https://doi.org/10.18093/0869-0189-2023-33-5-645-656

Check for updates

# Состав бактериального микробиома мокроты у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легких

*В.Г.Дружинин*[1, 2] ✉, *Е.Д.Баранова*[1], *П.С.Деменков*[3], *Ю.В.Захарова*[2], *М.Б.Лавряшина*[2], *А.В.Ларионов*[1], *Л.В.Мацкова*[4], *А.В.Шабалдин*[1], *Т.В.Пьянзова*[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: 650000, Россия, Кемерово, ул. Красная, 6

[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации: 650056, Россия, Кемерово, ул. Ворошилова, 22А

[3] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: 630090, Россия, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

[4] Каролинский институт – медицинский университет: 17165, Швеция, Стокгольм, Солнавэген, 9

**Резюме**

По данным исследований последних лет показано, что бактериальный микробиом респираторного тракта имеет влияние на развитие туберкулеза легких (ТЛ). Изменение состава микробиома у пациентов связано с особенностями патогенеза инфекции *Mycobacterium tuberculosis*, реакции на терапию и клинических исходов заболевания. До настоящего времени состав респираторного микробиома у больных с ограниченными формами ТЛ остается неизученным. **Материалы и методы.** С использованием технологии секвенирования (NGS) региона V3–V4 бактериального гена, кодирующего *16S рРНК*, проанализирован таксономический состав микробиома мокроты у пациентов ($n$ = 14) с ограниченными формами ТЛ (туберкулемами) и здоровых доноров ($n$ = 14) группы сравнения. **Результаты.** Установлено, что микробиомы мокроты у пациентов обеих сравниваемых групп не имели значимых различий по индексу видового богатства (Шеннона), однако наблюдалось снижение другого параметра альфа-разнообразия – индекса равномерности. Структуры бактериальных сообществ (бета-разнообразие) между больными с ограниченными формами ТЛ и здоровыми субъектами не имели значимых различий. У пациентов с ограниченными формами ТЛ на фоне снижения содержания в мокроте представителей типов *Fusobacteria*, *TM7*, *Tenericutes*, *Spirochaetes* и *SR1*, а также родов *Dialister*, *Mycoplasma* и *Filifactor* не наблюдалось явного доминирования какого-либо таксона бактерий. **Заключение.** Для дальнейшего понимания роли микробиоты мокроты в развитии ограниченных форм ТЛ требуется подтверждение результатами независимых крупномасштабных исследований определенных параметров альфа- и бета-разнообразия, характеризующих микробиом мокроты у пациентов с ограниченными формами ТЛ. Определение титров *Prevotella* в мокроте у этих больных перспективно для диагностики локализованных форм ТЛ и поиска их геномных маркеров.

**Ключевые слова:** туберкулез легкого, туберкулемы, бактериальный микробиом, мокрота, таксономический состав, *16S рРНК*, NGS-секвенирование.

**Конфликт интересов.** Конфликт интересов авторами не заявлен.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (соглашение № 056-03-2023-050).

**Этическая экспертиза.** Исследование одобрено комиссией по биомедицинской этике Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (протокол № 17 / 2021 от 05.04.21). При формировании групп соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации к исследованиям с участием людей (*World Medical Association Declaration of Helsinki*, 1964, 2000).

© Дружинин В.Г. и соавт., 2023

Для цитирования: Дружинин В.Г., Баранова Е.Д., Деменков П.С., Захарова Ю.В., Лавряшина М.Б., Ларионов А.В., Мацкова Л.В., Шабалдин А.В., Пьянзова Т.В. Состав бактериального микробиома мокроты у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легких. *Пульмонология*. 2023; 33 (5): 645–656. DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-5-645-656

# Composition of bacterial microbiome in sputum of patients with localized forms of pulmonary tuberculosis

*Vladimir G. Druzhinin*[1, 2] ✉, *Elizaveta D. Baranova*[1], *Pavel S. Demenkov*[3], *Julia V. Zakharova*[2], *Maria B. Lavryashina*[2], *Alexei V. Larionov*[1], *Liudmila V. Matskova*[4], *Andrey V. Shabaldin*[1], *Tatyana V. Pyanzova*[2]

[1] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kemerovo State University”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation: ul. Krasnaya 6, Kemerovo, 650000, Russia

[2] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kemerovo State Medical University”, Ministry of Health of the Russian Federation: ul. Voroshilova 22A, Kemerovo, 650056, Russia

[3] Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Novosibirsk State University”, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation: ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090, Russia

[4] Karolinska Institutet – a Medical University: Solnavägen 9, Stockholm, 17165, Sweden

The article is licensed by CC BY-NC 4.0 International Licensee https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

**Abstract**

Recent studies have shown that the respiratory bacterial microbiome has an impact on the development of pulmonary tuberculosis. Changes in the composition of the microbiome have been associated with the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* infection, response to therapy, and clinical outcomes of the disease. To date, the composition of the respiratory microbiome has not been studied in patients with localized forms of pulmonary tuberculosis. **Methods.** In the present study, the taxonomic composition of the sputum microbiome of 14 patients with localized forms of pulmonary tuberculosis (tuberculomas) and 14 healthy donors in the comparison group was analyzed by sequencing (NGS) of the V3 – V4 region of the bacterial gene encoding *16S rRNA*. **Results.** The sputum microbiomes of the patients and the control group did not have significant differences in the species richness index (Shannon). However, the patients showed a decrease in the uniformity index, another parameter of alpha diversity. Bacterial community structures (beta diversity) did not differ significantly between patients with localized forms of tuberculosis and healthy subjects. In patients with limited forms of tuberculosis, contrary to the decrease in the content of representatives of the phyla *Fusobacteria*, *TM7*, *Tenericutes*, *Spirochaetes*, and *SR1*, and of the genera *Dialister*, *Mycoplasma*, and *Filifactor* in the sputum, no clear dominance of any bacterial taxon was observed. **Conclusion.** Certain alpha and beta diversity parameters that characterize the sputum microbiome of patients with localized forms of pulmonary tuberculosis need to be confirmed in independent large-scale studies to further understand the role of the sputum microbiota in the development of localized forms of pulmonary tuberculosis. Determination of *Prevotella* titers in the sputum of these patients holds promise for the diagnosis of localized forms of pulmonary tuberculosis and the search for their genomic markers.

**Key words:** pulmonary tuberculosis; tuberculomas, bacterial microbiome, sputum; taxonomic composition; 16S rRNA; NGS sequencing.
**Conflict of interests.** The authors report that there is no conflict of interest.
**Funding.** The work was supported by the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation (Agreement No.056-03-2023-050).
**Ethical review.** The study was approved by the Commission on Biomedical Ethics of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kemerovo State University", Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (protocol No.17/2021 of 04.05.2021). The ethical principles laid down by the Declaration of Helsinki of the World Medical Association for research involving human subjects (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, 2000) were followed when forming the patient groups.
© Druzhinin V.G. et al., 2023

For citation: Druzhinin V.G., Baranova E.D., Demenkov P.S., Zakharova Yu.V., Lavryashina M.B., Larionov A.V., Matskova L.V., Shabaldin A.V., Pyanzova T.V. Composition of bacterial microbiome in sputum of patients with localized forms of pulmonary tuberculosis. *Pul'monologiya*. 2023; 33 (5): 645–656 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2023-33-5-645-656

Туберкулез относится к группе социально значимых заболеваний с хорошо изученной инфекционной природой, однако остается серьезной мировой проблемой. Уровень смертности при этом составляет > 1,5 млн ежегодно [1]. Согласно глобальной стратегии Всемирной организации здравоохранения по ликвидации туберкулеза, к 2035 г. предполагается снизить заболеваемость туберкулезом на 90 %, а смертность – на 95 % [2]. В последние годы в Российской Федерации отмечается существенное устойчивое снижение показателя заболеваемости туберкулезом, однако необходимы дальнейшие усилия по его ликвидации [3]. Особую остроту данной проблеме придает тот факт, что при развитии заболевания отмечается вариабельность тяжести клинических проявлений и объема поражения, которые у пациентов существенно различаются. Поэтому с развитием научной базы и внедрением новых методов молекулярной биологии активизируются исследования по идентификации факторов, модифицирующих противотуберкулезный ответ. В этом ключе изучаются генетические линии *Mycobacterium tuberculosis*, аннотируются полиморфные варианты генов иммунного ответа и внутриклеточного сигналинга, анализируется роль микроРНК (miRs) как регулятора антибактериального ответа [4] и маркера динамики клинического проявления туберкулеза [5], в т. ч. при диагнозе туберкулема легкого [6].

Все чаще научное сообщество обращается к микробиоте как фактору, модифицирующему характер развития заболеваний [7], в т. ч. туберкулеза легких (ТЛ). На настоящий момент большинство исследований, проведенных в этой области, посвящено сопоставлениям бактериальных профилей, характеризующих микробиом респираторного тракта у лиц с активным ТЛ и без такового [7–9]. Вместе с тем по данным анализа литературы выявлена нулевая публикационная активность по проблеме ограниченных форм ТЛ и вклада в этот процесс микробиома легких. В целом исследованность микробиома дыхательных путей (ДП) значительно отстает от микробиома желудочно-кишечного тракта, однако в настоящее время имеются веские доказательства того, что микробиом легких представляет собой богатую динамичную экосистему [10]. Идентификация бронхиального микробиома, исследование его влияния на иммунные реакции будет, несомненно, способствовать поиску путей профилактики и коррекции остро прогрессирующих и ограниченных форм ТЛ.

Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ таксономического состава бактериального микробиома мокроты у пациентов с ограниченными формами ТЛ и здоровых доноров – жителей Кузбасского региона Западной Сибири.

## Материалы и методы

**Характеристика пациентов исследованных групп.** Состав бактериальной микробиоты изучался на образцах мокроты у пациентов ($n$ = 14: 8 мужчин, 6 женщин; возраст 38–71 год; средний возраст – 57,9 ± 2,86 года) с клиническим диагнозом ограниченная форма ТЛ (основная группа) и практически здоровых субъектов – жителей Кемерово ($n$ = 14: 8 мужчин, 6 женщин; возраст – 42–73 года; средний возраст – 59,6 ± 2,95 года) без острых и хронических заболеваний бронхолегочной системы в анамнезе (группа сравнения). Материал для исследования собран за период с марта 2018 г. по март 2022 г. в отделении торакальной онкологии Государственного бюджетного учреждение здравоохранения «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С.Раппопорта» (Кемерово, Российская Федерация) у пациентов,

*Таблица 1*
*Характеристика пациентов исследуемых групп; %*
*Table 1*
*Characteristics of the study groups; %*

| Характеристика | Основная группа ($n$ = 14) | Группа сравнения ($n$ = 14) |
|---|---|---|
| Возраст, годы | 57,9 | 59,6 |
| Пол: | | |
| • мужской | 57 | 57 |
| • женский | 43 | 43 |
| Статус курения: | | |
| • курит | 50 | 29 |
| • не курит | 50 | 71 |

оперированных по поводу округлых теней в легких. Диагноз ТЛ у всех обследованных был подтвержден по результатам гистологического исследования операционного материала. Противотуберкулезную или иную антибактериальную терапию до исследования и на момент сбора мокроты пациенты не получали. Все клинические формы ТЛ были ограниченными, с поражением ⩽ 1 доли и представлены преимущественно туберкулемами. Сопоставляемые выборки не различались по возрасту ($p$ = 0,67). Структура участников исследования по полу, возрасту и отношению к курению представлена в табл. 1.

*Критерии включения* в исследование:
- возраст мужчин и женщин ⩾ 35 лет;
- готовность участвовать в исследовании;
- наличие результатов исследования мокроты;
- подписание письменного информированного согласия.

*Критерии исключения:*
- любое острое или хроническое состояние, которое ограничивало бы возможность пациента участвовать в исследовании;
- использование антибактериальных препаратов в течение 4 нед. до сбора материала;
- невозможность получить образец мокроты или отказ дать информированное согласие.

Все участники были проинформированы о целях, методологии и возможных рисках исследования и подписали добровольное информированное согласие. Исследование одобрено комиссией по биомедицинской этике Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (протокол № 17 / 2021 от 05.04.21). При формировании групп соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации к исследованиям с участием людей (*World Medical Association Declaration of Helsinki*, 1964, 2000).

**Сбор, обработка и хранение образцов.** Для анализа таксономического состава микробиома ДП образцы мокроты (2–3 мл) пациентов и участников группы сравнения получали путем откашливания утром натощак в стерильный закрывающийся контейнер при предварительном полоскании ротовой полости кипяченой водой. Индуцирующие методы сбора мокроты не применялись. Полученные образцы немедленно замораживались (–20 °С). Замороженные образцы транспортировались в лабораторию и хранились при –80 °С до процедуры выделения бактериальной ДНК. Из части образцов выборочно готовились цитологические препараты, которые анализировались на наличие столбчатых эпителиальных клеток ДП.

**Экстракция ДНК, амплификация и секвенирование *16S рРНК* генов.** Образцы прокариотической ДНК экстрагировались с помощью набора *FastDNA Spin Kit For Soil* (MP *Biomedicals*, Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Для амплификации генов *16S рРНК* использовались 50 нг ДНК. Амплификация *16S рРНК* генов проводилась согласно протоколу *Illumina* "*Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System*".

Первый этап амплификации вариабельных участков V3–V4 гена *16S рРНК* осуществлялся с использованием специфических праймеров:
- прямой праймер: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3';
- обратный праймер: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3' с использованием ДНК-полимеразы *BioMaster Hi-Fi* LR 2 × *ReadyMix* (*BiolabMix*, Новосибирск, Россия) по программе амплификации (амплификатор DNA *Engine Tetrad*® 2) (*Bio Rad*, США):
  - 94 °С – 3 мин 30 с;
  - 25 циклов: при температуре 94 °С – 30 с, при температуре 55 °С – 30 с, при температуре 68 °С – 40 с;
  - 68 °С – 5 мин;
  - охлаждение – 4 °С.

Второй этап амплификации для двойного индексирования образцов осуществлялся с использованием комбинации специфических праймеров и адаптеров секвенирования *Illumina* из наборов индексов *Illumina Nextera* XT v2 B и C (*Illumina*, Сан-Диего, США). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась с использованием ДНК-полимеразы *BioMaster* Hi-Fi LR 2 × *ReadyMix* (*BiolabMix*, Новосибирск, Россия), программа амплификации – при помощи амплификатора DNA *Engine Tetrad*® 2 (*BioRad*, США):
- 94 °С – 3 мин 30 с;
- 25 циклов: при температуре 94 °С – 30 с, при температуре 55 °С – 30 с, при температуре 68 °С – 40 с;
- 68 °С – 5 мин;
- охлаждение – 4 °С.

Очистка ПЦР-продуктов осуществлялась с использованием бусин *Agencourt AMPure* XP (*Beckman Coulter*, США) в соответствии с протоколом.

Концентрация полученных библиотек *16S РНК* генов в растворе определялась с помощью флуориметра *Quantus Fluorometer* dsDNA (*Promega*, Мадисон, США). Очищенные ампликоны смешивались эквимолярно в соответствии с полученными концентрациями. Качество приготовленной для сиквенса библиоте-

The article is licensed by CC BY-NC 4.0 International Licensee https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

ки оценивалось на приборе *Bioanalyzer* 2100 (*Agilent*, США) с использованием набора *Agilent* DNA 1000 *Kit*. Дальнейшая подготовка к секвенированию и секвенирование осуществлялось с использованием набора *MiSeq Reagent Kit* v2 (300 циклов) и прибора *MiSeq* (*Illumina*, США) согласно рекомендациям производителя.

**Оценка таксономического состава микробиоты.** Обработка данных, полученных по итогам секвенирования микробиомов, осуществлялась при помощи пакета программ QIIME2 [11]. Проведена проверка качества и создана библиотека последовательностей. Объединение последовательностей в операционные таксономические единицы (OTU) выполнялось на основе 99%-го порога сходства нуклеотидного состава с использованием библиотек референсных последовательностей *Greengenes* (версии 13–8) и SILVA (версия 138) с последующим удалением синглтонов (OTU, содержащие только 1 сиквенс).

Общее разнообразие (альфа-разнообразие) прокариотических сообществ мокроты оценивалось по количеству выделенных OTU (аналог видового богатства), индексам Шеннона ($H = \Sigma pi \times ln \times pi$, где $pi$ – доля вида $i$ в сообществе) и равномерности (*evenness*). Различие структур бактериальных сообществ разных образцов (бета-разнообразие) анализировалось при помощи *UniFrac* [12] – метода, при помощи которого оценивается различие между сообществами на основе филогенетического родства представленных таксонов. Достоверность различий между группами образцов оценивалась методом PERMANOVA (*Adonis*).

Для сравнения относительного процентного содержания отдельных бактериальных таксономических единиц в микробиомах сопоставляемых групп использовались 2 подхода. В первом случае определенные по итогам секвенирования индивидуальные частоты представленности таксонов, полученные в QIIME2, сводились в таблицы. Затем статистическая обработка результатов исследования выполнялась с помощью пакета программ *Statistica*.10 (*Statsoft*, США). Оценка количественных показателей осуществлялась посредством вычисления средних значений (M). Для оценки достоверности различий относительного процентного содержания отдельных бактериальных таксонов в образцах использовался ранговый U-тест Манна–Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Для устранения эффекта множественных сравнений при оценке значимости различий использовалась поправка *False Discovery Rate* (FDR). Второй вариант анализа различий в таксономическом составе бактерий между исследуемыми выборками был основан на оценке размера эффекта линейного дискриминантного анализа (LEFse) [13].

## Результаты

В результате секвенирования области V3–V4 гена *16S pPHK* в биологических образцах, полученных от обследованных индивидуумов основной группы и группы сравнения, идентифицированы в общей сложности 9 доминантных типов бактерий со средним содержанием > 0,1 % (табл. 2).

Показано, что в микробиомах у пациентов с ограниченными формами ТЛ (основная группа) и группы сравнения преобладающими типами бактерий являлись *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, которые суммарно составляли ⩾ 70 % общей структуры микробиоты. В целом среднее процентное содержание, а также соотношение доминантных бактериальных типов в мокроте оказалось близким к параметрам, описанным ранее для микробиома мокроты у здоровых лиц и больных ТЛ [14, 15]. Достоверные отличия при сравнении групп отмечены в отношении 5 типов бактерий ($p < 0,05$). Так, у пациентов основной группы по сравнению с группой сравнения зарегистрировано снижение уровня таких типов, как *Fusobacteria*, *TM7*, *Tenericutes*, *Spirochaetes* и *SR1*.

***Таблица 2***

***Структура доминантных типов бактерий в мокроте у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легких и пациентов группы сравнения (M), %***

***Table 2***

***Dominant types of bacteria in sputum of patients with localized forms of pulmonary tuberculosis and in the comparison group (M), %***

| Тип бактерий | Основная группа | Группа сравнения | *p* |
|---|---|---|---|
| *Firmicutes* | 48,86 | 46,26 | 0,45 |
| *Bacteroidetes* | 30,7 | 23,66 | 0,1 |
| *Actinobacteria* | 4,59 | 7,31 | 0,05 |
| *Proteobacteria* | 9,7 | 9,19 | 0,98 |
| *Fusobacteria* | 3,35↓ | 7,6 | 0,01* |
| *TM7* | 1,97↓ | 2,8 | 0,02* |
| *Spirochaetes* | 0,29↓ | 1,63 | 0,003* |
| *Tenericutes* | 0,1↓ | 0,53 | 0,02* |
| *SR1* | 0,02↓ | 0,5 | 0,02* |

Примечание: ↑, ↓ – направление отклонений у пациентов основной группы по сравнению со значением в группе сравнения; * – значение *p* меньше такового с поправкой на *False Discovery Rate*.

Note: ↑, ↓, the direction of deviations in patients of the main group compared with the comparison group; *, the *p* value is less than that adjusted for False Discovery Rate.

С помощью метрики Шеннона (*H*) и индекса равномерности *(evenness)* оценено разнообразие состава микробиоты в исследованных группах. Разнообразие – понятие, при помощи которого описывается размах изменчивости или различий между группами. На данном этапе на основании индекса Шеннона была рассчитана и сопоставлена величина альфа-разнообразия типов бактерий в группах. Чем выше величина показателя *H*, тем выше разнообразие. При оценке этого показателя необходимо также учитывать выравненность или равномерность распределения анализируемых переменных. Полная выровненность при высоких значениях индекса Шеннона соответствует наибольшему разнообразию системы.

Результаты проведенного анализа свидетельствуют о тенденции к снижению разнообразия в группе пациентов с ограниченными формами ТЛ по индексу Шеннона (*H*), который находится в прямой зависимости от микробного разнообразия в исследуемых образцах мокроты (рис. 1).

Вместе с тем согласно критерию Крускала–Уоллиса, зафиксировано отсутствие достоверных различий по индексу Шеннона между сопоставляемыми выборками ($p = 0{,}07$) (рис. 2).

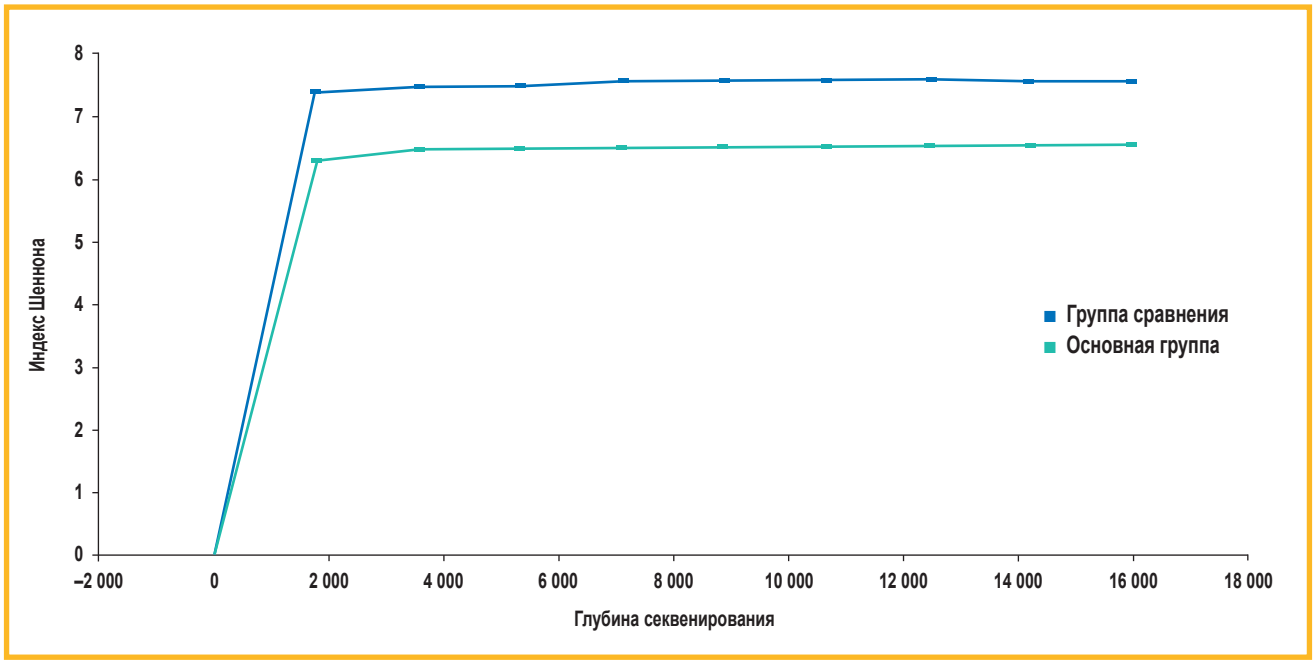


Рис. 1. Параметры альфа-разнообразия микробиома мокроты в выборках пациентов с ограниченными формами туберкулеза легкого и пациентов группы сравнения. Линейная диаграмма соединяет медианные значения распределения индекса Шеннона (*H*) по глубине прочтений

Figure 1. Parameters of α-diversity of sputum microbiome in patients with localized forms of pulmonary tuberculosis and in the comparison group. The line chart connects the median values of the distribution of the Shannon index (*H*) by the depth of readings

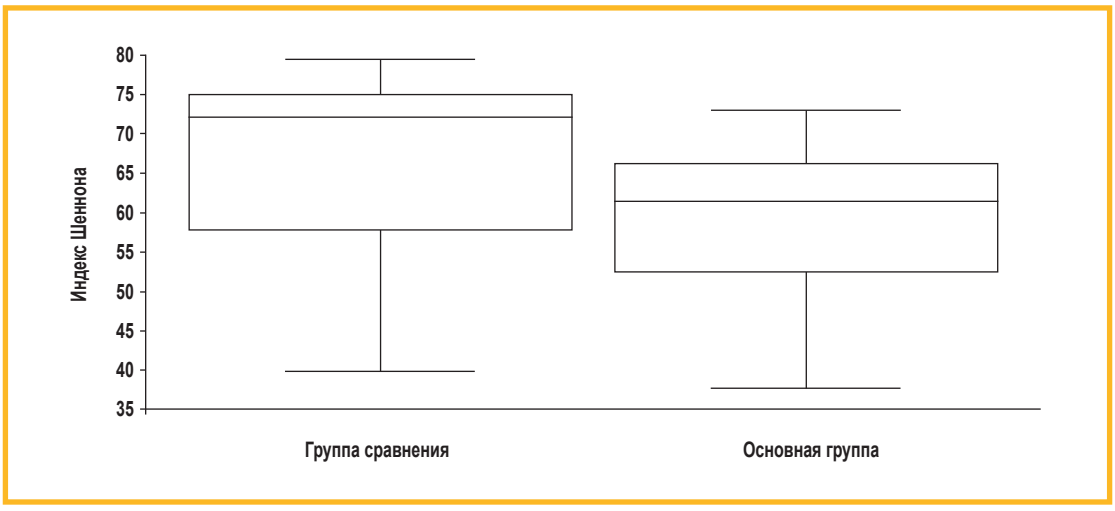


Рис. 2. Индекс разнообразия Шеннона (*H*) микробиома у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легкого (основная группа) и пациентов группы сравнения ($H = 3{,}26$; $p = 0{,}07$; $q = 0{,}07$)

Figure 2. Shannon diversity index (H) of the microbiome in patients with localized forms of pulmonary tuberculosis (main group) and in the comparison group ($H = 3.26$; $p = 0.07$; $q = 0.07$)

The article is licensed by CC BY-NC 4.0 International Licensee https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

В пользу связи разнообразия микробиома с развитием ограниченных форм ТЛ свидетельствует индекс равномерности микробиомов. Помимо видового богатства, альфа-разнообразие определяется равномерностью (*evenness*), с которой бактерии распределены по таксонам. У пациентов с ограниченными формами ТЛ он оказался достоверно ниже, чем в группе сравнения ($p = 0{,}003$) (рис. 3).

Оценка разнообразия структуры бактериальных сообществ (бета-разнообразие) в образцах мокроты у больных ТЛ и лиц группы сравнения, оцененного с помощью теста PERMANOVA (Адониса) и использованием матрицы различий, построенной по методу *Bray – Curtis* (рис. 4). Показано, что достоверные различия в уровнях разнообразия в группах отсутствуют ($p = 0{,}261$).

Следующим этапом исследования стало сопоставление структуры родов бактерий в образцах мокроты, полученных от людей, включенных в сравниваемые группы (табл. 3).

По результатам анализа показано, что в мокроте у пациентов основной группы наблюдаются различия в содержании представителей отдельных бактериальных родов по отношению к группе сравнения. Эти различия (указаны стрелками, см. табл. 3) имели разнонаправленный характер, но преимущественно проявлялись снижением средних значений у пациентов. Однако при использовании FDR-поправки на множественные сравнения показано, что достоверность различий между сравниваемыми группами можно констатировать только для рода *Dialister* (0,008 % *vs* 0,18 %; $p = 0{,}0004$).

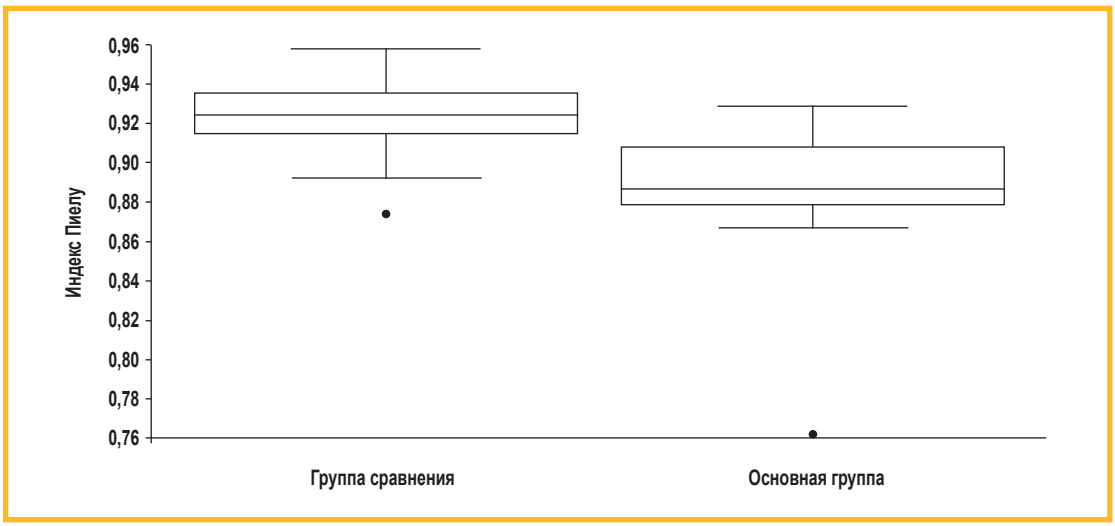


Рис. 3. Индекс равномерности (Пиелу) микробиома у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легкого (основная группа) и пациентов группы сравнения ($H = 8{,}41$; $p = 0{,}003$; $q = 0{,}003$)

Figure 3. Uniformity index (Pielu) of the microbiome in patients with localized forms of pulmonary tuberculosis (main group) and in the comparison group ($H = 8.41$; $p = 0.003$; $q = 0.003$)

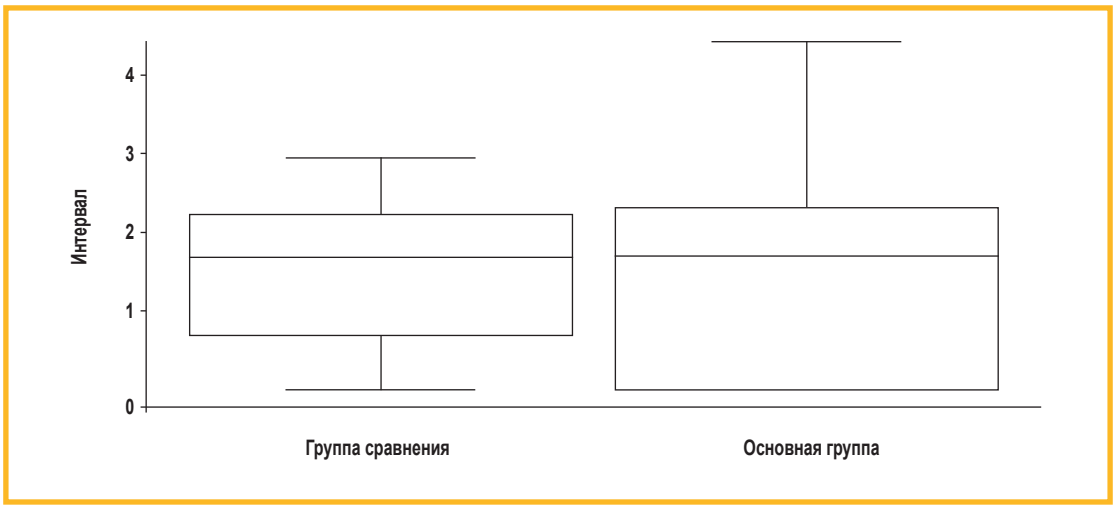


Рис. 4. Бета-разнообразие бактериальных сообществ мокроты у пациентов с ограниченными формами туберкулеза и пациентов группы сравнения (PERMANOVA; $p = 0{,}261$)

Figure 4. β-Diversity of sputum bacterial communities in patients with localized forms of tuberculosis and in the comparison group (PERMANOVA; $p = 0.261$)

*Таблица 3*
*Структура родов бактерий в мокроте у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легких и пациентов группы сравнения (M), %*
*Table 3*
*Genera of bacteria in the sputum of patients with localized forms of pulmonary tuberculosis and in the comparison group (M), %*

| Род бактерий | Среднее содержание | | p |
|---|---|---|---|
| | основная группа | группа сравнения | |
| *Streptococcus* | 18,82 | 18,58 | 0,48 |
| *Prevotella (f. Prevotellfceae)* | 21,02 | 15,18 | 0,06 |
| *Veillonella* | 17,69 | 14,07 | 0,15 |
| *Anaerosinus* | 10,81 | 7,01 | 0,46 |
| *Fusobacterium* | 1,69 | 4,09 | 0,09 |
| *Leptotrichia* | 1,56↓ | 3,7 | 0,04 |
| *Porphyromonas* | 2,62 | 3,67 | 0,22 |
| *Neisseria* | 3,29 | 3,63 | 0,34 |
| *Mycoplasma* | 1,22↓ | 2,97 | 0,03 |
| *Selenomonas* | 2,01 | 2,61 | 0,07 |
| *Rothia* | 1,45 | 2,37 | 0,06 |
| *Gemella* | 1,81 | 1,97 | 0,7 |
| *Megasphaera* | 2,49 | 1,68 | 0,75 |
| *Campylobacter* | 0,62 | 1,64 | 0,11 |
| *Streptobacillus* | 1,09 | 1,57 | 0,52 |
| *Alloprevotella* | 3,22 | 1,56 | 0,37 |
| *Granulicatella* | 1,52 | 0,57 | 0,13 |
| *Bacillus* | 1,74 | 1,31 | 0,73 |
| *Prevotella (f. Paraprevotellacacea)* | 2,03 | 1,28 | 0,94 |
| *Atopobium* | 0,6 | 1,03 | 0,25 |
| *Treponema* | 0,01 | 0,87 | 0,14 |
| *Capnocytophaga* | 0,72 | 0,76 | 0,58 |
| *Bacteroides* | 0,46 | 0,48 | 0,23 |
| *Actinomyces* | 0,05↓ | 0,69 | 0,02 |
| *Stomatobaculum* | 0,89↑ | 0,68 | 0,04 |
| *Lachnoanaerobaculum* | 0,17↓ | 0,69 | 0,02 |
| *Peptostreptococcus* | 0,15 | 0,66 | 0,11 |
| *Oribacterium* | 0,75 | 0,5 | 0,34 |
| *Filifactor* | 0,02↓ | 0,33 | 0,01 |
| *Catonella* | 0,03↓ | 0,24 | 0,007 |
| *Bulleidea* | 0,16 | 0,23 | 0,39 |
| *Solobacterium* | 0,14 | 0,21 | 0,29 |
| *Dialister* | 0,008↓ | 0,18 | 0,0004* |
| *Haemophilus* | 0,44 | 0,17 | 0,89 |
| *Macellibacteroides* | 0,64 | 0,14 | 0,89 |
| *Clostridium (f. Lachnospiraceae)* | 0,59 | 0,14 | 0,65 |
| *Bergeyella* | 0,15 | 0,12 | 0,65 |
| *Bulleidia* | 0,001↓ | 0,09 | 0,005 |

*Примечание:* ↑, ↓ – направление отклонений у пациентов основной группы по сравнению с таковым значением у пациентов группы сравнения; * – значение *p* меньше такового с поправкой на False Discovery Rate.

*Note:* ↑, ↓, the direction of deviations in patients of the main group compared with the patients of the comparison group; *, the *p* value is less than that adjusted for False Discovery Rate.

Различия состава бактерий на всех таксономических уровнях между исследуемыми выборками были изучены также с помощью оценки размера эффекта линейного дискриминантного анализа (LEFse). При помощи метода LEFse выявлено значимое увеличение содержания конкретных бактериальных таксонов в мокроте у здоровых индивидуумов по сравнению с таковым у больных с ограниченными формами ТЛ.

The article is licensed by CC BY-NC 4.0 International Licensee https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

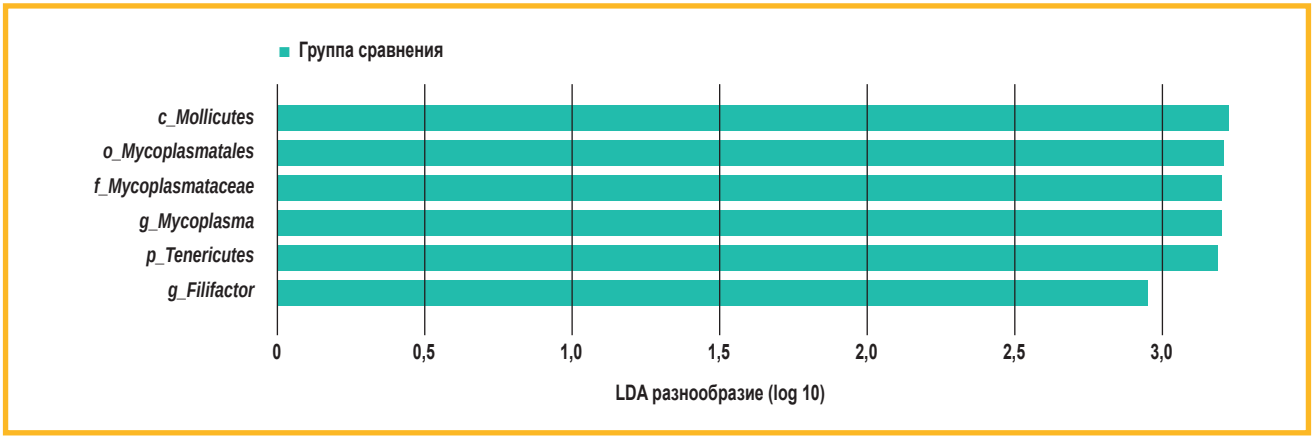


Рис. 5. Дифференциальная представленность бактериальных таксонов в образцах мокроты у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легкого и пациентов группы сравнения
Примечание: LDA (*linear discriminant analysis*) – линейный дискриминантный анализ.

Figure 5. Differential representation of bacterial taxa in sputum samples of patients with localized forms of pulmonary tuberculosis and in the comparison group

Это относится, в частности, к типу *Tenericutes*, классу *Mollicutes*, порядку *Mycoplasmatales*, семейству *Mycoplasmataceae* и роду *Mycoplasma* (рис. 5). Представители еще одного рода бактерий *Filifactor* также были обильнее представлены в мокроте у здоровых лиц группы сравнения.

## Обсуждение

Различия в таксономическом составе бактериальной микробиоты респираторного тракта человека уже признаны важным фактором развития целого ряда заболеваний легких и респираторного тракта [16, 17], однако до настоящего времени вопрос о значении микрофлоры в патогенезе ТЛ, тем более ассоциированной с разными стадиями патогенеза, остается открытым. В этом пилотном исследовании впервые сопоставлен таксономический состав микробиома в образцах мокроты у пациентов с ограниченными формами ТЛ.

Известно, что характер течения ТЛ может реализоваться по различным сценариям, например, по типу ограниченного течения с благоприятным прогнозом, при формировании очагов с продуктивной тканевой реакцией и тенденцией к ограничению, формированием очагового ТЛ и ограниченных туберкулем в I–II сегментах легкого (ограниченные формы). При неблагоприятной ситуации течение заболевания характеризуется преобладанием казеозного некроза или массивной гематогенной диссеминацией (остро прогрессирующие, распространенные формы). Главным фактором, определяющим характер клинического течения болезни, является особенность иммунного ответа организма на туберкулезную инфекцию [18, 19], одним из определяющих факторов которого может быть микробиота респираторного тракта.

По результатам анализа данных литературы показано, что практически все имеющиеся к настоящему времени исследования связей ТЛ с составом бактериальной микробиоты респираторного тракта посвящены продвинутым формам этого заболевания, в то время как ограниченные формы (туберкулемы) практически не изучены.

Установлено, что значения индекса Шеннона, отражающего видовое богатство микробиоты, близки к таковым в когорте пациентов с ограниченными формами ТЛ и группы сравнения. В целом это свидетельствует о схожести таксономических составов микробиоты в сопоставляемых группах. Так, у пациентов с ограниченным туберкулезным процессом, как и у здоровых лиц группы сравнения в мокроте идентифицированы 9 типов (филумов) микроорганизмов, которые представлены 38 родовыми таксонами бактерий. Однако при исследовании выравненности таксонов показано, что микробиом мокроты у пациентов с туберкулемами характеризовался меньшей равномерностью распределения таксонов в сообществе ($p = 0{,}003$). Это свидетельствует о снижении количественных уровней бактерий доминирующих таксонов и увеличении содержания «минорных» (условно-патогенных) членов сообщества, что подтверждает высказанное выше предположение о микроэкологических нарушениях микробиома верхних ДП у лиц основной группы. Структуры бактериальных сообществ (бета-разнообразие) у больных с ограниченными формами ТЛ и здоровых субъектов не имели значимых различий.

Согласно результатам имеющихся публикаций, сведения о разнообразии респираторной микробиоты у лиц с инфекцией *M. tuberculosis* противоречивы. В частности, по данным ряда работ показано, что активное заболевание туберкулезом связано с более высоким разнообразием микробиоты в мокроте [15, 20]. С другой стороны, *Y.Hu et al.* указывается на то, что у больных ТЛ наблюдается меньшее разнообразие микробиоты легких по сравнению с таковым у здоровых лиц [21]. Наконец по данным исследования *M.K.Cheung et al.* установлено, что разнообразие микробиоты было одинаковым в образцах мокроты у больных ТЛ и контрольных образцах [22].

По результатам предыдущих исследований показано, что состав бактериальной микробиоты в респираторном тракте у больных ТЛ может иметь особен-

ности, отличающие его от микробиома здоровых лиц. Однако до сих пор нет однозначных ответов на вопрос о том, какая связь существует между легочной инфекцией *M. tuberculosis* и резидентной микрофлорой ДП. Как и в случае оценки разнообразия, результаты разных исследований существенно различаются по наборам бактериальных таксономических единиц, содержание которых маркирует образцы ДП у пациентов с ТЛ. Например, *P.Krishna et al.* (Индия) по данным исследования состава микробиоты мокроты у больных ТЛ показано, что представительство *Firmicutes u Actinobacteria* было достоверно выше в образцах, полученных от пациентов с ТЛ, а *Neisseria* и *Veillonella* были двумя доминирующими родами после *Streptococcus* [15]. В другом исследовании с помощью пиросеквенирования гена *16S pPHK* были сопоставлены микробиомы из образцов мокроты, полученной от пациентов с активным ТЛ ($n$ = 22), и здоровых субъектов ($n$ = 14) [22]. Обнаружено, что представители *Firmicutes* преобладали в контрольных образцах, в то время как *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* были больше представлены в образцах, полученных от пациентов с ТЛ. На таксономическом уровне в мокроте пациентов с ТЛ отмечено значимое увеличение содержания родов *Mogibacterium*, *Moryella* и *Oribacterium*. У лиц с рецидивирующим ТЛ в образцах мокроты показано снижение содержания родов *Bulleidia* и *Atopobium* по сравнению с субъектами со впервые возникшим ТЛ [23].

Для ответа на вопрос о различиях между составами микробиома мокроты в сопоставляемых выборках были использованы 2 подхода к статистической обработке результатов (см. раздел «Материалы и методы»). По результатам непараметрического рангового U-теста Манна–Уитни с учетом FDR-поправки на множественные сравнения выявлено достоверное снижение содержания в мокроте пациентов с туберкулемами по сравнению с таковыми у здоровых субъектов представителей бактериальных типов *Fusobacteria*, *TM7*, *Spirochaetes* и *SR1*, а также рода *Dialister*. В то же время методом LEFse, который наиболее часто используется в микробиомных исследованиях, идентифицированы другие различия между сравниваемыми выборками (см. рис. 5). Микробиом мокроты у здоровых субъектов имел значимое обогащение представителями родов *Mycoplasma* и *Filifactor* при сопоставлении с образцами, полученными от пациентов с ограниченными формами ТЛ.

Показано, что основными таксонами в микробиоме мокроты у пациентов с ограниченными формами ТЛ являются типы *Firmicutes* (48,86 %), *Bacteroidetes* (30,7 %) и *Proteobacteria* (9,7 %), как и у лиц группы сравнения. По данным литературы показано, что удельный вес этих таксонов в микробиоме верхних отделов дыхательного тракта зависит от биотопа (нос, носоглотка, ротоглотка), возраста пациента, наличия патологических процессов и их этиологии [24]. В связи с этим отмечается очень широкий разброс их процентного содержания в микробиоте верхних ДП: *Firmicutes* – 35–65 %, *Bacteroidetes* – 10–48 %, *Proteobacteria* – ⩽ 10 % [25].

Полученные результаты о составе микробиома мокроты у пациентов с туберкулемами легких согласуются с данными литературы о доминировании этих таксонов в микробиоме верхних ДП и обеспечении ими колонизационной резистентности слизистых [26].

Однако обращает внимание некоторое снижение доли микроорганизмов типа *Actinobacteria* в мокроте у пациентов с туберкулемами легких. По данным *G.Biesbroek et al.*, представители актинобактерий родов *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Frankia*, *Bifidobacterium* являются комменсалами верхних ДП, поддерживающими эубиотическое равновесие в микробиоценозе за счет продукции антибиотикоподобных веществ и продуктов метаболизма [27]. В микробиоме мокроты у пациентов снизилась доля представителей типа *TM7* или *Saccharibacteria* ($p$ = 0,02). Бактерии *TM7* являются эпибионтами (живущими «на поверхности») *Actinomyces odontolyticus*, поэтому снижение содержания *TM7* косвенно подтверждает структурные изменения в архитектонике микроорганизмов типа *Actinobacteria* как комменсалов верхних отделов респираторного тракта. Таким образом, снижение доли указанных таксонов в структуре микробиоты мокроты у пациентов по сравнению с группой сравнения, вероятно, можно рассматривать как проявление дисбиоза верхних ДП у больных с ограниченными формами ТЛ.

В микробном сообществе мокроты у пациентов основной группы выявлено преобладание 4 родов: *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Anaerosinus*, на долю которых суммарно приходится 68,34 %. В группе сравнения на эти таксоны приходится 54,84 %. У пациентов с ограниченной формой ТЛ установлена более высокая частота обнаружения представителей рода *Prevotella*. По данным литературы, высокое содержание *Prevotella* у больных фтизиопульмонологического профиля связно с высокими рисками развития у них рецидивирующего туберкулезного процесса, т. к. установлены обратные корреляционные связи между количеством представителей рода *Prevotella* и уровнем $CD4^+$-клеток [28]. Кроме того, при высоком содержании *Prevotella* регистрируется снижение уровня интерферона-γ и интерлейкина-17А, что может приводить к прогрессированию процесса. Поэтому определение титров *Prevotella* в мокроте у пациентов с ограниченными туберкулезными процессами является перспективным для уточнения патогенеза развития ограниченных форм ТЛ и поиска их геномных маркеров.

## Заключение

Настоящее пилотное исследование направлено на оценку таксономического состава бактериального микробиома мокроты при ограниченной туберкулезной инфекции. Профиль бактериального микробиома мокроты составлен на основе секвенирования амплифицированного участка гена, кодирующего *16S pPHK*. Обнаружено снижение равномерности представленности таксонов бактерий в мокроте у больных с ограниченными формами ТЛ при сохранении биологического разнообразия микробиома у пациентов

The article is licensed by CC BY-NC 4.0 International Licensee https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

и здоровых лиц, что свидетельствует о количественных нарушениях в составе микробных сообществ ДП в условиях инфекции *M. tuberculosis*. У пациентов с ограниченными формами ТЛ на фоне снижения содержания в мокроте представителей типов *Fusobacteria*, *TM7*, *Tenericutes*, *Spirochaetes* и *SR1*, а также родов *Dialister, Mycoplasma* и *Filifactor* не наблюдалось явного доминирования какого-либо таксона бактерий.

Таким образом, для дальнейшего понимания роли микробиоты мокроты в развитии ограниченных форм ТЛ требуются независимые крупномасштабные исследования.

## Литература


1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. Available at: *https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021*
2. World Health Organization. WHO end TB strategy. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. Available at: *https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-TB-2015.19* [Accessed: May 23, 2016].
3. Васильева И.А., Тестов В.В., Стерликов С.А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19 – 2020–2021 гг. *Туберкулез и болезни легких*. 2022; 100 (3): 6–12. DOI: 10.21292/2075-1230-2022-100-3-6-12.
4. Moschos S.A., Williams A.E., Perry M.M. et al. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics*. 2007; 8: 240. DOI: 10.1186/1471-2164-8-240.
5. Еремеев В.В., Евстифеев В.В., Шепелькова Г.С. и др. МикроРНК и туберкулез. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8 (3): 309–315. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-3-309-315.
6. Гуськов А.М., Шепелькова Г.С., Эргешова А.Э. Перспектива использования сывороточных микроРНК в качестве маркеров распада у больных туберкулезом с диагнозом туберкулемы легкого. *Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза*. 2019; (Прил. 1): 13. DOI: 10.7868/S2587667819050029.
7. Wood M.R., Yu E.A., Mehta S. The human microbiome in the fight against tuberculosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2017; 96 (6): 1274–1284. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0581.
8. Eshetie S., van Soolingen D. The respiratory microbiota: new insights into pulmonary tuberculosis. *BMC Infect. Dis*. 2019; 19 (1): 92. DOI: 10.1186/s12879-019-3712-1.
9. Ticlla M.R., Hella J., Hiza H. et al. The sputum microbiome in pulmonary tuberculosis and its association with disease manifestations: a cross-sectional study. *Front. Microbiol*. 2021; 12: 633396. DOI: 10.3389/fmicb.2021.633396.
10. Barbosa-Amezcua M., Galeana-Cadena D., Alvarado-Peña N., Silva-Herzog E. The microbiome as part of the contemporary view of tuberculosis disease. *Pathogens*. 2022; 11 (5): 584. DOI: 10.3390/pathogens11050584.
11. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol*. 2019; 37 (8): 852–857. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9.
12. Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol*. 2005; 71 (12): 8228–8235. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
13. Segata N., Izard J., Waldron L. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011; 12 (6): R60. DOI: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
14. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Martinez F.J., Huffnagle G.B. The microbiome and the respiratory tract. *Annu. Rev. Physiol*. 2016; 78: 481–504. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105238.
15. Krishna P., Jain A., Bisen P.S. Microbiome diversity in the sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis*. 2016; 35 (7): 1205–1210. DOI: 10.1007/s10096-016-2654-4.
16. Dickson R.P., Huffnagle G.B. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. *PLoS Pathog*. 2015; 11 (7): e1004923. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004923.
17. Wang J., Li F., Tian Z. Role of microbiota on lung homeostasis and diseases. *Sci. China Life Sci*. 2017; 60 (12): 1407–1415. DOI: 10.1007/s11427-017-9151-1.
18. Ryndak M.B., Laal S. *Mycobacterium tuberculosis* primary infection and dissemination: a critical role for alveolar epithelial cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2019; 9: 299. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00299.
19. Simmons J.D., Stein C.M., Seshadri C. et al. Immunological mechanisms of human resistance to persistent Mycobacterium tuberculosis infection. *Nat. Rev. Immunol*. 2018; 18 (9): 575–589. DOI: 10.1038/s41577-018-0025-3.
20. Cui Z., Zhou Y., Li H. et al. Complex sputum microbial composition in patients with pulmonary tuberculosis. *BMC Microbiol*. 2012; 12: 276. DOI: 10.1186/1471-2180-12-276.
21. Hu Y., Kang Y., Liu X. et al. Distinct lung microbial community states in patients with pulmonary tuberculosis. *Sci. China Life Sci*. 2020; 63 (10): 1522–1533. DOI: 10.1007/s11427-019-1614-0.
22. Cheung M.K., Lam W.Y., Fung W.Y. et al. Sputum microbiota in tuberculosis as revealed by 16S rRNA pyrosequencing. *PLoS One*. 2013; 8 (1): e54574. DOI: 10.1371/journal.pone.0054574.
23. Wu J., Liu W., He L. et al. Sputum microbiota associated with new, recurrent and treatment failure tuberculosis. *PLoS ONE*. 2013; 8 (12): e83445. DOI: 10.1371/journal.pone.0083445.
24. Рыжова Н.Н., Воронина О.Л., Лосева Э.В. и др. Микробиом респираторного тракта детей с муковисцидозом. *Сибирское медицинское обозрение*. 2019; (2): 19–28. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-19-28.
25. Шабалдин А.В., Шабалдина Е.В., Симбирцев А.С. Особенности микробиома верхних отделов респираторного тракта у детей с рецидивирующими респираторными заболеваниями. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7 (4): 341–349. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-4-341-349.
26. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486 (7402): 201–214. DOI: 10.1038/nature11234.
27. Biesbroek G., Tsivtsivadze E., Sanders E.A. et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2014; 190 (11): 1283–1292. DOI: 10.1164/rccm.201407-1240OC.
28. Luo M., Liu Y., Wu P. et al. Alternation of gut microbiota in patients with pulmonary tuberculosis. *Front. Physiol*. 2017; 8: 822. DOI: 10.3389/fphys.2017.00822.


**Поступила: 11.05.23**
**Принята к печати: 13.07.23**

## References


1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. Available at: *https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021*
2. World Health Organization. WHO end TB strategy. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. Available at: *https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-TB-2015.19* [Accessed: May 23, 2016].
3. Vasilyeva I.A., Testov V.V., Sterlikov S.A. [Tuberculosis situation in the years of the COVID-19 pandemic – 2020–2021]. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2022; 100 (3): 6–12. DOI: 10.21292/2075-1230-2022-100-3-6-12 (in Russian).
4. Moschos S.A., Williams A.E., Perry M.M. et al. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics*. 2007; 8: 240. DOI: 10.1186/1471-2164-8-240.
5. Eremeev V.V., Evstifeev V.V., Shepelkova G.S. et al. MicroRNA and tuberculosis. *Infektsiya i immunitet*. 2018; 8 (3): 309–315. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-3-309-315 (in Russian).
6. Gus'kov A.M., Shepel'kova G.S., Jergeshova A.Je. [Prospects for the use of serum microRNAs as decay markers in tuberculosis patients diagnosed with pulmonary tuberculoma]. *Vestnik Central'nogo nauchno-issledovatel'skogo instituta tuberkuleza*. 2019; (Suppl. 1): 13. DOI: 10.7868/S2587667819050029 (in Russian).
7. Wood M.R., Yu E.A., Mehta S. The human microbiome in the fight against tuberculosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2017; 96 (6): 1274–1284. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0581.

8. Eshetie S., van Soolingen D. The respiratory microbiota: new insights into pulmonary tuberculosis. *BMC Infect. Dis*. 2019; 19 (1): 92. DOI: 10.1186/s12879-019-3712-1.
9. Ticlla M.R., Hella J., Hiza H. et al. The sputum microbiome in pulmonary tuberculosis and its association with disease manifestations: a cross-sectional study. *Front. Microbiol*. 2021; 12: 633396. DOI: 10.3389/fmicb.2021.633396.
10. Barbosa-Amezcua M., Galeana-Cadena D., Alvarado-Peña N., Silva-Herzog E. The microbiome as part of the contemporary view of tuberculosis disease. *Pathogens*. 2022; 11 (5): 584. DOI: 10.3390/pathogens11050584.
11. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol*. 2019; 37 (8): 852–857. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9.
12. Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol*. 2005; 71 (12): 8228–8235. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
13. Segata N., Izard J., Waldron L. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011; 12 (6): R60. DOI: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
14. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Martinez F.J., Huffnagle G.B. The microbiome and the respiratory tract. *Annu. Rev. Physiol*. 2016; 78: 481–504. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105238.
15. Krishna P., Jain A., Bisen P.S. Microbiome diversity in the sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis*. 2016; 35 (7): 1205–1210. DOI: 10.1007/s10096-016-2654-4.
16. Dickson R.P., Huffnagle G.B. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. *PLoS Pathog*. 2015; 11 (7): e1004923. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004923.
17. Wang J., Li F., Tian Z. Role of microbiota on lung homeostasis and diseases. *Sci. China Life Sci*. 2017; 60 (12): 1407–1415. DOI: 10.1007/s11427-017-9151-1.
18. Ryndak M.B., Laal S. *Mycobacterium tuberculosis* primary infection and dissemination: a critical role for alveolar epithelial cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2019; 9: 299. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00299.
19. Simmons J.D., Stein C.M., Seshadri C. et al. Immunological mechanisms of human resistance to persistent Mycobacterium tuberculosis infection. *Nat. Rev. Immunol*. 2018; 18 (9): 575–589. DOI: 10.1038/s41577-018-0025-3.
20. Cui Z., Zhou Y., Li H. et al. Complex sputum microbial composition in patients with pulmonary tuberculosis. *BMC Microbiol*. 2012; 12: 276. DOI: 10.1186/1471-2180-12-276.
21. Hu Y., Kang Y., Liu X. et al. Distinct lung microbial community states in patients with pulmonary tuberculosis. *Sci. China Life Sci*. 2020; 63 (10): 1522–1533. DOI: 10.1007/s11427-019-1614-0.
22. Cheung M.K., Lam W.Y., Fung W.Y. et al. Sputum microbiota in tuberculosis as revealed by 16S rRNA pyrosequencing. *PLoS One*. 2013; 8 (1): e54574. DOI: 10.1371/journal.pone.0054574.
23. Wu J., Liu W., He L. et al. Sputum microbiota associated with new, recurrent and treatment failure tuberculosis. *PLoS ONE*. 2013; 8 (12): e83445. DOI: 10.1371/journal.pone.0083445.
24. Ryzhova N.N., Voronina O.L., Loseva E.V. et al. [Respiratory tract microbiome in children with cystic fibrosis]. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*. 2019; (2): 19–28. DOI: 10.20333/2500136-2019-2-19-28 (in Russian).
25. Shabaldin A.V., Shabaldina E.V., Simbirtsev A.S. [Features of the microbiome of the upper respiratory tract in children with recurrent respiratory diseases]. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7 (4): 341–349. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-4-341-349 (in Russian).
26. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486 (7402): 201–214. DOI: 10.1038/nature11234.
27. Biesbroek G., Tsivtsivadze E., Sanders E.A. et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2014; 190 (11): 1283–1292. DOI: 10.1164/rccm.201407-1240OC.
28. Luo M., Liu Y., Wu P. et al. Alternation of gut microbiota in patients with pulmonary tuberculosis. *Front. Physiol*. 2017; 8: 822. DOI: 10.3389/fphys.2017.00822.


**Received: May 11, 2023**
**Accepted for publication: July 13, 2023**

## Информация об авторах / Authors Information

**Дружинин Владимир Геннадьевич** – д. б. н., профессор, профессор кафедры генетики и фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; старший научный сотрудник проблемной научно-исследовательской лаборатории Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (3842) 58-01-66; e-mail: druzhinin_vladim@mail.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-5534-2062*; SPIN: 6277-4704)

**Vladimir G. Druzhinin,** Doctor of Biology, Professor, Professor of the Department of Genetics and Fundamental Medicine, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kemerovo State University", Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; Senior Researcher, Problem Research Laboratory, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kemerovo State Medical University", Ministry of Health of the Russian Federation; tel.: (3842) 58-01-66; e-mail: druzhinin_vladim@mail.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-5534-2062*; SPIN: 6277-4704)

**Баранова Елизавета Дмитриевна** – магистрант кафедры генетики и фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3842) 58-01-66; e-mail: laveivana@mail.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0001-9503-8500*; SPIN: 9000-9016)

**Elizaveta D. Baranova**, Master's student, Department of Genetics and Fundamental Medicine, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kemerovo State University", Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3842) 58-01-66; e-mail: laveivana@mail.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0001-9503-8500*; SPIN: 9000-9016)

**Деменков Павел Сергеевич** – к. т. н., доцент кафедры дискретной математики и информатики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (923) 240-95-42; e-mail: demps@bionet.nsc.ru (SPIN: 1172-7270)

**Pavel S. Demenkov**, Candidate of Engineering, Associate Professor, Department of Discrete Mathematics and Computer Science, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Novosibirsk State University", Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (923) 240-95-42; e-mail: demps@bionet.nsc.ru (SPIN: 1172-7270)

**Захарова Юлия Викторовна** – д. м. н., профессор кафедры микробиологии и вирусологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (3842) 73-28-71; e-mail: yvz@bk.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-3475-9125)*

**Yulia V. Zakharova,** Doctor of Medicine, Professor, Department of Microbiology and Virology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kemerovo State Medical University", Ministry of Health of the Russian Federation; tel.: (3842) 73-28-71; e-mail: yvz@bk.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-3475-9125)*

**Лавряшина Мария Борисовна** – д. б. н. заведующий кафедрой молекулярной и клеточной биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (905) 960-94-47; e-mail: lmb2001@mail.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0003-1593-0676)*

**Maria B. Lavryashina,** Doctor of Biology, Head of Department of Molecular and Cellular Biology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kemerovo State Medical University", Ministry of Health of the Russian Federation; tel.: (905) 960-94-47; e-mail: lmb2001@mail.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0003-1593-0676)*

**Ларионов Алексей Викторович** – к. б. н., доцент кафедры генетики и фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3842) 58-01-66; e-mail: larionov@kemsu.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-7974-6483*; SPIN: 5360-4410)

The article is licensed by CC BY-NC 4.0 International Licensee https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

**Alexei V. Larionov,** Candidate of Biology, Associate Professor, Department of Genetics and Fundamental Medicine, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kemerovo State University", Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3842) 58-01-66; e-mail: larionov@kemsu.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-7974-6483*; SPIN: 5360-4410)

**Мацкова Людмила Валентиновна –** PhD, исследователь департамента микробиологии и клеточной биологии Каролинского института – медицинского университета; тел.: (46733) 633-89-54; e-mail: liudmila.matskova@ki.se (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-3174-1560*; SPIN: 4756-7437)
**Liudmila V. Matskova**, PhD, Affiliated Researcher, Department of Microbiology and Tumor Biology, Karolinska Institutet – a Medical University; tel.: (46733) 633-89-54; e-mail: liudmila.matskova@ki.se (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-3174-1560*; SPIN: 4756-7437)

**Шабалдин Андрей Владимирович** – д. м. н., доцент, профессор кафедры генетики и фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации; тел.: (3842) 90-09-22; e-mail: weit2007@yandex.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-8785-7896*)
**Andrey V. Shabaldin,** Doctor of Medicine, Associate Professor, Professor of the Department of Genetics and Fundamental Medicine, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kemerovo State University", Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; tel.: (3842) 90-09-22; e-mail: weit2007@yandex.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-8785-7896*)

**Пьянзова Татьяна Владимировна –** д. м. н., заведующий кафедрой фтизиатрии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (3842) 54-56-51; e-mail: tatyana_vezhnina@mail.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-4854-5734*)
**Tatyana V. Pyanzova,** Doctor of Medicine, Head of the Department of Phthisiology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kemerovo State Medical University", Ministry of Health of the Russian Federation; tel.: (3842) 54-56-51; e-mail: tatyana_vezhnina@mail.ru (ORCID: *https://orcid.org/0000-0002-4854-5734*)

## Участие авторов

**Дружинин В.Г.** – концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста
**Баранова Е.Д., Ларионов А.В.** – сбор и обработка материалов
**Деменков П.С.** – биоинформационная обработка материалов
**Мацкова Л.В.** – обзор литературы, дизайн исследования, редактирование текста
**Захарова Ю.В.** – дизайн исследования, редактирование текста
**Лавряшина М.Б.** – редактирование текста
**Шабалдин А.В.** – редактирование текста
**Пьянзова Т.В.** – редактирование текста
Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации, ответственность за целостность всех частей статьи.

## Authors Contribution

**Druzhinin V.G.** – study concept and design, data analysis, text writing

**Baranova E.D., Larionov A.V.** – collection and processing of materials
**Demenkov P.S.** – bioinformatic processing of materials
**Matskova L.V.** – literature review, study design, text editing

**Zakharova Yu.V.** – study design, text editing
**Lavryashina M.B.** – text editing
**Shabaldin A.V. – text editing**
**Pyanzova T.V.** – text editing
All authors made a significant contribution to the search, analysis, and preparation of the article, read and approved the final version before publication, and accepted responsibility for the integrity of all parts of the article.