

УДК 616.23/.24-002.2-06:616.34-008.87

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Огородова Л.М.¹, Говорун В.М.², Федосенко С.В.¹, Карнаушкина М.А.³, Салтыкова И.В.¹, Алексеев Д.Г.², Кострюкова Е.С.², Тяхт А.В.², Попенко А.С.²

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ физико-химической медицины ФМБА России, г. Москва

³ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, г. Москва

РЕЗЮМЕ

В статье обобщены результаты исследований, посвященных изучению состава сообщества микроорганизмов в образцах кала больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и здоровых добровольцев методом полногеномного метагеномного секвенирования. Показано, что сообщество микроорганизмов кишечника у пациентов с ХОБЛ характеризуется столь же разнообразным таксономическим составом метагеномов, что и микробиота здоровых добровольцев. При этом нормальный состав кишечной микробиоты у больных ХОБЛ подвергается качественной и количественной модификации. В отличие от здоровых добровольцев, кишечная микробиота у больных ХОБЛ характеризуется присутствием таких представителей *Proteobacteria*, как *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Eggerthella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Anaerococcus*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas*, а также более высокой обсемененностью грибами рода *Candida* (*Candida dubliniensis* и *Candida albicans*).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сообщество микроорганизмов кишечника, кишечная микробиота, полногеномное метагеномное секвенирование, ХОБЛ.

Введение

Микробные популяции играют важную роль в поддержании здоровья. В желудочно-кишечном тракте они детерминируют формирование локального и системного иммунитета, способствуют кишечному ангиогенезу и являются важным фактором нормального пищеварения [1]. Микробиота кишечника является одной из наиболее изученных благодаря применению преимущественно культуральных методов, что, однако, не дает возможности оценить все видовое многообразие населяющей кишечник микрофлоры в норме и не позволяет провести полноценный анализ особенностей изменения сообщества микроорганизмов при патологии. Так, с помощью культуральных методов возможно выявить не более 1–10% бактерий. Кроме того, культивирование является долгим процессом диагностики инфекций [2]. Внедрение современных молекулярно-генетических методов идентификации позволяет существенно расширить знания о кишечном микро-

биоме и его модификации при различных патологических состояниях, сопряженных, например, с частыми курсами антибиотикотерапии.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – распространенное среди взрослого населения заболевание бронхо-легочной системы, которое приводит к существенному снижению качества жизни и ассоциировано с частыми инфекционно-зависимыми обострениями. В среднем больной ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения переносит в год от одного до четырех и более эпизодов обострения. Каждое новое обострение ХОБЛ не только повышает риск долгосрочного снижения функции внешнего дыхания, но и обуславливает более высокую частоту антибиотикотерапии [3]. В свою очередь, нарушение роста нормальной микрофлоры кишечника на фоне приема антибактериальных препаратов может способствовать патологической колонизации его микроорганизмами, например *Clostridium* или *Candida Spp.* [4]. До настоящего момента глубинный анализ состава сообществ микроорганизмов, населяющих кишечную микробиоту, у больных ХОБЛ не проводился.

✉ Федосенко Сергей Вячеславович, e-mail: s-fedosenko@mail.ru

Цель исследования – выполнить глубинный анализ таксономического состава кишечной микробиоты у больных ХОБЛ и здоровых добровольцев.

Материал и методы

Были исследованы 52 образца кала больных ХОБЛ различной степени тяжести (средний возраст пациентов – $(58,22 \pm 9,6)$ года). Среди них 34 пациента с ХОБЛ средней степени тяжести и 18 пациентов с ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения. Степень тяжести определялась в соответствии со спирометрической классификацией GOLD (2010). В исследование включались больные ХОБЛ стабильного течения с отсутствием анамнеза обострений и приема антибиотиков на протяжении 3 мес и более.

После выделения тотальной ДНК было выполнено полногеномное (shotgun) метагеномное секвенирование на приборах SOLiD 4 и SOLiD 5500W (Life Technologies, США). Среднее число ридов на образец составило 38 млн штук. Предварительная фильтрация ридов показала, что качество секвенирования соответствует норме по протоколу, доля отфильтрованных низкокачественных ридов составила $(23,2 \pm 0,7)$ %. С целью определения таксономического состава микробиоты кишечника риды были отображены на представительный каталог, содержащий 354 генома кишечных бактерий. Для каждого бактериального таксона (вида, рода) его относительная доля в числе всех бактерий была вычислена исходя из суммарной длины ридов,

картировавшихся на геномы, принадлежащие к таксону, и приведена к процентному представлению. Доля идентифицированных ридов составила $(25,0 \pm 12,5)$ %, что соответствует популяционной норме по протоколу метагеномного анализа.

В качестве группы сравнения (контроль) использовались результаты исследованных по аналогичной методике образцов кала, полученных от 96 здоровых добровольцев из России [5].

Статистический анализ проводился на языке программирования R 3.1.0. Для подсчета матрицы расстояний между образцами было использовано расстояние Брэя-Кертиса. Поиск признаков, по которым различаются группы образцов, выполнялся тестом Манна-Уитни. Поправка на множественные сравнения производилась с помощью FDR (False Discovery Rate). Для поиска различающихся низкопредставленных таксонов была использована библиотека metagenomeSeq для языка программирования R.

Результаты и обсуждение

В ходе анализа таксономического состава метагеномных образцов кала больных ХОБЛ были выделены преобладающие таксоны, составляющие 1% и более в структуре общего числа бактерий хотя бы в одном образце. Выделенные таксоны приведены в диаграммах таксономического состава образцов кала больных ХОБЛ на уровне родов (рис. 1) и видов (рис. 2). В данных гистограммах строки соответствуют образцам

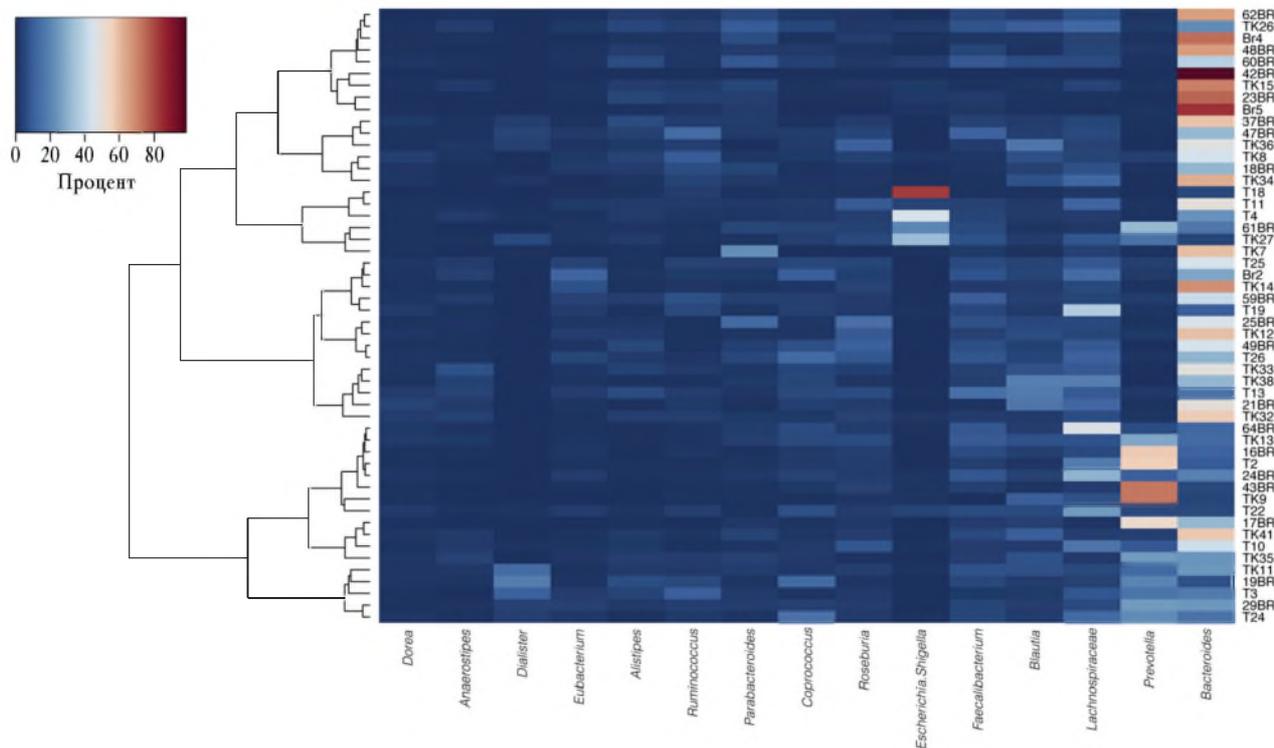


Рис. 1. Тепловая карта таксономического состава образцов больных ХОБЛ на уровне родов

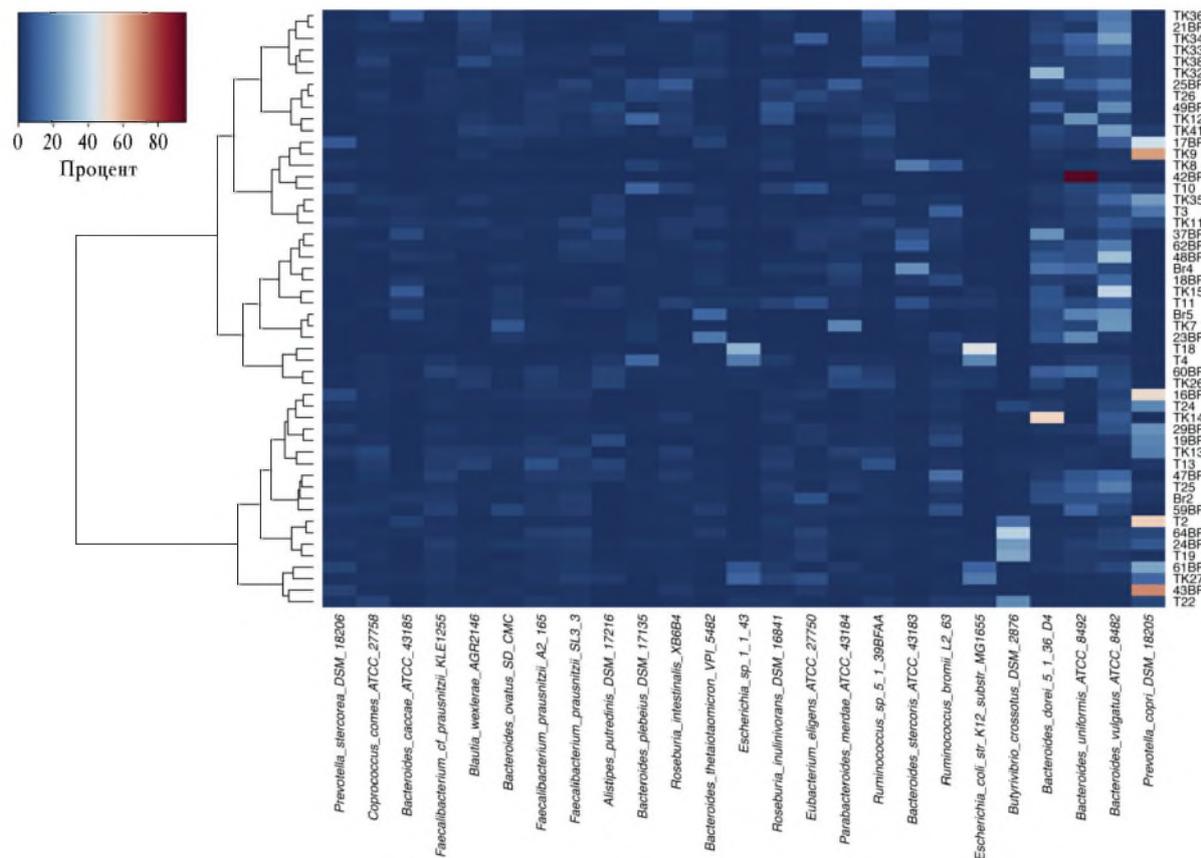


Рис. 2. Тепловая карта таксономического состава образцов больных ХОБЛ на уровне отдельных видов

(иерархически кластеризованы по сходству состава), а столбцы – бактериальным таксонам (следуют в порядке увеличения средней представленности по всей выборке слева направо).

В представленных гистограммах обращает на себя внимание явная кластеризация образцов по двум группам. Первая группа состоит из образцов с преобладанием бактерий рода *Prevotella*, а именно *Prevotella copri*, что соответствует так называемому второму энтеротипу, ассоциированному с диетой, богатой сложными углеводами [6]. Во второй группе образцов преобладают бактерии рода *Bacteroides*, что более характерно для людей, придерживающихся так называемой западной диеты, богатой белком и животными жирами [6, 7].

Глубинный анализ таксономического состава микроорганизмов в кале пациентов с ХОБЛ позволил выделить ряд образцов, отличающихся высоким уровнем обсемененности представителями группы *Proteobacteria* (табл. 1), большинство из которых в норме отсутствуют или слабо представлены в микробиоте кишечника. Так, например, следует отметить *Citrobacter* (найлены в 11 образцах), *Klebsiella* (в 9 образцах), *Enterobacter* (в 7 образцах), *Eggerthella* (в 8 образцах), *Proteus* (в 2 образцах), *Salmonella* (в 6 образцах),

Anaerococcus (в 1 образце), *Clostridium difficile* (в 7 образцах), *Pseudomonas* (в 1 образце).

Таблица 1

Группа <i>Proteobacteria</i> , представленная в образцах кала больных ХОБЛ		
Род бактерий	Количество образцов	% в структуре биома
<i>Citrobacter</i>	11	0,03–0,93
<i>Klebsiella</i>	9	0,02–1,42
<i>Enterobacter</i>	7	0,01–1,57
<i>Eggerthella</i>	8	0,02–0,16
<i>Proteus</i>	2	0,05–2,30
<i>Salmonella</i>	6	0,02–0,13
<i>Anaerococcus</i>	1	0,05
<i>Clostridium difficile</i>	7	0,01–0,10
<i>Pseudomonas</i>	1	0,02

С помощью теста Манна–Уитни были выявлены статистически значимые различия в представленности 129 видов и 41 рода между 52 образцами пациентов и 96 образцами метагенома кала здоровых лиц ($p < 0,05$). В частности, следует отметить пониженное содержание представителей отдела *Firmicutes* (*Faecalibacterium*, *Eubacterium*) в метагеноме пациентов с ХОБЛ. Бактерии этих таксонов производят бутират, традиционно рассматриваемый как энергетический

эквивалент, получаемый от кишечной микробиоты и благоприятный для здоровья организма.

Известно, что тест Манна–Уитни не позволяет достоверно различать выборки с множеством нулевых значений, как бывает для низкопокрытых (малочисленных в образце) организмов. В связи с этим в дополнение к стандартному статистическому анализу был проведен глубинный анализ различий таксономического состава микробиотических сообществ образцов кала пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц путем построения линейной регрессионной модели по значениям количества картировавшихся ридов на референсные геномы с использованием программного пакета metagenomeSeq для языка R [8].

В результате проведенного анализа (metagenomeSeq) были идентифицированы 110 видов микроорганизмов, статистически значимо различающихся по представленности в образцах больных ХОБЛ и здоровых добровольцев. В частности, этим методом были выявлены различия в обсемененности представителями *Candida* между образцами опытной и контрольной выборок. Особого внимания заслуживают *Candida dubliniensis* и *Candida albicans*, для которых определены наиболее значимые различия между группами больных ХОБЛ и здоровых добровольцев по значению коэффициента наклона прямой (вкладу микроорганизма в различия между метагеномами сравниваемых групп образцов) – 7,93 и 6,23 соответственно. И хотя определяемое количество этих микроорганизмов мало (покрывается менее 1% генома), указанный высокочувствительный метод позволяет выявить статистически значимые различия между группами: p с поправкой по FDR для *Candida dubliniensis* составило $7,78E-11$, для *Candida albicans* – $2,12E-12$. Ниже представлены рисунки, демонстрирующие более высокую обсемененность образцов кала больных ХОБЛ штаммом *Candida dubliniensis* CD36_1 (рис. 3) и *Candida albicans* по сравнению с образцами здоровых добровольцев (рис. 4).



Рис. 3. Уровни обсемененности *Candida dubliniensis* CD36_1 исследуемых образцов кала больных ХОБЛ и контрольной выборки

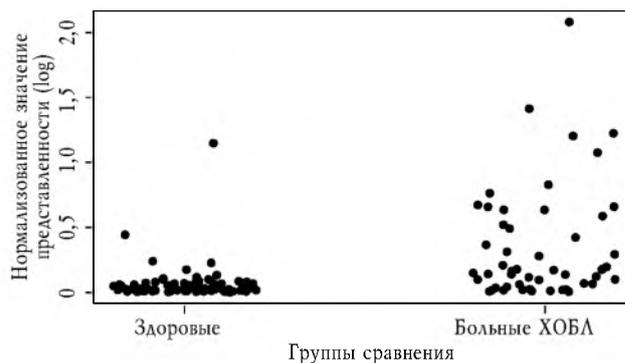


Рис. 4. Уровни обсемененности *Candida albicans* W60 исследуемых образцов кала больных ХОБЛ и контрольной выборки

Значимые различия по представленности в образцах кала больных ХОБЛ и здоровых добровольцев были выявлены и по ряду других микроорганизмов, традиционно рассматриваемых как часть нормальной микробиоты кишечника – *Ruminococcus sp.* и бифидобактерии (в частности, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium catenulatum* DSM 16992, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703). Данные микроорганизмы характеризовались отрицательным коэффициентом наклона прямой, т.е. их количество было меньше в образцах пациентов с ХОБЛ в сравнении с образцами здоровых добровольцев (таб. 2, рис. 5–7).

Таблица 2

Микроорганизмы, статистически значимо различающиеся по представленности в образцах кала между группами больных ХОБЛ и здоровых добровольцев		
Штамм микроорганизмов	Коэффициент наклона прямой	adjPvalue
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> DSM_20438	-3,473631472	0,00013926
<i>Collinsella aerofaciens</i> ATCC_25986	-3,806589893	0,000199063
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i> JDM301	-4,400957447	0,000104655
<i>Bifidobacterium bifidum</i> PRL2010	-4,779010156	7,32871E-05
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM_20213	-4,97857245	6,62285E-06
<i>Bifidobacterium angulatum</i> DSM_20098	-5,871980832	6,22372E-05
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> DSM_16992	-6,52313012	1,72973E-13
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC_15703	-7,237183311	0,00013926
<i>Ruminococcus sp. 5_1_39BFAA</i>	-7,378799539	0,000199063

Известно, что при различных воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, а также у лиц, применяющих антибиотики или получающих химиотерапию, наблюдается снижение таксономического разнообразия кишечной микробиоты (альфа-разнообразия). Менее разнообразная микробиота имеет меньший метаболический потенциал и характеризуется сниженной устойчивостью к воздействию патогенов.

Учитывая, что ХОБЛ является хроническим заболеванием с высоким потенциальным риском развития обострений и, следовательно, потенциально более высокой частотой антибиотикотерапии для их купирования, мы предположили возможность снижения альфа-разнообразия в образцах кала больных ХОБЛ в сравнении с группой контроля. Однако статистически значимые различия по индексу альфа-разнообразия отсутствовали (p -value (U -test) = 0,52) – кишечная микробиота больных ХОБЛ характеризовалась столь же разнообразным таксономическим составом метагеномов, что и микробиота здоровых добровольцев.

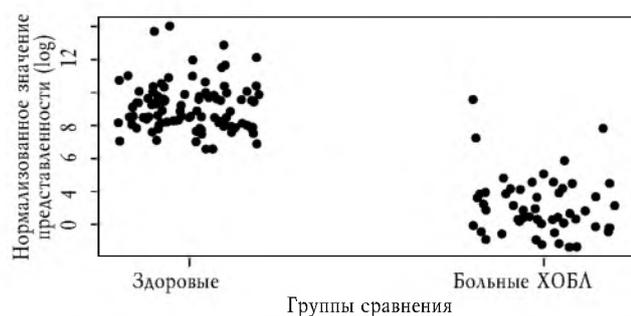


Рис. 5. Уровни обсемененности *Ruminococcus sp. 5_1_39BFAA* исследуемых образцов кала больных ХОБЛ и контрольной выборки



Рис. 6. Уровни обсемененности *Prevotella copri DSM_18205* исследуемых образцов кала больных ХОБЛ и контрольной выборки



Рис. 7. Уровни обсемененности *Bifidobacterium adolescentis ATCC_15703* исследуемых образцов кала больных ХОБЛ и контрольной выборки

Следует отметить один образец из группы больных ХОБЛ, для которого значение индекса альфа-разнообразия составило 0,11. Данный образец характеризовался рекордным содержанием микроорганизмов рода *Bacteroides* – 98,5%.

Заключение

Обобщая полученные результаты, можно сделать несколько выводов.

1. Сообщество микроорганизмов кишечника у пациентов с ХОБЛ характеризуется столь же разнообразным таксономическим составом метагеномов, что и микробиота здоровых добровольцев.

2. Состав кишечной микробиоты у больных ХОБЛ подвергается качественной и количественной модификации. Так, выявлены статистически значимые различия в представленности более 42 родов и 110 видов микроорганизмов в образцах кала больных ХОБЛ и здоровых добровольцев. Однако данные различия не являются столь значительными, чтобы выделить изученные образцы в отдельный вариант кишечной микробиоты.

3. Кишечная микробиота больных ХОБЛ характеризуется наличием отсутствующих или слабо представленных в норме представителей *Proteobacteria*, таких как *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Eggerthella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Anaerococcus*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas*, а также более высокой обсемененностью грибами рода *Candida* (*Candida dubliniensis* и *Candida albicans*).

4. В сравнении с сообществом микроорганизмов здоровых лиц кишечная микробиота больных ХОБЛ характеризуется снижением представленности микроорганизмов *Firmicutes* (*Faecalibacterium*, *Eubacterium*), *Ruminococcus sp.*, бифидобактерий (*Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium adolescentis*), которые традиционно рассматриваются как часть нормальной микрофлоры кишечника.

Хроническая обструктивная болезнь легких – заболевание, характеризующееся высоким риском обострений с потребностью в антибиотикотерапии. Вероятно, частые, нерациональные курсы приема антибактериальных препаратов, влияющих на нормальную кишечную микрофлору, могут качественно и количественно модифицировать состав сообщества микроорганизмов кишечника.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.»

(ГК № 14.604.21.0075, уникальный идентификатор RFMEFI60414X0075).

Литература

1. *Abt M.C., Artis D.* The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis // *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2009. 25. P. 496–502.
2. *Staley J.T., Konopka A.* Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats // *Annu. Rev. Microbiol.* 1985. 39. P. 321–346.
3. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD).* URL: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf
4. *Hooper L.V., Gordon J.I.* Commensal host-bacterial relationships in the gut // *Science.* 2001. 292. P. 1115–1118.
5. *Tyakht A.V., Kostryukova E.S., Popenko A.S., Belenikin M.S., Pavlenko A.V., Larin A.K., Govorun V.M.* Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia // *Nat. Commun.* 2013. 4.
6. *De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J.B., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. 107 (33). P. 14691–14696.
7. *Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D. et al.* Enterotypes of the human gut microbiome // *Nature.* 2011. 12, 473 (7346). P. 174–180.
8. *Joseph N., Paulson O., Colin Stine, Héctor Corrada Bravo, Mihai Pop.* Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys // *Nat. Methods.* 2013. 10 (12). P. 1200–1202.

Поступила в редакцию 10.09.2014 г.

Утверждена к печати 09.10.2014 г.

Огородова Людмила Михайловна – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАМН, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ (г. Томск), заместитель министра науки и образования Российской Федерации.

Говорун Вадим Маркович – д-р биол. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе НИИ физико-химической медицины ФМБА России (г. Москва).

Федосенко Сергей Вячеславович (✉) – канд. мед. наук, докторант кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины СибГМУ (г. Томск).

Карнаушкина Мария Александровна – канд. мед. наук, ассистент кафедры пульмонологии ФПДО МГМСУ им. А.И. Евдокимова (г. Москва).

Салтыкова Ирина Владимировна – канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ (г. Томск).

Алексеев Дмитрий Глебович – канд. биол. наук, зав. лабораторией биоинформатики НИИ физико-химической медицины ФМБА России (г. Москва).

Кострюкова Елена Сергеевна – канд. биол. наук, зав. лабораторией постгеномных исследований в биологии НИИ физико-химической медицины ФМБА России (г. Москва).

Тягт Александр Викторович – мл. науч. сотрудник лаборатории биоинформатики НИИ физико-химической медицины ФМБА России (г. Москва).

Попенко Анна Сергеевна – аспирант, лаборант лаборатории биоинформатики НИИ физико-химической медицины ФМБА России (г. Москва).

✉ Федосенко Сергей Вячеславович, e-mail: s-fedosenko@mail.ru

FEATURES OF THE INTESTINAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Ogorodova L.M.¹, Govorun V.M.², Fedosenko S.V.¹, Karnaushkina M.A.³, Saltykova I.V.¹, Alekseyev D.G.², Kostryukova Ye.S.², Tyakht A.V.², Popenko A.S.²

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

² Research Institute for Physico-Chemical Medicine, FMBA, Moscow, Russian Federation

³ A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

The article summarizes the results of studies on the composition of microbial communities in stool samples of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) compared with healthy volunteers using genome-metagenomic sequencing. It is shown that the microbial community of the intestine in COPD patients is characterized by diverse taxonomic composition of metagenomes that the healthy volunteers microbiota. In this case, the normal composition of intestinal microbiota in patients with COPD is exposed to the qualitative and quantitative modifications. In contrast to healthy volunteers, the intestinal microbiota in patients with COPD is characterized by the presence of representatives of the *Proteobacteria*, as *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Eggerthella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Anaerococcus*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas*, as well as higher insemination fungus genus *Candida* (*Candida dubliniensis* and *Candida albicans*).

KEY WORDS: community of microorganisms of the intestine, the intestinal microbiota, genome-metagenomic sequencing, COPD.

Bulletin of Siberian Medicine, 2014, vol. 13, no. 5, pp. 55–61

References

1. Abt M.C., Artis D. The intestinal microbiota in health and disease: the influence of microbial products on immune cell homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol*, 2009, 25, pp. 496–502.
2. Staley J.T., Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1985, 39, pp. 321–346.
3. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)*. URL: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf
4. Hooper L.V., Gordon J.I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 2001, 292, pp. 1115–1118.
5. Tyakht A.V., Kostryukova E.S., Popenko A.S., Belenikin M.S., Pavlenko A.V., Larin A.K., Govorun V.M. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat Commun*, 2013, 4.
6. De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J.B., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107 (33), pp. 14691–14696.
7. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, 12, 473 (7346), pp. 174–180.
8. Joseph N., Paulson O., Colin Stine, Héctor Corrada Bravo, Mihai Pop. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat. Methods*, 2013, 10 (12), pp. 1200–1202.

Ogorodova Lyudmila M., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Govorun Vadim M., Research Institute for Physico-Chemical Medicine, FMBA, Moscow, Russian Federation.

Fedosenko Sergei V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Karnaushkina Mariya A., A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation.

Saltykova Irina V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Alekseyev Dmitry G., Research Institute for Physico-Chemical Medicine, FMBA, Moscow, Russian Federation.

Kostryukova Yelena S., Research Institute for Physico-Chemical Medicine, FMBA, Moscow, Russian Federation.

Tyakht Aleksandr V., Research Institute for Physico-Chemical Medicine, FMBA, Moscow, Russian Federation.

Popenko Anna S., Research Institute for Physico-Chemical Medicine, FMBA, Moscow, Russian Federation.

✉ Fedosenko Sergei V., e-mail: s-fedosenko@mail.ru