

DOI 10.17516/1997-1389-0395

EDN: URBUBN

УДК 579.61

Analysis of the Microbiome of Human Lungs and Respiratory System in Lung Disorders: a Review

**Vladislav Yu. Buslaev^{a*}, Lyudmila V. Matskova^b,
Varvara I. Minina^{a, c} and Vladimir G. Druzhinin^c**

*^aFederal Research Centre of Coal and Coal Chemistry SB RAS
Institute of Human Ecology
Kemerovo, Russian Federation*

*^bImmanuel Kant Baltic Federal University
Kaliningrad, Russian Federation*

*^cKemerovo State University
Kemerovo, Russian Federation*

Received 22.12.2020, received in revised form 29.01.2021, accepted 25.04.2021

Abstract. The structural stability of the respiratory system and the functional activity of the lungs are influenced by the local microflora. The initiation and the progression of some lung diseases are determined by pathogenic factors produced by the lung microbiota and the dysbiotic conditions in general. Metagenomic studies based on sequencing of the genes for 16S ribosomal RNA have been used to collect direct data on the composition of the lung microbiota. 16S rRNA genes consist of 9 variable regions (V1-V9). By determining highly conservative 16S rRNA regions, bacterial genomes can be assigned to higher-level taxa, while based on information about less conservative regions of these genes, the genera or species of bacteria can be identified. Metatranscriptomics, which is based on estimating the number of copies of transcripts from the pulmonary microbiota, is also rapidly developing. The diversity and redundancy of genes and their variable activity in different conditions are prerequisites for using high-performance technologies such as RNA-seq and parallel sequencing methods. The metatranscriptomic analysis data significantly complement metagenomics; at the same time, metatranscriptomics is assumed to be more informative in examination of functional interactions between microbiome and host organism. These approaches offer an estimation of the biological activity of different components in the microbiome under normal and pathological conditions. This review

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: vladislasbus2358@yandex.ru
ORCID: 0000-0001-5566-5323 (Buslaev V.); 0000-0002-3174-1560 (Matskova L.); 0000-0003-3485-9123 (Minina V.); 0000-0002-5534-2062 (Druzhinin V.)

summarizes the results of recent metagenomic and metatranscriptomic studies regarding a number of serious diseases of the respiratory system (lung cancer, chronic obstructive lung disease, asthma, and cystic fibrosis).

Keywords: metagenomics, 16S rRNA sequencing, metatranscriptomics, RNA-seq, COPD, lung cancer, cystic fibrosis, asthma.

Acknowledgements. The research was supported by RFBR and Kemerovo region within scientific project No. 20–44–420012 p_a.

Citation: Buslaev V. Yu., Matskova L. V., Minina V.I., Druzhinin V.G. Analysis of the microbiome of human lungs and respiratory system in lung disorders: a review. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2022, 15(3), 396–421. DOI: 10.17516/1997-1389-0395



Анализ микробиоты лёгких и респираторного тракта человека при заболеваниях легочной системы (обзор)

**В. Ю. Буслаев^а, Л. В. Мацкова^б,
В. И. Минина^{а, в}, В. Г. Дружинин^в**

*^аФедеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН
Институт экологии человека
Российская Федерация, Кемерово*

*^бБалтийский федеральный университет имени Канта
Российская Федерация, Калининград*

*^вКемеровский государственный университет
Российская Федерация, Кемерово*

Аннотация. Микробиота легочной системы способна оказывать значимое влияние на стабильность структуры и функциональную активность легких. Инициация и прогрессирование некоторых заболеваний легких зависит от патогенных факторов, экспрессируемых легочной микробиотой, и состояния дисбиоза в целом. Метагеномные исследования, основанные на секвенировании генов 16S рРНК, позволили получить актуальные данные о составе легочной микробиоты. Гены 16S рРНК состоят из 9 переменных участков (V1–V9). Определение более консервативных в эволюционном плане участков последовательностей 16S рРНК гена позволяет относить исследуемые геномы бактерий к таксонам более высокого порядка, в то время как получение информации о менее консервативных участках позволяет определять принадлежность бактерий к роду или виду. В настоящее время также активно развивается метатранскриптомика, основанная на оценке числа копий транскриптов легочной микробиоты. Существование разнообразия и избыточности генов, а также переменность их активности в разных условиях предполагает использование таких высокопроизводительных

технологий, как секвенирование РНК и методы параллельного секвенирования. Полученные данные по метатранскриптному анализу в значительной степени дополняют результаты метагеномных исследований, в то же время предполагается, что метатранскриптный подход более информативен, что касается исследований функциональных взаимодействий между микробиотой и организмом-хозяином. Эти подходы предполагают оценку биологической активности различных компонентов микробиома в норме и патологии. В обзоре рассмотрены методические особенности применения метагеномного анализа, а также метатранскриптных исследований при некоторых тяжелых заболеваниях легочной системы (рак легкого, хроническая обструктивная болезнь легких, астма и муковисцидоз).

Ключевые слова: метагеномика, секвенирование 16S рРНК, метатранскриптомика, РНК-секвенирование, хроническая обструктивная болезнь лёгких, рак лёгкого, муковисцидоз, астма.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Кемеровской области в рамках научного проекта № 20–44–420012 р_а.

Цитирование: Буслаев, В.Ю. Анализ микробиоты лёгких и респираторного тракта человека при заболеваниях легочной системы (обзор) / В.Ю. Буслаев, Л.В. Мацкова, В.И. Минина, В.Г. Дружинин // Журн. Сиб. федер. ун- та. Биология, 2022. 15(3). С. 396–421. DOI: 10.17516/1997-1389-0395

Введение

Микробиота человека представляет собой совокупность микроорганизмов (бактерий, вирусов и грибов), населяющих определенную часть организма. Таким образом, человек может рассматриваться как мета-организм. Совокупность всех генов микроорганизмов обозначают термином «микробиом». Компоненты микробиоты лёгких имеют генотоксический, иммуномодуляторный и дисбиотический потенциалы, вклад которых (в совокупности с другими факторами) увеличивает предрасположенность к раку лёгкого, заболеванию, вызывающему самую высокую смертность среди онкологических патологий (Barta et al., 2019; Maddi et al., 2019). Активность отдельных составляющих микробиоты (бактерий, вирусов и грибов), населяющих мукозальный слой респираторного тракта, оказывает влияние на тяжесть течения наследственных заболеваний, напри-

мер муковисцидоза. Интересно, что не только патогенная, но и комменсальная микробиота может запускать процесс модуляции иммунных реакций, провоцировать аномальный иммунологический ответ и развитие таких заболеваний легочной системы, как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и астма (Wang et al., 2017). Патологические реакции иммунитета, как правило, связаны с развитием острого воспаления (рис. 1). Представители определенных бактериальных родов были отнесены к индукторам воспалительных реакций и могут рассматриваться в качестве факторов развития предопухольных процессов.

Секвенирование генов, кодирующих РНК малой субъединицы рибосом бактерий, в настоящее время является наиболее реализуемым и информативным методом для изучения разнообразия бактерий в результате широкого использования технологий нового

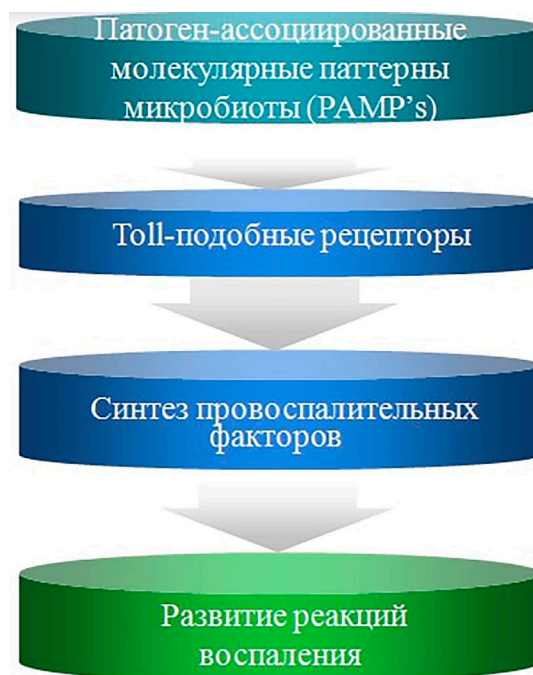


Рис. 1. Развитие воспалительных реакций при участии компонентов микробиоты человека. Синтез факторов воспаления связан с первоначальным этапом распознавания компонентов бактериальной мембраны (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP's) Toll-подобными рецепторами клеток организма-хозяина. Развитие острого воспаления является ключевым моментом в инициации онкогенеза с участием бактериальной микробиоты

Fig. 1. Development of inflammatory reactions involving human microbiota. Synthesis of inflammatory factors is related to primary recognition of bacterial membrane components (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP's) by Toll-like receptors of host organism cells. Acute inflammation development is a key factor for oncogenesis initiation by bacterial microbiota

поколения. Для определения последовательностей выбранные участки генов 16S рНК амплифицируются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Следующим этапом является создание библиотеки бактериальных последовательностей с идентификационными баркодами. С этой целью полученные продукты предыдущей стадии амплифицируют в ПЦР ещё раз с праймерами, содержащими баркоды. Результаты прочтений объединяются в ходе биоинформатической обработки результатов секвенирования в операционные таксономические единицы (OTU's) для последующей таксономической аннотации.

Кластерирование нуклеотидных последовательностей и построение OTU's обеспечи-

вается методами биоинформатики (Корюлова et al., 2016). К наиболее широко применяемым программам относятся uclust, USEARCH, UPARSE и CD-HIT. Таксономическая классификация нуклеотидных последовательностей эффективно осуществляется с помощью реализации алгоритма Kraken (Wood, Salzberg, 2014). Пакет программ PathoScope обеспечивает более продуктивный анализ наличия патогенов, ассоциированных с муковисцидозом, при сопоставлении с ресурсами программ Kraken и MetaPhlAn (Hahn et al., 2018). Аннотация основана на сравнении нуклеотидных последовательностей с референсными базами данных (базами данных последовательностей генов 16S рНК).

К наиболее распространенным базам данных в исследованиях микробиома относятся SILVA и Greengenes, которые содержат большое разнообразие прокариотических последовательностей. SILVA состоит из более чем четырёх миллионов последовательностей РНК малых и 400 тысяч последовательностей РНК больших субъединиц рибосом архей и эукариот. База данных Greengenes позволяет определять таксономию бактерий и архей, основываясь на филогенетических древах, построенных на основе многократно выверенных, неискусственных (нехимерных) последовательностей, но, к сожалению, она не обновлялась с мая 2013 года. Используется также база данных Ribosomal Data Project, которая позволяет осуществлять выравнивание последовательностей рРНК для построения более подробных филогенетических деревьев.

Однако существуют некоторые сложности и ограничения в применении метагеномики. Например, качество полученных в резуль-

тате секвенирования прочтений определяется особенностями дизайна праймеров и оптимизацией протокола выделения бактериальной ДНК. Кроме того, сложность биоинформатического анализа состоит в распознавании химерных и целевых прочтений, а также последовательностей праймеров. Ошибки секвенирования могут обуславливать возникновение ложноположительных результатов при анализе структуры микробиома. В качестве главного ограничения метагеномных исследований выступает вариабельность числа копий генов 16S рРНК в различных бактериальных геномах (Větrovský, Baldrian, 2013).

Метагеномный и метатранскриптомный анализы в настоящее время выступают в качестве основных молекулярных методов изучения микробиоты человека (рис. 2). Метатранскриптомика представляет собой альтернативный подход к исследованию структуры микробиома и определению его функциональной значимости. В первую



Рис. 2. Сравнительная характеристика методов метагеномики и метатранскриптомики. На схеме приведены основные этапы анализа микробиоты с применением двух разных подходов

Fig. 2. Comparative characteristics of metagenomics and metatranscriptomics methods. The diagram shows the main stages of microbiota analysis using two different approaches

очередь данный метод направлен на анализ экспрессии генов микроорганизмов и эффективен при определении полного транскриптомного профиля микробиома. Секвенирование РНК (RNA-seq) обеспечивает более эффективное и подробное исследование транскриптома, в особенности при выявлении наиболее активно экспрессирующихся генов в составе бактериальных сообществ. Данные группы генов могут выступать в качестве маркеров присутствия специфических компонентов микробиома в определенных условиях. RNA-seq позволяет также идентифицировать пути метаболизма, которые используются микроорганизмами, что способствует более полному пониманию их влияния на развитие определенных патологических состояний.

Анализ транскриптов микробных генов позволил получить более подробную картину при исследовании физиологического состояния здорового организма и развития заболеваний человека. Например, метатранскриптомный анализ выявил взаимосвязь между изменением состава микробиоты ротовой полости и развитием периодонтита (Jorth et al., 2014). Было отмечено, что в данном случае микробиота гораздо менее разнообразна, бактерии *Fusobacterium nucleatum* увеличивают уровень экспрессии генов, задействованных в синтезе бутирата при развитии заболевания. Интеграция метагеномного, метатранскриптомного и вирусного подходов позволяет провести более точный и корректный анализ (Bikel et al., 2015). Именно интегративное исследование позволило получить представление о большом разнообразии кишечного микробиома человека и о взаимосвязанной экспрессии генов организма-хозяина и микробиоты, его населяющей, а также о том, что особенности метагенома влияют на структуру метатранскриптома (Franzosa et al., 2014).

На примере исследования транскриптома микробиоты была представлена система прямого секвенирования РНК молекул с использованием Oxford Nanopore sequencing system. Nanopore секвенирование основано на последовательном распознавании отдельных нуклеотидов в составе полинуклеотидной цепи, которые проходят через нанопоровые структуры (Cozzuto et al., 2020). Данный подход может быть применен при метатранскриптомных исследованиях для обеспечения экономически рентабельного и точного анализа биологических систем (Semmourgi et al., 2020). Была продемонстрирована возможность детекции последовательностей эндопаразитов и других редких видов, основанной на анализе транскриптов 18S рРНК. Большое разнообразие нуклеотидных последовательностей, аннотированных из ONT и GO баз данных, необходимо для идентификации генов, вовлеченных в процессы гликолиза и синтеза белка.

Материал репозитория нуклеотидных последовательностей прокариот также выступает в качестве стандарта для сопоставления результатов RNA-seq с помощью алгоритмов выравнивания. Вместе с наличием референсных баз существует разнообразие биоинформатических программ, которые были разработаны для интерпретации результатов RNA-seq анализа в метатранскриптомных исследованиях. В ходе анализа используются алгоритмы: HUMAnN 2 (Franzosa et al., 2018), SAMSA (Westreich et al., 2016), SAMSA2 (Westreich et al., 2018), MetaTrans (Martinez et al., 2016), mOTU's program (Heintz-Buschart et al., 2016; Milanese et al., 2019).

Ограничения метатранскриптомного анализа связаны с тем, что в процессе выделения тотальной РНК наибольшей концентрацией обладают молекулы рРНК, и это может негативным образом влиять на возможность выделять мРНК. мРНК молекулы,

которые являются основной целью RNA-seq подхода, довольно нестабильны. Последовательное разрушение их структуры является запрограммированным и энергетически структурированным клеточным процессом, катализируемым специфическими рибонуклеазами (экзо- или эндонуклеазы). Процесс может быть сопряжен с транскрипцией. Контроль стабильности мРНК является адаптивным механизмом при регуляции экспрессии генов. Концентрация мРНК может влиять на деградацию данной структуры (Nouaille et al., 2017). Было разработано определенное количество методов для измерения периода деградации мРНК (Lugowski et al., 2018). Расчёт оптимальных показателей концентрации, размера молекул и удаление рРНК предотвращает деградацию мРНК. Это следует учитывать в ходе обработки данных.

Цель исследования: обобщение данных об опыте использования метагеномного и метатранскриптомного анализа микробиома при заболеваниях легочной системы.

Материалы и методы

Поиск был выполнен с использованием электронных баз данных, включая MedLine, PubMed, TOXLINE и Web of Science. Описанные данные являются результатом поиска и использования литературных источников, опубликованных до сентября 2020 года.

Были использованы ключевые слова и термины, необходимые для поиска: метатранскриптомика, метагеномные исследования, бактериальный транскриптом, секвенирование 16S рРНК, секвенирование РНК (RNA-seq), легочные заболевания, хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ), рак лёгкого (РЛ), муковисцидоз, астма. Были включены исследования, полный текст которых был опубликован на английском или русском языках.

Из анализа были исключены публикации, направленные на рассмотрение общих вопросов молекулярных, генетических и цитогенетических основ развития легочных заболеваний. В данной работе основное внимание уделялось исследованиям микробиома путем метагеномного и метатранскриптомного анализа при таких легочных заболеваниях, как рак лёгкого (РЛ), хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ), муковисцидоз и астма. 13 научных работ были посвящены исследованию ХОБЛ, 14 научных публикаций содержали информацию о вкладе микробиома в развитие РЛ, 7 работ были посвящены изучению муковисцидоза и 12 – астме. В обсуждение была включена информация о молекулярных методах и биоинформатическом анализе, которые могут быть применены в метагеномном и метатранскриптомном подходах. Были также описаны возможные риски и ограничения, связанные с применением двух видов анализа.

Применение метагеномных и метатранскриптомных исследований в изучении болезней легочной системы

Легочные заболевания относятся к патологиям, которые обуславливают высокие показатели заболеваемости и смертности среди населения. Их развитие может быть сопряжено с активностью микробиоты легочной системы (рис. 3). Применение высокопроизводительных технологий секвенирования позволяет проводить характеристику нормального микробиомного профиля разных отделов дыхательной системы человека. Согласно результатам исследований, проведенных несколькими независимыми научными группами, микробиота лёгких характеризуется высокой степенью филогенетического разнообразия (Kovaleva et al., 2019). *Bacteroidetes* и *Firmicutes* являются преобладающими ти-

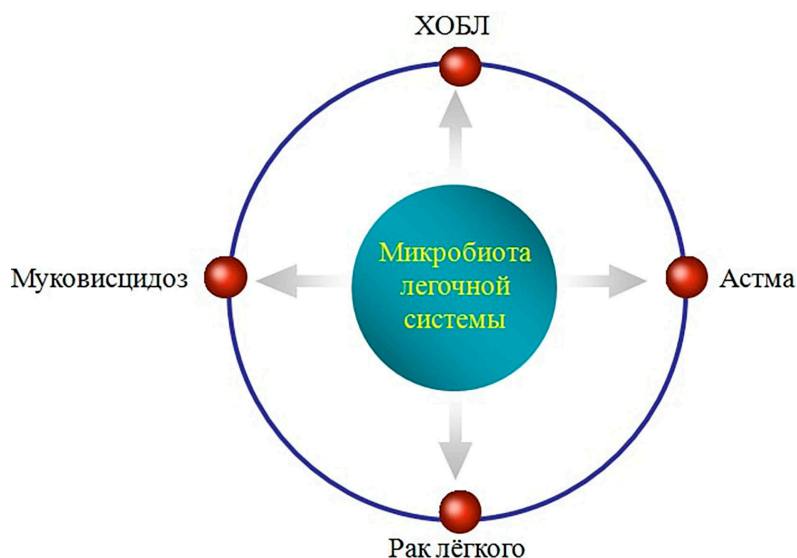


Рис. 3. Развитие патологий легочной системы под действием микробиоты

Fig. 3. Development of lung system pathologies caused by microbiota

пами бактерий в составе лёгких (Segal, Blaser, 2014). Для нормальной микробиоты лёгких также характерно наличие бактериальных родов *Prevotella* и *Veillonella*. Анализ бактериальных генов 16S рРНК при использовании Oxford Nanopore MiniION секвенирования и прокариотических баз данных MegaBLAST и EZ BioCloud позволил идентифицировать основные таксоны, обитающие в респираторном тракте человека (Ibironke et al., 2020). В качестве основных доминирующих бактериальных типов были определены *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Fusobacteria*. Видовая структура была представлена в основном таксонами *Veillonella dispar*, *Veillonella atypia*, *Streptococcus infantis* и *Streptococcus mitis*. Было отмечено, что около 95 % бактериальных таксонов, обнаруженных в респираторном тракте, могли мигрировать из других отделов легочной системы.

Муковисцидоз

Муковисцидоз поражает респираторный тракт и снижает дыхательную функцию лёг-

ких. Заболевание относится к наследственным, аутосомно-рецессивным моногенным патологиям, связанным с наличием мутаций в гене *CFTR*. Данный ген кодирует белок – трансмембранный регулятор проводимости, нарушение его активности способствует сгущению секретов желез внутренней секреции, что создаёт условия для активного размножения определенных бактерий. Патогенез муковисцидоза неразрывно связан с активностью компонентов микробиоты (бактерий, вирусов и грибов), населяющих мукозальный слой респираторного тракта. С применением методов секвенирования нового поколения была составлена подробная характеристика состава легочной микробиоты у пациентов с наличием муковисцидоза (Frost et al., 2020).

Одним из видов осложнений муковисцидоза является хронический синусит. В развитие подобных состояний потенциальный вклад могут вносить сообщества микроорганизмов микробиоты верхних и нижних дыхательных путей. Свойства микробиоты респираторного тракта были оценены у боль-

ных муковисцидозом, которые получали лечение от хронического синусита (Lucas et al., 2018). В ходе данной работы был сопоставлен уровень бактериального разнообразия, а также особенности состава микробиоты разных отделов легочной системы. Степень разнообразия микроорганизмов была выше в составе верхних дыхательных путей при сопоставлении с микробиотой лёгких. При анализе OTU's наиболее распространенными таксонами были определены *Pseudomonas*, *Streptococcus* и *Staphylococcus*, микробиота лёгких была обогащена родами *Pseudomonas*, *Prevotella* и *Veilonella*. В данном случае наблюдалось явление колонизации лёгких бактериальными патогенами, которые могли транспортироваться из респираторного тракта. Развитие побочных патологических состояний, ассоциированных с муковисцидозом, происходит при анаэробнозе, вследствие повышения численности аэробных бактерий.

Было проведено метагеномное исследование легочной микробиоты детей с муковисцидозом на ранних стадиях его развития (Jorth et al., 2019). При исследовании образцов бронхоальвеолярного лаважа были обнаружены сообщества микроорганизмов, содержавших в своём составе патогенов ротовой полости. В их качестве были определены представители семейства *Alcaligenaceae*, которые включали рода *Achromobacter*, *Bukholderia* и *Bordetella*. Развитие инфекционных состояний, ассоциированных с муковисцидозом, таким образом, могло происходить при низком содержании *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veilonella* и повышении численности бактерий семейства *Alcaligenaceae*.

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* относятся к наиболее распространённым микроорганизмам, которые обеспечивают развитие инфекционных процессов, ассоциированных с муковисцидозом. В связи с этим исполь-

зуется специфическая терапия с участием антибиотиков, направленная на элиминацию данных патогенов. С другой стороны, были получены данные о возможном изменении представленности других компонентов легочной микробиоты в ходе терапии (Kramna et al., 2018). В исследовании использовался материал детей, больных муковисцидозом с наличием хронической инфекции, связанной с бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. Применение антипсевдомональной терапии способствовало уменьшению представленности некоторых бактериальных видов, включая *Streptococcus aureus* и *Streptococcus mitis*. В ходе анализа было также отмечено повышение содержания бактерий вида *Granulicatella* sp., что влияло на показатели объёма форсированного выдоха. Острые состояния патогенеза муковисцидоза могут быть связаны и с фунгиальной инфекцией. Грибы рода *Aspergillus* заселяют легочную систему пациентов с муковисцидозом и провоцируют возникновение состояний резистентности (Warris, 2019). Более 60 % больных муковисцидозом могут быть носителями *Aspergillus fumigates*, которые способствуют нарушению функциональной активности лёгких по причине активных воспалительных реакций.

Данное заболевание является хорошей моделью для тестирования метагеномных и метатранскриптомных технологий для выявления совместного вклада бактериального и вирусного компонента в развитие муковисцидоза (Lim et al., 2013). Объектом исследования являлись пробы мокроты, из которых выделялись нуклеиновые кислоты. По результатам исследования было отмечено влияние наличия ДНК организма-хозяина на уменьшение концентрации микробной ДНК при её выделении. Секвенирование генов 16S рРНК выявило снижение численности *Pseudomonas aeruginosa* в составе проб,

взятых от пациентов с муковисцидозом. Секвенирование вирусных генов позволило установить присутствие и роль фаговых частиц, бактериальных вирусов, которые способны инфицировать патогенные микроорганизмы, задействованные в прогрессировании муковисцидоза. Полномасштабное исследование особенностей микробиома в ходе развития данной патологии предполагает в дальнейшем объединение анализа метагенома, метатранскриптома и вирома.

Динамика состава микробных сообществ может определяться разными клиническими проявлениями муковисцидоза, обусловленными применением лекарственных препаратов и развитием острых проявлений болезни. Для детального тестирования подобных свойств было проведено комплексное исследование, включающее стандартный метагеномный анализ и мультимиксный этап (исследования метаболома) (Hahn et al., 2020). Работа предполагала изучение динамики микробных сообществ у 14 пациентов с муковисцидозом в течение 12-месячного периода, а также выявление ассоциации между спецификой состава микробиоты и изменением метаболома. В процессе лечения муковисцидоза бактерии типа *Bacteroidetes* обладали меньшей численностью, чем представители *Stenotrophomonas*. Высокое содержание родов *Staphylococcus* и *Escherichia* было ассоциировано с повышением уровня метаболизма спиртов, в случае высокого содержания *Achromobacter* наблюдалось повышение синтеза окисленных органических метаболитов.

Хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ)

ХОБЛ – заболевание, которое связано с нарушением дыхательной функции и ограничением воздушного потока. Дисбиоз сообществ бактериальных микроорганизмов

усиливает патогенез ХОБЛ. В данном случае происходит активное размножение патогенных видов (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*), определяющих дальнейшее развитие деструктивных процессов в лёгких. Патологические состояния развиваются по причине синтеза и экспрессии токсичных продуктов жизнедеятельности бактерий, а также усиления воспалительных реакций.

Для установления профиля микробиоты дыхательных путей при ХОБЛ были использованы методы количественного культивирования и секвенирования генов 16S рРНК (технология Illumina MiSeq) (Brill et al., 2016). Применение обоих методов указало на повышение численности родов *Streptococcus*, *Haemophilus* (73 % и 61 %), представители бактериальных родов *Veillonella*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Prevotella* не были определены при использовании культивирования и имели низкие показатели численности (ниже 17 %) при секвенировании. В данном исследовании было отмечено, что в структуре микробиоты, ассоциированной с ХОБЛ, преобладают микроорганизмы, относящиеся к аэробам. Секвенирование 16S рРНК позволяло проводить характеристику компонентов микробиоты ХОБЛ, которые не могли быть установлены с помощью метода количественного культивирования.

Легочная эмфизема – одно из важных клинических проявлений ХОБЛ, развивается при условии изменения нормального состава бактериальных сообществ. Для детального исследования данной гипотезы проведена оценка состава бактериальной микробиоты в материале бронхоальвеолярного лаважа пациентов с пневмонией при использовании микробиологического культивирования и молекулярных методов метагеномного анали-

за (Naito et al., 2017). Молекулярные методы исследования микробиоты указали на высокую частоту встречаемости вида *Moraxella catarrhalis* у пациентов с острыми и средними проявлениями состояний пневмонии, ассоциированной с ХОБЛ. Процентное содержание видов *Haemophilus influenzae* и *Pseudomonas aeruginosa* не было связано с развитием эмфиземы определенной степени тяжести. Методы метагеномного анализа были также наиболее эффективны при детекции видов *Streptococcus angiosus* и *Streptococcus pneumoniae*, которые могли вносить вклад в развитие эмфиземы. Соответственно, представители *Moraxella catarrhalis* могут в большинстве случаев выступать в качестве факторов, повышающих риск возникновения осложнений, связанных с ХОБЛ.

Возникновение острых состояний ХОБЛ, а также различных осложнений, ассоциированных с данной патологией, может быть связано с колонизацией респираторного тракта бактериями *Pseudomonas aeruginosa* (Garcia-Nunez et al., 2015). Усиление патогенеза ХОБЛ в данном случае может происходить по причине способности бактерий к синтезу биоплёнок. В проведенном исследовании материал мокроты был получен от 21 пациента с ХОБЛ со стабильными и острыми проявлениями данной патологии. Проводилась оценка способности образования биоплёнки бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. В результате было отмечено, что высокий уровень их синтеза способствует повышению бактериального разнообразия микробиоты, что было определено при подсчёте OTU's. Увеличение численности определенных бактерий может усиливать острые проявления ХОБЛ.

При установлении роли микробиоты в прогрессировании острой формы ХОБЛ был использован материал легочной ткани пациентов (Pragman et al., 2018). Бактериальная

ДНК также выделялась из материала соскоба верхних дыхательных путей. В результате *Streptococcus* был доминирующим таксоном вне зависимости от специфики анализируемого материала. После проведения анализа главных координат (PCoA) были установлены таксоны, присутствие которых было специфично для определенной части легочной системы. Рода *Alloiococcus*, *Corynebacterium* и *Staphylococcus* имели высокую численность в материале соскобов верхних дыхательных путей, с легочной тканью были ассоциированы *Actinomycetales*, *Streptococcus* и *Rothia*. Анализ структуры микробиоты ХОБЛ позволил установить наличие высокой степени сходства между анализируемыми материалами. Несмотря на высокую степень информативности легочной ткани, в качестве предиктивных маркеров развития острой формы ХОБЛ могут также выступать сообщества микроорганизмов верхних дыхательных путей.

Ранее также была установлена совокупная роль бактериального и фунгиального компонентов микробиоты в развитии острых проявлений ХОБЛ (Su et al., 2015). Динамика изменений структуры микробных сообществ мокроты исследовалась путём секвенирования V4 варибельного региона, а также региона внутреннего транскрибируемого участка (Internal Transcribed Spacer (ITS)). В составе бактериома рода *Acinetobacter*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veillonella* и *Actinomyces* были наиболее распространены у пациентов с ХОБЛ. В составе фунгиального компонента микробиоты преобладали *Candida*, *Phialosimplex*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* и *Eutypella*.

Острые деструктивные процессы в лёгких, ассоциированные с ХОБЛ, также сами могут быть фактором изменения состава микробиоты лёгких. При изучении данного явления присутствие бактериальных патогенов

в составе мокроты определялось с помощью секвенирования и количественной оценки экспрессии генов 16S рРНК (Jubenville et al., 2018). Значимые изменения состава микробиоты при острых проявлениях ХОБЛ были отмечены относительно типов *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Развитие наиболее деструктивных форм патологии обуславливали изменения численности представителей *Streptococcus* и *Moraxella*. Методами метагеномного анализа, а также количественной оценки экспрессии генов установлено наличие бактериальных видов, которые относятся к нативным патогенам (*Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*). Были также определены таксоны, повышение численности которых было характерно для определенной степени развития ХОБЛ. При острых проявлениях ХОБЛ доминировали *Streptococcus pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis*, вид *Haemophilus influenzae* преобладал при умеренном развитии ХОБЛ.

Усиление патогенеза ХОБЛ происходит по причине развития вентиляционных нарушений, возникающих в результате активности нативных патогенных микроорганизмов. Для раскрытия механизмов возникновения данных явлений было проведено исследование по оценке вариабельности паттернов орофарингеальной микробиоты (Карнаушкина и др., 2018). Динамика состава микробиоты оценивалась при проявлении разных вариантов патологических фенотипов ХОБЛ (хронический бронхит, эмфизема и смешанный тип). Было отмечено, что при развитии эмфиземы происходит повышение численности типов *Firmicutes*, *Anaerobivrio*, *Leuconostoc*, *Oceanobacillus*, *Phascolartobacterium*, *Tetragenococcus*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Novosphingobium*. Данные таксоны относятся к комменсальным микроорганизмам. У индивидов с проявлениями фенотипа

«хронический бронхит» отмечалось повышенная обсемененность бактериальными типами: *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. У данной группы также было обнаружено повышение численности представителей родов, относящихся к условно-патогенным бактериям: *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, *Bacillus* и *Gemella*. В качестве наиболее распространенных видов были определены *Prevotella melaninogenica*, *Rothia mucilaginosa* и *Veillonella parvula*. Бактерии типа *Firmicutes* и *Bacteroidetes* преобладали у пациентов с наличием смешанного фенотипа. Общий анализ орофарингеальной микробиоты указал на сильную корреляцию бактериальных таксонов (семейств) *Moraxellaceae*, *Peptococcaceae*, *Eubacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Staphylococcaceae* и *Actinomycetaceae* с ухудшением течения ХОБЛ и прогрессированием неблагоприятных патологических деструктивных процессов.

В качестве одного из потенциальных факторов развития ХОБЛ активно рассматривается курение. Для полного понимания его вклада в развитие дисбиоза при ХОБЛ было проведено метагеномное секвенирование материала мокроты 124 проб здоровых индивидов (28 курящих и 92 некурящих с нормальной функциональной активностью лёгких) и материала 218 пациентов с ХОБЛ, отобранного в клинических центрах и являющегося частью данных консорциума COPDMAP (Haldar et al., 2020). У здоровых индивидов вне зависимости от статуса курения наиболее преобладали (выше 88 % от общего числа полученных прочтений) типы *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*, а также рода *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Actinomyces* и *Rothia*. *Proteobacteria* рассматривался в качестве доминантного типа в со-

ставе микробиоты пациентов с ХОБЛ, рода *Haemophilus* и *Moraxella* имели пониженные показатели процентного содержания. Однако при сопоставлении данных здоровых индивидов и пациентов с ХОБЛ в зависимости от статуса курения значимых различий выявлено не было. Следует предположить, что различия между структурой микробиоты пациентов с ХОБЛ и здоровых индивидов не зависят от статуса курения.

Применение секвенирования полной длины генов может улучшать степень глубины анализа и выявлять подробную видовую структуру микробиоты. Подобный подход был использован при изучении вклада микробиоты верхних дыхательных путей при развитии ХОБЛ (Wang et al., 2020a). Материал мокроты был отобран от 98 пациентов с наличием стабильных проявлений ХОБЛ, а также от 27 здоровых индивидов для дальнейшего секвенирования полной длины последовательностей генов 16S рРНК с помощью высокопроизводительных технологий Pacific Biosciences. Проявление продолжительных острых фаз данной патологии было связано с присутствием вида *Ralstonia mannitolilytica*. В ходе анализа также были идентифицированы бактериальные виды, которые являются индукторами воспалительных реакций при проявлении разных патологических фенотипов ХОБЛ (эозинофильного и нейтрофильного). Виды *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Neisseria meningitidis* были ассоциированы с повышением экспрессии Th1, Th17 и других провоспалительных медиаторов. Представители вида *Tropheryma whipplei* способствовали активации факторов эозинофильного типа. Исследование внутригенных аллелей 16S рРНК позволило определить структуру бактериальных линий внутри соответствующих родов. Линии 86–02NP, PittGG, которые относятся

к виду *Haemophilus influenza*, были связаны с активацией хемокинов CCL17 и CCL13, что также могло предопределять развитие ХОБЛ по эозинофильному типу.

В настоящее время есть примеры применения метатранскриптомного анализа для изучения активной части микробиоты в процессе развития ХОБЛ (Ren et al., 2018). Например, в работе Ren с коллегами, опубликованной в 2018 году, сравнивали метатранскриптомы проб бронхоальвеолярной жидкости пациентов с острой формой ХОБЛ с материалом здоровых доноров (без наличия легочных заболеваний). Для обработки метатранскриптомных данных использовались программы Trimmomatic, Bowtie2 и SortMeRNA. Таксономическая аннотация прочтений выполнялась с использованием алгоритма картирования BLASTN и базы данных NCBI (National Center for Biotechnological Information). Профиль микробиома был дополнительно охарактеризован в метагеномном исследовании, при помощи анализа генов 16S рРНК. С этой целью консервативные V3-V4 участки гена 16S рРНК были амплифицированы и секвенированы. Данные анализировались на основе баз Mothur и SILVA. Секвенирование метагенома и метатранскриптома показало взаимоподтверждающие результаты, выявило присутствие одинакового числа бактериальных родов, равное 28. Однако данные анализов, полученных с использованием этих двух подходов, разошлись в том, какие именно таксоны присутствовали в пробах. 16S рРНК анализ указал на присутствие представителей рода *Acinetobacter* у пациентов с наличием ХОБЛ, в то время как метатранскриптомный подход позволил детектировать наличие родов *Ralstonia* и *Pseudomonas*.

В ещё одном исследовании оценили вклад определенных таксонов в развитие лёгкой и тяжёлой форм ХОБЛ средствами мета-

транскриптомного анализа (Lee et al., 2016). Хотя в пробах мокроты у пациентов с разными формами ХОБЛ уровень был повышен для одних и тех же типов бактерий, для таксонов *Bacteroides*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes* процентное содержание отличалось. В составе проб тяжелой формы ХОБЛ представители таксона *Prevotella* были наиболее часто встречающимися компонентами, в то время как представленность бактерий рода *Acinetobacter* уменьшалась. У группы пациентов с лёгкой формой ХОБЛ было обнаружено повышение уровня бактерий типов *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Таким образом, метатранскриптомный анализ в проведенном исследовании показал, что представители типа *Proteobacteria* в равной степени обладали повышенным содержанием при развитии как лёгкой, так и тяжелой форм ХОБЛ. Однако были найдены различия на уровне рода. Бактерии родов *Haemophilus*, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Prevotella* и *Porphyromonas* характеризовались наибольшей численностью в пробах тяжёлой формы ХОБЛ по сравнению с лёгкой. Пробы, полученные от пациентов с наличием лёгкой формы данного заболевания главным образом содержали рода *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia* и *Porphyromonas*.

Для получения и дальнейшего анализа данных метатранскриптома важен правильный выбор биологического материала. Для изучения особенностей микробиома ХОБЛ является целесообразным использование мокроты (Ditz et al., 2020). Использование мокроты имеет как преимущества, так и ограничения. К преимуществам можно отнести то, что процедура забора проб осуществляется неинвазивно, материал позволяет охарактеризовать полный состав микробиома лёгких, в то время как пробы буккального эпителия, слюны или орофарингеальных маз-

ков позволяют исследовать наличие только специфических бактерий. Для успешного метатранскриптомного анализа следует стандартизировать этапы отбора проб и выделения РНК, следует оптимизировать биоинформатический анализ с учётом особенностей анализируемой биологической жидкости.

Определение функциональной значимости микробиоты легочной системы при развитии ХОБЛ становится возможным при проведении мультиомиксных исследований. В соответствии с этим был проведен метаанализ крупных репозиторий с наличием данных о метагеноме и транскриптоме ХОБЛ (Wang et al., 2020b). Метаанализ метагеномных исследований ХОБЛ позволил определить наиболее распространенные бактериальные рода: *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Moraxella* и *Lactobacillus*. Для ХОБЛ также было характерно понижение встречаемости *Selenomonas*, *Leptotrichia*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Campylobacter*, *Catonella* и *Prevotella*. Средствами пакета программ PICRUST-2 был проведен анализ изменений экспрессии генов, которые происходили под действием активности микробиоты. Было определено повышение уровня экспрессии 17 генов, вовлеченных в биотрансформацию ксенобиотиков, метаболизм углеводов, пептидогликанов и аминокислот. Таксоны *Haemophilus*, *Moraxella* и *Streptococcus* способствовали повышению экспрессии этих генов. 9 генов были задействованы в биосинтезе вторичных метаболитов, липидов и жирных кислот, комменсальные бактериальные рода *Veilonella* и *Prevotella*, которые обладали пониженной численностью у пациентов с ХОБЛ, вносили значимый вклад в контроль экспрессии данной группы генов. С помощью метода PRMT (Predictive Relative Metabolic Turnover) был исследован вклад специфического состава микробиоты в изменение осо-

бенностей метаболизма при развитии ХОБЛ. Для патологических состояний была отмечена характерная активация метаболических путей, связанных с синтезом пальмитата и N-ацетил-D-маннозамина, а также нарушением синтеза D-аспартата.

Астма

Астма относится к наиболее распространенным хроническим заболеваниям. Ключевым моментом его развития является образование бронхоспазмов, в результате сужения просвета бронхов. Дыхательная функция нарушается по причине активации иммунологических и других неспецифических механизмов. Бронхиальная астма обуславливает наиболее высокие показатели заболеваемости и смертности среди населения. Для исследования этиологии данного заболевания целесообразным является установление вклада микробиома легочной системы.

Метагеномные исследования микробиоты позволяют выработать новые подходы по диагностике и лечению астмы (Huang, 2013). Наибольшее внимание сфокусировано на особенностях состава микробиоты дыхательных путей и кишечника, а также на взаимодействии их компонентов с факторами окружающей среды. Развитие детской астмы может происходить по причине наличия специфических особенностей разнообразия микробиоты дыхательных путей (Thorsen et al., 2019). Секвенирование ампликонов 16S рРНК, полученных от 700 детей с диагнозом астма, позволило установить структуру микробиоты в течение первых трёх месяцев жизни. Бактериальные рода *Veilonella* и *Prevotella* были ассоциированы с проявлением патологических состояний начиная с первого месяца. Повышенное содержание этих микроорганизмов было связано с понижением экспрессии ФНО- α и ИЛ-1 β , а также

активацией хемокинов CCL2 и CCL17. Проведенное исследование указывает на взаимодействие микробиоты дыхательных путей с компонентами иммунитета. Это явление может рассматриваться как один из потенциальных механизмов развития детской астмы.

Материал детей и взрослых с наличием астмы был исследован в течение проявления патологии и стабильного состояния здоровья (Perez-Losada et al., 2017). У участников эксперимента отбирался материал назофарингеальных смывов, технологии секвенирования нового поколения использовались для исследования V4 региона 16S рРНК. Более 86 % полученных в ходе секвенирования последовательностей соответствовали бактериальным родам *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Dolosigranulum*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Fusobacterium* и *Nisseriaceae*. Эти таксоны были идентифицированы как у детей, так и у взрослых в разных пропорциях. Сезонная динамика (летний и осенний периоды) микробиоты дыхательных путей была связана с вариабельностью показателей родов *Haemophilus*, *Moraxella*, *Staphylococcus* и *Corynebacterium*.

На примере детской астмы было проведено исследование влияния микробиоты верхних дыхательных путей на патофизиологические особенности развития данного заболевания (Zhou et al., 2019). 319 проб назальных мазков были отобраны при развитии лёгкой формы астмы, а также при проявлении обострённых состояний заболевания. Наличие повышенных показателей комменсальных бактериальных родов *Corynebacterium* и *Dolosigranulum* способствовало понижению вероятности развития острой формы астмы. Повышение численности бактерий рода *Moraxella* увеличивало риск возникновения усиленного патогенеза и развития острых состояний астмы. Представители рода

Corynebacterium могли рассматриваться в качестве протективных компонентов микробиоты дыхательных путей.

Ранее при проведении исследований назальной микробиоты были выявлены основные таксоны, которые характерны для состояний детской астмы (Perez-Losada et al., 2018). Анализ кластеров OTU's выявил повышенное содержание (более 95 %) патогенных бактериальных родов *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Haemophilus*. Бактериальные типы *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, а также рода *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Dolosigranulum* и *Prevotella*, в данном исследовании характеризовались высокой степенью вариабельности в зависимости от наличия определенного патоморфологического профиля астмы и других клинических проявлений.

Анализ состава микробиоты дыхательных путей также позволяет оценить механизмы развития разных типов астмы. Был использован материал мокроты 24 пациентов с наличием астмы (10 с диагнозом эозинофильная астма и 12 пациентов с астмой, не связанной с эозинофилией), а также 12 здоровых доноров (Pang et al., 2019). Пациенты с разными типами астмы отличались по 6 бактериальным родам: рода *Claciicola* и *Helicobacter* были наиболее распространены у больных эозинофильной астмой, *Deinococcus*, *Scardovia*, *Bifidobacterium* и *Desulphobulbus* были ассоциированы с развитием неэозинофильной формы. Функциональный анализ микробиоты с помощью базы данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) в данном исследовании установил возможность влияния микроорганизмов на экспрессию генов, вовлечённых в развитие других заболеваний. К ним относятся инфекционные патологии, болезни иммунной системы, а также нарушения метаболизма.

Проведение характеристики состава орофарингеальной микробиоты позволяет выявить роль микроорганизмов легочной системы в развитии бронхиальной астмы и других хронических заболеваний лёгких (Огородова и др., 2015). Микробиота пациентов с острой формой бронхиальной астмы содержала пониженные показатели численности представителей рода *Prevotella* на фоне повышения представленности бактериальных родов *Odoribacter*, *Alloiococcus*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Parvimonas*, *Sneathia*, а также видов *Bifidobacterium longum*, *Prevotella nancienensis*, *Neisseria cinerea*, *Aggregatibacter segnis*. Эти различия указывают на изменение специфического состава бактериальных сообществ при развитии астмы разной степени тяжести. Выявленные в данном исследовании таксоны могут рассматриваться в качестве клинических маркеров при диагностике данной патологии.

Недавнее исследование охарактеризовало влияние состава назальной микробиоты на развитие астмы разной степени тяжести у взрослых пациентов (Fazlollahi et al., 2018). Секвенирование генов рибосомальной РНК 72 человек (20 с проявлением тяжелой формы астмы, 31 с наличием лёгкой формы заболевания и 21 здоровых контролей) было выполнено для описания профиля орофарингеальной микробиоты. Методы статистики PERMANOVA определили бактериальные типы *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* в качестве наиболее распространенных таксонов у пациентов с развитием астмы. В составе назальной микробиоты пациентов с проявлениями тяжелой формы астмы было характерно наличие *Prevotella*, *Alkanindiges* и *Gardnerella*, содержание рода *Dialister* было значимо выше у больных лёгкой формой. Для выявления бактериальных видов, вносящих значимый вклад в развитие определенной формы аст-

мы был проведён анализ OTU's с помощью LEfSe метода, а также линейный дискриминантный анализ. В результате присутствие таких видов, как *Prevotella buccalis*, *Dialister invisus*, *Gardnerella vaginalis* и *Alkanindiges hongkongensis*, было наиболее характерно для микробиоты, ассоциированной с острыми проявлениями астмы. Проведенная оценка экспрессии генов 16S рРНК указала на повышенные показатели таксонов *Prevotella buccalis* и *Gardnerella vaginalis* у пациентов с наличием астмы.

В настоящее время множество информации получено о влиянии дисбиоза орофарингеальной микробиоты на развитие усиленных воспалительных реакций, способствующих возникновению патогенетических состояний астмы. В качестве возможного механизма также могут быть рассмотрены особенности взаимодействия бактериального и фунгиального компонентов микробиоты мокроты (Liu et al., 2020). С целью анализа использовался материал мокроты 116 пациентов со стабильными проявлениями астмы и 29 здоровых индивидов. Ген 16S рРНК использовался для установления структуры бактериальных сообществ, для характеристики фунгиальных сообществ исследовался ITS 1 регион. Микробные рода *Moraxella*, *Capnocytophaga*, *Ralstonia* (бактериальный микробиом), а также *Schizophyllum*, *Candida*, *Phialemoniopsis* (фунгиальный микробиом) были наиболее характерны для пациентов с астмой, микробиота легочной системы здоровых людей была обогащена бактериальными родами *Rothia*, *Veillonella* и *Leptotrichia*, а также фунгиальным родом *Mezeryozyma*.

Свойства фунгиальной микробиоты могут предопределять развитие эозинофильной и нейтрофильной астмы (Sharma et al., 2019). Влияние микробиоты в данном случае связано с активацией воспалительного пути эо-

зинофильного типа, умеренная активность обуславливает возникновение нейтрофильного типа астмы. При анализе материала бронхоэндотелиального соскоба отмечено более высокое разнообразие таксонов у пациентов с эозинофильным типом воспаления, *Trichoderma* был определен в качестве наиболее распространенного фунгиального рода. Для проявлений нейтрофильной астмы было характерно повышение численности грибов рода *Penicillium*. В составе фунгиальной микробиоты бронхоальвеолярного лаважа доминирующими родами были *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*.

С целью исследования этиологии астмы был выполнен транскриптомный анализ генов организма человека и микробиоты верхних дыхательных путей (Perez-Losada et al., 2015). Сравнивались данные транскриптомного и метатранскриптомного анализа 8 пациентов с астмой и 6 здоровых индивидов. В качестве референсной базы данных использовался репозиторий NCBI-NR. Оценивались изменения в метаболических процессах и вклад микробных генов в эти биохимические пути с использованием ресурсов COG, SEED и KEGG. Методы мультивариационной статистики использовались для раскрытия особенностей состава микробных сообществ и экспрессии генов человеческого организма. Результаты исследования позволили идентифицировать представителей семейства *Moraxellaceae* – бактерий *Moraxella catarrhalis* – как основных индукторов патогенных процессов во время развития астмы. *M. catarrhalis* были уже определены в качестве основных этиологических факторов развития астмы у детей (Teo et al., 2015). Дисбаланс метаболических реакций уже был указан в качестве основного фактора развития заболеваний, в частности синдрома раздражённого кишечника (IBD), в развитии которого роль микробиоты была установле-

на. В настоящее время становится всё более очевидным, что бактериальные гены, вовлеченные в процессы метаболизма, экспрессии транспортных белков и факторов адгезии, могут вносить вклад в патогенез астмы.

Рак лёгкого (РЛ)

В настоящее время РЛ рассматривается как группа заболеваний, обуславливающих наиболее высокий уровень смертности в мире. Подверженность воздействию поллютантов, сигаретный дым и генетический полиморфизм могут рассматриваться как главные факторы предрасположенности к данной патологии. Нарушенная нормальная микробиота респираторного тракта или её патогенная составляющая способствуют развитию воспалительных реакций и усиливают прогрессию РЛ. Дисбаланс микробных сообществ может выражаться в понижении численности нейтральной или комменсальной компоненты бактериома и повышении активности патогенных бактериальных видов.

Было проведено исследование по определению различий состава легочной микробиоты при развитии плоскоклеточного типа РЛ и аденокарциномы (Gomes et al., 2019). Разнообразие микроорганизмов было проанализировано в соответствии со статусом курения пациентов и степенью обструкции респираторного тракта. При анализе последовательностей 16S рРНК различия между пациентами с РЛ и здоровыми контролями были найдены на уровне бактериальных типов *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Среди родов значимых различий выявлено не было, в качестве наиболее распространенных таксонов в обеих группах сравнения были определены *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Actinomyces* и *Prevotella*. Анализ метатранскриптомных последовательностей указал на преобладание этих же

таксонов, однако были получены другие показатели их процентного содержания. Тип *Proteobacteria* обуславливал различия между микробиотой пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком, а также преобладал у мужчин и был ассоциирован с курением. Обобщенный метагеномный и метатранскриптомный анализ позволил установить корреляцию между специфическим составом микробиоты и развитием определенной гистопатологической группы РЛ.

Исследование механизма развития дисбиоза легочной микробиоты может существенно улучшить представления о развитии РЛ (Xu et al., 2020). В настоящее время в контексте исследований РЛ в особенности рассматривается дисбиоз микробиоты слюны, который может быть ассоциирован с системным воспалением и изменением особенностей экспрессии метаболитов (Zhang et al., 2019). С целью оценки значения дисбиоза микробиоты было проведено исследование, в котором был сопоставлен её таксономический состав у пациентов с РЛ и индивидов с наличием других незлокачественных заболеваний лёгких (Cheng et al., 2020). Значимые различия между группами сравнения были обнаружены посредством применения метода РСoA. В составе микробиоты, ассоциированной с развитием РЛ, были обнаружены микроорганизмы относящиеся к типу *TM7* и родам *Capnocytophaga*, *TM7-3*, *Sediminibacterium*, *Gemmiger*, *Balutia* и *Oscillospira*. Данные таксоны можно определить в качестве потенциальных маркеров развития РЛ. В ходе исследования также была проведена оценка активации метаболических путей микробиоты у разных групп пациентов. Анализ проводился с использованием базы данных KEGG с применением LEfSe метода. Группы бактерий больных РЛ характеризовались повышением активности

синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований. В составе контрольной группы было отмечено повышение активности метаболических путей, связанных с синтезом жгутиков, а также функционированием двухкомпонентной системы бактерий и их системы секреции.

Использование материала легочной ткани для исследования структуры микробиоты позволяет наиболее информативно исследовать потенциальные маркеры развития РЛ. Проведенная работа указала на отличия в структуре профиля микробиоты у курильщиков, больных РЛ, и у пациентов с наличием эмфиземы (Liu et al., 2018). Материал дистальной паренхимы лёгких был использован для выделения бактериальной ДНК, анализ таксономического состава проводился путём секвенирования переменного участка V4 гена 16S рРНК. Группы исследования включали в себя 40 курильщиков: 10 с диагнозом эмфизема, 11 с наличием РЛ, 19 человек характеризовались наличием обеих патологий. Анализ микробиоты показал, что в материале пациентов с эмфиземой была отмечена наименьшая степень разнообразия микроорганизмов. В то же время состав легочной микробиоты пациентов с РЛ (без или с наличием эмфиземы) характеризовался наименьшими значениями содержания бактерий типа *Proteobacteria* (преимущественно родов *Acinetobacter* и *Acidovorax*), а также повышением численности представителей типа *Firmicutes* (род *Streptococcus*) и *Bacteroidetes* (род *Prevotella*).

В одном из исследований удалось выявить влияние микробиома нормальных тканей легкого на безрецидивную выживаемость пациентов с РЛ (Peters et al., 2019). Были изучены парные образцы тканей легкого (опухолевая и нормальная ткань) у 19 пациентов с немелкоклеточным РЛ. Повы-

шение численности представителей семейства *Koribacteriaceae* в нормальных тканях наблюдалось у пациентов с большей продолжительностью жизни без рецидивов заболевания. Обогащенность нетрансформированных тканей легкого бактериями из семейств *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* была связана со снижением продолжительности жизни пациентов без рецидивов. В целом авторы делают вывод, что большое разнообразие микробиома нормальных тканей связано с уменьшением безрецидивной выживаемости больных.

При проведении сравнения профилей легочной микробиоты, ассоциированной с развитием РЛ и доброкачественными опухолями, были найдены статистически значимые различия (Choi et al., 2016). Материал бронхоальвеолярного лаважа использовался для анализа состава сообществ микроорганизмов методом секвенирования нового поколения 16S рибосомальных генов и системой MALDI-TOF MS. В ходе эксперимента участвовали 20 индивидов с диагнозом РЛ и 8 пациентов с наличием доброкачественных опухолей. У 13 пациентов была диагностирована аденокарцинома, у 5 плоскоклеточный рак, остальные 2 имели диагноз мелкоклеточный РЛ. Анализ таксономии позволил определить бактериальные типы *Firmicutes* и *TM7*, а также рода *Veillonella*, *Megasphaera*, *Atopobium* и *Selenomonas* в качестве наиболее распространенных у пациентов с РЛ. Бактериальный род *Veillonella* был идентифицирован с использованием метода MALDI-TOF MS у 14 пациентов с РЛ и 5 с наличием доброкачественных опухолей, представители рода *Megasphaera* были выявлены у 3 пациентов с РЛ, наличие представителей рода *Selenomonas* определено не было.

Микробные сообщества дыхательных путей также могут быть рассмотрены в каче-

стве модуляторов развития РЛ (Goto, 2020). Функционирование иммунной системы и специфика иммунной терапии РЛ может определяться активностью легочной микробиоты (Ramirez-Labrada et al., 2020). Проявление онкогенных свойств данных микроорганизмов связано с синтезом генотоксических факторов, взаимодействием с компонентами иммунной системы, а также клетками опухоли. Множественная активность микробиоты влияет на особенности иммунотерапии при применении ингибиторов сигнальных молекул (Shaikh et al., 2019).

Состав микробиоты может быть ассоциирован с развитием рецидивов после терапии на ранних стадиях. Состав легочной микробиоты был проанализирован с использованием материала бронхоальвеолярного лаважа и слюны, отобранных у пациентов до хирургического вмешательства (Patnaik et al., 2021). Также был использован материал опухолевых тканей, удалённых на первой стадии развития РЛ. Микробиота пациентов с наличием рецидивов значительно отличалась от таковой у больных РЛ без их проявления вне зависимости от гендерной принадлежности, статуса курения и возраста (при использовании материала бронхоальвеолярного лаважа). Специфический состав микробиоты, ассоциированный со снижением выживаемости при отсутствии рецидивов, способствовал усилению экспрессии опухолевых генов, необходимых для клеточной пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода. Состав клеток иммунной системы и микроокружение не отличалось у пациентов с разной степенью развития РЛ. Таким образом, исследование состава респираторной микробиоты перед оперативным вмешательством может предопределять специфичность терапии немелкоклеточного типа РЛ, а также позволять прогнозировать возможные рецидивы.

Недавнее исследование позволило оценить синергизм вклада легочной микробиоты и мутаций в гене *TP53* в развитие предрасположенности к РЛ (Greathouse et al., 2018). Для установления состава микробиома были использованы две стратегии анализа 16S рРНК. Результаты секвенирования 16S рРНК были сопоставлены с таковыми, полученными при использовании флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Общепринятый анализ 16S рРНК сопровождался интерпретацией результатов РНК-секвенирования с использованием базы The Cancer Genome Atlas (TCGA). Было выявлено увеличение численности бактерий типа *Proteobacteria* при одновременном уменьшении бактерий типа *Firmicutes*, оценивалось также бета-разнообразие. Состав микробиома варьировал в зависимости от вида РЛ и типа исследованной ткани, как следует из результатов статистической обработки с помощью метода анализа PERMANOVA. Данное исследование указало на равный вклад методов анализа 16S рРНК и RNA-seq в изучение вклада микробиома.

Развитие РЛ также связывают с реактивностью иммунной системы. Было показано, что комменсальная часть микробиоты может усиливать развитие онкогенеза путём активации $\gamma\delta$ Т-клеток адаптивной иммунной системы (Jin et al., 2019). $\gamma\delta$ Т-клетки в ответ на определённые виды бактерий начинают усиленно экспрессировать цитокины, что стимулирует развитие онкогенного микроокружения. Была показана ассоциативная связь между уровнем бактерий *Herbaspirillum* и *Sphingomonadaceae* и возникновением случаев РЛ, в то время как лёгкие здоровых доноров содержали значительно больше бактерий *Aggregatibacter* и *Lactobacillus*. Для выявления различий в представленности бактериальных таксонов в пробах РЛ (аденокарциномы и плоскоклеточной формы РЛ) и контролей использовали Path-seq

анализ. Path-seq является компьютерным алгоритмом, который основан на выравнивании геномных и транскриптомных последовательностей организма-хозяина и бактерий. Данный анализ показал, что со злокачественными процессами было связано повышение численности *Betaproteobacteria* and *Burkholderiales*, в то время как для здоровых лёгких характерно наличие *Gammaproteobacteria* and *Pseudomonadales*. Таким образом, совместно 16S рРНК анализ и использование базы данных TCGA позволило выявить компоненты микробиоты лёгких, ассоциированных с развитием РЛ.

Заключение

Интегрированный метагеномный и метатранскриптомный анализ микробиоты лёгких, использованный при изучении детской астмы и ХОБЛ, выявил положительную корреляцию результатов. Метагеномные данные, таким образом, могут использоваться в качестве дополнения к информации о транскриптоме микроорганизмов. Детальный метатранскриптомный анализ мокроты позволил установить, что пациенты с наследственными (муковисцидоз) и онкологическими заболеваниями лёгких (различные подтипы РЛ) характеризуются наличием уникального состава микробиоты, который, вероятно, способствует развитию воспалительных реакций и прогрессированию заболеваний. Выявлен синергизм вклада легочной микробиоты и мутаций в гене *TP53* в развитие предрасположенности к РЛ.

Данные метатранскриптомных исследований, помимо структуры таксономического состава микробиоты, содержат информацию о профиле активно экспрессирующихся генов микроорганизмов. Высокопроизводительные технологии RNA-seq позволяют идентифицировать ранее неизученные микроорганизмы на молекулярном уровне. Метатранскриптомный анализ дает возможность исследования метаболических путей, в которые вовлечены микроорганизмы, и позволяет осуществлять поиск функционально значимых компонентов некодирующей регуляторной части генома микроорганизмов. Становится возможным изучение новых генетических маркеров различных патологических состояний, механизмов инициации и прогрессирования заболеваний.

Несмотря на большое количество исследований, многие вопросы относительно роли микробиоты в патогенезе заболеваний остаются дискуссионными и далекими от своего разрешения. Международные научные проекты, такие как Integrative Human Microbiome Project – (iHMP), продемонстрировали эффективность мультиомиксных подходов. Использование метагеномики, метатранскриптомики, метаболомики и метапротеомики будет не только стимулировать применение новых высокотехнологичных методов в молекулярной биологии, но и позволит наиболее полно охарактеризовать сложную структуру микробиоты человека и её значимость в норме и патологии.

Список литературы/ References

Карнаушкина М. А., Федосенко С. В., Сазонов А. Э., Петров В. А., Овсянников Д. Ю., Огородова Л. М. (2018) Микробиологические орофарингеальные паттерны у больных различными фенотипами хронической обструктивной болезни лёгких. *Современные технологии в медицине*, 10(2): 101–109 [Karnaushkina M. A., Fedosenko S. V., Sazonov A. E., Petrov V. A., Ovsyannikov D. Yu., Ogorodova L. M. (2018) Microbiological oropharyngeal patterns in patients with different phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease. *Sovremennye Tehnologii v Medicine*, 10(2): 101–109 (in Russian)]

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. (2015) Сравнительный анализ орофарингеальной микробиоты у больных хронической обструктивной болезнью и бронхиальной астмой различной степени тяжести. *Вестник Российской Академии Медицинских Наук*, 70(6): 669–678 [Ogorodova L. M., Fedosenko S. V., Popenko A. S., Petrov V. A., Tyakht A. V., Saltykova I. V., Deev I. A., Kulikov E. S., Kirillova N. A., Govorun V. M., Kostryukova E. S. (2015) Comparison study of oropharyngeal microbiota in case of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease in different severity levels. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences [Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk]*, 70(6): 669–678 (in Russian)]

Barta J. A., Powell C. A., Wisnivesky J. P. (2019) Global epidemiology of lung cancer. *Annals of Global Health*, 85(1): 8

Bikel S., Valdez-Lara A., Cornejo-Granados F., Rico K., Canizales-Quinteros S., Soberón X., Del Pozo-Yauner L., Ochoa-Leyva A. (2015) Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a system-level understanding of human microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13: 390–401

Brill S., James P., Cuthbertson L., Cox M., Cookson W., Wedzicha J., Moffatt M. (2016) Profiling the COPD airway microbiome using quantitative culture and 16S rRNA gene sequencing. *European Respiratory Journal*, 48(suppl 60): OA1787

Cheng C., Wang Z., Wang J., Ding C., Sun C., Liu P., Xu X., Liu Y., Chen B., Gu B. (2020) Characterization of the lung microbiome and exploration of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 9(3): 693–704

Choi J., Pack M. S., Yong D. E., Sung J. Y., Lee S. H., Lee E. H., Park J. E., Shin M. H. (2016) Characterization of microbiome in patients with lung cancer comparing with benign mass-like lesions. *European Respiratory Journal*, 48(suppl 60): PA1208

Cozzuto L., Liu H., Prysycz L. P., Pulido T. H., Delgado-Tejedor A., Ponomarenko J., Novoa E. M. (2020) MasterOfPores: A workflow for the analysis of Oxford Nanopore Direct RNA sequencing datasets. *Frontiers in Genetics*, 11: 211

Ditz B., Christenson S., Rossen J., Brightling C., Kerstjens H. A. M., van den Berge M., Faiz A. (2020) Sputum microbiome profiling in COPD: beyond singular pathogen detection. *Thorax*, 75(4): 338–344

Fazlollahi M., Lee T. D., Andrade J., Oguntuyo K., Chun Y., Grishina G., Grishin A., Bunyavanich S. (2018) The nasal microbiome in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(3): 834–843.e2

Franzosa E. A., McIver L. J., Rahnavard G., Thompson L. R., Schirmer M., Weingart G., Lipson K., Knight R., Caporaso J. G., Segata N., Huttenhower C. (2018) Species-level functional profiling of metagenomes and metatranscriptomes. *Nature Methods*, 15(11): 962–968

Franzosa E. A., Morgan X. C., Segata N., Waldron L., Reyes J., Earl A. M., Giannoukos G., Boylan M. R., Ciulla D., Gevers D., Izard J., Garrett W. S., Chan A. T., Huttenhower C. (2014) Relating metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22): E 2329–E 2338

Frost F., Walshaw M. J., Nazareth D. (2020) Cystic fibrosis-related diabetes: an update. *QJM: An International Journal of Medicine*, hcaa256

- Garcia-Nuñez M., Marti S., Puig C., Perez-Brocal V., Millares L., Liñares F., Monso E. (2015) Influence of biofilm on the bronchial microbiome in COPD patients colonized or infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *European Respiratory Journal*, 46(suppl 59): PA5028
- Gomes S., Cavadas B., Ferreira J.C., Marques P.I., Monteiro C., Sucena M., Sousa C., Vaz Rodrigues L., Teixeira G., Pinto P., Tavares de Abreu T., Barbara C., Semedo J., Mota L., Carvalho A.S., Matthiesen R., Pereira L., Seixas S. (2019) Profiling of lung microbiota discloses differences in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, 9(1): 12838
- Goto T. (2020) Airway microbiota as a modulator of lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9): 3044
- Greathouse K.L., White J.R., Vargas A.J., Bliskovsky V.V., Beck J.A., von Muhlinen N., Polley E.C., Bowman E.D., Khan M.A., Robles A.I., Cooks T., Ryan B.M., Padgett N., Dzutsev A.H., Trinchieri G., Pineda M.A., Bilke S., Meltzer P.S., Hokenstad A.N., Stickrod T.M., Walther-Antonio M.R., Earl J.P., Mell J.C., Krol J.E., Balashov S.V., Bhat A.S., Ehrlich G.D., Valm A., Deming C., Conlan S., Oh J., Segre J.A., Harris C.C. (2018) Interaction between the microbiome and TP53 in human lung cancer. *Genome Biology*, 19(1): 123
- Hahn A., Bendall M.L., Gibson K.M., Chaney H., Sami I., Perez G.F., Koumbourlis A.C., McCaffrey T.A., Freishtat R.J., Crandall K.A. (2018) Benchmark evaluation of true single molecular sequencing to determine cystic fibrosis airway microbiome diversity. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1069
- Hahn A., Whiteson K., Davis T.J., Phan J., Sami I., Koumbourlis A.C., Freishtat R.J., Crandall K.A., Bean H.D. (2020) Longitudinal associations of the cystic fibrosis airway microbiome and volatile metabolites: a case study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 174
- Haldar K., George L., Wang Z., Mistry V., Ramsheh M.Y., Free R.C., John C., Reeve N.F., Miller B.E., Tal-Singer R., Webb A.J., Brookes A.J., Tobin M.D., Singh D., Donaldson G.C., Wedzicha J.A., Brown J.R., Barer M.R., Brightling C.E. (2020) The sputum microbiome is distinct between COPD and health, independent of smoking history. *Respiratory Research*, 21(1): 183
- Heintz-Buschart A., May P., Laczny C.C., Lebrun L.A., Bellora C., Krishna A., Wampach L., Schneider J.G., Hogan A., de Beaufort C., Wilmes P. (2016) Integrated multi-omics of the human gut microbiome in a case study of familial type 1 diabetes. *Nature Microbiology*, 2(1): 16180
- Huang Y.J. (2013) Asthma microbiome studies and the potential for new therapeutic strategies. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(5): 453–461
- Ibironke O., McGuinness L.R., Lu S.-E., Wang Y., Hussain S., Weisel C.P., Kerkhof L.J. (2020) Species-level evaluation of the human respiratory microbiome. *GigaScience*, 9(4): G1AA038
- Jin C., Lagoudas G.K., Zhao C., Bullman S., Bhutkar A., Hu B., Ameh S., Sandel D., Liang X.S., Mazzilli S., Whary M.T., Meyerson M., Germain R., Blainey P.C., Fox J.G., Jacks T. (2019) Commensal microbiota promote lung cancer development via $\gamma\delta$ T cells. *Cell*, 176(5): 998–1013.e16
- Jorth P., Ehsan Z., Rezayat A., Caldwell E., Pope C., Brewington J.J., Goss C.H., Benschoter D., Clancy J.P., Singh P.K. (2019) Direct lung sampling indicates that established pathogens dominate early infections in children with cystic fibrosis. *Cell Reports*, 27(4): 1190–1204.e3
- Jorth P., Turner K.H., Gumus P., Nizam N., Buduneli N., Whiteley M. (2014) Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *mBio*, 5(2): e01012–14
- Jubinville E., Veillette M., Milot J., Maltais F., Comeau A.M., Levesque R.C., Duchaine C. (2018) Exacerbation induces a microbiota shift in sputa of COPD patients. *PLoS One*, 13(3): e0194355

Kopylova E., Navas-Molina J.A., Mercier C., Xu Z.Z., Mahé F., He Y., Zhou H.-W., Rognes T., Caporaso J.G., Knight R. (2016) Open-source sequence clustering methods improve the state of the art. *mSystems*, 1(1): e00003–15

Kovaleva O. V., Romashin D., Zborovskaya I. B., Davydov M. M., Shogenov M. S., Gratchev A. (2019) Human lung microbiome on the way to cancer. *Journal of Immunology Research*, 2019: 1394191

Kramná L., Dřevínek P., Lin J., Kulich M., Cinek O. (2018) Changes in the lung bacteriome in relation to antipseudomonal therapy in children with cystic fibrosis. *Folia Microbiologica*, 63(2): 237–248

Lee S. W., Kuan C.-S., Wu L.S.-H., Weng J.T.-Y. (2016) Metagenome and metatranscriptome profiling of moderate and severe COPD sputum in Taiwanese han males. *PLoS One*, 11(7): e0159066

Lim Y. W., Schmieder R., Haynes M., Willner D., Furlan M., Youle M., Abbott K., Edwards R., Evangelista J., Conrad D., Rohwer F. (2013) Metagenomics and metatranscriptomics: windows on CF-associated viral and microbial communities. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(2): 154–164

Liu H.-Y., Li C.-X., Liang Z.-Y., Zhang S.-Y., Yang W.-Y., Ye Y.-M., Lin Y.-X., Chen R.-C., Zhou H.-W., Su J. (2020) The interactions of airway bacterial and fungal communities in clinically stable asthma. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1647

Liu Y., O'Brien J.L., Ajami N.J., Scheurer M.E., Amirian E.S., Armstrong G., Tsavachidis S., Thrift A.P., Jiao L., Wong M. C., Smith D.P., Spitz M.R., Bondy M.L., Petrosino J.F., Kheradmand F. (2018) Lung tissue microbial profile in lung cancer is distinct from emphysema. *American Journal of Cancer Research*, 8(9): 1775–1787

Lucas S.K., Yang R., Dunitz J.M., Boyer H.C., Hunter R.C. (2018) 16S rRNA gene sequencing reveals site-specific signatures of the upper and lower airways of cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, 17(2): 204–212

Lugowski A., Nicholson B., Rissland O.S. (2018) DRUID: a pipeline for transcriptome-wide measurements of mRNA stability. *RNA*, 24(5): 623–632

Maddi A., Sabharwal A., Violante T., Manuballa S., Genco R., Patnaik S., Yendamuri S. (2019) The microbiome and lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 11(1): 280–291

Martinez X., Pozuelo M., Pascal V., Campos D., Gut I., Gut M., Azpiroz F., Guarner F., Manichanh C. (2016) MetaTrans: an open source pipeline for metatranscriptomics. *Scientific Reports*, 6: 26447

Milanese A., Mende D.R., Paoli L., Salazar G., Ruscheweyh H.-J., Cuenca M., Hingamp P., Alves R., Costea P.I., Coelho L.P., Schmidt T.S.B., Almeida A., Mitchell A.L., Finn R.D., Huerta-Cepas J., Bork P., Zeller G., Sunagawa S. (2019) Microbial abundance, activity and population genomic profiling with mOTUs2. *Nature Communications*, 10(1): 1014

Naito K., Yamasaki K., Yatera K., Akata K., Noguchi S., Kawanami T., Fukuda K., Kido T., Ishimoto H., Mukae H. (2017) Bacteriological incidence in pneumonia patients with pulmonary emphysema: a bacterial floral analysis using the 16S ribosomal RNA gene in bronchoalveolar lavage fluid. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 12: 2111–2120

Nouaille S., Mondeil S., Finoux A.-L., Moulis C., Girbal L., Coccagn-Bousquet M. (2017) The stability of an mRNA is influenced by its concentration: a potential physical mechanism to regulate gene expression. *Nucleic Acids Research*, 45(20): 11711–11724

Pang Z., Wang G., Gibson P., Guan X., Zhang W., Zheng R., Chen F., Wang Z., Wang F. (2019) Airway microbiome in different inflammatory phenotypes of asthma: a cross-sectional study in Northeast China. *International Journal of Medical Sciences*, 16(3): 477–485

Patnaik S. K., Cortes E. G., Kannisto E. D., Punnaninont A., Dhillon S. S., Liu S., Yendamuri S. (2021) Lower airway bacterial microbiome may influence recurrence after resection of early-stage non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 161(2): 419–429.e16

Pérez-Losada M., Alamri L., Crandall K. A., Freishtat R. J. (2017) Nasopharyngeal microbiome diversity changes over time in children with asthma. *PLoS One*, 12(1): e0170543

Pérez-Losada M., Autelet K. J., Hoptay C. E., Kwak C., Crandall K. A., Freishtat R. J. (2018) Pediatric asthma comprises different phenotypic clusters with unique nasal microbiotas. *Microbiome*, 6(1): 179

Pérez-Losada M., Castro-Nallar E., Bendall M. L., Freishtat R. J., Crandall K. A. (2015) Dual transcriptomic profiling of host and microbiota during health and disease in pediatric asthma. *PLoS One*, 10(6): e0131819

Peters B. A., Hayes R. B., Goparaju C., Reid C., Pass H. I., Ahn J. (2019) The microbiome in lung cancer tissue and recurrence-free survival. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 28(4): 731–740

Pragman A. A., Lyu T., Baller J. A., Gould T. J., Kelly R. F., Reilly C. S., Isaacson R. E., Wendt C. H. (2018) The lung tissue microbiota of mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Microbiome*, 6(1): 7

Ramírez-Labrada A. G., Isla D., Artal A., Arias M., Rezusta A., Pardo J., Galvez E. M. (2020) The influence of lung microbiota on lung carcinogenesis, immunity, and immunotherapy. *Trends in Cancer*, 6(2): 86–97

Ren L., Zhang R., Rao J., Xiao Y., Zhang Z., Yang B., Cao D., Zhong H., Ning P., Shang Y., Li M., Gao Z., Wang J. (2018) Transcriptionally active lung microbiome and its association with bacterial biomass and host inflammatory status. *mSystems*, 3(5): e00199–18

Segal L. N., Blaser M. J. (2014) A brave new world: the lung microbiota in an era of change. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(suppl. 1): S 21–S 27

Semmouri I., De Schampheleere K. A. C., Mees J., Janssen C. R., Asselman J. (2020) Evaluating the potential of direct RNA nanopore sequencing: Metatranscriptomics highlights possible seasonal differences in a marine pelagic crustacean zooplankton community. *Marine Environmental Research*, 153: 104836

Shaikh F. Y., Gills J. J., Sears C. L. (2019) Impact of the microbiome on checkpoint inhibitor treatment in patients with non-small cell lung cancer and melanoma. *EBioMedicine*, 48: 642–647

Sharma A., Laxman B., Naureckas E. T., Hogarth D. K., Sperling A. I., Solway J., Ober C., Gilbert J. A., White S. R. (2019) Associations between fungal and bacterial microbiota of airways and asthma endotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 144(5): 1214–1227.e7

Su J., Liu H.-Y., Tan X.-L., Ji Y., Jiang Y.-X., Prabhakar M., Rong Z., Zhou H.-W., Zhang G.-X. (2015) Sputum bacterial and fungal dynamics during exacerbations of severe COPD. *PLoS One*, 10(7): e0130736

Teo S. M., Mok D., Pham K., Kusel M., Serralha M., Troy N., Holt B. J., Hales B. J., Walker M. L., Hollams E., Bochkov Yu. A., Grindle K., Johnson S. L., Gern J. E., Sly P. D., Holt P. G., Holt K. E., Inouye M. (2015) The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host and Microbe*, 17(5): 704–715

Thorsen J., Rasmussen M. A., Waage J., Mortensen M., Brejnrod A., Bønnelykke K., Chawes B. L., Brix S., Sorensen S. J., Stokholm J., Busgaard H. (2019) Infant airway microbiota and topical immune perturbations in the origins of childhood asthma. *Nature Communications*, 10(1): 5001

Větrovský T., Baldrian P. (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One*, 8(2): e57923

Wang Z., Liu H., Wang F., Yang Y., Wang X., Chen B., Stampfli M.R., Zhou H., Shu W., Brightling C. E., Liang Z., Chen R. (2020a) A refined view of airway microbiome in chronic obstructive pulmonary disease at species and strain-levels. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1758

Wang Z., Yang Y., Yan Z., Liu H., Chen B., Liang Z., Wang F., Miller B. E., Tal-Singer R., Yi X., Li J., Stampfli M. R., Zhou H., Brightling C. E., Brown J. R., Wu M., Chen R., Shu W. (2020b) Multi-omic meta-analysis identifies functional signatures of airway microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *ISME Journal*, 14(11): 2748–2765

Wang B., Yao M., Lv L., Ling Z., Li L. (2017) The human microbiota in health and disease. *Engineering*, 3(1): 71–82

Warris A. (2019) Immunopathology of *Aspergillus* infections in children with chronic granulomatous disease and cystic fibrosis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 38(5): E 96–E 98

Westreich S. T., Korf I., Mills D. A., Lemay D. G. (2016) SAMSA: a comprehensive metatranscriptome analysis pipeline. *BMC Bioinformatics*, 17(1): 399

Westreich S. T., Treiber M. L., Mills D. A., Korf I., Lemay D. G. (2018) SAMSA2: a standalone metatranscriptome analysis pipeline. *BMC Bioinformatics*, 19(1): 175

Wood D. E., Salzberg S. L. (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15(3): R 46

Xu N., Wang L., Li C., Ding C., Li C., Fan W., Cheng C., Gu B. (2020) Microbiota dysbiosis in lung cancer: evidence of association and potential mechanisms. *Translational Lung Cancer Research*, 9(4): 1554–1568

Zhang W., Luo J., Dong X., Zhao S., Hao Y., Peng C., Shi H., Zhou Y., Shan L., Sun Q., Li Y., Zhao X. (2019) Salivary microbial dysbiosis is associated with systemic inflammatory markers and predicted oral metabolites in non-small cell lung cancer patients. *Journal of Cancer*, 10(7): 1651–1662

Zhou Y., Jackson D., Bacharier L. B., Mager D., Boushey H., Castro M., Durack J., Huang Y., Lemanske R. F. Jr, Storch G. A., Weinstock G. M., Wylie K., Covar R., Fitzpatrick A. M., Phipatanakul W., Robison R. G., Beigelman A. (2019) The upper-airway microbiota and loss of asthma control among asthmatic children. *Nature Communications*, 10(1): 5714