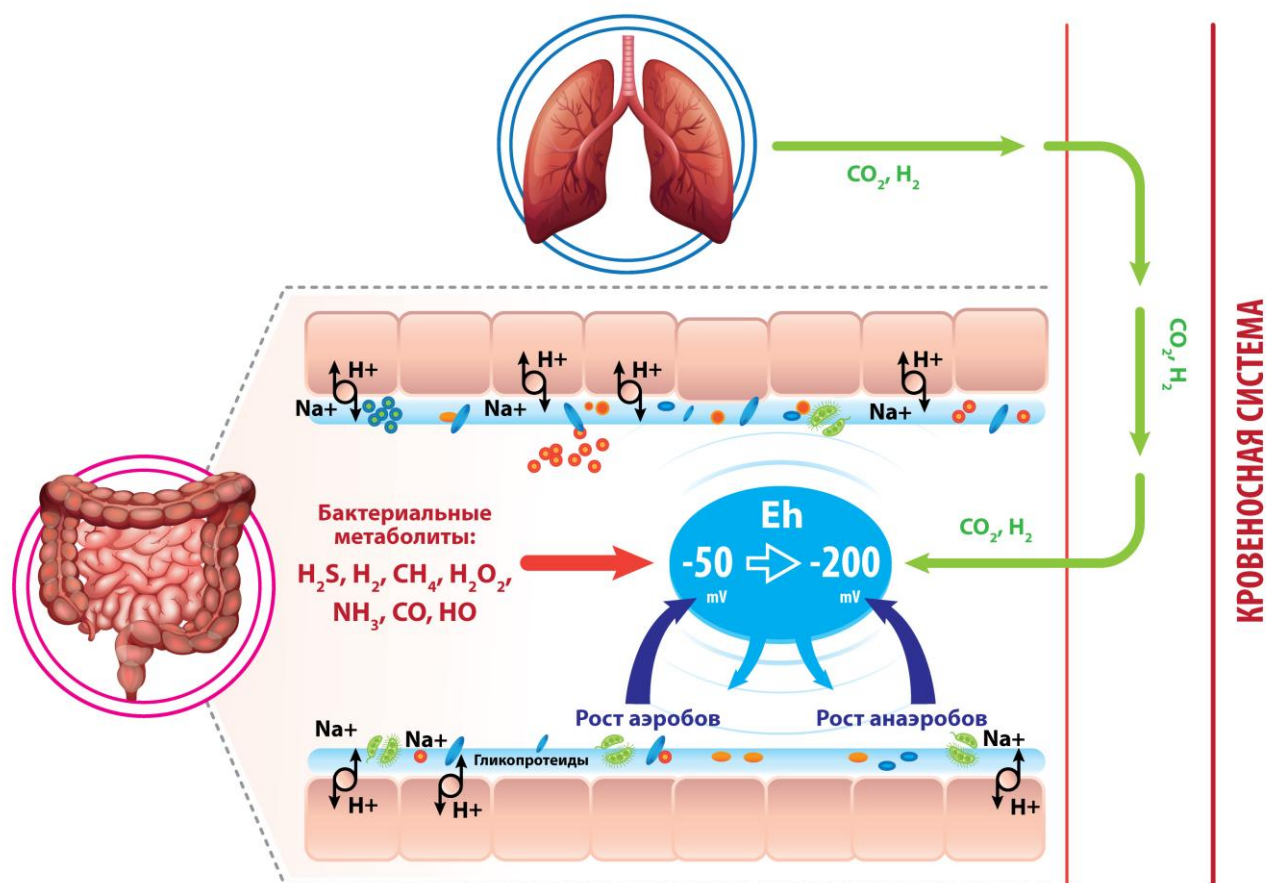


Рисунок 6. Модель изменения окислительно-восстановительного потенциала втутрипросветной среды (E_h) у пациентов с бронхиальной астмой. На величину E_h влияют как хозяин, так и метаболиты микробиоты. Значение E_h определяет работа натриевых насосов плазматической мембраны эпителиоцитов, поверхностные гликопротеиды, газообразные молекулярные бактериальные метаболиты (N_2 , O_2 , H_2 , CH_4 , CO_2 , H_2S , NH_3 , CO). Изменение E_h сопровождается аэробным или анаэробным бактериальным преобладанием.

Известно, что смещение окислительно-восстановительного потенциала втутрипросветной среды в более отрицательные значения, создает благоприятную среду для роста анаэробных микроорганизмов. В то время как, слабо отрицательные значения E_h предпочтительны для аэробов [1-3, 57, 214]. Таким образом, окислительно-восстановительный потенциал определяет стабильность и рост бактерий кишечного биотопа, направленность действия их биологической активности [1, 3, 57].

В случае пациентов с бронхиальной астмой, изменение Eh может служить значимым фактором, усугубляющим нарушение состава микрофлоры, усиливая ее дестабилизацию, а возможно и выступать его причиной (!). Обозначенный патогенетический механизм нельзя недооценивать, однако, он нуждается в уточнении, поскольку исследований на этот счет в литературе не представлено.

В литературе приводятся данные о влиянии микробиоты на циркадные ритмы человека [166]. В этой связи было высказано предположение об их взаимосвязи с течением заболевания, а так же участии в формировании чувствительности к проводимой стандартной терапии БА [120].

1.5 Эффект пробиотиков в лечении респираторных заболеваний

В настоящее время активно ведутся экспериментальные и клинические исследования, посвященные применению пробиотических бактерий в комплексной терапии заболеваний бронхолегочной системы. Цель исследователей - выяснить целесообразность назначения пробиотиков и их эффективность. Изучается возможность применения пробиотических культур у пациентов с острой респираторной вирусной инфекцией, пневмонией, хронической обструктивной болезнью легких, страдающих раком легких, идиопатическим легочным фиброзом (фиброзирующим альвеолитом), муковисцидозом и конечно БА [2, 63, 64, 84, 116, 127, 128, 185].

Результаты экспериментальных исследований по изучению эффективности пробиотиков на животных моделях острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) свидетельствуют об усилении противовирусного иммунного ответа. Применение *Lactobacillus planetarium* (per os) у мышей, инфицированных вирусом гриппа, способствовало увеличению IgA, INF- α , β , уменьшению титров вирусной нагрузки [201]. В аналогичной экспериментальной модели, но с трансназальным введением пробиотических бактерий наблюдалось нарастание уровня IgA, INF- γ , IL-12, IL-2, IL-10, IL-6, а так же увеличение числа Т хелперов в легочной паренхиме [246]. Одновременное назначение *Lactobacillus rhamnosus* и

Bifidobacterium lactis способствовало усилению мукозального иммунитета (увеличение IgA в слюне и сыворотке), увеличению уровня INF- γ , IL-4, IL-10, IL-6 в бронхоальвеолярном лаваже, увеличению числа и активности фагоцитов и естественных киллеров [121].

Полученные в эксперименте данные, в целом, совпадают с результатами клинических наблюдений. В литературе опубликованы результаты двух мета-анализов, которые касались оценки числа и степени тяжести эпизодов ОРВИ в разных возрастных группах. Мета-анализ, представленный Q. Нао и соавторами в 2015 году, объединил 12 рандомизированных клинических исследований, с общим числом участников 3720 человек, принимавших пробиотики на протяжении 3 месяцев. Результаты мета-анализа свидетельствуют в пользу того, что, несмотря на не высокий уровень доказательств, пробиотики имеют преимущество перед плацебо по ряду критериев. На фоне приема пробиотиков было отмечено снижение количества эпизодов ОРВИ до менее четырех раз в год (отношение шансов (OR) 0,53; 95% доверительный интервал (ДИ) 0,37-0,76; $p < 0,001$), уменьшение длительности симптомов - не более 3 дней (средняя разница (MD) - 1,89; 95% ДИ от -2,03 до -1,75; $p < 0,001$), снижение использования антибактериальных препаратов (отношение рисков (RR) 0,65; 95% ДИ 0,45 - 0,94; $p < 0,001$) [129]. В 2016 году Wang Y., Li X. проанализировали результаты 23 рандомизированных клинических исследований, включавших 6269 детей в возрасте от 0 до 18 лет. Авторами отмечено уменьшение общего количества дней ОРВИ в течение года, снижение количества дней отсутствия в школе и пребывания на дневном стационаре, а так же снижение частоты острого среднего отита [247].

Получены интересные сведения о влиянии лактобактерий на поствакцинальный иммунитет. Группе авторов под руководством Davidson L.E. удалось показать, что прием *Lactobacillus rhamnosus* GG в течение 28 суток после вакцинации (штамм H3N2) усиливает иммунологический ответ, что было подтверждено нарастанием более высокого титра защитных антител по

сравнению с группой, получавшей только противогриппозную вакцину (соответственно 84% [95% ДИ 60–97%] и 55% [95% ДИ 32–77%], $p < 0,05$) [83]. В других исследованиях получены схожие результаты [42, 205].

В литературе представлены работы о применении пробиотиков у пациентов с внебольничной пневмонией. В данном случае такая возможность рассматривается пока лишь с точки зрения коррекции состава кишечной микрофлоры, возникшей в результате антибиотикотерапии. Хотя экспериментальные исследования подтверждают снижение летальности и более быстрой редукции воспаления у лабораторных животных с пневмонией на фоне назначения пробиотических бактерий [118, 218, 245]. Наряду с этим установлена роль пробиотиков в профилактике нозокомиальных инфекций ($p < 0,01$) и снижении частоты вентиляционно-ассоциированных пневмоний ($p < 0,01$) [178].

Отмечен эффект *Lactobacillus rhamnosus* и *Bifidobacterium breve* (in vitro) в подавлении провоспалительных медиаторов, активированных воздействием сигаретного дыма и восстановления активности НК - клеток, что имеет большое значение у пациентов с ХОБЛ [187, 188].

Назначение пробиотиков пациентам с идиопатическим легочным фиброзом (фиброзирующим альвеолитом), а так же легочной формой муковисцидоза обсуждается в литературе и в ряде случаев демонстрирует улучшение респираторных проявлений заболевания. Однако, по мнению авторов исследований, интерпретация результатов имеет ряд определенных ограничений [64, 128, 185].

Изучается возможность и целесообразность применения пробиотиков при раке легких. В большинстве случаев это экспериментальные исследования, демонстрирующие иммуномодулирующий эффект пробиотических бактерий. Так, назначение *Lactobacillus acidophilus* по мнению Gui Q. повышало эффект химиотерапии (цисплатина), уменьшало размер опухоли и обеспечивало более высокую выживаемость лабораторных животных [127]. Назначение различных штаммов *Bifidobacterium* способствовало замедлению роста опухоли [222]. А в комбинации с препаратами моноклональных антител, блокирующих

трансмембранные белки добавление *Bifidobacterium* способствовало полному контролю роста опухоли. Клиническое исследование, опубликованное в 2016 году, показало, что *Enterococcus hirae* и *Barnesiella intestinihominis* повышают эффект циклофосфида, активируя Т-клетки, и увеличивают выживаемость пациентов [84]. Каждая из опубликованных работ активно обсуждалась медицинским сообществом с позиции значимости для фундаментальной онкологии. Была высказана точка зрения о том, что представленные результаты по применению пробиотических культур можно назвать инновационным подходом к лечению рака легких [84].

1.6 Эффект пробиотиков в лечении бронхиальной астмы и аллергии

Эффективность пробиотиков у пациентов с бронхиальной астмой и другими аллергическими проявлениями представлена как экспериментальными работами, так и неуклонно растущим числом клинических исследований.

Ряд исследований свидетельствуют о положительных эффектах пробиотиков для лечения аллергического ринита и пищевой аллергии [85, 122, 147, 157].

На животных моделях БА установлено, что применение пробиотических бактерий (*Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* и *Bifidobacterium breve*) активирует экспрессию антиген-специфичных регуляторных Т-клеток, способствуя ослаблению atopических реакций [149, 212]. В работе Forsythe P. и соавт. удалось обнаружить, что введение *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272 и *Lactobacillus rhamnosus* GG снижает уровень провоспалительных цитокинов бронхоальвеолярного лаважа. Уменьшение atopических реакции в дыхательных путях после перорального лечения мышей *Lactobacillus reuteri* ассоциируется со значительным увеличением доли CD4 + CD25 + Foxp3 + Treg в селезенке и медиастинальных лимфатических узлах [110]. В работе Jung-Hwan Kim, назначение *Lactobacillus casei* DN 114001 и *Bifidobacterium longum* KACC 91563 способствовало предупреждению развития пищевой аллергии [157]. Назначение

Bifidobacterium infantis в раннем возрасте снизило гиперреактивность бронхов у взрослых животных, что, по мнению исследователей, происходило за счет повышенной экспрессии Foxp3 лимфоцитами [157]. Введение мышам *Enterococcus faecalis* FK-23 способствовало уменьшению частоты обострений астмы вследствие способности этих бактерий к ослаблению Т-лимфоцитов и продукции провоспалительных цитокинов [256]. Сообщается, что применение *Bifidobacterium bifidum* индуцирует активацию Th17 посредством высвобождения IL-17 дендритными клетками [208]. Использование мышинных моделей атопического дерматита в нескольких исследованиях с применением различных штаммов *Lactobacillus* показало положительный эффект в виде профилактики заболевания, в том числе в повышении производства IgA, снижении содержания IgE, а также уменьшении секреции цитокинов Th2 типа. Koizumi S. и соавт. показали, что введение *Lactobacillus pentosus* значительно повышает активность NK-клеток селезенки и интерферона- γ . Увеличение производства IFN- γ напрямую зависело от IL-12, продуцируемого CD11c + дендритными клетками [155]. Установлено, что *Enterococcus faecalis* может снижать симптомы аллергического заболевания дыхательных путей, а так же влиять на клетки Th17, в связи с чем, авторы считают его потенциальным терапевтическим средством, как для лечения астмы, так и для влияния на Th17 иммунный ответ [41].

Заселение бактериями лабораторных животных, выращенных в стерильной среде, способствует стимуляции секреторного IgA и CD4+Т-клеток одновременно уменьшая значения IgE [162]. Было установлено, что взаимодействие дендритных клеток с пробиотическими бактериями активирует IL-10, что способствует дифференцировке и выживанию Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), смещая поляризацию иммунного ответа в сторону Т хелперов 1 типа [162]. Вместе с этим, стимуляция КЦЖК CD4+Foxp3 регуляторных клеток также уменьшает продукцию провоспалительных цитокинов, возвращая реакции к фенотипу Т-хелперов 1 типа [114, 162].

Результаты исследований *in vitro* на культурах клеток, а также на животных моделях показали хорошие результаты в профилактике и терапии аллергических состояний, что позволило перенести изучение их действия на клинический уровень [30, 82, 93, 134, 145, 154, 179, 252]. Однако, скептическое отношение многих исследователей в этом вопросе очевидно. В большей степени в литературе приводятся результаты исследований пробиотиков в детской популяции и крайне мало работ по изучению эффективности пробиотических бактерий в лечении бронхиальной астмы у взрослых.

В 2013 году опубликован мета-анализ 25 рандомизированных плацебо-контролируемых исследований, в которых изучено на детской популяции влияние пробиотических добавок на atopическую сенсibilизацию и профилактику астмы у детей. Пробиотики были эффективны в снижении уровня общего иммуноглобулина E (среднее снижение: $-7,59$ Ед / мл [95% ДИ от $-14,96$ до $-0,22$]; $p = 0,044$), особенно при длительном наблюдении. Отмечено, что пробиотики значительно снижали риск atopической сенсibilизации при внутриутробном введении (относительный риск: $0,88$ [95% ДИ: от $0,78$ до $0,99$]; $p = 0,035$) и постнатально (относительный риск: $0,86$ [95% ДИ: от $0,75$ до $0,98$]; $p = 0,027$), но не снижали развитие астмы (относительный риск: $0,96$ [ДИ 95%: от $0,85$ до $1,07$]) [101].

Несколькими годами позже (в 2017г), опубликованы результаты исследования М. Cabana по оценке противоаллергической активности пробиотиков. В течение 6 месяцев новорожденные получали *Lactobacillus rhamnosus GG*, с последующим наблюдением в течение 5 лет. Развитие бронхиальной астмы после приема пробиотика составило 9,7% против 17,4% у детей, не принимающих пробиотик [68].

Систематический обзор 2019г объединил результаты 19 рандомизированных контролируемых исследований, которые были сосредоточены на определении влияния пробиотиков на профилактику или облегчение симптомов астмы у детей. Всего в испытаниях приняли участие 5157

детей. Результаты анализа показали, что прием пробиотиков не влиял на предотвращение развития бронхиальной астмы (относительный риск RR, 0.94 [95% ДИ, 0.82–1.09]), однако способствовал увеличению продолжительности ремиссии заболевания (RR, 0.61 [95% ДИ, 0.42–0.90]) [249].

Увеличение продолжительности ремиссии бронхиальной астмы на фоне приема пробиотиков, а так же увеличение пиковой скорости выдоха и нормализации цитокинового профиля (IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ) было отмечено и другими исследователями [146, 168, 191, 241, 248, 250].

Представляется, что противоречивые результаты приведенных исследований связаны в первую очередь со штаммоспецифическими эффектами пробиотических бактерий и их взаимодействием, которые не были учтены в этих работах, а так же разной продолжительностью приема пробиотиков.

В этой связи интересны результаты экспериментальной работы Christensen HR., где был изучен эффект одновременного действия нескольких бактериальных штаммов [75]. Исследователями было продемонстрировано, что иммунорегулирующее действие определенного бактериального штамма может быть подавлено в присутствии других штаммов. Так, удалось выявить, что *Lactobacillus reuteri* по сравнению *Lactobacillus casei* оказывает меньший эффект относительно IL-12 и TNF- α , тогда как сочетание *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus reuteri* может ингибировать *Lactobacillus acidophilus* индуцированную продукцию IL-12 дендритными клетками, что, соответственно, изменяет продукцию IFN- γ [75]. Разный иммунорегулирующий эффект *Bifidobacterium* был выявлен в исследовании López P. Автором изучен 21 штамм, принадлежащий к четырем видам бифидобактерий. Часть штаммов в культуре мононуклеарных клеток человека (in vitro) индуцировала преимущественно продукцию цитокинов либо Th1-профиля (интерферон γ и TNF), либо Th17-профиля (IL 17) или же Treg-профиля (IL 10) [170].

Таким образом, интерпретация результатов исследования, безусловно, должна учитывать состав микробиоты каждого индивидуума, рацион питания, факторы окружающей среды, предшествующее применение препаратов,

способных повлиять на состав микробиоты (например, антибиотики) и конкретные пробиотические штаммы, назначаемые пациентам.

В большинстве случаев, ключевые механизмы благоприятного действия пробиотиков рассматриваются в первую очередь с позиции их плеiotропного действия. Учитывается возможность пробиотических бактерий препятствовать адгезии патогенных бактерий и вирусов, продуцировать бактериоцины, H_2O_2 , NO, восстанавливать колонизационную резистентность, осуществлять продукцию короткоцепочечных жирных кислот, участвовать в регуляции кишечного транзита, способствовать регенерации слизистой оболочки и восстановлению кишечной проницаемости, осуществлять конкурентную элиминацию патогенов [41, 60, 76, 82, 96, 134, 179, 191, 248, 249], а так же усиливать секрецию IgA, снижая уровень IgE, влиять на активность Toll-подобных и NOD-подобных рецепторов, дифференцировку регуляторных цитокинов [50, 101, 139, 147].

В рекомендациях всемирной организации аллергии (WAO) применение пробиотиков с целью профилактики аллергических заболеваний показано и обосновано для беременных и кормящих женщин, с отягощенным аллергическим анамнезом, а так же детям с высоким риском развития аллергии [108]. В отношении бронхиальной астмы пока таких рекомендаций нет.

Таким образом, открытие роли микробиоты в жизнедеятельности организма человека позволило по-новому взглянуть на патогенез аллергических заболеваний респираторного тракта и предположить новые пути их коррекции. Однако до сегодняшнего момента, многие вопросы остаются без ответа. В том числе, недостаточно изучен состав кишечного биотопа при БА у взрослых с разной длительностью и фенотипом заболевания. Исследований по эффективности применения пробиотиков у взрослых недостаточно. Нет пока ответа и в отношении наиболее эффективных штаммов микроорганизмов, которые следует использовать в лечении? Когда следует начинать лечение? Длительность терапии?

Все эти вопросы побуждают к проведению новых научных исследований для обоснования и лучшего понимания потенциальной возможности назначения пробиотических культур пациентам с бронхиальной астмой.

Глава 2

Материалы и методы исследования

2.1 Дизайн исследования

Для решения поставленных в исследовании задач, были проанализированы результаты обследования и лечения пациентов с atopической и неатопической бронхиальной астмой. Дизайн исследования демонстрирует схема 1.

Схема 1. Дизайн исследования.



2.2 Характеристика пациентов

С 2016 по 2019 год в клинике пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии имени В.Х. Василенко УКБ №2 Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (директор клиники - академик РАН, профессор В.Т. Ивашкин) обследовано 303 пациента с диагнозом бронхиальная астма в стадии обострения (атопическая (син. аллергическая по МКБ - J45.0) или неатопическая форма (син. неаллергическая по МКБ - J45.1)), в возрасте от 18 до 65 лет. Все пациенты проходили обследование и стационарное лечение в отделение пульмонологии (заведующая отделением - к.м.н. Н.И. Кокина). До включения в исследование, пациентами и лицами контрольной группы подписывалось информированное согласие на участие в научной работе, утвержденной Локальным Этическим Комитетом Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (№ 05-18 от 16.05.2018).

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Наличие письменного информированного согласия пациента на участие в научном исследовании;
2. Мужчины и женщины от 18 до 80 лет;
3. Установленный, согласно Федеральным и Международным рекомендациям, диагноз: бронхиальная астма атопическая или неатопическая форма с объемом форсированного выдоха за 1 сек. (ОФВ₁) меньше 80 % и положительной пробой с бронходилататором; не контролируемая бронхиальная астма;
4. Отказ от курения как минимум в течение последних 3 лет.

Критерии невключения пациентов в исследование:

1. Возраст: меньше 18 лет или более 80 лет;
2. Беременность, кормление грудью;
3. Наличие сопутствующей патологии: острый инфаркт миокарда, инсульт, цирроз печени, сахарный диабет, онкологические заболевания, инфекции, ВИЧ.

4. Прием в течение трех предыдущих месяцев антибактериальных препаратов, пробиотиков, пребиотиков, сахароснижающих препаратов, ингибиторов протонной помпы, прокинетиков, слабительных средств.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании;
2. Развитие у больного тяжелого патологического состояния, при котором наблюдение за ним со стороны исследователя становится плохо реализуемым, что может затруднить интерпретацию данных и помешать ходу исследования (ОНМК, инфаркт миокарда, психические заболевания и др.)

Из обследованных 303 человек 197 соответствовали критериям исследования. Не включённые в исследование пациенты (106 человек) принимали в течение 3 месяцев до начала исследования антибактериальные препараты ($n=34$), пробиотики ($n=18$), имели инфекционное заболевание ($n=15$), сахарный диабет ($n=12$), курили ($n=27$).

Диагноз БА устанавливался на основании данных анамнеза пациентов (для атопической астмы учитывалось наличие ранее атопических реакций, положительные пробы с аллергеном), физикального обследования пациентов, результатов лабораторной диагностики (клинический, биохимический анализы крови, уровень иммуноглобулинов и С-реактивного белка), инструментального обследования (функция внешнего дыхания с объемом форсированного выдоха за 1 сек. (ОФВ₁) меньше 80% и положительным бронходилатационным тестом (прирост ОФВ₁ более чем на 15% от исходных показателей; рентгенологическое исследование легких, в отдельных случаях мультиспиральная компьютерная томография).

Степень тяжести бронхиальной астмы определялась на основании «Федеральных клинических рекомендаций по диагностике и лечению бронхиальной астмы 2016» [31] и «GINA 2017» (Global Initiative for Asthma) [235], учитывая количество ночных и дневных симптомов заболевания, наличие

нарушений физической активности и сна, изменений ОФВ_1 и пиковой скорости выдоха (ПСВ) (см. приложение 1). Контролируемость бронхиальной астмы оценивалась клинически, согласно рекомендациям «GINA 2017» с учетом результатов, заполненного пациентами теста по контролю над астмой (АСТ-тест - Asthma Control Test) (см. приложение 2). Все пациенты, включенные в исследование, отмечали ежедневные симптомы и ночные пробуждения, связанные с БА, снижение физической активности, а так же необходимость прибегать к препаратам “неотложной помощи” чаще 2 раз в неделю. Таким образом, в диссертационное исследование включены пациенты с неконтролируемой бронхиальной астмой среднетяжелого и тяжелого течения.

Среди обследованных нами больных было 105 (53%) женщин и 97 (47%) мужчин. В группе больных атопической (син. аллергической) бронхиальной астмой (АА) оказалось 53 (48%) мужчины и 57 (52%) женщин, средний возраст составил 42,36 [33,17; 51,82] года. Длительность анамнеза заболевания в среднем составляла 19,86 [15,96; 23,32] лет. В группе пациентов с неатопической (син. неаллергической) астмой (НА) было 39 (45 %) мужчин и 48 (55%) женщин, средний возраст составил 40,39 [31,18; 52,03] лет. Длительность анамнеза заболевания в среднем составляла 16,17 [12,94; 21,41] лет.

Различия по данным показателям не достигали статистически значимого уровня ($p > 0,05$) (Таблица 2).

Для лечения БА (на амбулаторном этапе) пациенты получали стандартную базисную терапию, включающую в себя 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 пациентам проводилась терапия системными стероидами в течении (в среднем) 7-9 дней: Десаметазон 4 - 8 мг (Преднизолон 30-60 мг).

Таблица 2. Сравнение групп пациентов atopической и неатопической астмой по полу, возрасту, длительности анамнеза и тяжести заболевания

Показатель	Атопическая астма n = 110	Неатопическая астма n = 87	p
Возраст больных (годы) Me [-ДИ _{95%} ;+ДИ _{95%}]	42,36 [33,17; 51,82]	40,39 [33,18; 52,03]	0,08
Мужчины (n, %)	53 48 %	39 45 %	> 0,05
Женщины (n, %)	57 52 %	48 55 %	
ИМТ (кг/м ²) Me [-ДИ _{95%} ;+ДИ _{95%}]	25,44 [23,99; 26,89]	26,25 [24,63; 27,87]	0,12
Анамнез (годы) Me [-ДИ _{95%} ;+ДИ _{95%}]	19,86 [13,96; 23,32]	16,17 [12,94; 21,41]	0,058
Тяжесть заболевания	Среднетяжелое течение	Среднетяжелое течение	> 0,05

На двух этапах нашего исследования к стандартной терапии бронхиальной астмы добавлялось лечение, направленное на модуляцию состава микрофлоры. На этапе исследования патогенетического и клинического значения синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке у пациентов с бронхиальной астмой пациенты были рандомизированы следующим образом (схема 2):

- с учетом фенотипа бронхиальной астмы:

атопическая форма (АА) выявлена у 45 человек (из них мужчин- 21, женщин-24), неатопическая астма (НА) - у 35 (из них мужчин-16, женщин-19).

- с учетом наличия у пациентов СИБР:

АА СИБР (+) (30 пациентов) и АА СИБР (-) (15 пациентов).

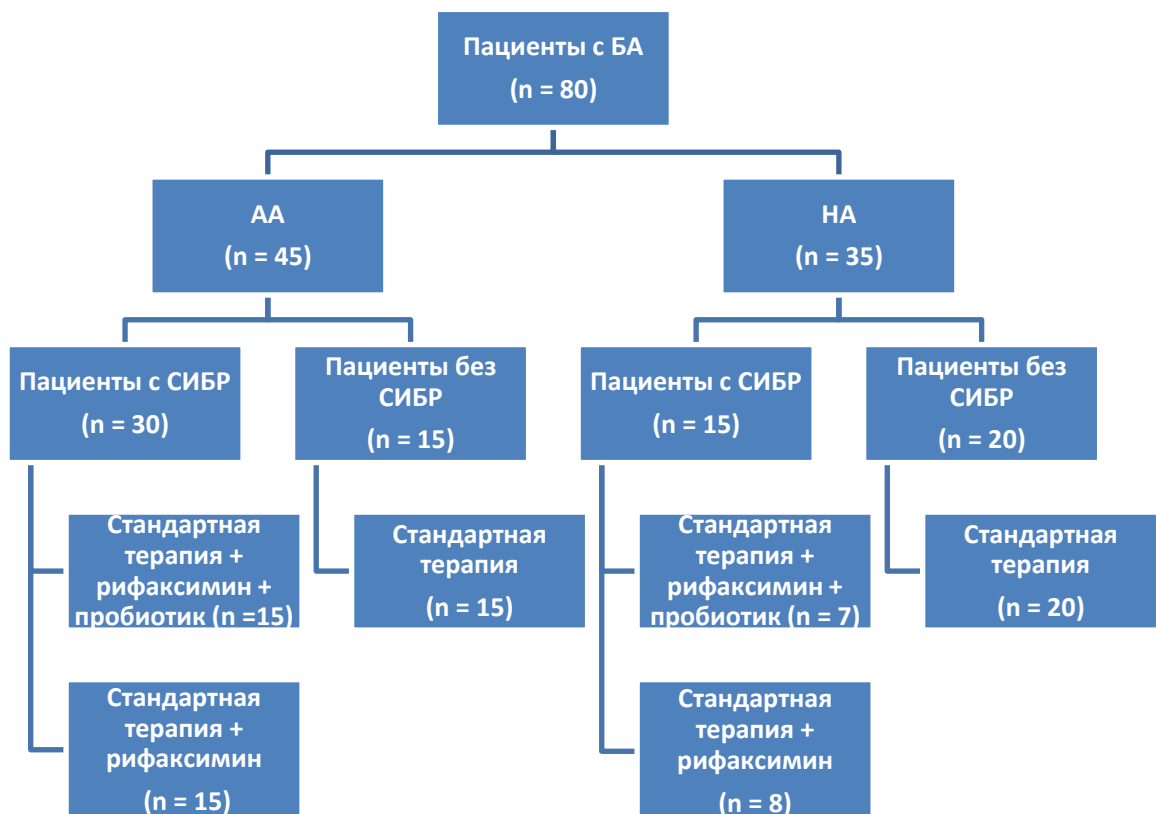
НА СИБР (+) (15 пациентов) и НА СИБР (-) (20 пациентов).

- с учетом схемы лечения СИБР:

подгруппа из 23 пациентов (15 из группы atopической БА и 8 из группы неатопической БА), получавших рифаксимин в дозе 600 мг в сутки (по 200 мг 3 раза в день), на протяжении 7 дней;

подгруппа из 22 пациентов (15 из группы atopической БА и 7 из группы неатопической БА), получавших рифаксимин в той же дозе, с последующим приемом пробиотического препарата Флорасан Д, содержащего: *Bifidobacterium bifidum* Ac 2773D не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium longum* Ac 2775D не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium infantis* Ac 2774D не менее 1×10^9 КОЕ; *Lactobacillus rhamnosus* B3170D не менее 1×10^9 КОЕ, по 1 капсуле 3 раза в день на протяжении 1 месяца.

Схема 2. Распределение пациентов по группам на этапе исследования значения синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке



На этапе исследования метаболической активности кишечной микробиоты у пациентов с БА для определения эффективности воздействия на кишечную микробиоту, лица, имеющие атопический фенотип заболевания были рандомизированы (схема 3):

- в зависимости от наличия СИБР:

АА СИБР (+) (20 пациентов) и АА СИБР (-) (10 пациентов).

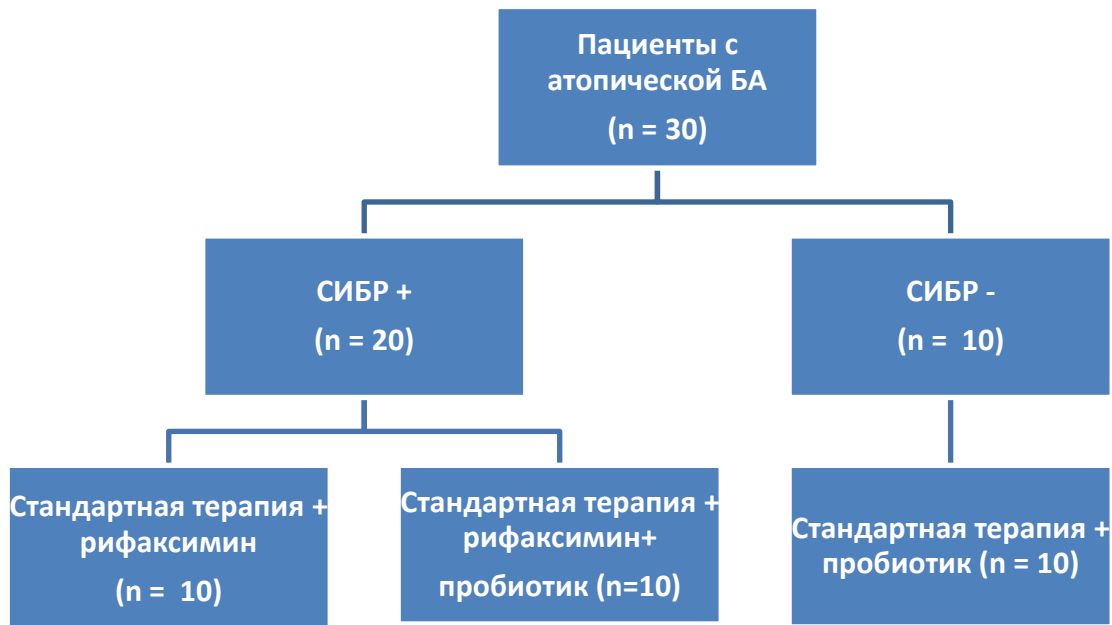
- с учетом схемы лечения СИБР:

подгруппа А состояла из 10 пациентов, получавших рифаксимин в дозе 600 мг в сутки (по 200 мг 3 раза в день), на протяжении 7 дней;

подгруппа Б - из 10 пациентов, получавших рифаксимин в той же дозе, с последующим приемом пробиотического препарата Лактобаланс® по 1 капсуле 3 раза в день на протяжении 1 месяца. Каждая капсула пробиотика содержит не менее 3 млрд. пробиотических микроорганизмов ($3,0 \times 10^9$ КОЕ/капс.): *Lactobacillus gassery* KS-13, *Lactobacillus gasser* LAC-343, *Lactobacillus ramnosus* LCS-742, *Bifidobacterium bifidum* G9-1, *Bifidobacterium longum* MM-2, *Bifidobacterium longum* BB536 Strain M, *Bifidobacterium infantis* M-63, *Bifidobacterium breve* M16V *mun* T, *Bifidobacterium lactis* B1-04.

Подгруппа В, пациентов с атопической астмой без СИБР (10 человек), в составе стандартной терапии для лечения БА принимали пробиотик Лактобаланс® по 1 капсуле 3 раза в день на протяжении 1 месяца.

Схема 3. Распределение пациентов по группам в исследовании эффективности воздействия на кишечную микробиоту у пациентов атопической астмой



2.3 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.

Для контрольной группы 1 (ГК1), при проведении секвенирования гена 16S рРНК бактерий в образцах кала, были отобраны 15 клинически здоровых добровольцев. Респонденты группы контроля достоверно не отличались от пациентов основной группы по полу и возрасту, индексу массы тела (Таблица 3).

Таблица 3. Сравнение групп пациентов атопической и неатопической астмой, а также респондентов группы контроля 1 при проведении секвенирования гена 16S рРНК бактерий в образцах кала

Показатель	Атопическая астма n = 20	Неатопическая астма n = 20	Группа контроля 1 n = 15	p
Возраст (годы) Me [-ДИ _{95%} ; +ДИ _{95%}]	43,61 [32,81; 49,32]	44,12 [34,27; 51,18]	46,78 [32,74; 51,13]	0,64
Мужчины (n, %)	11 55%	9 45%	6 40%	> 0,05
Женщины (n, %)	9 45%	11 55%	9 60%	
ИМТ (кг/м ²) Me [-ДИ _{95%} ; +ДИ _{95%}]	25,36 [23,61; 27,11]	25,60 [22,70; 27,19]	26,24 [23,37; 27,01]	0,28
Анамнез (годы) Me [-ДИ _{95%} ; +ДИ _{95%}]	19,64 [13,96; 24,14]	20,01 [14,08; 22,63]	-	0,37
Тяжесть заболевания	Среднетяжелое течение	Среднетяжелое течение	-	> 0,05

Для контрольной группы 2 (ГК2), при проведении газожидкостного хроматографического анализа КЦЖК бактерий в образцах кала, были отобраны 17 клинически здоровых добровольцев (Таблица 4).

Таблица 4. Сравнение групп пациентов атопической и неатопической астмой, а также респондентов группы контроля 2 при проведении газожидкостного хроматографического анализа КЦЖК бактерий в образцах кала

Показатель	Атопическая астма n = 30	Неатопическая астма n = 20	Группа контроля 2 n = 17	p
Возраст больных (годы) Me [-ди _{95%} ;+ди _{95%}]	39,46 [34,78; 47,07]	44,13 [36,71; 52,08]	37,53 [26,76;48,38]	0,08
Мужчины (n, %)	14 47%	9 45%	8 47%	> 0,05
Женщины (n, %)	16 53%	11 55%	9 53%	
ИМТ (кг/м ²) Me [-ди _{95%} ;+ди _{95%}]	25,09 [23,67; 26,09]	25,67 [22,98; 27,79]	25,14 [23,41; 26,86]	0,12
Анамнез (годы) Me [-ди _{95%} ;+ди _{95%}]	21,06 [15,32; 25,85]	18,98 [13,93; 26,11]	-	0,35
Тяжесть заболевания	Среднетяжелое течение	Среднетяжелое течение	-	> 0,05

Для контрольной группы 3 (ГКЗ), при проведении секвенирования гена 16S рРНК бактерий в образцах орофарингеальных мазков, были отобраны 10 клинически здоровых добровольцев (Таблица 5).

Таблица 5. Сравнение групп пациентов atopической и неатопической астмой, а также респондентов группы контроля 3 при проведении секвенирования гена 16S рРНК бактерий в образцах орофарингеальных мазков

Показатель	Атопическая астма n = 15	Неатопическая астма n = 12	Группа контроля 3 n = 10	p
Возраст больных (годы) Me [-ДИ _{95%} ; +ДИ _{95%}]	40,32 [33,71; 45,03]	42,61 [35,92; 51,67]	41,53 [32,98; 49,02]	0,41
Мужчины (n, %)	7 47%	5 42%	4 40%	> 0,05
Женщины (n, %)	8 53%	7 58%	6 60%	
ИМТ (кг/м ²) Me [-ДИ _{95%} ; +ДИ _{95%}]	24,95 [23,01; 26,98]	25, 71 [23,58; 27,82]	25,62 [22,98; 27,15]	0,26
Анамнез (годы) Me [-ДИ _{95%} ; +ДИ _{95%}]	22,15 [15,75; 25,13]	19,97 [14,25; 24,78]	-	0,37
Тяжесть заболевания	Среднетяжелое течение	Среднетяжелое течение	-	> 0,05

2.4 Методы обследования

Всем больным проведены общепринятые клинико-лабораторные исследования: клинический анализ крови, мокроты и мочи, биохимическое исследование крови, определение иммуноглобулинов класса А, М, G; общего иммуноглобулина класса Е, С-реактивного белка (СРБ), рентгенологическое исследование органов грудной клетки, электрокардиография. Лабораторные исследования проводились до начала терапии и спустя один месяц после начала лечения. Водородный дыхательный тест с лактулозой проводился до лечения и через 14 дней. Исследование функции внешнего дыхания с пробой с бронхолитиком 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 бронхиальной астмы, требующих госпитализации пациентов.

До и после лечения, 34 пациента основной группы заполнили тест по контролю над астмой. АСТ-тест (Asthma Control Test) - валидизированный опросник (приложение 3), включающий в себя 5 вопросов, касающихся выполнения пациентами привычного объема работы, наличия затрудненного дыхания и ночных пробуждений, частоты применения «быстродействующих» ингаляторов, собственной оценки, контролируемости заболевания. Анализ результатов теста осуществлялся по сумме набранных баллов (приложение 4): 25 баллов – полный контроль; 20-24 балла - заболевание контролируется хорошо (но не полностью); 19 баллов и менее – неконтролируемая астма (требуется коррекция терапии); 14 баллов и менее – необходима срочная медицинская помощь. Статистический анализ продемонстрировал прямую статистически значимую положительную корреляционную связь результатов опросника и значений функции внешнего дыхания пациентов ($ОФВ_1$) ($r_s = 0,68$, $p < 0,01$), а так же результатов опросника и уровнем контроля бронхиальной астмы, по мнению

лечащего врача ($r_s = 0,67$, $p < 0,01$). Выявлена прямая слабая корреляция результатов опросника с длительностью заболевания ($r_s = 0,19$, $p = 0,28$).

Исследование функции внешнего дыхания с бронхолитической пробой осуществлялось на аппарате Mas terScreen® (VIASYS Healthcare). Исследование выполнялось врачами отделения функциональной диагностики клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии имени В.Х. Василенко УКБ №2 Первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Пациенты обследовались по стандартной методике - в утренние часы, натощак. Перед проведением пробы, бронхолитические препараты, принимаемые больными, отменяли в соответствии с их фармакокинетикой: - за 6 часов до исследования отменяли препараты, в состав которых входят β_2 -агонисты короткого действия; - за 12 часов отменяли препараты, содержащие длительно действующие β_2 -агонисты; - за 24 часа - пролонгированные теофиллины. В качестве бронходилататора, при проведении теста, использовали β_2 -агонист короткого действия Сальбутамол в дозе от 200 до 800 мкг. Бронходилатационный ответ оценивали через 15 мин., у пациентов включенных в исследование, прирост значения $ОФВ_1$ составлял не менее 12 -15% от исходных величин.

Водородный дыхательный тест с лактулозой проводился пациентам и лицам контрольной группы с целью верификации СИБР. Исследование осуществлялось с помощью прибора Gastro+Gastrolyzer (№ HG001019, Bedfont Scientific Ltd., Великобритания. Регистрационное удостоверение: № ФСЗ 2010/06253). Измерение концентрации водорода (H_2) в выдыхаемом воздухе неинвазивная, общепринятая, стандартная, валидизированная методика. Водородный дыхательный тест позволяет оценить степень бактериальной ферментации углеводов в тонкой кишке, что в свою очередь служит отражением метаболической активности бактерий желудочно-кишечного тракта. Водород, образующийся в ходе ферментации бактериями углеводов, всасывается из кишечника, с током крови достигает легких и выделяется с выдыхаемым воздухом. Увеличение концентрации, в выдыхаемом воздухе, на более чем 12

рртт по сравнению с уровнем, измеренным до приема лактулозы, служит диагностическим признаком СИБР.

В соответствии с инструкцией производителя применение водородного дыхательного теста с лактулозой возможно у любого испытуемого, вне зависимости от заболевания. Таким образом, наличие у пациентов БА (с изменением в ходе естественного течения заболевания вентиляционно-перфузионного отношения легочной ткани) не является ограничением для проведения данного исследования.

Согласно стандарту выполнения теста, накануне пациенты исключали из рациона медленно всасываемые углеводы (хлеб, картофель, злаки) и растительную клетчатку, во избежание изменения выведения водорода. Исследование проводилось натощак после санации ротовой полости. За 2 часа до процедуры и во время проведения теста испытуемым рекомендовалось ограничить физическую нагрузку (с целью предотвращения гипервентиляции). Отказ от курения перед тестом не требовался, поскольку, согласно критериям исследования участники основной и контрольной групп не курят. После измерения базального уровня водорода, пациент принимал 10 г лактулозы (препарат Дюфалак), растворенной в 400 мл воды, после чего вновь санировалась полость рта во избежание активации ее микрофлоры. Измерение уровня H_2 проводили на 15-ой, 30-ой, 45-ой, 75-ой и 105-ой минутах исследования.

При анализе результатов учитывалось изменение концентрации H_2 в выдыхаемом воздухе, связанное с увеличением бактериальной активности в тонкой кишке (в течение первых 60 мин). Во внимание так же принимался и прирост водорода, связанный с ферментацией лактулозы бактериями толстой кишки, происходящий в норме.

Секвенирование бактериальной 16S рРНК проводилось в образцах кала и орофарингеальных мазках. Метагеномный анализ образцов кала и орофарингеальных мазков осуществлялся на базе Центра Коллективного Пользования "Геном" ФГБУ "Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта" Российской академии наук, г. Москва (руководитель ЦКП "Геном" - Кудрявцева А.В, биоинформатик - Краснов Г.С.). Биоматериал собирался на следующий день после госпитализации пациентов в клинику.

Образцы кала для проведения секвенирования 16S РНК собирались в чистую одноразовую посуду и сразу же замораживались при температуре -80°C .

Забор орофарингеального мазка проводился натошак. За 2-3 суток исключалось применение спреев, мазей, ополаскивателей ротовой полости, содержащих антибактериальные и противомикробные вещества. Пациентов предупреждали, о необходимости воздержаться от чистки зубов до забора биоматериала, употребления воды, использования жвачки. Для проведения процедуры использовался универсальный одноразовый, стерильный зонд-тампон (Регистрационное удостоверение: № ФСЗ 2011/10587 от 16.09.2011, приказом от 3.06.2016 №4896 допущено к обращению на территории РФ, InterLabService). Зонд-тампон с биологическим материалом, полученным с задней стенки глотки, помещали в транспортную среду, предназначенную для взятия, транспортировки и хранения клинического материала из респираторного тракта. Транспортная среда представляет собой стерильную пробирку типа эппендорф, которая содержит изотонический водно-солевой буферный раствор с консервантом и криостабилизатором (Регистрационное удостоверение: № ФСР 2009/05011 от 09.04.2019 г., InterLabService). Полученные образцы сразу же замораживались при температуре -80°C .

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). Подготовка 16S метагеномных библиотек

осуществлялась в соответствии с протоколом 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США), рекомендованным Illumina для секвенатора MiSeq. Первый раунд амплификации переменных участков V3-V4 гена 16S рРНК осуществляли с использованием прямого (TCGTCTGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-CCTACGGGNGGCWGCAG) и обратного (GTCTCTGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-GACTACHVGGGTATCTAATCC) праймеров, преимущественно направленных на амплификацию бактериальных генов рРНК (охват бактерий порядка 90%; охват архей менее 5%); программа амплификации (амплификатор Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, США):

- 1) 95°C - 3 мин
- 2) 30 циклов: 95°C - 30с; 55°C - 30с; 72°C - 30с
- 3) 72°C - 5 мин
- 4) 4°C.

Полученные ПЦР-продукты, были очищены с использованием шариков Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США) в соответствии с протоколом производителя. Второй раунд амплификации для двойного индексирования образцов осуществляли с использованием комбинации специфических праймеров. Программа амплификации (амплификатор Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, США):

- 1) 95°C - 3мин
- 2) 8 циклов: 95°C - 30с; 55°C - 30с; 72°C - 30с
- 3) 72°C - 5мин
- 4) 4°C.

Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием шариков Agencourt AMPure XP. Концентрацию полученных библиотек 16S определяли с помощью флуориметра Qubit® 2.0 (Invitrogen, США) с использованием набора QuantiT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. Очищенные ампликоны смешивали эквимольно, в соответствии с полученными концентрациями. Качество

приготовленного пула библиотек проводили на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) с использованием набора Agilent DNA 1000 Kit. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina), в режиме парно-концевых прочтений, 2x150 нукл. с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycles). Для оценки общего числа родов, семейств и др. (индексы Шеннона, Чao1, ACE) использовались пакеты *vegan* и *fossil*.

Газожидкостная хроматография проводилась в образцах кала с целью определения КЦЖК. Исследование осуществлялось, согласно стандартной медицинской технологии "Способ определения короткоцепочечных жирных кислот (фракции C₂-C₆ с изомерами) в различных биологических субстратах, методом газожидкостной хроматографии" (Регистрационное удостоверение: № ФС-2006/030-у от 17.03.2006 г. Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ). Образцы кала для газожидкостной хроматографии собирались в чистую одноразовую посуду, и сразу же замораживались при температуре -80°C. Исследование проводилось в лаборатории "ДНКом" на газовом хроматографе "Хромос ГХ-1000 с детектором ионизации в пламени". Согласно протоколу исследования, пробу надосадочной жидкости (около 1 мкл), полученной после центрифугирования исследуемого образца со стандартными растворами, вводили в испаритель хроматографа с детектором ионизации в пламени. Время хроматографирования около 8 мин, с последующей компьютерной обработкой хроматограмм.

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 [57]).

Больным проводилось тестирование для выявления их субъективного определения контролируемости течения БА. С этой целью был выбран валидизированный опросник **АСТ-тест (Asthma Control Test)** (Приложение 3). Было предложено ответить на вопросы теста по контролю над астмой дважды - первый раз в день госпитализации и второй раз, в день выписки из стационара. Опросник включает в себя 5 вопросов, адресуемых к состоянию пациента в

течение последних 4 недель. Вопросы теста касаются возможности выполнения привычной физической нагрузки, появления или учащения дневных и ночных симптомов заболевания, необходимости прибегать к препаратам “скорой помощи”. В соответствии со степенью выраженности проявлений, каждому вопросу присвоены значения от 1 (максимальная выраженность симптома) до 5 (симптом отсутствует). Результаты проведения теста (максимальная сумма баллов - 25) позволяют определить контролируемость течения заболевания, необходимость коррекции терапии (Приложение 4).

2.5 Статистическая обработка материала

Статистический анализ результатов проводился с помощью программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Качественные признаки описывали при помощи абсолютных и относительных (%) величин, количественные при помощи 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). Было принято, если модуль корреляции $r \leq 0,25$ – корреляция слабая, $0,25 < r < 0,75$ – умеренная сила корреляционной связи, $r \geq 0,75$ – корреляция сильная.

В некоторых случаях результаты работы проиллюстрированы в виде таблиц и диаграмм. Значимые различия в таблицах и тексте выделены жирно и курсивом.

Глава 3

Состояние микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой

Для определения состояния микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой были изучены следующие показатели:

1. Состав микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы.
2. Определение бактериального разнообразия микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы.
3. Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рНК бактерий в образцах кала, с клиническими симптомами атопической бронхиальной астмы.
4. Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рНК бактерий в образцах кала, с клиническими симптомами неатопической бронхиальной астмы.
5. Сравнение состава микробиоты кишечника пациентов с атопической астмой с учетом СИБР статуса пациентов.
6. Сравнение состава микробиоты кишечника пациентов с неатопической астмой с учетом СИБР статуса пациентов.

3.1 Состав микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы по данным молекулярно-генетического исследования (секвенирование 16S рНК)

Для оценки состояния микробиоты толстой кишки, 40 пациентам с бронхиальной астмой, из которых 20 человек страдали атопической астмой и у 20 больных был неатопический фенотип заболевания, а также 15 клинически здоровым добровольцам из группы контроля (ГК1) проводилось молекулярно-генетическое исследование микробиоты кишечника (секвенирование 16S рНК); для обнаружения синдрома избыточного бактериального роста (СИБР) выполнялся водородный дыхательный тест с лактулозой.

Включенные в исследование лица были сопоставимы по возрасту ($p > 0,05$), полу ($p > 0,05$), индексу массы тела ($p > 0,05$). Пациенты групп АА и НА были сравнимы по длительности анамнеза ($p > 0,05$) и тяжести течения бронхиальной астмой ($p > 0,05$) (таблица 3). В зависимости от наличия СИБР в тонкой кишке пациенты были распределены на подгруппы по 10 человек каждая: АА СИБР (+) и АА СИБР (–), НА СИБР (+) и НА СИБР (–).

Состав кишечной микробиоты в исследуемых группах представлен в таблице 6 и диаграммах 1, 2.

Наиболее часто встречающийся тип бактерий, в исследуемых группах, представлен филумом *Firmicutes*, который объединяет множество грамположительных бактерий, относящихся как к аэробам, так и анаэробам. У больных бронхиальной астмой по сравнению с группой контроля отмечено увеличение бактерий класса *Bacilli* ($p \leq 0,05$), снижение рода *Anaerostipes* ($p \leq 0,05$) (семейство *Lachnospiraceae*) и рода *Faecalibacterium* ($p = 0,03$) (семейство *Ruminococcaceae*). Род *Anaerostipes* и род *Faecalibacterium* признаны важнейшими продуцентами короткоцепочечных жирных кислот, а именно бутирата.

Следующий по распространенности тип бактерий микрофлоры кишечника, представлен филумом *Bacteroidetes*. *Bacteroidetes* включает в себя грамотрицательные неспорообразующие строгие анаэробы, обладающие сахаролитической активностью. У пациентов бронхиальной астмой выявлено снижение ($p \leq 0,05$) представителей семейства *Rikenellaceae* (род *Alistipes*). Эти изменения наблюдались как при атопическом варианте БА, так и в случае неатопического течения заболевания. Род *Alistipes*, относящий к семейству *Rikenellaceae*, продуцируют в толстой кишке в качестве основной КЦЖК - ацетат, а так же изовалериановую и янтарную кислоты.

Отмечено статистически значимое увеличение в составе кишечной микробиоты доли бактерий, относящихся к типу *Proteobacteria* ($p = 0,002$). Тип *Proteobacteria* объединяет большинство грамотрицательных микроорганизмов,

относящихся к факультативным или облигатным анаэробам. У пациентов с атопическим течением заболевания рост *Proteobacteria* происходит за счет классов *Betaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria*. В бактериальном спектре при неатопической астме увеличения *Proteobacteria* происходит за счет класса *Gammaaproteobacteria*.

Другие типы бактерий (*Verrucimicrobia* и *Actinobacteria*) обнаруживаются в кишечном микробиоме в значительно меньшем количестве, как у здоровых лиц, так и у больных бронхиальной астмой.

Таблица 6. Состав микробиоты кишечника различных таксономических уровней у пациентов атопической и неатопической бронхиальной астмой и группы контроля (%)

Таксономическая группа бактерий	Группа контроля 1	Атопическая астма	Неатопическая астма	p
Филум Firmicutes	78,76 [68,00; 89,50]	72,0 [54,79; 89,34]	75,69 [59,39; 91,98]	0,25
Класс Clostridia	76,40 [55,46; 86,62]	68,49 [49,89; 87,08]	66,73 [42,53; 90,92]	0,2
Порядок Clostridiales	75,17 [65,15; 85,17]	68,78 [50,20; 87,35]	67,57 [42,49; 92,66]	0,27
Род Blautia	7,66 [3,30; 12,02]	10,6 [1,33; 19,93]	6,29 [0,0; 12,74]	0,28
Род Clostridium IV	1,8 [0,08; 3,53]	1,86 [0,85; 2,88]	5,37 [0,0; 11,64]	0,47
Семейство Ruminococcaceae	31,79 [25,55; 38,02]	29,91 [17,73; 42,09]	30,87 [12,38; 49,36]	0,39
Род Faecalibacterium	12,4 [7,65; 17,14]	7,0 [6,01; 8,11]	6,74 [6,01; 7,98]	0,03 1,2
Род Ruminococcus	2,68 [0,37; 4,99]	1,73 [0,21; 3,24]	2,88 [0,0; 6,34]	0,22
Род Ruminococcus 2	3,00 [1,52; 4,48]	4,52 [1,84; 7,19]	5,51 [0,0; 12,24]	0,16

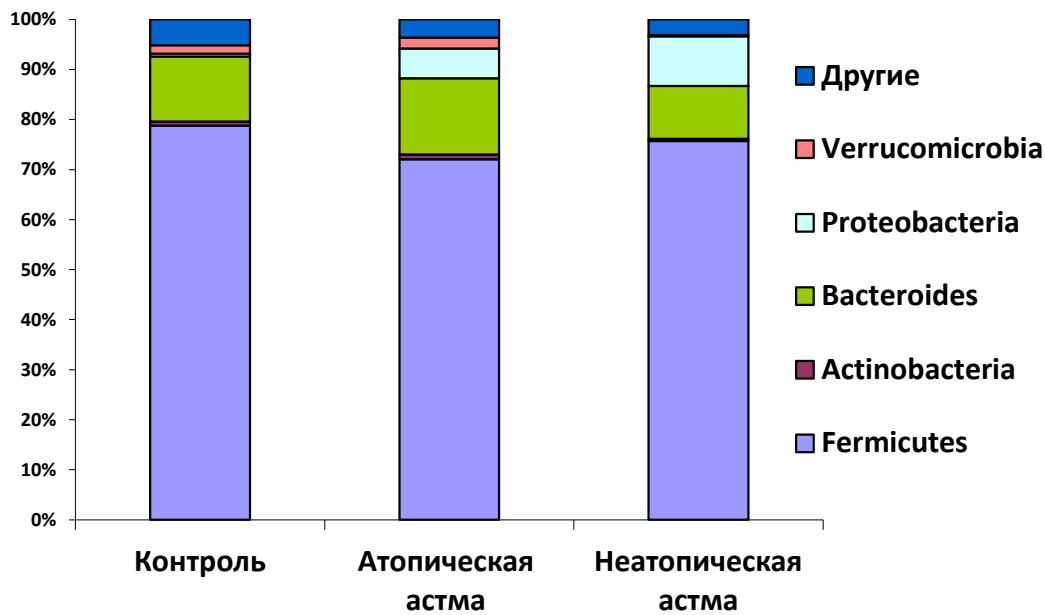
Семейство Acidaminococcace	0,26 [0,0; 0,56]	0,28 [0,09; 0,45]	0,59 [0,03; 1,15]	0,46
Семейство Lachnospiraceae	35,71 [26,56; 44,76]	31,19 [18,02; 44,36]	30,40 [9,10; 51,71]	0,28
Род Anaerostipes	2,92 [0,98; 4,86]	0,69 [0,33;1,04]	0,73 [0,0; 1,51]	0,05
Род Coprococcus	0,85 [0,34; 1,35]	1,46 [0,23; 2,69]	0,47 [0,18; 0,76]	0,18
Род Dorea	0,82 [0,31; 1,33]	0,68 [0,36; 0,99]	0,65 [0,17; 1,12]	0,29
Род Lachnospira	2,58 [0,94; 4,22]	1,81 [1,09; 2,53]	3,6 [0,0; 7,41]	0,14
Род Roseburia	2,83 [0,95; 4,71]	2,24 [0,31; 4,17]	2,1 [0,86; 3,35]	0,32
Семейство Peptostreptococcac	0,61 [0,0; 1,47]	0,24 [0,08; 8,38]	0,15 [0,01; 0,29]	0,15
Класс Bacilli	0,07 [0,02; 0,12]	1,57 [0,0; 3,69]	0,23 [0,04; 0,42]	0,05
Порядок Lactobacillales	0,068 [0,022; 0,11]	1,53 [0,0; 3,6]	0,2 [0,04; 0,35]	0,09
Класс Negativicutes	0,52 [0,13; 0,92]	0,45 [0,27; 0,64]	1,05 [1,10; 2,01]	0,35
Семейство Veillonellaceae	0,24 [0,0; 0,54]	0,16 [0,03; 0,27]	0,38 [0,0; 1,02]	0,27
Класс Erysipelotrichia	1,91 [0,05; 3,77]	0,71 [0,11; 1,31]	6,23 [0,0; 17,00]	0,16
Семейство Erysipelotrichacea	1,48 [0,0; 3,26]	0,69 [0,10; 1,27]	6,05 [0,0; 16,48]	0,16
Род Holdemanella	0,99 [0,0; 2,61]	0,31 [0,0; 0,76]	4,9 [0,0; 14,64]	0,16
Филум Actinobacteria	0,85 [0,11; 1,5]	0,95 [0,38; 1,53]	0,44 [0,0; 0,96]	0,39
Класс Actinobacteria	0,85 [0,11; 1,6]	0,95 [0,38; 1,52]	0,45 [0,0; 1,00]	0,4
Семейство Bifidobacteriaceae	0,66 [0,0; 1,44]	0,52 [0,12; 0,91]	0,12 [0,0; 0,30]	0,35
Род Bifidobacterium	0,38 [0,0; 0,87]	0,37 [0,09;0,65]	0,05 [0,0; 0,13]	0,48
Семейство Coriobacteriaceae	0,16 [0,07; 0,25]	0,26 [0,01; 0,51]	0,29 [0,0; 0,61]	0,25
Филум Bacteroidetes	12,98 [3,98; 21,98]	15,22 [4,40; 26,06]	10,59 [2,41; 18,75]	0,37

Класс Bacteroidia	12,54 [3,65; 21,43]	14,90 [4,46; 25,34]	10,35 [2,32; 18,37]	0,3
Семейство Bacteroidaceae	2,88 [1,23; 4,54]	3,21 [0,0; 7,10]	2,02 [0,0; 4,32]	0,43
Род Bacteroides	2,78 [1,24; 4,32]	3,11 [0,0; 6,71]	1,92 [0,0; 4,16]	0,43
Семейство Prevotellaceae	4,49 [0,0; 13,5]	8,03 [0,0; 17,53]	5,67 [0,0; 12,19]	0,28
Род Prevotella	3,85 [0,0; 11,61]	7,8 [0,0; 17,36]	4,5 [0,0; 10,41]	0,25
Семейство Rikenellaceae	2,99 [1,0; 4,97]	1,94 [1,01; 2,87]	1,04 [0,19; 1,88]	0,05²
Род Alistipes	2,56 [1,0; 4,16]	1,82 [0,95; 2,7]	0,96 [0,12; 1,80]	0,05²
Филум Proteobacteria	0,54 [0,06; 1,03]	5,91 [0,0; 11,91]	9,90 [0,0; 24,99]	0,002
Класс Betaproteobacteria	0,06 [0,02; 0,09]	1,20 [0,0; 2,88]	0,12 [0,01; 0,23]	0,05¹
Порядок Burkholderiales	0,06 [0,02; 0,09]	0,25 [0,05; 0,37]	0,10 [0,02; 0,18]	0,03¹
Класс Gammaproteobacteria	0,33 [0,0; 0,77]	3,52 [0,0; 9,1]	9,6 [0,0; 25,04]	0,04^{1,2}
Семейство Enterobacteriaceae	0,28 [0,0; 0,70]	2,71 [0,0; 7,5]	8,87 [0,0; 23,17]	0,04²
Род Escherichia/Shigella	0,16 [0,0; 0,43]	0,10 [0,02; 0,17]	6,60 [0,0; 17,70]	0,05²
Семейство Moraxellaceae	0,001 [0,0; 0,0027]	0,21 [0,0; 0,44]	0,09 [0,0; 0,20]	0,04^{1,2}
Филум Verrucimicrobia	1,70 [0,0; 4,5]	2,21 [0,0; 5,4]	0,29 [0,0; 0,63]	0,4
Класс Verrucomicrobiae	2,07 [0,0; 4,7]	2,23 [0,0; 5,5]	0,28 [0,0; 0,63]	0,39
Семейство Verrucomicrobiace	1,64 [0,0; 4,40]	2,21 [1,05; 5,48]	0,28 [0,0; 0,61]	0,39
Род Akkermansia	1,65 [0,0; 4,43]	2,15 [0,0; 5,34]	0,26 [0,0; 0,58]	0,4

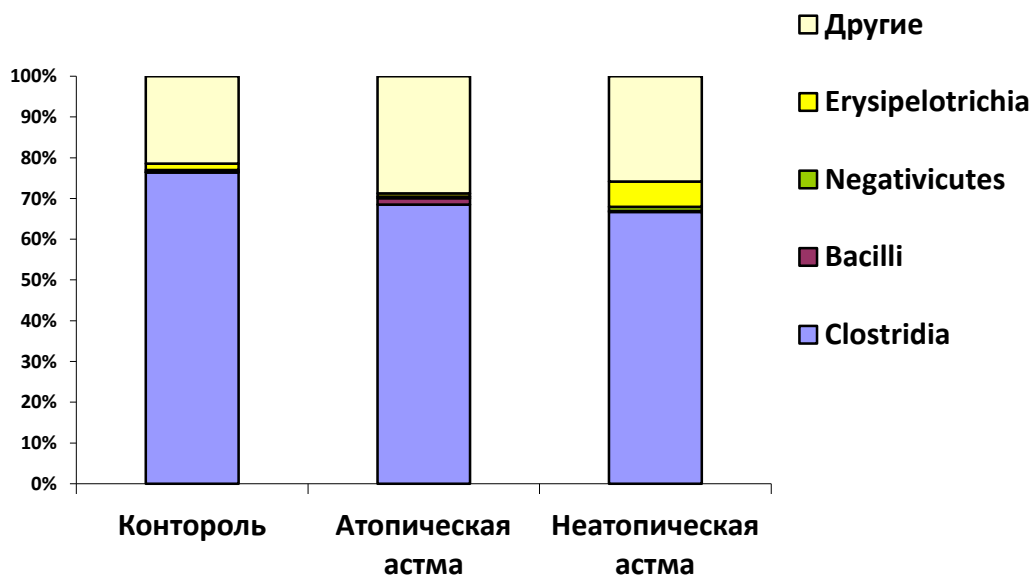
Если не указано иное, сравнение осуществлялось при помощи метода Краскела-Уоллиса; Критерий Манна-Уитни при сравнении группы контроля с ¹атопической астмой и при сравнении ²неатопической астмой.

Диаграмма 1. Изменение структуры микробиоты кишечника у пациентов бронхиальной астмой на различных таксономических уровнях. А - на уровне типов, Б - внутри типа *Firmicutes*; В - по отношению к окраске по Грамму

А.



Б.



В.

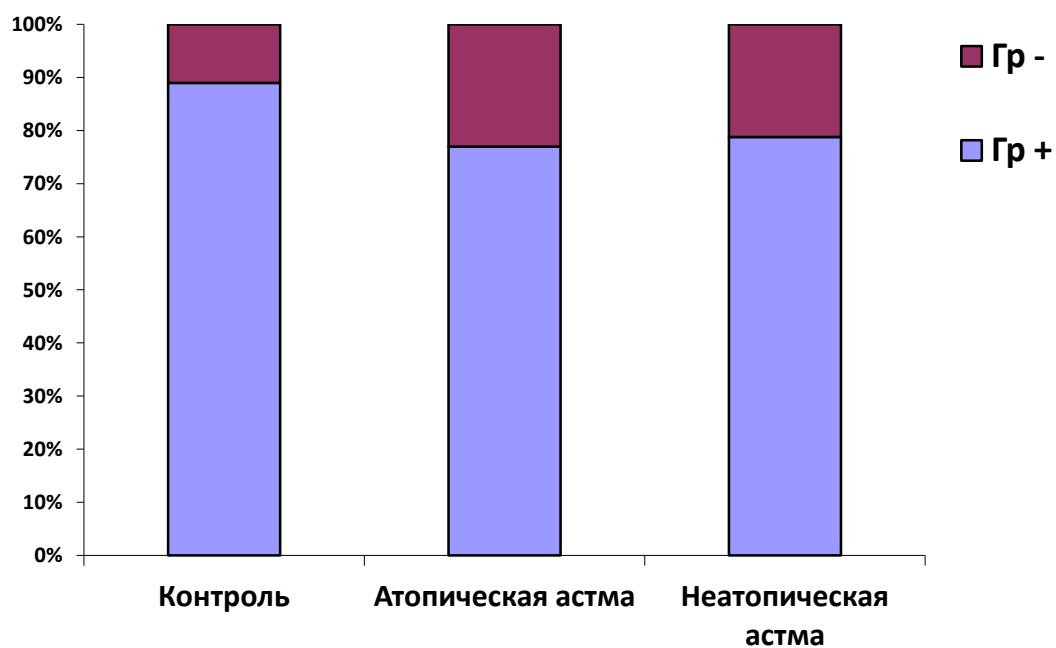
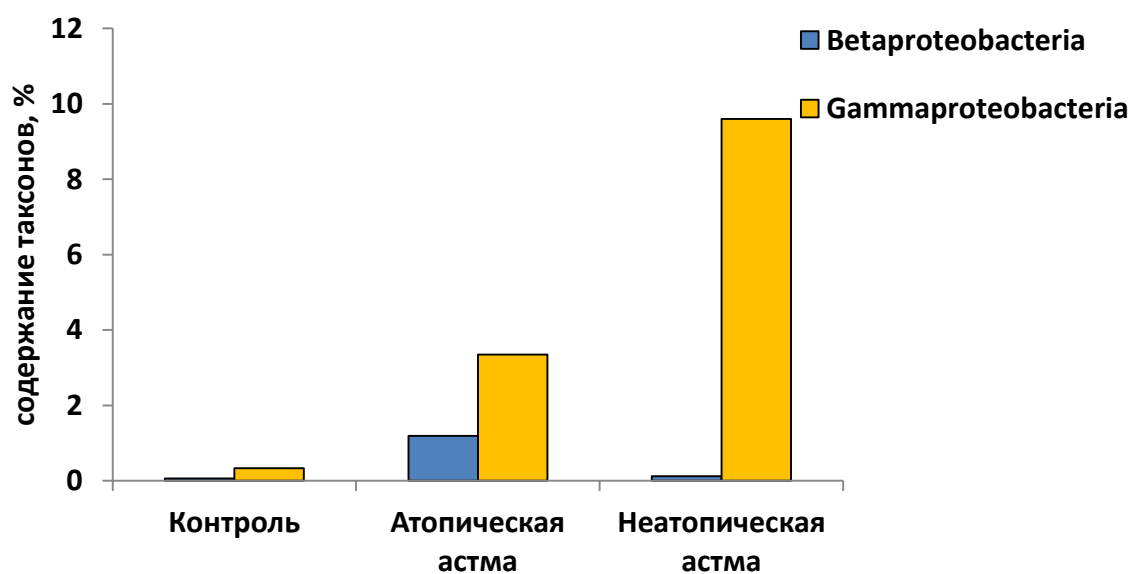


Диаграмма 2. Частота выявлений представителей типа *Proteobacteria* в группе контроля, пациентов атопической и неатопической бронхиальной астмой



Средняя доля таксонов в кишечном микробиоме, относящихся к грамотрицательным бактериям, отличалась в группе контроля и пациентов с бронхиальной астмой ($p = 0,037$), составив у здоровых лиц 11%, а при аллергической и неаллергической астме соответственно 23% и 22% (Диаграмма 1).

3.2 Определение бактериального разнообразия микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы

Учитывая, что бронхиальная астма представляет собой хроническое заболевание с высоким риском развития обострений и, следовательно, потенциально более высокой частотой терапии глюкокортикостероидами, мы предположили возможность снижения бактериального биоразнообразия в образцах кала пациентов. Однако в ходе исследования установлено, что микробиота кишечника, у лиц страдающих 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 бронхиальной астмой.

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 бронхиальной астме 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 бронхиальной астмой.

В таблице 7 представлены значения индексов бактериального разнообразия в зависимости от фенотипа бронхиальной астмы.

Таблица 7. Индексы бактериального разнообразия у пациентов с разными фенотипами бронхиальной астмы и группы контроля

Исследуемая группа	Индексы бактериального разнообразия		
	Шеннона	Чео1	ACE
Контроль	1,27 [1,07; 1,43]	22,32 [19,22; 25,43]	20,22 [18,10; 22,74]
Атопическая астма	1,19 [0,96; 1,41]	33,03 [26,16; 39,91] *	27,33 [23,79; 30,87] *
Неатопическая астма	1,21 [0,89; 1,53]	32,95 [26,96; 38,95] *	28,20 [21,99; 34,40] *

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

Различия бактериального разнообразия в зависимости от фенотипа бронхиальной астмы получено не было ($p > 0,05$) (таблица 7).

3.3 Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рНК бактерий в образцах кала с клиническими симптомами атопической бронхиальной астмы

Корреляции изменений таксономического состава бактерий, выявленных при секвенировании 16S рНК образцов кала с клиническими симптомами заболевания, иллюстрирует таблица 8.

Были выявлены как положительные, так и отрицательные корреляции, разной силы, статистической значимости их не получено. Изменения *Anaerostipes* имели обратную корреляционную зависимость с анамнезом заболевания (-0,28),

уровнями эозинофилов крови (-0,46) и мокроты (-0,45), значениями IgE (0,26) и результатами ОФВ₁ (0,24).

Таблица 8. Корреляции выявленных изменений в составе кишечной микробиоты с клинико-лабораторными проявлениями атопической БА

Тип- класс-порядок- семейство-род	Клинико-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		

Уровень *Faecalibacterium* обратно коррелировал с длительностью анамнеза заболевания (-0,29) и эозинофилами мокроты (0,31), эозинофилами крови (0,25), значениями IgE (0,29), представленность класса *Bacilli* с уровнем эозинофилов мокроты (-0,55). Количество *Proteobacteria* коррелировало с длительностью анамнеза (0,33) и ОФВ₁ (-0,25).

В большинстве случаев сила корреляционной связи изменений состава микробиоты кишечника с клинико-лабораторными проявлениями атопической БА умеренная ($0,25 \leq r_s \leq 0,75$).

Полученные результаты корреляционного анализа позволили выявить взаимосвязь изменений *Faecalibacterium* с другими представителями кишечной микрофлоры, продемонстрировавших связь с клинико-лабораторными проявлениями БА (Таблица 9).

Представленность рода *Faecalibacterium* обратно коррелировала со значением *Bacilli* (-0,67) и *Gammaproteobacteria* (-0,62), а так же имело прямую корреляционную связь с *Alistipes* (0,78). Изменения *Alistipes* так же демонстрировали обратную корреляционную связь с уровнем *Bacilli* (-0,65) и

Gammaproteobacteria (-0,58). Количество *Proteobacteria* коррелировало с представленностью таксонов, относящихся к *Bacilli* (0,63) и представителей семейства *Rikenellaceae* (род *Alistipes*) (-0,53).

Таблица 9. Корреляции между отдельными бактериальными представителями кишечной микробиоты пациентов атопической астмой (r_s , Спирмена)

Тип- класс-порядок- семейство-род	Класс Bacilli	Класс Gammaproteobacteria	Род Alistipes
Род <i>Faecalibacterium</i>	- 0,67	-0,62	0,78
Класс Bacilli			-0,65
Класс Gammaproteobacteria			-0,58
Филум <i>Proteobacteria</i>	0,63		-0,53

3.4 Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рРНК бактерий в образцах кала с клиническими симптомами неатопической бронхиальной астмы

Был проведен корреляционный анализ, выявленных при секвенировании 16S рРНК бактерий в образцах кала с клиническими симптомами неатопической бронхиальной астмы (таблица 10).

С длительностью анамнеза выявлена обратная зависимость уровня *Anaerostipes* (-0,27), *Faecalibacterium* (-0,30), *Bacilli* (-0,35), *Alistipes* (-0,46). Получена прямая корреляция анамнеза с *Proteobacteria* (0,30) и *Moraxellaceae* (0,57). Значения ОФВ₁ демонстрировали обратную зависимость от *Proteobacteria* (-0,29).

Таблица 10. Корреляции выявленных изменений в составе кишечной микробиоты с клинико-лабораторными проявлениями неатопической БА

Тип- класс-порядок- семейство-род	Клинико-лабораторные проявления астмы	
	Анамнез	ОФВ ₁
r_s , Спирмена		
Род <i>Anaerostipes</i>	-0,27	
Род <i>Faecalibacterium</i>	-0,30	
Класс <i>Bacilli</i>	-0,35	
Филум <i>Proteobacteria</i>	0,30	-0,29
Род <i>Alistipes</i>	-0,46	
Сем. <i>Moraxellaceae</i>	0,57	

Как и в случае IgE опосредованной астмы при неатопическом фенотипе, выявлены корреляции, продемонстрировавшие взаимосвязь изменений отдельных бактериальных представителей и клинико-лабораторных проявлений заболевания (Таблица 11).

Представленность рода *Faecalibacterium* обратно коррелировала со значением *Bacilli* (-0,47) и имело прямую корреляционную связь с *Anaerostipes* (0,5). Изменения *Anaerostipes* демонстрировали обратную корреляционную связь с уровнем *Bacilli* (-0,55), *Proteobacteria* (-0,35) и положительную с *Alistipes* (0,57). Количество *Bacilli* коррелировало с представленностью таксонов, относящихся к *Alistipes* (-0,25), *Anaerostipes* (-0,55), *Moraxellaceae* (0,3).

Таблица 11. Выявлены корреляции между отдельными бактериальными представителями кишечной микробиоты пациентов неатопической астмой (r_s , Спирмена)

Тип- класс-порядок- семейство-род	Класс Bacilli	Род Anaerostipes
Род Faecalibacterium	-0,47	0,5
Класс Bacilli		-0,55
Филум Proteobacteria		-0,35
Род Alistipes	-0,25	0,57*
Сем. Moraxellaceae	0,3	

* $p < 0,05$

В большинстве случаев корреляционный анализ продемонстрировал умеренную силу корреляционной связи. А в случае сравнения рода *Alistipes* и рода *Anaerostipes* корреляционная зависимость была статистически значима ($p < 0,05$).

3.5 Сравнение состава микробиоты кишечника пациентов с atopической бронхиальной астмой с учетом их СИБР статуса

Результаты сравнения таксономического состава метагеномных образцов кала у пациентов atopической астмы, в зависимости от выявленного СИБР, представлены в таблицах 12, 13, 14. Выявлены 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* ($p = 0,02$).

Таблица 12. Сравнительный анализ представленности классов бактерий в образцах кала больных АА СИБР (+) и АА СИБР (-) LogFC – двоичный логарифм отношения средней доли бактерий, относящихся к данному классу. $\text{LogFC} < 0$ соответствуют снижению численности таксона при СИБР (+) по сравнению с СИБР (-), и наоборот

Класс бактерий	LogFC	АА СИБР (-)	АА СИБР (+)	t-test p	Mann-Wh. p	Spearman r_s	Pearson r
Negativicutes	-1,37	216,9	77,9	0,01	0,0008	-0,82	-0,74
Actinobacteria	-1,66	488,2	148,1	0,07	0,1	-0,44	-0,56
Erysipelotrichia	-2,45	424,1	69,5	0,1	0,01	-0,66	-0,56
Bacteroidia	-1,51	7200,5	2521,2	0,2	0,05	-0,54	-0,42
Betaproteobacteria	-2,38	708,7	128,5	0,4	0,2	-0,35	-0,32
Gammaaproteobacteria	1,51	443,7	1282,5	0,5	0,4	-0,25	0,16
Bacilli	1,84	176,7	659,8	0,4	0,8	-0,09	0,22
Clostridia	0,30	17738,7	21914,7	0,4	0,2	0,35	0,21
Verrucomicrobiae	0,78	461,4	797,8	0,7	0,8	-0,10	0,10

Таблица 13. Сравнительный анализ представленности семейств бактерий в образцах кала больных АА СИБР (+) и АА СИБР (-) LogFC – двоичный логарифм отношения средней доли бактерий, относящихся к данному семейству. $\text{LogFC} < 0$ соответствуют снижению численности таксона при СИБР (+) по сравнению с СИБР (-), и наоборот

Семейство бактерий	LogFC	АА СИБР (-)	АА СИБР (+)	t-test	Mann-Wh.	Spearman r_s	Pearson r
Erysipelotrichaceae	-2,45	424,1	69,5	0,1	0,01	-0,66	-0,56
Porphyromonadaceae	0,15	158,8	177,8	0,9	0,02	-0,63	0,03
Comamonadaceae	-1,43	33,5	6,2	0,4	0,5	-0,20	-0,27
Veillonellaceae	-0,82	67,6	34,1	0,4	0,4	-0,22	-0,25
Pseudomonadaceae	-0,70	7,3	0,7	0,1	0,02	-0,63	-0,56
Rhodospirillaceae	-0,49	4,5	0,4	0,1	0,04	-0,56	-0,53
Bacillaceae	-0,08	0,7	0,2	0,1	0,02	-0,64	-0,44
Brucellaceae	-0,05	0,3	0,0	0,2	0,03	-0,61	-0,50
Aerococcaceae	1,14	0,2	12,4	0,4	0,9	-0,05	0,22
Spirochaetaceae	0,16	0,0	1,1	0,3	0,5	0,22	0,22
Actinomycetaceae	-0,69	46,9	25,3	0,7	0,9	-0,05	-0,13

Таблица 14. Сравнительный анализ представленности родов бактерий в образцах кала больных АА СИБР (+) и АА СИБР (-) LogFC – двоичный логарифм отношения средней доли бактерий, относящихся к данному роду. $\text{LogFC} < 0$ соответствуют снижению численности таксона при СИБР (+) по сравнению с СИБР (-), и наоборот

Род бактерий	LogFC	АА СИБР (-)	АА СИБР (+)	t- test p	Mann- Wh. p	Spearman r_s	Pearson r
Parabacteroides	-1,97	72,5	11,1	0,09	0,07	-0,51	-0,56
Bacteroides	-3,58	2229,3	176,7	0,2	0,1	-0,44	-0,50
Barnesiella	-1,35	17,0	0,6	0,04	0,02	-0,67	-0,68
Klebsiella	-3,95	155,9	0,8	0,4	0,2	-0,39	-0,33
Paraprevotella	-3,38	98,8	0,5	0,3	0,01	-0,68	-0,35
Anaerostipes	-1,08	335,4	153,9	0,2	0,3	-0,30	-0,45
Roseburia	-2,12	1241,3	278,1	0,2	0,8	-0,09	-0,48
Prevotella	-1,33	3724,5	1473,4	0,5	0,3	-0,32	-0,22
Collinsella	-2,81	63,8	0,5	0,3	0,07	-0,50	-0,37
Bifidobacterium	-1,63	200,1	57,9	0,2	0,05	-0,19	-0,47
Pyrolobus	-0,22	1,7	0,0	0,05	0,008	-0,73	-0,66
Pseudomonas	-0,54	5,1	0,3	0,09	0,02	-0,63	-0,59
Coproacter	-0,60	6,4	0,8	0,2	0,04	-0,56	-0,47
Bacillus	-0,07	0,7	0,2	0,1	0,02	-0,64	-0,43

3.6 Сравнение состава микробиоты кишечника пациентов с неатопической бронхиальной астмой с учетом их СИБР статуса

У пациентов неатопической астмой 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* ($p = 0,03$) (см. таблицы 15, 16).

Таблица 15. Сравнительный анализ представленности семейств бактерий в образцах кала больных НА СИБР (+) и НА СИБР (-) *LogFC* – двоичный логарифм отношения средней доли бактерий, относящихся к данному семейству. *LogFC* < 0 соответствуют снижению численности таксона при СИБР (+) по сравнению с СИБР (-), и наоборот

Семейство бактерий	LogFC	АА СИБР (-)	АА СИБР (+)	t-test p	Mann-Wh. p	Spearman r_s	Pearson r
Acidaminococcaceae	2,20	70,5	358,7	0,1	0,1	0,62	0,77
Bacteroidaceae	2,52	213,5	1267,6	0,3	0,04	0,85	0,65
Rikenellaceae	1,84	155,8	582,4	0,2	0,07	0,73	0,72
Porphyromonadaceae	0,86	110,2	207,8	0,5	0,3	0,51	0,33
Enterobacteriaceae	-1,66	3633,3	1146,1	0,5	0,8	-0,17	-0,25
Veillonellaceae	-1,82	185,0	45,2	0,4	0,7	-0,23	-0,25
Peptostreptococcaceae	-1,34	63,6	19,1	0,2	0,1	-0,62	-0,47
Erysipelotrichaceae	-1,70	2468,9	751,3	0,5	1,0	0,06	-0,24
Bifidobacteriaceae	-2,11	57,0	5,5	0,2	0,8	-0,17	-0,39
Verrucomicrobiaceae	-1,77	119,2	27,8	0,2	0,8	-0,17	-0,39
Lachnospiraceae	0,44	8185,2	11103,8	0,7	0,8	0,17	0,20
Streptococcaceae	-1,00	64,2	27,0	0,3	0,3	-0,51	-0,34
Coriobacteriaceae	-0,76	105,6	58,2	0,5	1,0	0,06	-0,21
Ruminococcaceae	-0,13	9914,5	9035,8	0,9	1,0	-0,06	-0,07

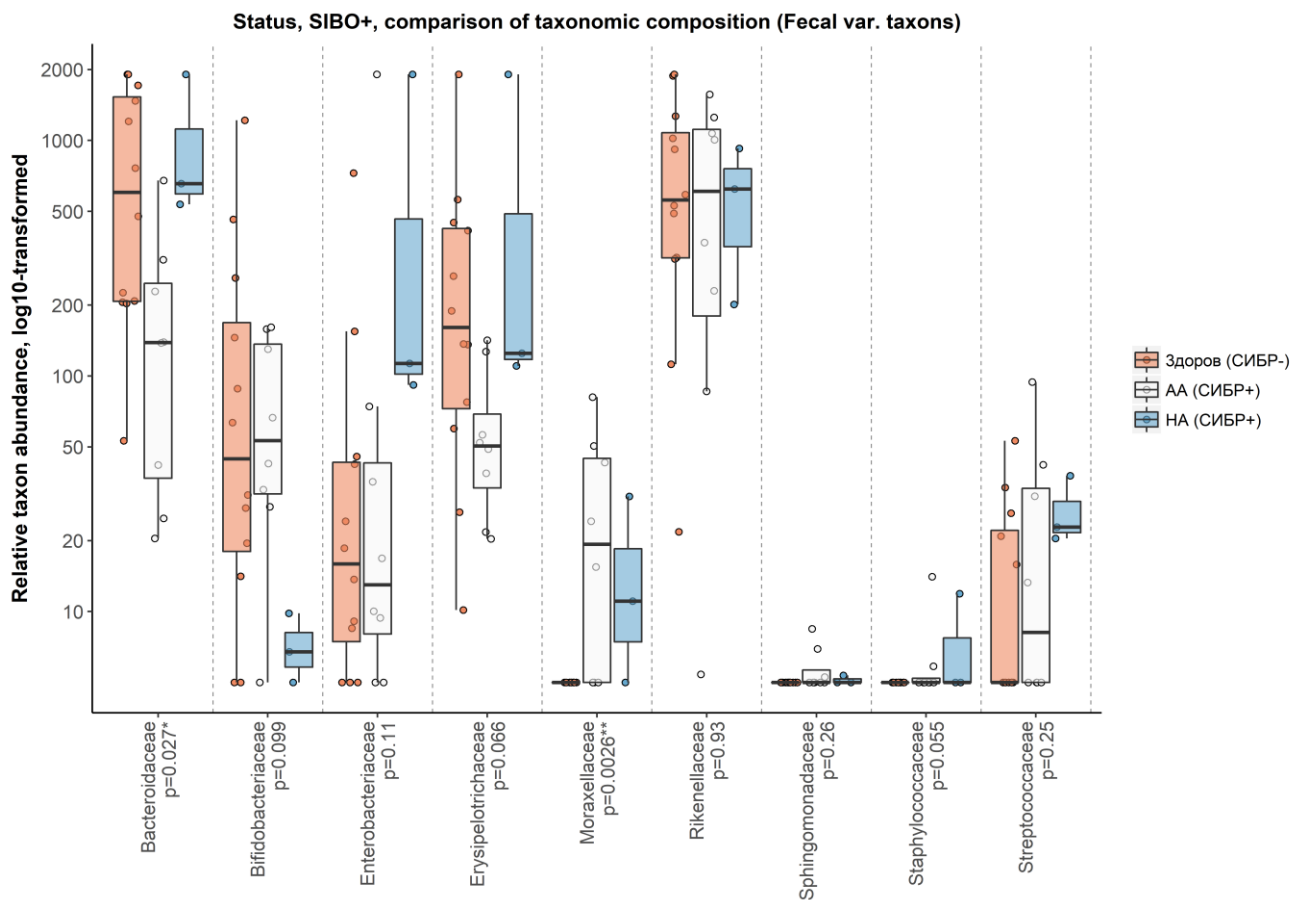
Таблица 16. Сравнительный анализ представленности родов бактерий в образцах кала больных НА СИБР (+) и НА СИБР (-) LogFC – двоичный логарифм отношения средней доли бактерий, относящихся к данному роду. $\text{LogFC} < 0$ соответствуют снижению численности таксона при СИБР (+) по сравнению с СИБР (-), и наоборот

Род бактерий	LogFC	НА СИБР (-)	НА СИБР (+)	t-test p	Mann-Wh. p	Spearman r_s	Pearson r
Paraprevotella	2,43	6,0	76,3	0,03	0,04	0,85	0,93
Flavonifractor	0,86	12,1	30,1	0,04	0,1	0,62	0,66
Coprococcus	-1,18	189,1	78,1	0,09	0,1	-0,62	-0,56
Odoribacter	0,82	2,0	11,1	0,007	0,04	0,85	0,93
Bacteroides	2,52	213,4	1267,6	0,3	0,04	0,85	0,65
Alistipes	1,94	140,5	568,4	0,2	0,07	0,73	0,72
Butyricicoccus	1,40	9,9	42,4	0,1	0,04	0,85	0,76
Catenibacterium	3,40	31,2	423,5	0,5	0,8	-0,17	0,46
Clostridium XIVa	1,61	23,5	92,4	0,2	0,07	0,73	0,66
Oscillibacter	2,37	83,2	471,6	0,5	0,8	0,17	0,45
Ruminococcus2	1,12	1158,8	2523,4	0,6	0,6	0,28	0,29
Parasutterella	1,38	1,1	18,9	0,1	0,03	0,90	0,80
Faecalibacterium	-0,38	3603,4	2771,0	0,7	1,0	0,06	-0,12
Bifidobacterium	-1,33	23,6	3,4	0,3	0,6	-0,28	-0,36

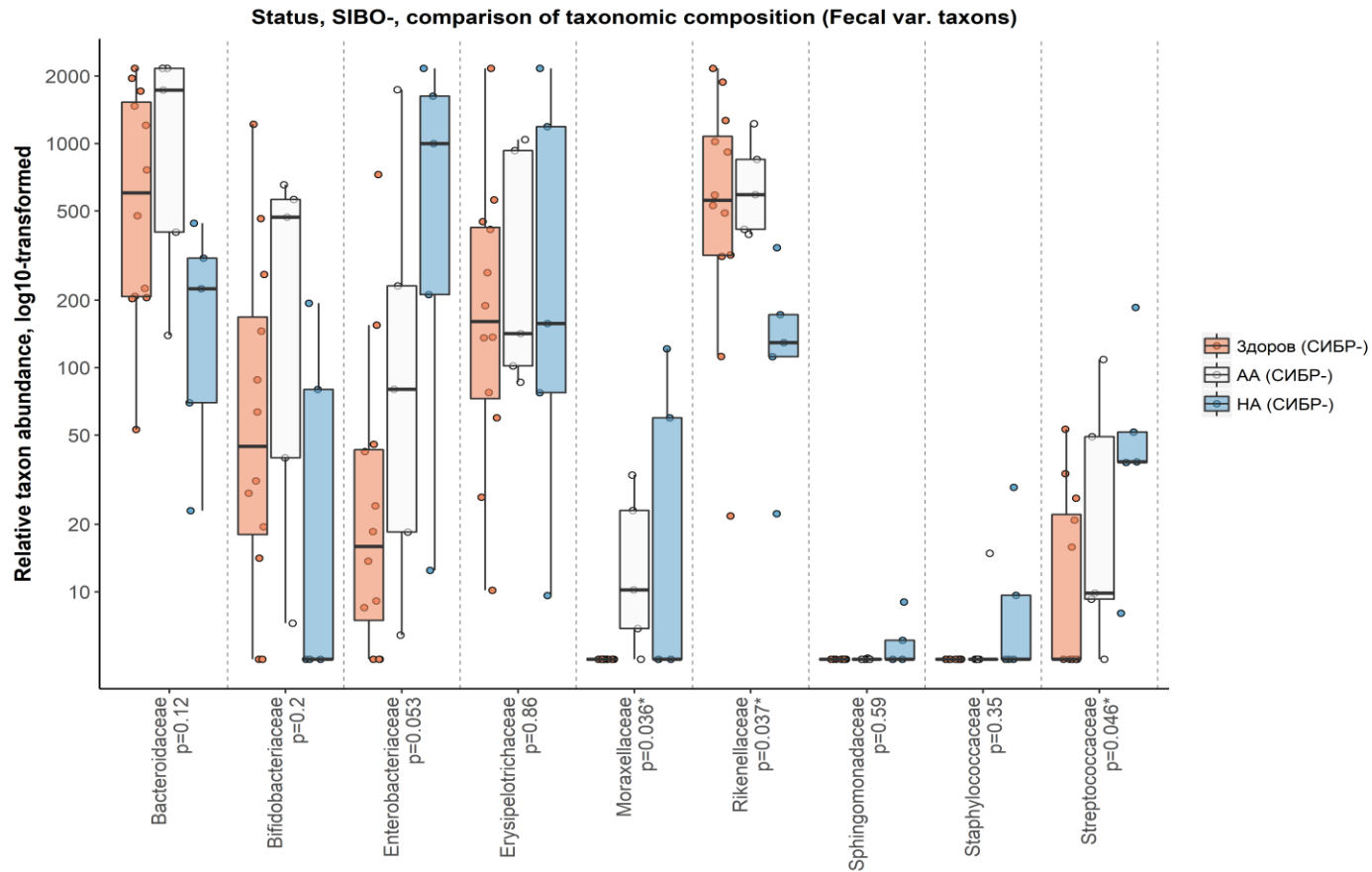
Мы продолжили поиск внутригрупповых различий и сравнили между собой разные фенотипы астмы, ориентируясь на наличие или отсутствие СИБР. Полученные результаты представлены на диаграмме 3. Для обеих исследуемых групп, общим параметром служит выявленные изменения представленности *Moraxella* ($p < 0,05$).

Диаграмма 3. Распределение семейств таксонов в составе микробиоты кишечника в группах контроля, атопической и неатопической астмы По вертикали - представлено относительное содержание таксонов (логарифмическая шкала), по горизонтали – сравнение таксономического состава. Ширина прямоугольника - межквартильный интервал, отрезки - размах без выбросов. А - при наличии СИБР (+), Б - в отсутствии СИБР (-)

А.



Б.



Таким образом, выявленные в ходе исследования значимые различия бактериального состава кишечного биотопа на уровне всех таксономических единиц и их корреляционные связи с основными клинико-лабораторными проявлениями бронхиальной астмы свидетельствуют в пользу роли микробиоты в патогенезе заболевания.

Глава 4 *

Патогенетическое и клиническое значение синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке у пациентов с бронхиальной астмой

Для выявления изменений микробиоценоза тонкой кишки у 80 больных, с подтвержденным диагнозом БА (атопическая и неатопическая форма), нами были изучены следующие показатели:

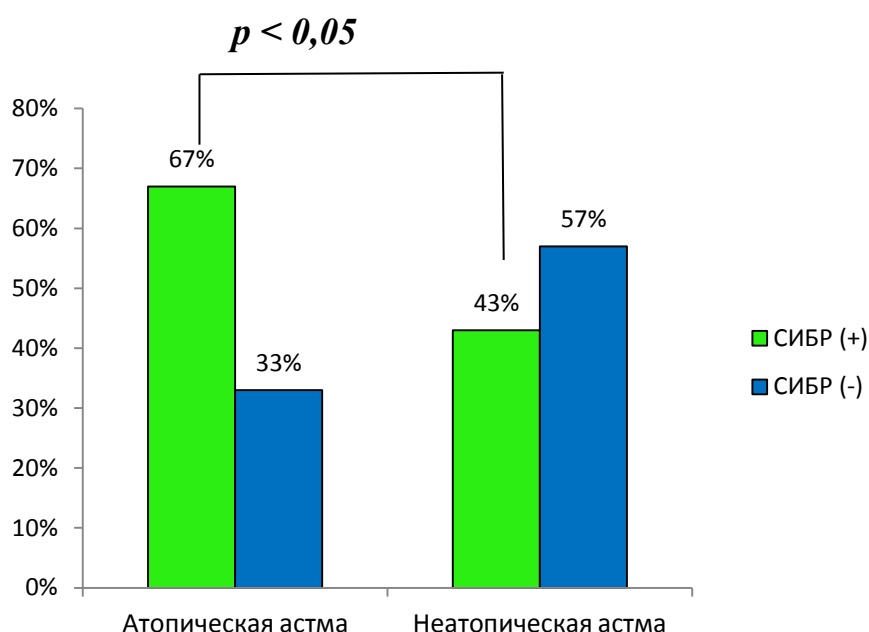
1. Наличие/отсутствие и основные проявления синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке (СИБР) у больных бронхиальной астмой.
2. Сравнительный анализ основных клинико-лабораторных проявлений атопической БА с/без СИБР.
3. Сравнительный анализ основных клинико-лабораторных проявлений неатопической БА с/без СИБР.
4. Эффективность лечения СИБР у больных атопической бронхиальной астмой.
5. Эффективность лечения СИБР у больных неатопической бронхиальной астмой.
6. Течение атопической бронхиальной астмы в последующий год наблюдения после коррекции микробиоты кишечника.
7. Течение неатопической бронхиальной астмы в последующий год наблюдения, после коррекции микробиоты кишечника.

*Результаты исследования были получены в ходе совместной работы с Поцхверашвили Н.Д. и были опубликованы в научной литературе (см. список литературы 10, 29, 30, 146, 147)

4.1 Частота выявления и основные клинические характеристики СИБР у больных бронхиальной астмой

Для выявления синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке 80 пациентам из основной группы проводился водородный дыхательный тест с лактулозой. Установлено, что СИБР в тонкой кишке достоверно чаще встречался среди пациентов, страдающих IgE опосредованной (атопической) БА ($p < 0,05$) (Диаграмма 4).

Диаграмма 4. Частота выявления СИБР у пациентов с atopической и неатопической бронхиальной астмой



Основные клинические проявления СИБР у пациентов имели стертую симптоматику, требовали специального уточнения при расспросе и не отличались в зависимости от фенотипа БА (Таблица 17).

Таблица 17. 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

Нами проведен анализ результатов, полученных при помощи водородного дыхательного теста. Результаты прироста H_2 в выдыхаемом воздухе представлены в таблицах 18 и 19, диаграммах 5 и 6.

В группе пациентов с атопической бронхиальной астмой и подтвержденным СИБР (АА СИБР (+)), длительность анамнеза бронхиальной астмы 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 (+)) 14,0 [12,77; 15,22] и 43,00 [28,41; 57,58] лет соответственно.

Таблица 18. Количество водорода в выдыхаемом воздухе у больных атопической и неатопической бронхиальной астмой

Группы пациентов	Концентрация H ₂ , ppm; 95% ДИ					
	Исходно	15 мин	30 мин	45 мин	75 мин	105 мин
АА СИБР (+)	4,66 [3,00; 6,32]	15,2 [11,69; 18,70]	20,8 [16,16; 25,43]	28,2 [21,57; 34,83]	35,0 [30,20; 39,79]	38,26 [33,71; 42,82]
НА СИБР (+)	3,0 [1,58; 4,41]	5,42 [3,58; 7,26]	7,0 [2,13; 11,86]	18,85 [7,84; 29,87]	27,71 [15,47; 39,95]	29,0 [18,24; 39,75]
СИБР (-)	2,28 [0,62; 3,91]	3,28 [2,01; 4,56]	3,57 [2,07; 5,06]	6,28 [3,27; 9,29]	8,85 [5,96; 11,75]	10,42 [7,32; 13,53]

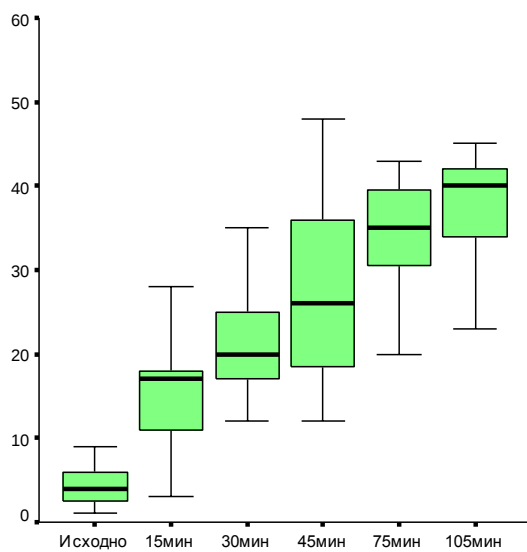
В ходе проведения водородного дыхательного теста обращало на себя внимания различие в динамике прироста H_2 у пациентов группы АА СИБР (+) по сравнению с группой НА СИБР (+) (таблица 19, диаграмма 5). У пациентов, не имеющих СИБР (СИБР (-)) вне зависимости от фенотипа БА, особенностей в динамики H_2 не выявлено (таблица 18, диаграмма 6).

Таблица 19. Сравнение уровней водорода у лиц с аллергической и неаллергической бронхиальной астмой, полученных в ходе выполнения водородного дыхательного теста

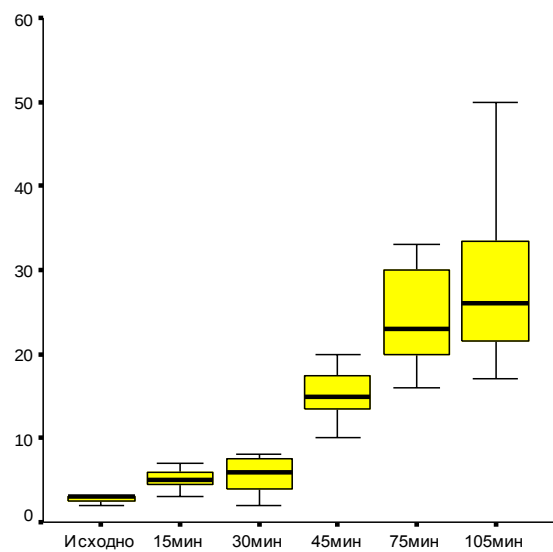
Концентрация H_2 , ppm	АА СИБР (+), 95% ДИ	НА СИБР (+), 95% ДИ	P
Исходно	4,7 [3,00; 6,32]	3,0 [1,58; 4,41]	0,09
15 мин	15,2 [11,69; 18,70]	5,42 [3,58; 7,26]	0,00039
30 мин	20,8 [16,16; 25,43]	7,0 [2,13; 11,86]	0,00036
45 мин	28,2 [21,57; 34,83]	18,85 [7,84; 29,87]	0,05
75 мин	35,0 [30,20; 39,79]	27,71 [15,47; 39,95]	0,068
105 мин	38,3 [33,71; 42,82]	29,0 [18,24; 39,75]	0,02

Диаграмма 5. Динамика уровня водорода в выдыхаемом воздухе у пациентов с бронхиальной астмой (А - группа АА СИБР (+), Б - группа НА СИБР (+), В – пациенты с бронхиальной астмой (атопической и неатопической) при отсутствии СИБР (группа СИБР (-)). по вертикали – концентрация H_2 , ррт; по горизонтали - время исследования, мин. (линия внутри прямоугольника - медиана, прямоугольник – интерквартильный размах, конечные планки - размах без выбросов)

А.



Б.



В.

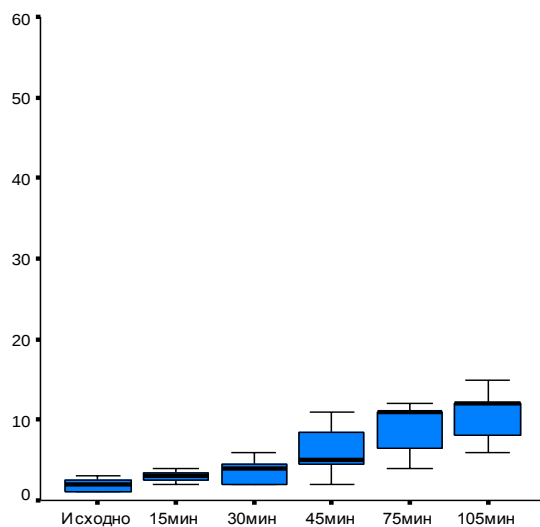
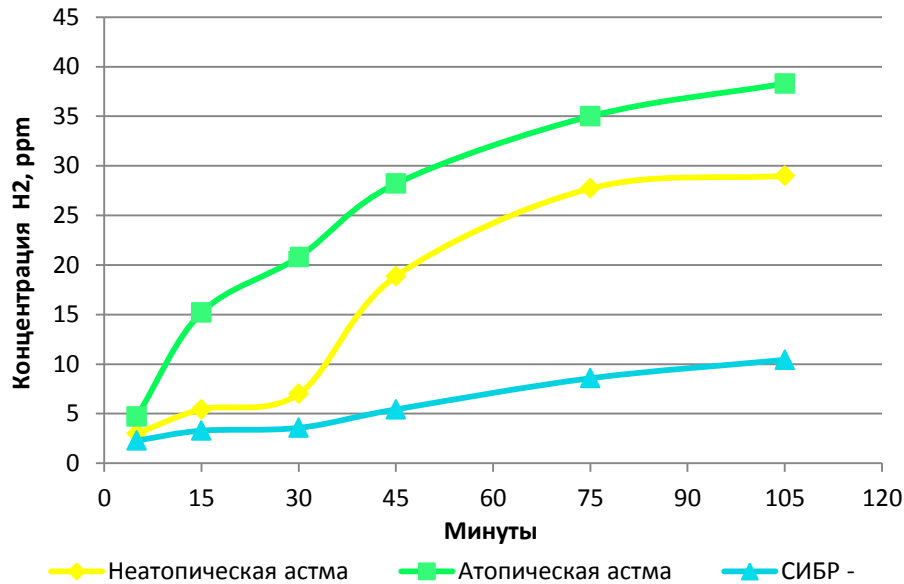


Диаграмма 6. Динамика уровня водорода по значениям средних величин H_2 в исследуемых группах



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 (+) (Таблица 19). По всей видимости, это может быть связано с двумя факторами. Во-первых, это может быть 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.

Таким образом, более быстрое повышение градиента H_2 наблюдалась у пациентов атопической астмой, имеющих в нашем исследовании более длительный анамнез заболевания. Представляется, что при разных фенотипах бронхиальной астмы СИБР в тонкой кишке имеет ряд особенностей и как показали результаты нашего исследования, имеют различную кривую водородного теста.

4.2 Сравнительный анализ основных клинико-лабораторных проявлений атопической бронхиальной астмы с наличием и без СИБР

Подгруппы АА СИБР (+) и АА СИБР (–) были сопоставимы по возрасту ($p > 0,05$), индексу массы тела (ИМТ) ($p > 0,05$), длительности анамнеза ($p > 0,05$) и тяжести течения БА ($p > 0,05$), проводимой медикаментозной терапии ($p > 0,05$). Результаты сравнения основных клинико-лабораторных показателей представлены в таблице 20, проводимой медикаментозной терапии – в таблице 21.

**Таблица 20. Основные клинико-лабораторные показатели больных
атопической бронхиальной астмой**

Показатель	СИБР (+) n = 30	СИБР (–) n = 15	p
Возраст больных (годы)	41,4 [35,72; 47,07]	45,13 [36,67; 53,58]	0,08
Мужчины/Женщины	14/16	7/8	$> 0,05$
ИМТ (кг/м ²)	25,3 [23,61; 27,11]	25,6 [22,7; 28,49]	0,12
Анамнез (годы)	20,06 [15,28; 24,85]	18,8 [12,48; 25,11]	0,37
Тяжесть заболевания	Среднетяжелое течение	Среднетяжелое течение	$> 0,05$
IgE (МЕ/мл)	348,4 [297,02; 399,96]	237,1 [162,16; 312,10]	0,006
IgA (МЕ/мл)	1,36 [1,20; 1,52]	1,24 [1,17; 1,30]	0,146

IgG (МЕ/мл)	13,40 [12,65; 14,15]	14,05 [12,95; 15,14]	0,156
Эозинофилы мокроты (ед.)	7,4 [5,79; 9,00]	3,06 [1,98; 4,14]	0,0002
Эозинофилы крови (%)	3,6 [2,69; 4,58]	3,28 [2,52; 4,03]	0,306
ОФВ ₁ (%)	64,6 [62,10; 67,16]	69,6 [65,90; 73,43]	0,011

Нами были выявлены в подгруппе пациентов, имеющих атопическую форму БА СИБР (+), более высокие титры IgE ($p < 0,01$), уровень эозинофилов мокроты ($p < 0,001$), а также более выраженные нарушения функции внешнего дыхания в виде снижения ОФВ₁ ($p < 0,01$) по сравнению с группой 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.

Таблица 21. Медикаментозная терапия, проводимая у пациентов с атопической бронхиальной астмой.

Терапия		АА СИБР (+) n = 30	АА СИБР (-) n = 15	p
<i>Амбулаторно (течение min 3 месяцев до госпитализации)</i>				
Salmeterol + Fluticasone (Серетид Мультиликс)	50/250 мкг	6 (20%)	3 (20%)	1,00
	50/500 мкг	10 (33,3%)	4 (26,6%)	0,74
Budesonide + Formoterol	Симбикорт 9/320 сумм доза (4,5/160 по 2 вд x2p или 9/320 по 1 вд x2p)	9 (30%)	5 (33,5%)	0,87

(Симбикорт турбухалер Форадил комби)	Симбикорт 4.5/80 мкг по 2 вд х2р	1 (3,3%)	2 (13,3%)	0,24
	Форадил комби 12/200 мкг	1 (3,3%)	-	0,48
Beclometasone + Formoterol (Фостер)	6/100 мкг по 1 вд х2р	2 (6,7%)	1 (6,7%)	1,00
	6/100 мкг по 2 вдх2р	1 (3,3%)	-	0,48
<i>В течение 1 месяца до госпитализации</i>				
Сальбутамол 100 мкг до 5-6р в сут по 2 вд. Фенотерол 50 мкг + ипратропия бромид 25 мкг (Беродуал) 1-2 мл		30 (100%)	15 (100%)	1,00
<i>Стационарное лечение</i>				
Десаметазон 7-9 дней (Преднизолон 30-60 мг)	4 мг	12 (40%)	8 (54%)	0,60
	8 мг/сут	18 (60%)	7 (46%)	0,64
Небулайзеротерапия: Фенотерол + ипратропия бромид (Беродуал)		30 (100%)	15 (100%)	1,00

4.3 Сравнительный анализ основных клинико-лабораторных проявлений неатопической бронхиальной астмы с наличием и без СИБР

В группе больных с НА СИБР (+) выявлено статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение $ОФВ_1$, что свидетельствует в пользу значимости СИБР в формировании более выраженных нарушений вентиляционной функции легких (Таблица 22). Остальные лабораторные показатели у пациентов с неатопическим фенотипом БА определялись в пределах референсных значений и не изменились в процессе лечения и наблюдения за пациентами. Результаты сравнения проводимой медикаментозной терапии не достигли статистических различий и приведены в таблице 23.

Таблица 22. Основные клинико-лабораторные показатели больных группы с неатопической бронхиальной астмой

Показатель	НА СИБР (+) n = 15	НА СИБР (-) n = 20	p
Возраст (годы)	45,53 [37,10; 53,96]	51,6 [47,25; 54,04]	0,08
Мужчины/Женщины	7/8	9/11	> 0,05
ИМТ (кг/м ²)	27,33 [24,25; 30,41]	25,45 [23,60; 27,29]	0,12
Анамнез (годы)	4,0 [2,77; 7,22]	3,45 [2,58; 7,31]	0,21
Тяжесть заболевания	Среднетяжелое течение	Среднетяжелое течение	> 0,05
IgE (МЕ/мл)	60,4 [40,59; 80,20]	54,55 [30,11; 78,99]	0,355
IgA (МЕ/мл)	1,87 [1,63; 2,11]	2,11 [1,84; 2,38]	0,091
IgG (МЕ/мл)	14,98 [14,30; 15,66]	13,36 [12,22; 14,49]	0,012
Эозинофилы мокроты (ед.)	1,46 [1,11; 1,82]	1,15 [0,59; 1,7]	0,177
Эозинофилы крови (%)	0,79 [0,49; 1,09]	1,92 [0,88; 2,95]	0,031
ОФВ ₁ (%)	60, 06 [59,39; 62,73]	62,45 [57,37; 67,52]	0,016

Таблица 23. Медикаментозная терапия, проводимая у пациентов с неатопической бронхиальной астмой

Терапия		НА СИБР (+) n = 15	НА СИБР (-) n = 20	p
<i>Амбулаторно (течение min 3 месяцев до госпитализации)</i>				
Salmeterol + Fluticasone (Серетид Мультидиск)	50/250 мкг	3 (20%)	4 (20%)	1,00
	50/500 мкг	4 (26,7%)	7 (35%)	0,70
Budesonide + Formoterol (Симбикорт турбухалер Форадил комби)	Симбикорт 9/320 сумм доза (4,5/160 по 2 вд х2р или 9/320 по 1 вд х2р)	3 (20%)	5 (25%)	0,78
	Симбикорт 4.5/160 мкг по 2 вд х2р	1 (6,66%)	2 (10%)	0,75
	Симбикорт 4.5/80 мкг по 2 вд х2р	2 (13,3%)	1 (5%)	0,42
	Форадил комби 12/200 мкг	1 (6,66%)	-	0,25
Beclometasone + Formoterol (Фостер)	6/100 мкг по 1 вд х2р	-	1 (5%)	0,39
	6/100 мкг по 2 вдх2р	1 (6,66%)	-	0,25
<i>В течение 1 месяца до госпитализации</i>				
Сальбутамол 100 мкг до 5-6р в сут по 2 вд. Фенотерол 50 мкг + ипратропия бромид 25 мкг (Беродуал) 1-2 мл		15 (100%)	20 (100%)	1,00
<i>Стационарное лечение</i>				
Десаметазон 7-9 дней (Преднизолон 30-60 мг)	4 мг	7 (46,66%)	8 (40%)	0,80
	8 мг/сут	8 (53,33%)	12 (60%)	0,84
Небулайзеротерапия: Фенотерол + ипратропия бромид (Беродуал)		15 (100%)	20 (100%)	1,00

Таким образом, частота выявления СИБР в тонкой кишке и верифицированная тенденция клинико-лабораторных изменений у пациентов, как с атопическим, так и неатопическим фенотипом заболевания, свидетельствуют в пользу значимого вклада измененного состава кишечного биотопа в развитие бронхиальной астмы. Выявленные изменения диктуют необходимость коррекции состава микробиоты и последующего наблюдения за пациентами.

4.4 Эффективность терапии синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке у пациентов с атопической бронхиальной астмой

Для лечения СИБР пациенты были рандомизированы на две подгруппы. В подгруппе 1 в качестве терапии для лечения СИБР (15 пациентов) был назначен рифаксимин в дозе 600 мг в сутки на протяжении 7 дней. Во 2-ой подгруппе (15 больных) проводилась 7 дневная терапия рифаксимином в той же дозе, с последующим приемом пробиотика Флоросан Д по 1 капсуле 3 раза в день на протяжении 1 месяца.

Нам удалось установить, что в случае атопической БА, одновременное назначение пациентам базисной терапии для лечения астмы и терапии, направленной на нормализацию кишечной микробиоты, уровень аллергоспецифического 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 IgE в ходе наблюдения достигнуто не было ($p > 0,05$) (Таблица 24).

Таблица 24. Уровень IgE в группе пациентов с atopической бронхиальной астмой 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

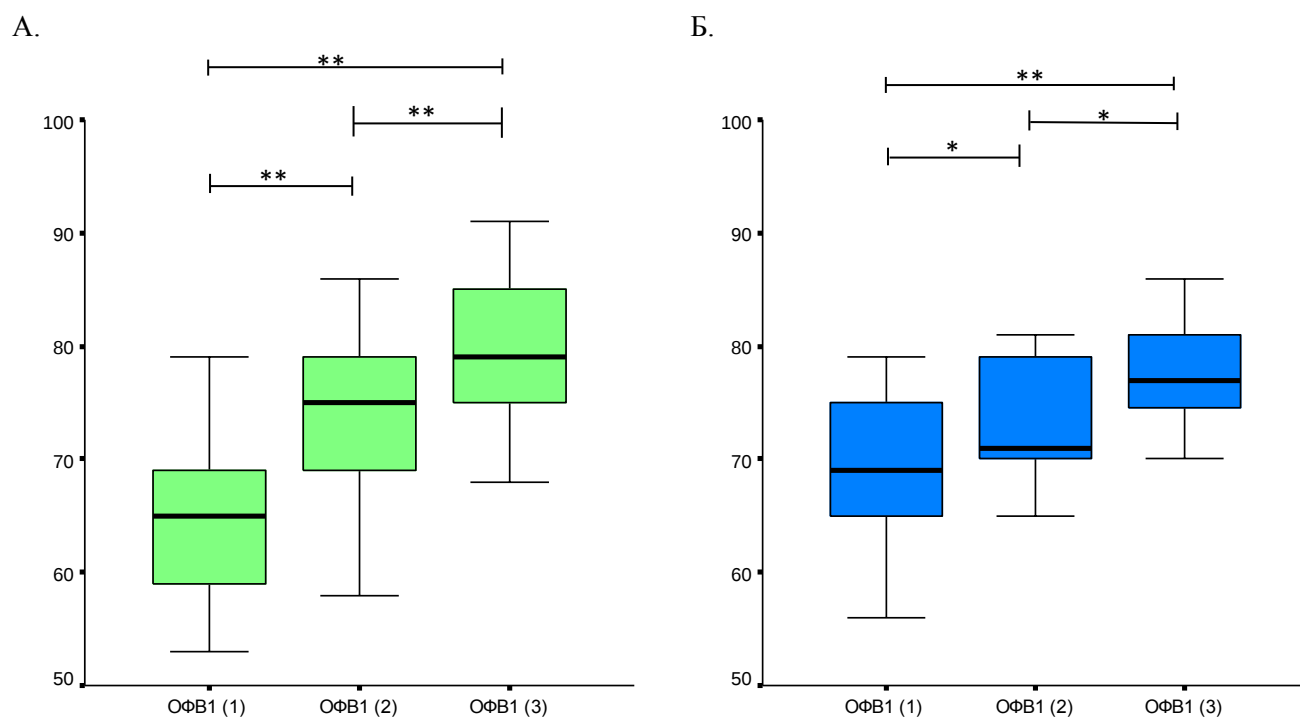
В результате проведенной терапии отмечено улучшение вентиляционной функции легких в обеих группах, определяемое как увеличение объема форсированного выдоха за 1-ю секунду (таблица 25, диаграмма 7).

Таблица 25. Результаты сравнения объема форсированного выдоха за первую секунду (%) в группе больных atopической бронхиальной астмой

Группы	ОФВ ₁ (1)	ОФВ ₁ (2)	ОФВ ₁ (3)	p, (1) vs (2)	p, (2) vs (3)	p, (1) vs (3)
АА СИБР (+)	64,6 [62,10; 67,16]	74,2 [71,69; 6,83]	80,1 [77,78; 82,41]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
АА СИБР (-)	69,6 [65,90; 73,43]	73,6 [70,68; 76,51]	77,26 [74,72; 79,80]	< 0,05	< 0,05	< 0,001

ОФВ₁ (1) – результаты до лечения, ОФВ₁ (2) – результаты через 2 недели лечения, ОФВ₁ (3) – результаты через 4 недели лечения

Диаграмма 7. Показатели спирометрии до и после лечения в группе атопической астмы (А – СИБР (+), Б – СИБР (-)). $**p < 0,001$, $*p < 0,05$; по горизонтали - ОФВ₁ (1) – результаты до лечения, ОФВ₁ (2) – результаты через 2 недели лечения, ОФВ₁ (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)



Увеличение объема форсированного выдоха за первую секунду мы расценивали, в первую очередь, как положительный результат медикаментозного лечения в условиях стационара. Однако, обращает на себя внимание более значимое улучшение функции внешнего дыхания после коррекции СИБР, это может служить подтверждением вклада нарушений состава микрофлоры в развитии основных проявлений БА.

Из 30 пациентов АА СИБР (+) для лечения синдрома избыточного бактериального роста 15 человек получали терапию рифаксимин + Флорасан Д и

15 человек только рифаксимин. Значения IgE в обеих группах до начала терапии были сопоставимы (308,4 [188,51 - 428,28] vs 368,5 [312,33 - 424,66]; $p = 0,13$).

Таблица 26. IgE в группе пациентов с атопической бронхиальной астмой (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

Уровень IgE на фоне лечения СИБР достоверно снизился в обеих подгруппах (таблица 26). В исследовании нам удалось проследить потенцирующий эффект пробиотика. Было выявлено, что добавление к терапии пробиотического препарата привело к статистически значимому уменьшению IgE по сравнению с подгруппой, получавшей только антибактериальный препарат (таблица 27).

Таблица 27. Уровень иммуноглобулина Е у пациентов, принимавших рифаксимин и рифаксимин + Флорасан Д

Показатель (МЕ/мл)	Рифаксимин + Флорасан Д, n = 15	Рифаксимин, n = 15	p
IgE	192,5 [136,19; 248,80]	280,83 [228,67; 332,99]	0,014

4.5 Эффективность терапии синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке у больных с неатопической бронхиальной астмой

Значения основных лабораторных показателей исходно были в пределах нормальных референсных значений и не изменились после проводимого лечения и наблюдения за пациентами. Проводимая в условиях клиники медикаментозная терапия способствовала улучшению функции внешнего дыхания (таблица 28, диаграмма 8).

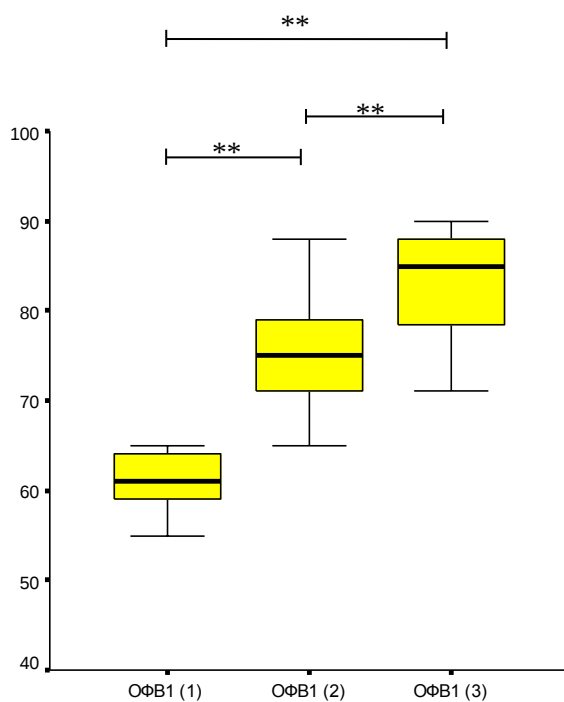
Таблица 28. Результаты сравнения объема форсированного выдоха за первую секунду (%) в группе больных неатопической бронхиальной астмой

Группы	ОФВ ₁ (1)	ОФВ ₁ (2)	ОФВ ₁ (3)	p, (1) vs (2)	p, (2) vs (3)	p, (1) vs (3)
НА СИБР (+)	60, 06 [59,39; 62,73]	75,60 [72,07; 79,12]	82,8 [79,48; 86,11]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
НА СИБР (-)	62,45 [57,37; 67,52]	67,4 [62,41; 72,38]	68,6 [63,68; 73,51]	0,076	0,36	0,038

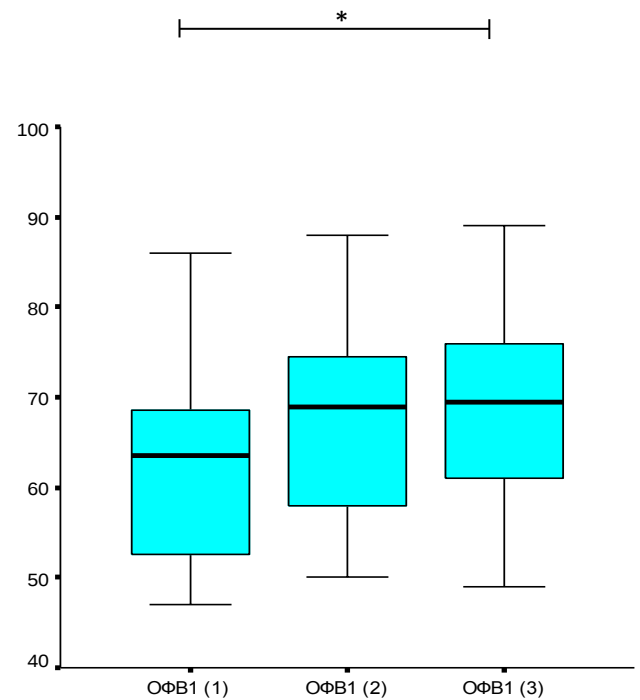
ОФВ₁ (1) – результаты до лечения, ОФВ₁ (2) – результаты через 2 недели лечения, ОФВ₁ (3) – результаты через 4 недели лечения

Диаграмма 8. Показатели спирометрии до и после лечения в группе неатопической астмы (А – СИБР (+), Б – СИБР (-)). $**p < 0,001$, $*p < 0,05$; по горизонтали - ОФВ₁(1) – результаты до лечения, ОФВ₁(2) – результаты через 2 недели лечения, ОФВ₁(3) – результаты через 4 недели лечения; по вертикали – значение объема форсированного выдоха за 1 секунду в %. (линия внутри прямоугольника - медиана, прямоугольник – интерквартильный размах, конечные планки - размах без выбросов)

А.



Б.



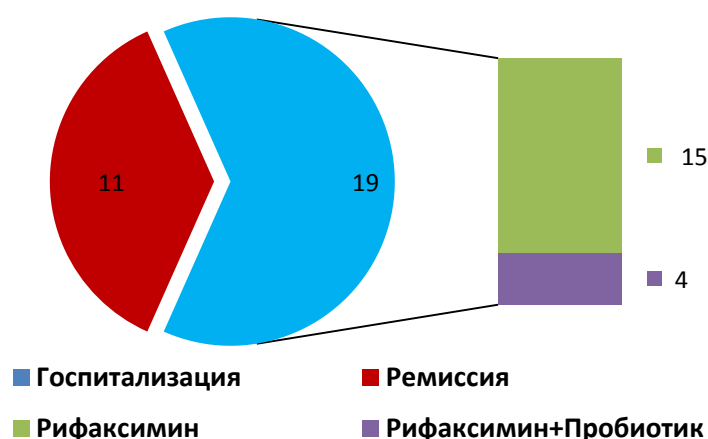
Обращает на себя внимание, что, как и в группе с atopической БА, после лечения СИБР на фоне стандартной терапии БА, у пациентов с неатопическим фенотипом БА СИБР (+) были получены статистически значимые различия по улучшению функции внешнего дыхания.

4.6 Течение атопической бронхиальной астмы в последующий год наблюдения после коррекции микробиоты кишечника

Наблюдение за пациентами в течение последующего года показало, что лечение СИБР в тонкой кишке способствовало снижению частоты обострений заболевания, требующих госпитализаций в среднем до 1-2 раз в год, при сравнении с 2-3 раза ежегодно до проведения терапии.

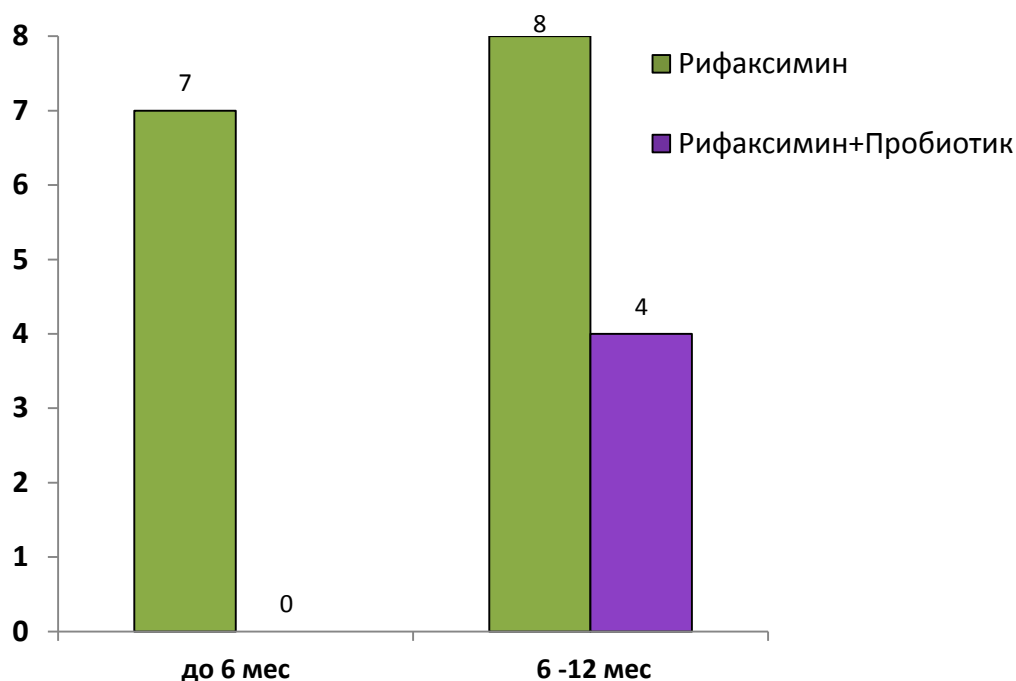
В группе АА СИБР (+) в течение последующего года однократная госпитализация потребовалась лишь 19 больным (63% от общего числа пациентов группы АА СИБР (+)). Все эти пациенты имели длительный анамнез бронхиальной астмы от 15 до 40 лет и одна пациентка была с 50 летним стажем заболевания. Установлено, что среди госпитализированных 15 человек (79%) для лечения СИБР принимали только рифаксимин, а 4 пациента (21%) получали рифаксимин + Флорасан Д (диаграмма 9). Таким образом, добавление к терапии пробиотического препарата способствовало более длительной ремиссии заболевания (критерий Фишера = 0,00002, $p < 0,05$; критерий $\chi^2 = 17,37$, $p < 0,001$).

Диаграмма 9. Течение атопической бронхиальной астмы в последующий год наблюдения после лечения синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке



Мы проанализировали, насколько быстро развивались последующие обострения БА. Так из 15 больных, принимавших рифаксимин, 7 пациентов были госпитализированы в течение первых 6 месяцев, а остальные 8 - в интервале 6-12 месяцев. Пациенты, получавшие для лечения рифаксимин + Флорасан Д были госпитализированы через 6-12 месяцев наблюдения (Диаграмма 10).

Диаграмма 10. Количество пациентов atopической бронхиальной астмой, госпитализированных в течение года



Таким образом, в течение первого полугодия госпитализация была необходима пациентам, не получавшим пробиотик (критерий Фишера = 0,00003, $p < 0,05$; $\chi^2 = 18,00$, $p < 0,001$). Необходимость стационарного лечения во втором полугодии у этих пациентов так же была выше (критерий Фишера = 0,00135, $p < 0,05$; $\chi^2 = 11,24$, уровень значимости $p < 0,001$).

11 пациентам (37% группы АА СИБР (+)) госпитализация в течение года не потребовалась, их состояние расценивалось как ремиссия (Диаграмма 9). Для лечения СИБР эти больные получали терапию рифаксимин + Флорасан Д.

Длительность заболевания БА, в этом случае, была несколько меньше - до 10 лет, и лишь у одного пациента анамнез астмы составил 20 лет.

Таким образом, терапия с добавлением Флорасана Д способствовала более длительной ремиссии бронхиальной астмы.

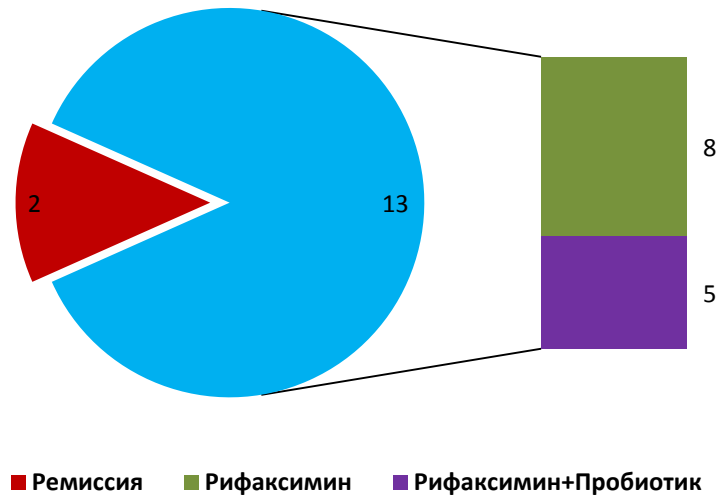
Пациенты АА СИБР (-), получавшие по условиям исследования только основную терапию, направленную на лечение БА, в 100% случаев (15 человек) были госпитализированы 2 и более раз.

4.7 Течение неатопической бронхиальной астмы в последующий год наблюдения после коррекции микробиоты кишечника

У пациентов неатопической БА 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 НА СИБР (+) необходимость стационарного лечения в течение года возникла у 13 больных, с длительностью анамнеза БА до 10 лет (86% от общего числа НА СИБР (+)) (Диаграмма 11). 5 человек (38,5%) в качестве терапии СИБР получали рифаксимин + Флорасан Д, а 8 (61,5%) человек - только рифаксимин (Диаграмма 8). Статистически достоверных различий при сравнении этих подгрупп не получено $p > 0,05$ ($p = 0,2$ по критерию Фишера; $p = 0,10$ по критерию χ^2).

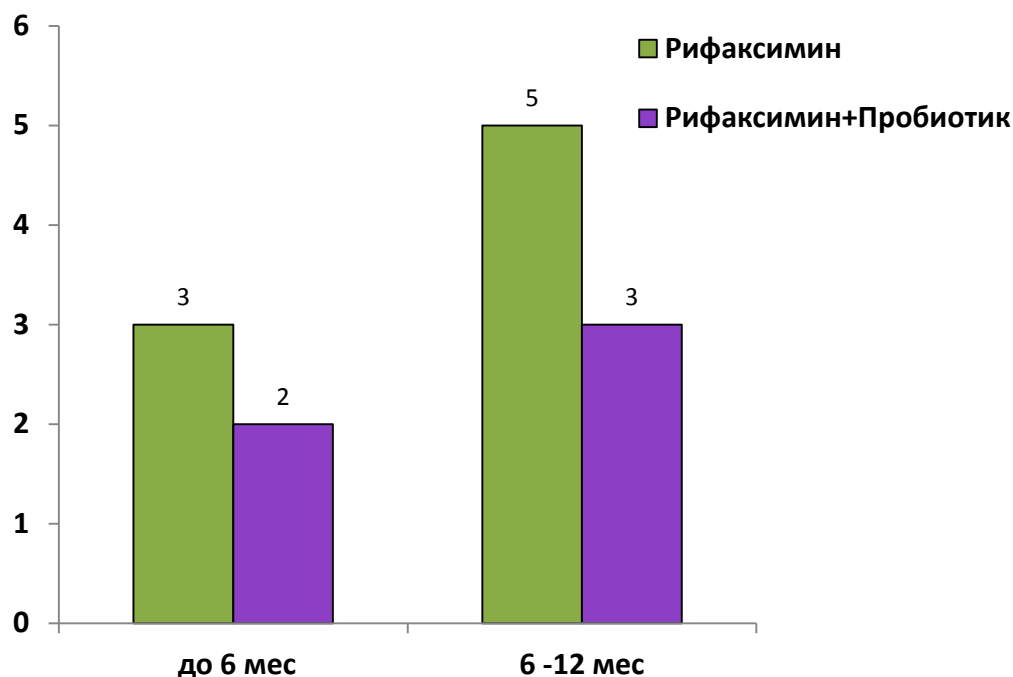
Диаграмма 11. Течение неатопической бронхиальной астмы в последующий год наблюдения после лечения синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке



Из 8 человек, получавших рифаксимин, 3 пациента были госпитализированы в первом полугодии, а остальные 5 в интервале 6-12 месяцев.

Из 5 человек, получавших рифаксимин + Флорасан Д, 2 человека госпитализированы через 6 месяцев, а 3 пациента в интервале 6-12 месяцев. (Диаграмма 12).

Диаграмма 12. Количество пациентов неатопической бронхиальной астмой, госпитализированных в течение года



У пациентов неатопической астмой частота госпитализации не зависела от приема пробиотика, как в первом (критерий Фишера = 0,43, $p > 0,05$; критерий $\chi^2 = 2,10$, $p = 0,14$), так и во втором полугодии (критерий Фишера = 0,22, $p > 0,05$; критерий $\chi^2 = 2,50$, $p = 0,11$).

Лишь 2 пациентам, с длительностью анамнеза до 5 лет (14% от общего числа больных группы НА СИБР (+)) стационарное лечение в течение года не потребовалась, все они получали терапию рифаксимином + 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 бронхиальной астмы в случае пролонгированной терапии Флорасаном Д, особенно у пациентов с продолжительностью заболевания менее 10 лет.

Глава 5

Метаболическая активность кишечной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой

Для анализа метаболической активности кишечной микробиоты было изучено:

1. Содержание бактериальных кворум-молекул - короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) в кале методом газожидкостного хроматографического анализа у пациентов, страдающих бронхиальной астмой и здоровых лиц.
2. Сравнительный анализ экспрессии КЦЖК в группах atopической и неатопической бронхиальной астмы.
3. Спектр КЦЖК у пациентов, страдающих бронхиальной астмой и здоровых лиц.
4. Корреляция симптомов заболевания и метаболической активности микробиоты кишечника.
5. Эффективность коррекции кишечной микробиоты у пациентов atopической бронхиальной астмой.

5.1 Содержание бактериальных кворум-молекул - короткоцепочечных жирных кислот в кале при бронхиальной астме

Исследование проведено у 50 пациентов из основной группы (30 человек IgE ассоциированная астма и 20 пациентов с неатопическим фенотипом заболевания) и 17-и здоровых добровольцев из группы контроля (ГК 2)

Группы обследованных не различались между собой по возрасту ($p > 0,05$), полу ($p > 0,05$), индексу массы тела ($p > 0,05$). Пациенты с бронхиальной астмой были так же сопоставимы по длительности анамнеза ($p > 0,05$) и тяжести течения заболевания ($p > 0,05$) (Таблица 4).

Таблица 27 иллюстрирует уровень КЦЖК в исследуемых группах. Было установлено значительное снижение общего содержания КЦЖК в кале у всех пациентов с БА ($p < 0,001$). Выявлено снижение абсолютных концентраций ацетата, пропионата, бутирата ($p < 0,001$) и суммарного содержания изокислот ($p < 0,001$). Результаты значений приведены в таблице 29, диаграмме 13.

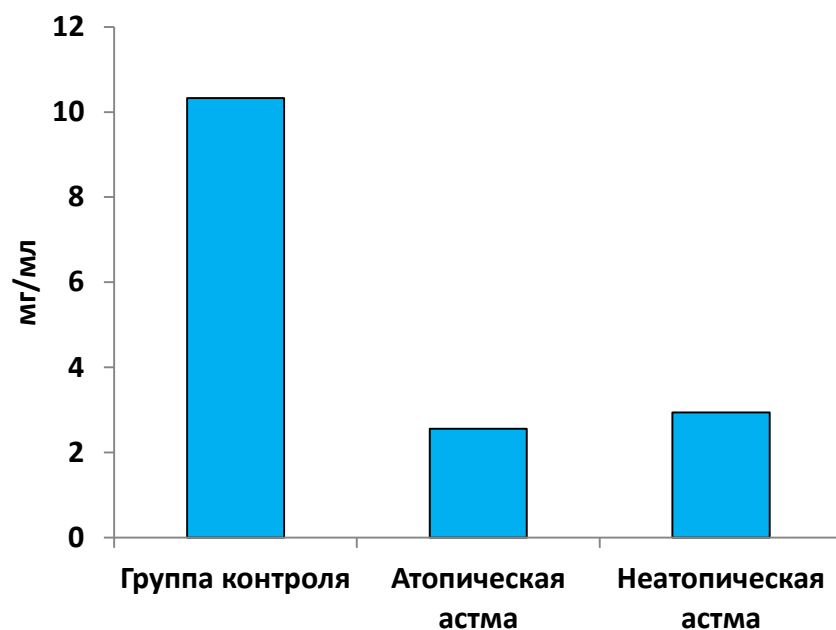
Таблица 29. Уровень короткоцепочечных жирных кислот у пациентов с атопической и неатопической бронхиальной астмой и группы контроля

Параметр	Группа контроля 2	Атопическая астма	Неатопическая астма	p
Общее 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

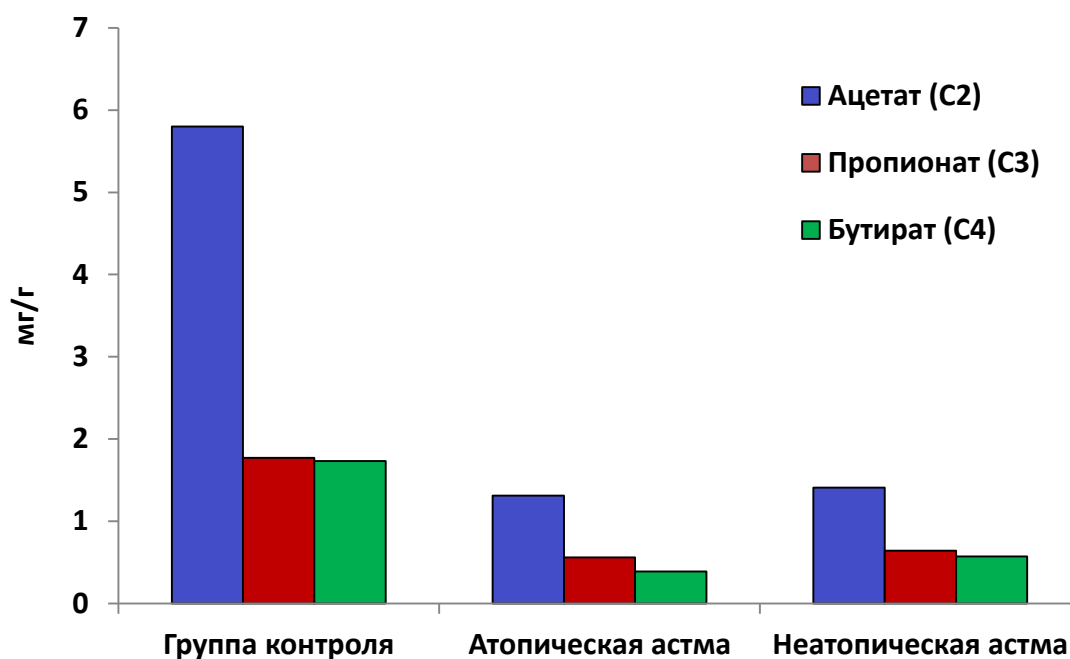
Критерий Манна-Уитни при сравнении: ¹АА и здоровых добровольцев; ² НА и здоровых добровольцев.

Диаграмма 13. Общее содержание (А) и уровень отдельных (Б.) короткоцепочечных жирных кислот в исследуемых группах

А.



Б.



5.2 Сравнительный анализ экспрессии короткоцепочечных жирных кислот в группах атопической и неатопической бронхиальной астмы

В ходе сравнительного анализа разных фенотипов БА статистически достоверных различий в уровнях КЦЖК, изокислот, отношения изокислоты/кислоты не выявлено ($p > 0,05$) (Таблица 30). У лиц, страдающих неатопической БА, показатели анаэробного индекса были смещены в сторону более отрицательных значений при сравнении с пациентами IgE – опосредованной астмой ($p \leq 0,01$).

Таблица 30. Экспрессия короткоцепочечных жирных кислот у больных с различными вариантами течения бронхиальной астмы

Группы пациентов Монокарбоновые кислоты	Атопическая астма	Неатопическая астма	p
Общее содержание, мг/г	2,56 [1,53;3,60]	2,94 [1,75;4,12]	0,30
Ацетат (C ₂), мг/г	1,31 [0,77;1,84]	1,41 [0,86;1,97]	0,38
Пропионат (C ₃), мг/г	0,56 [0,31;0,84]	0,64 [0,29;0,98]	0,34
Бутират (C ₄), мг/г	0,39 [0,21;0,56]	0,57 [0,35;0,78]	0,08
Изокислоты (C _n), мг/г	0,31 [0,16;0,47]	0,19 [0,13;0,25]	0,09
Изокислоты (C _n), ед	0,09 [0,06; 0,12]	0,09 [0,005; 0,18]	0,44
ИзоC _n /C _n , ед.	0,52 [0,36;0,67]	0,37 [0,22;0,51]	0,07
Анаэробный индекс, ед.	-0,7 [-0,82; -0,59]	-1,00 [-1,27;-0,72]	0,01

5. 3 Спектр короткоцепочечных жирных кислот у пациентов, страдающих бронхиальной астмой и здоровых лиц

У пациентов БА, по сравнению с группой контроля, выявлено изменение соотношения КЦЖК (C₂-C₄) (таблица 31, диаграмма 14).

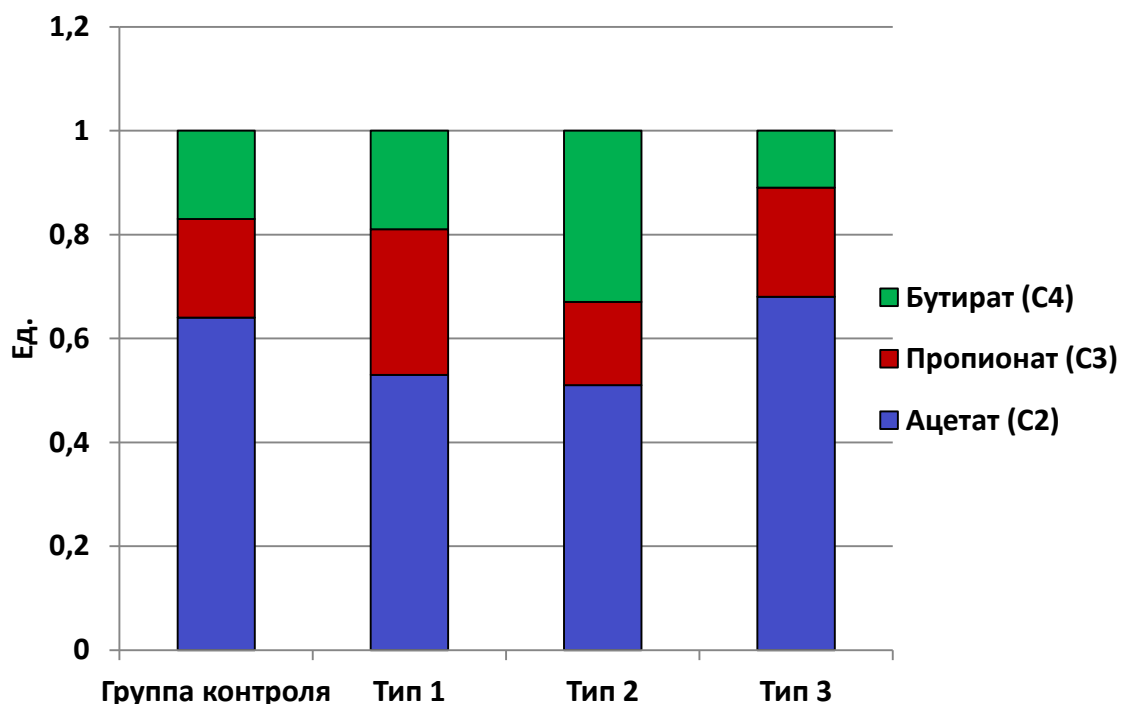
Таблица 31. Профиль короткоцепочечных жирных кислот у пациентов с бронхиальной астмой и группы контроля

Метаболический профиль 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

В большинстве случаев, у 84% обследованных пациентов (42 человека), выявлен анаэробный спектр КЦЖК. В таблице 29 и диаграмме 14 он соответствует 1 и 2 типам профилей КЦЖК. Анаэробный профиль бактериального метаболизма характеризуется (тип 1) снижением доли ацетата при бóльшем содержании доли пропионата и бутирата. Такое соотношение КЦЖК выявлено 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* и др.).

Диаграмма 14. Спектр короткоцепочечных жирных кислот в исследуемых группах



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 повышенной его абсорбцией в кишечнике. В целом, этот спектр КЦЖК соответствует анаэробному и выявлен у 22% обследованных пациентов (11 человек).

При 3-ем варианте метаболического спектра соотношения КЦЖК распределялось иначе. 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 [57]. 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.

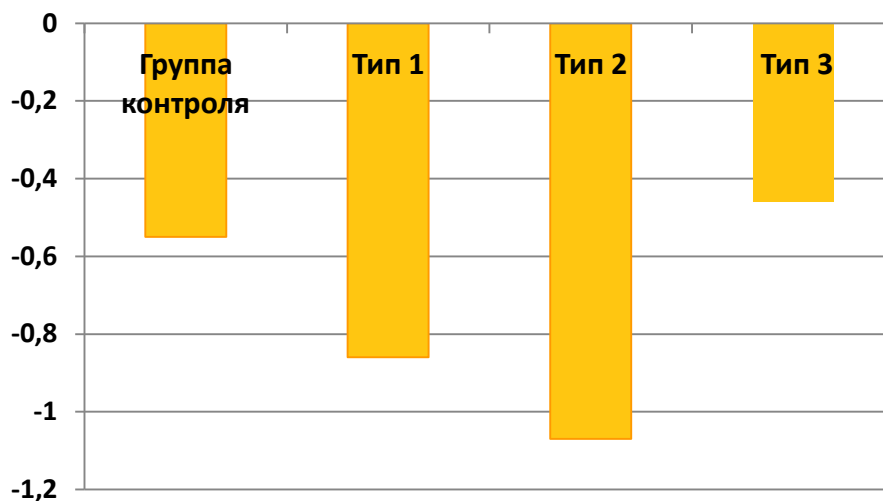
Изокислоты (изоформы КЦЖК) в норме образуются в минимальных количествах. Увеличение их относительного содержания свидетельствует об увеличении активности протеолитической микрофлоры, развивающейся на фоне нарушений состава кишечного биотопа. Субстратом для образования изокислот служат белки слизи кишечника. Сумма концентраций изокислот C₄-C₆ (ИзоCn) и отношение изокислот C₄-C₆ ко всем неразветвленным кислотам C₄-C₆ (ИзоCn/Cn) позволяет оценить протеолитическую активность микроорганизмов. 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 32).

Таблица 32. Содержание изокислот (относительные концентрации), отношение суммы изокислот к кислотам и анаэробного индекса в соответствии с профилем короткоцепочечных жирных кислот

Параметр	Группа контроля 2	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Изокислоты (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 15. Результаты анаэробного индекса у пациентов с бронхиальной астмой при разных метаболических профилях короткоцепочечных жирных кислот



При разных метаболических типах (таблица 30, диаграмма 15) существенно различались значения анаэробного индекса. 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.

5.4 Корреляция клинико-лабораторных проявлений заболевания и метаболической активности микробиоты кишечника

Проведен корреляционный анализ клинико-лабораторных проявлений БА с показателями метаболической активности микробиоты кишечника (таблица 33).

Сила корреляционной связи умеренная и сильная, в большинстве случаев статистически значима.

У пациентов атопической БА были выявлены следующие корреляции:

- достоверная отрицательная корреляция между уровнем IgE и соотношением изокислоты/кислоты (-0,66).
- достоверная отрицательная корреляция между уровнем IgE и анаэробным индексом (-0,45).
- достоверная отрицательная корреляция между значением эозинофилов крови и соотношением изокислоты/кислоты (-0,53).
- достоверная отрицательная корреляция между значением эозинофилов крови и анаэробным индексом (-0,70).
- определялась отрицательная корреляция между уровнем ОФВ₁ и соотношением изокислоты/кислоты (-0,36).

Таблица 33. Корреляция клинико-лабораторных проявлений бронхиальной астмы и спектра короткоцепочечных жирных кислот

Параметры	Метаболическая активность	Атопическая астма, r_s	Неатопическая астма, r_s
Возраст	Общее содержание КЦЖК		
	Ацетат (C ₂)		
	Пропионат (C ₃)		
	Бутират (C ₄)		-0,30
	Изокислоты		
	Изокислоты/кислоты		0,40
	Анаэробный индекс		
IgE	Изокислоты/кислоты	-0,66*	
	Анаэробный индекс	-0,45*	
ОФВ ₁	Изокислоты		-0,77
	Изокислоты/кислоты	-0,36	
Эозинофилы крови	Изокислоты/кислоты	-0,53*	
	Анаэробный индекс	-0,70**	

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

Таким образом, у пациентов с atopической БА получены результаты, достигшие статистически значимого уровня, подтверждающие взаимосвязь активности иммунного ответа и метаболизма кишечной микробиоты. При неатопическом течении заболевания полученные корреляции так же позволяют говорить об имеющейся тенденции, подтверждающей связь с микробиотой.

5.5 Эффективность коррекции кишечной микробиоты у пациентов atopической бронхиальной астмой

Пациенты с atopическим фенотипом БА были дополнительно протестированы на наличие СИБР в тонкой кишке. По результатам водородного дыхательного теста с лактулозой пациенты были рандомизированы на три подгруппы:

Подгруппа А, состояла из 10 пациентов с СИБР (+), которые в составе комплексной терапии получали рифаксимин в дозе 600 мг в сутки на протяжении 7 дней.

В подгруппу Б вошло так же 10 пациентов с СИБР (+). Им проводилась 7 дневная терапия рифаксимином в той же дозе, с последующим приемом пробиотика Лактобаланс® по 1 капсуле 3 раза в день на протяжении 1 месяца.

В подгруппу В были включены 10 пациентов с СИБР (-), которые в составе комплексной терапии для лечения бронхиальной астмы принимали пробиотик Лактобаланс® по 1 капсуле 2 раза в день на протяжении 1 месяца.

Контрольное исследование КЦЖК поводилось по окончанию 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 34).

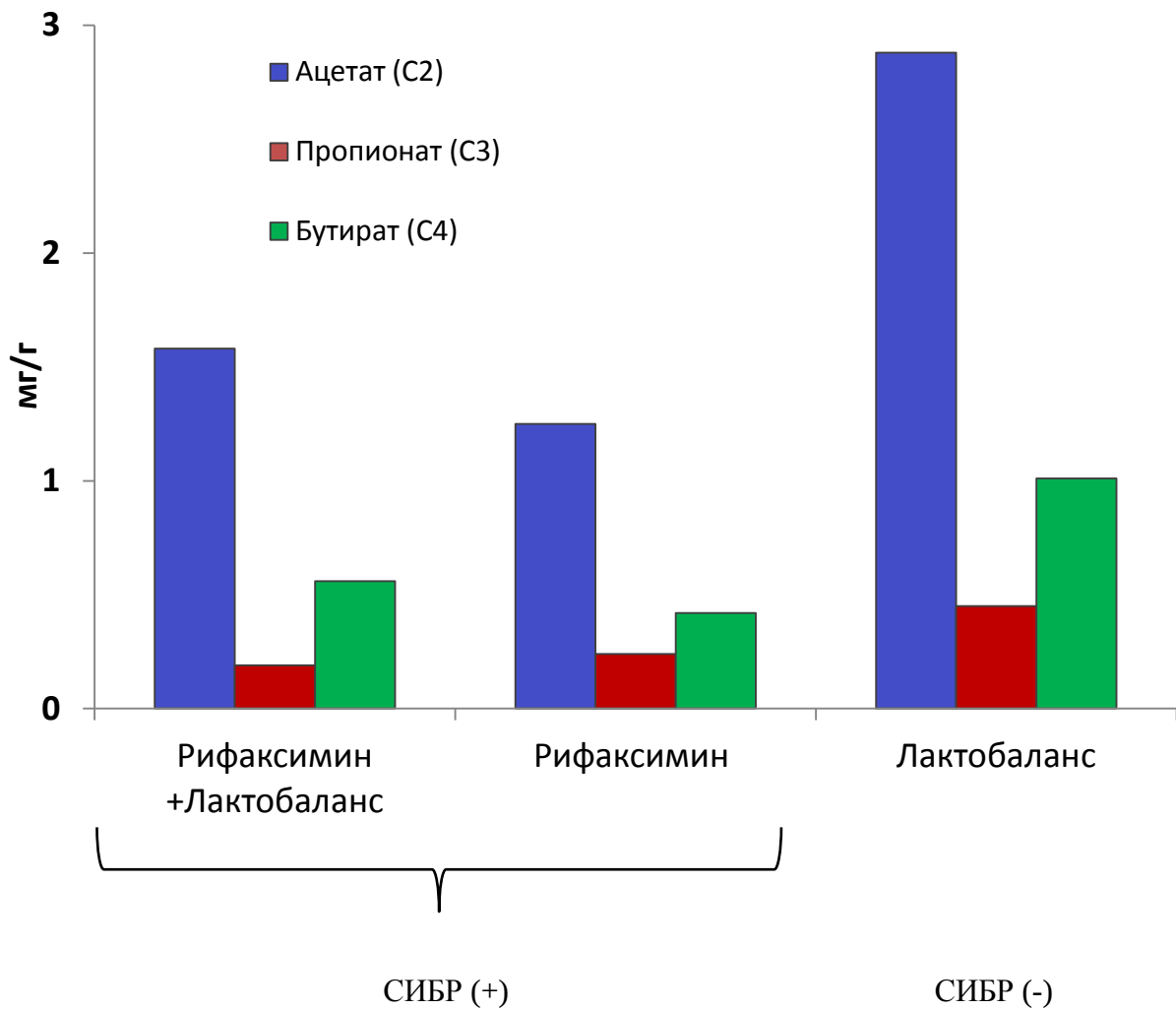
Таблица 34. Экспрессия короткоцепочечных жирных кислот у пациентов с atopической бронхиальной астмой до и после лечения СИБР

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]
Изокислоты (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

Таблица 34 и диаграмма 16 демонстрируют уровень КЦЖК и изокислот у пациентов после лечения СИБР в сравнении с исходными значениями. Вне зависимости от схемы терапии СИБР, выявлено достоверное уменьшение абсолютного количества изокислот ($p < 0,05$), а так же снижение уровня пропионата ($p < 0,01$) в подгруппе пациентов, принимавших пролонгированную терапию (рифаксимин + Лактобаланс). Следует отметить, что уровень остальных КЦЖК и общее их содержание в этих подгруппах не изменились.

Диаграмма 16. Уровень короткоцепочечных жирных кислот у пациентов с атопической астмой после лечения в исследуемых подгруппах

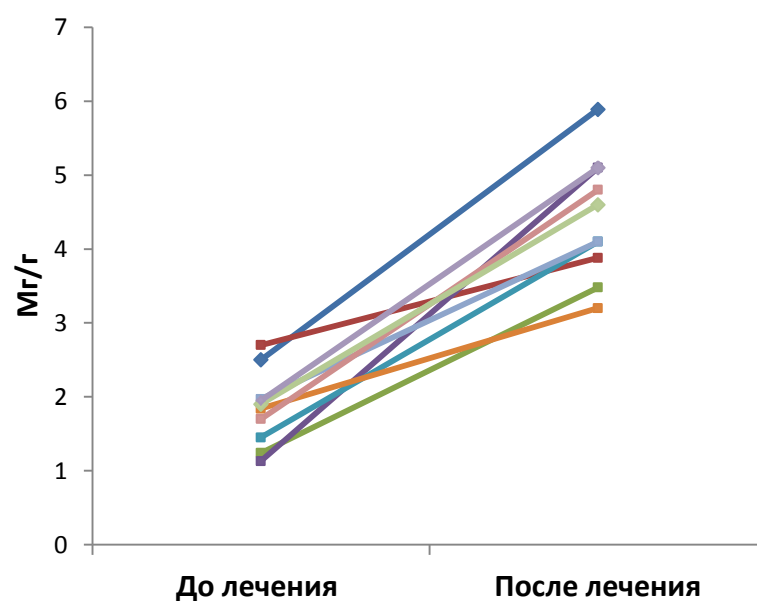


У пациентов третьей подгруппы (“В”), которым не требовалось назначение антибактериального препарата, ввиду отсутствия СИБР, выявлено достоверное увеличение общего содержания КЦЖК ($p < 0,001$), ацетата ($p < 0,001$) и бутирата ($p < 0,001$), отмечено снижение количества изокислот ($p < 0,05$) (таблица 35, диаграмма 17).

Таблица 35. Экспрессия короткоцепочечных жирных кислот у пациентов атопической бронхиальной астмой СИБР (-) до и после лечения пробиотиком

Параметр	Атопическая астма СИБР (-), до лечения	Атопическая астма СИБР (-), после лечения	p
Общее 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

Диаграмма 17. Увеличение общего содержания короткоцепочечных жирных кислот у пациентов с атопической астмой СИБР (-) через 1 месяц терапии пробиотиком



После лечения, направленного на коррекцию состава кишечной микрофлоры, соотношение КЦЖК, во всех исследуемых подгруппах, не отличалось от группы контроля (таблица 36, диаграмма 18).

Таблица 36. Профиль короткоцепочечных жирных кислот в исследуемых подгруппах после проведённого лечения

Монокарбоновые 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]
Изокислоты (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. У них значимо снизилось содержание изокислот и соотношения изокислоты/кислоты, как по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$), так и с группой лиц, принимающих только рифаксимин ($p < 0,05$). Достоверное снижение изокислот ($p < 0,001$) и соотношения изокислоты/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 презепителиальный и эпителиальный уровень кишки [78, 159].

Во всех исследуемых подгруппах после лечения, значения анаэробного индекса не отличались от группы контроля ($p > 0,05$) (диаграмма 19).

Диаграмма 18. Спектр короткоцепочечных жирных кислот в исследуемых подгруппах после проведённого лечения

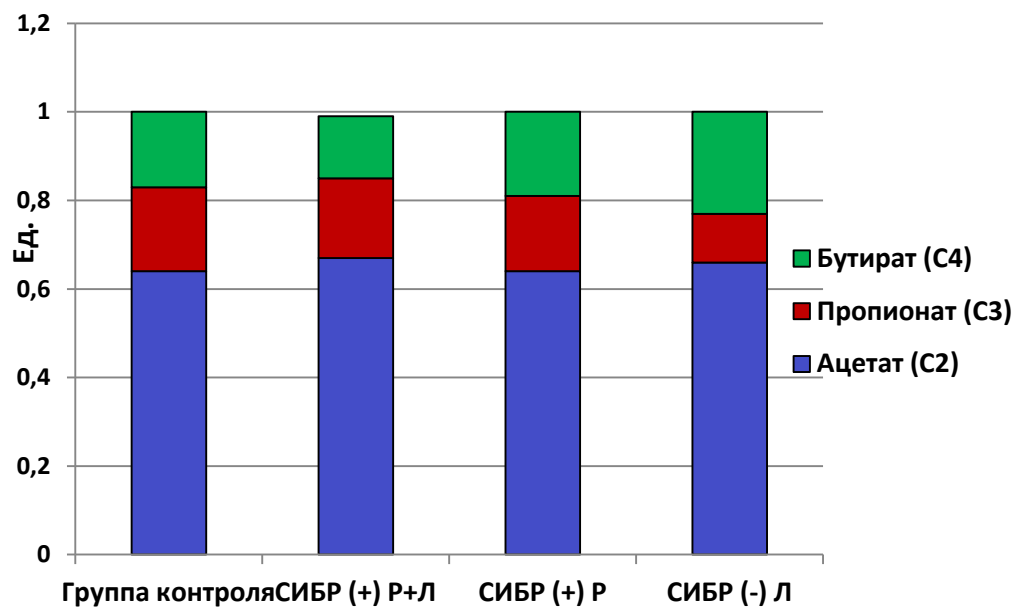
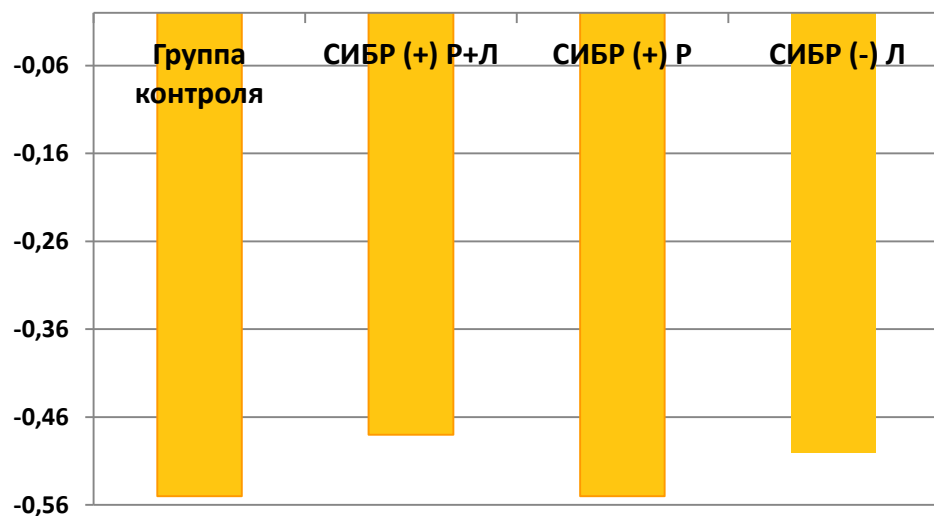


Диаграмма 19. Результаты значений анаэробного индекса у пациентов с бронхиальной астмой после лечения в исследуемых подгруппах



Таким образом, выявленные изменения метаболической активности микробиоты кишечника и ее динамика на фоне проводимой терапии, с одной стороны, служат отражением выраженных дисбиотических процессов, а с другой стороны, выступают в качестве их биомаркеров.

Глава 6

Состояние орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой

Для определения состояния орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой были изучены следующие показатели:

1. Состав орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы, изученный в образцах мазка задней стенки глотки.
2. Сравнение состава орофарингеальной микробиоты пациентов с atopической и неатопической астмой.
3. Определение бактериального разнообразия орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы.
4. Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рНК бактерий в образцах мазка задней стенки глотки, с клинико-лабораторными проявлениями atopической бронхиальной астмы.
4. Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рНК бактерий в образцах мазка задней стенки глотки, с клинико-лабораторными проявлениями неатопической бронхиальной астмы.

6.1 Состав орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы по данным молекулярно-генетического исследования (секвенирование 16S рНК)

Для оценки состояния орофарингеальной микробиоты, 27 пациентам с бронхиальной астмой, из которых 15 человек страдали atopической астмой и у 12 больных был неатопический фенотип заболевания, а также 10 клинически

здоровым добровольцам из группы контроля (ГКЗ) проводилось молекулярно-генетическое исследование микробиоты задней стенки глотки (секвенирование 16S рРНК).

Включенные в исследование лица были сопоставимы по возрасту ($p > 0,05$), полу ($p > 0,05$), индексу массы тела ($p > 0,05$). Пациенты групп АА и НА были сравнимы по длительности анамнеза ($p > 0,05$) и тяжести течения бронхиальной астмой ($p > 0,05$) (Таблица 5).

Состав микробиоты, колонизирующей слизистую оболочку задней стенки глотки, в исследуемых группах представлен в таблице 37 и диаграмме 20.

Таблица 37. Состав орофарингеальной микробиоты (%) на различных таксономических уровнях у клинически здоровых лиц и пациентов с бронхиальной астмой

Таксономическая группа бактерий	Группа контроля	Атопическая астма	Неатопическая астма	p
Филум Firmicutes	17,05 [3,60; 30,51]	15,55 [7,33; 30,26]	17,39 [0,97; 33,81]	0,94
Класс Clostridia	4,02 [1,02; 7,03]	2,09 [0,58; 3,6]	1,84 [0,46; 3,23]	0,04¹
Порядок Clostridiales	4,14 [1,09; 7,19]	2,67 [0,61; 4,73]	1,84 [0,48; 3,19]	0,09
Семейство Lachnospiraceae	3,34 [0,48; 6,20]	1,93 [0,36; 3,50]	1,37 [0,80; 1,94]	0,31
Род Lachnoanaerobaculum	0,99 [0,0; 2,11]	0,37 [0,07; 0,66]	0,45 [0,21; 0,70]	0,6
Род Oribacterium	1,32 [0,29; 2,79]	0,34 [0,02; 0,87]	0,22 [0,08; 0,37]	0,03
Семейство Ruminococcaceae	0,14 [0,0; 0,29]	0,28 [0,0; 0,63]	0,34 [0,0; 1,15]	0,41
Семейство Peptostreptococcaceae	0,28 [0,0; 0,65]	0,03 [0,0; 0,7]	0,01 [0,0; 0,02]	0,03
Класс Erysipelotrichia	0,18 [0,0; 0,37]	0,51 [0,0; 1,46]	0,12 [0,029; 0,20]	0,42
Класс Bacilli	7,02 [0,0; 17,24]	6,23 [0,0; 16,75]	10,58 [0,0; 25,42]	0,97
Семейство Bacillales	0,23 [0,0; 0,59]	0,22 [0,0; 0,74]	0,21 [0,0; 0,57]	0,74
Порядок Lactobacillales	7,1	5,7	10,8	0,97

	[0,0; 18,30]	[0,0; 15,47]	[0,0; 26,37]	
Семейство Carnobacteriaceae	0,37 [0,0; 0,82]	0,36 [0,03; 0,68]	0,28 [0,0; 0,59]	0,93
Семейство Streptococcaceae	3,58 [0,0; 8,74]	3,09 [0,0; 7,71]	6,17 [0,0; 15,64]	0,95
Род Gemella	0,21 [0,0; 0,53]	0,19 [0,0; 0,61]	0,20 [0,0; 0,50]	0,75
Род Granulicatella	0,29 [0,0; 0,64]	0,29 [0,02; 0,56]	0,21 [0,01; 0,44]	0,75
Род Streptococcus	2,79 [0,0; 6,97]	2,31 [0,0; 6,43]	4,54 [0,0; 11,22]	0,97
Класс Negativicutes	5,48 [0,0; 11,10]	5,76 [3,81; 7,70]	4,46 [1,26; 7,65]	0,9
Семейство Veillonellaceae	5,53 [0,0; 11,16]	5,92 [3,65; 8,18]	4,46 [1,35; 7,56]	0,42
Род Veillonella	3,9 [0,0; 8,33]	3,9 [2,4; 5,44]	3,29 [0,9; 5,68]	0,6
Семейство Erysipelotrichaceae	0,18 [0,0; 0,38]	0,50 [0,0; 1,42]	0,12 [0,03; 0,20]	0,35
Род Solobacterium	0,13 [0,0; 0,31]	0,38 [0,0; 1,23]	0,09 [0,01; 0,16]	0,29
Филум Actinobacteria	4,18 [0,0; 10,17]	3,72 [1,06; 6,37]	3,35 [0,83; 5,87]	0,42
Класс Actinobacteria	4,27 [0,0; 10,42]	3,7 [1,13; 6,26]	3,29 [1,02; 5,57]	0,85
Семейство Micrococcaceae	1,57 [0,0; 5,39]	0,39 [0,005; 0,78]	0,31 [0,03; 0,59]	0,81
Род Morococcus	0,25 [0,05; 0,44]	0,14 [0,0; 0,39]	0,12 [0,001; 0,33]	0,32
Род Rothia	1,41 [0,0; 4,43]	0,33 [0,0; 0,67]	0,25 [0,018; 0,49]	0,81
Семейство Gaiellaceae	0,27 [0,0; 0,62]	0,51 [0,0; 1,12]	0,44 [0,0; 1,60]	0,41
Род Gaiella	0,25 [0,0; 0,72]	0,47 [0,0; 0,90]	0,39 [0,0; 1,01]	0,45
Семейство Coriobacteriaceae	0,38 [0,009; 0,75]	0,94 [0,40; 1,48]	1,05 [0,05; 2,05]	0,13
Род Atopobium	0,32 [0,007; 0,64]	0,81 [0,32; 1,30]	0,95 [0,03; 1,87]	0,15
Семейство Actinomycetaceae	0,34 [0,0; 0,83]	0,37 [0,07; 0,66]	0,14 [0,0; 0,28]	0,29
Род Actinomyces	0,29 [0,0; 0,71]	0,33 [0,06; 0,59]	0,12 [0,0; 0,24]	0,26
Филум Bacteroides	39,29	51,12	52,90	0,42

	[18,6; 59,96]	[20,4; 72,82]	[19,06; 86,73]	
Класс Bacteroidia	35,22 [14,88;55,56]	48,04 [25,32;70,75]	49,58 [17,27; 81,88]	0,3
Семейство Porphyromonadaceae	5,6 [0,0; 15,01]	1,21 [0,0; 3,40]	0,56 [0,0; 1,17]	0,03
Род Porphyromonas	0,66 [0,0; 1,77]	0,55 [0,0; 2,15]	0,04 [0,0; 0,13]	0,03¹
Род Tannerella	1,18 [0,0; 2,73]	0,15 [0,06; 0,23]	0,13 [0,004; 0,25]	0,04
Семейство Prevotellaceae	26,69 [8,58; 44,80]	40,95 [22,06; 59,83]	44,21 [14,17; 74,24]	0,24
Род Alloprevotella	1,52 [0,13; 2,92]	1,95 [0,0; 4,06]	2,01 [0,0; 5,03]	0,77
Род Prevotella	20,29 [7,06; 33,52]	29,27 [14,27;44,27]	33,28 [9,54; 57,03]	0,18
Класс Flavobacteriia	1,38 [0,0; 3,04]	0,51 [0,0; 1,46]	0,14 [0,0; 0,28]	0,02
Семейство Flavobacteriaceae	1,38 [0,0; 3,03]	0,57 [0,0; 1,44]	0,14 [0,0; 0,28]	0,01
Род Capnocytophaga	0,83 [0,0; 2,01]	0,13 [0,001; 0,26]	0,04 [0,0; 0,1]	0,01
Филум Proteobacteria	20,07 [5,16; 34,98]	11,64 [4,04; 19,22]	12,40 [2,69; 22,11]	0,24
Класс Alphaproteobacteria	1,67 [0,0; 4,15]	2,41 [0,0; 5,26]	2,36 [0,0; 7,55]	0,58
Семейство Acetobacteraceae	0,38 [0,0; 0,86]	0,71 [0,0; 1,63]	0,73 [0,0; 2,39]	0,5
Семейство Caulobacteraceae	0,16 [0,0; 0,42]	0,25 [0,0; 0,58]	0,24 [0,0; 0,82]	0,47
Класс Betaproteobacteria	7,58 [0,0; 19,00]	1,89 [0,0; 5,00]	3,10 [0,0; 7,80]	0,36
Порядок Neisseriales	6,6 [0,0; 18,13]	1,27 [0,0; 3,52]	2,8 [0,0; 7,80]	0,23
Семейство Neisseriaceae	6,70 [0,0; 18,31]	1,25 [0,0; 3,47]	2,59 [0,0; 7,07]	0,23
Род Neisseria	3,83 [0,0; 12,32]	0,31 [0,0; 1,11]	0,36 [0,0; 0,86]	0,15
Порядок Burkholderiales	0,53 [0,0; 1,28]	0,39 [0,0; 0,86]	0,25 [0,0; 0,75]	0,49
Семейство Burkholderiaceae	0,31 [0,0; 0,75]	0,16 [0,0; 0,43]	0,02 [0,0; 0,05]	0,03¹
Класс Gammaproteobacteria	6,79 [0,0; 14,82]	3,71 [0,79; 6,64]	2,38 [0,0; 6,96]	0,18

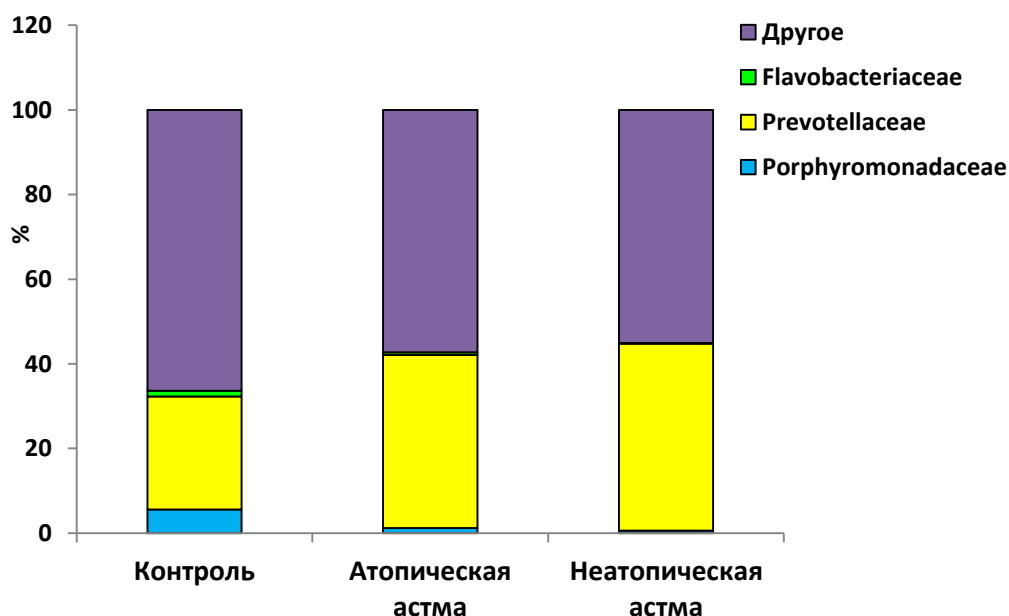
Семейство Pasteurellaceae	5,62 [0,0; 14,39]	2,55 [0,65; 4,46]	1,12 [0,0; 2,89]	0,11
Род Haemophilus	1,88 [0,0; 0,45]	0,53 [0,0; 1,15]	0,23 [0,0; 0,53]	0,03¹
Семейство Pseudomonadaceae	0,78 [0,0; 2,53]	0,57 [0,05; 1,09]	0,47 [0,0; 1,53]	0,37
Порядок Pseudomonadales	0,86 [0,0; 2,67]	0,70 [0,06; 1,35]	0,61 [0,0; 1,95]	0,37
Класс Epsilonproteobacteria	3,82 [0,0; 8,03]	3,39 [0,0; 7,53]	4,46 [0,52; 8,38]	0,87
Сем. Campylobacteriaceae	3,44 [0,0; 7,50]	2,7 [0,0; 6,07]	3,73 [0,45; 7,00]	0,87
Род Campylobacter	3,13 [0,0; 6,83]	2,56 [0,0; 5,52]	3,38 [0,48; 6,28]	0,87
Филум Verrucimicrobia	0,18 [0,0; 0,47]	0,29 [0,0; 0,60]	0,26 [0,0; 0,88]	0,21
Филум Acidobacteria	1,02 [0,0; 2,40]	1,7 [0,0; 4,03]	1,79 [0,0; 5,86]	0,48
Класс Acidobacteria Gp1	0,56 [0,0; 1,27]	1,16 [0,0; 2,78]	1,32 [0,0; 4,46]	0,36
Филум Fusobacteria	8,93 [0,93; 16,91]	5,9 [3,29; 8,51]	4,4 [0,0; 11,74]	0,2
Класс Fusobacteriia	9,17 [4,05; 17,28]	2,58 [1,34; 8,76]	4,60 [0,01; 12,22]	0,03
Семейство Fusobacteriaceae	4,93 [0,0; 11,62]	2,46 [0,0; 5,49]	0,91 [0,0; 1,94]	0,09
Род Fusobacterium	3,85 [0,0; 9,48]	1,19 [0,0; 2,96]	0,65 [0,0; 1,4]	0,05
Род Leptotrichia	2,87 [0,45; 5,29]	2,42 [0,98; 3,86]	1,8 [0,0; 4,89]	0,44
Семейство Leptotrichiaceae	3,89 [0,69; 7,08]	3,33 [1,46; 5,20]	3,32 [0,0; 9,29]	0,44

Если не указано иное, сравнение осуществлялось при помощи метода Краскела-Уоллиса; Критерий Манна-Уитни при сравнении группы контроля с ¹неатопической астмой.

Доминирующий тип бактерий, в исследуемых группах, представлен филумом *Bacteroidetes*, объединяющим сахаролитические анаэробные бактерии. Внутри этого типа, у больных БА выявлено статистически значимое снижение представленности семейств *Porphyromonadaceae* ($p < 0,05$), *Flavobacteriaceae* ($p < 0,01$) и входящих в них соответственно родов *Porphyromonas* ($p < 0,05$), *Tannerella*

($p < 0,05$) и *Capnocytophaga* ($p < 0,01$). 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. Установлено, что при раке желудка человека имеется тенденция к снижению в составе микробиоты желудка двух видов *Porphyromonas*. *Porphyromonas* рассматривается и как маркер рака поджелудочной железы. *Tannerella* относят к грамотрицательным анаэробам, снижение которых свидетельствует об улучшении состояния пародонта и десен.

Диаграмма 20. Изменение структуры орофарингеальной микробиоты у пациентов бронхиальной астмой внутри типа *Bacteroides*



Следующий по распространенности тип бактерий орофарингеальной микрофлоры представлен *Firmicutes*. Как уже упоминалось, он объединяет множество грамположительных бактерий, относящихся как к аэробам, так и

анаэробам. Тип *Firmicutes* характеризуется, у пациентов с БА, статистически значимым снижением в составе орофарингеальной микробиоты бактерий относящихся к классу *Clostridia* ($p < 0,05$), семейству *Peptostreptococcaceae* ($p < 0,05$), роду *Oribacterium* (семейство *Lachnospiraceae*) ($p < 0,05$). Бактерии, входящие в класс *Clostridia*, представляют собой в бóльшей 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.

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 неатопической астмы, снижение 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* ($p < 0,05$), рода *Fusobacterium* ($p < 0,05$). Эти изменения наблюдались, как при atopическом варианте БА, так и в случае неатопического течения заболевания. Представители рода *Fusobacterium* признаны важнейшими продуцентами короткоцепочечных жирных кислот — бутирата и ацетата.

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.

6.2 Сравнение состава орофарингеальной микробиоты пациентов атопической и неатопической бронхиальной астмой

Изменений в составе орофарингеальной микробиоты пациентов с бронхиальной астмой, в зависимости от фенотипа заболевания, не было выявлено. Представленность типов, классов, семейств и родов у лиц страдающих атопической БА не отличалась от таковых, при неатопическом фенотипе заболевания (таблица 37) ($p > 0,05$).

6.3 Определение бактериального разнообразия орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой и лиц контрольной группы

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 бронхиальной астмой. 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 бронхиальной астме 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 ($p > 0,05$). Таблица 38 иллюстрирует индексы бактериального разнообразия в зависимости от фенотипа бронхиальной астмы.

Таблица 38. Индексы бактериального разнообразия у пациентов с разными фенотипами бронхиальной астмы и группы контроля

Исследуемая группа	Индексы бактериального разнообразия		
	Шеннона	Чao1	ACE
Контроль	3,40 [3,09; 3,70]	452,0 [261,01; 642,98]	406,38 [242,85; 569,90]
Атопическая астма	3,30 [2,80; 3,70]	491,07 [263,96; 718,18]	444,92 [257,52; 632,32]
Неатопическая астма	3,08 [2,70; 3,45]	406,08 [222,50; 589,65]	349,92 [174,16; 525,67]
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

6.4 Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рРНК бактерий в образцах мазка задней стенки глотки с клинико-лабораторными проявлениями атопической бронхиальной астмы

Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рРНК бактерий в образцах мазка задней стенки глотки, с клинико-лабораторными проявлениями заболевания, иллюстрирует таблица 39.

В ходе анализа полученных результатов выявлены, как положительные, так и отрицательные корреляции. Статистически значимая корреляция получена между представителями рода *Capnocytophaga* и ОФВ₁ (0,93); *Fusobacterium* и длительностью анамнеза и возрастом пациентов (-0,83); *Oribacterium* (-0,63) и уровнем эозинофилов крови. Изменение ОФВ₁ продемонстрировало прямую корреляцию со значением *Clostridia* (0,61), *Oribacterium* (0,61), *Peptostreptococcaceae* (0,62), *Porphyromonas* (0,73). Обратная корреляционная зависимость с анамнезом заболевания и возрастом пациентов выявлена для семейств *Porphyromonadaceae* (-0,81) и *Flavobacteriaceae* (-0,8), класса *Fusobacteriia* (-0,8). Уровень IgE коррелировал с представленностью рода *Tannerella* (-0,8), *Flavobacteriia* (-0,6) и *Fusobacterium* (-0,8). С уровнем

эозинофилов крови обратно взаимосвязаны значения *Peptostreptococcaceae* (-0,31), *Porphyromonadaceae* (-0,4), *Flavobacteriaceae* (-0,4), *Fusobacteriia* (-0,4), *Fusobacterium* (-0,6), а с уровнем эозинофилов мокроты - *Flavobacteriia* (-0,63).

Таблица 39. Корреляции выявленных изменений в составе орофарингеальной микробиоты с клинико-лабораторными проявлениями атопической бронхиальной астмы

Тип- класс-порядок- семейство-род	Клинико-лабораторные проявления астмы					
	Анамнез	Возраст	IgE	ОФВ ₁	Эозиноф. крови	Эозиноф. мокроты
r _s , Спирмена						
Класс Clostridia				0,61		
Род Oribacterium				0,61	-0,63*	
Семейство Peptostreptococcaceae				0,62	-0,31	
Семейство Porphyromonadaceae	-0,81	-0,8			-0,4	
Род Porphyromonas				0,73		
Род Tannerella			-0,8			
Кл. Flavobacteriia			-0,6			-0,63
Семейство Flavobacteriaceae	-0,8	-0,77			-0,4	
Род Capnocytophaga				0,93**		
Класс Fusobacteriia	-0,8	-0,8			-0,4	
Род Fusobacterium	-0,83**	-0,83**	-0,8		-0,6	

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

6.5 Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рНК бактерий в образцах мазка задней стенки глотки, с клинико-лабораторными проявлениями неатопической бронхиальной астмы

Корреляции изменений, выявленных при секвенировании 16S рНК бактерий в образцах мазка задней стенки глотки, с клинико-лабораторными проявлениями заболевания, отражены в таблице 40.

Таблица 40. Корреляции выявленных изменений в составе орофарингеальной микробиоты с клинико-лабораторными проявлениями неатопической бронхиальной астмы

Тип- класс-порядок- семейство-род	Клинико-лабораторные проявления астмы		
	Анамнез	Возраст	ОФВ ₁
r _s , Спирмена			
Класс Clostridia			0,59
Род Oribacterium			0,64
Сем. Peptostreptococcaceae			0,62
Сем. Porphyromonadaceae	-0,69	-0,65	
Род Porphyromonas			0,71
Сем. Flavobacteriaceae	-0,75	-0,68	
Род Capnocytophaga			0,8
Класс Fusobacteriia	-0,67	-0,64	
Род Fusobacterium	-0,53*	-0,53*	

** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

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

Таким образом, выявленные изменения состава орофарингеальной микробиоты и их корреляции с основными клинико-лабораторными проявлениями бронхиальной астмы служат подтверждением участия микробиоты в развитии заболевания.

Глава 7

Взаимосвязь кишечной и орофарингеальной микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой

Для определения взаимосвязи микробиоты обоих биотопов в исследуемых группах, было проведено:

1. Сравнение качественных и количественных характеристик кишечной и орофарингеальной микробиоты у пациентов с atopической и неатопической бронхиальной астмой и группы контроля.
2. Определение соотношения типов *Bacteroides/Firmicutes* кишечной и орофарингеальной микробиоты у пациентов с atopической и неатопической бронхиальной астмой и группы контроля.

7.1 Сравнение качественных и количественных характеристик кишечной и орофарингеальной микробиоты у пациентов с atopической и неатопической бронхиальной астмой и группой контроля

Анализ микробиоты кишечника у пациентов с atopической и неатопической БА 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 (Таблица 6).

Микробиота орофарингеальной зоны при atopической и неатопической 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 (Таблица 35).

Все выше перечисленные типы, семейства и рода бактерий так же обнаружены в составе метагеномных образцов кала и мазка задней стенки глотки группы здоровых добровольцев.

Спектр кишечной и орофарингеальной микробиоты в исследуемых группах на разных таксономических уровнях, на примере пациентов с atopической БА, представлен на диаграмме 21 и 22.

Диаграмма 21. Состав кишечной (А) и орофарингеальной (Б) микробиоты на уровне типа у пациентов с atopической бронхиальной астмой

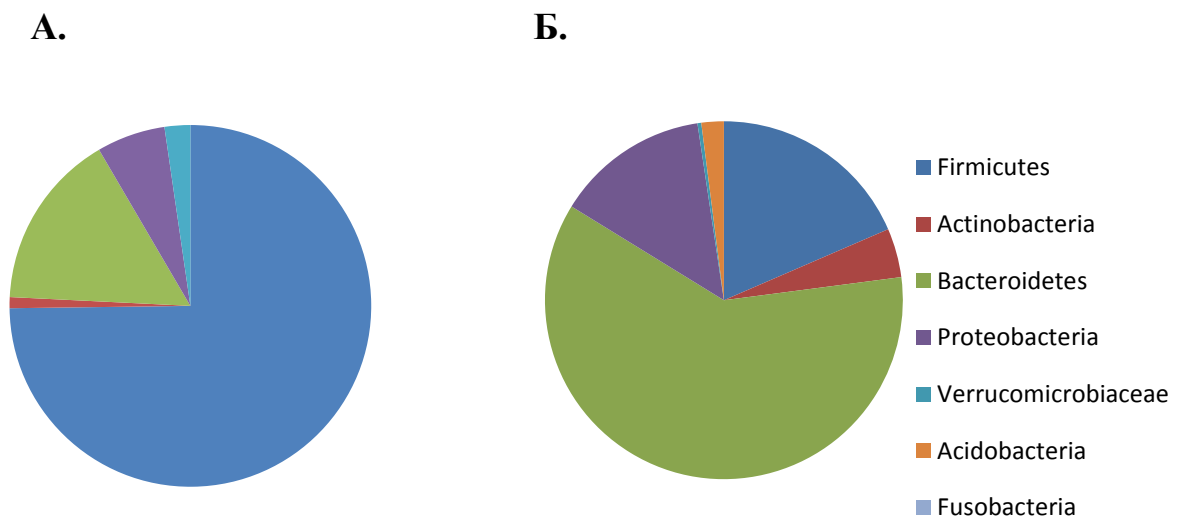
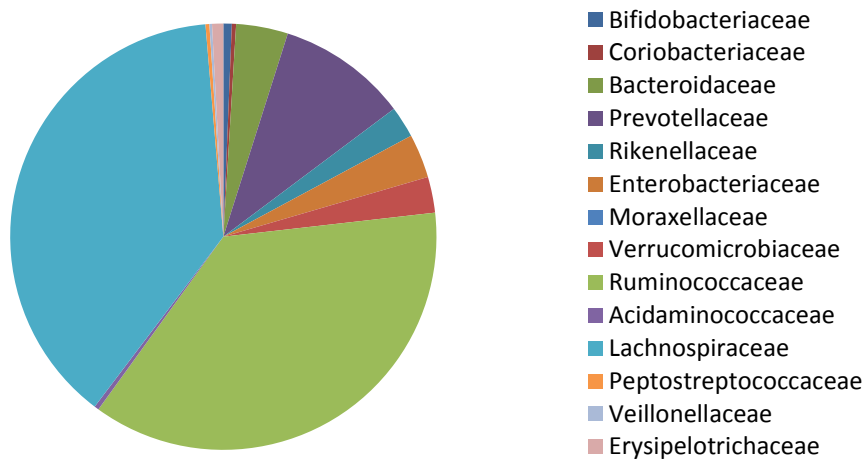
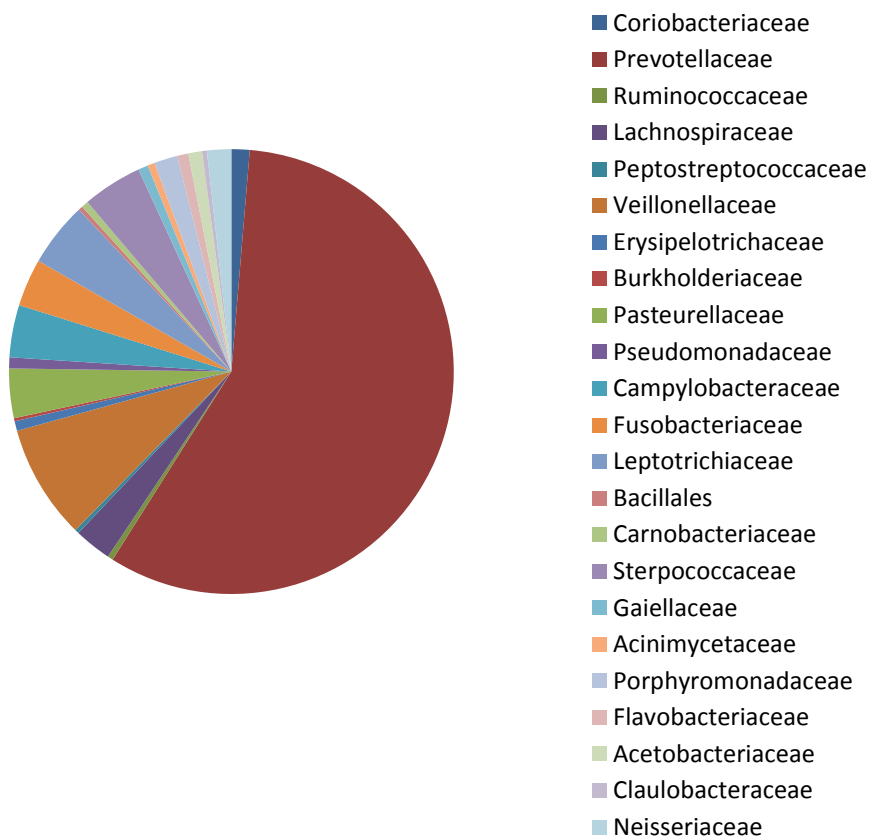


Диаграмма 22. Состав кишечной (А) и орофарингеальной (Б) микробиоты на уровне семейств у пациентов с atopической астмой

А.



Б.



Состав бактерий, населяющих орофарингеальную область, был более многообразен во всех исследуемых группах. Подтверждением этому служит расчет индексов бактериального разнообразия метагеномных образцов изучаемых биотопов, представленных соответственно в главе 3 и главе 6.

Индекс Шеннона микробиоты кала у пациентов с БА составил 1,23 [1,01; 1,36], а в группе контроля 1,27 [1,07; 1,43]; индексы Чao1 и ACE 32,58 [28,39; 36,77] и 27,65 [24,83; 30,46] соответственно при БА, а у здоровых лиц 22,32 [19,22; 25,43] и 20,22 [18,10; 22,74].

Значения аналогичных индексов при детальном анализе видового состава мазка задней стенки глотки, представлены большими величинами. Так, индекс Шеннона составил 3,40 [3,09; 3,70] в случае БА, а в группе контроля 3,18 [2,95; 3,41]; индексы Чao1 и ACE 443,85 [333,59; 554,11] и 392,14 [289,80; 494,48] при БА, а у здоровых лиц 452,0 [261,01; 642,98] и 406,38 [242,85; 569,90] соответственно.

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.

Таблица 41 иллюстрирует 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 неатопической астмой и группой контроля.

Таблица 41. Сравнительный анализ представленности семейств бактерий в образцах кала и орофарингеального мазка пациентов с атопической бронхиальной астмой

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
Acidaminococcaceae	-2,87	68,2	0,7	0,08	0,04	-0,53	-0,30
Neisseriaceae	7,31	0,0	1581,2	0,2	0,0001	0,98	0,56
Sutterellaceae	-1,10	11,6	0,1	0,01	0,005	-0,72	-0,43
Erysipelotrichaceae	-2,85	378,9	44,0	0,1	0,05	-0,50	-0,26
Desulfovibrionaceae	-0,89	9,4	0,4	0,01	0,005	-0,71	-0,45
Carnobacteriaceae	3,28	0,1	87,8	0,08	0,001	0,82	0,70
Porphyromonadaceae	3,27	126,5	1309,6	0,2	0,001	0,74	0,53
Verrucomicrobiaceae	-4,81	422,4	5,4	0,2	0,08	-0,45	-0,21
Clostridiaceae 1	-0,85	9,7	0,9	0,02	0,01	-0,61	-0,40
Methylobacteriaceae	0,41	0,0	3,3	0,02	0,0001	0,98	0,86
Micrococcaceae	5,19	0,3	365,6	0,3	0,002	0,80	0,43
Acetobacteraceae	3,35	0,0	92,1	0,09	0,0003	0,93	0,68
Enterobacteriaceae	-2,67	74,0	3,2	0,2	0,03	-0,55	-0,23
Gaiellaceae	2,89	0,0	64,7	0,09	0,0003	0,93	0,68
Mycoplasmataceae	1,53	0,0	18,9	0,06	0,0009	0,85	0,74
Burkholderiaceae	3,04	0,0	72,4	0,1	0,0005	0,89	0,64
Actinomycetaceae	3,11	0,5	80,7	0,1	0,002	0,80	0,63
Corynebacteriaceae	0,18	0,0	1,4	0,04	0,0003	0,93	0,78
Pseudomonadaceae	4,00	1,8	178,3	0,3	0,001	0,74	0,46
Methanobacteriaceae	-0,82	7,7	0,0	0,05	0,03	-0,57	-0,34
Cardiobacteriaceae	0,41	0,0	3,3	0,05	0,0009	0,85	0,76
Moraxellaceae	1,50	0,7	20,2	0,09	0,0003	0,79	0,68
Fimbriimonadaceae	1,00	0,0	9,9	0,1	0,0001	0,98	0,65

Xanthomonadaceae	2,46	1,3	52,5	0,2	0,004	0,74	0,57
Bradyrhizobiaceae	1,47	0,0	17,7	0,1	0,0003	0,93	0,62
Caulobacteraceae	2,23	0,1	37,3	0,2	0,0005	0,89	0,57
Hyphomicrobiaceae	0,63	0,1	5,7	0,1	0,006	0,71	0,66
Phyllobacteriaceae	0,31	0,1	2,5	0,09	0,04	0,52	0,69
Bdellovibrionaceae	0,98	0,0	9,8	0,1	0,0009	0,85	0,61
Chitinophagaceae	1,35	0,0	15,5	0,2	0,006	0,71	0,58
Comamonadaceae	1,40	0,1	16,5	0,2	0,001	0,83	0,54
Sphingomonadaceae	1,78	0,5	26,0	0,2	0,006	0,70	0,53
Nitrospiraceae	2,14	0,0	33,9	0,3	0,006	0,71	0,41
Spirochaetaceae	1,64	0,0	21,2	0,3	0,0009	0,85	0,47
Erythrobacteraceae	0,89	0,2	8,9	0,2	0,0005	0,89	0,57
Peptococcaceae 1	0,79	0,1	7,4	0,1	0,04	0,52	0,61
Staphylococcaceae	0,47	0,4	4,3	0,1	0,007	0,69	0,60
Rhodocyclaceae	0,70	0,2	6,5	0,2	0,01	0,63	0,58
Planctomycetaceae	1,41	0,0	16,6	0,3	0,02	0,60	0,44
Coxiellaceae	0,91	0,0	8,8	0,2	0,03	0,56	0,56
Micromonosporaceae	0,27	0,0	2,0	0,1	0,0009	0,85	0,62
Rhodobacteraceae	1,10	0,1	11,6	0,3	0,02	0,60	0,47
Sinobacteraceae	0,77	0,1	7,2	0,2	0,009	0,66	0,53
Acidimicrobiaceae	0,52	0,0	4,3	0,2	0,003	0,77	0,56
Sphaerobacteraceae	0,15	0,0	1,1	0,1	0,006	0,71	0,64
Enterococcaceae	0,68	0,4	6,6	0,3	0,006	0,70	0,46
Microbacteriaceae	0,78	0,0	7,3	0,3	0,02	0,60	0,43
Opitutaceae	0,76	0,0	6,9	0,3	0,03	0,56	0,45
Gemmatimonadaceae	0,67	0,1	6,0	0,3	0,02	0,60	0,45
Nocardoidaceae	0,60	0,0	5,2	0,2	0,03	0,56	0,51
Rhodobiaceae	0,40	0,0	3,2	0,2	0,03	0,56	0,50
Rhizobiaceae	0,12	0,0	0,9	0,1	0,006	0,71	0,60
Cryomorphaceae	0,26	0,0	2,0	0,2	0,03	0,56	0,54
Labilitrichaceae	0,26	0,0	2,0	0,3	0,006	0,71	0,46
Kofleriaceae	0,35	0,0	2,7	0,3	0,03	0,56	0,42
Nocardiaceae	0,30	0,0	2,3	0,3	0,03	0,56	0,43
Euzebyaceae	0,18	0,0	1,3	0,2	0,03	0,56	0,56
Beijerinckiaceae	0,21	0,0	1,6	0,2	0,03	0,56	0,54
Jiangellaceae	0,19	0,0	1,4	0,2	0,03	0,56	0,54
Saprospiraceae	0,23	0,0	1,7	0,3	0,03	0,56	0,46
Tepidisphaeraceae	0,20	0,0	1,5	0,3	0,03	0,56	0,41
Succinivibrionaceae	0,03	0,0	0,2	0,1	0,006	0,71	0,64
Cytophagaceae	0,18	0,0	1,4	0,3	0,03	0,56	0,46
Nannocystaceae	0,11	0,0	0,8	0,2	0,03	0,56	0,56
Iamiaceae	0,14	0,0	1,1	0,3	0,03	0,56	0,47
Polyangiaceae	0,12	0,0	0,9	0,2	0,03	0,56	0,52
Planococcaceae	0,04	0,0	0,3	0,1	0,006	0,71	0,60
Hydrogenimonaceae	0,07	0,0	0,5	0,2	0,03	0,56	0,57
Thermomonosporaceae	0,05	0,0	0,4	0,2	0,03	0,56	0,56
Phaselicytidaceae	0,04	0,0	0,3	0,2	0,03	0,56	0,49
Streptomycetaceae	0,02	0,0	0,1	0,2	0,03	0,56	0,56

Таким образом, несмотря на разнообразие бактериального состава орофарингеальной микробиоты, их количественное содержание заметно уступает микробиоте кишечника.

7.2 Определение соотношения типов *Bacteroides/Firmicutes* кишечной и орофарингеальной микробиоты у пациентов с atopической и неатопической бронхиальной астмой и группы контроля

Были проанализированы соотношение типов *Bacteroides/Firmicutes* обоих биотопов (таблица 42).

Таблица 42. Соотношение *Bacteroides/Firmicutes* у пациентов с atopической и неатопической бронхиальной астмой и группы контроля

Таксономическая группа бактерий	Группа контроля		Атопическая астма		Неатопическая астма	
	Кал	Мазок	Кал	Мазок	Кал	Мазок
<i>Bacteroides/Firmicutes</i>	0,16	2,30	0,21	3,28	0,13	3,04
<i>Bacteroides</i> , (%)	12,98 [3,98; 21,98]	39,29 [18,61; 59,96]	15,22 [4,40; 26,06]	51,12 [20,40; 72,82]	10,59 [2,41; 18,75]	52,90 [19,06; 86,73]
<i>Firmicutes</i> , (%)	78,76 [68,00; 89,50]	17,05 [3,60; 30,51]	72,07 [54,79; 89,34]	15,55 [7,33; 30,26]	75,69 [59,39; 91,98]	17,39 [0,97; 33,81]

У пациентов IgE-опосредованной БА по сравнению с группой здоровых добровольцев соотношение *Bacteroides/Firmicutes* среди бактерий населяющих кишечник имело тенденцию к увеличению (с 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 с atopической 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.

Клинические наблюдения

Больная М., 43 лет. Обратилась в клинику с жалобами на малопродуктивный кашель, свистящее дыхание, приступы экспираторного удушья, одышку при физической нагрузке.

Анамнез заболевания: считает себя больной в течение последних 10 лет (с 2007 года), когда впервые отметила появление приступообразного кашля, одышки, снижение толерантности к физическим нагрузкам. В 2009 году усилилась одышка при нагрузке, появились приступы экспираторного удушья. При помощи кожных проб диагностирована сенсibilизация к домашней пыли и антигенам пыльцы деревьев. В качестве базисной терапии принимала Сальметерол 50 мкг + Флутиказона пропионат 500 мкг по 1 вдоху 2 раза в день. Неоднократно проходила стационарное лечение. В 2017 году обратилась на консультацию в клинику пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии имени В.Х. Василенко.

Объективные данные при поступлении: состояние относительно удовлетворительное. Правильного телосложения. Кожные покровы и видимые слизистые обычной окраски, чистые, умеренной влажности. ИМТ 22 кг/м². Периферические лимфатические узлы не пальпируются. Над легкими перкуторно – коробочный звук, при аускультации жесткое дыхание, сухие свистящие хрипы по всем легочным полям. ЧДД 24 в минуту. Сердечные тоны приглушены, ритмичные. АД 110 и 70 мм. рт. ст., ЧСС = PS = 78 уд. в мин. Язык влажный. Живот мягкий, безболезненный. Печень у края реберной дуги по правой среднеключичной линии. Селезенка не пальпируется. Симптомов раздражения брюшины нет. Симптом поколачивания по поясничной области отрицательный с обеих сторон.

В клинике проведено обследование, включающее в себя общий и б/х анализ крови, определение иммуноглобулинов класса А, М, G, Е, С-реактивного белка (СРБ), общий анализ мокроты, общий анализ мочи, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, электрокардиография, водородный

дыхательный тест с лактулозой. По данным проведенного обследования у пациентки выявлена неконтролируемая атопическая бронхиальная астма (клинически и результаты АСТ теста – 12 баллов) тяжелого течения (ОФВ₁– 65%, положительный тест с бронходилататором), уровень иммуноглобулина Е повышен до 550 МЕ/мл, эозинофилы крови составили - 4,2%, эозинофилы мокроты 9 в пол.зр. Остальные лабораторные показатели в пределах нормы. Водородный дыхательный тест с лактулозой подтвердил наличие СИБР. При тщательном расспросе симптомов СИБР выявить не удалось, в связи с чем, сделан вывод о бессимптомном его течении **больная М., 43 лет**. Пациентке было проведено секвенирование образцов кала 16sRNA бактерий.

Результаты секвенирования образцов кала **пациентки М., 43 лет**, позволили выявить следующие изменения: достоверно большим, по сравнению с группой здоровых добровольцев оказалось содержание *Proteobacteria* за счет классов *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* класса *Bacilli* (относящегося к типу *Firmicutes*); достоверно ниже по сравнению с группой контроля количество *Faecalibacterium* и *Anaerostipes* (тип *Firmicutes*). По сравнению с лицами с атопической астмой без СИБР у **пациентки М., 43 лет** выявлено значимое снижение относительного количества бактерий, относящихся: к классам *Negativicutes*, *Erysipelotrichia*, *Bacteroidia*; к семействам *Erysipelotrichaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Bacillaceae*, увеличению *Porphyromonadaceae*; было снижено количество таксонов, относящихся к родам *Barnesiella*, *Paraprevotella*, *Pyrolobus*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Coprobacter*, *Bacillus*.

Учитывая наличие СИБР, к основной терапии, направленной на лечение бронхиальной астмы, было добавлено лечение СИБР рифаксиминем в дозе 600 мг в сутки, с последующим приемом пробиотического препарата Флорасана Д, по 1 капсуле 3 раза в день на протяжении 1 месяца. При контрольном клинικο-лабораторном обследовании отмечено улучшение общего самочувствия и состояния больной, улучшение функции внешнего дыхания (ОФВ₁ - 85%),

снижение уровня иммуноглобулина Е до 250 МЕ/мл, эозинофилов крови (1%) и мокроты (отсутствуют). При заполнении АСТ теста набрано 24 балла, что свидетельствует о полном контроле заболевания. В течение последующего года наблюдения за **пациенткой М., 43 лет** – обострений бронхиальной астмы, требующих госпитализации не было.

Больная К., 47 лет. Обратилась в клинику с жалобами на приступы экспираторного удушья, малопродуктивный кашель, свистящее дыхание, слабость и одышку при физической нагрузке.

Анамнез заболевания: первые симптомы заболевания появились в возрасте 40 лет (в 2010 году): пациентка отметила появление приступообразного малопродуктивного кашля и снижение толерантности к физическим нагрузкам. Неоднократно проходила стационарное лечение по месту жительства. В качестве базисной терапии принимала Будесонид 160 мкг + Формотерол 4,5мкг по 1 вдоху 2 раза в день. В 2017 году обратилась на консультацию в клинику пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии имени В.Х. Василенко.

Объективные данные при поступлении: состояние относительно удовлетворительное. Правильного телосложения. Кожные покровы и видимые слизистые обычной окраски, чистые, умеренной влажности. ИМТ-22,7 кг/м². Периферические лимфатические узлы не пальпируются. Над легкими перкуторно – коробочный звук, при аускультации жесткое дыхание, сухие свистящие хрипы по всем легочным полям. ЧДД 26 в минуту. Сердечные тоны приглушены, ритмичные. АД 125 и 75 мм. рт. ст., ЧСС = PS = 86 уд. в мин. Язык влажный. Живот мягкий, безболезненный. Печень у края реберной дуги по правой среднеключичной линии. Селезенка не пальпируется. Симптом раздражения брюшины нет. Симптом поколачивания по поясничной области отрицательный с обеих сторон.

В клинике проведено обследование, включающее в себя общий и б/х анализ крови, определение иммуноглобулинов класса А, М, G, Е, С-реактивного белка (СРБ), общий анализ мокроты, общий анализ мочи, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, электрокардиография, водородный дыхательный тест с лактулозой. По данным проведенного обследования у пациентки выявлена неконтролируемая неатопическая бронхиальная астма (клинически и результаты АСТ теста – 13 баллов) тяжелого течения (ОФВ₁– 67%, положительный тест с бронходилататором), уровень иммуноглобулина Е составил 79МЕ/мл, эозинофилы крови - 1%, эозинофилы мокроты - 1 в пол.зр. Остальные лабораторные показатели так же в пределах нормы. Водородный дыхательный тест с лактулозой подтвердил наличие СИБР. При тщательном расспросе симптомов СИБР выявить не удалось, в связи с чем, сделан вывод о бессимптомном его течении у **больной К., 47 лет**. Пациентке было проведено секвенирование образцов кала 16sRNA бактерий.

Результаты секвенирования образцов кала **пациентки К., 47 лет**, позволили выявить следующие изменения: достоверно большим, по сравнению с группой здоровых добровольцев оказалось содержание *Proteobacteria* за счет *Gamma**proteobacteria* и класса *Bacilli* (относящегося к типу *Firmicutes*); достоверно ниже по сравнению с группой контроля количество *Faecalibacterium* и *Anaerostipes* (тип *Firmicutes*) и *Alistipes* (тип *Bacteroidetes*). По сравнению с лицами с неатопической астмой без СИБР, выявлено повышение относительного количества бактерий, относящихся к семейству *Bacteroidaceae*; к родам *Paraprevotella*, *Odoribacter*, *Bacteroides*, *Butyricicoccus*, *Parasutterella*.

Учитывая наличие СИБР, к основной терапии, направленной на лечение бронхиальной астмы, было добавлено лечение СИБР рифаксимином в дозе 600 мг в сутки. При контрольном клинико-лабораторном обследовании отмечено улучшение общего самочувствия и состояния больной, улучшение функции внешнего дыхания (ОФВ₁ - 88%). В течение последующего года наблюдения за

пациенткой – было отмечено развитие двух обострений заболевания, требующих госпитализации.

Приведенные клинические наблюдения не противоречат нашему предположению о том, что изменение микробиоты служит важным патогенетическим звеном в развитии бронхиальной астмы.

Глава 8

Обсуждение результатов

В литературе приводятся данные о роли микробиоты в развитии atopических заболеваний, в том числе бронхиальной астмы. Однако, исследований, в которых бы изучалась корреляция основных клинико-лабораторных проявлений бронхиальной астмы с изменением микробиоты у взрослых (кишечного и орофарингеального биотопа), а также анализ метаболической активности микробиоты, в настоящее время недостаточно. В публикациях преимущественно приводятся данные об изменениях бактериального состава микробиоты кишечника, в то время, как об орофарингеальной флоре известно, крайне мало. Немногочисленные исследования продемонстрировали корреляционную зависимость бактериального спектра кишечника и изменений функции внешнего дыхания, а так же уровня IgE, однако, эти результаты нуждаются в уточнении.

Как показали результаты проведенного нами исследования, есть все основания утверждать, что изменение состава микробиоты человека может быть одним из звеньев патогенеза бронхиальной астмы.

Для оценки состояния микробиоты у пациентов с бронхиальной астмой проводилось молекулярно-генетическое исследование кишечной микрофлоры в образцах кала (секвенирование 16S рРНК бактерий), а так же анализ водородного дыхательного теста с лактулозой для верификации избыточного бактериального роста в тонкой кишке. Анализируя результаты, полученные в ходе исследования, следует отметить, что кишечный биотоп у больных с бронхиальной астмой характеризуется биоразнообразным таксономическим составом, однако, имеет ряд качественных и количественных изменений. Выявлены достоверные различия между содержанием *Proteobacteria* у пациентов бронхиальной астмой (при atopическом и неatopическом фенотипе 5,91 [0,0; 11,91], 9,90 [0,0; 24,99] соответственно) и у здоровых лиц (0,54 [0,06; 1,03]) ($p < 0,01$). При atopической астме увеличение *Proteobacteria* наблюдалось за счет классов *Betaproteobacteria* и

Gammaproteobacteria. При неатопическом фенотипе заболевания только преимущественно за счет *Gammaproteobacteria*. Рост числа *Proteobacteria* у пациентов с бронхиальной астмой в целом согласуется с результатами, представленными в литературе [34, 137, 189, 195, 200]. По мнению ряда авторов, увеличение численности *Proteobacteria* ассоциировано с самим заболеванием и не зависит от проводимой медикаментозной терапии, т.е. не связано, как предполагалось изначально, с эффектом часто назначаемых кортикостероидов [35, 86, 123, 176]. *Proteobacteria* относят к грамотрицательным микроорганизмам, имеющим в структуре своей бактериальной стенке липополисахаридный комплекс [57]. Липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий могут инициировать воспалительный каскад реакций через Толл-подобные рецепторы, в результате чего повышается стимуляция генов ряда цитокинов (фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-6), синтазы оксида азота, ядерного фактора транскрипции NF- κ B (NF- κ B) [43, 57, 58, 107]. Эти медиаторы воспаления в свою очередь активируют реакции Th-2 опосредованного иммунного ответа. По данным литературы известно, что *Proteobacteria* участвуют в индукции воспаления слизистой оболочки кишки, способствуя повышению ее проницаемости [189]. Опубликованные в отечественной и зарубежной литературе исследования свидетельствуют, что у лиц, страдающих atopическими реакциями, повышена проницаемость слизистых оболочек кишечника и респираторного тракта [5, 6]. Известно так же, что ряд аллергенов обладает способностью усугублять и без того измененную проницаемость слизистых оболочек [6]. Так, аллерген клеща домашней пыли, микроскопические частицы пылевых зерен и грибов обладают способностью влиять на белки плотных межклеточных контактов, в частности окклюдин и зонулин, что способствует нарушению функции эпителиального барьера и усилению синтеза провоспалительных цитокинов [5, 6]. Таким образом, выявленное повышение численности *Proteobacteria* служит значимым фактором развития иммунологической интолерантности у пациентов с бронхиальной астмой.

В нашем исследовании выявлены существенные различия внутри бактериальных типов *Firmicutes* (снижение *Faecalibacterium* и *Anaerostipes*, $p < 0,05$) и *Bacteroidetes* (*Alistipes*, $p < 0,05$). У пациентов с БА снижена доля таксонов, продуцирующих основные КЦЖК, а именно бутират (*Anaerostipes*, *Faecalibacterium*) и ацетат (*Alistipes*). Представители этих родов бактерий, по мнению некоторых исследователей, представляют “филометаболическое ядро микробиоты кишечника” [257]. Бутират и ацетат или соответственно, масляная и уксусная короткоцепочечные жирные кислоты, участвуют в большом количестве метаболических и обменных процессов в организме человека. В том числе служат энергосубстратом для эпителиальных клеток, регулируют клеточное обновление и дифференцировку эпителиоцитов, участвуют в активации местного и системного иммунного ответа, а так же поддерживают ионный обмен и моторику кишечника, оказывают антибактериальный эффект [1-3]. В литературе приводятся результаты исследований, свидетельствующие в пользу того, что уменьшение производства КЦЖК способствует поляризации иммунного ответа в сторону Т-хелперов 2 типа и формированию провоспалительных иммунных реакций, в то время как нормальное их содержание, защищает от аллергического воспаления [114, 162, 207].

Таким образом, выявленные изменения в бактериальном спектре микробиоты кишечника у пациентов с бронхиальной астмой свидетельствуют в пользу уменьшения доли строгих анаэробов-симбионтов и увеличения доли условно-патогенных факультативных анаэробов в ее составе.

В нашем исследовании у пациентов БА определены разнонаправленные корреляции между изменениями, выявленными при секвенировании 16S рРНК бактерий в образцах кала с клинико-лабораторными проявлениями заболевания. В случае атопической астмы корреляционная зависимость прослеживалась с длительностью анамнеза, уровнями IgE, эозинофилов крови и мокроты, а так же результатами ОФВ₁. У пациентов с неатопическим фенотипом заболевания корреляционная тенденция выявлялась соответственно со значением ОФВ₁ и

длительностью анамнеза. Вне зависимости от фенотипа БА, определены корреляционные связи отдельных бактериальных представителей между собой. Так доля таксонов, продуцирующих основные КЦЖК, в большинстве случаев отрицательно коррелировала с численностью *Proteobacteria*, что еще раз подчеркивает диагностическую значимость этих микроорганизмов и их потенциальную роль в патогенезе БА.

В литературе приводятся результаты исследований, свидетельствующие о связи низкого видового разнообразия микробиоты кишечника с развитием бронхиальной астмы в детской популяции [45, 56, 63, 78, 183]. Сведений о бактериальном разнообразии кишечного биотопа у взрослых, страдающих БА, на сегодняшний день не достаточно. Мы предполагали, у пациентов с БА возможное снижение биоразнообразия кишечного биотопа вследствие частой терапии глюкокортикостероидами. Однако, наша гипотеза в ходе исследования не подтвердилась. Индекс Шеннона, характеризующий разнообразие и выравненность бактериального сообщества, не отличался у пациентов БА и группы здоровых добровольцев ($p > 0,05$). Однако, видовое разнообразие представленных образцов, оцененное по индексам Чao1 и ACE, продемонстрировало значимое различие между группой контроля и пациентов с астмой ($p < 0,001$), что логично связано с увеличением представленности *Proteobacteria* в группе лиц, страдающих БА.

Нами впервые проанализирован состав метабеномных образцов кала в зависимости от наличия у пациентов синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке. Выявлен ряд различий на уровне класса-порядка-семейства-рода в зависимости от СИБР статуса. Неожиданным результатом было то, что наличие СИБР при IgE-ассоциированной астме ассоциировано со снижением относительного количества бактерий классов *Negativicutes*, *Erysipelotrichia*, *Bacteroidia*, семейств *Erysipelotrichaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhodospirillaceae*, *Bacillaceae*, родов *Barnesiella*, *Paraprevotella*, *Pyrolobus*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Coprobacter*, *Bacillus*. Вместе с тем, при неатопической астме СИБР

наоборот сопровождался повышением относительного количества бактерий семейства *Bacteroidaceae* и родов *Paraprevotella*, *Odoribacter*, *Bacteroides*, *Butyricicoccus*, *Parasutterella*. Возможно, что объяснение этому кроется как раз в разных фенотипах заболевания. В изученной нами литературе, данных на этот счет не представлено. Вероятнее всего, СИБР служит фактором, отражающим более выраженные нарушения кишечного микробиоценоза у пациентов с бронхиальной астмой, и усугубляет течение заболевания. Анализируя факт присутствия СИБР на всех этапах нашего исследования, получены веские доказательства его значимости в формировании преимущественно IgE – опосредованных иммунных реакций.

Согласно результатам выполненного исследования, нарушения микробиоты в виде синдрома избыточного бактериального роста достоверно чаще выявляется при atopической БА (67% vs 43%; $p < 0,05$). Клинические проявления СИБР у больных с астмой не специфичны и не связаны с фенотипом заболевания. Выявленные особенности быстрого повышения градиента водорода в выдыхаемом воздухе при проведении водородного дыхательного теста ($p < 0,01$) у пациентов с IgE-обусловленной БА с одной стороны, могут подтверждать предполагаемый факт контаминации тонкой кишки различной микробной флорой при разных фенотипах заболевания. В пользу этого свидетельствуют результаты секвенирования образцов кала, отражающие различный спектр микробиоты толстой кишки с учетом СИБР статуса больных. С другой стороны, нельзя исключить и большую в этом случае степень бактериального обсеменения тонкой кишки. Следует также принимать во внимание возможное влияние на моторику кишечника биогенных аминов, в частности гистамина, метаболизм которого изменяется при нарушении состава кишечной микробиоты и в значительной степени связан с формированием atopического фенотипа БА [22, 25, 180, 225].

Важным фактором, усиливающим нарушения микробиоты у пациентов с БА, служит изменение вентиляционно-перфузионного отношения в легких, логичным образом, развивающимся в ходе прогрессирования заболевания. Это

приводит к снижению выведения газов (CO_2 и H_2) из организма, что в свою очередь может способствовать изменению окислительно-восстановительного потенциал внутрипросветной среды [1-3, 57, 214]. На наш взгляд эти изменения в меньшей степени повлияли на результат водородного дыхательного теста, поскольку у других пациентов с atopической астмой (в отсутствии СИБР) динамика показателей водорода отличалась.

Как показали результаты проведенного нами исследования в случае наличия у пациентов СИБР наблюдается более высокий IgE-опосредованный иммунный ответ, проявляющийся статистически значимым преобладанием титров IgE ($p < 0,01$) и уровня эозинофилов мокроты ($p < 0,001$), а так же более выраженными изменениями ОФВ_1 ($p < 0,01$). При неатопической бронхиальной астме присутствие СИБР также ассоциировано с более значимыми изменениями вентиляционной функции легких ($p < 0,05$).

Вероятно, что механизмы лежащие в основе патологического влияния СИБР на течение БА, связаны с изменением проницаемости кишечной стенки, с формированием так называемой “протекающей кишки” (“leaky gut”), что в дальнейшем посредством бактериальной транслокации и активации иммунокомпетентных клеток опосредует развитие сенсибилизации организма и определяет стойкость IgE-ассоциированной аллергии [8, 16, 20, 27].

Терапия, направленная на коррекцию СИБР одновременно со стандартным лечением бронхиальной астмы привела к улучшению иммунного ответа у пациентов. Было достигнуто статистически значимое снижение IgE ($p < 0,05$). При сравнении двух схем, назначаемых для лечения СИБР (рифаксимин или рифаксимин + Флорасан Д), выявлено, что пролонгированная терапия с пробиотиком Флорасан Д способствовала большему снижению IgE ($p < 0,01$) в сравнении с группой пациентов, принимающих только антибактериальный препарат. Значения IgE до лечения, в названных подгруппах, были сопоставимы ($p = 0,13$). В подгруппах пациентов без СИБР, которые по условиям исследования

получали только базисную терапию бронхиальной астмы, уровень IgE в ходе наблюдения не изменился ($p > 0,05$).

Улучшение функции внешнего дыхания у всех пациентов, безусловно, демонстрирует результативность стационарного лечения. Однако, больший прирост показателей отмечен после терапии, направленной на коррекцию СИБР как в группе IgE-обусловленной астмы ($p < 0,001$), так и при неатопическом фенотипе ($p < 0,001$).

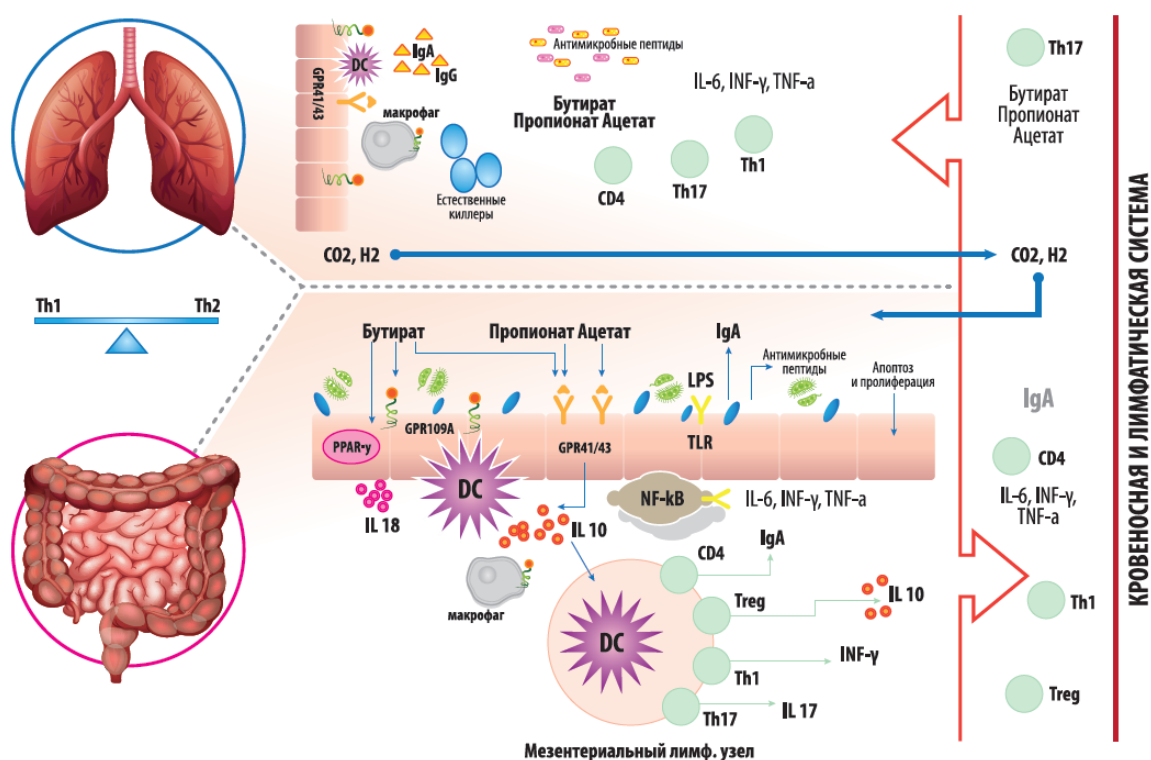
Наблюдение за пациентами в течение последующего года позволило выявить снижение частоты госпитализаций до 1-2 раз в год, по сравнению с 2-3 раза в год до лечения СИБР. Значительно реже в течение года госпитализировались пациенты атопической астмой, принимающие пролонгированную терапию с пробиотиком Флорасан ($p < 0,001$) и имеющие менее продолжительный анамнез заболевания (до 10 лет). Части пациентам с атопической БА (37%) после пролонгированной терапии и пробиотиком госпитализация в течение года не потребовалась вовсе. При неатопической БА после лечения СИБР лишь 14% пациентам (с длительностью анамнеза 2-3 года), после терапии рифаксимин + пробиотик Флорасан Д госпитализация не потребовалась. У пациентов без СИБР, на фоне базисной терапии БА, частота госпитализаций сохранилась на исходном уровне. В течение года, два и более раз госпитализированы 100% пациентов атопической астмой и 50% пациентов из группы неатопической БА.

Таким образом, в проведенном нами исследовании показано, что коррекция микробиоты кишечника способствовала более эффективной ремиссии БА. Большой эффект наблюдался при добавлении к терапии мультиштаммового пробиотического препарата и у пациентов со сравнительно коротким анамнезом заболевания (до 10 лет).

В процессе своей жизнедеятельности комменсальные бактерии вырабатывают ряд важнейших сигнальных кворум-молекул,

взаимодействующих с клетками иммунной системы [81, 158, 160]. Одними из основных метаболитов микробиоты признаны КЦЖК. Посредством взаимодействия с иммунокомпетентными клетками КЦЖК поддерживают иммунологическое равновесие, препятствуют развитию аллергического воспаления [62, 81, 114, 158, 160] (Рисунок 7).

Рисунок 7. Модель регулирующего влияния короткоцепочечных жирных кислот на иммунологический ответ респираторного тракта



Бутират, пропионат и ацетат связываются с G-белковыми рецепторами GPR_{43} и GPR_{41} . Бутират взаимодействует также с GPR_{109A} и рецепторами, активирующими пролиферацию пероксисом (PPAR-γ). Все КЦЖК влияют на функцию ядерного фактора транскрипции (NFκB), дендритных клеток (DC), тем самым модулируют активность Treg лимфоцитов и различных регуляторных цитокинов (IL-10, TGF-α, INF-γ, IL-6). Системная циркуляция с током крови и

лимфой обеспечивает доступ в легкие регуляторным цитокинам и КЦЖК, где они участвуют в иммунных и противовоспалительных реакциях, обеспечивая тем самым связь оси “кишка-легкие”.

Состояние метаболической активности микробиоты изучено нами при помощи метода газожидкостного хроматографического анализа в образцах кала. По результатам исследования были выявлены достоверные различия между группой здоровых добровольцев и пациентов с БА. Установлено значительное уменьшение общего содержания КЦЖК ($p < 0,001$), снижение абсолютных концентраций отдельных кислот (ацетата, пропионата, бутирата) ($p < 0,001$), а также суммарного содержания изокислот ($p < 0,001$) при наличии БА. Из литературных источников известно, что снижение концентраций КЦЖК, в первую очередь, свидетельствует в пользу уменьшения количества и метаболической активности симбиотных бактерий, а именно молочнокислой флоры, представленной лактобактериями и бифидобактериями [1-3]. Изменение концентраций изокислот (изомеров КЦЖК), образующихся в результате метаболизма белков, служит отражением нарушения метаболической активности протеолитической микрофлоры (например, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecali* и др.) [46, 113]. Снижение количества изокислот может быть связано с изменением продукции и секреции гликопротеидов, нарушением образования муцина [81, 238].

Между группами пациентов с разными фенотипами БА отсутствовали достоверные различия по уровням КЦЖК, изокислот, отношения изокислоты/кислоты ($p > 0,05$). Достоверные различия получены лишь в отношении анаэробного индекса, который в случае неатопической БА был смещен в сторону более отрицательных значений ($p < 0,01$). Анаэробный индекс отражает значения окислительно-восстановительного потенциала внутрипросветной среды, который призван определять функциональную активность, рост и размножение бактерий [1-3]. В этом случае изменение значений редокс-потенциала усиливает дисбаланс в качественном и

количественном составе микробиоты кишечника. Что, в свою очередь, приводит к активации условно патогенных анаэробов. Возможно, что изменения редокс-потенциала ввиду нарушения вентиляционно-перфузионного отношения в легких может представлять собой иницирующий фактор в развитии нарушений микробиоты у пациентов с БА. В таком случае, взаимоотношения между состоянием микробиоты и основными патофизиологическими механизмами при БА представляют собой “*circulus vitiosus*” (порочный круг).

Продукция коммессальными бактериями КЦЖК определяется рядом факторов, но в первую очередь зависит от состава микробиоты кишечника [3, 59, 130, 207]. Известно, что синтез каждой из кислот осуществляется благодаря ферментативной активности определенных бактериальных видов, это позволяет судить о качественном и количественном составе микроорганизмов кишечного биотопа. Вне зависимости от индивидуальных различий микробиоты, профиль КЦЖК представляет собой относительно устойчивый параметр и содержание ацетата, пропионата, бутирата должно соответствовать пропорции 60:20:18 на всем протяжении толстой кишки [1-3, 207, 215].

Результаты проведенного исследования выявили у пациентов с БА, измененный спектр КЦЖК с числом углеродных атомов C_2 - C_4 . В большинстве случаев (84%) наблюдалось снижение содержания ацетата при увеличении в профиле кислот относительной доли бутирата и разнонаправленных изменений пропионата. Так же было выявлено смещение анаэробного индекса в сторону отрицательных значений ($p < 0,01$). Такое соотношение КЦЖК и анаэробного индекса в целом служит характеристикой увеличения роста и метаболизма анаэробных бактерий на фоне снижения активности облигатной флоры. Умеренное, незначительное повышение относительного количества изокилот и отношения изокилоты/кислоты у этих пациентов подтверждает активацию анаэробной флоры, обладающей слабой способностью к протеолизу белков [3].

В меньшем проценте случаев (16%) выявлен аэробный метаболический профиль КЦЖК. Основные его характеристики заключаются в увеличении

содержания ацетата при снижении относительной доли бутирата и пропионата. Анаэробный индекс в этом случае имел тенденцию к слабо отрицательным значениям (значимых различий с группой контроля не получено), свидетельствуя об активации аэробных бактерий так же на фоне снижения активности облигатной флоры. В случае аэробного бактериального метаболизма была выявлена и активация бактериальной флоры, обладающей протеолитической активностью [57], что выражалось в значимом увеличении относительного содержания изокислот C_4-C_6 ($p < 0,001$) и отношения изокислоты/кислоты ($p < 0,001$), свидетельствуя об изменении приэпителиального слоя слизистой оболочки. Известно, что эпителиальная слизь представляет собой метаболический субстрат для протеолитической микрофлоры [81, 244]. Таким образом, вышеуказанные изменения содержания изокислот и отношения изокислоты/кислоты свидетельствуют о повышенной протеолитической активности аэробных и анаэробных популяций факультативных и остаточных микроорганизмов [46, 172].

При проведении нашего исследования выявлены достоверные отрицательные корреляции, подтверждающие взаимосвязь изменений метаболической активности микробиоты с основным патофизиологическими механизмами IgE-опосредованной БА - уровнем IgE, значением эозинофилов крови ($p < 0,01$). Выявлены отрицательные корреляции с уровнем ОФВ₁. В случае неатопического течения астмы, несмотря на отсутствие статистической значимости, отмечались корреляционные зависимости с возрастом пациентов, значением ОФВ₁.

Таким образом, выявленные изменения КЦЖК подтверждают наличие выраженных качественных и количественных изменений кишечного компартмента, а так же свидетельствуют в пользу взаимосвязи этих изменений с клиническими проявлениями заболевания.

В нашем исследовании мы проследили в динамике изменение метаболической активности микробиоты у пациентов atopической БА в ходе

лечения у них СИБР. Несмотря на то, что контрольное обследование через 1 месяц после лечения СИБР не позволило выявить увеличения КЦЖК в кале, было отмечено, что пролонгированная терапия с пробиотическим препаратом оказала значимое положительное влияние на состояние кишечника. Добавление пробиотика Лактобаланс, после курса антибиотикотерапии, способствовало снижению относительного количества изокислот и отношения изокислоты/кислоты по сравнению с группой, принимающей для лечения СИБР только рифаксимин. Полученные нами данные согласуются с результатами исследований по изучению действия пробиотиков на слизистую оболочку кишки [9, 11, 114, 119], согласно которым, снижение численности изокислот служит признаком восстановления презпителиального и эпителиального слоя кишечника, нормализации протеолитической активности микробиоты кишечника [3, 81, 244].

В отсутствии СИБР, когда пациентам не требовался прием антибактериального препарата, эффект пробиотика в отношении восстановления метаболической активности микробиоты был наиболее показателен. На фоне приема пробиотического препарата Лактобаланс в составе комплексной терапии БА, через 1 месяц выявлено достоверное увеличение общего содержания КЦЖК с числом углеродных атомов C_2-C_4 ($p < 0,001$), отдельных кислот - ацетата и бутирата ($p < 0,001$). Наряду с этим, было отмечено снижение количества изокислот ($p < 0,001$) и отношения изокислоты/кислоты ($p < 0,001$).

Следует отметить, что во всех исследуемых подгруппах после лечения, направленного на коррекцию состава кишечной микрофлоры (только рифаксимин, рифаксимин+пробиотик Лактобаланс или только пробиотик), спектр КЦЖК был неотличим от группы контроля. Это свидетельствует в пользу деконтаминации кишечника от условно-патогенной, патогенной флоры, активность которой изначально изменила соотношение КЦЖК.

С целью изучения состава микробиоты респираторного тракта у пациентов с бронхиальной астмой нами было предпринято изучение бактериального спектра орофарингеальной области. Использованы результаты молекулярно-

генетического типирования (секвенирование 16S рРНК бактерий) образцов мазка задней стенки глотки.

Анализируя результаты, полученные в ходе исследования, следует отметить, что биотоп орофарингеальной зоны у больных бронхиальной астмой, так же, как и кишечная микробиота, характеризуется биоразнообразным таксономическим составом. Нами установлено снижение отдельных бактериальных классов, семейств и родов в пределах типов *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Fusobacteria*. 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*, у пациентов с БА выявлено снижение представленности класса *Fusobacteriia* ($p < 0,05$), рода *Fusobacterium* ($p < 0,05$). Детальный анализ таксономической принадлежности бактерий орофарингеальной микробиоты при разных фенотипах БА не позволил выявить каких-либо различий. Изменения микробных популяций у пациентов были однонаправленные ($p > 0,05$).

В нашем исследовании, у пациентов БА определены разнонаправленные корреляционные связи изменений, выявленных при секвенировании 16S рРНК бактерий в образцах мазка задней стенки глотки, с клинико-лабораторными проявлениями заболевания. В случае атопической астмы корреляционная зависимость прослеживалась с уровнями IgE, эозинофилов крови и мокроты, результатами ОФВ₁, а так же с длительностью анамнеза и возрастом пациентов. У пациентов с неатопическим фенотипом заболевания, корреляционная зависимость определена со значением ОФВ₁, длительностью анамнеза и возрастом пациентов.

Таким образом, в нашем исследовании показано снижение доли таксонов, продуцирующих ключевые микробные метаболиты, необходимые для полноценной функциональной активности микробиоты. Снижена доля бактерий, продуцирующих КЦЖК, преимущественно за счет уменьшения бутиратобразующих бактерий. Снижены группы бактерий, продуцирующие

бактерицидные метаболиты (например, флавоцин) и метаболиты, обладающие антибиотической активностью (например, H_2O_2).

В интерпретации результатов, нами, безусловно, принималось во внимание использование пациентами ингаляционных кортикостероидов, влияние которых на состав микробиоты, колонизирующей слизистую оболочку орофарингеальной области, очевидно [26, 34]. В качестве неблагоприятного эффекта терапии кортикостероидами в литературе рассматривается снижение таксономического разнообразия респираторного тракта [35], чего не наблюдалось в нашем исследовании.

Таким образом, выявленные изменения ряда бактериальных таксонов и их корреляции с патофизиологическими проявлениями заболевания позволяют высказать предположение об их потенциальной роли в формировании гиперреактивности дыхательных путей.

Имеющиеся в литературе данные о составе орофарингеальной зоны, в большинстве своем, выполнены на основании микробиологического исследования и их сравнение с нашими результатами, полученными в результате молекулярно-генетического типирования, представляется не корректным. Результаты незначительного числа работ, выполненных с использованием секвенирования 16S рРНК, демонстрируют неоднозначные результаты [63]. В некоторых случаях показано формирование преобладающей бактериальной группы орофарингеального биотопа, со значительным патогенным потенциалом (в первую очередь увеличение численности *Proteobacteria*) [26]. Имеются доказательства снижения содержания в орофарингеальном биотопе ряда микроорганизмов, в том числе *Prevotella nigrescens*, *Haemophilus influenzae*, *Alloiococcus*, *Mycoplasma* и др. [34, 35].

В проведенном исследовании мы не выявили преобладающего патогенного или условно-патогенного вида бактерий, однако определили статистически значимое снижение ряда бактерий (сем. *Peptostreptococcaceae* ($p < 0,05$), сем. *Lachnospiraceae* ($p < 0,05$), класса *Fusobacteriia* ($p < 0,05$)), служащих продуцентами основных КЦЖК (ацетата, пробионата, бутирата), что в свою

очередь служит отражением изменения метаболической активности орофарингеального биотопа. Снижение численности *Haemophilus* ($p < 0,05$), отмеченное в литературе, было продемонстрировано и в нашем исследовании. Изменения биоразнообразия микробиоты орофарингеальной зоны у пациентов с БА, принимающих стандартную терапию с ингаляционными кортикостероидами, не выявлено.

Сравнение качественных и количественных характеристик орофарингеальной и кишечной микробиоты подтвердило видовую специфику, каждого из изучаемых биотопов [57, 142]. Микробиота орофарингеальной зоны в нашем исследовании характеризуется бóльшим разнообразием представленных метагеномов и одновременно меньшим их количественным содержанием в сравнении с составом бактерий, колонизирующие кишечник, что соответствует опубликованным в литературе данным [142, 143].

В литературе обсуждается изменение соотношения между численностью *Firmicutes* и *Bacteroides*. Ряд авторов считает, что это может быть прогностическим признаком развития некоторых заболеваний и в первую очередь, речь идет о метаболическом синдроме, ожирении и инсулинорезистентности. Наряду с этим, существует неоднозначное мнение о том, что соотношение между *Bacteroidetes* и *Firmicutes* может быть маркером развития БА и аллергии [124, 179]. В нашем исследовании соотношение *Bacteroides/Firmicutes* менялось различно при разных фенотипах заболевания. У пациентов с IgE-ассоциированным проявлением астмы, соотношение *Bacteroides/Firmicutes* имело тенденцию к увеличению в обоих биотопах. В то время, как при неатопической астме БА, выявлена тенденция к снижению в кишечной микробиоте и увеличению среди микроорганизмов орофарингеальной области. Возможно, что это можно объяснить с позиции разных (клинических особенностей) фенотипических проявлений заболевания, уровнем системного воспалительного ответа, синтезом регуляторных цитокинов.

Состав микробиоты служит определяющим фактором, поддерживающим колонизационную резистентность и адекватный иммунный ответ

соответствующего биотопа [92, 103, 116]. Наряду с этим, существующие убедительные данные, в рамках концепции общего иммунного ответа слизистых оболочек, позволяют рассматривать микробиоту в целом, как основу (единство) иммунного гомеостаза организма человека [43, 88, 92, 116, 131, 143]. Таким образом, изменения количественного состава микробиоты или же ее метаболической активности, опосредуя повышение проницаемости эпителия, могут вносить существенное значение в развитие БА или же определять вероятность возникновения аллергии.

Назначаемые в нашем исследовании в составе комплексной терапии БА препараты, влияющие на состав микрофлоры, продемонстрировали свою выраженную активность и оказали благоприятное влияние на снижение IgE – опосредованного иммунного ответа и улучшение метаболической активности микробиоты. Выбор антибактериального препарата рифаксимины был обусловлен наличием у пациентов СИБР в тонкой кишке и назначался только при его верификации для селективной деконтаминации.

Применение пробиотиков Флорасан Д и Лактобаланс, с целью коррекции состава микрофлоры и ее метаболической активности, было оправдано с позиции их плеiotропного влияния. Оба пробиотических препарата мультиштаммовые пробиотики, в состав которых входят штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Назначение мультиштаммовых препаратов предпочтительней, с точки зрения потенцирующего действия, входящих в него представителей [82, 114, 129]. Пробиотические бактерии реализуют свой эффект на разных уровнях. В том числе, способствуют восстановлению колонизационной резистентности, конкуренции с патогенными микроорганизмами за питательные вещества, взаимодействию с определенными рецепторами, синтезу веществ, обладающих бактерицидной активностью, снижению уровня рН в просвете кишки, нормализации проницаемости и регенерации слизистой оболочки, продукции микробных метаболитов и, безусловно, взаимодействию с иммунными клетками, восстановлению иммунологической толерантности [114, 119, 145].

Таким образом, результаты диссертационного исследования согласуются с современными представлениями о роль микробиоты в патогенезе бронхиальной астмы, а так же играющим важную роль в определении течения заболевания и реакции на лечение. Выявленные корреляционные связи клинико-лабораторных проявлений заболевания (атопической и неатопической астмы) с результатами (современного высокотехнологичного) молекулярно-генетического анализа орофарингеального и кишечного бактериальных сообществ, с оценкой метаболической активности бактерий, определяемой при помощи газожидкостной хроматографии и их динамика в ходе лечения, служат тому подтверждением. Трансформация микробиоты, вероятно, является не только следствием прогрессирования заболевания, но и важным фактором, активно вовлеченным в его патогенез, в том числе, определяющим выраженность и характер воспаления, а так же фенотипические особенности бронхиальной астмы. Измененный бактериальный рост способствует развитию контаминации условно-патогенными и патогенными микроорганизмами, что само по себе усугубляет тяжесть клинических проявлений бронхиальной астмы и выраженности иммунологического ответа, способствуя увеличению частоты обострений заболевания (и связанных с ними эпизодов госпитализаций).

Дальнейшие научные исследования целесообразно направить на изучение у больных БА патогенетического значения определенных микроорганизмов и продуктов их метаболической активности, исследование наиболее эффективных пробиотических штаммов бактерий, с возможностью в последующем разработать новые прогностические маркеры БА, улучшить определение клинических фенотипов, повысить эффективность лечения.

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 atopической и неатопической астмой по сравнению со здоровыми добровольцами преобладали бактерии типа *Proteobacteria* ($p < 0,01$). При atopической астме увеличение *Proteobacteria* наблюдалось за счет *Betaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria*, при неатопическом фенотипе заболевания - преимущественно за счет класса *Gammaaproteobacteria*. 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 бронхиальной астмой 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 бронхиальной астмой 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 нетопическом фенотипе, в случае наличия СИБР, отмечалось повышение представленности семейства *Bacteroidaceae* и родов *Paraprevotella*, *Odoribacter*, *Bacteroides*, *Butyricicoccus*, *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 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 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 нетопическом фенотипе бронхиальной

астмы прослеживается взаимосвязь с возрастом пациентов ($r_s = 0,40$) и снижением ОФВ₁ ($r_s = -0,77$).

7. Анализ результатов секвенирования 16S рРНК 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 БА были однонаправленные ($p > 0,05$).

8. Микробиота кишечного и орофарингеального биотопа пациентов бронхиальной астмы 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 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 atopической бронхиальной астмой 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 иммуноглобулина Е ($p < 0,01$), 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 *Bifidobacterium bifidum* Ac2773D, *Bifidobacterium longum* Ac2775D, *Bifidobacterium infantis* Ac2774D, *Lactobacillus 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 бронхиальной астмой мультиштаммового пробиотика, содержащего *Lactobacillus gassery* KS-13, *Lactobacillus gasser* LAC-343, *Lactobacillus rhamnosus* LCS-742, *Bifidobacterium bifidum* G9-1, *Bifidobacterium longum* MM-2, *Bifidobacterium longum* BB536 Strain M, *Bifidobacterium infantis* M-63, *Bifidobacterium breve* M16V *mut* T, *Bifidobacterium lactis* B1-04 приводит к увеличению количества короткоцепочечных жирных кислот, нормализации их спектра, нормализации анаэробного индекса и отношения изокислоты 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 пробиотического препарата, содержащего *Bifidobacterium bifidum* Ac2773D, *Bifidobacterium longum* Ac2775D, *Bifidobacterium infantis* Ac2774D, *Lactobacillus rhamnosus* B3170D или же препарата, содержащего *Lactobacillus gassery* KS-13, *Lactobacillus gasser* LAC-343, *Lactobacillus ramnosus* LCS-742, *Bifidobacterium bifidum* G9-1, *Bifidobacterium longum* MM-2, *Bifidobacterium longum* BB536 Strain M, *Bifidobacterium infantis* M-63, *Bifidobacterium breve* M16V *mun* T, *Bifidobacterium 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 *Bifidobacterium bifidum* Ac2773D, *Bifidobacterium longum* Ac2775D, *Bifidobacterium infantis* Ac2774D, *Lactobacillus rhamnosus* B3170D или же

препарата содержащего *Lactobacillus gassery* KS-13, *Lactobacillus gasser* LAC-343, *Lactobacillus ramnosus* LCS-742, *Bifidobacterium bifidum* G9-1, *Bifidobacterium longum* MM-2, *Bifidobacterium longum* BB536 Strain M, *Bifidobacterium infantis* M-63, *Bifidobacterium breve* M16V *mun T*, *Bifidobacterium 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 сокращений

АА - атопическая астма

АСТ - тест - тест по контролю над астмой (Asthma Control Test)

БА - бронхиальная астма

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМТ - индекс массы тела

КОЕ – колониеобразующая единица

КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты

ЛПС - липополисахариды

НА - неатопическая астма

ОФВ₁ - объем форсированного выдоха за 1 секунду

РНК - рибонуклеиновая кислота

СИБР - синдром избыточного бактериального роста

TNF- α – туморнекротизирующий фактор- α

ФВД - функция внешнего дыхания

DAO – диаминооксидаза

GINA (Global Initiative for Asthma) - всемирная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы

GPR (FFAR) - G- протеин связывающие рецепторы

IgA – иммуноглобулин А

IgE - иммуноглобулин E

IgG - иммуноглобулин G

NOD (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) - рецепторы нуклеотидной олигомеризации

RIG (Retinoic acid-inducible gene) - рецепторы индуцируемые ретиноевой кислотой

TLR (Toll-like receptor) - Толл-подобные рецепторы

H₂ – водород

ppm (parts permillion) - единица измерения каких-либо (миллионная доля)

CH₄ - метан

CO₂ - двуокиси углерода

Список литературы

1. Ардатская М. Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук. 14.00.05 / Ардатская М.Д. – М., 2003 год.
2. Ардатская М. Д., Бельмер С. В., Добрица В. П., Захаренко С. М., Лазебник Л. Б., Минушкин О. Н., Орешко Л. С., Ситкин С. И., Ткаченко Е. И., Суворов А. Н., Хавкин А. И., Шендеров Б. А. Дисбиоз (Дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – Т.117, № 5. – С. 13 – 50.
3. Ардатская М. Д., Минушкин О. Н. Диагностика состояния микрофлоры кишечника и дифференцированная коррекция ее нарушений: Методическое пособие для врачей, руководителей органов управления здравоохранением и лечебно-профилактических учреждений. - М., 2005. - 48 с.
4. Бабак С.Л, Горбунова М.В., Малявин А.Г. Бронхообструктивный синдром в современной практике врача-терапевта. // Терапия. - 2017. - № 1. – С. 47 - 53.
5. Гущин И. С. Аллергенная проницаемость барьерных тканей – стратегическая проблема аллергологии. // Пульмонология. - 2006. - № 3. – С. 5 – 13.
6. Гущин И. С. IgE-опосредованная гиперчувствительность как ответ на нарушение барьерной функции тканей. // Иммунология. – 2015. – Т. 36, № 1. – С. 45 – 52.
7. Евсютина Ю. В., Ивашкин В. Т. Роль микробиома в развитии заболеваний поджелудочной железы. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2017. - № 3. – С. 11 – 17.

8. Жаркова М. С. Бактериальная транслокация в патогенезе инфекционных осложнений у больных циррозом печени: дисс... на канд. мед.наук: 14.01.28 / Жаркова М.С. – М., 2012 год.
9. 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.
10. Зольникова О.Ю., Поцхверашвили Н.Д., Трухманов А.С., Кокина Н.И., Ивашкин В.Т. Результаты применения пробиотиков в комплексной терапии бронхиальной астмой. // Российский Аллергологический Журнал. – 2019. - № 1. - С. 68 – 70.
11. 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.
12. Ивашкин В.Т., Зольникова О.Ю., Поцхверашвили Н. Д., Кокина Н.И., Буеверова Е.Л., Седова А.В., Трухманов А.С. Перспективы применения пробиотиков при острых инфекциях респираторного тракта. // Пульмонология. – 2019. - № 5. - С. 612 – 619.
13. Ильина Н.И., Ненашева Н.М., Авдеев С.Н., Айсанов В.В.,Архипов В.В., Визель А.А., Емельянов А.В., Княжеская Н.П., Курбачева О.М., Лещенко И.В., Осипова Г.Л., Стырт Е.А., Титова О.Н., Фассахов Р.С., Федосенко С.В. Алгоритм биофенотипирования и выбор таргетной терапии тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмы с эозинофильным типом воспаления дыхательных путей. // Российский аллергологический журнал. - 2017. – Т. 14, № 3. – С. 5 - 18.
14. Каштанова Д.А., Егшатын Л.В., Ткачева О.Н. Участие микробиоты кишечника человека в процессах хронического системного воспаления. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2015. - № 4. – С. 310 - 317.
15. Клиническая иммунология и аллергология. // Дранник Г. Н. - 2010. – С. 25 - 35.

16. Курбатова А.А. Патогенетическое и клиническое значение системы цитокинов и клаудинов у больных с синдромом раздражённого кишечника: дисс... на канд. мед.наук: 14.01.28 / Курбатова А.А. – М., 2013 год.
17. Курбачева О.М., Амантурлиева М.Е. Роль барьерной функции слизистых оболочек при аллергических заболеваниях и при сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии. // Бюллетень сибирской медицины. - 2017. – Т. 16, № 2. – С. 32 – 46.
18. Маев И.В., Кучерявый Ю.А., Андреев Д.Н., Ивашкина Н.Ю. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке: клиническое значение, критерии диагностики и терапевтическая тактика. // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. - 2016. - № 3. – С.118 - 125.
19. Малиновская В.В., Коровина Н.А., Захарова И.Н. Коррекция нарушений местного иммунитета при дисбиозе кишечника у детей. // Русский медицинский журнал. – 2006. – № 1. – С. 57 - 61.
20. Масленников Р.В. Бактериальная транслокация как причина системной воспалительной реакции при циррозе печени: дисс... на канд. мед.наук: 14.01.28 / Масленников Р.В. – М., 2018 год.
21. Минушкин О.Н., Логинов В.А. Синдром избыточного бактериального роста у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью, длительно принимающих ингибиторы протонной помпы. // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2014. – № 2. – С. 30 – 33.
22. Минушкин О.Н., Масловский П.В., Аникина Н.Ю. Нарушения моторики желудочно-кишечного тракта в практике терапевта и некоторые лечебные подходы. // Медицинский совет. - 2016. - № 14. - С. 36 - 41.
23. Ненашева Н.М., Себекина О.В., Терехова Е.П., Бодня О.С. Как помочь пациенту с тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмой? // Практическая пульмонология. - 2018. - № 2. - С.16 - 23.
24. Ненашева Н.М. Т2-бронхиальная астма: характеристика эндотипа и биомаркеры. // Пульмонология. – 2019. – Т. 29, № 2. – С. 216 – 228.

25. Носырева С.Ю., Литяева Л.А. Роль кишечной микробиоты в формировании пула свободного гистамина у детей с атопическим дерматитом. // Детские инфекции. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 46 – 50.
26. Огородова Л.М., Федосенко С.В., Попенко А.С., Петров В.А., Тяхт А.В., Салтыкова И.В., Деев И.А., Куликов Е.С., Кириллова Н.А., Говорун В.М., Кострюкова Е.С. Сравнительный анализ орофарингеальной микробиоты у больных хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой различной степени тяжести. // Вестник РАМН. - 2015. – Т. 70, № 6. – С. 669 – 678.
27. Полуэктова Е. А. Синдром раздраженного кишечника: патофизиологические, клинические и социальные аспекты проблемы. : дисс. ... на доктора мед. наук: 14.00.05 / Полуэктова Е. А - М., 2018 год.
28. Полуэктова Е.А., Кучумова С.Ю., Шептулин А.А., Ивашкин В.Т. Лечение синдрома раздраженного кишечника с позиций современных представлений о патогенезе заболевания // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2013. – Т. 23, № 1. – С. 57 – 65.
29. Поцхверашвили Н.Д., Зольникова О.Ю., 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.
30. Поцхверашвили Н.Д., Зольникова О.Ю., Трухманов А.С., Кокина Н.И., Джахия Н.Л., Седова А.В., Буеверова Е.Л. Синдром избыточного бактериального роста у больных бронхиальной астмой. // Российский Журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2018. - № 4. – С. 54 - 59.
31. Российское респираторное общество - Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению бронхиальной астмы 2017.
32. Ситкин С.И., Ткаченко Е.И., Вахитов Т.Я. Филометаболическое ядро микробиоты кишечника. // Альманах клинической медицины. – 2015. - № 40. – С. 12 – 34.
33. Топчий С.Н., Ардатская М.Д., Башанкаев Н.А., Липницкий Е.М., Минушкин О.Н. Короткоцепочечные жирные кислоты в слизистой оболочке толстой кишки и кишечном содержимом у больных раком толстой кишки:

- патогенетические и диагностические аспекты. // Российский Журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2005. - № 3. - С. 75 - 81.
34. Федосенко С.В., Огородова Л.М., Карнаушкина М.А., Куликов Е.С. Состав сообщества микроорганизмов в дыхательных путях у здоровых лиц и больных бронхиальной астмой. // Вестник РАМН. – 2014. – Т. 3, № 4. - С. 71 – 76.
35. Федосенко С.В., Карнаушкина М.А., Огородова Л.М., Петров В.А., Деев И.А., Куликов Е.С., Сазонов А.Э. Влияние курсового назначения системных глюкокортикостероидов при обострении бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких на состав респираторной микробиоты в стабильный период. // Бюллетень сибирской медицины. - 2016. – Т. 15, № 5. – С. 159 – 165.
36. Фадеева М.В. Микробиота кишечника в патогенезе хронической сердечной недостаточности. // Российский Журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2020. - № 2. – С. 54 - 59.
37. Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р., Архипов В.В., Белевский А.С., Ненашева Н.М. Согласованные рекомендации по применению антихолинэргического препарата длительного действия тиотропия в терапии бронхиальной астмы. // Пульмонология. – 2015. – Т. 25, № 2. - С. 43 - 50.
38. Юренев Г.Л., Самсонов А.А., Юренева-Тхоржевская Т.В., Маев И.В. Бронхообструктивный синдром у больных с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью: внепищеводное проявление заболевания или бронхиальная астма? // Consilium medicum. - 2014. - Т. 16, № 8. - С. 33 – 38.
39. Aagaard K., Ma J., Antony K.M., Ganu R., Petrosino J., Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. // Sci. Transl. Med. – 2014. - Vol. 6 - P. 237.
40. Aagaard K., Riehle K., Ma J., Segata N., Mistretta T.A., Coarfa C. Metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. // PLoS ONE. - 2012. – Vol. 7. – P. 36 - 46.
41. Adami A.J., Bracken S.J. Breathing better through bugs: asthma and the microbiome. // Yale J. Biol. Med. – 2016. – Vol. 89, N 3. - P. 309 – 324.

42. Akatsu H., Arakawa H., Yamamoto T. Lactobacilli in jelly enhances the effect of influenza vaccination. // J. Am. Geriatr. Soc. – 2013. - Vol. 61, N 10. - P. 1828 – 1830.
43. Allaire J., Crowley Sh., Law H., Chang S-Y., Ko H., Vallance B. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. // Trends in Immunology. - 2018. - <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
44. Ang Zh., Ding J.L. GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation – Protective or Causative? // Front Immunol. - 2016. - Vol. 7. - P. 28.
45. Anand S., Mande S.S. Diet, Microbiota and Gut-Lung Connection. // Front. Microbiol. – 2018. - № 9. - P. 2147.
46. Arrieta M. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. // Sci. Transl. Med. – 2015. - № 7. – P. 307 - 312.
47. Arumugam M. Enterotypes of the human gut microbiome. // Nature. – 2011. – Vol. 473, № 7346. – P. 174 – 180.
48. Avadhanula V., Rodriguez C.A., Devincenzo J.P. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner. // J. Virol. – 2006. – N 6. – P. 1629 – 1636.
49. Avershina E., Storrø O., Øien T., Johnsen R., Pope P., Rudi K. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. // FEMS Microbiol. Ecol. – 2014. – Vol. 87. - P. 280 – 290.
50. Azad M.B., Coneys J.G., Kozryskyj A.L. Probiotic supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. // BMJ. – 2013. - № 347. – P. f6471.
51. Backhed F., Roswall J., Peng Y., Feng Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P. et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. // Cell Host Microbe. - 2015. - Vol. 17. – P 5.
52. Barcik W., Pugin B., Westermann P., Perez N.R., Ferstl R., Wawrzyniak M. Histamine-secreting microbes are increased in the gut of adult asthma patients. // J. Allergy Clin. Immunol. - 2016. - Vol. 138. - P. 1491 - 1494.

53. Barcik W., Wawrzyniak M., Akdis C., O'Mahony L. Immune regulation by histamine and histamine-secreting bacteria. // *Current Opinion in Immunology*. -2017. - Vol. 48. - P. 108 - 113.
54. Bassis Ch.M., Erb-Downward J.R., Dickson R.P. Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiota in Healthy Individuals. // *mBio*. – 2015. - Vol. 6 (2). – P. e00037-15.
55. Begley L., Madapoosi S., Opron K. Gut microbiota relationships to lung function and adult asthma phenotype: a pilot study. // *BMJ Open Resp. Res.* – 2018. - № 5. – P. e000324.
56. Benjamin T. Prince et al. Gut Microbiome and the Development of Food Allergy and Allergic Disease. // *Pediatr Clin North Am.* – 2015. - Vol. 62 (6). – P. 1479 - 1492.
57. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (Whitman W.B.) ISBN: 9781118960608, DOI: 10.1002/9781118960608
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608>
58. Bernasconi E., Pattaroni C., Koutsokera A. Airway microbiota determines innate cell inflammatory or tissue remodeling profiles in lung transplantation. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2016. - Vol. 194. – P. 1252 – 1263.
59. Bingula R., Filaire M., Robin N., Bey M. Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. // *Journal of Oncology*. – 2017. - № 1. - P. 1 - 15.
60. Bisgaard H., Hermansen M.N., Buchvald F., Loland L., Halkjaer L.B., Bønnelykke K., Brasholt M., Heltberg A., Vissing N.H., Thorsen S.V. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. // *N. Engl. J. Med.* 2007. - Vol. 357. – P. 1487 – 1495.
61. Bisgaard H., Hermansen M.N., Bønnelykke K., Stokholm J., Baty F., Skytt N.L., Aniscenko J., Keadze T., Johnston S.L. Association of bacteria and viruses with wheezy episodes in young children: prospective birth cohort study. // *BMJ*. - 2010. - Vol. 341. – P. c4978.
62. Bosch A., Biesbroek G., Trzcinski K. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. // *PLoS Pathog.* – 2013. - № 9. – P. e1003057.

63. Boutin S., Depner M., Stahl M., Graeber S., Legatzki A., Mutius E., Mall M., Dalpke A. Comparison of Oropharyngeal Microbiota from Children with Asthma and Cystic Fibrosis. // *Mediators of Inflammation*. – 2017. - P. 5047403.
64. Burke D.G., Harrison M, Rea M. The altered gut microbiota in adults with cystic fibrosis. // *BMC Microbiology*. – 2017. - Vol. 17. – P. 102 – 107.
65. Brown A.J. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. // *J Biol Chem*. - 2003. - Vol. 278, №13. - P. 11312-11319.
66. Brown R. L., Clarke T. B. The regulation of host defences to infection by the microbiota. // *Immunology*. – 2017. – Vol. 150. – P.1 – 6.
67. Cani P. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. // *Gut*. – 2018. - № 0. – P. 1 – 10.
68. Cabana M., McKean M., Caughey A., Fong L., Lynch S., Wong A., Leong R., Boushey H., Hilton J. Early Probiotic Supplementation for Eczema and Asthma Prevention: A Randomized Controlled Trial. // *Pediatrics*. - 2017. - Vol. 140. – P. 3.
69. Charlson E.S., Diamond J.M., Bittinger K., Fitzgerald A.S., Yadav A., Haas A.R. Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. - 2012. - Vol. 186. - P. 536 - 545.
70. Charlson E.S., Bittinger K., Haas A.R. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2011. - Vol. 184 (8). – P. 957 – 963.
71. Charlson E.S., Bittinger K., Chen J. Assessing bacterial populations in the lung by replicate analysis of samples from the upper and lower respiratory tracts. // *PloS one*. – 2012. - Vol. 7 (9). – P. e42786.
72. Chauvistré H., Küstermann C., Rehage N., Klisch T., Mitzka S., Felker P. Dendritic cell development requires histone deacetylase activity. // *Eur. J. Immunol*. – 2014. - Vol. 44. – P. 2478 – 2488.
73. Chishimba L., Fraczek M.G., Niven R.M., Bowyer P., Denning D.W. Regulatory T-Cells/Th17 immune responses and microbiome population in severe asthma, severe

asthma with fungal sensitization (SAFS) and ABPA. // Am. Thorac. Soc. -2015. - Vol. 191. - P. A5177.

74. Chishimba L., Niven R., Fraczek M., Bowyer P., Smyth L., Simpson A. Lung microbiome is associated with asthma severity in fungal associated asthma. // Eur. Respir. J. - 2015. - Vol. 46. - P. OA1462.

75. Christensen H. R., Pestka J. Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. // J. Immunol. – 2002. - Vol. 168. – P. 171 – 178.

76. Chung K. Airway microbial dysbiosis in asthmatic patients: A target for prevention and treatment? // J. Allergy Clin Immunol. – 2018. - Vol. 139 (2). – P. 1071 – 1081.

77. Claesson M.J., Jeffery I.B., Conde S., Power S.E., O'Connor E.M., Cusack S. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. // Nature. - 2012. - Vol. 488 (7410). – P. 178 – 184.

78. Clemente J.C., Ursell L.K., Parfrey L.W., Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. // Cell. – 2012. – Vol. 148, N. 6. - P. 1258 – 1270.

79. Choi Y., Park H., Park H.-S., Kim Y.-K. Extracellular Vesicles, a Key Mediator to Link Environmental Microbiota to Airway Immunity. // Allergy, Asthma, Immunol Res. – 2017. - Vol. 9 (2). – P.101 – 106.

80. Coopersmith C. M., Stromberg P. E., Davis C. G., Dunne W. M., Amiot D. M., Karl I. E. Sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia decreases intestinal proliferation and induces gut epithelial cell cycle arrest. // Crit. Care Med. – 2003. - Vol. 31. – P. 1630 – 1637.

81. Cummings J.A. Short chain fatty acids in the human colon. // Gut. – 1981. – Vol. 22 (9). – P. 763 – 779.

82. Cuello-Garcia C.A., Broek J.L., Fiocchi A. Probiotics for the prevention of allergy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. // J. Allergy Clin. Immunol. – 2015. – Vol. 136, N 4. – P. 952 - 961.

83. Davidson L.E., Fiorino A.M., Snyderman D.R., Hibberd P.L. Lactobacillus GG as an immune adjuvant for live-attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomized double-blind placebo-controlled trial. // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2011. - Vol. 65 (4). – P. 501 – 507.
84. Daillère R., Vétizou M., Waldschmitt N., Yamazaki T., Isnard C., Poirier-Colame V. *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects. // *Immunity*. 2016. - Vol. 45. – P. 931 – 943.
85. Del Giudice M.M., Leonardi S., Maiello N., Brunese F.P. Food allergy and probiotics in childhood. // *J Clin. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 44. – P. 5.
86. Denner D.R., Sangwan N., Becker J.B., Hogarth D.K., Oldham J., Castillo J. Corticosteroid therapy and airflow obstruction influence the bronchial microbiome, which is distinct from that of bronchoalveolar lavage in asthmatic airways. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2016. - Vol. 137. - P. 1398 - 1405.
87. Dibaise J.K., Young R.J., Vanderhoof J.A. Enteric microbial flora, bacterial overgrowth, and short-bowel syndrome. // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2006.–Vol. 4. – P. 11 - 20.
88. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Huffnagle G.B. The role of the bacterial microbiome in lung disease. // *Expert Rev. Respir Med.* – 2013. - № 7. – P. 245 –257.
89. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Freeman C.M., Walker N., Scales B.S., Beck J.M. Changes in the lung microbiome following lung transplantation include the emergence of two distinct *Pseudomonas* species with distinct clinical associations. // *PLoS ONE*. – 2014. - № 9. - P. e97214.
90. Dickson R.P., Huffnagle G.B. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. // *PLoS Pathog.* – 2015. - Vol. 11. – P. e1004923.
91. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Freeman C.M. Bacterial topography of the healthy human lower respiratory tract. // *mBio*. – 2017. - № 8. – P. e02287-16.
92. Ding T., Schloss P.D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. // *Nature*. – 2014. - Vol. 509 (7500). – P. 357 – 360.

93. Di Cerbo A., Palmieri B., Aponte M., et al. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. // *J. Clin. Pathol.* – 2016. - Vol. 69 (3). - P. 187 – 203.
94. Di Stefano M., Certo M., Colecchia A., Sorges M., Perri F. H₂- breath tests: methodological audits in adults and children. // *Aliment Pharmacol Ther.* - 2009. -Vol. 29 - P. 8 - 13.
95. Dukowicz C. Lacy Brian E. Gary M. Small Intestinal Bacterial Overgrowth: A Comprehensive Review. // *Levine Gastroenterol Hepatol.* - 2007. – Vol. 3 (2). – P. 112 – 122.
96. Durack J., Boushey H., Lynch S. Airway Microbiota and the Implications of Dysbiosis in Asthma. // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2016. - Vol.16. - P. 52 – 65.
97. Durack J., Lynch S., Nariya S., Bhakta N., Beigelman A., Castro M. Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2017. - Vol. 140. - P. 63 - 75.
98. Earl C.S., Keong T.W., Murdoch S., McCarthy Y., Garmendia J. *Haemophilus influenzae* responds to glucocorticoids used in asthma therapy by modulation of biofilm formation and antibiotic resistance. // *EMBO Mol. Med.* - 2015. - Vol. 7 (8). - P. 1018 - 1033.
99. Earl C.S., An S.Q., Ryan R.P. The changing face of asthma and its relation with microbes. // *Trends Microbiol.* - 2015. – Vol. 23. – P. 408 – 418.
100. Ege M.J., Mayer M., Normand A.C., Genuneit J., Cookson W.O., Braun-Fahrlander C. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. // *N. Engl. J. Med.* – 2011. - Vol. 364. – P. 701 - 709.
101. Elazab N., Mendy A., Gasana J., Vieira E., Quizon A., Forno E. Probiotic Administration in Early Life, Atopy, and Asthma: A Meta-analysis of Clinical Trials. // *Pediatrics.* – 2013. - Vol 132, № 3. – P. e666-76.
102. Essilfie A.T., Simpson J.L., Dunkley M.L., Morgan L.C., Oliver B.G., Gibson P.G. Combined *Haemophilus influenzae* respiratory infection and allergic airways disease drives chronic infection and features of neutrophilic asthma. // *Thorax.* - 2012. - Vol. 67 (7). - P. 588 - 599.

103. Erb-Downward J.R., Thompson D.L., Han M.K., Freeman C.M., McCloskey L., Erturk-Hasdemir D., Kasper D.L. Resident commensals shaping immunity. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2013. - Vol. 25. - P. 450 - 455.
104. Evsyutina Y., Komkova I., Zolnikova O., Tkachenko P., Ivashkin V. Lung microbiome in healthy and diseased individuals. // *World J. Respir.* – 2017. - № 7 (2). – P. 39 - 47.
105. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity and cancer. // *Physiol Rev.* - 2011. - Vol. 91. - P.151 - 175.
106. Ferstl R., Frei R., Barcik W., Schiavi E., Wanke K., Ziegler M. Histamine receptor 2 modifies iNKT cell activity within the inflamed lung. // *Allergy.* - 2017. - Vol. 72. - P. 925 - 935.
107. Ferreira C., Vieira A., Vinolo M., Oliveira F. Review Article The Central Role of the Gut Microbiota in Chronic Inflammatory Diseases. // *J Immunol Res.* - 2014. –Vol. 689492. – P. 10 - 22.
108. Fiocchi A., Pawankar R., Cuello-Garcia C., Ahn K., Al-Hammadi S., Agarwal A. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for allergic disease prevention (GLAD-P): probiotics. // *World Allergy Organ J.* - 2015. –Vol. 8 (1). - P. 4 - 10.
109. Følsgaard N.V., Schjørring S., Chawes B.L., Rasmussen M.A., Krogfelt K.A., Brix S., Bisgaard H. Pathogenic bacteria colonizing the airways in asymptomatic neonates stimulates topical inflammatory mediator release. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2013. - Vol. 187. – P. 589 – 595.
110. Forsythe P., Inman M.D., Bienenstock J. Oral treatment with live *Lactobacillus reuteri* inhibits the allergic airway response in mice. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2007. - Vol. 175 (6). – P. 561 – 569.
111. Frati F., Salvatori C., Incorvaia C., Bellucci A. The Role of the Microbiome in Asthma: The Gut–Lung Axis. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. - Vol. 20. – P. 123 - 135.

112. Fujimura KE, Lynch SV. Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. // *Cell Host Microbe*. – 2015. - Vol. 17. – P. 592 – 602.
113. Gallaracher D.J., Kotecha S. Respiratory Microbiome of New-Born Infants. // *Front. Pediatr.* – 2016. - Vol. 4. – P. 10 - 15.
114. Ganesh B.P., Versalovic J. Luminal Conversion and Immunoregulation by Probiotics. // *Front Pharmacol.* - 2015. –Vol. 6. - P. 269.
115. Garate I., Garcia-Bueno B., Madrigal J. Origin and consequences of brain toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. // *J Neuroinflamm.* - 2011. - Vol. 8 (151). – P. 1 - 31.
116. Garzoni C., Brugger S.D., Qi W., Wasmer S., Cusini A. Microbial communities in the respiratory tract of patients with interstitial lung disease. // *Thorax*. – 2013. - Vol. 68. – P. 1150 – 1156.
117. Garidou L., Pomié C., Klopp P., Waget A., Charpentier J., Aloulou M. The gut microbiota regulates intestinal CD4 T cells expressing ROR γ t and controls metabolic disease. // *Cell Metab.* – 2015. – Vol. 22. – P. 100 – 112.
118. Gauguet S., D'Ortona S., Ahnger-Pier K. Intestinal Microbiota of Mice Influences Resistance to *Staphylococcus aureus* Pneumonia. // *Infect Immun.* – 2015. - Vol. 83 (10). - P. 4003 - 4014.
119. Gerritsen J., Smidt H., Rijkers G.T., de Vos W.M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. // *Genes Nutr.* – 2011. - № 6. – P. 209 – 240.
120. Gibbs J., Ince L., Matthews L., Mei J. et al. An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. // *Nat Med.* - 2014. - Vol. 20 (8). - P. 919 – 926.
121. Gill H.S., Rutherford K.J., Cross M.L., Gopal P.K. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. // *Am. J. Clin. Nutr.* - 2001. - Vol. 74 (6). – P. 833 - 839.
122. Giovannini M., Agostoni C., Riva E., Salvini F., Ruscitto A., Zuccotti G.V. A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term

consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. // *Pediatr. Res.* - 2007. – Vol. 62. - P. 5 - 20.

123. Goleva E., Jackson L., Harris J., Robertson C., Sutherland E., Hall C. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 2013. - Vol. 188. - P. 1193 – 1201.

124. Gollwitzer E.S., Saglani S., Trompette A., Yadava K., Sherburn R., McCoy K.D., Nicod L.P., Lloyd C.M., Marsland B.J. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. // *Nat. Med.* – 2014. - Vol 20. – P. 642 – 647.

125. Grace E., Shaw C., Whelan K., Andreyev H.J. Review article: small intestinal bacterial overgrowth prevalence, clinical features, current and developing diagnostic tests, and treatment. // *Aliment Pharmacol Ther.* - 2013. - Vol. 38 (7). - P. 88.

126. Green B.J., Wiriyaichaiyorn S., Grainge C., Rogers G.B., Kehagia V., Lau L. Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in treatment resistant severe asthma. // *PLoS One.* - 2014. - Vol. 9 (6). - P. e100645.

127. Gui Q. F., Lu H. F., Zhang C. X., Xu Z. R., Yang Y. H. Well-balanced commensal microbiota contributes to anti-cancer response in a lung cancer mouse model. // *Genet. Mol. Res.* – 2015. - Vol. 14. – P. 5642 – 5651.

128. Han M.K., Zhou Y., Murray S. Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study. // *Lancet Respir. Med.* – 2014. - Vol. 2 (7). - P. 548 – 556.

129. Hao Q., Dong B.R., Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. // *Cochrane Database of Systematic Reviews.* – 2015. - N 2. – P. CD006895.

130. Haines I., Baines K. J., Berthon B. S., Macdonald-Wicks L. K., Gibson P. G., Wood L. G. Soluble fibre meal challenge reduces airway inflammation and expression of GPR43 and GPR41 in asthma. // *Nutrients.* – 2017. - N 9. - E57.

131. He Y., We Q., Yao F., Xu D., Huang Y., Wang J. Gut-lung axis: the microbial contributions and clinical implications. // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2017. - Vol. 43. - P. 81 – 95.

132. Heederik D., von Mutius E. Does diversity of environmental microbial exposure matter for the occurrence of allergy and asthma? // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2012. - Vol. 130. – P. 44 - 50.
133. Herbst T., Sichelstiel A., SchĖar C. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. // *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* – 2011. - № 2. – P. 198 – 205.
134. Hevia A., Milani C., López P., Donado C.D., Cuervo A., González S. Allergic Patients with Long-Term Asthma Display Low Levels of *Bifidobacterium adolescentis*. // *PLoS ONE.* – 2016. - Vol. 11(2). – P. e0147809.
135. Hilty M., Burke C., Pedro H., Cardenas P., Bush A., Bossley C. Disordered microbial communities in asthmatic airways. // *PLoS One.* - 2010. - Vol. 5 (1). - e8578.
136. Hill D.A., Siracusa M.C., Abt M.C., Kim B.S., Kobuley D., Kubo M. Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. // *Nat Med.* – 2012. - Vol. 18 (4). – P. 538 – 546.
137. Huang Y.J., Nelson C.E., Brodie E.L., Desantis T.Z., Baek M.S., Liu J. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2011. - Vol. 127. - P. 372 - 381.
138. Huang Y.J., Nariya S., Harris J.M., Lynch S.V., Choy D.F., Arron J.R. The airway microbiome in patients with severe asthma: associations with disease features and severity. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2015. - Vol. 136 (4). - P. 874 - 884.
139. Huang Y., Marsland B., Bunyavanich S., O'Mahony L., Leung D., Muraro A. The microbiome in allergic disease: current understanding and future opportunities—2017 PRACTALL document of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology and the European academy of allergy and clinical immunology. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2017. - Vol. 139. – P. 1099 – 1110.
140. Huang Y.J., Charlson E.S., Collman R.G., Colombini-Hatch S., Martinez F.D., Senior R.M. The role of the lung microbiome in health and disease. A National Heart, Lung, and Blood Institute workshop report. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 2013. - Vol. 187 (12). - P. 1382 - 1387.

141. Hughes D.T., Sperandio V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. - Vol. 6. – P. 111 – 120.
142. Human Microbiome Project . The NIH Common Fund. Retrieved 8 March 2012.
143. Human Microbiome Project. // Home NIH Common Fund . -2018. Vol. 04. – P.15.
144. Ichiohe T., Pang I.K., Kumamoto Y. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2011. - Vol. 108 (13). - P. 5354 - 5359.
145. Ismai I.H., Licciardi P.V., Tang M.L. Probiotic effects in allergic disease. // *J. Paediatr Child Health.* - 2013. - Vol. 49 (709). - P. 15.
146. 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. // *Italian Journal of Medicine.* - 2018. - № 12. – P. 260 - 264.
147. 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. - № 9. – P.1126.
148. Jakobsson H.E., Abrahamsson T.R., Jenmalm M.C., Harris K., Quince C., Jernberg C. Decreased gut microbiota diversity, delayed *Bacteroidetes* colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. // *Gut.* - 2012. – Vol.63. - P. 559 – 566.
149. Jang S.O., Kim H.J., Kim Y.J., Kang M.J., Kwon J.W., Seo J.H., Kim H.Y., Kim B.J., Yu J., Hong S.J. Asthma Prevention by *Lactobacillus Rhamnosus* in a Mouse Model is Associated With CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T Cells. // *Allergy Asthma Immunol Res.* – 2012. - Vol. 4 (3). – P. 150 - 156.
150. Jung T. H., Park J. H., Jeon W. M., Han K. S. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. // *Nutr. Res. Pract.* – 2015. - № 9. – P. 343 – 349.
151. Jutel M., Akdis M., Akdis C.A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. // *ClinExp Allergy.* - 2009. - Vol. 39. - P. 1786 – 1800.

152. Jiminez J. A., Uwiera T. C., Abbott D. W., Uwiera R. R. E., Inglis G. D. Butyrate supplementation at high concentrations alters enteric bacterial communities and reduces intestinal inflammation in mice infected with *Citrobacter rodentium*. // *mSphere*. – 2017. - № 2. - P. e00243-17.
153. Kåhrström C.T., Pariente N., Weiss U. Intestinal microbiota in health and disease. // *Nature*. – 2016. – Vol. 535 (7610). - P. 47.
154. Kang Y.B., Caib Y., Zhangb H. Gut microbiota and allergy/asthma: From pathogenesis to new therapeutic strategies. // *Allergol. Immunopathol.* - 2016. - <http://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2016.08.004>
155. Koizumi S., Wakita D., Sato T. Essential role of Toll-like receptors for dendritic cell and NK1.1(+) cell-dependent activation of type 1 immunity by *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84. // *Immunol Lett.* - 2008. - Vol. 120 (1-2). – P. 14 – 19.
156. Koren O., Knights D., Gonzalez A., Waldron L., Segata N., Knight R. A Guide to Enterotypes across the Human Body: Meta-Analysis of Microbial Community Structures in Human Microbiome Datasets. // *PLoS Comput Biol.* – 2013. - Vol. 9 (1). - [pmid:23326225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23326225/).
157. Kim J., Jeun E. Extracellular vesicle–derived protein from *Bifidobacterium longum* alleviates food allergy through mast cell suppression. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – Vol. 137 (2). – P. 507 - 516.
158. Kim M., Qie Y., Park J., Kim C. H. Gut microbial metabolites fuel host antibody responses. // *Cell Host Microbe*. - 2016. – Vol. 20. – P. 202 – 214.
159. Kumar M., Babaei P., Ji B., Nielsen, J. Human gut microbiota and healthy aging: recent developments and future prospective. // *Nutr. Healthy Aging*. -2018. - N. 4. – P. 3 – 16.
160. Kuwahara A. Contribution of colonic short-chain fatty acid receptors in energy homeostasis. // *Front. Endocrinol.* – 2014. - № 5. – P.144.
161. Larsen J.P., Musavian H.S., Butt T.M. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma-associated Proteobacteria, but not commensal *Prevotella* spp., promote Toll-like receptor 2-independent lung inflammation and pathology. // *Immunology*. – 2015. - Vol. 144 (2). – P. 333 – 342.

162. Larsen J.M., Steen-Jensen D.B., Laursen J.M. Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. // PLoS One. – 2012. - Vol. 7 (2). - P. e31976.
163. Lee S.C., Yang Y.H., Chuang S.Y., Huang S.Y., Pan W.H. Reduced medication use and improved pulmonary function with supplements containing vegetable and fruit concentrate, fish oil and probiotics in asthmatic school children: a randomised controlled trial. // Br. J. Nutr. - 2013. - Vol. 110. - P. 145 - 155.
164. Lee N., Kim W. Microbiota in T-cell homeostasis and inflammatory diseases. // Experimental & Molecular Medicine. – 2017. - Vol. 49. – P. e340.
165. Li M., van Escha B., Wagenaar G., Garssen J., Folkerts G. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. // European Journal of Pharmacology. – 2018. - Vol. 831. – P. 52 – 59.
166. Liang X., Bushman FD. Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. // Proc Natl AcadSci USA. - 2015. - Vol. 112 (33). – P. 10479 – 10484.
167. Lin H.V., Frassetto A., Kowalik EJ. Jr., Nawrocki A.R., Lu M.M., Kosinski J.R., Hubert J.A., Szeto D., Yao X., Forrest G., Marsh D.J. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. // PLoS One. - 2012. - Vol. 7, №4. - P. 35240.
168. Lin J., Zhang Y., He C., Dai J. Probiotics supplementation in children with asthma: A systematic review and meta-analysis. // J. Paediatr. Child. Health. – 2018. - Vol. 54 (9). – P. 953 – 961.
169. Looft T., Allen H. K. Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. // Gut Microbes. – 2012. - № 3. – P. 463 – 467.
170. Lopez P., Gonzalez-Rodriguez I., Gueimonde M., Margolles A., Suarez A. Immune Response to Bifidobacterium bifidum Strains Support Treg/Th17 Plasticity. // PLoS ONE. – 2011. - Vol. 6 (9). – P. e24776.

171. Lotvall J., Akdis C.A., Bacharier L.B., Bjermer L., Casale T.B., Custovic A. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2011. – N. 127. – P. 355 – 360.
172. Louis P., Young P., Holtrop G., Flint H.J. Diversity of human colonic butyrateproducing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA: acetate CoA-transferase gene. // *Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 12 (2). – P. 304 - 314.
173. Maeda Y., Kurakawa T., Umemoto E., Motooka D., Ito Y., Gotoh K. Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. // *Arthritis Rheumatol.* 2016. – Vol. 68. – P. 2646 – 2661.
174. Masui R., Sasaki M., Funaki Y., Ogasawara N., Mizuno M., Iida A. G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2013. - Vol. 19 (13). P. 2848 – 2856.
175. Marks L.R., Davidson B.A., Knight P.R., Hakansson A.P. Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to disease. // *mBio.* – 2013. - № 4. – P. e00438.
176. Marri P.R., Stern D.A., Wright A.L., Billheimer D., Martinez F.D. Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2013. - Vol. 131. - P. 346 - 352.
177. Man W.H., de Steenhuijsen Pitsers W.A., Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2017. - Vol. 15. - P. 259 - 270.
178. Manzanares W., Lemieux M., Langlois P., Wischmeyer P. Probiotic and synbiotic therapy in critical illness (meta-analysis). // *Critical Care.* – 2016. - Vol. 20. – P. 262 – 281.
179. McCoy K.D., Köller Y. New developments providing mechanistic insight into the impact of the microbiota on allergic disease. // *Clin Immunol.* – 2015. – Vol. 159, N. 2. – P. 170 - 176.
180. MacGlashan D. Jr. Histamine: a mediator of inflammation. // *J. Allergy. Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 112, N 4. - P. 53 – 59.

181. McAleer J. P. Pulmonary Th17 antifungal immunity is regulated by the gut microbiome. // *J. Immunol.* – 2016. – Vol. 197. – P. 97 – 107.
182. McNamee L.A., Harmsen A.G. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. // *Infect. Immun.* – 2006. - Vol. 74. – P. 6707 – 6721.
183. Mendes R., Raaijmakers J.M. Cross-kingdom similarities in microbiome functions. // *The ISME Journal.* - 2015. - Vol. 9. - P. 1905 – 1907.
184. Mendoza M., Cruz B., A. Guzman-Banzon et al. Comparative Assessment of Asthma Control Test (ACT) and GINA Classification including FEV1 in predicting asthma severity. // *Phil Heart Center J.* – 2007. - Vol. 13 (2). - P. 149 – 154.
185. Molyneaux P.L., Cox M.J., Willis_Owen S.A. et al. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2014. - Vol. 190 (8). – P. 906 – 913.
186. Moore W.C., Bleeker E.R., Curran-Everett D., Erzurum S.C., Ameredes B.T., Bacharier L. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 119, N 2. – P. 405 – 413.
187. Morris A., Beck JM, Schloss PD, et al. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2013. - Vol. 187. – P. 1067 – 1075.
188. Mortaz E., Adcock I.M., Ricciardolo F.L., Varahram M., Jamaati H., Velayati A.A., Folkerts G., Garssen J. Anti-Inflammatory Effects of *Lactobacillus Rahmnosus* and *Bifidobacterium Breve* on Cigarette Smoke Activated Human Macrophages. // *PLoS One.* – 2015. - Vol. 10 (8). – P. e0136455.
189. Mukhopadhyay I., Hansen R., El-Omar E.M. IBD-what role do Proteobacteria play? // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2012. - № 9. – P. 219 - 230.
190. Nastasi C., Candela M., Bonefeld C.M., Geisler C., Hansen M., Krejsgaard T. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. // *Sci. Rep.* – 2015. - № 5. – P.16148.

191. Oelschlaeger T. A. Mechanisms of probiotic actions—a review. // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2010. - Vol. 300, N 1. – P. 57 – 62.
192. O'Dwyer D., Dickson R., Moore B. The Lung Microbiome, Immunity, and the Pathogenesis of Chronic Lung Disease. // *J. Immunol.* – 2016. – Vol. 196, N 12. – P. 4839 – 4847.
193. Olszak T., An D., Zeissig S., Vera M.P., Richter J., Franke A. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. // *Science*. – 2012. - Vol. 336. – P. 485 – 489.
194. Ownby D.R., Johnson C.C., Peterson E.L. Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age. // *JAMA*. - 2002. - Vol. 288. – P. 963 - 972.
195. Ozdemir O. Microbial dysbiosis in allergic lower airway disease (asthma). // *MOJ Immunol.* – 2018. - Vol. 6 (4). – P.129 – 132.
196. 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. – Vol. 9. – N. 10. – P. e109710.
197. Parker D., Ahn D., Cohen T., Prince A. Innate immune signaling activated by MDR bacteria in the airway. // *Physiol. Rev.* – 2016. – Vol. 96. – P. 19 – 53.
198. Quigley E. M. Small intestinal bacterial overgrowth. // *Infect. Dis. Clin. North.Am.* – 2010 Dec. – Vol. 24, N 4. – P. 943 – 959.
199. Raghu G., Freudenberger T.D., Yang S. High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. // *Eur. Respir. J.* – 2006. - Vol. 27. – P. 136 – 142.
200. 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.- Vol. 9, N10.- P. e109710.
201. Pang I.K., Iwasaki A. Control of antiviral immunity by pattern recognition and the microbiome. // *Immunol. Rev.* – 2012. - Vol. 245 (1). – P. 209 - 226.

202. Rautava S., Luoto R., Salminen S., Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2012. - № 9. – P. 565 - 576.
203. Relman DA. The human microbiome: ecosystem resilience and health. // *Nutrition reviews.* – 2012. - Vol. 70 (1). – P. S2 – S9.
204. Riedler J., Braun-Fahrlander C., Eder W., Schreuer M., Waser M., Maisch S. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. // *Lancet.* – 2001. - Vol. 358. – P. 1129 - 1133.
205. Rizzardini G., Eskesen D., Calder P.C. Evaluation of the immune effects of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis*, BB lactis, BB-12 and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, L. casei 431 in an influenza vaccination model: a randomized double-blind placebo controlled study. // *Brit. J. Nutr.* – 2012. - Vol. 107 (6). P. 876 – 884.
206. Rodriguez J.M. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. E coli.* // *Health Dis.* - 2015. – Vol. 26. – P. 26050.
207. Rogers G.B., Wesselingh S. Precision respiratory medicine and the microbiome. // *Lancet. Respir. Med.* - 2016. - Vol. 4 (1). – P. 73 – 82.
208. Ruane D., Chorny A., Lee H. Microbiota regulate the ability of lung dendritic cells to induce IgA class-switch recombination and generate protective gastrointestinal immune responses. // *J. Exp. Med.* - 2016. - Vol. 213 (1). – P. 53 - 73.
209. Russell S.L., Gold M.J., Hartmann M., Willing B.P., Thorson L., Wlodarska M. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. // *EMBO Rep.* – 2012. - Vol. 13. – P. 440 - 447.
210. Russel S.L., Gold M.J., Willing B.P. Perinatal antibiotic treatment affects murine microbiota, immune responses and allergic asthma. // *Gut microbes.* - 2013. - Vol. 4 (2). – P. 158 - 164.
211. Rusconi F., Zugna D., Annesi-Maesano I., Baiz N., Barros H., Correia S. Mode of delivery and asthma at school age in 9 European birth cohorts. // *Am. J. Epidemiol.* – 2017. - Vol. 185. – P. 465 – 473.

212. Sagar S., Morgan M.E., Chen S., Vos A.P., Garssen J., van Bergenhenegouwen J., Boon L., Georgiou N.A., Kraneveld A.D., Folkerts G. Bifidobacterium breve and Lactobacillus rhamnosus treatment is as effective as budesonide at reducing inflammation in a murine model for chronic asthma. // *Respir. Res.* – 2014. - Vol. 15. – P. 46 - 51.
213. Sajjan U., Wang Q., Zhao Y. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 2008. - Vol. 178. – P. 1271 – 1281.
214. Salyers A.A. Bacteroides of the human lower intestinal tract. // *Annu Rev. Microbiol.* -1984. - Vol. 38. – P. 293 – 313.
215. Samuelson D.R., Welsh D.A., Shellito J.E. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. // *Front. Microbiol.* - 2015. – Vol. 6. – P. 1085.
216. Schmidt L.A. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. // *PLoS One.* – 2011. - № 6. – P. e16384.
217. Schmidt A., Belaaouaj A., Bissinger R. Neutrophil elastase-mediated increase in airway temperature during inflammation. // *J. Cyst. Fibros.* – 2014. - Vol. 13 (6). – P. 623 - 631.
218. Schuijt T.J., Lankelma J.M., Scicluna B.P. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. // *Gut.* – 2016. - Vol. 65 (4). – P. 575 – 583.
219. Shukla S.D., Budden K.F., Neal R., Hansbro P.M. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. // *Clin. Transl. Immunol.* – 2017. - Vol. 6. – P. e133.
220. Segal L.N., Blaser M.J. A brave new world: the lung microbiota in an era of change. // *Ann. Am. Thorac. Soc.* – 2014. - Vol. 11 (1). – P. s21–27.
221. Simpson J.L., Daly J., Baines K.J., Yang I.A., Upham J.W., Reynolds P.N. Airway dysbiosis: Haemophilus influenzae and Tropheryma in poorly controlled asthma. // *Eur. Respir. J.* - 2016. - Vol. 47 (3). - P. 792 - 800.

222. Sivan A., Corrales L., Hubert N., Williams J. B., Aquino-Michaels K., Earley Z. M. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. // *Science*. – 2015. – Vol. 350. – P. 1084 – 1089.
223. Slater M., Rivett D.W., Williams L., Martin M., Harrison T., Sayers I. The impact of azithromycin therapy on the airway microbiota in asthma. // *Thorax*. - 2014. - Vol. 69 (7). - P. 673 - 674.
224. Small C.L., Shaler C.R., McCormick S. Influenza infection leads to increased susceptibility to subsequent bacterial superinfection by impairing NK cell responses in the lung. // *J. Immunol.* – 2010. - Vol. 184. – P. 2048 – 2056.
225. Smolinska S., Jutel M., Cramer R., O'Mahony L. Histamine and gut mucosal immune regulation. // *Allergy*. – 2013. - Vol. 12. - P. 33.
226. Sullivan A., Hunt E., MacSharry J., Murphy D. The Microbiome and the Pathophysiology of Asthma. // *Respiratory Research*. - 2016. - Vol. 17. – P. 163 – 174.
227. Sun K., Metzger D.W. Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon- γ during recovery from influenza infection. // *Nat. Med.* – 2008. - Vol. 14 . - P. 558 – 564.
228. Sun M., Wu W., Liu Z., Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. // *J. Gastroenterol.* – 2017. - Vol. 52. - P. 1 – 8.
229. Stiemsma L., Turvey S. Asthma and the microbiome: defining the critical window in early life. // *Allergy Asthma Clin. Immunol.* – 2017. - Vol. 13. – P. 3 – 12.
230. Strachan D.P. Hay fever, hygiene, and household size. // *BMJ*. - 1989. - Vol. 299. – P. 1259 - 1260.
231. Stokholm J., Blaser M.J., Thorsen J., Rasmussen M.A., Waage J., Vinding R.K., Schoos A.M., Kunøe A., Fink N.R. Maturation of the gut microbiome and risk of asthma in childhood. // *Nature communications*. – 2018. – Vol. 9. - P. 141.
232. Sze M. A., Tsuruta M., Yang S. W., Oh Y., Man S. F., Hogg J. C. Changes in the bacterial microbiota in gut, blood, and lungs following acute LPS instillation into mice lungs. // *PLoS ONE*. – 2014. – № 9. – P. e111228.

233. Tanoue T., Atarashi K., Honda K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2016. - N 16. – P. 295 – 309.
234. Thavagnanam S. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. // *Clin. Exp. Allergy.* - 2008. - Vol. 38 (4). – P. 629 – 633.
235. The 2018 update of the Global Strategy for Asthma Management and Prevention incorporates new scientific information about asthma
236. Theiler A., Bärnthaler T., Platzer W., Richtig G., Peinhaupt M., Rittchen S., Kargl J. Butyrate ameliorates allergic airway inflammation by limiting eosinophil trafficking and survival. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2019. – N 11. - pii: S0091-6749(19)30613-X.
237. Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota. // *Biochemical Journal* . - 2017. - Vol. 474. – P. 1823 – 1836 .
238. Trompette A., Gollwitzer E. S., Yadava K. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. // *Nature Medicine.* – 2014. - № 2. – P. 159 – 166.
239. Turturice B. Atopic asthmatic immune phenotypes associated with airway microbiota and airway obstruction. // *PLoS One.* – 2017. – Vol.12, N 10. - P. e0184566.
240. Urb M., Snarr B.D., Wojewodka G., Lehoux M., Lee M.J., Ralph B. Evolution of the immune response to chronic airway colonization with *Aspergillus fumigatus* Hyphae. // *Infect. Immun.* - 2015. - Vol. 83 (9). - P. 3590 - 3600.
241. Van De Pol M., Lutter R., Smids B., Weersink E., Van Der Zee J. Synbiotics reduce allergen-induced T-helper 2 response and improve peak expiratory flow in allergic asthmatics. // *Allergy.* - 2010. - Vol. 66. - P. 39 - 47.
242. Van de Flier M., Chunn N., Wizemann T.M. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized fibronectin. // *Infect. Immun.* – 1995. - Vol. 63. – P. 4317 – 4322.
243. Vega J.M., Badia X., Badiola C. Validation of the Spanish version of the Asthma Control Test (ACT). // *J. Asthma.* – 2007. - Vol. 44 (10). – P. 867 – 872.

244. Venkataraman A., Bassis Ch., Beck J., Young V. Application of a Neutral Community Model to Assess Structuring of the Human Lung Microbiome. // *mBio*. – 2015. - № 6. – P. e02284-14.
245. Vieira A.T., Rocha V.M., Tavares L. Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 5(1A). // *Microbes Infect.* – 2016. - Vol. 18 (3). – P. 180 - 189.
246. Villena J., Suzuki R., Fujie H. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* modulates the Toll-like receptor 4-induced inflammatory response via negative regulation in porcine antigen-presenting cells. // *Clin Vaccine Immunol.* – 2012. - Vol. 19 (7). – P. 1038 - 1053.
247. Wang Y., Li X., Ge T. Probiotics for prevention and treatment of respiratory tract infections in children. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. - Vol. 95 (31). – P. e4509.
248. Waser M., Michels K.B., Bieli C., Floistrup H., Pershagen G., von Mutius E. Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. // *Clin. Exp. Allergy*. – 2007. - Vol. 37. – P. 661 - 670.
249. Wei X., Jiang P., Liu J., Sun R., Zhu L. Association between probiotic supplementation and asthma incidence in infants: a meta-analysis of randomized controlled trials. // *Journal of Asthma*. – 2019. – № 1. - P. 1-12.
250. Wilson N.G., Hernandez-Leyva A., Kau A.L. The ABCs of wheeze: Asthma and bacterial communities. // *PLoS Pathog.* – 2019. – Vol. 15 (4). P. e1007645.
251. Wu H., Kuzmenko A., Wan S. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. // *J. Clin. Invest.* – 2003. - Vol. 111. - P. 1589 – 1602.
252. Yaung S.J., Church G.M., Wang H.H. Recent Progress in Engineering Human-Associated Microbiomes. In: *Engineering and Analyzing Multicellular Systems*. // Springer. - 2014. – №1. - P. 3 – 25.

253. Yatsunenکو T., Rey F.E., Manary M.J. Human gut microbiome viewed across age and geography. // *Nature*. – 2012. - Vol. 486. – P. 222 – 227.
254. Zeng H., Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. // *Trends Immunol.* – 2015. - Vol. 36. - P. 3 – 12.
255. Zeng B., Zhao J., Guo W. High-altitude living shapes the skin microbiome in humans and pigs. // *Front. Microbiol.* – 2017. - № 8. – P. 1929.
256. Zhang B., An J., Shimada T., Liu S., Maeyama K. Oral administration of *Enterococcus faecalis* FK-23 suppresses Th17 cell development and attenuates allergic airway responses in mice. // *Int. J. Mol. Med.* – 2012. - Vol. 30 (2). – P. 248 - 254.
257. Zhang J., Guo Z., Xue Z., Sun Z. et al. A phylofunctional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. // *ISME J.* – 2015. – Vol. 9 (9). – P. 1979 – 1990.
258. Zhang Q., Cox M., Liang Z., Brinkmann F., Cardenas P., Duff R., Bhavsar P., Cookson W., Moffatt M., Chung K. Airway Microbiota in Severe Asthma and Relationship to Asthma Severity and Phenotypes. // *PLoS One*. – 2016. - Vol. 11 (4). – P. e0152724.
259. Zolnikova O., Komkova I., Potskherashvili N., Trukhmanov A., Ivashkin V. Application of probiotics for acute respiratory tract infections. // *Italian Journal of Medicine*. – 2018. - Vol. 12. - P. 32 - 38.

Приложение 1

Классификация бронхиальной астмы по клиническому течению заболевания

Легкая эпизодическая (интермиттирующая) астма	- Симптомы реже 1 раза в неделю - Короткие обострения заболевания (от нескольких часов до нескольких дней) - Ночные симптомы 2 раза в месяц и реже - Отсутствие симптомов и нормальная ФВД между обострениями - ОФВ₁ и ПСВ более 80% от должного - Колебания ПСВ менее 20%
Легкая персистирующая астма	- Симптомы от 1 раза в неделю до 1 раза в день - Обострения могут снижать физическую активность и нарушать сон - Ночные симптомы чаще 2 раз в месяц - ОФВ₁ и ПСВ более 80% от должного - Колебания ПСВ 20%-30%
Среднетяжелое течение астмы	- Симптомы ежедневные - Обострения могут ограничивать физическую активность и нарушать сон - Ночные симптомы чаще 1 раза в неделю - ОФВ₁ и ПСВ более 60%-80% от должного - Колебания ПСВ более 30%
Тяжелое течение астмы	- Симптомы постоянные - Ограничение физической активности из-за симптомов астмы и нарушение сна - Ночные симптомы частые - ОФВ₁ и ПСВ менее 60% - Колебания ПСВ более 30%

Приложение 2.

Критерии контролируемости бронхиальной астмы

Параметры	Уровень контроля		
	Контролируемая	Частично контролируемая	Неконтролируемая
Симптомы днем	Нет (< 2 раз в нед.)	> 2 раз в неделю	≥ 3 признаков частичного контроля в неделю
Снижение активности	Нет	Да (Любое)	
Симптомы ночью (в т.ч. пробуждение)	Нет	Да (Любое)	
Потребность в короткодействующих бронходилататорах	Нет (< 2 раз в нед.)	> 2 раз в неделю	
Спирометрия	Норма	$< 80\%$ от должного	

Приложение 3

Опросник АСТ- тест по контролю над астмой
(Asthma Control Test)

Узнайте свой результат теста по контролю над астмой

1

25

В каждом вопросе выберите ответ, который Вам подходит, обведите соответствующую ему цифру и впишите ее в квадратик справа. Постарайтесь честно отвечать на вопросы. Это поможет Вам и Вашему врачу подробно обсудить, как Вы справляетесь с астмой.

Как часто за последние 4 недели астма мешала Вам выполнять обычный объем работы в учебном заведении, на работе или дома?

1

2

3

4

5

Все время

Очень часто

Иногда

Редко

Никогда

БАЛЛЫ

2

Как часто за последние 4 недели Вы отмечали у себя затрудненное дыхание?

1

2

3

4

5

Чаше, чем раз в день

Раз в день

От 3 до 6 раз в неделю

Один или два раза в неделю

Ни разу

3

Как часто за последние 4 недели Вы просыпались ночью или раньше, чем обычно, из-за симптомов астмы (свистящего дыхания, кашля, затрудненного дыхания, чувства стеснения или боли в груди)?

1

2

3

4

5

4 ночи в неделю или чаще

2-3 ночи в неделю

Раз в неделю

Один или два раза в неделю

Ни разу

4

Как часто за последние 4 недели Вы использовали быстроедействующий ингалятор (например, Вентолин, Беротек, Беродуал, Атровент, Сальбутамол, Саламон, Сальвен, Астмопент) или небулайзер (аэрозольный аппарат) с лекарством (например, Беротек, Беродуал, Вентолин Небуль)?

1

2

3

4

5

3 раза в день или чаще

1 или 2 раза в день

2 или 3 раза в неделю

Один раз в неделю или реже

Ни разу

5

Как бы Вы оценили, насколько Вам удавалось контролировать астму за последние 4 недели?

1

2

3

4

5

Совсем не удавалось контролировать

Плохо удавалось контролировать

В некоторой степени удавалось контролировать

Хорошо удавалось контролировать

Полностью удавалось контролировать

2

Сложите баллы и запишите полученный результат.

ИТОГО

3

прочитайте, что означает полученный результат.

Приложение 4

Интерпретация результатов АСТ - теста

Результаты тестирования определяются как сумма баллов:

- 25 баллов свидетельствуют о полном контроле над заболеванием в настоящее время;
- от 20 до 24 баллов теста позволяют сделать вывод, что астма контролируется хорошо, но не полностью. Врач может помочь больному добиться полного контроля;
- 19 баллов и меньше – свидетельствуют о неконтролируемом течении бронхиальной астмы. В этом случае требуется коррекция терапии, для достижения оптимального контроля;
- 14 баллов и меньше – астма у пациента не контролируемая, требуется срочное обращение за помощью.