

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ
И РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА»**

На правах рукописи

Орлова Елизавета Андреевна

**РОЛЬ САТЕЛЛИТНОЙ МИКРОБИОТЫ ТУБЕРКУЛЁЗНОГО ОЧАГА В
ПАТОГЕНЕЗЕ ГРАНУЛЁМАТОЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ**

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Огарков Олег Борисович

Иркутск – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ МИКРОБИОТЫ ЛЁГКИХ В ПАТОГЕНЕЗЕ ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
1.1. Патогенез туберкулёза на организменном, клеточном и молекулярном уровнях	14
1.1.1. Патогенез туберкулёза	14
1.1.2. Механизм формирования гранулёмы	16
1.1.3. Иммунопатогенез гранулёматозного воспаления.....	19
1.1.4. Биоплёнки микобактерий как фактор патогенности	26
1.2. Микробиота лёгких в норме и при патологических состояниях	29
1.2.1. Общая характеристика микробиоты лёгких.....	29
1.2.2. Микробиота лёгких и иммунитет	32
1.2.3. Микробиота лёгких как патогенетический фактор	36
1.2.4. Современные методы изучения микробиома лёгких	39
1.2.5. Отечественные исследования микробиоты нижних дыхательных путей при патологическом процессе	42
1.2.6. Микробиота лёгких при туберкулёзе.....	43
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Дизайн и объекты исследования	49
2.2. Методы исследования	54
2.2.1. Биоинформатический анализ микробного разнообразия лёгких	54
2.2.2. Микробиологические методы анализа	60
2.2.3. Иммунологические методы анализа	63
2.2.4. Программное обеспечение и методы статистической обработки данных	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ	69
3.1. Сравнительный анализ микробиоты туберкулёзных очагов и интактной ткани лёгкого	69
3.1.1. Особенности состава и структуры микробиоты	70
3.1.2. Прогноз функциональных профилей микробиоты.....	83
3.1.3. Исследование взаимосвязи клинических показателей с типом бактериального сообщества туберкулёзного очага	89
3.2. Фенотипические характеристики и иммуногенность микробиоты казеозного некроза туберкулём	93
3.2.1. Выделение и характеристика микроорганизмов из казеозного некроза туберкулём	94
3.2.2. Анализ клеточного иммунитета	99
3.2.3. Анализ гуморального иммунитета.....	110
3.2.4. Экспериментальная <i>in vitro</i> модель гранулёматозного воспаления, индуцированного <i>M. tuberculosis</i>	113

3.3. Влияние <i>C. kefirresidentii</i> и <i>S. epidermidis</i> из казеозного некроза туберкулём на рост микобактерий <i>in vitro</i>	118
3.3.1. Культивирование клинического штамма <i>M. tuberculosis</i> с клеточными лизатами <i>C. kefirresidentii</i> и <i>S. epidermidis</i>	118
3.3.2. Культивирование вакцинного штамма <i>M. bovis</i> var. BCG с живыми клетками <i>C. kefirresidentii</i>	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
ВЫВОДЫ	132
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	134
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	136
Приложение А	163
Приложение Б	169
Приложение В	171
Приложение Г	172

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Воспаление представляет собой типичный патологический процесс с двуединой природой: с одной стороны, оно выполняет саногенетическую роль, а с другой – может приводить к патологическим изменениям. Одной из форм хронического воспаления является гранулёматозное воспаление, при котором формируются гранулёмы – структуры, состоящие из макрофагов и других иммунных клеток, окружающих патогены или инородные тела, устойчивые к фагоцитозу. Гранулёматозное воспаление характерно для ряда заболеваний и является ключевым компонентом иммунного ответа при инфекции *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) [Ramakrishnan, 2012]. При туберкулёзе (ТБ) гранулёмы служат барьером, ограничивающим распространение МБТ [Cronan, 2022]. На сегодняшний день накоплено значительное количество клинических и экспериментальных данных, указывающих на двойственную природу гранулём, которые могут не только ограничивать инфекцию, но и приводить к негативным последствиям, влияя на течение заболевания и его исход [Orme et al., 2014; Orme et al., 2015; Brighenti et al., 2018]. Эти данные стали основой для пересмотра роли гранулёматозного воспаления в патогенезе ТБ, акцентируя внимание на его патологических аспектах [Orme, 2014; Hunter, 2016]. Однако несмотря на более чем 150-летнюю историю изучения ТБ, остаются пробелы в понимании причин формирования неадекватного иммунного ответа и патогенетических процессов, приводящих к некрозу и разжижению казеозных масс в гранулёмах.

С середины XX века внедрение антибиотикотерапии привело к значительным успехам в лечении ТБ и практически вытеснило хирургические методы лечения во многих западных странах. Однако с точки зрения фундаментальной фтизиатрии это затруднило изучение поздних стадий инфекции. Исследования на животных моделях имеют ряд ограничений, так как их результаты не всегда можно адекватно экстраполировать на человека из-за

морфологических и видоспецифических различий [Cronan, 2022]. Поэтому вопрос о механизмах разжижения некротического содержимого гранулём, способствующего развитию открытой формы ТБ и передаче инфекции, остаётся нерешённым с середины XX века. Именно тогда Жорж Канетти выдвинул ряд гипотез, пытаясь объяснить данный процесс, однако до сих пор эти предположения не получили окончательного подтверждения [Canetti, 1955]. Признано, что в этом патологическом процессе важную роль играет взаимодействие клеток иммунной системы с микобактериями, но остаётся неясной роль других микроорганизмов, населяющих лёгкие.

Современные метагеномные исследования опровергли прежние представления о стерильности лёгких и позволили детально изучить микробные сообщества нижних дыхательных путей (НДП) [Dickson et al., 2016; Man et al., 2017]. Лёгочная микробиота значительно отличается от микробных сообществ кишечника и верхних дыхательных путей (ВДП) низкой биомассой и представляет собой сателлитную микробиоту – спутниковые, неспецифические, транзиторные микроорганизмы, которые временно присутствуют в данном органе [Rogers et al., 2013; Natalini et al., 2022]. При патологических состояниях количество и состав сателлитной микробиоты могут изменяться, что способно приводить к устойчивой колонизации лёгких бактериями. Нарушение взаимодействия между микробиотой и организмом может оказывать влияние на патогенез различных заболеваний, и в настоящее время сателлитная микробиота рассматривается как важный фактор в развитии патологий лёгких [Morse et al., 2004; Koh et al., 2007; Svejic et al., 2011; Man et al., 2017].

Хотя за последние два десятилетия в области исследований лёгочной микробиоты достигнут значительный прогресс, её изучение при ТБ является новым и приоритетным направлением как на международном, так и на отечественном уровне. Микробный состав лёгких у больных ТБ отличается от состава здоровых лёгких, что может влиять на течение заболевания и эффективность проводимой терапии [Zhang et al., 2014; Segal et al., 2017; Sala et al., 2020; Kateete et al., 2021; Ueckermann et al., 2022; Xiao et al., 2022a]. Ряд

исследований показал, что сателлитная микробиота лёгких может участвовать в процессах гранулёмогенеза [Zhou et al., 2015; Balcells et al., 2019], однако на данный момент достоверных данных о её роли в формировании гранулём и разжижении некротического содержимого предоставлено не было.

В отечественной науке исследование лёгочной микробиоты при ТБ находится на начальном этапе. Опубликованы лишь единичные работы, которые в основном носят описательный характер [Николаян и др., 2018; Дружинин и др., 2023; Каюкова и др., 2023]. В свете роста числа лекарственно-устойчивых форм ТБ и ограниченной эффективности существующих терапевтических подходов, изучение сателлитной микробиоты туберкулёзных очагов может открыть новые перспективы для патогенетического обоснования профилактики и лечения ТБ.

Цель исследования

Установить закономерности влияния сателлитной микробиоты туберкулёзного очага на иммунные реакции и патогенез гранулёматозного воспаления у больных туберкулёзом лёгких для поиска продуцентов новых иммуномодуляторов при иммунопрофилактике туберкулёза лёгких.

Задачи исследования

1. Установить особенности состава и структуры сателлитной микробиоты туберкулёзных очагов у пациентов с туберкулёзом лёгких.
2. Оценить метаболические способности представителей микробиоты туберкулёзного очага и влияние их клеточных компонентов на иммунные реакции в популяции больных туберкулёзом лёгких.
3. Выявить влияние сателлитной микробиоты туберкулёзного очага на рост микобактерий и формирование гранулём в *in vitro* моделях.
4. Определить взаимосвязь клинических показателей у больных туберкулёзом лёгких с типом бактериального сообщества туберкулёзного очага.
5. Провести поиск потенциальных продуцентов биологически активных веществ с иммуномодулирующими свойствами из факультативных анаэробов казеозного некроза для патогенетически обоснованной иммунопрофилактики хронического, прогрессирующего туберкулёза.

Научная новизна

Впервые при проведении анализа бактериальных сообществ казеозного некроза туберкулёзных очагов на основе биопсийного материала лёгких установлено, что доля МБТ в составе бактериального сообщества казеозного некроза туберкулёзных очагов варьирует от 5% до 99,9%. Для туберкулёзных очагов с высокой концентрацией МБТ спрогнозировано усиление биосинтеза углеводов, компонентов клеточной стенки, вторичных метаболитов, разнообразных энергетических реакций, а также метаболизма серы и холестерина, которые являются признанными факторами патогенности МБТ.

Приоритетными являются данные о том, что в значительном числе случаев очагового ТБ казеозный некроз колонизируется сателлитными микроорганизмами, состав которых значительно отличается от интактной микробиоты лёгкого и характеризуется увеличением доли факультативно-анаэробных бактерий. Обнаружены ранее неизвестные олигобактериальные туберкулёзные очаги, в микробиоме которых доминирующие представители рода *Staphylococcus* ассоциированы с нейтрофильной инфильтрацией гранулёмы.

Важным достижением исследования стало установление значимой патофизиологической ассоциации сателлитной микробиоты в казеозном некрозе туберкулёзных очагов с лейкоцитозом и тромбоцитозом периферической крови пациентов с ТБ.

Из казеозного содержимого туберкулёзных очагов впервые выделены и охарактеризованы восемь штаммов факультативно-анаэробных микроорганизмов, принадлежащих к родам *Corynebacterium* и *Staphylococcus*. Отмечена их способность к увеличению рН очага воспаления, утилизации липидов некроза и разрушению стромы лёгкого, а также антибиотикорезистентность и высокая устойчивость к химическим и физическим факторам воздействия. Доказано, что данные микроорганизмы могут быть отнесены к патогенетически значимой микробиоте лёгких при ТБ.

Получены важные результаты, отражающие наличие гуморального и клеточного иммунитета к *Corynebacterium kefirresidentii* у пациентов с ТБ.

Отмечены повышенная реактивность гуморального компонента иммунитета у 20% больных ТБ и активация Th1- и Th2-ответов (IFN- γ , IL-4) у пациентов с активным клеточным иммунитетом на антигены *C. kefirresidentii*. Выявлено усиление T-регуляторного иммунного ответа (IL-10) и увеличенное содержание эозинофилов в крови у больных ТБ с активным клеточным иммунитетом на *Staphylococcus epidermidis*.

В модели гранулематозного воспаления *in vitro*, индуцированного МБТ, показано стимулирующее влияние клеточных лизатов *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* на образование гранулемоподобных макрофагальных структур. Обосновано использование изученных бактерий в качестве продуцентов иммуномодуляторов новых противотуберкулёзных вакцин.

Впервые в среде, моделирующей *in vitro* некротическое содержимое гранулёмы, установлено стимулирующее действие *C. kefirresidentii* на продукцию бактериальной биоплёнки *Mycobacterium bovis* var. BCG.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Проведённое исследование обобщает существующие литературные данные о роли микробиоты лёгких в патогенезе ТБ и на основе изучения микробиома хирургически иссечённых туберкулёзных очагов расширяет знание об её составе и структуре. Результаты анализа генетических и фенотипических характеристик, а также иммуногенности отдельных представителей сателлитной микробиоты туберкулёзных очагов позволяют утверждать, что выделенные штаммы обладают значительной иммуногенностью и метаболическим потенциалом, позволяющим им участвовать в патологическом процессе. При совместном культивировании *M. bovis* var. BCG и микроорганизма из казеозного некроза туберкулёзного очага обнаружен феномен стимуляции продукции корд-фактора микобактериями. Микроорганизмы родов *Corynebacterium* и *Staphylococcus* могут быть отнесены к патогенетически значимой микробиоте лёгких при ТБ.

С теоретической точки зрения исследование расширяет понимание патогенеза гранулематозного воспаления при развитии туберкулёмы лёгкого. В диссертационной работе впервые обоснована концепция патологического влияния

микробного сообщества туберкулёзного очага на процессы разжижения некротического содержимого и активации иммунного ответа. Полученные результаты имеют важное значение и позволяют по-новому взглянуть на патогенез гранулёматозного воспаления при ТБ лёгких.

В рамках исследования разработаны и внедрены в экспериментальную практику новые лабораторные подходы для оценки гуморального, Т-клеточного и врождённого иммунного ответа против неспецифической микробиоты туберкулёзного очага. Эти подходы создают базу для дальнейших исследований роли сателлитной микробиоты туберкулёзных очагов в процессах казеации некроза и иммунопатогенеза гранулёматозного воспаления. Полученные клеточные лизаты микроорганизмов из казеоза могут быть использованы в качестве потенциальных диагностических инструментов на основе иммуноферментного анализа (ИФА) и теста высвобождения интерферона- γ , а выделенные иммуногенные соединения могут послужить основой для разработки иммуномодуляторов для новых вакцин против ТБ.

Материалы диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «ИГМУ» Минздрава России, кафедры эпидемиологии и микробиологии ИГМАПО – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ для врачей-эпидемиологов и врачей-бактериологов, а также в учебный процесс кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «ИГУ».

Методология и методы исследования

Исследование проведено на базе ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск, директор – д.м.н., член-корр. РАН, Рычкова Л. В.) и сочетает классические методы патологической физиологии с современными молекулярно-биологическими технологиями. В рамках исследования проанализирована медицинская документация, включающая результаты клинико-инструментальных и лабораторных исследований, проведены иммунологические тесты, а также использована экспериментальная модель *in vitro* для изучения процессов

гранулёмогенеза. Исследование включало применение технологии NGS (метасеквенирование переменных фрагментов гена 16S рРНК и метагеномное секвенирование «методом дробовика») и методов классической микробиологии и иммунологии. Проект одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (протокол № 4 от 16.11.2020) и соответствует нормам Хельсинкской декларации. Все участники исследования дали письменное информированное согласие на участие.

Для изучения микробиоты использовались 77 образцов биопсийного материала лёгких. Основная группа включала 72 пациента ОГБУЗ «Иркутская областная клиническая туберкулёзная больница» (ОГБУЗ ИОКТБ), от которых были получены хирургические образцы туберкулём (73 образца). Группа сравнения состояла из 4 пациентов ГБУЗ «Иркутский областной онкологический диспансер» (ГБУЗ ИООД), от которых в рамках резекции по поводу рака лёгкого были получены 4 образца гистологически нормальной непоражённой раком ткани лёгкого. Применялись методы ПЦР, молекулярного клонирования, метагеномного и ампликонного секвенирования, а также культуральные и биоинформатические подходы.

Для изучения адаптивного иммунитета к микроорганизмам казеума туберкулём обследовали 90 пациентов ОГБУЗ ИОКТБ с ТБ и 90 здоровых доноров из числа обратившихся в ОГАУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр» (ИДЦ), от которых были получены образцы сыворотки крови (90 – ТБ, 90 – контроль) и образцы цельной крови (15 – ТБ, 16 – контроль). Гуморальный иммунитет оценивался с помощью ИФА, Т-клеточный иммунитет – с помощью модифицированного квантиферонового IGRA-теста и оценки цитокинового профиля.

В экспериментальном исследовании *in vitro*, проведённом на базе ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулёза» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России, г. Новосибирск), для анализа влияния микроорганизмов из казеозного некроза на рост МБТ и процессы гранулематозного воспаления использовался клинический

штамм МБТ генотипа Beijing B0/W148, перитонеальные макрофаги и спленоциты самцов мышей линии C57BL/6 из коллекции ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России, а также клеточные лизаты *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis*, полученные автором работы. В *in vitro* исследовании влияния живых клеток *C. kefirresidentii* на рост вакцинного штамма *M. bovis* var. BCG, проведённом на базе ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, использован штамм *M. bovis* var. BCG-1 (Russia), полученный из вакцины БЦЖ.

Статистическая обработка данных проведена с помощью методов описательной статистики, с применением параметрических и непараметрических методов. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. Патогенез гранулёматозного воспаления у больных туберкулёзом лёгких может быть модулирован микробиотой туберкулёзного очага, которая варьируется от преобладания *Mycobacterium tuberculosis* до формирования полимикробного сообщества с минимальным присутствием этиологического агента.
2. Ключевым компонентом сателлитной микробиоты туберкулёзных очагов являются представители родов *Corynebacterium* и *Staphylococcus*, способные эффективно деградировать их казеозное содержимое.
3. Важными патогенетическими факторами в формировании системного и локального клеточного иммунного ответа в гранулёме являются иммуногены сателлитной микробиоты туберкулёзного очага.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается достаточным объёмом клинического материала и экспериментальных данных, а также применением современных молекулярно-биологических, биоинформационных, микробиологических и иммунологических методов. Все исследования проводились с использованием сертифицированного оборудования и реактивов. Обработка данных осуществлялась с помощью адекватных методов биомедицинской статистики, что подтверждает репрезентативность полученных результатов и обоснованность выводов.

Результаты диссертационной работы обсуждены и представлены на всероссийских и международных конференциях: 3rd Asian African Congress of Mycobacteriology (2021 г., Тегеран, Иран), 4-й Российский Микробиологический Конгресс (2023 г., Томск), Юбилейная всероссийская научно-практическая конференция «Фтизиатрия в XXI веке: взгляд в будущее» (2023 г., Новосибирск), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Здоровье семьи – здоровье нации: фундаментальные и прикладные исследования» (2024 г., Иркутск), XI Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных с международным участием «Развитие науки и перспективы фтизиатрии: прикладные и фундаментальные аспекты» (2024 г., Новосибирск), 1st International congress on Biomedical and Biotechnology (2024 г., Тегеран, Иран), III Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (2024 г., Байкальск), IX Молодёжная школа-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (2024 г., Санкт-Петербург), VI Международная конференция ПОСТГЕНОМ'2024 (2024 г., Москва).

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в разработке дизайна исследования, сборе и первичной обработке биологического материала и медицинской документации. Автор самостоятельно проводил лабораторные и экспериментальные исследования, модифицировал и оптимизировал протоколы для достижения поставленных задач, а также выполнял анализ, статистическую обработку и интерпретацию полученных данных. Автор лично проводил поиск и анализ литературных источников, обобщение результатов, активно участвовал в обсуждении выводов, подготовке публикаций и докладов, в написании и оформлении рукописи диссертации, а также формулировании научных положений и выводов. Все ключевые результаты исследования получены лично автором и неоднократно представлены на конференциях различного уровня.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационной работы опубликовано 14 научных работ, из которых 3 в научных изданиях ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов диссертационных работ на соискание учёной степени кандидата наук, 8 статей в ведущих рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, индексируемых в базах RSCI, Web of Science и Scopus.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 173 страницах, состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка цитируемой литературы и 4 приложений. Список литературы включает 260 источников, из которых 30 представлены на русском языке и 230 – на иностранных языках. Текст диссертации иллюстрирован 18 таблицами и 19 рисунками.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ МИКРОБИОТЫ ЛЁГКИХ В ПАТОГЕНЕЗЕ ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Патогенез туберкулёза на организменном, клеточном и молекулярном уровнях

Туберкулёз – хроническое инфекционное заболевание, поражающее различные органы и системы (дыхательную, лимфатическую, пищеварительную, костно-суставную и др.), но преимущественно лёгкие [Зверева и др., 2016]. Бактериальную природу туберкулёза установил Р. Кох в 1882 году, открыв возбудителя – *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), за что в 1911 году был удостоен Нобелевской премии.

По данным Всемирной организации здравоохранения ТБ является глобальной угрозой общественного здравоохранения, особенно в развивающихся странах. Четверть населения планеты инфицирована ТБ; в 2021 году зарегистрировано свыше 10 миллионов новых случаев и около 1,6 миллиона смертей. ТБ занимает 13-е место среди причин смертности и 2-е – среди причин смерти после COVID-19 [World Health Organization, 2022]. Прекращение эпидемии ТБ к 2030 году включено в Цели устойчивого развития Организации Объединённых Наций, однако, несмотря на практически 150-летнюю историю изучения, патогенез заболевания остаётся недостаточно исследованным.

1.1.1. Патогенез туберкулёза

Патогенез ТБ включает проникновение микобактерий в организм и их взаимодействие с тканями и органами [Турченко и др., 2017]. МБТ является внутриклеточным патогеном, способным персистировать в фагоцитирующих клетках. Основной путь заражения – воздушно-капельный, однако возможны и другие: алиментарный, контактный, трансплацентарный [Кошечкин и др., 2007]. В большинстве случаев первичная инфекция либо элиминируется иммунной системой, либо протекает бессимптомно и переходит в латентную форму

(латентная ТБ инфекция, ЛТБИ). Риск развития активного ТБ в течение жизни составляет около 10%, т. е. МБТ может ускользать от иммунной системы в течение десятилетий после заражения [Orme et al., 2015]. Примерно у 5-10% первично инфицированных субъектов может немедленно развиваться активный (первичный) ТБ, у остальных может произойти клиническая реактивация ЛТБИ (вторичный ТБ) из-за неспособности развить или поддерживать эффективный иммунный ответ. Этому могут способствовать возраст, иммунодефицит, недоедание и высокая бактериальная нагрузка при заражении.

Патогенез ТБ включает несколько этапов. На первом этапе МБТ проникают в лёгкие и фагоцитируются альвеолярными макрофагами иммунологически наивного организма [Ernst, 2012]. Для уничтожения внутриклеточных бактерий в макрофагах происходит слияние фаголизосом, продукция активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА), аутофагия и апоптоз. Если иммунная система эффективно уничтожает бактерии, инфекция не развивается [Кошечкин и др., 2007]. Однако МБТ обладают эффективными механизмами, позволяющими избегать фагоцитоз и длительно сохраняться в макрофагах.

На втором этапе происходит пролиферация и диссеминация бактерий. МБТ размножаются внутри макрофагов, вызывая их разрушение. Высвобождаемые из клеток хемокины привлекают новые фагоциты, которые также интернализуют бактерии и разрушаются от незавершённого фагоцитоза, способствуя локальному распространению инфекции и её перемещению в регионарные лимфатические узлы корня лёгкого [Ernst, 2012].

Иммунный ответ организма на инфекцию определяется его иммунным статусом, что предопределяет различные сценарии развития ТБ. У большинства пациентов формируется стойкая защита, предотвращающая прогрессирование инфекции на протяжении всей жизни. В этих случаях размножение МБТ прекращается, а очаг первичного поражения (первичный туберкулёзный комплекс или очаг Гона) не возникает или оставляет минимальные остаточные изменения, при этом туберкулиновый кожный тест становится положительным [Кошечкин и др., 2007].

При ослабленном иммунитете, например, при ВИЧ или других иммунодефицитах происходит экспоненциальное размножение микобактерий, сопровождающееся гранулёматозным воспалением. Это приводит к реактивации очага в лёгком, образованию гранулём и казеозных масс. Слияние очагов воспаления зачастую приводит к образованию крупных инфильтратов, представляющих собой объёмные казеозно-некротические структуры, известные как туберкулёмы (казеомы). При благоприятном течении заболевания гранулёма замещается соединительной тканью, коллагенизируется и кальцинируется [Кошечкин и др., 2007]. Считается, что в это время большая часть МБТ погибает, а небольшая субпопуляция выживает в состоянии ограниченной метаболической активности. Такие очаги, окружённые плотной капсулой, в ряде случаев могут быть удалены хирургическим путём [Холодок и др., 2014].

При неблагоприятном течении ТБ казеум постепенно разжижается, а локальное разрушение дыхательных путей приводит к их слиянию с гранулёмой и образованию полости (каверны), сообщающейся с бронхом [Кошечкин и др., 2007]. Это создаёт благоприятные аэробные условия для роста микобактерий и их распространения в здоровые отделы лёгких с образованием новых очагов отсева и каверн, на этом этапе происходит активное выделение микобактерий в окружающую среду, что характеризует открытую форму ТБ. Протеолитическое действие ферментов, усиленное размножение и токсическое действие МБТ, гиперсенсibilизация – всё это рассматривается как механизмы формирования казеозных масс [Холодок и др. 2014]. При высокой резистентности организма процесс может замедляться: гранулёмы замещаются соединительной тканью, коллагенизируются и кальцинируются [Кошечкин и др., 2007].

Для более глубокого понимания влияния патогенных факторов и иммунного ответа на развитие гранулёматозного воспаления необходимо детализировать процессы формирования гранулём на клеточном и молекулярном уровнях.

1.1.2. Механизм формирования гранулёмы

Гранулёма – это организованная структура, представляющая собой очаг казеозного некроза, которая изолирует МБТ и определяет исход ТБ

[Ramakrishnan, 2012] (Рисунок 1). Она формируется в результате пролиферации и трансформации фагоцитирующих клеток, ограничивая распространение микобактерий, но также может служить источником их персистенции [Orme et al., 2014].

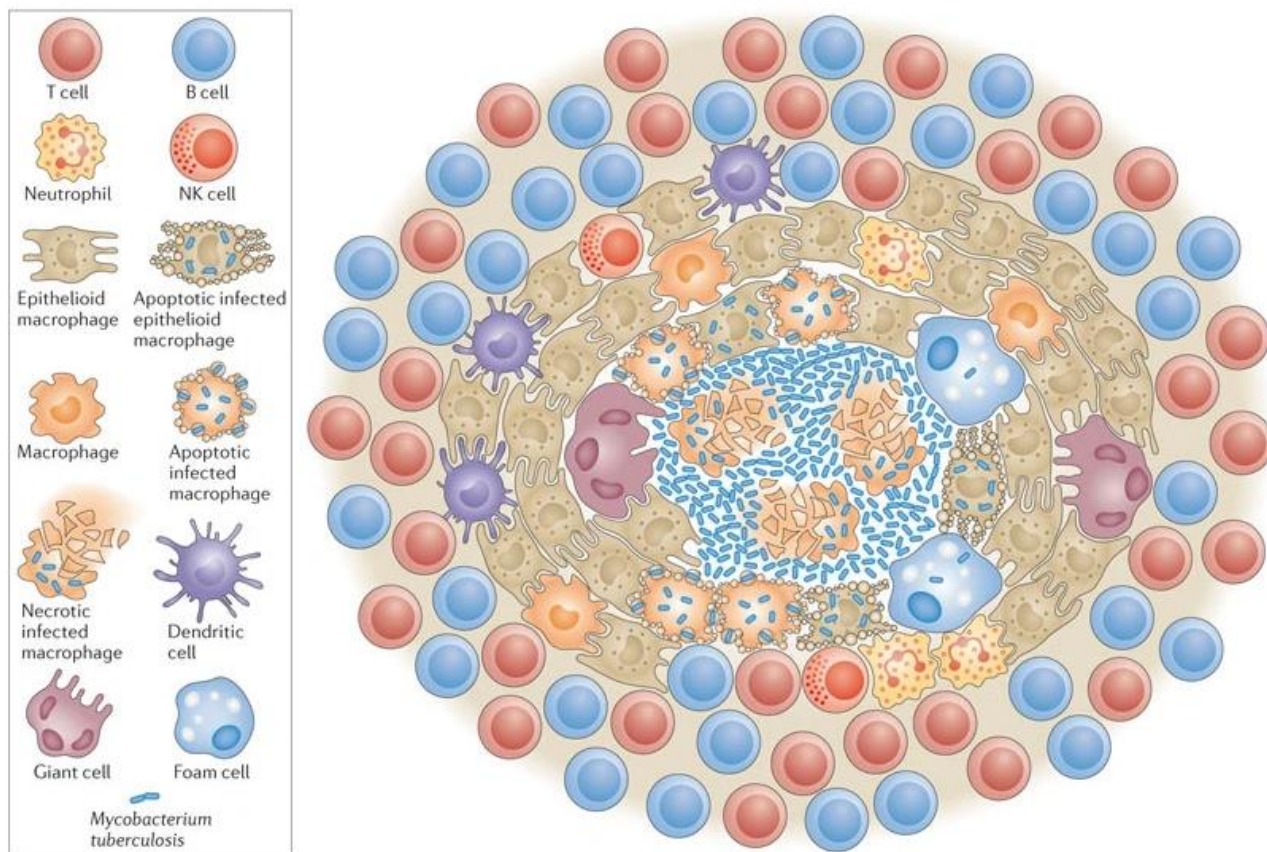


Рисунок 1 – Схема классической структуры некротической гранулёмы при ТБ [Ramakrishnan, 2012].

Внутренние слои гранулёмы состоят преимущественно из макрофагов, которые фагоцитируют МБТ через Toll-подобные рецепторы (TLR) и подвергаются выраженной морфологической дифференцировке в эпителиоидные макрофаги (макрофагально-эпителиальный переход). Эти клетки окружают ядро гранулёмы, а их слияние приводит к образованию гигантских многоядерных клеток Пирогова-Лангханса (синцитий). В структуре гранулёмы также присутствуют пенистые макрофаги, которые накапливают липиды. В центральной зоне, где происходит некротическая гибель клеток, формируется ядро клеточного детрита, который часто имеет мягкую творожистую консистенцию, называемую казеумом.

Внешние слои гранулёмы включают миелоидные клетки (нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы и тучные клетки), лимфоциты ($CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, В-клетки, НК-клетки и лимфоидные клетки врождённого иммунитета) и некроветворные клетки (фибробласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки) [Cropan, 2022].

Дендритные клетки интернализуют МБТ и необходимы для активации Т-клеток и поддержания воспалительного баланса, хотя также могут служить репликативной нишей для микобактерий [Mihret, 2012]. Ключевыми цитокинами в патогенезе гранулёмы являются фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и интерферон- γ (IFN- γ), а основным регулятором адаптивного иммунитета против МБТ выступают $CD4^+$ Th1-клетки. В ответ на секрецию интерлейкина-12 (IL-12) антигенпрезентирующими клетками, $CD4^+$ Th1-клетки продуцируют IFN- γ , который активирует макрофаги, стимулируя фаголизосомное слияние, аутофагию и продукцию АФА [Kumar, 2017]. Активированные макрофаги, в свою очередь, секретируют TNF- α , необходимый для уничтожения бактерий, формирования и поддержания стабильности гранулём [Mezouar et al., 2019].

$CD8^+$ Т-лимфоциты также участвуют в иммунном ответе, лизируя инфицированные клетки и продуцируя IFN- γ , хотя и в меньшей степени, чем $CD4^+$ Т-клетки. Они также уничтожают внутриклеточные микобактерии с помощью гранзимов и перфоринов [Cassano et al., 2006].

Ранее гуморальный иммунитет при ТБ считался незначимым, поскольку МБТ является облигатным внутриклеточным патогеном. Однако поздние исследования показали, что специфические антитела нейтрализуют токсины и способствуют опсонизации бактерий, активации комплемента и препятствуют адгезии микобактерий [Matucci et al., 2014]. В поражённых лёгких В-клетки формируют структуры, напоминающие зародышевые центры вторичных лимфоидных тканей, регулируя активность $CD4^+$ Т-клеток и поддерживая локальную продукцию цитокинов для активации макрофагов. В-клетки также функционируют как антигенпрезентирующие клетки и модулируют Т-клеточные ответы посредством секреции цитокинов [Rijnink et al., 2021].

В инфицированных МБТ клетках (макрофагах, нейтрофилах и дендритных клетках) происходит метаболическое перепрограммирование: подавляется окислительное фосфорилирование и окисление жирных кислот, активируется гликолиз и пентозофосфатный путь [Kumar et al., 2019]. Макрофаги внутренних и внешних слоёв гранулёмы характеризуются разной экспрессией цитокинов и защитных ферментов. Внутренние макрофаги имеют провоспалительный фенотип [Mattila et al., 2013] и обогащены TNF- α , эйкозаноидами и продуктами сигнального пути IFN- γ [Marakalala et al., 2016], что придаёт казеозной массе бактерицидные свойства. Внешние макрофаги обладают противовоспалительным фенотипом, поддерживаемым цитокинами IL-4, IL-10, IL-13, E-кадгеринном и TGF- β , а также взаимодействиями с тромбоцитами [Cronan, 2022].

Классические казеозно-некротические гранулёмы при ТБ бывают фиброзными (инкапсулированы фиброзным ободком), кальцифицированными (некротическое ядро минерализовано солями кальция) и гнойными (некротическое ядро инфильтрировано нейтрофилами) [Cronan, 2022]. Однако могут формироваться и ненекротические гранулёмы, где отсутствует центральное некротическое ядро, а бактерии остаются внутриклеточными [Mattila et al., 2013]. В пределах одного организма могут сосуществовать различные типы гранулём, что указывает на различия в локальных условиях инфекции и иммунного ответа [Canetti, 1955; Lin et al., 2014]. Такая гетерогенность гранулём затрудняет лечение, так как каждая гранулёма по-разному реагирует на антибиотикотерапию [Cronan, 2022]. В частности, казеозный некроз служит существенным барьером, затрудняя проникновение и эффективность препаратов, так как многие антибиотики либо плохо в него диффундируют, либо необратимо связываются с его содержимым [Sarathy et al., 2020].

1.1.3. Иммунопатогенез гранулёматозного воспаления

В ходе длительной совместной эволюции МБТ удалось адаптироваться к защитным механизмам хозяина. Современные исследования показывают, что развитие гранулёматозного воспаления имеет двойную природу [Orme et al., 2014; Orme et al., 2015; Brighenti et al., 2018]. С одной стороны, оно выполняет

защитную функцию, с другой – МБТ способны управлять этим процессом через сигнальные молекулы [Davis et al., 2009; Volkman et al., 2010]. Патогенез ТБ осложняется несбалансированным иммунным ответом (иммунопатогенез): МБТ влияет на активность антигенпрезентирующих клеток и Т-лимфоцитов, что проявляется дисбалансом про- и противовоспалительных цитокинов, нарушением экспрессии ключевых молекул межклеточного взаимодействия, активацией супрессорных механизмов и индукцией апоптоза, приводящих к гипо- и анергии Т-лимфоцитов и снижению эффективности иммунного ответа [Есимова и др., 2012].

Изучение гранулём затруднено из-за сложности доступа и ограничений моделей. Ограничением животных моделей являются различия в морфологии гранулём у животных и людей, а также видоспецифические особенности. Например, у мышей линий C57BL/6 и BALB/c не формируются некротические нейтрофильные гранулёмы, характерные для человека. В качестве моделей с различными ограничениями используют кроликов, морских свинок, приматов и рыбок *Danio rerio*. В последнем случае рыбок инфицируют *Mycobacterium marinum*, близким родственником МБТ, который имеет многие факторы вирулентности МБТ и является естественным патогеном рыб [Cronan, 2022]. Также применяются *in vitro* модели с использованием человеческих мононуклеарных клеток периферической крови [Karooor et al., 2013; Arbués et al., 2020].

Широко известно, что область RD1 генома МБТ, содержащая гены вирулентности, ответственна за патогенность, и именно делеция этой области у *M. bovis* var. BCG привела к аттенуации штамма [Lewis et al., 2003]. Исследование Davis J. M. и Ramakrishnan L. на прозрачных эмбрионах *D. rerio* с использованием флуоресцентной микроскопии показало, что на ранних этапах гранулёма способствует прогрессированию инфекции [Davis et al., 2009]. В частности, белок ESAT6, кодируемый в RD1, высвобождается из инфицированных макрофагов и поглощается эпителием, стимулируя экспрессию хемотаксической металлопротеазы MMP9. Это приводит к привлечению макрофагов к гранулёме,

создавая условия для дальнейшего инфицирования и формирования вторичных гранулём [Davis et al., 2009]. Нарушение функции MMP9 снижает привлечение макрофагов и нарушает структуру гранулёмы.

Несмотря на высокую организацию гранулёмы, пространственное разделение клеток может препятствовать эффективной передаче сигналов, что ограничивает взаимодействие Т- и НК-клеток, расположенных по периферии гранулёмы, с инфицированными макрофагами в центре гранулёмы, снижая их способность к элиминации МБТ [Cronan, 2022]. Помимо этого, гипоксия в гранулёме на ранних этапах её формирования стимулирует секрецию фактора HIF (англ. Hypoxia-Inducible Factor), который активирует фактор роста эндотелия сосудов (англ. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), способствующий васкуляризации и привлечению новых макрофагов, лимфоцитов и дендритных клеток в очаг [Kumar et al., 2019]. Таким образом, патогенные микобактерии могут использовать ранние гранулёмы как платформу для своего усиленного размножения и системного распространения [Davis et al., 2009; Volkman et al., 2010].

Молекулярные защитные механизмы МБТ включают выработку ферментов, которые способствуют деградации холестерина в макрофагах, что подавляет генерацию АФК и АФА и снижает их бактерицидную активность [Каминская и др., 2016]. Важную роль также играют белки и липиды клеточной стенки МБТ, одной из самых сложных среди прокариот. Трегалоза-6,6'-димиколат (TDM) защищает микобактерии от уничтожения, подавляет активность макрофагов и презентацию антигенов [Hunter et al., 2006; Cronan, 2022]. Маннозилированный липоарабиноманнан ингибирует активацию CD4⁺ Т-клеток и вызывает анергию, влияя на экспрессию и фосфорилирование их рецепторов [Del Carmen Guerra-De-Blas et al., 2018].

Миколовые кислоты стимулируют дифференцировку макрофагов в пенистые клетки, которые создают оптимальные условия для персистенции и размножения МБТ. Эти клетки содержат обильные липидные запасы, служащие источником углерода и энергии для бактерий [Martens et al., 2008]. В их

цитоплазме активно накапливаются нейтральные липиды, такие как эфиры холестерина и триглицериды, окружённые фосфолипидным монослоем, и лактозилцерамид [Kim et al., 2010; Turankar et al., 2019]. Пенистые клетки формируются либо *de novo*, либо за счёт липопротеинов низкой плотности через поверхностные scavenger-рецепторы, экспрессию которых усиливает патоген [Mahajan et al., 2012].

Значение холестерина для выживания МБТ подтверждается защитным эффектом статинов, показанным в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также в ретроспективных исследованиях [Del Carmen Guerra-De-Blas et al., 2018]. Массивное накопление и окисление внутриклеточных липидов ведёт к гибели пенистых макрофагов и высвобождению их содержимого во внеклеточную среду в виде липидных капель. Предполагается, что их накопление способствует разжижению казеума в центре гранулёмы [Russell et al., 2009]. Липиды остаются единственным источником углерода в таких условиях [Thomas et al., 2011], а сформировавшийся творожистый некроз приводит к дефициту питательных веществ, гипоксии и накоплению АФА, нарушая иммунный баланс в гранулёме.

Иммунопатогенез ТБ характеризуется несбалансированным, часто гиперактивным проявлением защитных механизмов, которое поддерживает хроническое воспаление. Нейтрофилы участвуют в сдерживании МБТ на ранних стадиях, их патологическая роль при ТБ подтверждена рядом исследований [Lowe et al., 2012; Kumar, 2017]. Нейтрофилия коррелирует с задержкой элиминации бактерий из мокроты, тяжестью заболевания и неблагоприятным прогнозом. Нейтрофилы быстро, в течение нескольких часов, рекрутируются в очаг инфекции, где фагоцитируют патоген через паттерн-распознающие рецепторы или опсонизацию [Lowe et al., 2012].

Цитоплазма нейтрофилов богата кальпротектином, антимикробным пептидом, который *in vitro* способствует росту МБТ [Pechkovsky et al., 2000], что указывает на их возможную роль в поддержании инфекции. Высокие уровни IFN- γ в гранулёмах усиливают нейтрофилию, продлевая их активность [Kumar, 2017]. Хотя нейтрофилы продуцируют обильные количества АФК, АФА и образуют

внеклеточные ловушки, их бактерицидная эффективность против МБТ остаётся спорной [Lowe et al., 2012]. У МБТ развиты ферментные системы (каталазы-пероксидазы, алкилгидропероксидредуктазы, супероксиддисмутазы), нейтрализующие окислительный стресс, что снижает эффективность нейтрофилов [Линге и др., 2021]. Напротив, МБТ индуцируют гибель нейтрофилов через апоптоз [Persson et al., 2008] или некроз [Corleis et al., 2012], ослабляя их защитные функции и экранируя патоген от более эффективных макрофагов [Линге и др., 2021].

Гибель нейтрофилов, высвобождение ими провоспалительных медиаторов и матрикс-разрушающих ферментов (эластазы, миелопероксидазы, коллагеназы, такие как MMP9, и сериновые протеазы) усиливают воспаление и могут способствовать росту гранулёмы и/или её открытию в полость бронхиолы, что приводит к прогрессированию ЛТБИ в активную форму заболевания [Lowe et al., 2012; Линге и др., 2021]. IFN- γ дополнительно способствует активации инфекции, нарушая васкуляризацию гранулёмы и усиливая гипоксию, некроз и казеацию её центральных областей [Kumar, 2017].

Адаптивный ответ, опосредованный Т-лимфоцитами, формируется через 2-4 недели после инфицирования. Kumar P. описывает клинические и экспериментальные данные, показывающие, что избыточная активность CD4+ Th1-клеток и высокие уровни IFN- γ усугубляют патогенез ТБ у иммунокомпетентных взрослых [Kumar, 2016]. Активность IFN- γ + CD4+ Т-клеток отличает активный ТБ от латентного и коррелирует с тяжестью инфекции. У пациентов с коинфекцией ВИЧ-ТБ на фоне антиретровирусной терапии снижается вирусная нагрузка, что приводит к быстрому увеличению количества IFN- γ -продуцирующих CD4+ Т-клеток, так называемый синдром восстановления иммунной системы. Антигены МБТ, присутствующие в организме, способствуют селективной экспансии именно МБТ-специфических CD4+ Th1-клеток, вызывая тяжёлые поражения, включая туберкулёму мозга. Эти данные подтверждены на мышинной модели [Barber et al., 2010].

Накопленные экспериментальные данные привели к пересмотру роли гранулематозного воспаления и казеозных гранулём, предлагая новый взгляд на патогенез ТБ. Оригинальную концепцию патогенеза ТБ предложил британско-американский микробиолог Я. Орм [Orme, 2014]. Рассмотрев большой фактический материал, он полагает, что МБТ могут существовать внеклеточно в форме биоплёночных кластеров в некротических очагах. Орм утверждает, что некроз лёгочной ткани не является следствием дисбаланса между иммунными реакциями и патогеном, а наоборот, служит исходной точкой патогенеза. Внутри гранулёмы МБТ не способны к распространению, а их передача между хозяевами возможна только при внеклеточной локализации в некротических полостях.

Попадание МБТ в лёгкие вызывает воспаление, привлекая нейтрофилы, которые, по мнению Орма, играют ключевую роль в патогенезе. Дегрануляция нейтрофилов высвобождает ферменты, АФК и АФА, повреждающие сосудистый эндотелий, но не влияющие на МБТ, что запускает некротические процессы. В результате локальные капилляры спадаются, а центральные зоны поражения становятся гипоксичными, ограничивая проникновение Т-клеток и макрофагов. МБТ приспосабливаются к гипоксии, образуя биоплёночные кластеры и используя ядерный материал погибших нейтрофилов в качестве матрикса, а липиды и холестерин погибших нейтрофилов как источник питания. Орм рассматривает ЛТБИ как подготовительный этап, в ходе которого МБТ «настраиваются» на выделение и передачу новому хозяину. Ключевой вывод Орма заключается в том, что передача МБТ осуществляется не в виде отдельных клеток, а в форме защищённых биоплёночных кластеров, покрытых оболочкой из миколовых кислот, что обеспечивает их выживание и успешное инфицирование нового организма [Orme, 2014].

Работы Роберта Хантера развили эту идею и позволили сформулировать новую парадигму патогенеза ТБ [Hunter, 2016]. Он проанализировал гистологические данные, доступные с начала 19 века до 1950-х годов, когда антибиотики начали заменять хирургическое лечение ТБ в большинстве стран, кроме России. Эти данные выявили две характерные формы лёгочного ТБ:

туберкулёзную инфильтрацию (туберкулёзную пневмонию) и туберкулёзную грануляцию (казеозную гранулёму). По соображениям Р. Хантера патогенез ТБ представляет собой «пьесу в трёх действиях».

Первичная инфекция распространяется через лимфу и кровь до формирования системного клеточно-опосредованного иммунитета и образования классической гранулёмы. Этот этап завершается в течение нескольких недель у большинства иммунокомпетентных людей, но может прогрессировать до летального исхода у людей с ослабленным иммунитетом и у большинства лабораторных животных. Иммунокомпетентные люди часто сохраняют небольшое количество микобактерий бессимптомно в виде ЛТБИ [Hunter, 2016].

Активный ТБ, возникающий из-за реинфекции или реактивации ЛТБИ у иммунокомпетентных людей, развивается в течение 1-2 лет как бессимптомная обструктивная дольковая пневмония, локализуемая в верхних долях лёгких. Процесс распространяется на соседние участки через бронхи, а не через лимфу или кровь. В это время в пенистых альвеолярных макрофагах накапливаются липиды и секреторные микобактериальные антигены, хотя количество кислотоустойчивых палочек остаётся минимальным. Воспаление вокруг них часто отсутствует или незначительно до начала казеозного некроза. Хантер предполагает, что задержка между инфекцией и началом клинического лёгочного ТБ связана со временем, необходимым для накопления достаточного количества липидов хозяина и микобактериальных антигенов [Hunter, 2016].

Большинство очагов инфекции (более 95%) регрессируют самостоятельно, однако 5% из них внезапно подвергаются некрозу, что приводит либо к олигобациллярной казеозной пневмонии, либо к казеозной пневмонии с множеством нейтрофилов и кислотоустойчивых бактерий. По мнению Хантера, пусковым механизмом некроза может быть изменение конформации гликолипида TDM (корд-фактор), который известен своей способностью индуцировать казеозные гранулёмы у сенсibilизированных животных [Hunter et al., 2006]. TDM, выделяемый МБТ, нерастворим и остаётся на поверхности клеток, тем самым защищая бактерии от уничтожения макрофагами. При контакте с

липидной каплей TDM отделяется и формирует токсичный монослой на поверхности липидов, что приводит к высвобождению накопленных антигенов МБТ [Hunter, 2016].

Казеозная пневмония либо окружается эпителиоидными клетками и фиброзной тканью, что приводит ко вторичному гранулёматозному воспалению и фиброзно-кавернозному ТБ, либо размягчается и откашливается. Согласно Хантеру, некротические гранулёмы формируются исключительно в ответ на казеозный некроз, а не являются его причиной. При размягчении казеоза образуются полости, из которых МБТ может выйти и инфицировать новых хозяев [Hunter, 2016].

Механизмы размягчения казеума долгое время были предметом споров. В 1955 году Жорж Канетти предложил 4 возможных механизма: (I) высвобождение протеолитических ферментов во время вторичной нетуберкулёзной инфекции, (II) реактивация протеолитических ферментов из некротизированных клеток-хозяев, (III) приток полиморфноядерных клеток и (IV) активный рост МБТ [Canetti, 1955]. Однако точная причина размягчения казеоза остаётся неизвестной. Предполагается, что комбинация рассмотренных выше механизмов может нарушать антибактериальный ответ, способствуя прогрессии ЛТБИ в активный ТБ и хроническое воспаление. Это, в свою очередь, истощает иммунную систему и создаёт «порочный круг» патогенеза. В числе потенциальных факторов также могут быть молекулярные и клеточные компоненты патогена и транзиторная микробиота лёгких, вовлекаемая в воспалительный процесс.

1.1.4. Биоплёнки микобактерий как фактор патогенности

Микроорганизмы в естественной среде обитания преимущественно существуют в виде самоорганизующихся, поверхностно прикреплённых многоклеточных сообществ, известных как биоплёнки. Биоплёнки появились на планете около 3,5 млрд лет назад, а в настоящее время они составляют 95-99% всех микробных популяций [Hall-Stoodley et al., 2004]. Микобактерии также образуют биоплёнки, которые способствуют их патогенности, обеспечивая им повышенную устойчивость к агрессивным воздействиям окружающей среды и

дезинфицирующим средствам по сравнению с планктонными формами [Ojha et al., 2005; Esteban et al., 2017].

Феномен образования микобактериями «агрегатов» или «пелликлов» был описан ещё в ранних исследованиях микобактериологии Левенштейном и Кальметтом. «Пелликл» представляет собой поверхностную плёнку, формирующуюся на границе раздела воздух-среда в жидких питательных средах, что объясняется особенностями внеклеточного матрикса и уникальными характеристиками клеточной стенки микобактерий, особенно высоким содержанием липидов [Esteban et al., 2017]. Пелликлы образуются как нетуберкулёзными микобактериями, так и клетками *M. bovis* var. BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) – ослабленным штаммом, используемым в вакцине против ТБ [Schulze-Robbecke et al., 1989; Ojha et al., 2008].

Ещё Роберт Кох, описывая этиологию ТБ, отметил образование микобактериальных структур, напоминающих «тяжи» (корды), и возникающих при упорядоченной агрегации клеток. Кордообразование связано с патогенностью нетуберкулёзных микобактерий и характерно для вирулентных штаммов МБТ, что позволяет им избегать фагоцитоза макрофагами [Julián et al., 2010]. Способность к образованию кордов сохраняется и у клеток *M. bovis* var. BCG, что указывает на сохранение некоторых вирулентных характеристик в аттенуированных штаммах [Park et al., 2011]. Кордообразование наблюдается как при культивировании микобактерий в жидких средах, так и в биоптатах пациентов с ТБ, как вне-, так и внутриклеточно. Ключевую роль в этом процессе играет корд-фактор (TDM), который является важным компонентом клеточной стенки микобактерий и участвует в патогенезе и модуляции иммунного ответа [Hunter et al., 2006; Julián et al., 2010; Lerner et al., 2020].

Биоплёнкообразование у микобактерий индуцируется стрессовыми условиями, такими как дефицит питательных веществ, гипоксия и тиол-редуктивный стресс. Ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} также регулируют этот процесс [Esteban et al., 2017]. В формировании биоплёнок участвуют гликопептидолипиды, короткоцепочечные миколовые кислоты и шаперон GroEL1

[Ojha et al., 2005]. Процесс включает адгезию к поверхности, сидячий рост, синтез внеклеточного матрикса и рассеивание. У микобактерий отсутствуют поверхностные фимбрии или пили, поэтому адгезия обеспечивается специфическими адгезинами и гидрофобностью клеточной стенки [Esteban et al., 2017]. В отличие от других бактерий, микобактерии не продуцируют обычные экзополисахариды, но способны формировать биоплёнки благодаря липидному составу клеточной стенки (миколовые кислоты), которые создают барьер проницаемости, обеспечивая высокую устойчивость биоплёнок к агрессивным условиям среды [Zambrano et al., 2005]. Внеклеточный матрикс биоплёнок микобактерий включает также целлюлозоподобные полимеры, внеклеточную ДНК, гликолипиды и липопротеины. Межклеточная коммуникация осуществляется через кворум-сенсинг [Esteban et al., 2017]. Устойчивость биоплёнок особенно важна при респираторных инфекциях, вызванных нетуберкулёзными микобактериями, такими как *M. avium* complex и *M. abscessus*, которые часто поражают пациентов с хроническими заболеваниями лёгких, включая муковисцидоз [Højby et al., 2017].

В природных условиях микробные сообщества преимущественно существуют в виде мультивидовых биоплёнок. Взаимодействия в таких сообществах включают конкуренцию, комменсализм или протокооперацию, при которой продукты одного микроорганизма могут служить сигнальными молекулами или индукторами для другого [Ножевникова и др., 2015]. В полимикробных биоплёнках взаимодействие микобактерий с другими микроорганизмами влияет на их вирулентность и устойчивость. Нетуберкулёзные микобактерии часто обнаруживаются в гетероспецифических биоплёнках в окружающей среде [Falkinham, 2009]. Исследования показали, что *M. abscessus* и *P. aeruginosa* могут сосуществовать в модели полимикробных биоплёнок *in vivo*, вступая в конкурентные отношения [Rodríguez-Sevilla et al., 2018].

В последние годы активно исследуются механизмы биоплёнкообразования у МБТ. Несмотря на то что при определённых условиях *in vitro* МБТ могут формировать биоплёнки [Ojha et al., 2008; Kulka et al., 2012], их роль в патогенезе

ТБ остаётся недостаточно изученной. Исследования Огаркова О. Б. и соавторов показали, что современные клинические штаммы МБТ при выращивании на питательных средах не образуют биоплёнки в 95% случаев. Выдвигается гипотеза о том, что лекарственная устойчивость МБТ может препятствовать образованию биоплёнки, а казеум может служить её альтернативой [Огарков и др., 2018]. В то же время, некоторые исследования предполагают, что биоплёнки МБТ могут играть роль в казеозном некрозе и формировании полостей в лёгочной ткани, способствуя прогрессированию заболевания, повышению вирулентности и устойчивости к лекарствам [Kulka et al., 2012; Orme, 2014; Basaraba et al., 2017]. В работе Уфимцевой Е. Г. было показано, что в ряде случаев при культивировании МБТ в альвеолярных макрофагах *ex vivo* патоген способен за короткое время возобновить активное размножение. Это сопровождается разрушением клеток-хозяев и выделением в среду культивирования большого количества высоковирулентных бактерий, образующих корды [Ufimtseva et al., 2023].

Таким образом, внеклеточные агрегаты МБТ *in vivo* могут представлять собой уникальные структуры, которые потенциально влияют на клинические проявления ТБ. Открытым остаётся вопрос о способности МБТ формировать полимикробные биоплёнки с представителями лёгочной микробиоты. Изучение этих механизмов может открыть новые перспективы в борьбе с ТБ.

1.2. Микробиота лёгких в норме и при патологических состояниях

1.2.1. Общая характеристика микробиоты лёгких

Многочисленные исследования подтвердили важную роль микробиоты человека в поддержании физиологического гомеостаза [Dekaboruah et al., 2020; Eisenstein, 2020], а также в модуляции его иммунных [Rooks et al., 2016; Cheng et al., 2019], метаболических [Wang et al., 2018; Visconti et al., 2019] и пищеварительных функций [Milani et al., 2016; Valdes et al., 2018]. Ранее считалось, что дыхательные пути стерильны, но современные методы позволили детально изучить микробные сообщества НДП (трахея и лёгкие) [Dickson et al., 2016; Man et al., 2017]. Лёгочная микробиота включает бактерии, вирусы и грибы, однако основное внимание уделяется бактериальному компоненту [Man et al.,

2017]. Микробиота лёгких существенно отличается от микробиоты кишечника и даже микробиоты ВДП (куда входят полость носа, околоносовые пазухи, глотка и надгортанная часть гортани), которые значительно колонизированы бактериями. Микробиота здоровых лёгких характеризуется низкой биомассой и динамичным микробным разнообразием [Natalini et al., 2022]. Сателлитная микробиота лёгких – это спутниковые, неспецифические, транзиторные микроорганизмы, которые временно присутствуют в данном органе [Rogers et al., 2013].

В отличие от желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), дыхательные пути бедны питательными веществами, что сдерживает рост микроорганизмов. ВДП заселены резидентными бактериальными, вирусными и грибковыми сообществами, которые предотвращают рост потенциальных патогенов и их распространение в лёгкие [Man et al., 2017]. Поддержание низкой бактериальной нагрузки в лёгких необходимо для эффективного газообмена, поэтому в них биомасса в 100-10000 раз ниже, чем в ВДП [Natalini et al., 2022]. Микробная биомасса составляет всего 10^3 - 10^5 КОЕ/г лёгочной ткани мыши [Remot et al., 2017] или примерно $2,2 \times 10^3$ бактериальных генома на см^2 поверхности лёгких человека [Hilty et al., 2010]. Для сравнения, нижние отделы ЖКТ человека населены 10^{11} - 10^{12} КОЕ/г ткани [Guarner et al., 2003].

Микробиота легких характеризуется не только низким количественным, но и качественным разнообразием и состоит из транзиторных микроорганизмов, баланс которых определяется миграцией и элиминацией [Natalini et al., 2022]. В отличие от более стабильных сообществ в ЖКТ и полости рта, где доминирующие микробные сообщества формируют эубиоз (нормобиоту), микробиота лёгких менее фиксирована [Iebba et al., 2016]. Так, в микробиоте ВДП взрослого человека преобладают разнообразные представители родов *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *Rothia*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium* и др. [Charlson et al., 2010; Steenhuijsen Piters de et al., 2020] (Таблица 1). Основной путь попадания бактерий в лёгкие – микроаспирация из ВДП [Segal et al., 2016]. Также существует

взаимодействие лёгких с кишечником через кровотоки и лимфатическую систему, что формирует так называемую «ось кишечник-лёгкое» [Budden et al., 2016].

Таблица 1 – Сравнение бактериального состава микробиомов ВДП и НДП

Состав микробиоты (тип, род)	ВДП	НДП	Ссылки
Bacteroidota <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i>	+	+	[Charlson et al., 2010; Erb-Downward et al., 2011; Dickson et al., 2016; Steenhuijsen Pipers de et al., 2020] [Erb-Downward et al., 2011; Steenhuijsen Pipers de et al., 2020]
Bacillota <i>Veillonella</i> <i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Dolosigranulum</i>	+	+	[Charlson et al., 2010; Erb-Downward et al., 2011; Dickson et al., 2016; Steenhuijsen Pipers de et al., 2020] [Charlson et al., 2010; Erb-Downward et al., 2011; Dickson et al., 2016] [Charlson et al., 2010; Steenhuijsen Pipers de et al., 2020] [Steenhuijsen Pipers de et al., 2020]
Pseudomonadota <i>Pseudomonas</i> <i>Acidocella</i> <i>Neisseria</i> <i>Haemophilus</i> <i>Moraxella</i> <i>Shigella</i> <i>Acinetobacter</i>		+	[Erb-Downward et al., 2011; Segal et al., 2016] [Segal et al., 2016] [Charlson et al., 2010; Steenhuijsen Pipers de et al., 2020] [Charlson et al., 2010; Erb-Downward et al., 2011] [Steenhuijsen Pipers de et al., 2020] [Charlson et al., 2010] [Charlson et al., 2010]
Actinomycetota <i>Tropheryma</i> <i>Rothia</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Propionibacterium</i>		+	[Charlson et al., 2012; Dickson et al., 2016] [Charlson et al., 2010; Segal et al., 2016] [Charlson et al., 2010; Steenhuijsen Pipers de et al., 2020] [Charlson et al., 2010]
Fusobacteriota <i>Fusobacterium</i> <i>Leptotrichia</i>	+	+	[Charlson et al., 2010; Erb-Downward et al., 2011; Steenhuijsen Pipers de et al., 2020] [Charlson et al., 2010]

Анализы БАЛ выявляют в лёгких здорового взрослого человека представителей Bacteroidota (*Prevotella* и *Porphyromonas*), Bacillota (*Veillonella* и *Streptococcus*) и в меньшей степени Pseudomonadota (*Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Neisseria* и *Acidocella*), Actinomycetota (*Rothia*) и Fusobacteriota (*Fusobacterium*) [Charlson et al., 2012; Erb-Downward et al., 2011; Dickson et al., 2016; Segal et al., 2016; Sulaiman et al., 2021; Wu et al., 2021], которые в значительной мере совпадают с микробиотой ВДП [Charlson et al., 2012; Simone Di et al., 2023] (см.

Таблица 1). Однако в лёгких встречаются и специфичные микроорганизмы, например, *Tropheryma whipplei* [Charlson et al., 2012]. Структура микробиоты НДП распределяется следующим образом: ~50% бактерий принадлежит к типу Bacteroidota, ~30% к Bacillota, ~10% к Pseudomonadota, ~5% к Actinomycetota, остальные типы составляют менее 5% [Guilloux et al., 2018].

Очищение лёгких обеспечивается мукоцилиарным клиренсом, кашлем, иммунными механизмами и, возможно, бактериофагами. Абиотические условия, такие как pH, температура или концентрация кислорода, также влияют на рост бактерий. В здоровых лёгких присутствуют следы ДНК и РНК оральных комменсалов, что указывает на временное присутствие жизнеспособных микробов [Sulaiman et al., 2021]. В целом считается, что микробиота лёгких у здоровых людей не является резидентной и реколонизируется через микроаспирацию и дыхание [Natalini et al., 2022]. Дисбиотические изменения в лёгких могут выступать ключевым патогенетическим фактором в развитии респираторных заболеваний, которые будут рассмотрены ниже.

1.2.2. Микробиота лёгких и иммунитет

Существует тесная взаимосвязь развивающейся сателлитной респираторной микробиоты с процессом созревания, обучения и развития основных компонентов врождённого и адаптивного иммунитета, что важно для поддержания иммунной толерантности и снижения риска аллергий [Herbst et al., 2011; Gollwitzer et al., 2014; Pattaroni et al., 2018; Sánchez Montalvo et al., 2022]. Задача иммунной системы здорового организма – поддерживать гомеостаз в симбиотических отношениях человека и его микробиоты [Siwicka-Gieroba et al., 2020; Zheng et al., 2020].

Колонизация лёгких микроорганизмами начинается в первые дни жизни и зависит от окружающих факторов [Lal et al., 2016; Pattaroni et al., 2018]. Например, у недоношенных детей состав микробиоты НДП определяется способом родоразрешения: при вагинальных родах доминирует *Ureaplasma* (комменсал половых путей), при кесаревом сечении – *Staphylococcus* (кожный комменсал) [Pattaroni et al., 2018]. Постепенно микробиота стабилизируется

благодаря обогащению оральными комменсалами, и через два месяца у детей наблюдается смешанный профиль микроорганизмов [Pattaroni et al., 2018]. Помимо ротоглотки, источниками обогащения лёгочной микробиоты служат пищевод и аэрозоль воздуха, который содержит 10^4 - 10^6 бактериальных клеток на м^3 [Lighthart, 2000]. Эпидемиологические исследования показывают, что дети, живущие в сельской местности, реже страдают аллергиями и астмой благодаря раннему воздействию разнообразной микрофлоры и факторов окружающей среды [Mutius Von et al., 2010]. В то же время городская среда с бедным рационом, диетой с высоким содержанием сахара и жиров и низкой физической активностью ведёт к дисбиозу микробиоты и нарушению иммунного гомеостаза [Frei et al., 2022]. На состав ранней микробиоты также влияют лёгочные инфекции, гестационный возраст, питание, антибиотики и социальные факторы (наличие братьев и сестёр, посещение учреждений дошкольного воспитания) [Man et al., 2017; Simone Di et al., 2023]. Эти изменения регулируют экспрессию проаллергических цитокинов, таких как IL-33, и генов, связанных с иммуноглобулином А (IgA), который важен в развитии толерантности к аллергенам [Sánchez Montalvo et al., 2022].

Микроаспирация ротоглоточного содержимого часто встречается у здоровых людей. Попадающие в лёгкие микробы активируют лейкоциты (макрофаги, нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты), которые устраняют бактерии. В ответ формируются Т-хелперы 17 (Th17) и регуляторные Т-клетки (Treg), регулирующие этот процесс. Повторяющаяся аспирация может вызывать дисбиоз и усугублять течение таких заболеваний, как хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) [Cvejić et al., 2011], астма [Field et al., 1996], обструктивное апноэ [Morse et al., 2004], муковисцидоз [Scott et al., 1985] и лёгочные инфекции [Koh et al., 2007]. Микроорганизмы также продуцируют метаболиты, нарушающие иммунный контроль и усиливающие воспалительные реакции через провоспалительные цитокины (IL-17, IL-1 α , IL-1 β , IL-6), антитела, АФК и АФА, усиливающие воспаление с преобладанием нейтрофилов и Т-клеток [Natalini et al., 2022].

Из-за труднодоступности биологического материала и сложности моделирования исследование патофизиологии лёгочной микробиоты часто проводится на животных. Эксперименты показали, что при контакте с аэроаллергенами в лёгких у мышей развивается эозинофилия и гиперреактивность, что связано с выделением цитокинов Th2-клетками (IL-4, IL-5, IL-13). Предрасположенность к воспалению снижается только после появления Treg-клеток [Gollwitzer et al., 2014]. В отсутствие микробиоты лёгких у GF-мышей (Germ-Free, безмикробные животные) или её малом количестве у SPF-мышей (Specific Pathogen-Free, свободные от патогенов животные) наблюдается увеличение Th2-лимфоцитов и эозинофилов [Herbst et al., 2011], снижение секреции слизи и уменьшение числа альвеол [Yun et al., 2014].

Лёгочная микробиота влияет на экспрессию генов иммунных клеток, регулируя врождённый иммунитет. Под её воздействием увеличивается продукция IL-5 (участвует в созревании и активации эозинофилов), IL-10 (противовоспалительный цитокин, регулирует функции Treg-клеток и макрофагов), IFN- γ и CCL11 (хемотаксический белок эозинофилов, участвует в аллергических реакциях). Разные микроорганизмы вызывают специфические иммунные реакции. Например, при обогащении лёгких мышей *Pseudomonas* и *Lactobacillus* усиливается Th17-ответ и продукция IL-17A [Yadava et al., 2016], аналогично действуют оральные анаэробы *Prevotella* и *Veillonella* у людей [Segal et al., 2016]. У мышей аспирация оральных комменсалов человека (*Prevotella melaninogenica*, *Veillonella parvula* и *Streptococcus mitis*) приводит к активации Th17-клеток, CD4+, CD8+ Т-клеток и Treg-клеток и иммунному праймингу, который укрепляет защиту от патогенов, включая *Streptococcus pneumoniae* [Wu et al., 2021]. Также выявлено, что патобионт *Haemophilus influenzae* провоцирует у мышей тяжёлое ХОБЛ-подобное воспаление дыхательных путей, тогда как *Prevotella* spp. ослабляют воспаление с преобладанием нейтрофилов [Larsen et al., 2015].

Слизистая оболочка лёгких богата фосфолипидами в форме поверхностно-активных веществ, необходимых для поддержания поверхностного натяжения и

аэрации альвеол [Veldhuizen et al., 1998], и антимикробными пептидами, такими как сурфактантный белок А, иммуноглобулины, лактоферрин и дефенсины, что препятствует микробной колонизации и влияет на метаболизм микробов [Rogan et al., 2006]. Секреторный иммуноглобулин А защищает лёгкие от прикрепления патогенов, аллергенов и аутоантигенов; его дефицит усиливает воспаление в ответ на резидентную лёгочную микробиоту и способствует ремоделированию дыхательных путей и развитию эмфиземы [Richmond et al., 2016].

Между кишечником, лёгкими и микробиотой существует «ось кишечник-лёгкое» [Budden et al., 2016]. Микроорганизмы кишечника могут влиять на иммунные реакции в лёгких через цитокины и структурные компоненты, модулируя как локальное, так и системное воспаление. Например, факторы вирулентности патогенных бактерий, таких как *Helicobacter pylori* или *Bacteroides fragilis*, могут подавлять иммунные реакции человека, тогда как структурные компоненты комменсальных бактерий могут влиять на воспалительные реакции посредством активации паттерн-распознающих рецепторов [Budden et al., 2016].

Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAs, short-chain fatty acids), такие как ацетат, пропионат и бутират, образуются преимущественно в толстом кишечнике при ферментации крупных углеводных волокон и служат регуляторами иммунитета. Они связываются с рецепторами свободных жирных кислот на иммунных клетках, влияя на экспрессию генов, дифференцировку и пролиферацию [Alvarez-Curto et al., 2016], обычно способствуя противовоспалительным реакциям моноцитов и макрофагов и активации Treg-клеток [Corrêa-Oliveira et al., 2016]. SCFAs также воздействуют на лёгкие, где их рецепторы экспрессируются на эпителиальных и иммунных клетках. Диета, богатая клетчаткой, улучшает микробиом дыхательных путей, увеличивая количество Bacteroidota и подавляя избыточный рост Bacillota [Trompette et al., 2018]. Кишечные Bacteroidota продуцируют SCFAs и продукты метаболизма клетчатки, которые защищают от аллергического воспаления дыхательных путей и повышают противовирусный иммунитет. Эксперименты на животных показали, что отсутствие микробиоты снижает способность к борьбе с инфекцией.

Например, GF-мыши более восприимчивы к инфекции *Klebsiella pneumoniae*, чем обычные. Фекальная трансплантация восстанавливала способность этих мышей контролировать инфекцию [Fagundes et al., 2012].

1.2.3. Микробиота лёгких как патогенетический фактор

Микробиота рассматривается как фактор, способствующий патогенезу хронических заболеваний. Нарушение баланса между микробной иммиграцией и элиминацией приводит к изменениям микробиоты лёгких, зависящим от конкретного заболевания. Наиболее изучены изменения при обострении ХОБЛ [Cvejić et al., 2011], астмы [Field et al., 1996], муковисцидоза [Scott et al., 1985], обструктивного апноэ [Morse et al., 2004] и лёгочных инфекций [Koh et al., 2007]. Менее исследованы дисбиозы при ВИЧ [Beck et al., 2015], ТБ [Botero et al., 2014; Brighenti et al., 2018; Hu et al., 2020a] и различных формах рака лёгких [Jin et al., 2019; Kovaleva et al., 2020; Kovaleva et al., 2022].

Общая закономерность патологических процессов связана с нарушением биоценоза лёгких, что создаёт условия, благоприятные для роста патогенных бактерий: повышенная секреция богатой питательными веществами слизи, отёк, изменение кислородных градиентов и местные воспалительные реакции.

Лёгкие состоят из различных микросред, отличающихся по уровню кислорода, рН, температуре и содержанию слизи и иммунных клеток. Патологические изменения редко бывают однородными, чаще возникают участки повреждённой ткани с локальным воспалением. Это формирует петлю положительной обратной связи между дисбиозом и заболеванием. Такие изменения дают дифференциальное преимущество в выживании некоторым видам бактерий и ухудшают рост других, поэтому состав микробиоты лёгких при разных заболеваниях различается (Рисунок 2).

Mancabelli L. *et al.* выделили 13 возможных типов микробных сообществ, специфичных для различных анатомических областей дыхательных путей, из которых пять типов ассоциированы с заболеваниями НДП. Так, обогащение микробиоты видами *Haemophilus influenzae*, *Tetrasphaera japonica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* или *Staphylococcus aureus* связано с

респираторными нарушениями лёгких, в то время как *Prevotella jejuni* преобладает в здоровых лёгких [Mancabelli et al., 2022]. Авторы считают, что снижение разнообразия микробиоты и преобладание условно-патогенных бактерий (*H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) связано с развитием респираторных заболеваний.

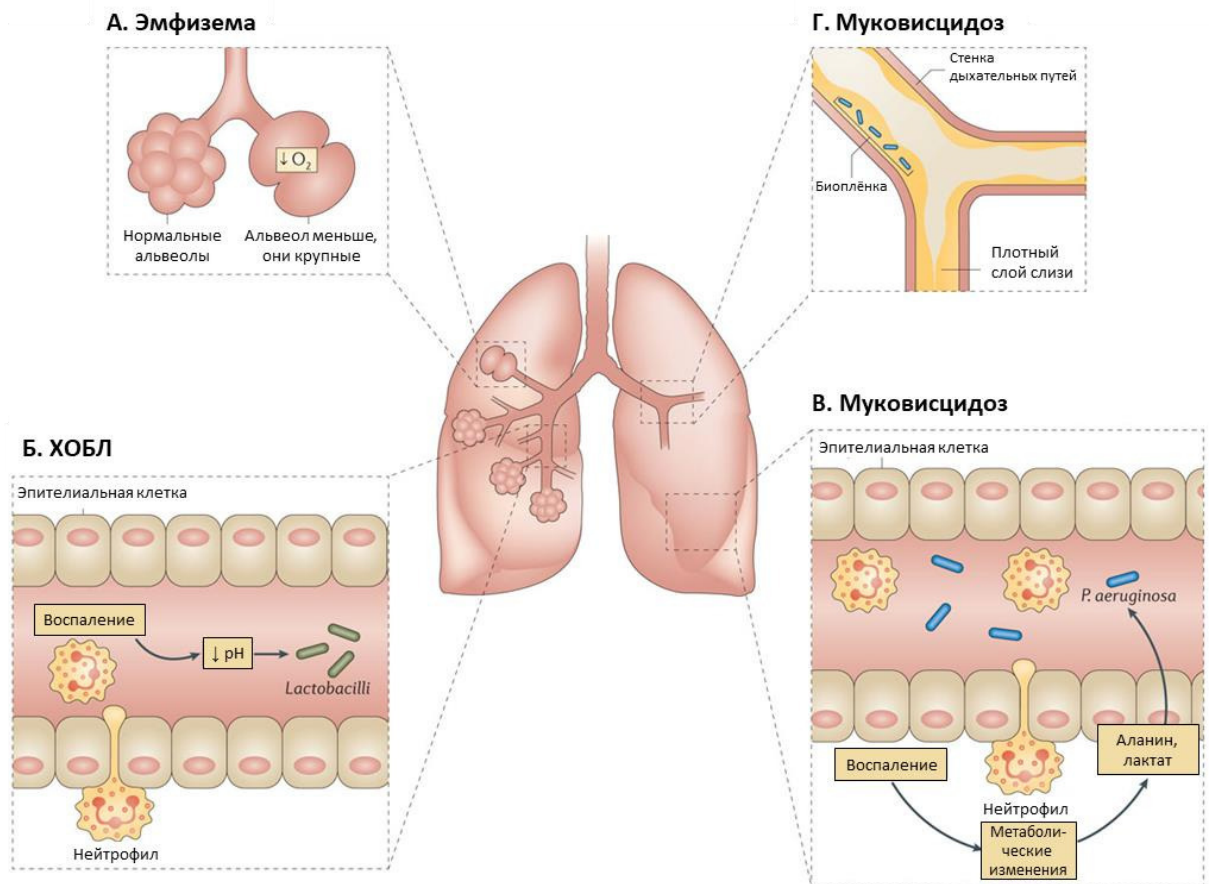


Рисунок 2 – При заболеваниях лёгких формируются гетерогенные микробиоты с дисбиотическими изменениями микробиоты лёгких (рисунок воспроизведён по материалам из статьи Marsland B. J. [Marsland et al., 2014]).

Для основных лёгочных неинфекционных заболеваний отмечены следующие закономерности: при муковисцидозе увеличивается количество Actinomycetota и Pseudomonadota, а Bacteroidota уменьшается; при ХОБЛ возрастает доля Bacillota, особенно *Streptococcus*, и Actinomycetota, в то время как Pseudomonadota уменьшается; астма связана с ростом *Streptococcus* на фоне снижения *Veillonella* (Bacillota) и *Prevotella* (Bacteroidota) [Guilloux et al., 2018].

Хотя лёгкие хорошо аэрируются, их микробиота включает как облигатных анаэробов (*Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Veillonella*), так и виды с

разными потребностями в кислороде, включая аэробные (*Pseudomonas*, *Neisseria*) и факультативно-анаэробные бактерии (*Streptococcus*, *Haemophilus*). Снижение уровня кислорода в лёгких при хронических заболеваниях, таких как ХОБЛ, эмфизема, лёгочный фиброз и, вероятно, при казеозном некрозе в туберкулёзном очаге [Ulrichs et al., 2006], когда площадь доступной для газообмена поверхности уменьшается на 90%, способствует росту анаэробных микроорганизмов (см. Рисунок 2, А) [Dickson et al., 2016]. Воспаление может снижать локальный pH, что способствует развитию ацидофильных микроорганизмов, таких как *Lactobacillus* при ХОБЛ, и изменению соотношения Bacteroidota и Bacillota в пользу последних, так как большинство Bacteroidota не выживает в кислой среде (см. Рисунок 2, Б) [Marsland et al., 2014].

В здоровых дыхательных путях вырабатывается относительно мало защитной слизи (около 100 мл в день). При муковисцидозе наблюдается её избыточная продукция, что приводит к нарушению мукоцилиарного клиренса и создаёт условия для аноксии, повышения температуры и бактериальной колонизации [Dickson et al., 2016]. Избыточная слизь создаёт среду, в которой микроорганизмы рода *Pseudomonas* имеют конкурентное преимущество [Moreau-Marquis et al., 2008]. Аланин, валин, таурин и лактат, а также воспалительные метаболиты, катехоламины, цитокины и свободный АТФ способствуют росту *Pseudomonas aeruginosa* и других бактерий (см. Рисунок 2, В) [Marsland et al., 2014; Dickson et al., 2016].

Некоторые микроорганизмы, чтобы избежать действия защитного слизистого слоя, формируют биоплёнки – бактериальные популяции, окружённые секретлируемым полимерным матриксом, прикреплённые друг к другу и/или к поверхности [Domingue et al., 2020]. Хотя биоплёнки редко образуются в здоровых лёгких, они играют патогенетическую роль при ряде заболеваний. Биоплёнки *P. aeruginosa* [Bjarnsholt et al., 2009] и нетипируемой *H. influenzae* [Stamer et al., 2006] обнаружены у больных муковисцидозом (см. Рисунок 2, Г), что делает бактерии более устойчивыми к антибиотикам [Domingue et al., 2020].

Таким образом, микробиота влияет на заболевания лёгких через несколько патогенетических механизмов: нарушение баланса между иммиграцией и элиминацией микроорганизмов, изменение состава микробиоты из-за микроанатомической дифференциации условий, а также использование патоген-ассоциированных механизмов. В зависимости от заболевания, изменения в микробиоте могут играть разную роль в патогенезе (Рисунок 3).

Во-первых, этиологический фактор может воздействовать как на микробиоту, так и на её носителя. Во-вторых, такие воздействия, как аспирация или сепсис, могут непосредственно изменять состав или структуру микробиоты лёгких и вызвать воспаление и повреждение. В то же время, первичное воспаление и повреждение лёгких (например, при вирусных инфекциях) могут изменить биоценоз, способствуя росту определённых бактерий. В итоге, дисбиоз и воспаление могут усиливать друг друга, создавая порочный круг и продлевая заболевание даже после устранения первоначальной причины.

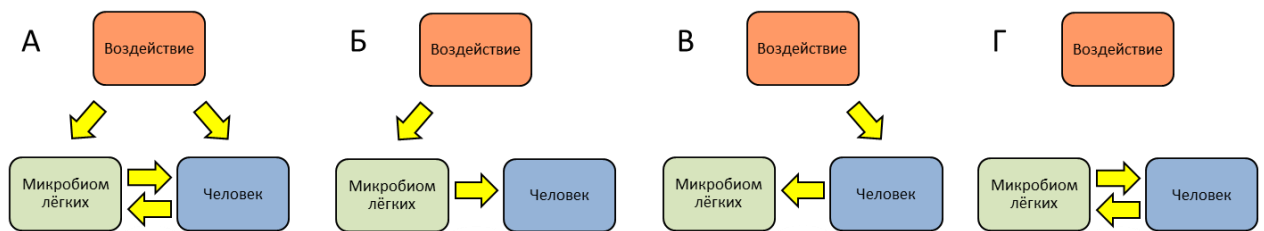


Рисунок 3 – Варианты причинно-следственных связей в патогенезе дисбиоза лёгких по материалам из статьи Carney S. M. [Carney et al., 2020]: *A* – прямое или косвенное воздействие на микробиоту и её носителя; *B* – непосредственное изменение микробиоты лёгких, приводящее к воспалению и повреждению; *C* – воспаление и повреждение лёгких изменяют биоценоз дыхательных путей, способствуя росту определённых бактерий; *D* – дисбиоз и воспаление взаимодействуют, создавая порочный круг патогенеза.

1.2.4. Современные методы изучения микробиома лёгких

Современные знания о микробиоте НДП основаны на данных высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS, Next-Generation Sequencing). Используются два основных метода: метасеквенирование библиотек ампликонов гена 16S рРНК (небольшого и высококонсервативного локуса бактериального генома) и метагеномное секвенирование «методом

дробовика» (shotgun sequencing), осуществляемое на платформах Illumina, Oxford Nanopore, PacBio и др. ДНК-последовательности выравниваются и классифицируются по общедоступным базам данных (SILVA, Greengenes). Последовательности с гомологией выше 97,5% группируются в оперативные таксономические единицы (OTU, Operational Taxonomic Unit), что позволяет оценить состав и численность микроорганизмов в образцах [Carney et al., 2020]. Данные анализируются для оценки α -разнообразия (внутри образцов), β -разнообразия (между образцами) и связи микробиома с клиническими данными.

Точность таксономической идентификации, особенно с использованием амплификации гена 16S рРНК, ограничена в основном до уровня рода, а обнаружение таксонов с низкой численностью крайне затруднено [Větrovský et al., 2013; Earl et al., 2018]. Некоторые микроорганизмы устойчивы к стандартным методам выделения ДНК за счёт специфического состава клеточной стенки [Sulaiman et al., 2018]. Альтернативный метод, метатранскриптомика (секвенирование РНК), позволяет оценить метаболические функции микробиоты [Chang et al., 2021].

Оценка микробиоты лёгких обычно проводится на основе анализа мокроты, жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и реже – хирургически иссеченной лёгочной ткани [Carney et al., 2020]. Проблема отбора образцов из НДП заключается в возможной контаминации. В то время как одни исследования указывают на минимальную контаминацию образцов, полученных при бронхоскопии [Dickson et al., 2015], другие показывают значительную контаминацию образцов от неинтубированных пациентов бактериями носоглотки и ВДП [Berger et al., 2013]. Инвазивные методы, такие как биопсия лёгкого, позволяют получить более достоверный материал для исследования [Yu et al., 2016; Kovaleva et al., 2020; Орлова и др., 2021]. Хирургическим путём получают образцы из «здоровых» участков лёгких у пациентов с раком [Kovaleva et al., 2020], но даже они могут быть изменены из-за иммуносупрессивной и антибактериальной терапии пациентов [Carney et al., 2020].

Изучение «биогеографии» лёгких, то есть микроанатомических различий в микробном разнообразии, остаётся недостаточно разработанным. Исследования по этому вопросу дают противоречивые результаты. В 2011 году Erb-Downward J. R. с соавторами обнаружили значительные микроанатомические различия в микробиоте лёгких одного пациента с ХОБЛ [Erb-Downward et al., 2011]. Однако позже те же исследователи, вместе с Dickson R. P., изучая образцы БАЛ, описали небольшую пространственную изменчивость микробиоты у здоровых людей, предполагая, что кашель может её выравнивать [Dickson et al., 2015]. Эти различия могут вносить систематическую ошибку в исследования в зависимости от метода и места сбора образцов БАЛ.

Изучение микробиома лёгких сопровождается рядом уникальных методических трудностей, отсутствующих при исследовании микробиома других биотопов. Чрезвычайно низкая бактериальная нагрузка в здоровых лёгких приводит к неоптимальному соотношению сигнал/«шум», а способы вычитания «шума» до настоящего времени не стандартизованы и отличаются между исследованиями [Twigg et al., 2013]. «Шум» может поступать от бактериальной ДНК, фоновно присутствующей в стерильном эндоскопическом и хирургическом оборудовании, в растворах для экстракции и т.д. [Salter et al., 2014]. В образцах с низким содержанием бактериальной ДНК часто наблюдается стохастичность секвенирования [Charlson et al., 2012]. Также при метагеномном секвенировании «методом дробовика» ДНК человека, тысячекратно превосходящая бактериальную ДНК по объёму, может заглушить микробные считывания в образцах, содержащих даже относительно небольшое количество человеческих клеток [Marotz et al., 2018]. Поэтому в образцах дыхательных путей с низкой микробной биомассой подавляющее большинство секвенированных прочтений приходится на геномную ДНК человека

Стоит отметить, что в настоящее время всё ещё отсутствует единый стандарт или рекомендации по отбору проб и контролю контаминации при анализе ДНК для исследований микробиома лёгких [Carney et al., 2020]. Для достижения более глубокого понимания и изучения роли отдельных бактерий

следует сочетать метагеномику с культивированием и фенотипированием микроорганизмов *in vitro*, а также моделированием *in vivo*. Этот подход можно рассматривать как адаптацию классических постулатов Коха к сателлитной микробиоте [Neville et al., 2018]. Применение технологий культивирования микробиоты, хотя и методологически сложных, в перспективе даст возможность выйти за рамки простых ассоциаций микробиома с заболеваниями к изучению причинно-следственных связей на уровне отдельных изолятов [Tunney et al., 2012; Browne et al., 2016].

1.2.5. Отечественные исследования микробиоты нижних дыхательных путей при патологическом процессе

В России активно исследуется микробиом ЖКТ, тогда как исследования микробиома респираторного тракта, особенно микробиома лёгких, пока единичны. Основное внимание уделяется респираторному микробиому при различных формах рака лёгкого. Обычно используются образцы мокроты, хотя они не всегда точно отражают микробиом лёгких.

В рамках проекта РНФ под руководством д.б.н. Дружинина В. Г. получены важные результаты: в мокроте пациентов с раком лёгкого обнаружены увеличенные количества родов *Haemophilus*, *Bergeyella* [Druzhinin et al., 2020], *Streptococcus*, *Bacillus*, *Gemella*, *Rothia* и *Actinobacillus* [Дружинин и др., 2020] и снижение числа *Atopobium*, *Stomatobaculum*, *Treponema* и *Porphyromonas* [Druzhinin et al., 2020]. У пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого отмечено снижение β -разнообразия, увеличение представительства родов *Streptococcus*, *Bacillus*, *Gemella* и *Haemophilus*, а вид *Streptococcus agalactiae*, по сообщению авторов, может служить биомаркером этого типа рака [Baranova et al., 2022]. По данным Буслаева В. Ю. и Винокурова М. А. род *Haemophilus* ассоциирован с плоскоклеточным раком лёгкого в большей степени, чем с аденокарциномой [Буслаев и др., 2021].

Ковалёва О. В. и соавторы изучили бактериальную нагрузку и таксономическую структуру микробиоты в биопсиях лёгких при немелкоклеточном раке. Они обнаружили, что высокая бактериальная нагрузка в

сочетании с иммуносупрессией (большим количеством FOXP3⁺Treg-клеток) является маркером плохого прогноза заболевания, в отличие от случаев с высоким содержанием бактерий и низким уровнем FOXP3 [Kovaleva et al., 2020]. В другом исследовании выявлены различия в составе бактерий родов *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* между опухолевой и нормальной тканью, а также зависимость состава микробиоты от стадии болезни, наличия метастазов и дифференцировки опухоли. Бактерии родов *Variovorax* и *Pseudoclavibacter* оказались прогностически значимыми при немелкоклеточном раке [Kovaleva et al., 2022].

Другие отечественные исследования сосредоточены на микробиоте респираторного тракта при муковисцидозе [Ryzhova et al., 2019; Воронина и др., 2020; Зигангирова и др., 2020; Dmitrijeva et al., 2021] и ХОБЛ [Мазурина и др., 2018; Еронина и др., 2020], а также на микробиоте мокроты у угольщиков с пневмокониозом [Druzhinin et al., 2022]. Микробиота лёгких при ТБ остаётся недостаточно изученной, как в России, так и за рубежом.

1.2.6. Микробиота лёгких при туберкулёзе

Ряд исследований указывают на значимую роль кишечной микробиоты в формировании иммунного ответа при ТБ-инфекции. Однако, несмотря на активное развитие исследований микробиоты человека, данных о микробиоте лёгких в контексте лёгочного ТБ остаётся недостаточно. Систематический поиск в базах данных PubMed, eLIBRARY, Google Scholar выявил 22 оригинальных исследования, посвящённых анализу микробного разнообразия лёгких при ТБ у человека. Более половины из них опубликованы за предыдущие 3 года и не входят в последние доступные обзоры литературы [Comberiat et al., 2021; Shah et al., 2021]. Анализ полученных в этих исследованиях данных кратко представлен в таблице (Приложение А).

Большинство исследований основано на анализе мокроты с использованием амплификации и секвенирования гена 16S рРНК. Реже применялись методы секвенирования метагенома «методом дробовика» на жидкости БАЛ, а в нескольких случаях использовались культуральные методы. Такой дизайн

исследований накладывает определённые ограничения на интерпретацию и достоверность полученных данных, как обсуждалось ранее.

Результаты исследований микробиоты лёгких при ТБ варьируют и нередко противоречивы (см. Приложение А). Например, в работах Cui Z. с соавторами [Cui et al., 2012] и Valdez-Palomares F. с соавторами [Valdez-Palomares et al., 2021] указывают на увеличение таксономического разнообразия при активном ТБ, тогда как большинство других исследований сообщают о его снижении [Wu et al., 2013; Hu et al., 2020a; Hu et al., 2020b; Vázquez-Pérez et al., 2020; Ueckermann et al., 2022; Xiao et al., 2022a] или незначительных изменениях [Cheung et al., 2013; Botero et al., 2014; HaileMariam et al., 2021; Zhang et al., 2022]. В ряде исследований выявлены различия в относительной численности таксонов между ТБ-пациентами и контрольной группой, иногда вплоть до видового уровня. Так, у больных ТБ часто наблюдается обогащение микробиоты представителями типов Actinomycetota (вероятно, за счёт МБТ) [Hu et al., 2020a; Zhang et al., 2022] и Pseudomonadota [Cheung et al., 2013; Vázquez-Pérez et al., 2020; Zhang et al., 2022], семейства *Bacillaceae* [Krishna et al., 2016; Hu et al., 2020b], родов *Acinetobacter* [Krishna et al., 2016; Ueckermann et al., 2022], *Campylobacter* [Ticlla et al., 2021; Xia et al., 2022], *Moraxella* [Krishna et al., 2016; Valdez-Palomares et al., 2021], *Pseudomonas* [Wu et al., 2013; Ueckermann et al., 2022], а также *S. aureus* [Ding et al., 2021; Xiao et al., 2022a]. В отношении типов Bacteroidota [Cheung et al., 2013; Hu et al., 2020a] и Bacillota [Hu et al., 2020a; Vázquez-Pérez et al., 2020], родов *Rothia* [Krishna et al., 2016; HaileMariam et al., 2021] и *Streptococcus* [Botero et al., 2014; Nakhaee et al., 2018; Vázquez-Pérez et al., 2020] наблюдаются противоречивые данные. Кроме того, различные исследования рассматривают такие микроорганизмы, как *Cupriavidus*, *Porphyromonas*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Selenomonas*, *Fusobacterium*, как возможные патогенетические факторы при ТБ.

Обогащение микробиоты лёгких анаэробами (*Prevotella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Selenomonas*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*) и накопление в лёгких различных метаболитов анаэробной ферментации связано с изменением иммунного ответа и прогрессированием ТБ. Например, увеличение

доли *Prevotella* в НДП коррелирует с концентрациями SCFAs (пропионата и бутирата), которые подавляют продукцию IFN- γ и IL-17A в ответ на антигены МБТ, что повышает восприимчивость к ТБ у ВИЧ-инфицированных и может способствовать прогрессированию ЛТБИ до активного ТБ [Segal et al., 2017]. Этот эффект также может быть связан с индукцией Treg-клеток при повышенных уровнях SCFAs в лёгких [Trompette et al., 2014]. Популяция Treg-клеток значительно увеличивается в крови пациентов с активным ТБ, подавляя продукцию IFN- γ [Ribeiro-Rodrigues et al., 2006] и пролиферацию МБТ-специфических Т-клеток [Sharma et al., 2009].

В российской научной литературе (база данных РИНЦ) опубликовано лишь несколько исследований на тему микробиоты лёгких при ТБ. Каюкова С. И. и соавторы исследовали микробиоту лёгких у мышей в модели экспериментального ТБ, обнаружив дисбаланс микробиоты в виде увеличения количества и разнообразия бактериального сообщества, сопровождающийся воспалением и нарастанием микобактериальной нагрузки [Каюкова и др., 2023]. Ключевыми маркерами дисбаланса стали *Streptococcus thoralensis*, *Streptococcus acidominimus*, *Arthrobacter crystallopoietes*, *Staphylococcus hominis*, *Micrococcus luteus*. Дружинин В. Г. и коллеги использовали NGS для анализа таксономического состава микробиома мокроты у пациентов с туберкулёмами и здоровых доноров. Авторы не обнаружили значительных различий в видовом богатстве или β -разнообразии, также у пациентов с ТБ не наблюдалось доминирования какого-либо таксона бактерий [Дружинин и др., 2023]. Николаян Л. Т. и соавторы с помощью культуральных методов выделили различные виды стрептококков, стафилококков, а также грибы и коринебактерии из мокроты и плевральной жидкости пациентов с ТБ [Николаян и др., 2018].

Интересно отметить, что относительное содержание самих микобактерий в метагеномах (доля прочтений) в ряде исследований оказалось низким, что, по мнению авторов, может быть обусловлено техническими ограничениями амплификации и секвенирования 16S рРНК микобактерий. Это подчёркивает необходимость осторожного подхода при интерпретации данных

метасеквенирования. Тем не менее, Ding L. с соавторами, изучив зависимость между клиническими характеристиками пациентов и лёгочной микробиотой при ТБ, отметили, что уровень МБТ отрицательно коррелирует с сывороточной концентрацией альбумина и положительно коррелирует с уровнем нейтрофилов в крови [Ding et al., 2021].

Противотуберкулёзная терапия длится не менее шести месяцев и включает комбинацию противотуберкулёзных препаратов (ПТП) узкого и широкого спектра действия, которые могут оказывать длительное негативное влияние на микробиоту. Хотя одно исследование не обнаружило значимого эффекта терапии на микробиоту лёгких [Sala et al., 2020], другие работы указывают на снижение микробного разнообразия в процессе лечения [Kateete et al., 2021; Zhang et al., 2022]. Xiao G. с соавторами показали, что терапия изменяет состав микробного сообщества, снижая долю *S. aureus*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *N. gonorrhoeae*, при этом увеличивая количество *Prevotella melaninogenica*, *P. jejuni*, *Ralstonia pickettii*, *Neisseria subflava*, *Prevotella intermedia* [Xiao et al., 2022a].

Исследований, посвящённых влиянию сателлитной микробиоты лёгких на динамику гранулёматозного воспаления при ТБ, крайне мало. Тем не менее, на ряде животных моделей продемонстрирована связь саркоидоза, характеризующегося неказеозными гранулёмами в лёгких, с локальной инфекцией *Cutibacterium acnes* [Werner et al., 2017]. Примечательно, что *C. acnes* часто встречается в лёгких здоровых людей [Hong et al., 2018]. Согласно Zhou Y. с соавторами, анаэробные *Porphyromonas* в большей степени присутствуют в туберкулёзных поражениях (вероятно, авторы подразумевают гранулёмоподобные поражения) [Zhou et al., 2015]. Balcells M. E. с соавторами предполагают, что дисбиоз микробиоты лёгких и кишечника может модулировать Th1-ответ через IL-17, влияя на гранулёматозное воспаление [Balcells et al., 2019]. Они подчёркивают важную роль витамина D в этом процессе, который необходим для активации макрофагов на ранних стадиях ТБ и клиренса МБТ, а его дефицит влияет на микробиоту лёгких и кишечника.

В совокупности приведённые данные указывают на сложные взаимодействия между МБТ и микробиотой лёгких, играющие значимую роль в патофизиологии ТБ. Однако различия в исследуемых группах, типах клинических образцов и методах анализа затрудняют формулировку чётких выводов о роли микробиоты в патогенезе заболевания и прогнозе его течения. Поэтому требуется дальнейшее систематическое исследование взаимодействий между микробиотой и МБТ.

Материалы данной главы изложены в обзорной статье Особенности микробиоты легких при туберкулёзной инфекции / Е. А. Орлова, О. Б. Огарков, Л. И. Колесникова // Бюллетень сибирской медицины. – 2024. – Т. 23, № 1. – С. 166-175. DOI 10.20538/1682-0363-2024-1-166-175 [Орлова и др., 2024с].

Резюме

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что патогенез инфекционных заболеваний лёгких, включая ТБ, является сложным процессом, обусловленным множеством взаимосвязанных факторов. Несмотря на прогресс, до настоящего времени отсутствует единая концептуальная модель, учитывающая взаимодействие патогена, микробиоты и организма хозяина.

Лёгочная микробиота отличается от других микробных сообществ пониженной биомассой и высокой динамичностью таксономического состава, включающего транзиторные микроорганизмы. Эти микроорганизмы модулируют иммунный ответ хозяина и связаны с созреванием иммунной системы, что играет ключевую роль в поддержании иммунного гомеостаза. Дисбиотические изменения в лёгочной микробиоте могут служить как причиной, так и следствием респираторных заболеваний.

Несмотря на продолжительное изучение ТБ как одного из древнейших инфекционных респираторных заболеваний человека, исследования микробиоты туберкулёзного очага остаются ограниченными недостаточной репрезентативностью исследуемого материала и методологическими трудностями, что затрудняет формулирование общих выводов. Тем не менее, вклад микробиоты в патогенез ТБ подчёркивается в большинстве работ, а

некоторые эксперименты позволили оценить её роль особенно в аспекте гранулематозного воспаления. Сателлитные микроорганизмы в очаге воспаления могут влиять как на иммунный ответ хозяина, так и на жизнедеятельность МБТ, что делает роль микробиоты в патофизиологии ТБ актуальной темой для дальнейших исследований.

Существует тесная взаимосвязь между компонентами МБТ и иммунной системой человека, а также защитные механизмы, позволяющие микобактериям избегать иммунный надзор и антибактериальную терапию, в том числе биоплёнкообразование. Исследования в этой области имеют важное значение для разработки новых терапевтических стратегий. Изучение взаимодействий микробиоты, патогенетических факторов микобактерий и иммунной системы является перспективным направлением для раскрытия механизмов гранулематозного воспаления при ТБ и может привести к выявлению новых мишеней для диагностики и лечения ТБ.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн и объекты исследования

Работа была выполнена в период с 2020 по 2024 гг. в ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск, директор – д.м.н., член-корр. РАН, Рычкова Л. В.) на базе лаборатории эпидемиологически и социально-значимых инфекций (руководитель – д.м.н. Огарков О. Б.). Исследование проводилось в рамках фундаментального научного исследования № 121022500179-0 «Молекулярные, организменные и популяционные закономерности формирования эпидемического процесса антропонозных и трансмиссивных инфекций на территории Северной Азии и сопредельных территориях» (руководитель темы – д.м.н. Огарков О. Б.), поискового научного исследования № АААА-А20-120120790028-8 «Поиск новых биомаркеров для ранней диагностики и предсказания исходов социально-значимых инфекций» (руководитель темы – д.м.н. Огарков О. Б.), двух грантов Российского фонда фундаментальных исследований: № 20-015-00078/22 «Разработка унифицированного молекулярно-биологического подхода для мониторинга микробных сообществ в лёгких при инфекционных и неинфекционных заболеваниях (туберкулёз и рак лёгкого)» (руководитель – д.м.н. Огарков О. Б.) и № 19-515-55009 «Взгляд изнутри на развитие лекарственно-устойчивого туберкулёза у взрослых и детей: влияние бактериального штамма и окружающего микробиома» (руководитель – д.м.н. Жданова С. Н.) и гранта Российского научного фонда № 23-15-00280 «Комплексный подход к молекулярной диагностике МЛУ/ШЛУ туберкулёза с разработкой информационно-аналитической системы для персонализированной медицины и эпидемиологического надзора» (руководитель – д.м.н. Огарков О. Б.).

Проведение исследования одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (протокол № 4 от 16.11.2020) и соответствует этическим нормам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. От всех

участников исследования было получено письменное информированное согласие на участие в проводимом исследовании.

Структура данного исследования состоит из трёх последовательных этапов, представленных на схеме (Рисунок 4).

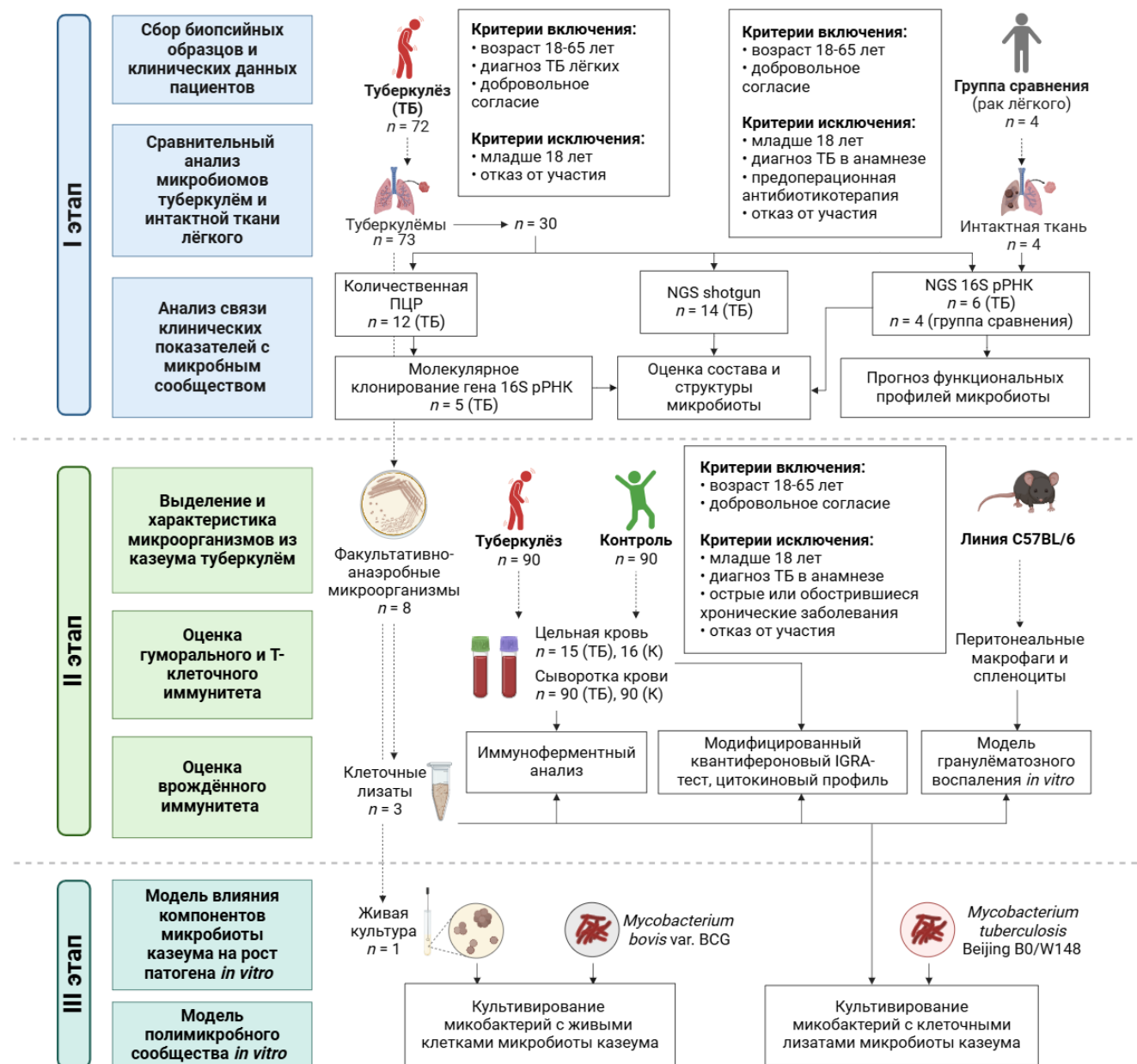


Рисунок 4 – Дизайн исследования.

Первый этап включает клиническую, молекулярно-биологическую и биоинформатическую части. Он основан на данных комплексного клинко-лабораторного обследования пациентов с ТБ, патогистологического исследования туберкулёзных очагов, предоставленных из медицинской документации ОГБУЗ «Иркутская областная клиническая туберкулёзная больница» (ОГБУЗ ИОКТБ), и

анализе микробиома образцов туберкулём ($n = 30$) с использованием ПЦР, молекулярного клонирования гена 16S рРНК и технологии NGS (метасеквенирование переменных фрагментов гена 16S рРНК и метагеномное секвенирование «методом дробовика»). Также проведено сравнение этих данных с результатами анализа микробиома интактной ткани лёгких, полученной от пациентов ГБУЗ «Иркутский областной онкологический диспансер» (ГБУЗ ИООД), перенесших резекцию по поводу рака лёгкого ($n = 4$).

Второй этап охватывает ретроспективный микробиологический поиск факультативно-анаэробных бактерий среди образцов казеума туберкулём ($n = 73$). Изолированные микроорганизмы подвергнуты генетической идентификации, отдельные представители – биохимической и микробиологической характеристике и оценке иммуногенности их биологически активных веществ. Для оценки Т-клеточного иммунитета на антигены микроорганизмов с помощью модифицированного квантиферонового IGRA-теста проведена оценка цитокинового профиля среди пациентов с ТБ ($n = 15$) и здоровых доноров ($n = 16$). Для анализа гуморального иммунитета проведено скрининговое популяционное исследование с участием пациентов с ТБ ($n = 90$) и здоровых добровольцев ($n = 90$). Помимо этого, второй этап включал экспериментальный блок, направленный на исследование влияния клеточных лизатов отдельных представителей микробиоты казеума туберкулём на организацию макрофагов и спленоцитов мышей в гранулёмоподобные структуры в *in vitro* модели гранулёматозного воспаления, индуцированного МБТ.

Третий этап представляет собой экспериментальное *in vitro* исследование влияния клеточных лизатов микроорганизмов из казеозного некроза на рост МБТ и влияния живых клеток микробиоты на рост вакцинного штамма *M. bovis* var. BCG.

Эксперименты по изучению влияния лизатов микроорганизмов, выделенных из казеума туберкулёзных очагов, на рост МБТ и гранулёмообразование *in vitro* выполнялись на базе ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулёза» Министерства здравоохранения

Российской Федерации (ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России, г. Новосибирск) в лаборатории, проводящей работу с микроорганизмами III-IV групп патогенности. В экспериментах были использованы клеточные лизаты, полученные автором работы. Постановка экспериментов проводилась сотрудниками ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России.

Анамнестические данные

Клинические данные (рентгенологическое описание, патогистологическое заключение исследования туберкулёзных очагов, исследование биоматериала на МБТ, результаты общего (ОАК) и биохимического анализов крови) для 34 пациентов с ТБ получены из медицинской документации ОГБУЗ ИОКТБ (выписной эпикриз) с информированного согласия пациентов.

Биопсийный материал

Для изучения микробного разнообразия лёгких использованы 77 образцов биопсийного материала лёгких, полученные от 76 пациентов в период с 2020 по 2024 гг.

Основная группа включала 72 пациента, находящихся на плановом оперативном лечении в ОГБУЗ ИОКТБ, от которых были получены хирургические образцы туберкулём (73 образца). Критерии включения в исследование: возраст 18-65 лет; клинически-подтверждённые диагнозы «туберкулёма лёгких», «инфильтративный ТБ» (фаза распада или обсеменения) или «очаговый ТБ»; добровольное согласие пациента на участие в исследовании. Критерии исключения из выборки: возраст младше 18 лет; отказ от участия в исследовании или трудности в понимании информированного согласия. Два образца получены от одного пациента, которому дважды проводили операции с интервалом в 6 месяцев. Средний возраст пациентов составил $35,2 \pm 9$ лет, среди них 41% женщин и 59% мужчин. Все пациенты проходили антибиотикотерапию ПТП перед хирургической операцией по иссечению туберкулём.

Группа сравнения состояла из 4 пациентов ГБУЗ ИООД, от которых в рамках резекции по поводу рака лёгкого были получены 4 образца гистологически нормальной непоражённой раком ткани лёгкого. Критерии

включения в исследование: возраст 18-65 лет; добровольное согласие пациента на участие в исследовании. Критерии исключения из выборки: возраст младше 18 лет; наличие в анамнезе диагноза ТБ; антибиотикотерапия в предоперационном периоде; отказ от участия в исследовании или трудности в понимании информированного согласия. Средний возраст пациентов составил 65,5 лет, среди них 25% женщин и 75% мужчин.

Кровь

Для изучения гуморального иммунного ответа в период с 2020 по 2024 гг. были набраны две скрининговые группы без учёта возраста и пола, в которые вошли пациенты с ТБ ($n = 90$) и здоровые добровольцы ($n = 90$). От них были получены образцы сыворотки крови (в том числе по четыре парных образца на группу, собранные с разницей не менее 2 месяцев), которые хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Образцы крови больных ТБ получены от пациентов ОГБУЗ ИОКТБ с клинически-диагностированным ТБ. Критерии включения в исследование: возраст 18-65 лет, клинически-подтверждённый диагноз «туберкулёз», добровольное согласие пациента на участие в исследовании. Критерии исключения из выборки: возраст младше 18 лет, отказ от участия в исследовании или трудности в понимании информированного согласия. Пациенты проходили антибиотикотерапию ПТП по основному диагнозу.

Образцы контрольной группы получены от здоровых доноров из числа обратившихся в ОГАУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр» (ИДЦ) и выбраны из популяционной выборки случайным образом. Критерии включения в исследование: возраст 18-65 лет; добровольное согласие пациента на участие в исследовании. Критерии исключения из выборки: возраст младше 18 лет; наличие в анамнезе диагноза ТБ; наличие острых и обострение хронических заболеваний; отказ от участия в исследовании или трудности в понимании информированного согласия.

Для изучения клеточного адаптивного иммунитета были отобраны 15 пациентов с ТБ и 16 здоровых доноров. От них были получены образцы цельной

крови, которые использовали в эксперименте *in vitro* непосредственно в день забора крови.

Микробиологические штаммы и клеточные линии

В исследовании использованы бактериальные штаммы:

- МБТ штамм Beijing B0/W148 – клинический изолят высокой степени патогенности, устойчивый ко всем ПТП 1-го ряда, полученный из коллекции микобактериальных культур ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России;
- *M. bovis* var. BCG-1 (Russia) – вакцинный штамм, полученный из лиофилизированной туберкулёзной вакцины (БЦЖ);
- *E. coli* XL1-blue – лабораторный штамм, использованный для молекулярного клонирования переменных фрагментов V4–V5 гена 16S рРНК.

Для формирования гранулём использованы перитонеальные макрофаги и спленоциты самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 6-8 месяцев и массой 20-25 г, полученные в ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Биоинформатический анализ микробного разнообразия лёгких

Сбор биопсийного материала

Сбор биопсийного материала проводился хирургами ОГБУЗ ИОКТБ и ГБУЗ ИООД непосредственно после проведения хирургических вмешательств. Для предотвращения избирательного роста микроорганизмов образцы биопсийного материала массой 1-3 г фиксировали в растворе DNA/RNA Shield 2×Concentrate (Zymo Research, США), а в ряде случаев материал помещали в 1% раствор СТАВ в 50% изопропилового спирта [Ogarkov et al., 2012]. Далее образцы хранились при температуре -80 °С.

В зависимости от этапа исследования, анализ биопсийного материала проводился с использованием различных методик:

- количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (кПЦР) для оценки количества эубактериальной и микобактериальной ДНК (12 образцов туберкулём);
- молекулярное клонирование переменных фрагментов V4–V5 гена 16S рРНК на основе ДНК, выделенной из некротического содержимого туберкулём, с последующей трансформацией штамма *E. coli* плазмидными конструкциями и секвенированием плазмидной ДНК клонов по Сэнгеру (5 образцов туберкулём);
- метасеквенирование переменных фрагментов V1–V2 или V3–V4 гена 16S рРНК с помощью NGS (6 образцов туберкулём и 4 образца интактной ткани лёгкого);
- метагеномное секвенирование ДНК «методом дробовика» из 14 образцов туберкулём, включая два парных образца от одного пациента.

Выделение геномной ДНК из биопсийного материала

Экстракцию геномной ДНК проводили из 100 мг нерастворимого субстрата фиксированных хирургических образцов. Для уменьшения влияния ингибиторов ПЦР проводили предварительную обработку образцов протеиназой К (AppliChem, Германия). Фермент добавляли в количестве 2 U на образец в равном образцу объёме 0,5-кратного лизирующего буфера от набора реактивов ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Россия), интенсивно встряхивали и инкубировали при 55 °С в течение 30 мин. Затем к каждому образцу добавляли равный объём хлороформа, перемешивали и центрифугировали при максимальной скорости. Полученный супернатант переносили в чистую пробирку. Экстракцию ДНК проводили набором реактивов DNeasy Blood&Tissue Kits (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Количественная ПЦР эубактериальной и микобактериальной ДНК

Для оценки количества эубактериальной ДНК и микобактериальной ДНК, выделенной из некротического содержимого туберкулёзных очагов, проводили кПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX-96 (BioRad, США). Олигонуклеотидные праймеры разработаны на основе известных

последовательностей (Таблица 2) [Wallner et al., 1993], зонды сконструированы в рамках данного исследования [Орлова и др., 2021]. Праймеры и зонды синтезированы в НПФ Синтол и ЗАО Евроген (Россия).

Таблица 2 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов для количественной оценки бактериальной ДНК

Праймеры, зонды	Последовательность (5'→3')
EUB338Fmod	TCCTACGGGAGGCAGCAGT
EUB775Rmod	ACTACCAGGGTATCTAATCCT
EUB500prob	[R6G]-TGCCAGCAGCCGCG[G-LNA]TAATAC-[BHQ1]
MBTprob1	[FAM]-GAAGGTCCGGTTCTCTC[G-LNA]GA-[BHQ1]

Реакцию ПЦР проводили с AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, США) на амплификаторе CFX-96 в следующем режиме: тотальная денатурация 10 мин при 95 °С; 40 циклов: денатурация ДНК 40 сек при 95 °С, гибридизация с праймерами 10 сек при 56 °С, элонгация 40 сек при 72 °С.

В качестве стандартной матрицы использовали ДНК штамма МБТ с известной концентрацией, как описано в работе Огаркова О. Б. [Огарков и др., 2017]. Для количественной оценки был построен калибровочный график, на основе которого определяли зависимости значения порогового цикла (Ct) от десятичного логарифма количества геном-эквивалентов МБТ. Линейное уравнение регрессии использовалось для определения общего количества эубактериальной и микобактериальной ДНК:

$$y = -0,3065x + 7,1774, \text{ (Формула 1)}$$

где y – десятичный логарифм количества геном-эквивалентов исследуемых бактерий, x – значение Ct [Орлова и др., 2021].

Молекулярное клонирование фрагментов гена 16S рРНК

ДНК, выделенная из туберкулём № 928, 948, 281, 388, 486, была использована для амплификации фрагментов гена 16S рРНК и молекулярного клонирования ампликонов [Орлова и др., 2021]. Амплификацию переменных участков V4–V5 гена 16S рРНК проводили с помощью ПЦР с использованием универсальных бактериальных праймеров EUB500F (5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGТАА-3') и EUB1000R (5'-

ССТGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC-3'). Целевые ампликоны очищали и концентрировали с помощью набора Cleanup Mini (Евроген). Молекулярное клонирование ПЦР продуктов проводили с помощью набора реактивов CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Трансформацию компетентных клеток *E. coli* XL1-blue проводили по стандартным методикам [Маниатис и др., 1984]. Секвенирование по Сэнгеру выполняли в ЗАО Евроген.

Метагеномное секвенирование «методом дробовика»

Очищенные образцы ДНК, выделенные из биопсийного материала туберкулём № 777, 1010, 1124, 1197, 1198, 1647, 1891, 1731, 1742, 1800, 1828, 1881, 1882 и 10169, использовались для проведения метагеномного секвенирования «методом дробовика». Секвенирование проведено группой «Геномных исследований и биоинформационного анализа» на оборудовании ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Библиотеки готовили с помощью набора реактивов Nextera XT (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя и секвенировали на приборе NextSeq 550 (Illumina) с использованием набора реагентов NextSeq 500/550 Kit v2.5. Результаты секвенирования в виде стандартных файлов коротких прочтений (в формате fastq) депонированы в базу данных NCBI (BioProject: PRJNA659860) [Орлова и др., 2024b].

Метасеквенирование ампликоновых библиотек гена 16S рРНК

Очищенные образцы ДНК, выделенной из биопсийного материала (туберкулёмы лёгких и участки интактной ткани лёгких), использовались для создания библиотек фрагментов гена 16S рРНК методом ПЦР с применением универсальных бактериальных праймеров. Контроль качества ампликоновых библиотек проводили с помощью электрофореза. Подготовку библиотек и высокопроизводительное секвенирование проводили в соответствии с рекомендациями производителей.

Секвенирование туберкулём № 1903 и 1904 проведено в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» УрО РАН. Для амплификации переменных

участков V3–V4 гена 16S рРНК использовали универсальные бактериальные праймеры EUB338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') и EUB800R (5'-GACTACCAGGGTATCTAATCCT-3'). Для образца № 1903 библиотека была подготовлена с помощью набора GS Junior (Roche, Швейцария), для образца № 1904 – с использованием Nextera DNA Flex Library Prep (Illumina). Высокопроизводительное секвенирование проведено на платформах 454 GS Junior (Roche) и Miseq (Illumina) соответственно. Полученные результаты депонированы в базу данных NCBI (BioProject: PRJNA609038) [Орлова и др., 2021].

Секвенирование туберкулём № 2202, 2204, 2206, 2208 и образцов интактной ткани лёгких № L32-35 проведено в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии». Для амплификации переменных участков V1–V2 гена 16S рРНК использовали праймеры EUB27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') и EUB318R (5'-CTGCWGCCNCCCGTAGG-3'). Индексирование ампликонов осуществляли с помощью набора реактивов Nextera XT Index kit v2 (set A-D), индивидуальные библиотеки смешивали в эквимольных количествах и секвенировали на приборе MiSeq (Illumina) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2×150 н). Полученные результаты депонированы в базу данных NCBI (BioProject: PRJNA885249) [Орлова и др., 2024a].

Анализ метагеномных данных

Первоначальная обработка полученных данных, а именно, демультиплексирование образцов и удаление адаптеров, проводилась с помощью программного обеспечения компании Illumina. Таксономическая классификация коротких прочтений, полученных в ходе метагеномного секвенирования «методом дробовика» для образцов № 777, 1010, 1124, 1197, 1198, 1647, 1891, 1731, 1742, 1800, 1828, 1881, 1882, 10169, выполнена с использованием программы Kraken2 [Wood et al., 2019]. Прочтения, относящиеся к человеку, были удалены из набора данных.

Для образца № 1903 таксономическую классификацию прочтений гена 16S рРНК (вариабельные участки V3–V4) провели с помощью программы VSEARCH [Rognes et al., 2016]. Обработка данных для образцов № 1904, 2202, 2204, 2206, 2208, L-32-35 проведена по следующему алгоритму: использовали программный пакет dada2 для «устранения шума», объединения последовательностей, удаления химерных прочтений, восстановления исходных фило типов. Для представления данных таксономического анализа использовались алгоритмы платформы QIIME2 v2021.4 [Bolyen et al., 2019]. Последовательности со сходством $\geq 97\%$ отнесены к одной OTU, для дальнейшей таксономической классификации полученных OTU использовали референсную базу SILVA v138.1 (релиз 27.08.2020).

Для оценки альфа-разнообразия бактериальных сообществ использовали следующие показатели:

- индекс Шеннона (H) – показатель разнообразия сообщества, варьирующий от 0 (полное доминирование одного таксона) до высоких значений для разнообразных сообществ;
- индекс Симпсона (1–D) – показатель «равномерности» сообщества, варьирующий от 0 (полное доминирование одного таксона) до 1 (равное присутствие всех таксонов);
- индекс Chao1 – показатель богатства сообщества, варьирующий от 1 (полное доминирование одного таксона) до высоких значений для богатых сообществ.

Для анализа структуры сообществ (бета-разнообразии) использовали индекс несходства Брея-Кёртиса (BC), который варьируется от 0 (одинаковый состав сообществ) до 1 (полное различие). Все показатели были рассчитаны в программе Past3 Version 3.26 [Hammer et al., 2001].

Функциональные профили изучаемых микробных сообществ предсказывали с помощью программного пакета PICRUSt2 v2.5.1. (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) [Douglas et al., 2020].

2.2.2. Микробиологические методы анализа

Микробиологический скрининг

Ретроспективный микробиологический скрининг факультативно-анаэробных бактерий был проведён среди свежесобранных и ранее замороженных при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ без консервантов образцов казеума. Непосредственно после хирургической операции или после медленного оттаивания при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ максимальное количество некротического материала казеума помещали в стерильные пробирки с 5 мл среды LB (Difco, Becton Dickinson, Великобритания) и выращивали в анаэробных условиях под вазелиновым маслом при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. После 14 дней культивирования 100 мкл придонного осадка пересевали на агаризованную среду LB (Difco) и выращивали при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ с использованием инкубационного контейнера BD GasPak EZ Incubation Container (Becton Dickinson) и газогенерирующих пакетов AnaeroGas Pack (Becton Dickinson) для создания анаэробных условий. Инкубацию проводили до появления видимых бактериальных колоний.

Генетическая идентификация

ДНК выделяли из осадка бульонной культуры с помощью длительной температурной обработки (10 мин) в щёлочном растворе (0,2 N NaOH), затем применяли стандартный метод фенол-хлороформной экстракции с гуанидинтиоцианатом [Маниатис и др., 1984].

Штаммы 2204, 2206/1, 2206/2, 2336, 2404, 2409, 2411 и 2414 идентифицировали секвенированием генов 16S рРНК и *rpoB* по Сэнгеру и полногеномным секвенированием. Для амплификации и секвенирования по Сэнгеру гена 16S рРНК использовали праймеры EUB27F и EUB518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), для гена *rpoB* – праймеры 1418stF (5'-ATCTCAATTYATGGACCAAGC) и 3241stR (5'-GCTACGTGTTCCATACCTGT) из работы Mellmann A. с соавторами [Mellmann et al., 2006]. Полногеномное секвенирование выполнено на NGS-секвенаторе DNBSeg-G400 компанией «Геномед». Результаты секвенирования в виде стандартных файлов коротких прочтений (в формате fastq) депонированы в базу данных NCBI (OP550281,

OP550282; OP893659, OP893660; PRJNA971334, PRJNA1074084, SAMN44033508, SAMN44033509, SAMN44033510, SAMN44033511, SAMN44033512, SAMN44033513).

Определение биохимических и микробиологических свойств выделенных штаммов

Чувствительность к антибиотикам штаммов 2204 (*Corynebacterium kefirresidentii*), 2206/1 и 2206/2 (*Staphylococcus epidermidis*) определяли с помощью тест-систем TREK Diagnostic Systems (Thermo Fisher Scientific): RAPMYCO для быстрорастущих микобактерий и SLOWMYCO для медленно растущих микобактерий. Оценку устойчивости или чувствительности в зависимости от минимальных ингибирующих концентраций проводили в соответствии с международными рекомендациями [Brown-Elliott et al., 2019]. Для разведения культуры использовали сердечно-мозговой бульон (HiMedia, Индия), инкубацию производили при 37 °С в течение трёх дней в анаэроостате с газогенерирующими пакетами Анаэрогаз (ИНКО, Россия).

Биохимические свойства штаммов 2206/1 и 2206/2 изучали с использованием биохимических тест-систем STAPHYtest 16 (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Липазную активность всех выделенных штаммов определяли посевом на сердечно-мозговой агар (ВНІ Broth, HiMedia) с добавлением 0,1% Tween-80 и 10 мМ CaCl₂. После инкубации при 37 °С в течение трёх суток в анаэроостате с газогенерирующими пакетами Анаэрогаз чашки инкубировали сутки при 4 °С. Наличие экзогенной липазной активности оценивали по образованию «гало» нерастворимых кальциевых солей свободных жирных кислот вокруг колоний.

Получение клеточных лизатов

Для получения клеточных лизатов штаммов 2204 (*C. kefirresidentii*), 2206/1 и 2206/2 (*S. epidermidis*) условия культивирования подбирали экспериментальным путём. Инокулировали 100 мл питательной среды, содержащей 0,1% Tween-80, 1 мл стартовых культур: штамм 2204 выращивали на средах LB и ВНІ Broth, штаммы 2206/1 и 2206/2 – на средах LB и Nutrient Broth (NB). Культивирование проводили в течение ночи при 37 °С и перемешивании 250 об/мин. Клеточные

осадки дважды отмывали 1×PBS и разрушали либо обработкой лизоцимом с двукратным замораживанием-оттаиванием лизатов, либо с помощью пробирок для лизиса ZR BashingBead Lysis Tubes (ZymoResearch, США) на вортексе в течение 30 мин. Степень лизиса и экстракции тотального клеточного белка оценивали с помощью ПААГ-электрофореза и измерением концентрации белка по Брэдфорд. Полученные клеточные лизаты использовали как смесь потенциальных иммуногенов соответствующих микроорганизмов.

Влияние лизатов микроорганизмов из казеума туберкулёзных очагов на рост МБТ

Оценку влияния штаммов 2204 (*C. kefirresidentii*), 2206/1 и 2206/2 (*S. epidermidis*) на рост МБТ выполняли сотрудники ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России с использованием клеточных лизатов, полученных автором работы. Штамм МБТ Beijing B0/W148 использовался в логарифмической фазе роста. Суспензию бактерий помещали в лунки 96-луночного планшета в количестве 10^5 бактерий на лунку в 200 мкл полной культуральной среды RPMI-1640, содержащей фетальную сыворотку крупного рогатого скота, обработанную при 56 °C в течение 30 минут, и L-глутамин. Клеточные лизаты штаммов 2204, 2206/1 и 2206/2 были использованы в концентрациях 10 и 100 мкг/мл по тотальному клеточному белку. В результате были сформированы 6 экспериментальных групп и одна контрольная, каждая из которых имела по 2 повтора. Клетки культивировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 7 дней. Пролиферацию бактерий фиксировали при помощи световой микроскопии, а также с использованием спектрофотометра INNO-S (LТек, Республика Корея). Оптическую плотность (ОП) измеряли в 3 точках каждой лунки при длине волны 450 нм.

Влияние C. kefirresidentii из казеума туберкулёзного очага на рост M. bovis var. BCG

Проводили совместное культивирование вакцинного штамма *M. bovis* var. BCG с живыми клетками штамма 2204 (*C. kefirresidentii*). Суспензию бактерий в соотношении 1:1 в пяти повторах помещали в 7 мл среды Школьниковой с

добавлением 0,1% Tween-80 и 2% фетальной сыворотки телят и культивировали при 37 °С в течение 48 дней, периодически встряхивая и открывая пробирки для отбора бактериального материала каждые три дня. В качестве контроля культивировали монокультуры *M. bovis* var. BCG и штамма 2204 в тех же условиях. Пролиферацию бактерий оценивали спектрофотометрически по ОП при длине волны 565 нм на денситометре DEN-1 в единицах МакФарланда (McF Units) после перемешивания содержимого пробирок. Мазки совместной культуры микроорганизмов окрашивали по Цилю-Нильсену и красителем азури I на 14 день роста.

2.2.3. Иммунологические методы анализа

Квантифероновый IGRA-тест

Модифицированный квантифероновый IGRA-тест на антигены МБТ и штаммов 2204 (*C. kefirresidentii*), 2206/1 и 2206/2 (*S. epidermidis*) проводили с помощью набора STANDART E TB-Feron IGRA (SB BIOSENSOR, Республика Корея) и полученных бактериальных лизатов. Для этого осуществляли забор цельной крови в вакутейнеры с гепарином натрия (поскольку гепарин в меньшей степени влияет на функции иммунных клеток) в количестве 7 мл и транспортировали пробирки в лабораторию при 37 °С. В течение двух часов после забора по 1 мл цельной крови помещали в три пробирки набора STANDART E TB-Feron IGRA (пробирка нулевого контроля, пробирка с митогеном и пробирка с антигенами МБТ) и в вакутейнеры с гепарином натрия с добавлением одного из бактериальных лизатов в концентрации 100 мкг/мл. Кровь инкубировали при 37 °С в течение 16-24 ч, затем пробирки центрифугировали и плазму анализировали на содержание IFN- γ с помощью ИФА по протоколам наборов STANDART E TB-Feron IGRA и гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия). Для оценки уровня IFN- γ пользовались референсными значениями набора STANDART E TB-Feron IGRA: $\geq 0,5$ МЕ/мл – нормальная реакция на митоген, $\geq 0,35$ МЕ/мл – положительный результат на МБТ. Для сопоставления результатов разных ИФА-систем уровень IFN- γ выражали в пг/мл.

Оценка цитокинового профиля

Плазму крови, полученную после инкубации клеток крови с лизатами штаммов 2204 (*C. kefirresidentii*), 2206/1 и 2206/2 (*S. epidermidis*), анализировали на цитокиновый профиль. Для этого измеряли уровни TNF- α , IL-4 и IL-10 методом ИФА по протоколам наборов альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ, Интерлейкин-4-ИФА-БЕСТ и Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест). В качестве отрицательного контроля использовали образцы нулевого контроля из квантиферонового IGRA-теста.

Иммуноферментный анализ

ИФА проводили для исследования гуморального иммунитета на антигены штаммов 2204 (*C. kefirresidentii*) и 2206/2 (*S. epidermidis*). Для оценки уровня иммуноглобулинов класса G (IgG) проанализировали 180 образцов сыворотки/плазмы крови пациентов, разделённых на две группы: здоровые доноры (90 образцов, включая 8 парных сывороток от 4 доноров) и пациенты с диагнозом ТБ (90 образцов, включая 8 парных сывороток от 4 пациентов). В том числе были проанализированы образцы плазмы крови от 15 пациентов с ТБ и 16 здоровых доноров из квантиферонового IGRA-теста.

В качестве антигена сорбировали в лунки полистирольного планшета 100 мкл предварительно полученных клеточных лизатов в концентрации 150-300 нг белка на лунку в 0,1 М NaHCO₃ в течение ночи при 4 °С. Блокировку планшета проводили 10% БСА в 0,1 М NaHCO₃, в течение 1 часа при 37 °С и перемешивании 500 об/мин на планшетном шейкере-термостате ST-3 (ELMI, Латвия). Образцы сыворотки/плазмы крови разводили в 50 раз с использованием компонентов тест-системы фирмы Вектор-Бест, ИФА проводили в соответствии с инструкцией производителя. Для контроля фонового сигнала проводили ИФА с использованием 1×PBS вместо образцов крови или без антигена, используя смесь 10 случайных сывороток в разведении 1/50. Для проверки специфичности иммуноферментной реакции оценивали линейность зависимости сигнала ОП от разведения сыворотки крови или антигенов. Для этого использовали образец крови с высоким положительным сигналом ОП, титруя его с шагом разведения $\times 2$

от 1/12,5 до 1/800, антиген наносили в концентрации 300 нг на лунку. Этот же образец сыворотки в разведении 1/50 использовали для калибровки антигена, который также титровали с шагом разведения $\times 2$ от 2400 нг до 37,5 нг на лунку.

ОП измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм. Определение IgG проводили полуколичественно по сигналу ОП при 450 нм после вычитания сигнала ОП при 620 нм и фонового сигнала (среднее значение ОП пустых образцов).

Для определения пороговых значений (threshold), детерминирующих отрицательные, пограничные (серая зона) и положительные результаты ИФА, использовался анализ точек изменения (change-point analysis), как описано в работе Lardeux F. с соавторами [Lardeux et al., 2016]. Этот метод, не требующий наличия известных положительных или отрицательных сывороток, основан на обнаружении резкого изменения в среднем уровне сигнала ОП в ряду количественных значений. Обнаруженное значение является специфическим порогом, который различает положительные и отрицательные образцы [Lardeux et al., 2016]. В настоящей работе для обнаружения и вычисления вероятностей точек изменения в ряду данных применялся пакет Beast для R.

Вкратце, результаты ОП для каждого проведённого ИФА упорядочивались по возрастанию, после чего каждый ряд был проанализирован с использованием пакета Beast, который позволяет построить графики декомпозиции и идентификации точек изменений, а также рассчитать вероятность каждой точки изменения. Точки с максимальными значениями вероятности далее использовались для разграничения зон распределения результатов: образцы с ОП ниже крайней левой точки изменения считались отрицательными, выше крайней правой точки (включительно) – положительными, а находящиеся между двумя точками – неопределёнными (серая зона).

МБТ-индуцированный гранулёмогенез in vitro

Оценку влияния штаммов 2204 (*S. kefirresidentii*), 2206/1 и 2206/2 (*S. epidermidis*) на формирование гранулём в модели МБТ-индуцированного

гранулёмогенеза *in vitro* проводили сотрудники ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России с использованием клеточных лизатов, полученных автором данной работы. Способ моделирования туберкулёзной инфекции *in vitro* путём получения гранулёмоподобных структур из мононуклеарных клеток венозной крови в присутствии МБТ, культивируемых в трёхмерном матриксе, разработан сотрудниками ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России и запатентован [Белгородцев и др., 2019]. В данной работе для формирования гранулём применена модификация метода с использованием перитонеальных макрофагов и спленоцитов мышей линии C57BL/6 – самцов в возрасте 6-8 месяцев и массой 20-25 г. Все работы с экспериментальными животными проводились в соответствии с международными и национальными документами, регламентирующими проведение экспериментов на лабораторных животных, с соблюдением всех современных стандартов биоэтики (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях).

Гранулёматоз *in vitro* индуцировали добавлением штамма МБТ Beijing B0/W148 в логарифмической фазе роста. Лизаты штаммов 2204, 2206/1 и 2206/2 использовались в концентрациях 10 и 100 мкг/мл (по тотальному клеточному белку). Были сформированы 6 экспериментальных и одна контрольная группа. Формирование гранулём осуществляли в лунках 96-луночного планшета в экстрацеллюлярном матриксе с феноловым красным (High Concentration Low-factor Star Matrigengel, ABW, Китай), инокулируя макрофаги (200 тыс/мл) и спленоциты (800 тыс/мл) в объёме 200 мкл на лунку. К суспензиям клеток добавляли штамм Beijing B0/W148 МБТ и клеточные лизаты бактерий. Культивирование проводили при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 7 дней. Количество гранулём оценивали при помощи световой микроскопии.

2.2.4. Программное обеспечение и методы статистической обработки данных

Для статистической обработки данных исследования использовались методы параметрического и непараметрического анализа. Все исходные данные были систематизированы и обработаны в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2010. Статистический анализ данных проводили с использованием

свободной программной среды вычислений R (в том числе программные пакеты Beast, dada2), программ Past3 Version 3.26 [Hammer et al., 2001] и Microsoft Excel. Таксономическую классификацию коротких прочтений выполняли с использованием программ Kraken2 [Wood et al., 2019], VSEARCH [Rognes et al., 2016], алгоритмов платформы QIIME2 v2021.4 [Bolyen et al., 2019] и референсной базы SILVA v138.1 (релиз 27.08.2020). Функциональные профили предсказывали с помощью программного пакета PICRUSt2 v2.5.1 [Douglas et al., 2020]. Для визуализации результатов использована программа SCImago Graphica Beta 1.0.46.

Проверка распределения количественных данных на соответствие нормальному распределению проводилась с использованием *W*-критерия Шапиро-Уилка. Для нормально распределённых данных описание осуществлялось с указанием среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$), а значимость различий между группами оценивалась с помощью *t*-критерия Стьюдента. В случае отклонения распределения исследуемых признаков от нормального и небольшого объёма выборок (до 20 измерений) применяли непараметрические методы. Для таких данных рассчитывались медиана (Me) и значения нижнего и верхнего квартилей [$Q1$; $Q3$]. Значимость различий между группами оценивали с помощью *U*-критерия Манна-Уитни (с поправкой Бонферрони в случае множественных сравнений), непараметрического многомерного дисперсионного анализа (one-way PERMANOVA) с использованием индекса несходства Брэя-Кёртиса в качестве метрики или рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса.

Для анализа связи между количественными данными, распределение которых отличалось от нормального, использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s), а статистическая значимость корреляции оценивалась с помощью *t*-критерия. Значения коэффициента корреляции r_s интерпретировались по шкале Чеддока.

Номинальные данные представлены в виде абсолютных величин или частоты событий (процента наблюдений). Достоверность различий между номинальными признаками оценивали при помощи критерия χ^2 Пирсона для двух

независимых переменных. При анализе четырёхпольных таблиц, где ожидаемое количество наблюдений в одной из ячеек было меньше 10, применялся χ^2 -критерий с поправкой Йейтса для уменьшения вероятности ошибки первого рода. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предпосылкой данного исследования послужил ретроспективный анализ клинических ПЦР-исследований хирургического материала, выполненных в клинико-диагностической лаборатории ОГБУЗ ИОКТБ. В период с 2018 по 2019 годы было проанализировано 388 образцов иссечённых туберкулём на наличие генетического материала МБТ, в результате в 35 случаях (9%) ДНК МБТ не была выявлена. Этот факт позволил предположить, что в ряде случаев патологический процесс гранулёматозного воспаления в туберкулёзных очагах после инициации этиологическим агентом – МБТ, может продолжаться под воздействием патогенетически значимой микробиоты, способствующей усилению хронического воспаления и неспецифической деградации гранулём, что и послужило гипотезой данного исследования.

3.1. Сравнительный анализ микробиоты туберкулёзных очагов и интактной ткани лёгкого

Для проверки выдвинутой гипотезы в период с 2020 по 2024 годы была сформирована основная группа пациентов с ТБ ($n = 72$), у которых в ходе хирургического иссечения туберкулём были получены биопсийные образцы казеума туберкулёзных очагов ($n = 73$). В качестве группы сравнения были отобраны образцы лёгочной ткани от пациентов ГБУЗ ИООД, перенёсших резекцию по поводу рака лёгкого, при этом анализировалась ткань, не поражённая опухолевым процессом ($n = 4$).

Первый этап исследования посвящён анализу особенностей микробиоты казеозного некроза в туберкулёзных очагах и выявлению её связи с клиническими данными пациентов, страдающих лёгочным ТБ. Для достижения этой цели проведена серия молекулярно-биологических и NGS-исследований биопсийных образцов ($n = 30$) с использованием нескольких подходов анализа микробиома, выполнена таксономическая идентификация и классификация, оценка индексов α - и β -разнообразия, прогноз функциональных профилей микробиоты. Проведён

сравнительный анализ микробных сообществ туберкулём с микробиотой интактной ткани лёгкого. Проанализирована взаимосвязь преобладающих в туберкулёзном очаге бактериальных таксонов с клиническими данными пациентов с ТБ ($n = 19$).

3.1.1. Особенности состава и структуры микробиоты

Исследование микробиома с помощью ПЦР и молекулярного клонирования

Первоначально для количественной оценки ДНК микобактерий в некротическом содержимом туберкулём относительно общего количества эубактериальной ДНК была проведена количественная ПЦР в режиме реального времени (кПЦР) на 12 биопсийных образцах (Таблица 3) с использованием стандартной матрицы ДНК штамма МБТ, как указано в работе Огаркова О. Б. [Огарков и др., 2017].

Таблица 3 – Количество геном-эквивалентов МБТ относительно общей эубактериальной ДНК в некротическом содержимом туберкулём

№	Количество геном-эквивалентов на 1 г некротического содержимого		Доля ДНК МБТ относительно эубактериальной ДНК, %
	ДНК МБТ	Эубактериальная ДНК	
1	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	100
2	$2,8 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	100
3	0	$1,1 \times 10^5$	0,0
4	0	$2,7 \times 10^7$	0,0
5	$3,2 \times 10^3$	$2,8 \times 10^6$	0,1
6	$6,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^5$	6,1
7	0	$1,0 \times 10^5$	0,0
8	$3,3 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	100
9	$8,5 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$	100
10	$2,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$	1,0
11	$2,8 \times 10^3$	$5,4 \times 10^4$	5,2
12	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	100

В образцах № 3, 4 и 7 микобактериальная ДНК не обнаружена, тогда как в образцах № 5, 6, 10 и 11 её содержание варьировало от 0,1 до 10%. Только образцы № 1, 2, 8, 9 и 12 можно считать истинными очагами туберкулёзного некроза. Таким образом, микробиота более половины исследованных на данном этапе образцов на 90% и более состояла из микроорганизмов, отличных от МБТ. ДНК пяти случайных образцов использовалась для амплификации переменных

участков V4–V5 гена 16S рРНК, молекулярного клонирования ампликонов и их секвенирования по Сэнгеру. Идентифицировано 3 бактериальных типа и 18 родов (Таблица 4).

Таблица 4 – Таксономическая идентификация фрагментов гена 16S рРНК, полученных в ходе молекулярного клонирования ДНК из некротического содержимого туберкулём

№	Тип	Класс	Семейство	Род	Грам (+)/(-)	Кол-во
3	Bacillota	<i>Bacilli</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	+	5
			<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Gemella</i>	+	1
		<i>Negativicutes</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>	+	2
	Actinomycetota	<i>Actinomycetes</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Rothia</i>	+	1
5	Pseudomonadota	<i>Alpha-proteobacteria</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	-	1
			<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i>	-	1
			<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>	-	1
		<i>Beta-proteobacteria</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Ralstonia</i>	-	1
			<i>Azonexaceae</i>	<i>Dechloromonas</i>	-	1
	<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	-	4	
Actinomycetota	<i>Actinomycetes</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>	+	1	
6	Pseudomonadota	<i>Alpha-proteobacteria</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	-	2
			<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	-	1
		<i>Beta-proteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Pelomonas</i>	-	2
7	Pseudomonadota	<i>Alpha-proteobacteria</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	-	3
		<i>Beta-proteobacteria</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Ralstonia</i>	-	1
		<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	-	1
	Actinomycetota	<i>Actinomycetes</i>	<i>Nocardioidaceae</i>	<i>Nocardioides</i>	+	1
8	Actinomycetota	<i>Actinomycetes</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>	+	5
			<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	+	1
	Pseudomonadota	<i>Alpha-proteobacteria</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Pedomicrobium</i>	-	1
			<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>	-	1
		<i>Beta-proteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Pelomonas</i>	-	1

Примечание: полужирным шрифтом выделены мажорные таксоны, преобладающие в образце.

Туберкулёма № 8 была единственной, где доминировали фрагменты гена 16S рРНК микобактерий (5 из 9 последовательностей), что позволяет классифицировать её как «истинную» микобактериальную туберкулёму. В остальных образцах преобладали грамотрицательные палочки и

грамположительные кокки, особенно род *Brevundimonas* (6 последовательностей в трёх туберкулёмах), который является условно-патогенным и вызывает внутрибольничные инфекции [Ryan et al., 2018]. Вид *Brevundimonas albigilva* также встречается в лёгких больных раком [Ekanayake et al., 2020]. В образцах преобладали также представители родов *Streptococcus*, *Pseudomonas* и *Pelomonas*, а *Pelomonas* и *Sphingomonas* воспроизводимо выявлялись в разных образцах.

Исследование микробиома с использованием NGS

Для глубокого анализа микробиоты туберкулёзного очага и интактной ткани лёгкого использовалась технология NGS. Были проведены метасеквенирование ампликоновых библиотек гена 16S рРНК и метагеномное секвенирование «методом дробовика». Изучены 20 образцов туберкулём, собранных с 2020 по 2022 год от пациентов с диагнозом «туберкулёма лёгких», «инфильтративный ТБ» (фаза распада или обсеменения) или «очаговый ТБ», включая два образца от одного пациента, прошедшего две операции с интервалом в 6 месяцев. Здоровая ткань лёгкого является недоступным для исследования материалом, а получение аутопсийных образцов по ряду юридических причин занимает не менее трёх суток, за которые в тканях происходят необратимые изменения, затрудняющие изучение микробиоты. В связи с этим в качестве группы сравнения были исследованы четыре образца гистологически интактной ткани лёгкого, полученные от пациентов с раком лёгкого, но не поражённые опухолью. В исследовании использованы следующие подходы, основанные на NGS:

- Метасеквенирование ампликонных библиотек V1–V2 гена 16S рРНК – для четырёх туберкулём и четырёх образцов интактной ткани лёгкого (BioProject: PRJNA885249).
- Метасеквенирование ампликонных библиотек переменных участков V3–V4 гена 16S рРНК – для двух туберкулём (BioProject: PRJNA609038).
- Метагеномное секвенирование «методом дробовика» – для 14 туберкулём (включая парные образцы) (BioProject: PRJNA659860).

Обработка данных включала первичную фильтрацию, определение OTU, таксономическую идентификацию и классификацию, а также оценку индексов α - и β -разнообразия. Для отдельных образцов дополнительно выполнено прогнозирование функциональных профилей микробиоты с помощью программы PICRUSt2 (Таблица 5).

Таблица 5 – Методы анализа микробиома туберкулём и интактной ткани лёгкого

Группа	Образец, №	Методы анализа микробиома
ТБ	1903	NGS 16S рPHK
	1904	NGS 16S рPHK
	777	Shotgun
	1010	Shotgun
	1124	Shotgun
	1197	Shotgun
	1198	Shotgun
	1647*	Shotgun
	1891*	Shotgun
	1731	Shotgun
	1742	Shotgun
	1800	Shotgun
	1828	Shotgun
	1881	Shotgun
	1882	Shotgun
	10169	Shotgun
	2202	NGS 16S рPHK, PICRUSt2
	2204	NGS 16S рPHK, PICRUSt2
	2206	NGS 16S рPHK, PICRUSt2
	2208	NGS 16S рPHK, PICRUSt2
К	L-32	NGS 16S рPHK, PICRUSt2
	L-33	NGS 16S рPHK, PICRUSt2
	L-34	NGS 16S рPHK, PICRUSt2
	L-35	NGS 16S рPHK, PICRUSt2

Примечание: NGS 16S рPHK – метасеквенирование гена 16S рPHK; Shotgun – метагеномное секвенирование «методом дробовика», PICRUSt2 – выполнен прогноз функциональных профилей; * – образцы, полученные с интервалом в 6 месяцев от одного пациента.

Ограничения молекулярных методов изучения микробиома туберкулём

Краткая статистика результатов метасеквенирования ампликоновых библиотек гена 16S рPHK представлена в таблице (Таблица 6). Как видно из результатов обработки данных, получение ампликоновых библиотек для ДНК из туберкулём сопровождалось рядом технических трудностей из-за ограничений метода, описанных в Главе 1.

Таблица 6 – Результаты метасеквенирования ампликоновых библиотек гена 16S рРНК для некротического содержимого туберкулём и интактной ткани лёгкого

№	Варианбельные фрагменты	Исходное количество прочтений	После фильтрации	После нормализации	После удаления химер	Классифицированные прочтения	OTU
1903	V3-V4	168	140	137	99	48	16
1904	V3-V4	63433	51969	51692	37352	27732	16
2202	V1-V2	14028	11452	11350	11140	11119	8
2204	V1-V2	17086	14132	14056	13606	13554	6
2206	V1-V2	36198	30108	29760	29063	29048	4
2208	V1-V2	16062	13319	13275	13083	13026	3
L-32	V1-V2	14566	12060	11766	10468	10468	106
L-33	V1-V2	15310	12685	12499	11761	11761	78
L-34	V1-V2	18054	14990	14324	11511	11424	131
L-35	V1-V2	17560	14126	13683	12491	12051	101

Примечание: в связи с высокой вариабельностью результатов между двумя независимо проведёнными раундами метасеквенирования (отделены жирной линией), средние значения не представлены.

Одной из главных проблем стало высокое содержание липидов в некротизированном материале туберкулём, которые ингибируют процесс ПЦР [Kim et al., 2010]. Это привело к тому, что при первом раунде исследования удалось успешно получить ампликоновые библиотеки только для двух образцов (№ 1903 и 1904). Из-за невысокого качества секвенирования (особенно для образца № 1903), анализ данных оказался возможен только с помощью программы VSEARCH [Rognes et al., 2016]. Для образца № 1904 показатели качества секвенирования были значительно выше, что позволило получить более надёжные результаты.

Кроме того, амплификация ДНК даёт преимущество в идентификации таксонов с высокой численностью (например, ДНК микобактерий в туберкулёме) и большим количеством копий гена 16S рРНК, что приводило к снижению чувствительности метода к минорным таксонам. В результате этого, при анализе микробиома туберкулём № 2202-2208 удалось выявить не более восьми OTU, большая часть которых приходилась на ДНК микобактерий. В то же время в интактной ткани лёгкого удалось идентифицировать до 131 OTU, что в пять раз больше, чем в туберкулёмах. Вероятно, разнообразие состава интактной микробиоты лёгких и её низкая биомасса позволили преодолеть некоторые

ограничения метода, такие как чрезмерная амплификация доминирующих таксонов, и получить более полные данные о структуре микробиоты.

Метагеномное секвенирование образцов туберкулём «методом дробовика» позволило получить в среднем более 2 млн прочтений на образец, при этом до 98% прочтений подлежали таксономической классификации (Таблица 7). Однако значительное содержание клеток человека в образцах привело к тому, что подавляющее большинство прочтений (до 99,95%) относилось к геномной ДНК человека, что ранее уже было отмечено для данного метода [Marotz et al., 2018]. Из бактериальных прочтений (около 0,013%) удалось идентифицировать от 14 до 29 OTU и классифицировать их до уровня семейства. В общей сложности, в 14 образцах было определено 98 бактериальных семейств.

Таблица 7 – Результаты метагеномного секвенирования «методом дробовика» для некротического содержимого туберкулём

№	Исходное количество прочтений	Классифицированные прочтения	ДНК человека		Бактериальная ДНК		OTU
			Количество прочтений	%	Количество прочтений	%	
777	2554168	2510303	2509205	99,96	93	0,004	23
1010	1974247	1936137	1935129	99,95	88	0,007	24
1124	1370015	1345680	1344914	99,94	233	0,022	14
1197	1877195	1845509	1844652	99,95	136	0,009	14
1198	2442317	2412659	2411567	99,95	256	0,013	23
1647	2464389	2427352	2424585	99,89	1870	0,081	20
1891	2618684	2579209	2578095	99,96	536	0,022	18
1731	2709923	2667326	2666525	99,97	43	0,002	24
1742	3678138	3621379	3620045	99,96	204	0,007	29
1800	2450215	2401009	2399703	99,95	642	0,027	27
1828	3114748	3058559	3057215	99,96	416	0,014	26
1881	1889339	1853495	1852854	99,97	90	0,010	20
1882	2466404	2434393	2433744	99,97	40	0,002	17
10169	3060570	3002182	3000259	99,94	646	0,026	22
М/Ме	2476454 *	2435371 *	2434178 *	99,95 **	233 **	0,013 **	21 *

Примечание: * – данные представлены как среднее арифметическое (М), ** – данные представлены как медиана (Ме).

Изначально микробиом лёгких не был включён в проект «Микробиом человека», проводимый Национальными институтами здравоохранения США, что привело к отсутствию стандартных протоколов для его исследования, особенно в контексте патологий, таких как ТБ. В настоящее время не разработаны

универсальные рекомендации по отбору проб, контролю контаминации и методам анализа, что делает стандартизацию подходов актуальной темой для обсуждения [Carney et al., 2020]. Анализ данных, полученных разными методами NGS, указывает на то, что для образцов с низкой бактериальной биомассой и высокой нагрузкой ДНК хозяина совместное и последовательное применение метасеквенирования библиотек гена 16S рРНК и глубокого метагеномного секвенирования «методом дробовика» может быть более эффективным, чем использование этих методов по отдельности.

Состав микробиоты

Проведённое исследование позволило подробно охарактеризовать состав микробиоты туберкулёзных очагов и интактной ткани лёгкого. Таксономическая идентификация OTU была выполнена до уровня семейства (при анализе данных метагеномного секвенирования «методом дробовика») и до уровня рода или вида (при использовании данных метасеквенирования ампликоновых библиотек гена 16S рРНК). Основные выявленные бактериальные типы и семейства представлены ниже (Рисунок 5).

В каждом образце туберкулём были идентифицированы представители типа Actinomycetota, в основном за счёт присутствия МБТ, однако их доля в микробном сообществе варьировала от 5% до 99,9%. В среднем, микобактериальная ДНК доминировала лишь в половине всех изученных микробиомов туберкулём. В некоторых образцах тип Actinomycetota был также представлен бактериями семейства *Streptomyetaceae* (образец № 777) и *Eggerthellaceae* (образцы № 1197 и 1742). В ряде образцов (№ 1010, 1731, 1800, 1828, 1881, 1882) наблюдалось доминирование альтернативных бактериальных типов – Pseudomonadota или Bacillota, которые в других образцах составляли минорную часть бактериального сообщества. Основные немикобактериальные семейства включали представителей *Staphylococcaceae* (до 71%), *Pasteurellaceae* (до 50%), *Acetobacteraceae* (до 38%), *Eggerthellaceae* (до 24%) и *Pseudomonadaceae* (до 22%). Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, хотя и

составляли меньшую долю микробиома (до 14%), присутствовали во многих образцах.

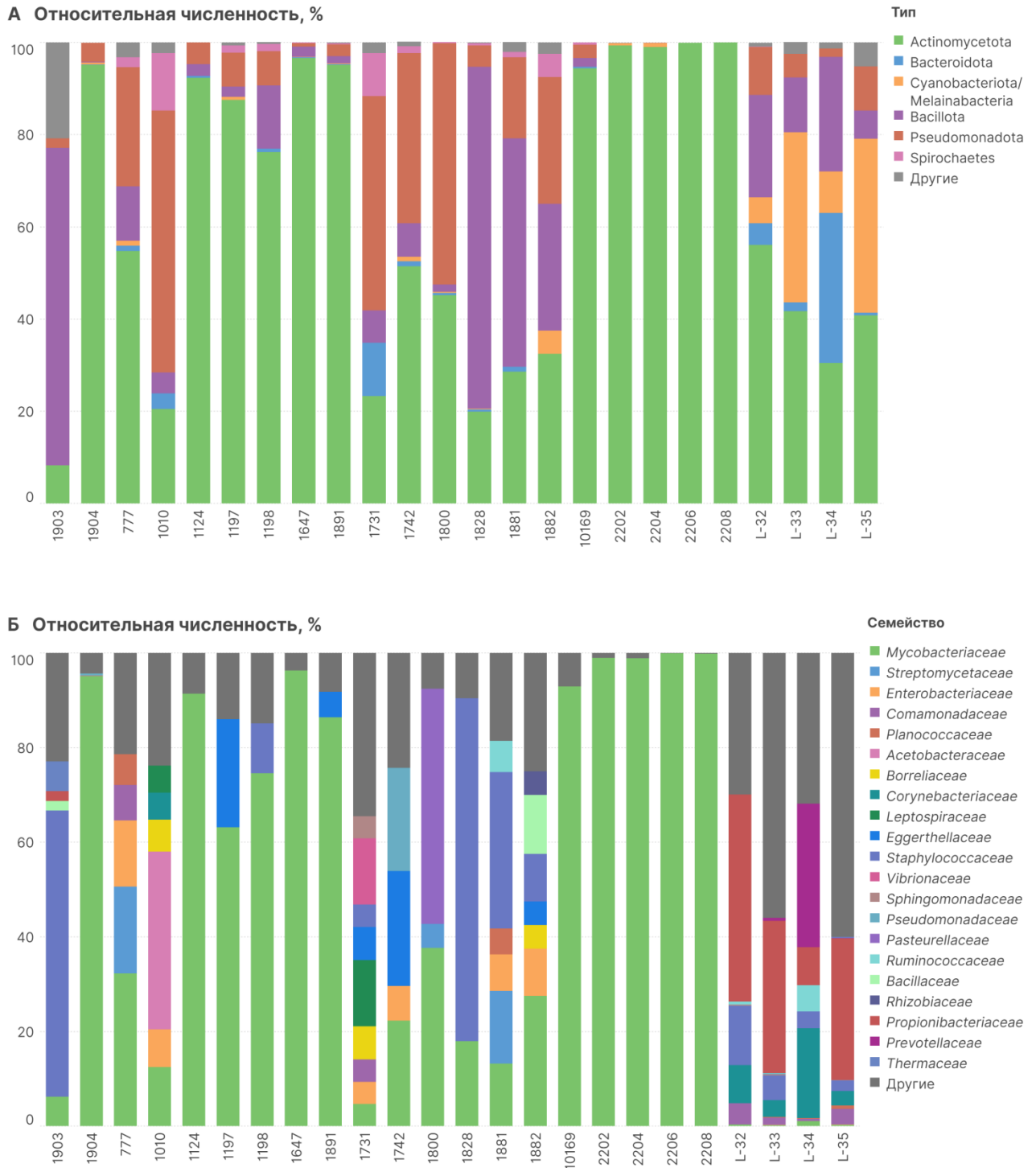


Рисунок 5 – Таксономическая характеристика на уровне типа (А) и семейства (Б) основных идентифицированных бактерий в микробиомах туберкулём и интактных лёгких.

В образцах интактной ткани лёгкого преобладали представители типов Actinomycetota (семейства *Propionibacteriaceae* и *Corynebacteriaceae*), Bacillota

(семейство *Staphylococcaceae*), Bacteroidota (семейство *Prevotellaceae*) и Pseudomonadota (семейство *Comamonadaceae*).

Особое внимание привлекла распространённость в исследованных микробиомах ДНК нефотосинтезирующих Melainabacteria из группы Cyanobacteriota/Melainabacteria [Facciponte et al., 2018; Hu et al., 2022], доля которых варьировала от 0,1% до 5% в туберкулёмах и от 5,6% до 37,7% в микробиомах интактных лёгких, при этом они не классифицировались ниже уровня типа. Кроме того, во всех образцах полностью отсутствовали представители типа Fusobacteriota, ранее описанные в микробиоте лёгких [Charlson et al., 2010; Erb-Downward et al., 2011; Steenhuijsen Piters de et al., 2020].

Для некоторых образцов была проведена более глубокая таксономическая характеристика микробиомов до уровня рода или вида. Значимой находкой стало выявление в туберкулёме № 1903 доминирования грамположительных факультативно-анаэробных бактерий рода *Staphylococcus* (71%), тогда как микобактерии составили всего 7% от общего числа бактериальных прочтений. В образце № 1904, напротив, преобладали микобактерии (95%), а около 2% бактериального сообщества принадлежали грамотрицательным аэробным сапрофитам рода *Acinetobacter*, который, как известно, является компонентом нормобиоты ВДП [Charlson et al., 2010]. Однако устойчивый к карбапенемам вид *Acinetobacter baumannii* часто вызывает вентиляторно-ассоциированную пневмонию [Xiao et al., 2022b]. В казеуме четырёх других туберкулём (образцы № 2202-2208), при доминировании МБТ, до 1% сообщества составляли пропионовокислые бактерии *Cutibacterium acnes* и нефотосинтезирующие цианобактерии из группы Cyanobacteriota/Melainabacteria.

Для всех четырёх образцов интактной ткани лёгкого общими были 16 OTU. Основные из них относятся к представителям родов *Cutibacterium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Delftia*, группе *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, родам *Streptococcus*, *Bradyrhizobium*, *Brevibacillus*, *Brevundimonas*, *Arthrobacter* и *Gemella*. Пропионовокислые бактерии в основном были представлены *Cutibacterium acnes* (43%). Среди стафилококков преобладали

кожные комменсалы *Staphylococcus hominis* (9%). В семейство коринебактерий, наиболее представленное в образце № L-34, входило 15 видов, среди которых наиболее значимыми были липофильные *Corynebacterium tuberculostearicum* (5%) и *C. mucifaciens* (4%), часто встречающиеся на коже человека [Djossou et al., 2010; Hinić et al., 2012], а также патогенные *C. aquatimens* (2%) и *C. glucuronolyticum* (1%) [Aravena-Román et al., 2012; Ruiz-Pino et al., 2019]. В том же образце род *Prevotella* был в основном представлен *Prevotella copri* (18%) – граммотрицательными анаэробными комменсалами ЖКТ [Yeoh et al., 2022], а семейство *Comamonadaceae* – бактериями рода *Delftia* (4%). Топ-10 наиболее распространённых бактериальных родов представлен ниже (Рисунок 6). Другие микроорганизмы составляли менее 1% от общей численности.

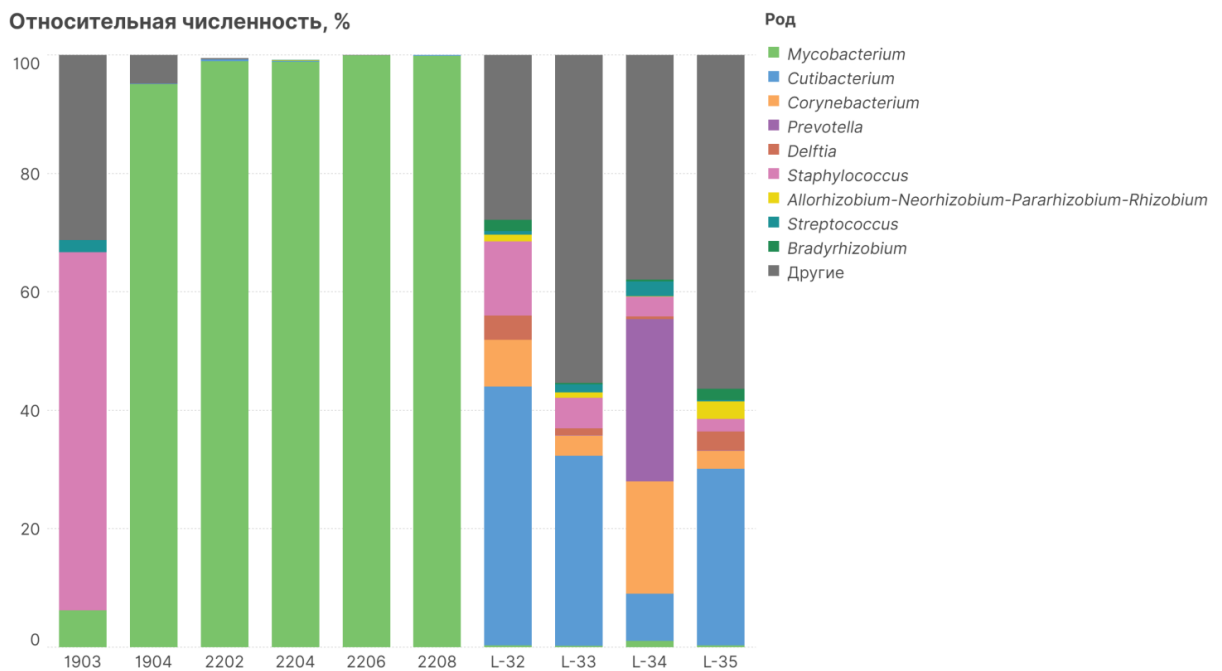


Рисунок 6 – Топ-10 основных идентифицированных бактериальных родов в микробиомах туберкулём и интактных лёгких.

Структура микробиоты

Для изученных микробиомов были рассчитаны показатели альфа-разнообразия (Таблица 8).

Таблица 8 – Сравнение индексов альфа-разнообразия, рассчитанных для микробиомов туберкулём (МБТ-богатых и с преобладанием сателлитных таксонов) и интактной ткани лёгких

Индекс	МБТ-богатая микробиота (LDMM) (1) $n = 11$	Сателлитная микробиота (HDBM+LDBM) (2) $n = 9$	Интактная ткань лёгких (3) $n = 4$	$U;$ p_{1-2}	$U;$ p_{1-3}	$U;$ p_{2-3}
H	0,4±0,4	2,1±0,6	2,7±0,5	$U = 2$ $p = 0,0004^*$	$U = 0$ $p = 0,005^*$	$U = 5$ $p = 0,05$
$1-D$	0,1 [0; 2]	0,8 [0,6; 0,9]	0,8 [0,8; 0,9]	$U = 1$ $p = 0,0003^*$	$U = 0$ $p = 0,005^*$	$U = 18$ $p = 0,9$
$Chao1$	18,2 [6; 37,6]	57 [41,8; 78,5]	103,5 [83,8; 124,8]	$U = 8,5$ $p = 0,002^*$	$U = 0$ $p = 0,005^*$	$U = 5$ $p = 0,05$

Примечание: LDMM – low α -diversity mycobacterial microbiota, HDBM – high α -diversity bystander microbiota, LDBM – low α -diversity bystander microbiota; * – различия статистически значимы.

Результаты анализа указывают на значимые различия как между туберкулёмами с высокой концентрацией МБТ и интактной тканью лёгких, так и между туберкулёмами, обогащёнными МБТ, и туберкулёмами с преобладанием сателлитной микробиоты. При этом различий в индексах альфа-разнообразия между микробиомами интактной ткани и туберкулёмами с доминированием сателлитной микробиоты не выявлено, т.е. они близки по бактериальному разнообразию, но не по таксономическому составу. Тем не менее, более высокие значения индексов Шеннона (H), Симпсона ($1-D$) и $Chao1$ указывают на большее таксономическое разнообразие и богатство микробиоты интактной ткани. Этот результат представляет значительный интерес, поскольку свидетельствует о развитии в ходе гранулёматозного воспаления ряда процессов, сходных с сукцессией в природных микробных сообществах. Вероятно, при формировании казеозного некроза происходит последовательная смена микробного консорциума, обусловленная изменениями условий существования, доступности питательных веществ или, например, воздействием антибиотиков. В условиях некротической среды гранулёмы, вероятно, доминирующее положение получают бактериальные таксоны, адаптированные к таким специфическим условиям.

Используя в качестве критерия величину индекса Симпсона ($1-D$), которая варьируется от 0 до 1, и долю МБТ в сообществе, микробиомы туберкулём были подразделены на два основных типа:

- МБТ-богатая микрофлора с низким альфа-разнообразием – LDMM (low α -diversity mycobacterial microbiota): $1-D < 0,6$, доля МБТ $> 50\%$;
- Полимикробное сообщество немикобактериальных видов:
 - с высоким альфа-разнообразием – HDBM (high α -diversity bystander microbiota): $1-D > 0,6$, доля МБТ $< 50\%$;
 - с низким альфа-разнообразием – LDBM (low α -diversity bystander microbiota): $1-D \leq 0,6$, доля МБТ $< 50\%$.

К типу LDBM относятся образцы № 1828 и № 1903, в которых доминируют стафилококки (до 73%), а также образец № 1800, где преобладают пастереллы (50%) (см. Рисунок 5). Возможно, что сообщества типа LDBM представляют собой стадию эволюции туберкулёзного очага с доминированием сателлитных таксонов (HDBM). Однако из-за ограниченного количества образцов, принадлежащих к этой группе, LDBM-сообщества были объединены с HDBM для дальнейшего анализа.

Высокие значения бета-разнообразия, измеренные с использованием индекса Брея-Кёртиса (BC), характеризующего различия в структуре бактериальных сообществ, свидетельствуют о значительном различии между собой бактериального состава отдельных образцов полимикробных туберкулём ($BC = 0,99$) и отдельных образцов интактной ткани лёгких ($BC = 0,91$), что согласуется с концепцией транзиторной природы микробиоты лёгких. Ожидаемо, микробные сообщества LDMM-туберкулём показали более высокую степень сходства ($BC = 0,67$).

Характеристика микробиоты по типу клеточной стенки и аэротолерантности

Была проведена характеристика микробиоты по типу клеточной стенки (окраска по Граму) и аэротолерантности основных выявленных микроорганизмов. Информация об аэротолерантности экстраполировалась на основе свойств

основных представителей соответствующих бактериальных семейств. В анализ включены только семейства, чья доля превышала 5% в образцах. Результаты показали, что доля грамположительных и грамотрицательных, а также аэробных и факультативно-анаэробных бактерий существенно варьирует в зависимости от типа микробного сообщества (Таблица 9).

Таблица 9 – Сравнение микробиоты казеума туберкулём и интактной ткани лёгких по типу клеточной стенки (окраска по Граму) и аэротолерантности основных бактериальных семейств

Показатель	МБТ-богатая микробиота (LDMM) (1) <i>n</i> = 11	Сателлитная микробиота (HDBM+LDBM) (2) <i>n</i> = 9	Интактная ткань лёгких (3) <i>n</i> = 4	<i>U</i> ; <i>p</i> ₁₋₂	<i>U</i> ; <i>p</i> ₁₋₃	<i>U</i> ; <i>p</i> ₂₋₃
Грам(+), %	98 [94; 99]	60 [34; 75]	55 [49; 72]	<i>U</i> = 2 <i>p</i> = 0,0008*	<i>U</i> = 0 <i>p</i> = 0,005*	<i>U</i> = 15 <i>p</i> = 0,9
Грам(-), %	2 [1; 6]	41 [25; 66]	45 [25; 48]	<i>U</i> = 2 <i>p</i> = 0,0008*	<i>U</i> = 0 <i>p</i> = 0,005*	<i>U</i> = 15 <i>p</i> = 0,9
Аэробы, %	95 [86; 99]	33 [16; 47]	24 [10; 40]	<i>U</i> = 0 <i>p</i> = 0,0002*	<i>U</i> = 0 <i>p</i> = 0,005*	<i>U</i> = 12 <i>p</i> = 0,4
Факультативные анаэробы, %	0 [0; 0,3]	44 [24; 55]	38 [32; 59]	<i>U</i> = 1 <i>p</i> = 0,001*	<i>U</i> = 0 <i>p</i> = 0,008*	<i>U</i> = 18 <i>p</i> = 0,9
Анаэробы, %	0 [0; 9,5]	3 [0; 7]	0,4 [0; 23]	<i>U</i> = 20 <i>p</i> = 0,6	<i>U</i> = 8 <i>p</i> = 0,4	<i>U</i> = 14 <i>p</i> = 0,8

Примечание: LDMM – low α -diversity mycobacterial microbiota, HDBM – high α -diversity bystander microbiota, LDBM – low α -diversity bystander microbiota; * – различия статистически значимы.

В целом, микробиота LDMM-туберкулём представлена почти исключительно грамположительными и аэробными микобактериями. В то же время, как полимикробные туберкулёмы, так и полимикробные сообщества интактной ткани лёгких включают как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии с широким спектром аэротолерантности. В этих сообществах доминируют факультативно-анаэробные микроорганизмы.

3.1.2. Прогноз функциональных профилей микробиоты

С использованием программы PICRUSt2 [Douglas et al., 2020] было выполнено *in silico* прогнозирование функциональных профилей микробных сообществ на основе данных метасеквенирования библиотек переменных фрагментов гена 16S рРНК для образцов туберкулём № 2202-2208, а также образцов группы сравнения № L-32-35. Данные, полученные с помощью метагеномного секвенирования «методом дробовика», оказались непригодными для анализа функциональных профилей ввиду крайне низкого количества бактериальных прочтений относительно человеческой ДНК, что ещё раз подчеркнуло трудности при работе с микробиомом лёгких в рамках биоинформатического подхода. В результате функциональное профилирование было выполнено исключительно для LDMM-туберкулём.

Для всех изученных сообществ был предсказан высокий биосинтетический потенциал (73,3%), преобладающий над другими метаболическими путями ($U = 1$, $p = 0,001$). Для изученных микробиомов туберкулём и интактной ткани лёгкого были установлены значимые различия в прогнозируемых функциональных профилях, которые охватывали как общее количество ортологов и метаболических путей, так и их тип (Таблица 10). Эти различия были подтверждены с помощью непараметрического многомерного дисперсионного анализа (one-way PERMANOVA) ($F = 88,3$, $p = 0,03$). В целом, бактериальные сообщества интактного лёгкого характеризовались бóльшим разнообразием метаболических путей, что связано с относительно высоким таксономическим богатством их состава по сравнению с казеозными очагами туберкулём, ограниченными метаболическими способностями микобактерий.

Таблица 10 – Сравнение спрогнозированных функциональных профилей микробиоты туберкулём и интактного лёгкого

Показатель	Туберкулёмы $n = 4$	Интактное лёгкое $n = 4$	p
Количество предсказанных ортологов	1129±131	1853±49	0,03*
Количество предсказанных метаболических путей	234±27	375±6	0,03*
Биосинтез, %	74,7±0,9	71,9±1,3	0,11

Деградация, утилизация, ассимиляция, %	7,8±1,1	13,2±1,1	0,47
Получение энергии и прекурсоров метаболитов, %	14,9±0,2	12,1±0,4	0,06
Модификация макромолекул, %	0,005±0,004	0,3±0,05	0,03*
Суперпути, %	2,6±0,2	2,5±0,2	0,06

Примечание: p – уровень значимости U -критерия Манна-Уитни, * – различия статистически значимы.

Согласно тепловой карте распределения генов-ортологов метаболических путей, наибольшая доля была связана с биосинтезом нуклеотидов и нуклеозидов, аминокислот, кофакторов, переносчиков и витаминов, углеводов, жирных кислот и липидов, клеточных структур, а также вторичных метаболитов. Среди путей биодеградации более 1% прогнозируемых ортологов приходилось на пути расщепления углеводов, одноуглеродных соединений, нуклеозидов и нуклеотидов, а также на метаболизм неорганических питательных веществ. В бактериальных сообществах лёгких была предсказана значительная роль цикла трикарбоновых кислот, гликолиза и дыхательных процессов (Рисунок 7).

Сравнение функциональных профилей микробиомов интактного лёгкого, проведённое с использованием рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса, не выявило статистически значимых различий между образцами ($H_c = 0,98$, $p = 0,8$). Это позволяет предположить, что представители микробиоты интактного лёгкого из разных таксонов используют сходные метаболические пути (см. Рисунок 7). Среди анаболических реакций доминирующую роль играли пути биосинтеза аминов и полиаминов, метаболических регуляторов, полипренилов, аминоксил-тРНК и других процессов синтеза. Также были предсказаны ортологи, связанные с биосинтезом коферментов, антиоксидантов, витаминов и некоторых сидерофоров, таких как энтеробактин, и тейхоевых кислот – компонентов клеточной стенки многих грамположительных бактерий, в том числе представителей *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* [Brown et al., 2013], но не клеточной стенки МБТ. Среди катаболических реакций предсказаны пути ассимиляции различных органических и некоторых неорганических соединений (например, нитратов, метилфосфоната, цикл мочевины), а также множество ортологов, участвующих в ассимиляции простых и

сложных сахаров (глюкозы, лактозы, сукрозы, галактозы, гликогена и крахмала) и других углеводов. Для микробиоты интактного лёгкого также были предсказаны более разнообразные пути модификации макромолекул, включая биосинтез кевозина (модифицированный нуклеозид, присутствующий в некоторых тРНК бактерий) с помощью фермента эпоксикевозинредуктазы (EC 1.17.99.6).

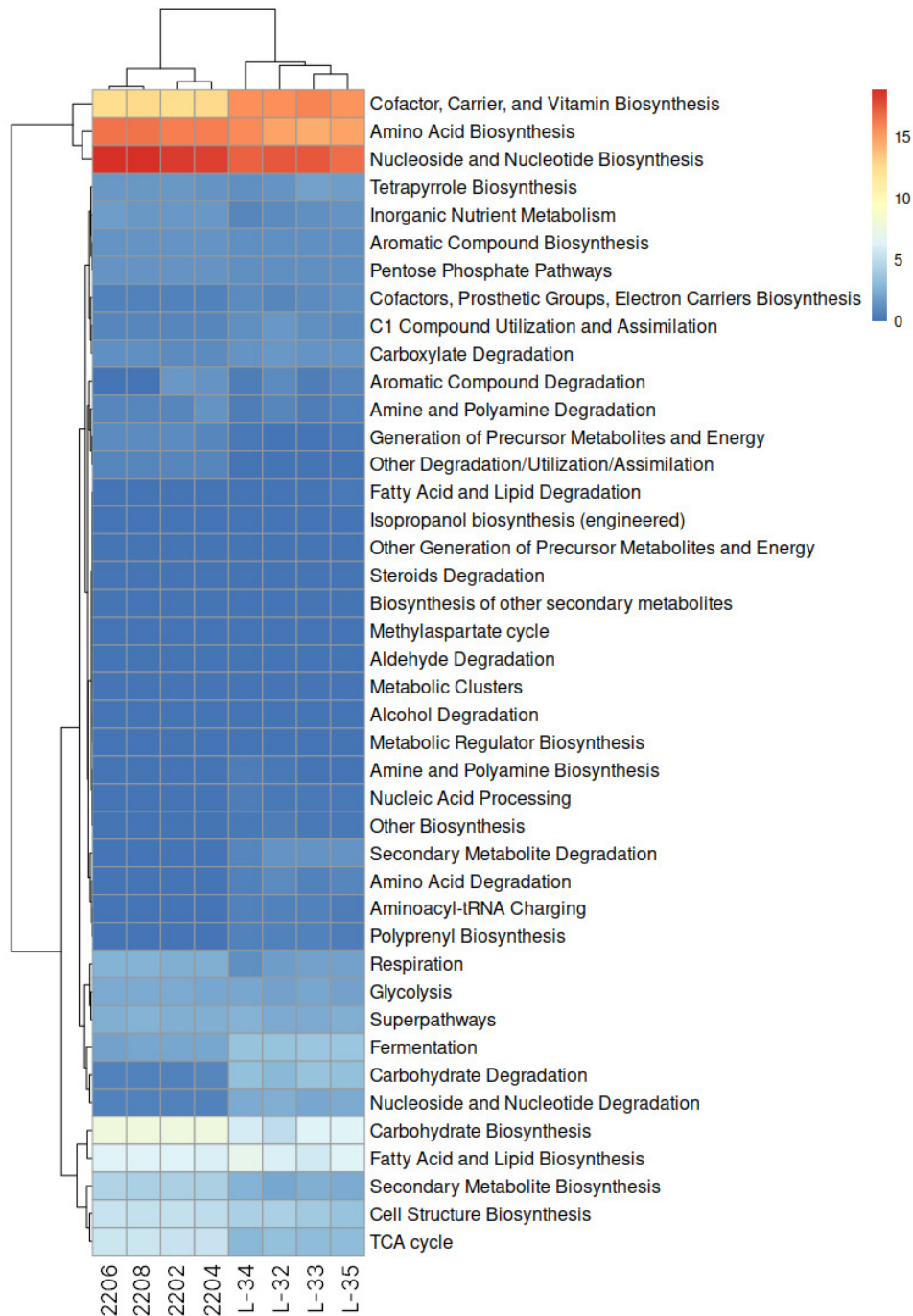


Рисунок 7 – Тепловая карта относительной представленности прогнозируемых метаболических путей микробиоты туберкулём и интактной ткани лёгких.

Повышенное количество предсказанных ортологов, связанных с энтеробактерином – высокоаффинным сидерофором, хелатирующим железо, свидетельствует о распространённости данного метаболического пути среди транзитной микробиоты лёгких. В условиях некротической среды казеума доступность микроэлементов, в частности железа, ограничена. Хотя прямое количественное определение свободного железа в казеозных очагах туберкулёзных гранулём не проводилось [Sarathy et al., 2020], имеются косвенные свидетельства его дефицита [Kurthkoti et al., 2017]. Учитывая, что железо необходимо для жизнедеятельности большинства микроорганизмов, между сателлитной микробиотой и МБТ может возникать конкуренция за этот ограниченный ресурс.

Различия в функциональных профилях микробиомов интактных лёгких и туберкулёзных гранулём охватывали более половины метаболических путей (Рисунок 8). Для микробиомов туберкулём было спрогнозировано значительное усиление процессов биосинтеза углеводов, нуклеотидов, клеточных структур (преимущественно компонентов клеточной стенки) и вторичных метаболитов. Например, предсказан биосинтез GDP-D-глицеро- α -D-манно-гептозы, необходимой для сборки гликопротеина S-слоя у некоторых грамположительных бактерий [Kosma et al., 1995]. В её образовании участвуют обнаруженные *in silico* с помощью PICRUSt2 ферменты D-глицеро- α -D-манно-гептозо-7-фосфаткиназа (EC 2.7.1.168) и D-глицеро- α -D-манно-гептозо-1,7-бифосфат-7-фосфатаза (EC 3.1.3.83). Наличие этих ферментов описано и для микобактерий (UniProtKB O53637, P9WMV3). Предсказаны метаболические пути синтеза пептидогликана и комплекса миколил-арабиногалактан-пептидогликан (mAGP), который составляет клеточную стенку МБТ и отвечает за устойчивость ко многим ПТП. Количество ортологов, ответственных за разнообразные энергетические реакции (генерация метаболитов-предшественников и посредников обмена энергии, цикл трикарбоновых кислот, дыхание), также было обогащено среди микробиомов туберкулём.



Рисунок 8 – Различия в относительной представленности спрогнозированных метаболических путей микробиомов туберкулём и интактных лёгких. Данные представлены в виде медиан с 95 % доверительным интервалом, вычисленным по медианным значениям. Уровень значимости U -критерия Манна-Уитни для всех сравниваемых групп $p < 0,05$.

Многие различия касались катаболических процессов, причём бактериальное сообщество туберкулём в целом демонстрировало сниженные способности к деградации различных органических соединений (спирты, альдегиды, аминокислоты, карбоксильные соединения, жирные кислоты и липиды, нуклеозиды и нуклеотиды, вторичные метаболиты). Однако, несмотря на общее снижение катаболизма липидов, было обнаружено значительное увеличение ($p = 0,03$) количества ортологов холестеролоксидазы (ЕС 1.1.3.6). Интересно отметить также повышенный уровень фермента эноил-КоА гидратазы (ЕС 4.2.1.17), который составлял в среднем 1% ортологов в микробиомах туберкулём по сравнению с 0,2% в микробиомах интактных лёгких. Этот фермент

участвует в β -окислении жирных кислот и катаболизме холестерина у МБТ, что имеет критическое значение для её персистенции [Yang et al., 2014].

Также 1% предсказанных ортологов был связан с циклопропан-синтазой жирных кислот (ЕС 2.1.1.79), ферментом, участвующим в биосинтезе циклопропановой кислоты. Известно, что патогенные виды микобактерий имеют несколько генов циклопропан-синтаз жирных кислот, которые ответственны за синтез циклопропановых колец миколовых кислот [Yuan et al., 1995; Glickman, 2003]. Эти ферменты активно участвуют в патогенезе ТБ и идентифицированы как мишени для новых ПТП [Rao et al., 2005]. В микробиомах интактных лёгких ортологи этого фермента прогнозировалось не более чем в 0,1% случаев. Усиленный липидный метаболизм отражает условия, характерные для казеума туберкулём, где в результате гранулёматозного воспаления и казеозного некроза формируется гипоксическая среда с высокой концентрацией липидов макрофагов. Это способствует персистенции МБТ, активно использующей липиды в своём метаболизме [Sarathy et al., 2020].

Для микробиомов туберкулём был предсказан усиленный метаболизм неорганических соединений, главным образом за счёт увеличения активности суперпути ассимиляции сульфатов, биосинтеза цистеина и ассимиляционной сульфатредукции I. Ассимиляция сульфатов связана со значительным ($p < 0,03$) увеличением количества предсказанных ортологов АТФ-сульфуриказы (ЕС 2.7.7.4), тиосульфатсульфотрансферазы (ЕС 2.8.1.1), сульфатаденилилтрансферазы (ЕС 2.7.7.4) и аденилсульфаткиназы (ЕС 2.7.1.25). Ассимиляционный метаболизм серы с помощью этих ферментов описан для микобактерий и связан с вирулентностью, устойчивостью к антибиотикам и антиоксидантной защитой МБТ [Williams et al., 2002; Pinto et al., 2004; Meza et al., 2019]. Более того, тиосульфатсульфотрансфераза CysA2 МБТ стимулирует иммунный ответ, взаимодействуя с клетками лёгких и активируя макрофаги и дендритные клетки [Meza et al., 2019], а сульфатаденилилтрансфераза и аденилсульфаткиназа последовательно участвуют в создании 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (PAPS) – субстрата для сульфотрансфераз, которые

продуцируют сульфолипиды, предполагаемые факторы вирулентности МБТ [Williams et al., 2002].

Сера играет ключевую роль в ряде микробных метаболических процессов. Установлено, что ассимиляционный метаболизм серы у МБТ связан с вирулентностью патогена и опосредует его взаимодействие с иммунной системой человека [Williams et al., 2002; Pinto et al., 2004; Meza et al., 2019]. В частности, сульфолипиды ингибируют активацию и слияние фагосом и лизосом в макрофагах [Pabst et al., 1988]. Сера также присутствует в микотиоле – микобактериальном аналоге глутатиона, который регулирует окислительно-восстановительный баланс клеток и играет важную роль в защите микобактерий от токсических окислителей и действия ПТП, таких как рифампицин и изониазид [Buchmeier et al., 2003].

3.1.3. Исследование взаимосвязи клинических показателей с типом бактериального сообщества туберкулёзного очага

Для 19 пациентов с ТБ были получены подробные рентгенологические данные и результаты патогистологических исследований иссечённых туберкулёзных очагов, выполненные врачами ОГБУЗ ИОКТБ. Также были собраны доступные данные ОАК и биохимического исследования крови (Приложение Б). Проведён сравнительный анализ этих клинических данных и результатов метагеномного секвенирования.

Клинические данные сопоставлялись с процентным содержанием МБТ в образцах, а также с относительным содержанием представителей семейства *Staphylococcaceae*, поскольку особый интерес представляли нетипичные микробные сообщества, где преобладали немикобактериальные таксоны. В качестве критерия разделения образцов на группы использовалось относительное содержание микроорганизмов: от 0 до 50% (группа 1: M1 и S1) и более 50% (группа 2: M2 и S2). Единственное статистически значимое различие выявлено в отношении инфильтрации туберкулёзного очага нейтрофилами, которая оказалась характерна только для туберкулёмы с высоким содержанием стафилококков ($\chi^2 = 4,2, p = 0,04$) (Таблица 11).

Таблица 11 – Сравнение данных рентгенологического описания и патогистологического исследования туберкулём с бактериальным таксоном, доминирующим в казеуме

Клинический показатель	<i>Mycobacteriaceae</i>			<i>Staphylococcaceae</i>		
	M1 n = 8	M2 n = 11	χ^2 p	S1 n = 18	S2 n = 1	χ^2 ; p
Инфильтрация ТБ очага нейтрофилами (да / нет / n/a)	1 / 7 / 0	0 / 11 / 0	$\chi^2 = 0,03$ p = 0,9	0 / 18 / 0	1 / 0 / 0	$\chi^2 = 4,2$ p = 0,04*
Инфильтрация ТБ очага лимфоцитами (да / нет / n/a)	3 / 5 / 0	3 / 8 / 0	$\chi^2 = 0,2$ p = 0,6	5 / 13 / 0	1 / 0 / 0	$\chi^2 = 0,2$ p = 0,7
Кальцинаты (да / нет / n/a)	4 / 3 / 1	5 / 4 / 2	$\chi^2 = 0,004$ p = 1	9 / 6 / 3	0 / 1 / 0	$\chi^2 = 0,02$ p = 0,9
Бактериовыделение (да / нет / n/a)	2 / 4 / 2	4 / 5 / 2	$\chi^2 = 0,2$ p = 0,7	6 / 8 / 4	0 / 1 / 0	$\chi^2 = 0,7$ p = 0,4
Дополнительные очаги (да / нет / n/a)	7 / 1 / 0	8 / 1 / 2	$\chi^2 = 0,008$ p = 0,9	14 / 2 / 2	1 / 0 / 0	$\chi^2 = 0,1$ p = 0,7

Примечание: * – различия статистически значимы.

Доступные клинические данные общего и биохимического анализов крови были сопоставлены с типами микробиоты (МБТ-богатые туберкулёмы и полимикробная сателлитная микробиота). У пациентов с преобладанием сателлитной микробиоты в очаге наблюдалось увеличение количества лейкоцитов и тромбоцитов периферической крови. По другим клиническим показателям статистически значимых различий не выявлено (Таблица 12).

Лейкоциты являются основными участниками иммунной защиты при ТБ и формировании гранулём. Тромбоциты участвуют в воспалительных реакциях и могут взаимодействовать с клетками иммунной системы, усиливая их активацию. При продолжительной активации микротромбообразование может стать неконтролируемым и необратимым. Нарушение функции тромбоцитов может быть обусловлено гиперергической реакцией организма на инфекцию и тяжёлым течением болезни. Таким образом, нейтрофильная инфильтрация стафилококковых гранулём и повышенный уровень тромбоцитов и лейкоцитов периферической крови отражает более активный воспалительный процесс, характерный для туберкулёзных очагов с преобладанием сателлитной микробиоты. По-видимому, такая реакция является частью комплексного

иммунного ответа на хроническое воспаление и повреждение тканей, связанное с патогенетически значимой микробиотой туберкулёзного очага.

Таблица 12 – Сравнение показателей общего и биохимического анализов крови с типом микробиоты казеума туберкулём

Показатель	МБТ-богатая микробиота (LDMM) <i>n</i> = 9	Сателлитная микробиота (HDBM+LDBM) <i>n</i> = 5	$\chi^2/U; p$
Эритроциты, $10^{12}/л$	4,3±0,4	4,7±0,4	$U = 10$ $p = 0,2$
Гемоглобин, г/л	140±9	144±11	$U = 14,5$ $p = 0,5$
Лейкоциты, $10^9/л$	5,6±2,4	9,4±2,9	$U = 7$ $p = 0,046^*$
Эозинофилы, %	2 [2; 8]	3 [1; 5]	$U = 21,5$ $p = 0,9$
Базофилы, %	0 [0; 0]	0 [0; 0]	$\chi^2 = 0,6$ $p = 0,4$
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1 [1; 3]	1 [1; 2]	$U = 17,5$ $p = 0,5$
Сегментоядерные нейтрофилы, %	52±9	52±18	$U = 22$ $p = 0,98$
Моноциты, %	7 [5; 8]	7 [5; 8]	$U = 21$ $p = 0,8$
Лимфоциты, %	39 [30; 41]	34 [24; 38]	$U = 14$ $p = 0,3$
Тромбоциты, $10^9/л$	245 [226; 327]	355 [320; 475]	$U = 7$ $p = 0,045^*$
СОЭ, мм/ч	6 [3; 16]	10 [3; 16]	$U = 20,5$ $p = 0,8$
Общий белок, г/л	69±6	63±6	$U = 12,5$ $p = 0,2$
Билирубин, мкмоль/л	10,8±2,7	14,9±4,3	$U = 9$ $p = 0,08$
Мочевина, ммоль/л	4,3±1,3	4,4±1,2	$U = 20$ $p = 0,9$
Креатинин, мкмоль/л	72±18	77±14	$U = 19$ $p = 0,6$

Примечание: * – различия статистически значимы.

Материалы данной подглавы изложены в следующих статьях: Metagenomic analysis of the lung tuberculomas microbiome: paucibacillary bacterial community / O. Ogarkov, P. Khromova, V. Sinkov, E. Orlova *et al.* // International Journal of Mycobacteriology. – 2021. – Vol. 10, Suppl. 1. – P. S13. DOI: 10.4103/2212-5531.307062 [Ogarkov *et al.*, 2021]; Анализ микробного разнообразия казеозного некроза туберкулёзных очагов / Е. А. Орлова, О. Б. Огарков, А. Е. Суздальницкий

и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2021. – Т. 39, № 3. – С. 18-24. DOI: 10.17116/molgen20213903118 [Орлова и др., 2021]; Анализ разнообразия и функционального потенциала бактериальных сообществ туберкулёзных очагов / Е. А. Орлова, О. Б. Огарков, И. Г. Кондратов и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2024. – № 1. – С. 29-36. DOI: 10.47056/1814-3490-2024-1-29-36 [Орлова и др., 2024a]; Метагеномный анализ казеозного содержимого туберкулёзных очагов / Е. А. Орлова, В. В. Синьков, О. Б. Огарков и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 178, № 11. – С. 569-573. DOI: 10.47056/0365-9615-2024-178-11-569-573 [Орлова и др., 2024b].

Резюме

Результаты анализа туберкулёзных очагов с применением молекулярно-биологических подходов и технологии NGS позволили выделить два основных типа бактериальных сообществ: i) классическая микобактериальная микрофлора (LDMM) и ii) полимикробное сообщество, характеризующееся увеличением доли бактерий, не относящихся к роду *Mycobacterium* (HDBM). Предсказанные *in silico* функциональные профили микробиомов интактных лёгких и туберкулём с высокой концентрацией МБТ различаются более чем по половине метаболических путей. Для туберкулём прогнозируется усиление биосинтеза углеводов, компонентов клеточной стенки, вторичных метаболитов, энергетических реакций, а также метаболизма серы и холестерина – факторов, связанных с патогенностью МБТ.

Полимикробные сообщества туберкулём, как и микробиота интактной лёгочной ткани, состоят преимущественно из факультативно-анаэробных микроорганизмов, представляющих различные таксоны, причём структура этих сообществ варьирует между образцами. Особое место занимают олигобактериальные сообщества туберкулём с низким бактериальным разнообразием, где доминируют немикобактериальные виды (LDBM), такие как представители факультативно-анаэробных семейств *Staphylococcaceae* или *Pasteurellaceae*. Наличие выраженной нейтрофильной инфильтрации в казеозном

содержимом и прилегающих тканях туберкулём с доминированием стафилококков, а также повышенный уровень тромбоцитов и лейкоцитов периферической крови подтверждают патофизиологическую связь между микробиомом и воспалительными процессами в пределах очага.

Эти данные подтверждают гипотезу о том, что исходное микробное сообщество туберкулёзного очага формируется изоляцией иммунной системой хозяина вместе с МБТ других микробов, попавших туда транзиторно. Присутствие факультативно-анаэробных бактерий может способствовать образованию не только традиционных микобактериальных гранулём, но и полимикробных сообществ с доминированием сателлитных таксонов. Можно предполагать, что размножение немикобактериальных видов бактерий препятствует обратному развитию казеозного воспаления туберкулём, сопровождающемуся уменьшением размера и обызвествлением очага.

3.2. Фенотипические характеристики и иммуногенность микробиоты казеозного некроза туберкулём

На втором этапе исследования проведён ретроспективный микробиологический скрининг факультативно-анаэробных бактерий среди образцов казеума туберкулём ($n = 73$). Цель данного этапа заключалась в оценке способности представителей микробиоты туберкулёзного очага вызывать иммунный ответ, усиливать гранулёматозное воспаление и способствовать разжижению казеума. Основными задачами было выделение чистых культур микроорганизмов и изучение их биохимических и микробиологических свойств, а также лекарственной чувствительности и иммуногенности для поиска потенциальных продуцентов биологически активных веществ с иммуномодулирующими свойствами.

Для выявления особенностей гуморального и клеточного иммунного ответа на антигены микроорганизмов, выделенных из туберкулёзных очагов, была набрана основная группа пациентов с ТБ ($n = 90$) и контрольная группа здоровых добровольцев ($n = 90$) в соответствии с критериями включения. Для изучения влияния микробиоты казеума туберкулём на клетки врождённого иммунитета

(перитонеальные макрофаги и спленоциты мыши) проведён эксперимент *in vitro*, моделирующий гранулёматозное воспаление в туберкулёзном очаге.

3.2.1. Выделение и характеристика микроорганизмов из казеозного некроза туберкулём

При анализе 73 образцов стабильный и воспроизводимый рост на агаризованной среде был зафиксирован для 8 штаммов факультативно-анаэробных микроорганизмов: 2204, 2206/1, 2206/2 (два штамма выделены из одного образца), 2336, 2404, 2409, 2411 и 2414.

Клеточная стенка выделенных микроорганизмов оказалась весьма устойчивой к стандартным методам лизиса. Для выделения ДНК применяли длительную температурную обработку в щёлочном растворе, после чего использовали стандартный метод фенол-хлороформной экстракции с гуанидинтиоцианатом. Идентификация штаммов была проведена с помощью секвенирования генов 16S рРНК и *rpoB* методом Сэнгера, а также полногеномного NGS (WGS). Полученные последовательности были депонированы в базу данных NCBI: OP550281, OP893659 и SRX23556596 (штамм 2206/1, гены 16S рРНК, *rpoB* и WGS соответственно); OP550282, OP893660 и SRX23556597 (штамм 2206/2, гены 16S рРНК, *rpoB* и WGS соответственно); PRJNA971334 (штамм 2204, WGS), SAMN44033508 и SAMN44033509 (штамм 2336, WGS), SAMN44033510 (штамм 2404, WGS), SAMN44033511 (штамм 2409, WGS), SAMN44033512 (штамм 2411, WGS), SAMN44033513 (штамм 2414, WGS).

По совокупности полученных генетических данных штамм 2204 был идентифицирован как *Corynebacterium kefirresidentii*, штаммы 2206/1 и 2206/2 – два штамма вида *Staphylococcus epidermidis*, 2336 – *Corynebacterium ureicelerivorans*, 2404, 2409 и 2411 – три штамма вида *Staphylococcus hominis*, 2414 – *Staphylococcus epidermidis*. Далее более подробно изучались свойства трёх штаммов – 2204, 2206/1 и 2206/2.

Штамм 2204 был выделен из творожистого некроза гранулёмы, полученной от пациентки с диагнозом туберкулёма нижней доли правого легкого в фазе обсеменения и сопутствующих хронических воспалительных диагнозов, включая

сальпингит и периодонтит. Пациентка ранее болела ТБ (в детстве) и на момент операции проходила лечение ТБ по III режиму химиотерапии, включающему применение изониазида, рифампицина, пиразинамида и этамбутола. На фоне лечения отмечалась положительная динамика и уменьшение инфильтрации, рассасывание и уплотнение очагов в лёгком. Штаммы 2206/1 и 2206/2 были выделены из гранулёмы, полученной от пациентки с диагнозом инфильтративный ТБ верхней доли левого лёгкого в фазе распада и сопутствующих ВИЧ-инфекции, хронического вирусного гепатита С, периодонтита и цервицита. Пациентка принимала изониазид, рифампицин и этамбутол.

Род *Corynebacterium*, насчитывающий по данным международной микробиологической базы LPSN около 170 видов, представляет собой грамположительные палочковидные бактерии, некоторые из которых имеют медицинское, ветеринарное и биотехнологическое значение или являются потенциально патогенными, например, *C. diphtheria*. Виды *Corynebacterium* широко распространены и составляют значительную часть микробиоты человеческой кожи [Council et al., 2016]. Наиболее часто встречающимися на коже видами являются липофильные *C. tuberculostearicum*, *C. kefirresidentii* и *C. aurimicosum* типа E, образующие узкий видовой комплекс [Salamzade et al., 2023]. *C. ureicelerivorans* является условно-патогенным липофильным микроорганизмом с исключительно высокой уреазной активностью [Yassin, 2007]. Важной особенностью этой группы является их неспособность синтезировать жирные кислоты *de novo*, хотя они способны продуцировать специфические миколовые кислоты, которые входят в состав клеточной стенки и частично аналогичны тем, что синтезируются микобактериями [Dover et al., 2021]. У некоторых видов коринебактерий описано образование биоплёнок, связанное с их вирулентностью [Olson et al., 2002; Soriano et al., 2009; Souza de et al., 2015; Ozdemir et al., 2021].

S. epidermidis принадлежит к группе грамположительных коагулазоотрицательных стафилококков и также является компонентом нормальной микрофлоры кожи и слизистых оболочек человека. В последние годы этот микроорганизм стал одной из частых причин внутрибольничных инфекций,

включая катетер-ассоциированные инфекции и септицемию, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом [Otto, 2009]. *S. epidermidis* содержит гены, которые, как предполагается, обеспечивают его защиту в экстремальных условиях естественной среды обитания. Этот вид способен к образованию биоплёнок и формированию капсул с помощью защитных экзополимеров, известных как капсульный полисахарид/адгезин (PS/A). Предполагается, что эти структуры способствуют адгезии бактериальных клеток к биоматериалам и защищают их от фагоцитоза со стороны клеток хозяина [Kojima et al., 1990]. Вероятно, именно капсульная форма клинических изолятов *S. epidermidis*, выделенных из туберкулёзного очага, обеспечила его жизнеспособность после глубокой заморозки при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и объясняет крайнюю устойчивость клеток к разрушению.

В исследованиях кожного микробиома установлено, что для роста *S. epidermidis* и *C. kefirresidentii* необходимы экзогенные липиды, которые на коже присутствуют в составе себума – смеси триглицеридов, эфиров восков, холестерина, свободных жирных кислот и сквалена [Swaney et al., 2023]. Казеоз туберкулём также является богатой липидами средой, способной поддерживать рост липофильных микроорганизмов. Липазная активность была подтверждена у штамма *C. kefirresidentii*. При культивировании на среде с 0,1% Tween-80 (производное сорбита и олеиновой кислоты) и 10 мМ CaCl_2 , вокруг колоний в толще агара формировался ореол нерастворимых кальциевых солей свободных жирных кислот, что указывает на высокую липазную активность штамма *C. kefirresidentii* (Рисунок 9).

Биохимические свойства штаммов *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 были дополнительно исследованы с использованием биохимических тест-систем. Штамм *S. epidermidis* 2206/2, в частности, проявлял желатиназную и β -гемолитическую активность (Таблица 13). Желатиназная активность ответственна за расщепление желатина – частично гидролизованного коллагена, составляющего основу соединительной ткани стромы лёгкого. За счёт уреазной

активности *S. epidermidis* могут изменять pH от кислого до нейтрального, что характерно для зрелых очагов казеоза в туберкулёмах [Sarathy et al., 2020].



Рисунок 9 – Липазная активность штамма *S. kefirresidentii*: вокруг роста культуры виден ореол нерастворимых кальциевых солей свободных жирных кислот [Огарков и др., 2023].

Таблица 13 – Биохимические и микробиологические свойства штаммов *S. epidermidis* 2206/1 и *S. epidermidis* 2206/2

Параметры	<i>S. epidermidis</i> 2206/1	<i>S. epidermidis</i> 2206/2
STAPHYtest 16 (Erba Lachema)		
VPT Ацетоин	да	да
URE Уреаза	да	да
ARG Аргинин	нет	нет
ORN Орнитин	нет	нет
BGA β-Галактозидаза	нет	нет
GLR β-Глюкуронидаза	нет	нет
ESL Эскулин	нет	нет
NIT Нитраты	нет	нет
PHS Фосфатаза	нет	нет
GAL Галактоза	да	да
SUC Сахароза	да	да
TRE Трегалоза	нет	нет
MAN Маннитол	нет	нет
XYL Ксилоза	нет	нет
MLT Мальтоза	да	да
MNS Манноза	да	да
LAC Лактоза	да	да
Микробиологические тесты		
Желатиназа	нет	да
Коагулаза	нет	нет
Гемолиз	нет	да (β-type)
Липаза	нет	нет

Выделенные штаммы демонстрировали ограниченный спектр устойчивости к ПТП и противомикобактериальным препаратам первого ряда (Таблица 14).

Штамм *C. kefirresidentii* оказался устойчив к изониазиду, триметоприму/сульфаметоксазолу и этионамиду. Конситутивная устойчивость коринебактерий к изониазиду может объясняться особенностями липидного обмена, поскольку у этой группы отсутствует ген *InhA* [Огарков и др., 2023]. Штаммы *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 различались по спектру лекарственной устойчивости: штамм 2206/1 был устойчив к изониазиду и этамбутолу, тогда как штамм 2206/2 проявлял дополнительную устойчивость к кларитромицину и триметоприму/сульфаметоксазолу. Таким образом, выделенные штаммы обладали устойчивостью к антибиотикам (изониазид, этамбутол), применяемым в терапии пациентов.

Таблица 14 – Тестирование чувствительности штаммов *C. kefirresidentii*, *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 к ПТП и противомикробным препаратам

Антибиотик	<i>C. kefirresidentii</i>	<i>S. epidermidis</i> 2206/1	<i>S. epidermidis</i> 2206/2
Кларитромицин	S	S	R
Рифабутин	S	S	S
Этамбутол	S	R	R
Изониазид	R	R	R
Моксифлоксацин	S	S	S
Рифампицин	S	S	S
Триметоприм/Сульфаметоксазол	R	S	R
Амикацин	S	S	S
Линезолид	S	S	S
Ципрофлоксацин	S	S	S
Стрептомицин	S	S	S
Доксициклин	S	S	S
Этионамид	R	S	S
Цефокситин	S	S	S
Тигециклин	S	S	S
Имипенем	S	S	S
Цефепим	S	S	S
Амоксициллин/Клавулановая кислота	S	S	S
Цефтриаксон	S	S	S
Миноциклин	S	S	S
Тобрамицин	S	S	S

Примечание: S – Susceptibility (чувствительность), R – Resistance (устойчивость).

Для оценки иммуногенности выделенных штаммов необходима экстракция их клеточных компонентов, содержащих иммуногены – антигены и патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMPs, Pathogen-Associated

Molecular Patterns). Для этой цели можно использовать клеточные лизаты бактерий. Наиболее распространённые методы лизиса включают щёлочную обработку и механическое разрушение. Щёлочной лизис может привести к денатурации антигенов, в то время как механическое разрушение, как предполагается, не изменяет антигенные структуры [Suárez et al., 2020].

Для эффективной экстракции тотального клеточного белка потребовался экспериментальный подбор условий культивирования и лизиса клеток. Изначально для выращивания культур использовали стандартную среду LB с добавлением 0,1% Tween-80 в качестве источника липидов. Для штаммов *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 также применяли среду NB, рекомендованную для культивирования модельного штамма *S. epidermidis* ATCC12228, а для штамма *C. kefirresidentii* – среду VNI Broth, которая часто используется для выращивания коринебактерий. Было отмечено, что в среде LB культуры *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 растут значительно быстрее, но лизис клеток происходит неэффективно. Вероятно, по мере увеличения плотности культуры происходит накопление капсульных полисахаридов/адгезинов, что препятствует лизису клеток. Максимальную концентрацию клеточной массы с сохранением разнообразия профиля выделяемых белков удалось достичь при культивировании *C. kefirresidentii* на среде VNI Broth, а штаммов *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 – на среде NB, с последующим механическим лизисом клеток инертными частицами размером 0,1 и 0,5 мм. Полученные клеточные лизаты далее использовались для оценки иммуногенности соответствующих микроорганизмов с помощью нескольких ключевых методов, направленных на изучение как гуморального, так и клеточного иммунного ответа.

3.2.2. Анализ клеточного иммунитета

Иммунный ответ при ТБ включает различные компоненты клеточного иммунитета, в том числе цитокины Т-лимфоцитов, которые регулируют воспаление и уничтожение патогена. Провоспалительные цитокины, такие как IFN- γ и TNF- α , продуцируются Т-лимфоцитами и NK-клетками, стимулируют дифференцировку Th1-клеток, активируют макрофаги и способствуют контролю

инфекции. IL-4 продуцируется Т-лимфоцитами, стимулирует дифференцировку Th2-клеток и активирует В-клетки. Противовоспалительный IL-10 продуцируется Т- и В-лимфоцитами, ингибирует синтез цитокинов, стимулирует дифференцировку Treg-клеток и приводит к супрессии макрофагов, способствуя хронизации заболевания. Таким образом, баланс между цитокинами Т-клеток определяет течение инфекции, влияет на эффективность защиты и уровень повреждения ткани.

Квантифероновый IGRA-тест (оценка IFN- γ)

Для изучения Т-клеточного иммунитета на митогены и антигены МБТ, *S. kefirresidentii*, *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 был проведён модифицированный квантифероновый IGRA-тест среди пациентов с ТБ и здоровых лиц. В современной диагностике ТБ квантифероновый IGRA-тест применяют для выявления ЛТБИ и активного ТБ путём измерения уровней IFN- γ , вырабатываемого *ex vivo* после стимуляции сенсibilизированных Т-лимфоцитов цельной или периферической крови специфичными пептидными антигенами МБТ (ESAT-6, CFP-10 и TB 7.7). Известно, что на этот тест не влияет предшествующая вакцинация БЦЖ [Doan et al., 2017]. В данной работе квантифероновый IGRA-тест применялся в модификации с применением клеточных лизатов штаммов *S. kefirresidentii*, *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 в качестве альтернативных антигенов для проверки наличия Т-клеточного иммунитета к данным микроорганизмам у пациентов с ТБ и здоровых доноров.

Уровень IFN- γ в контроле (без добавления антигена) в обеих группах находился в пределах нормальных значений и не превышал 10 пг/мл ($U = 87$, $p = 0,2$). При суточной обработке клеток крови коммерческим митогеном выделение IFN- γ значительно увеличивалось в обеих исследуемых группах в пределах значений, заявленных производителем ($Me = 1104,6$ пг/мл [362,2; 1259,1] в группе здоровых доноров и $Me = 600,8$ пг/мл [323,2; 1396,9] в группе больных ТБ), при этом не наблюдалось статистически значимого различия между группами ($U = 97$, $p = 0,9$).

В ответ на обработку клеток крови специфическими антигенами МБТ выброс $\text{IFN-}\gamma$, как и ожидалось, был значительно выше в группе больных ТБ ($\text{Me} = 41,1$ пг/мл [13,6; 168,9]) по сравнению со здоровыми донорами ($\text{Me} = 1,1$ пг/мл [0,2; 2,6]), различие статистически значимо ($U = 6$, $p = 0,00002$). Три здоровых донора, однако, имели положительный результат на МБТ и были исключены из дальнейшего анализа (Рисунок 10).

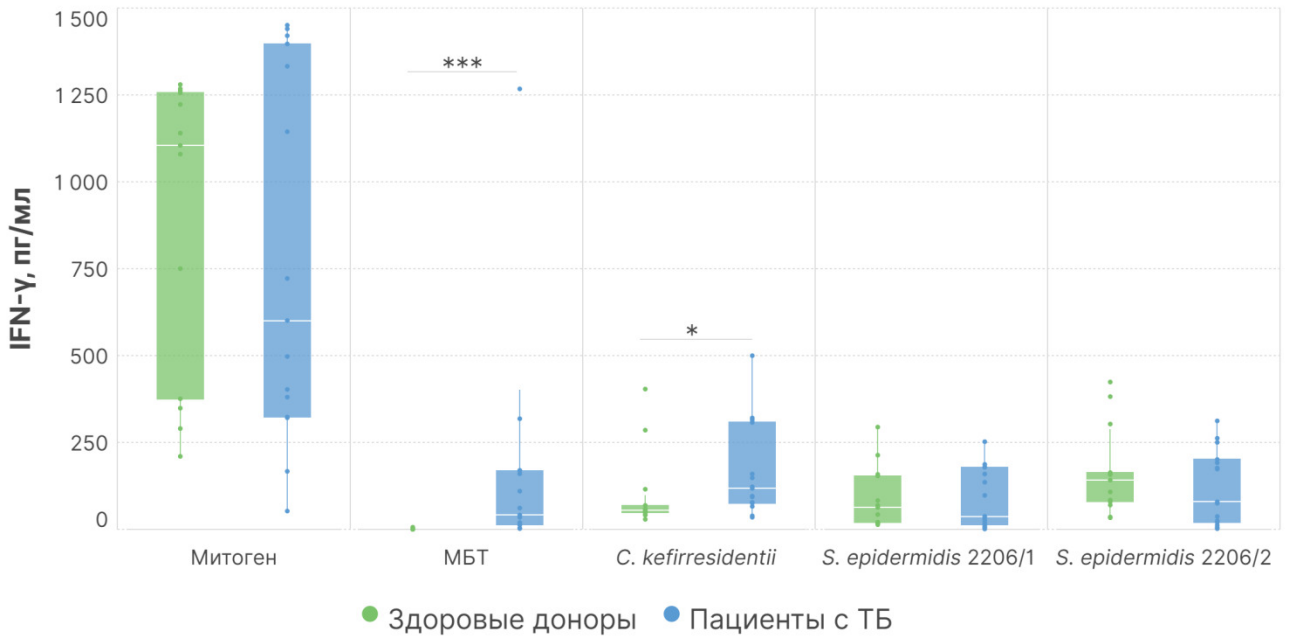


Рисунок 10 – Концентрации $\text{IFN-}\gamma$ в ответ на обработку клеток крови митогеном, антигенами МБТ, *C. kefirresidentii*, *S. epidermidis* (штаммы 2206/1 и 2206/2) в группах здоровых доноров и пациентов с ТБ; p – уровень значимости U -критерия Манна-Уитни: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

Клеточный лизат *C. kefirresidentii* вызывал значительное увеличение концентрация $\text{IFN-}\gamma$ у больных с ТБ ($\text{Me} = 117,6$ пг/мл [75,6; 307,5]), в некоторых случаях превосходящее ответ на антигены МБТ, что может свидетельствовать о наличии активного Т-клеточного ответа против коринебактерий у данных пациентов. Было обнаружено статистически значимое отличие ($U = 51$, $p = 0,03$) от группы здоровых доноров, где средний уровень $\text{IFN-}\gamma$ составил 55,8 пг/мл [45,9; 92,0]. Клеточные лизаты *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 вызывали значительное увеличение концентрация $\text{IFN-}\gamma$ в обеих исследуемых группах: $\text{Me} = 63$ пг/мл [18,6; 155,7] и $\text{Me} = 141,7$ пг/мл [74,6; 233] в группе здоровых доноров; $\text{Me} = 37,3$ пг/мл [12,8; 178,7] и $\text{Me} = 79,2$ пг/мл [20,2; 200,9] в группе больных ТБ

на штаммы 2206/1 и 2206/2 соответственно. Сравнение уровней IFN- γ в исследуемых группах не оказалось статистически значимым ($U = 97, p = 0,9$; $U = 79, p = 0,4$ соответственно). В целом, увеличение уровня IFN- γ на исследуемые антигены сателлитной микробиоты туберкулёзного очага было сопоставимо с ответом на антигены МБТ.

Стоит отметить, что у пациентов с ТБ реакция клеток крови на антигены МБТ и сателлитной микробиоты значительно варьировала (Рисунок 11). Так, у трёх пациентов (№ 23-28, 23-33 и 23-к4) наблюдалась более высокая реактивность к *C. kefirresidentii* по сравнению с МБТ, разница составляла 1,9; 2,9 и 1,8 раза соответственно. Ещё у пяти пациентов (№ 23-29, 23-31, 23-32, 23-37 и 23-39) при отсутствии выраженного ответа на МБТ ($Me = 12,4$ пг/мл [2,7; 16,5]) был зафиксирован значительный выброс IFN- γ в ответ на антигены *C. kefirresidentii* ($Me = 117,6$ пг/мл [85,5; 140,9]), что в среднем превышало реакцию на МБТ в 21 раз. Кроме того, у пациента № 23-32 был выявлен сильный выброс IFN- γ в ответ на антигены *S. epidermidis* 2206/1 (135,6 пг/мл), что превышало реакцию на МБТ в 41 раз. У пациентов № 23-31, 23-32 и 23-37 также наблюдался значительный выброс IFN- γ в ответ на антигены *S. epidermidis* 2206/2 ($Me = 79,2$ пг/мл [75; 262]), что в 24 раза превышало уровень ответа на МБТ. Таким образом, у этих пациентов интерфероновый ответ на антигены *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* был значительно более выраженным, чем на антигены возбудителя ТБ.

При анализе взаимосвязи уровней IFN- γ , индуцированных антигенами МБТ, *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* (штаммы 2206/1 и 2206/2), были выявлены положительные и статистически-значимые корреляции между реакциями на большинство антигенов (Таблица 15). Самые высокие степени корреляции наблюдались между реакциями на антигены двух штаммов *S. epidermidis*, которые, очевидно, имеют очень близкие антигенные детерминанты, а также между *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* 2206/1. Выявленные закономерности могут указывать на участие общих компонентов иммунной системы в ответ на МБТ и представителей микробиоты туберкулёзного очага.

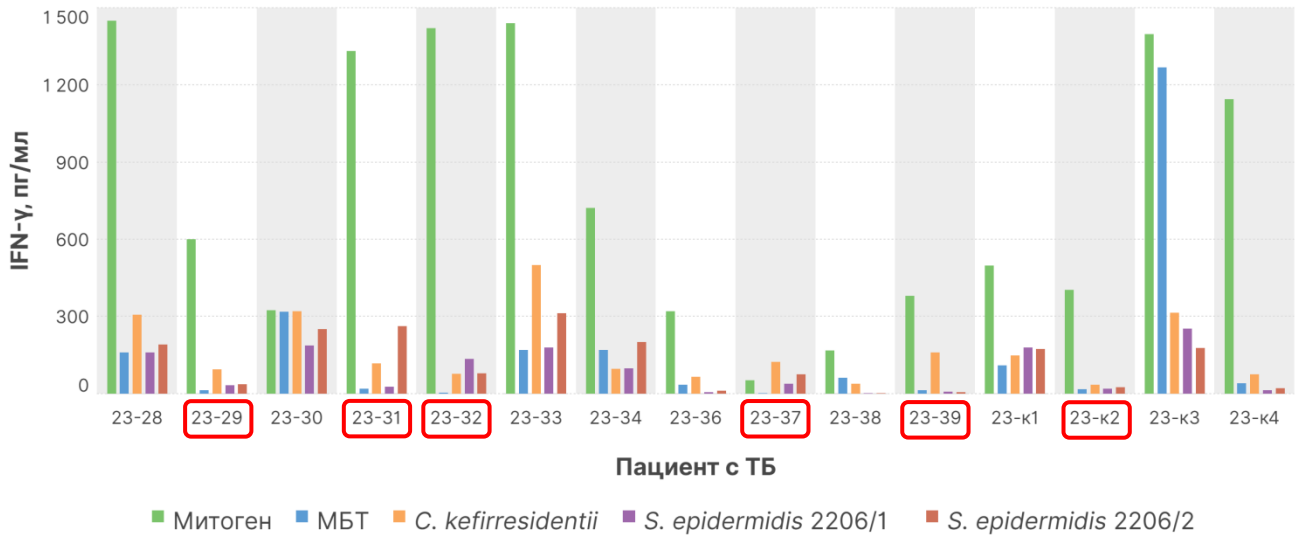


Рисунок 11 – Концентрация IFN- γ в ответ на обработку клеток крови пациентов с ТБ митогеном, антигенами МБТ, *C. kefirresidentii*, *S. epidermidis* (штаммы 2206/1 и 2206/2). Красной рамкой выделены пациенты с отрицательной реакцией IFN- γ на МБТ.

Таблица 15 – Коэффициенты корреляции между уровнями IFN- γ в ответ на антигены МБТ, *C. kefirresidentii*, *S. epidermidis* (штаммы 2206/1 и 2206/2)

Антиген 1	Антиген 2	r_s	p
МБТ	<i>C. kefirresidentii</i>	0,5	0,054
МБТ	<i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,6	0,03*
МБТ	<i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,5	0,046*
<i>C. kefirresidentii</i>	<i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,8	0,0008*
<i>C. kefirresidentii</i>	<i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,7	0,006*
<i>S. epidermidis</i> 2206/1	<i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,8	0,0005*

Примечание: * – различия статистически значимы.

Для пациентов с ТБ были получены результаты микроскопического исследования мокроты и операционного материала на наличие МБТ, патогистологические заключения, а также данные ОАК и биохимического анализа крови (Приложение В). При сравнении клинических данных с уровнями IFN- γ была обнаружена положительная корреляция между интерфероновым ответом на антигены *S. epidermidis* (оба штамма) и концентрацией общего белка в крови ($r_s = 0,5$, $p = 0,04$). Повышение общего белка крови может быть связано с хроническими воспалительными процессами в организме, в т.ч. за счёт усиленной продукции антител и белков острой фазы воспаления. Кроме того, отмечена тенденция к взаимосвязи интерферонового ответа на митоген с количеством

сегментоядерных нейтрофилов ($r_s = 0,5$, $p = 0,0503$). Другие клинические показатели не продемонстрировали значимой ассоциации с интенсивностью интерферонового ответа. Разделение пациентов на группы по уровню интерферонового ответа на антигены (сильный – более 100 пг/мл, умеренный – менее 100 пг/мл) не выявило статистически значимых различий между ними (Приложение Г).

Анализ цитокинового профиля (оценка TNF- α , IL-4, IL-10)

Для анализа цитокинового профиля здоровых доноров и больных ТБ в ответ на обработку клеток крови антигенами *C. kefirresidentii*, *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 оценивали уровни TNF- α , IL-4 и IL-10 (Рисунок 12, Таблица 16).

TNF- α является ключевым провоспалительным цитокином, важным для активации макрофагов и борьбы с микобактериями. После инкубации цельной крови пациентов с антигенами исследуемых микроорганизмов происходила сверхэкспрессия TNF- α , концентрация цитокина увеличивалась на три порядка (см. Таблица 16) в обеих исследуемых группах ($p > 0,05$) в ответ на все три изучаемых лизата.

IL-4 является маркером активации Th2-ответа, который играет роль в иммуносупрессивных процессах. У пациентов с ТБ хроническая инфекция может вызывать дисбаланс между Th1- и Th2-ответами, приводя к гиперактивации Th2-клеток. Уровень IL-4 значительно увеличивался у пациентов с ТБ по сравнению со здоровыми донорами при инкубации с антигенами всех трёх штаммов, причём наиболее высокий уровень наблюдался в ответ на *C. kefirresidentii* (статистически значимо отличается от *S. epidermidis* 2206/1 ($U = 40,5$, $p = 0,015$)). Таким образом, антигены *C. kefirresidentii* могут дополнительно усиливать Th2-ответ у больных ТБ.

IL-10 – это иммунорегуляторный цитокин, который подавляет воспаление и способствует развитию толерантности. Его повышенный уровень у больных ТБ может отражать компенсаторный механизм, направленный на контроль избыточного воспаления, вызванного инфекцией. Концентрация IL-10 оказалась значительно выше у больных ТБ после стимуляции антигенами обоих штаммов *S.*

epidermidis. Хотя для *C. kefirresidentii* отмечалась тенденция к значительному повышению уровня IL-10 у больных ТБ, разница со здоровыми донорами оказалась статистически незначимой ($p = 0,13$).

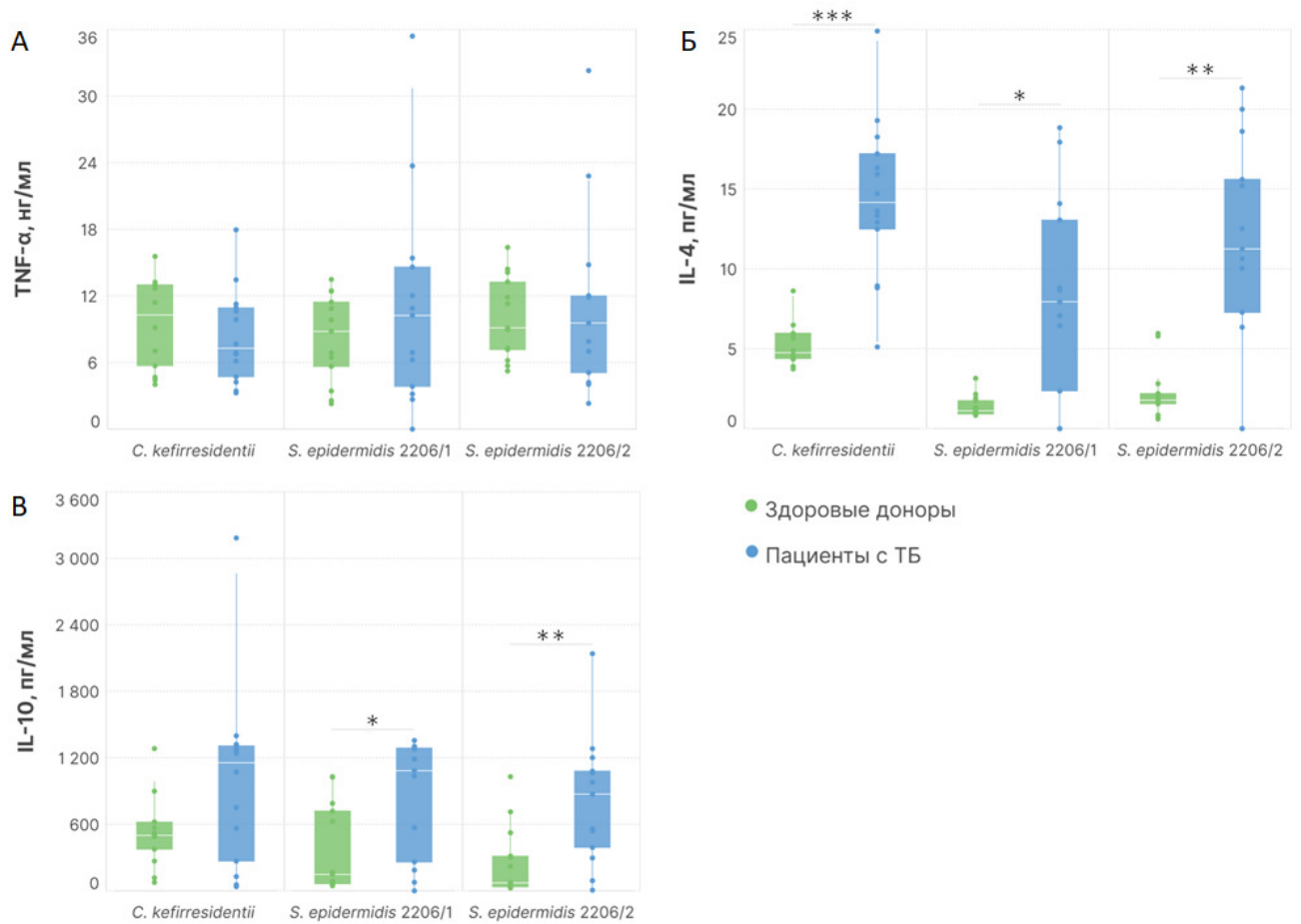


Рисунок 12 – Концентрации TNF-α (А), IL-4 (Б) и IL-10 (В) в ответ на обработку клеток крови антигенами *C. kefirresidentii*, *S. epidermidis* (штаммы 2206/1 и 2206/2) в группах здоровых доноров и пациентов с ТБ; p – уровень значимости U -критерия Манна-Уитни: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Таблица 16 – Показатели цитокинового профиля здоровых доноров и пациентов с ТБ в ответ на антигены штаммов, выделенных из туберкулёзных очагов

Интерлейкин / штамм	Здоровые доноры	Пациенты с ТБ	$U; p$
<i>Контроль</i>			
TNF-α, пг/мл	3,2 [1; 3,5]	13 [6,6; 25,7]	$U = 50,5$ $p = 0,052$
IL-4, пг/мл	0,2 [0,1; 1,7]	3,1 [1,8; 7,5]	$U = 30$ $p = 0,003^*$
IL-10, пг/мл	7,8 [6,3; 14,5]	9 [4,3; 21,1]	$U = 89$ $p = 0,94$
<i>C. kefirresidentii</i>			
TNF-α, нг/мл	10,3 [0,5; 13]	7,3 [4,6; 11]	$U = 68$ $p = 0,43$
IL-4, пг/мл	4,8 [4,4; 5,9]	14,2 [11,6; 17,5]	$U = 5$

			$p = 0,00005^*$
IL-10, пг/мл	501,2 [295,2; 607,9]	1155,7 [232,9; 1310,4]	$U = 54$ $p = 0,13$
<i>S. epidermidis</i> 2206/1			
TNF- α , нг/мл	8,8 [4,5; 11,9]	10,3 [3,5; 15]	$U = 73$ $p = 0,57$
IL-4, пг/мл	1,1 [0,9; 1,8]	7,9 [1,2; 13,6]	$U = 40$ $p = 0,02^*$
IL-10, пг/мл	148,8 [62,3; 753,7]	1083,9 [223,9; 1295,1]	$U = 37$ $p = 0,02^*$
<i>S. epidermidis</i> 2206/2			
TNF- α , нг/мл	9,1 [6,7; 13,7]	9,6 [4,7; 13,4]	$U = 80$ $p = 0,84$
IL-4, пг/мл	1,8 [1,2; 2,5]	11,3 [6,8; 17,1]	$U = 26$ $p = 0,003^*$
IL-10, пг/мл	73 [37,4; 418,6]	872,9 [343,5; 1140,4]	$U = 33$ $p = 0,009^*$

Примечание: * – различия статистически значимы.

Также был проведён анализ взаимосвязи уровней TNF- α , IL-4, IL-10 с уровнем IFN- γ и клиническими данными пациентов с ТБ. Ниже проиллюстрированы статистически-значимые корреляции (Таблица 17). Сильные положительные корреляции наблюдались между уровнями TNF- α и IFN- γ при стимуляции антигенами разных штаммов, что указывает на синергичное участие TNF- α и IFN- γ в ответе на бактериальные антигены. Уровни IL-4 при стимуляции *S. epidermidis* демонстрировали значительные положительные корреляции с уровнями IFN- γ и количеством лейкоцитов крови. Кроме того, для пациентов с выраженным ответом IL-4 ($> 11,3$ пг/мл) на антигены *S. epidermidis* 2206/2 оказалась характерна эозинофилия лёгкой степени (7-8% эозинофилов от общего числа лейкоцитов) ($U = 7,5$, $p = 0,03$). При стимуляции *C. kefirresidentii*, напротив, IL-4 отрицательно коррелировал с числом лимфоцитов, что может свидетельствовать об иммуносупрессивных эффектах IL-4 на определённые популяции клеток. Уровни IL-10 показали тесную положительную корреляцию с TNF- α и IL-4 при стимуляции всеми антигенами, особенно *S. epidermidis*, что может объясняться регуляторной ролью IL-10, направленной на ограничение воспаления.

Таблица 17 – Статистически значимые коэффициенты корреляции между уровнями цитокинов в ответ на антигены *C. kefirresidentii*, *S. epidermidis* (штаммы 2206/1 и 2206/2) и некоторыми клиническими показателями пациентов с ТБ

Показатель 1	Показатель 2	r_s	p
TNF- α \rightarrow <i>C. kefirresidentii</i>	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,7	0,01
	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,6	0,03
TNF- α \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,6	0,02
	TNF- α \rightarrow <i>C. kefirresidentii</i>	0,8	0,0003
TNF- α \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,6	0,02
	TNF- α \rightarrow <i>C. kefirresidentii</i>	0,9	0,000007
	TNF- α \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,9	0,00002
IL-4 \rightarrow <i>C. kefirresidentii</i>	Лимфоциты крови	-0,6	0,03
IL-4 \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,7	0,01
	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,9	0,0002
IL-4 \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,7	0,004
	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,6	0,02
	IL-4 \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,8	0,0008
	Лейкоциты крови	0,6	0,03
IL-10 \rightarrow <i>C. kefirresidentii</i>	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,6	0,02
	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,9	0,000006
	TNF- α \rightarrow <i>C. kefirresidentii</i>	0,6	0,03
	IL-4 \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,8	0,0003
	Общий белок крови	0,6	0,04
IL-10 \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,8	0,003
	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,8	0,001
	TNF- α \rightarrow <i>C. kefirresidentii</i>	0,8	0,002
	TNF- α \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,7	0,01
	TNF- α \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,7	0,01
	IL-4 \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,8	0,002
	IL-10 \rightarrow <i>C. kefirresidentii</i>	0,9	0,00006
IL-10 \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	IFN- γ \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,7	0,006
	TNF- α \rightarrow <i>C. kefirresidentii</i>	0,6	0,03
	TNF- α \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/2	0,7	0,02
	IL-4 \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,6	0,046
	IL-10 \rightarrow <i>C. kefirresidentii</i>	0,9	0,0001
	IL-10 \rightarrow <i>S. epidermidis</i> 2206/1	0,8	0,0008
	Общий белок крови	0,6	0,04

Иммунная система больных ТБ часто находится в состоянии повышенной активации, обусловленной деятельностью Th1-клеток, отвечающих за продукцию IFN- γ и активацию антимикобактериальных функций макрофагов [Kumar, 2017]. В то же время хроническая инфекция МБТ проявляется дисбалансом про- и противовоспалительных цитокинов [Есимова и др., 2012]. Результаты исследования интерферонового и IL-4 ответа на антигены *C. kefirresidentii* позволяют предположить, что данный микроорганизм способствует дисбалансу

иммунной системы через одновременную активацию Th1- и Th2-ответов. Сходство химической структуры клеточной стенки *C. kefirresidentii* с антигенами микобактерий может вызывать перекрёстную иммунную активацию и нарушение толерантности к данному микроорганизму, усугубляя хроническое воспаление, вызванное МБТ.

S. epidermidis оказывает значительное влияние на иммунную систему, но его роль в хронических и септических инфекциях остаётся недостаточно изученной. Колонизация кожи этим микроорганизмом активирует TLR2-рецепторы на кератиноцитах, стимулируя синтез антимикробных пептидов и регуляторный иммунный ответ через Treg-клетки [Nguyen et al., 2017]. Инфекции, связанные с биопленками *S. epidermidis*, характеризуются хроническим течением из-за ослабления фагоцитарной активности макрофагов и нейтрофилов, а также из-за усиленной продукции провоспалительных цитокинов и подавления противовоспалительных [Nguyen et al., 2017]. Описанные в литературе противовоспалительные реакции в ответ на *S. epidermidis* согласуются с результатами проведённого нами исследования, в ходе которого было показано, что IL-10 регуляторный ответ у пациентов с ТБ особенно выражен при стимуляции антигенами *S. epidermidis*.

Эозинофилы, играющие роль в защите от инфекций, обнаруживаются в очагах гранулёматозного воспаления при ТБ, а также при стафилококковых и коринебактериальных инфекциях. Эозинофилы обладают регуляторной активностью и участвуют в контроле иммунного ответа, вырабатывая цитокины с противовоспалительным (IL-4), провоспалительным (IFN- γ , TNF- α) и иммуносупрессорным (IL-10) потенциалом [Колобовникова и др., 2014]. При ТБ эозинофилы в избытке обнаруживаются как в периферической крови, так и в составе туберкулёзной гранулёмы, наряду с макрофагами и лимфоцитами [Колобовникова и др., 2012; Prakash Babu et al., 2019].

Описаны случаи стафилококковых инфекций, ассоциированных с эозинофилией. У пациента с плевральным выпотом была диагностирована эозинофильная инфильтрация плевральной жидкости и периферической крови, а

также инфицирование плевральной жидкости *S. epidermidis* [Ito et al., 2024]. В экспериментах на мышах было показано, что воздействие оппортунистического патогена *S. aureus* индуцирует инфильтрацию эозинофилов и Т-клеток в кожу, инициируя воспаление [Kline et al., 2024]. В одной работе указывали на наличие стафилоккоков в эозинофильной гранулёме кости [Kitsoulis et al., 2009]. В тоже время у пациентов, инфицированных различными видами коринебактерий, наблюдались случаи воспаления лёгких с эозинофилией периферической крови [Keslin et al., 1979; Nureki et al., 2007], а также эозинофильные инфильтраты в поражённых тканях [Keslin et al., 1979; Bregenzer et al., 1997; Nureki et al., 2007]. Авторы заключили, что «эозинофильный инфильтрат должен указывать на возможность заражения коринебактериями» [Bregenzer et al., 1997]. В экспериментах на животных описано заражение токсигенными *C. nuclearans*, которое стало причиной гнойного воспаления и формирования эозинофильной гранулёмы [Murakami et al., 2014]. Поэтому можно предполагать, что повышенное содержание эозинофилов в крови у больных ТБ может быть также связано с хронической инфекцией, обусловленной персистенцией патогенетически значимой респираторной микробиоты.

Следует учитывать, особенности иммунного ответа на бактериальные лизаты зависят от индивидуальных особенностей иммунной системы и анамнеза конкретного человека, а также от состава антигенов в используемых лизатах. Некоторые эффекты могут быть связаны с активацией рецепторов врождённого иммунитета на РAMP, что запускает сигнальные пути для выработки воспалительных медиаторов и инициирования адаптивного ответа

Таким образом, полученные данные демонстрируют сложные взаимодействия между провоспалительными и регуляторными цитокинами в ответах на антигены исследуемых штаммов у пациентов с ТБ. Результаты отражают дисбаланс иммунной системы, вызванный хронической инфекцией, с одновременной активацией Th1- и Th2-ответов и усилением регуляторной активности IL-10 для ограничения воспаления.

3.2.3. Анализ гуморального иммунитета

Исследование гуморального иммунитета на антигены штаммов *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* 2206/2, выделенных из туберкулёзных очагов, проводили методом ИФА. Определение IgG проводилось полуколичественно по уровню ОП. Первоначально для проверки специфичности иммуноферментной реакции оценивали линейность кривой, отражающей зависимость ОП от разведения сыворотки крови или клеточных лизатов, используемых в качестве антигенов (Рисунок 13). Полученные графики показали практически линейную зависимость при разведении сыворотки крови в диапазоне от 25 до 200 раз (см. Рисунок 13, А) и нанесении антигена в концентрации 37,5-150 нг на лунку полистирольного планшета, с максимальным сигналом ОП при концентрации 150-300 нг/лунка (см. Рисунок 13, Б). Таким образом, были выбраны оптимальные концентрации для проведения скринингового исследования.

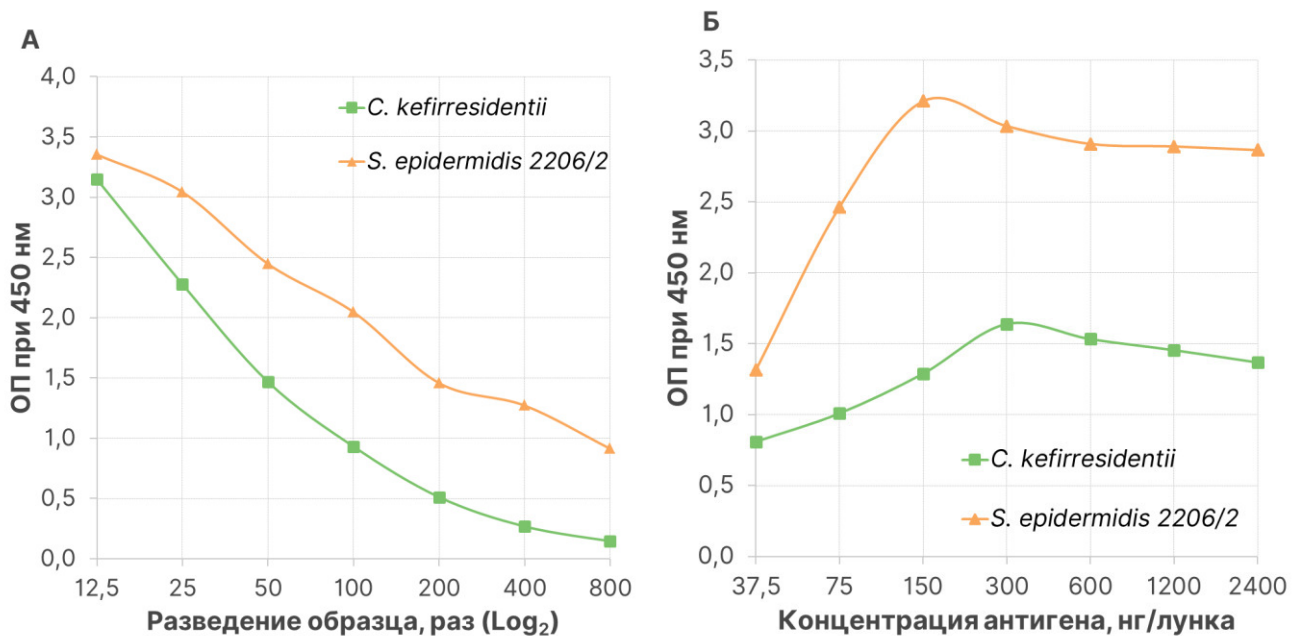


Рисунок 13 – Зависимость оптической плотности (ОП) от разведения сыворотки крови (А) и клеточных лизатов микроорганизмов в качестве антигенов (Б).

Были проанализированы 180 образцов сывороток крови: 90 образцов от пациентов с ТБ и 90 образцов от здоровых доноров. В том числе были проанализированы парные образцы от восьми пациентов, полученные с разницей не менее 2 месяцев, а также образцы от 15 пациентов с ТБ и 16 здоровых доноров,

проанализированные на наличие Т-клеточного иммунитета на предыдущем этапе исследования. Результаты серологического обследования на наличие специфических IgG к антигенам штаммов, выделенных из туберкулёзных очагов, представлены ниже (Таблица 18).

Таблица 18 – Результаты серологического обследования на наличие специфических IgG к антигенам штаммов, выделенных из туберкулёзных очагов

Показатель иммунитета / штамм	Здоровые доноры	Пациенты с ТБ	$\chi^2/U; p$
<i>C. kefirresidentii</i>			
Серонегативный, человек	75	61	$\chi^2 = 10,6$ $p = 0,001^*$
Серопозитивный, человек	3	18	
Серопревалентность, %	3,5±3,9	20±8,3	
Средняя ОП, о.е.	0,8 [0,5; 1,2]	1,0 [0,5; 1,9]	$U = 3290$ $p = 0,029^*$
Средняя ОП (только серопозитивные), о.е.	2,7±0,1	3,1±0,4	$U = 7$ $p = 0,049^*$
<i>S. epidermidis</i> 2206/2			
Серонегативный, человек	31	44	$\chi^2 = 2,2$ $p = 0,14$
Серопозитивный, человек	35	28	
Серопревалентность, %	38,9±10,1	31,1±9,6	
Средняя ОП, о.е.	2,3 [1,2; 3,3]	1,8 [0,9; 3,2]	$U = 3497$ $p = 0,1$
Средняя ОП (только серопозитивные), о.е.	3,4 [3,1; 3,6]	3,4 [3,2; 3,5]	$U = 487$ $p = 0,97$

Примечание: * – различия статистически значимы.

Анализ парных сывороток показал умеренную изменчивость: средний коэффициент вариации парных образцов составил 14,7±10,9% по результатам серийных ИФА. Серологическое обследование выявило наличие антител к исследуемым антигенам у значительного числа пациентов с ТБ.

Серопревалентность к антигенам *C. kefirresidentii* среди пациентов с ТБ оказалась умеренной и составила 20%, в то время как среди здоровых лиц количество серопозитивных оказалось минимально ($p = 0,001$). Средний уровень ОП, отражающий концентрацию IgG, был значительно выше у больных ТБ как в общем анализе, так и при отдельном сравнении только серопозитивных сывороток (см. Таблица 18). Ранее не сообщалось об оценке гуморального иммунитета к этому микроорганизму. Таким образом, антигены *C. kefirresidentii* могут вызывать системный иммунный ответ, а антитела к этому микроорганизму

могут служить иммунологическим маркером инфекции с потенциальной диагностической ценностью.

Высокая серопревалентность к антигенам *S. epidermidis* 2206/2 и высокие значения средней ОП были зафиксированы как у пациентов с ТБ, так и у здоровых лиц, при этом различия не были статистически значимы (см. Таблица 18). Таким образом, наблюдается выраженный как гуморальный, так и Т-клеточный иммунный ответ на антигены *S. epidermidis*.

В литературе обнаружено несколько исследований, посвящённых оценке гуморального иммунитета к *S. epidermidis*, где сообщается о наличии антител у здоровых людей [Puhvel et al., 1965; Гульнева, 2021]. По-видимому, высокая серопревалентность к *S. epidermidis* в популяции связана с широким распространением этого кожного комменсала и его постоянным взаимодействием с иммунной системой человека. *S. epidermidis* активно стимулирует кожный иммунный ответ, поддерживает гомеостаз кожи и предотвращает колонизацию условно-патогенными микроорганизмами. Однако новые данные указывают на то, что некоторые штаммы *S. epidermidis* могут способствовать патогенезу распространённых кожных заболеваний (атопический дерматит, перхоть, себорейный дерматит, розацеа) и вызывать соответствующий иммунный ответ [Severn et al., 2023].

У больных ТБ выявлена слабая положительная корреляция между средними уровнями ОП при оценке гуморального иммунитета к *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* 2206/2 ($r_s = 0,3$, $p = 0,001$), в то время как у здоровых лиц такая связь отсутствует ($r_s = 0,2$, $p = 0,1$). Эти данные, наряду с результатами серопревалентности, предполагают, что контакт с данными микроорганизмами у больных ТБ, в отличие от здоровых лиц, носит патологический характер. Это служит косвенным подтверждением выдвигаемой концепции о роли *Corynebacterium* и *Staphylococcus* в патогенезе воспалительных процессов при ТБ.

Среди 15 пациентов с ТБ, исследованных на Т-клеточный иммунитет, только один пациент оказался серопозитивным к *C. kefirresidentii* и два пациента – к *S. epidermidis* 2206/2. Среди 16 здоровых участников, исследованных на Т-

клеточный иммунитет, шестеро были серопозитивными к *S. epidermidis* 2206/2 и отсутствовали случаи серопозитивности к *C. kefirresidentii*. В связи с этим не удалось выявить корреляции между уровнями антител и данными о Т-клеточном иммунитете у пациентов с ТБ и здоровых лиц. Это может быть связано как с особенностями гуморального и клеточного иммунного ответа пациентов с ТБ, для которых характерны иммунодефицит или дисрегуляция иммунных механизмов, так и с индивидуальными различиями в иммунном ответе, а также с особенностями самих антигенов *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis*, которые, по-видимому, вызывают более выраженный клеточный ответ.

Следует отметить, что ограничением иммунологических исследований, представленных в данной работе, является использование в качестве антигенов неочищенных лизатов, представляющих собой смеси клеточных компонентов исследуемых микроорганизмов. Это может привести к кросс-реактивности антител и Т-клеточных рецепторов, вырабатываемых против других коринебактерий и стафилококков, которые могут частично распознавать антигены *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* из-за структурных сходств их белков или других PAMP. Чтобы глубже понять связь между клеточным и гуморальным иммунитетом к изучаемым микроорганизмам, требуется расширение выборки, т.к. её малый размер в данном исследовании ограничивает возможность выявления редких или статистически значимых корреляций.

3.2.4. Экспериментальная *in vitro* модель гранулёматозного воспаления, индуцированного *M. tuberculosis*

Моделирование туберкулёзной инфекции *in vitro* используется для исследования иммунопатологических механизмов гранулёмогенеза при развитии туберкулёзного процесса, а также для поиска, разработки и оценки новых ПТП. Эти модели помогают исследовать активность веществ, влияющих на взаимодействие клеток иммунной системы с МБТ [Белгородцев и др., 2019]. В данной работе была применена экспериментальная *in vitro* модель МБТ-индуцированного гранулёмогенеза, основанная на фагоцитозе клеток МБТ перитонеальными макрофагами и спелноцитами мыши с формированием

трёхмерных гранулёмоподобных структур. Для изучения влияния бактерий, выделенных из казеозного некроза, на формирование гранулём, к клеточным культурам добавляли лизаты бактерий в концентрации 10 и 100 мкг/мл (Рисунок 14).

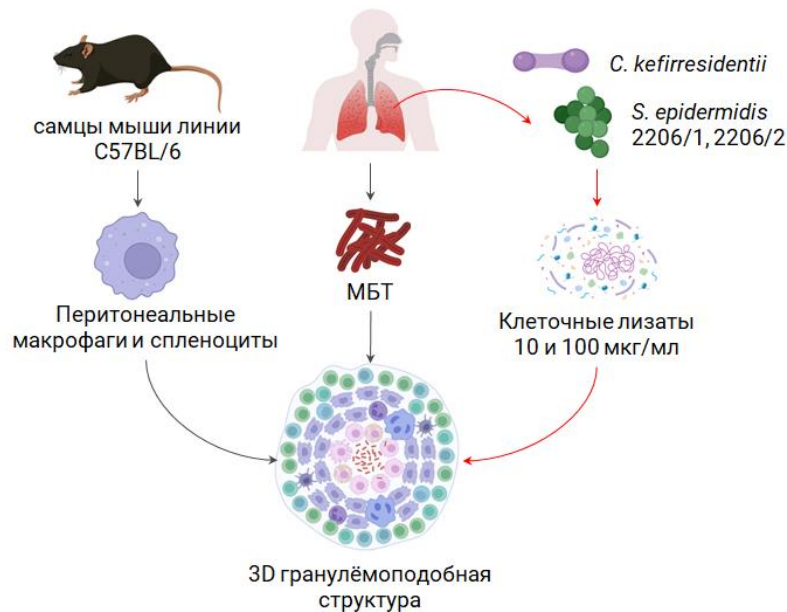


Рисунок 14 – Экспериментальное *in vitro* моделирование МБТ-индуцированного гранулематозного воспаления с добавлением лизатов микроорганизмов из туберкулёзного очага.

По данным световой микроскопии, через 7 дней культивирования в контрольных образцах наблюдались небольшие гранулёмоподобные клеточные скопления, состоящие из 10-20 клеток, а также редкие более крупные скопления, содержащие 20-40 клеток (Рисунок 15, А1). При культивировании в присутствии клеточных лизатов микроорганизмов, выделенных из казеозного некроза туберкулёзных очагов, наблюдалось более эффективное рекрутирование клеток, что приводило к образованию более крупных гранулёмоподобных структур и появлению очень крупных клеточных скоплений (более 50 клеток) (см. Рисунок 15, А2-А5). Гетерогенность размеров гранулёмоподобных структур на 7-е сутки отражала динамику миграции («сползания») клеток в область формирования скоплений. Различия в размерах между контрольной и всеми экспериментальными группами были статистически значимы ($p < 0,05$) (см. Рисунок 15, Б). Появление таких структур подтвердило адекватность

применённой экспериментальной модели для изучения МБТ-индуцированного гранулёматозного воспаления, что делает её полезной для дальнейших исследований механизмов патогенеза ТБ.

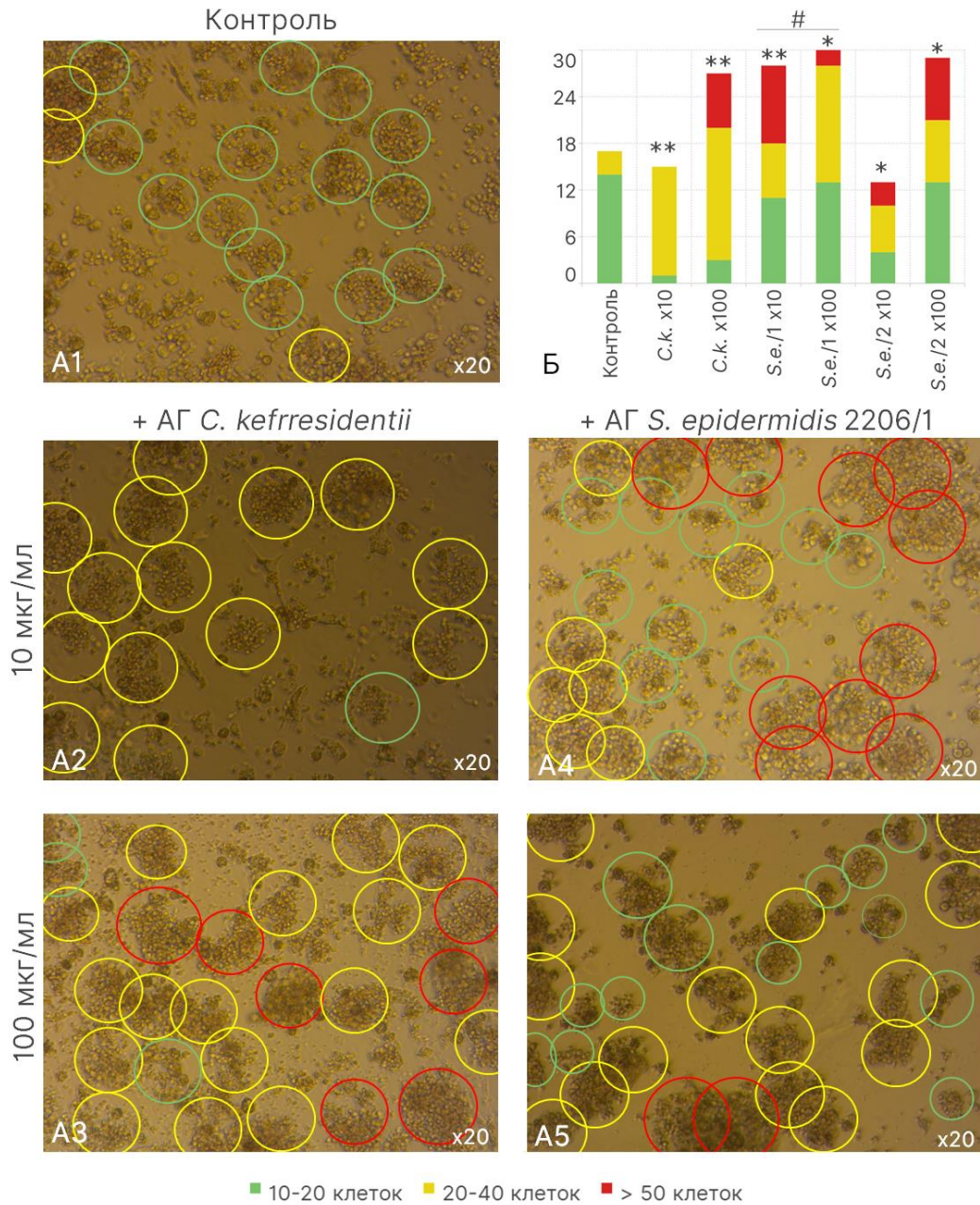


Рисунок 15 – Формирование трёхмерных гранулёмоподобных структур в результате фагоцитоза МБТ (А1) и при добавлении клеточных лизатов: *C. kefirresidentii* (*C.k.*) в концентрациях 10 мкг/мл (А2) и 100 мкг/мл (А3), *S. epidermidis* 2206/1 (*S.e./1*) в концентрациях 10 мкг/мл (А4) и 100 мкг/мл (А5), увеличение в 20 раз. Б – гетерогенность размеров гранулёмоподобных структур, уровень значимости по критерию χ^2 Пирсона: * – различия по сравнению с контролем (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$), # – различия внутри группы, *S.e./2* – *S. epidermidis* 2206/2.

Эффект формирования гранулёмоподобных структур имел дозозависимый характер при сокультивировании с лизатами *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* 2206/2. Увеличение концентрации клеточных лизатов этих микроорганизмов в 10 раз приводило к двукратному увеличению количества гранулёмоподобных структур. Гетерогенность размеров гранулёмоподобных структур слабо зависела от концентрации лизатов ($p > 0,05$), однако повышение концентрации лизата *C. kefirresidentii* вызывало появление очень крупных клеточных скоплений (см. Рисунок 15, Б).

Количество гранулёмоподобных структур увеличивалось примерно в 2 раза при добавлении лизата *S. epidermidis* 2206/1, независимо от концентрации. Повышение концентрации, напротив, приводило к уменьшению доли очень крупных гранулёмоподобных структур на фоне увеличения доли крупных клеточных скоплений ($\chi^2 = 8,4, p = 0,02$) (см. Рисунок 15, Б).

Увеличение и вариабельность гранулёмоподобных структур при добавлении клеточных лизатов бактерий из туберкулёзных очагов свидетельствуют об усилении иммунного ответа и прогрессировании гранулематозного воспаления. Растущее количество таких структур указывает на выраженную активацию макрофагов и других клеток иммунной системы, т.е. на формирование локального клеточного иммунного ответа в гранулёме. Разнообразие размеров гранулёмоподобных структур может отражать гетерогенность реакции иммунных клеток на различные антигенные и PAMPs-содержащие компоненты клеточного лизата.

Материалы данной подглавы изложены в следующих статьях: Выделение и полногеномное секвенирование липофильной анаэробной бактерии, представителя видового комплекса *Corynebacterium tuberculostearicum*, из туберкулёзного очага / О. Б. Огарков, А. Е. Суздальницкий, И. Г. Кондратов и др. // Acta Biomedica Scientifica. – 2023. – Т. 8, № 4. – С. 12-19. DOI: 10.29413/ABS.2023-8.4.2 [Огарков и др., 2023]; Геном *Staphylococcus epidermidis* из казеозного некроза туберкулёмы / В. В. Синьков, Е. А. Орлова, О. Б. Огарков и др. // Генетика. – 2024. – Т. 60, № 10. – С. 129–134. DOI:

10.31857/S0016675824100139 [Синьков и др., 2024]; Isolation and Immunogenicity Assessment of Facultative Anaerobic Microorganisms from the Caseum of Tuberculosis Foci / E. Orlova, E. Nemkova, Y. Schwartz, O. Ogarkov // Biomedical and Biotechnology Research Journal. – 2024. – Vol. 8, Abstract Supplement. – P. S20. DOI: 10.4103/bbrj.bbrj_121_24 [Orlova et al., 2024].

Резюме

В данной работе изучены микроорганизмы, обитающие в туберкулёзных очагах, которые проявляют исключительную устойчивость к химическим и физическим факторам воздействия, гипоксии, а также к некоторым антибиотикам. Выявленные микроорганизмы обладают высоким метаболическим потенциалом, который позволяет им эффективно метаболизировать липиды казеума и разрушать коллаген соединительной ткани стромы лёгкого за счёт ферментативной активности липазы (*C. kefirresidentii*) и желатиназы (*S. epidermidis*). Благодаря уреазной активности эти микроорганизмы способны изменять pH от кислого до нейтрального, что характерно для зрелых очагов казеоза в туберкулёмах. В данной работе впервые были определены оптимальные условия для культивирования бактериальных изолятов из туберкулёзного очага.

Выявленные микроорганизмы иммуногенны и вызывают локальный и системный иммунный ответ. *C. kefirresidentii* вызывает значимую активацию Th1- и Th2-ответов у пациентов с ТБ (IFN- γ : $p = 0,03$; IL-4: $p = 0,00005$), при этом уровень IL-4 демонстрирует отрицательную корреляционную связь с числом лимфоцитов крови ($p = 0,03$). *C. kefirresidentii* также вызывает выработку антител у 20% пациентов с ТБ, что значительно чаще, чем у здоровых лиц ($p = 0,001$). *S. epidermidis* способствует усилению Т-регуляторного иммунного ответа у больных ТБ с повышением уровня IL-10 (2206/1: $p = 0,02$; 2206/2: $p = 0,009$), а увеличение уровня IL-4 в ответ на *S. epidermidis* 2206/2 положительно коррелирует с сопутствующей эозинофилией крови ($p = 0,03$). Антигены *S. epidermidis* вызывают гуморальный иммунный ответ у примерно 35% популяции, что связано с широким распространением этого микроорганизма в качестве комменсала кожи и слизистых оболочек.

В *in vitro* модели гранулематозного воспаления, индуцированного МБТ, лизаты *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* способствуют увеличению числа и размера гранулемоподобных структур, включая крупные гранулёмы ($p < 0,05$), что указывает на усиление иммунного ответа и прогрессирование гранулематозного воспаления. Таким образом, изученные микроорганизмы являются потенциальным источником иммуномодулирующих соединений, которые могут быть использованы в качестве иммуномодуляторов новых противотуберкулёзных вакцин.

3.3. Влияние *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* из казеозного некроза туберкулём на рост микобактерий *in vitro*

На третьем этапе исследования изучалось влияние микроорганизмов *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis*, выделенных из казеозного некроза, на рост микобактерий *in vitro* с целью определения их ингибирующей или стимулирующей роли в отношении патологических свойств микобактерий. В рамках эксперимента проводилось культивирование клинического штамма МБТ с клеточными лизатами трёх микроорганизмов, выделенных из казеума, а также культивирование вакцинного штамма *M. bovis* var. BCG, который является генетически близкой моделью возбудителя ТБ, с живыми клетками *C. kefirresidentii*.

3.3.1. Культивирование клинического штамма *M. tuberculosis* с клеточными лизатами *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis*

Для изучения влияния клеточных компонентов микроорганизмов, представляющих микробиоту туберкулёзного очага, на рост микобактерий было проведено культивирование клинического штамма МБТ генотипа Beijing B0/W148 (высокая степень патогенности) с лизатами *C. kefirresidentii*, *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2. Культивирование МБТ с лизатами бактерий в концентрациях 10 и 100 мкг/мл по белку проводилось в лаборатории ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России, работающей с микроорганизмами III-IV групп патогенности.

По завершении 7-дневного совместного культивирования была обнаружена слабая антимикобактериальная активность клеточных лизатов. В частности:

- Лизат *C. kefirresidentii* в концентрации 10 мкг/мл показал незначительный эффект ($U = 3, p = 0,02$).
- Лизаты *S. epidermidis* 2206/1 в концентрациях 10 мкг/мл и 100 мкг/мл продемонстрировали активность ($U = 0,5, p = 0,006$; $U = 3,5, p = 0,03$ соответственно).
- Лизат *S. epidermidis* 2206/2 в концентрации 100 мкг/мл также оказал эффект ($U = 1, p = 0,008$).

Максимальный эффект был зафиксирован при добавлении клеточных компонентов *S. epidermidis* 2206/1 в концентрации 10 мкг/мл, что привело к снижению оптической плотности культуры микобактерий в 1,2 раза (Рисунок 16).

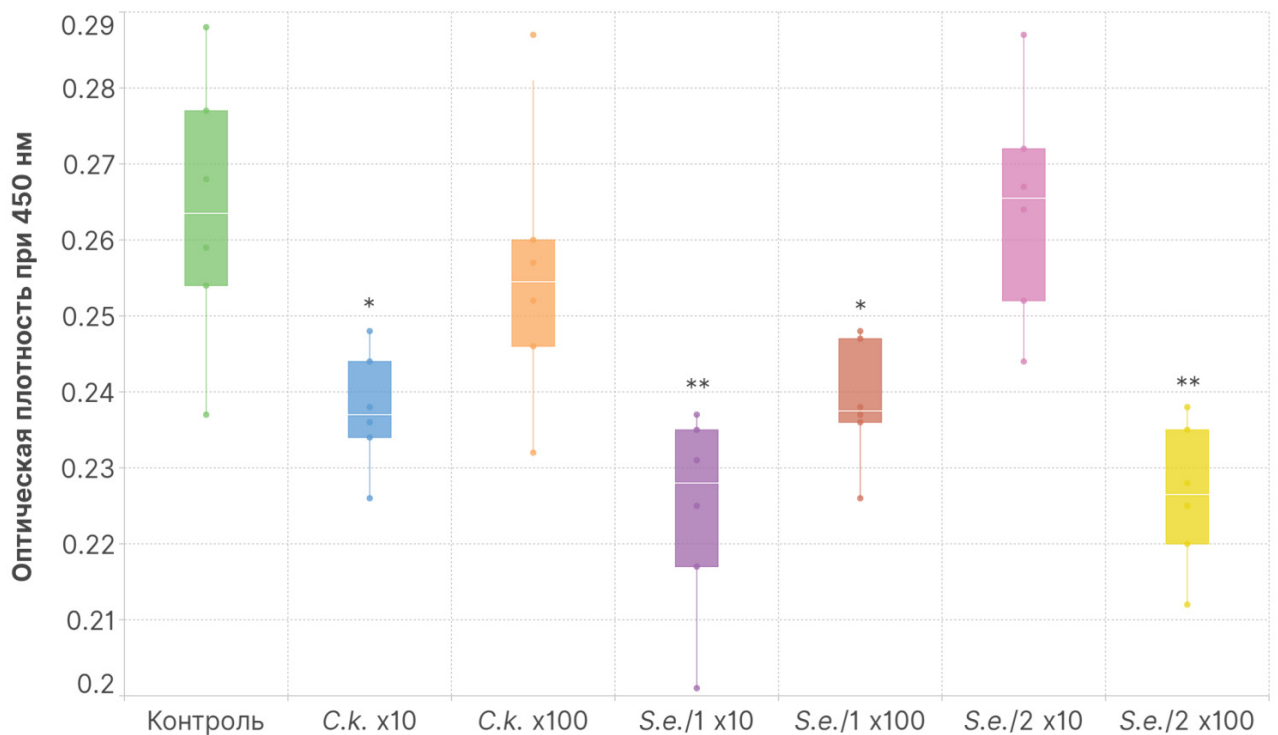


Рисунок 16 – Оптическая плотность культуры МБТ Beijing B0/W148 после 7 дней культивирования в контроле и в присутствии клеточных лизатов *C. kefirresidentii* (*C.k.*), *S. epidermidis* 2206/1 (*S.e./1*) и *S. epidermidis* 2206/2 (*S.e./2*) в концентрациях 10 и 100 мкг/мл ($\times 10$ и $\times 100$ соответственно); p – уровень значимости U -критерия Манна-Уитни: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

3.3.2. Культивирование вакцинного штамма *M. bovis* var. BCG с живыми клетками *C. kefirresidentii*

Для изучения влияния коринебактерий, выделенных из туберкулёзного очага, на рост микобактерий автором работы было проведено экспериментальное совместное культивирование вакцинного штамма *M. bovis* var. BCG с живыми клетками штамма *C. kefirresidentii* в течение 48 дней на среде с добавлением 0,1% Tween-80. В качестве контроля использовались монокультуры *M. bovis* var. BCG и *C. kefirresidentii*, выращенные в тех же условиях.

Совместное культивирование *C. kefirresidentii* с *M. bovis* var. BCG привело к образованию быстро растущей поверхностной биоплёнки на границе раздела фаз воздух/среда (Рисунок 17, А). На 14-й день культивирования было проведено окрашивание мазков биоплёнки по Цилю-Нильсену и красителем азуром I (Рисунок 17, Б, В).

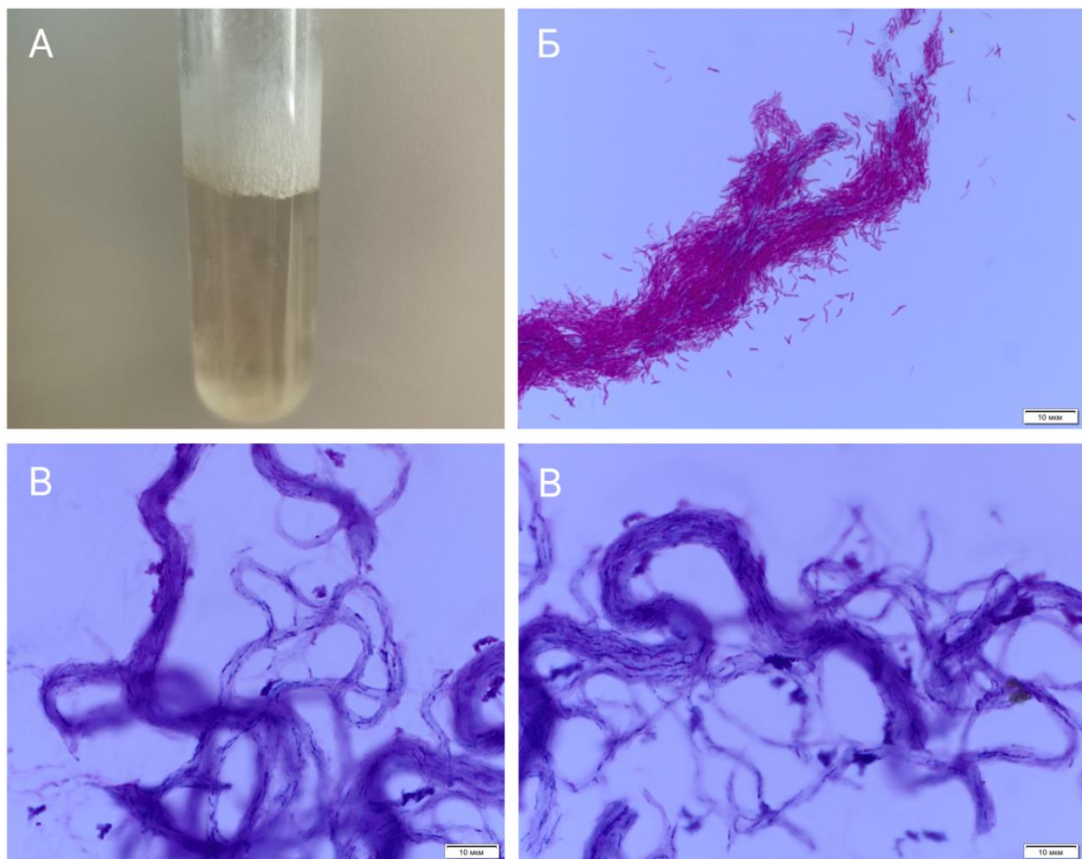


Рисунок 17 – Биоплёнка после 14 дней совместного культивирования *M. bovis* var. BCG и *C. kefirresidentii*: общий вид биоплёнки (А), окрашивание мазков биоплёнки по Цилю-Нильсену (Б) и азуром I (В). Виден хорошо развитый внеклеточный матрикс (масштабная линейка – 10 мкм).

Окрашивание по Цилю-Нильсену позволяет идентифицировать кислотоустойчивые микроорганизмы, к которым относятся все микобактерии благодаря высокому содержанию миколовой кислоты в их клеточных стенках. Как видно на рисунке (см. Рисунок 17, Б), на 14-й день экспериментального культивирования биоплёнка состояла из клеток микобактерий, которые сформировали типичный корд. Корд-фактор признаётся достаточным фактором для формирования гранулёмы [Hunter et al., 2006]. Кордообразование наблюдается при *ex vivo* культивировании МБТ в альвеолярных макрофагах некоторых пациентов и способствует гибели этих клеток [Ufimtseva et al., 2023], а также при *in vitro* культивировании МБТ в жидкой среде при хорошей оксигенации и перемешивании при пониженной концентрации Tween-80 (0,01%) [Kalsum et al., 2017]. Такие условия могут имитировать среду *in vivo*, когда микобактерии растут на границе раздела воздух/жидкость в полостях лёгких.

В настоящем исследовании при экспериментальном сокультивировании *M. bovis* var. BCG с *C. kefirresidentii* пробирки с бактериальными культурами периодически встряхивались и открывались для отбора материала. Встряхивание и оксигенация действительно оказались необходимым условием для образования корда клетками *M. bovis* var. BCG, поскольку при культивировании в той же среде без перемешивания культура микобактерий оставалась диспергированной на отдельные клетки и мелкие агрегаты. Однако при высокой концентрации Tween-80 (0,1%), встряхивание и оксигенация недостаточны для образования микобактериями устойчивой биоплёнки на границе фаз воздух/среда. Это может быть связано с эмульгирующим воздействием Tween-80, так как этот детергент препятствует агрегации клеток.

Феномен образования биоплёнки наблюдался только в присутствии *C. kefirresidentii*. Усиленный рост микобактерий в такой системе может быть обусловлен кооперативным поведением бактерий, например, последовательной утилизацией питательных веществ. На роль промежуточного питательного соединения наиболее вероятно претендуют липиды, поскольку именно экзогенные липиды необходимы для роста выделенного штамма *C. kefirresidentii*,

а также активно используются в метаболизме микобактерий и необходимы для образования кордов [Julián et al., 2010; Sarathy et al., 2020]. Tween-80, добавленный в ростовую среду в качестве источника липидов, является производным полиэтоксилированного сорбитана и олеиновой кислоты, и часто используется в микробиологических питательных средах для обеспечения бактериальных клеток экзогенной олеиновой кислотой [Reitermayer et al., 2018]. Известно, что олеиновая кислота стимулирует рост различных видов микобактерий [Schaefer et al., 1965]. Например, при снижении pH метаболизм МБТ переключается на ассимиляцию олеиновой кислоты вместо глицерина [Gouzy et al., 2021].

Высокая липазная активность *C. kefirresidentii* может играть ключевую роль в первичной деградации сложных липидов в среде, повышая их биодоступность для микобактерий. Например, в экспериментах на *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. и *Paracoccus* sp. показано, что Tween-80 улучшает гидрофобность поверхности клеток, способствуя их колонизации [Cheng et al., 2022].

С другой стороны, совместное культивирование бактерий может активировать метаболические пути, ответственные за синтез и секрецию внеклеточного матрикса и других факторов, способствующих образованию корда. Внеклеточный матрикс способен защищать бактерии от неблагоприятных условий среды, таких как изменение pH, осмотический стресс, действие антибиотиков, что способствует более стабильному и быстрому росту клеток. Внеклеточный матрикс биоплёнки обычно состоит из воды и внеклеточных полимерных веществ, таких как нуклеиновые кислоты, везикулы, белки, липиды и другие биополимеры, которые образуют каркас биоплёнки и обеспечивают адгезию бактерий. Состав внеклеточного матрикса может сильно различаться между биоплёнками в зависимости от микроорганизмов, условий окружающей среды и доступности питательных веществ [Flemming, et al., 2010]. В контексте туберкулёзной гранулёмы подобный хорошо развитый внеклеточный матрикс

может защищать микобактерии от воздействия антимикробных агентов, что усложняет лечение и способствует хронизации инфекции.

Для визуализации структуры полученной биоплёнки на 14-й день мазки дополнительно окрашивали азуром I. Этот катионный краситель связывается с отрицательно заряженными соединениями, такими как анионные белки, полисахариды, ДНК и РНК, которые могут входить в состав внеклеточного матрикса, окрашивая их в фиолетово-синий цвет. Окрашивание биоплёнки азуром I позволило визуализировать хорошо развитый слизеподобный внеклеточный матрикс, в который заключены клетки микобактерий (см. Рисунок 17, Б).

В течение двух месяцев пролиферация монокультур бактерий и биоплёнки оценивалась по изменению ОП. За этот период биомасса изолированных микобактерий увеличилась всего в два раза, коринебактерии не демонстрировали видимого роста на среде Школьниковой, в то время как биоплёнка имела экспоненциальный рост ($H_c = 10,91$, $p = 0,004$) (Рисунок 18). К 40-му дню культивирования рост биоплёнки перешёл в стационарную фазу. За исследуемый период оптическая плотность биоплёнки увеличилась в 7,5 раз, что указывает на значительное накопление биомассы и активное метаболическое состояние клеток в биоплёнке.

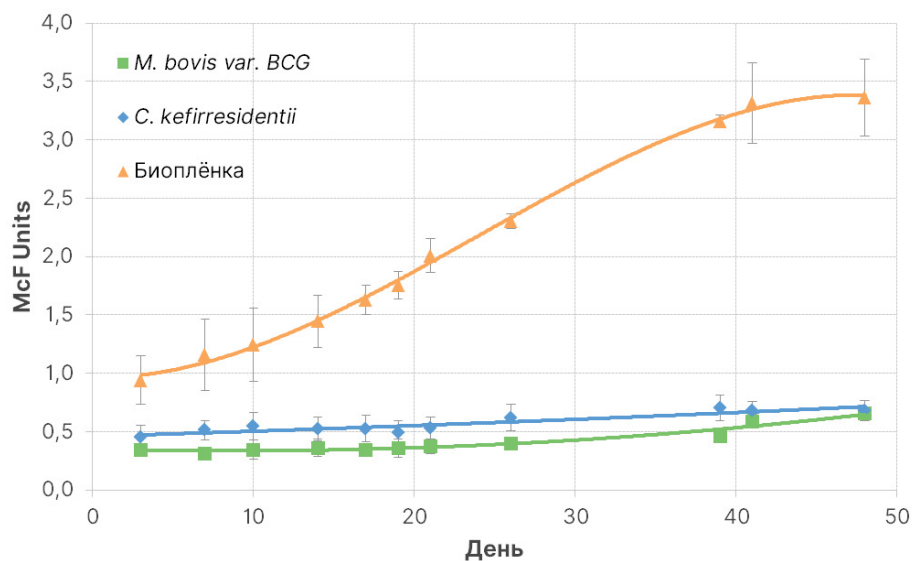


Рисунок 18 – Динамика роста *M. bovis var. BCG* и *C. kefirresidentii* при изолированном и совместном (биоплёнка) культивировании.

Таким образом, наблюдаемый феномен формирования быстро растущей биоплёнки при совместном культивировании *M. bovis* var. BCG и *C. kefirresidentii*, вероятно, обусловлен синергетическим взаимодействием бактерий, а также активным изменением метаболизма и улучшенной защитой микобактерий. В контексте развития ТБ, подобный процесс в лёгких может играть ведущую роль в формировании казеозного некроза в ходе гранулёматозного воспаления.

Резюме

В данной работе впервые показано, что совместное культивирование вакцинного штамма *M. bovis* var. BCG, близкого родственника возбудителя ТБ, с живыми клетками *C. kefirresidentii* привело к образованию быстро растущей биоплёнки, состоящей из клеток микобактерий, организованных в корды и окружённых внеклеточным матриксом. При этом совместное культивирование с клеточными компонентами бактерий из казеума туберкулём (*C. kefirresidentii* и *S. epidermidis*) слабо влияло на рост микобактерий. Другими словами, именно метаболическая активность микробиоты казеума модулирует жизнедеятельность микобактерий.

Хотя в последние годы проводились исследования биоплёнок патогенных микобактерий, условия их формирования и влияние на патогенез ТБ остаются недостаточно изученными. Как упоминалось ранее, накопление и метаболизм липидов является важным фактором выживания микобактерий в замкнутом пространстве гранулёмы. Полученные данные о высокой липазной активности *C. kefirresidentii* свидетельствуют о том, что они являются промежуточными метаболиторами (редуцентами) липидов и делают их доступными для утилизации микобактериями. При совместном культивировании наблюдалось очень активное образование биоплёнки уже на 10-14 день, тогда как в норме *M. bovis* var. BCG относятся к медленно растущим микобактериями и дают видимый рост только через месяц культивирования.

В условиях богатой липидами среды, моделирующей некротическое содержимое гранулёмы, присутствие коринебактерий способствует быстрому росту и продукции хорошо развитого слизеподобного внеклеточного матрикса, в

который заключены корды микобактерий. Таким образом, взаимодействие с комменсалом лёгких позволяет микобактерии усилить патологический фенотип, что вносит значимый вклад в казеацию гранулёмы и развитие патогенеза гранулёматозного воспаления при ТБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микобактерии на протяжении тысячелетий адаптировались к механизмам иммунной защиты человека, что обусловило длительное сохранение ТБ в качестве ведущей причины смертности от респираторных заболеваний. Внедрение антибиотикотерапии в XX веке значительно снизило смертность от ТБ, однако полное искоренение заболевания до сих пор не достигнуто. Причины устойчивости инфекции кроются в особенностях самого патогена и в недостаточной эффективности иммунного ответа, однако существуют и другие факторы, которые включаются в порочный круг патологических процессов. Существенное значение имеет гранулёматозное воспаление при инфицировании МБТ, в результате которого образуются объёмные казеозно-некротические гранулёмы. Хотя гранулёмы выполняют защитную функцию, они одновременно способствуют развитию патологий, что было подтверждено в ряде клинических и экспериментальных исследований последних десятилетий [Orme, 2014; Hunter, 2016]. Ключевым аспектом патогенеза поздних стадий ТБ остаётся исход гранулёмы: её обратное развитие и кальцификация являются признаками благоприятного течения, в то время как разжижение казеозного ядра и последующее откашливание способствуют переходу заболевания в открытую форму с дальнейшим распространением инфекции. Механизмы и причины разжижения казеума во многом остаются неизвестны.

В последние десятилетия методы высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS) и метагеномного анализа становятся всё более востребованными для изучения патогенеза респираторных заболеваний. Накопленные данные убедительно свидетельствуют о существовании транзиторной микробиоты в здоровых лёгких, которая имеет динамичный характер и играет двоякую роль: с одной стороны, она поддерживает иммунный гомеостаз, с другой – может способствовать развитию патологических процессов при респираторных заболеваниях [Dickson et al., 2016]. На сегодняшний день в

научном сообществе сформировался патофизиологический консенсус относительно влияния микробиоты на патогенез распространённых неинфекционных респираторных патологий (ХОБЛ, астма, муковисцидоз).

В то же время, роль сателлитной микробиоты в патогенезе ТБ, в частности микробиоты казеозных масс туберкулёзных гранулём, остаётся недостаточно исследованной. Немногочисленные зарубежные и единичные отечественные работы, посвящённые сателлитной микробиоте лёгких при ТБ имеют значительные методологические различия, которые затрудняют формулирование однозначных выводов о динамике микробиоты при данном заболевании. Казеозный материал, хирургически иссечённый у пациентов с диагнозом «туберкулёма лёгких», до настоящего времени не подвергался метагеномному анализу, что оставляет открытым вопрос о его бактериальном разнообразии.

Гипотезой данного исследования стало предположение, что патологический процесс гранулёматозного воспаления в туберкулёзных очагах после инициации этиологическим агентом – МБТ – может продолжаться под воздействием патогенетически значимой микробиоты, способствующей усилению хронического воспаления и неспецифической деградации гранулём. В рамках настоящей диссертационной работы были выявлены особенности вторичной, или сателлитной, микробиоты туберкулёзного очага, её роль в иммунных реакциях и её влияние на разжижение казеума гранулём у больных ТБ лёгких.

На первом этапе исследования было выявлено, что патогенетически значимая микробиота туберкулёзных гранулём делится на два основных типа: i) классическая микобактериальная микрофлора (LDMM – low α -diversity mycobacterial microbiota) и ii) полимикробное сообщество, характеризующееся увеличением доли бактерий, не относящихся к роду *Mycobacterium* (HDBM – high α -diversity bystander microbiota). Важной находкой стал третий тип олигобактериальных туберкулём, в которых доминируют немикобактериальные виды (LDBM – low α -diversity bystander microbiota), такие как пастереллы и стафилококки. Обнаружение выраженной нейтрофильной инфильтрации в казеуме и прилегающих тканях туберкулёмы с доминированием стафилококков, а

также повышенный уровень тромбоцитов и лейкоцитов периферической крови подтвердило патофизиологическую связь между микробиомом и воспалительным процессом в пределах туберкулёмы.

Было выявлено, что микробиом туберкулёзного очага значительно отличается от микробиома интактной ткани лёгких по таксономическому составу и характеризуется увеличением доли факультативно-анаэробных бактерий. Для LDMM-туберкулём методами *in silico* было спрогнозировано усиление биосинтеза углеводов, компонентов клеточной стенки, вторичных метаболитов, а также метаболизма серы и холестерина, что согласуется с известными механизмами патогенеза ТБ лёгких, когда в очагах инфекции, в центре казеозного некроза, наблюдается гипоксия, резкое ограничение доступности микроэлементов, на фоне обогащения его липидами.

Определив значимость факультативно-анаэробных микроорганизмов для микробиоты туберкулём, задачей второго этапа исследования стал ретроспективный скрининг образцов казеума туберкулём на наличие этих бактерий. В результате изолированы восемь бактериальных штаммов, идентифицированные как *Corynebacterium kefirresidentii* (один изолят), *Corynebacterium ureicelerivorans* (один изолят), *Staphylococcus epidermidis* (3 изолята) и *Staphylococcus hominis* (3 изолята). *C. kefirresidentii* и два изолята *S. epidermidis* продемонстрировали исключительную стабильность к физическим и химическим воздействиям, были устойчивы к гипоксии, ряду противотуберкулёзных препаратов, а также обладали высоким метаболическим потенциалом для утилизации липидов казеума и разрушения коллагена стромы лёгкого. Кроме того, их уреазная активность позволяет изменять pH очага некроза в щёлочную сторону, что характерно для зрелых казеозных очагов.

Исследование иммуногенности *C. kefirresidentii* и двух изолятов *S. epidermidis* показало их значительное влияние на иммунный ответ. Была установлена роль данных микроорганизмов в формировании как гуморального, так и клеточного иммунного ответа у пациентов с ТБ. Моделирование гранулематозного воспаления *in vitro*, индуцированного МБТ, с использованием

макрофагов и спленоцитов мышей, продемонстрировало стимулирующее влияние лизатов *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* на формирование гранулемоподобных структур, включая образование крупных гранулём. Полученные результаты подтвердили предположение о влиянии иммуногенов сателлитной микробиоты туберкулёзного очага на формирование иммунного ответа в гранулёме.

На третьем этапе исследования в экспериментах *in vitro* был смоделирован процесс взаимодействия патогена с патогенетически значимой микробиотой туберкулёзного очага. При совместном культивировании штамм *C. kefirresidentii* стимулировал продукцию микобактериальной биоплёнки и усиливал синтез корд-фактора вакцинным штаммом *M. bovis* var. BCG, что указывает на синергетическое взаимодействие между микобактериями и патогенетически значимой микробиотой рода *Corynebacterium*.

Таким образом, опираясь на данные литературы и материалы собственного исследования, предложена концептуальная схема участия патогенетически значимой микробиоты туберкулёзного очага в патологических процессах: разжижении казеозного содержимого и модуляции специфического противотуберкулёзного иммунного ответа. Все эти патологические процессы могут способствовать прогрессированию гранулематозного воспаления при ТБ (Рисунок 19).

Согласно предложенной схеме, изначальное микробное сообщество туберкулёзного очага формируется в результате изоляции иммунной системой вместе с МБТ других сателлитных микроорганизмов, попавших туда транзиторно. В процессе гранулематозного воспаления и казеозного некроза в туберкулёме происходит последовательная смена микробного консорциума, аналогичная процессам сукцессии в природных микробных сообществах, что связано с изменениями условий некротической среды и конкуренцией между бактериями за доступные питательные вещества. В большинстве случаев эти микробные сообщества представлены неспецифическими таксонами и не оказывают патологического воздействия, без развития гранулематозного воспаления. Однако в отдельных случаях в казеозном некрозе факультативно-анаэробные бактерии

получают преимущество и начинают доминировать, адаптируясь к специфическим условиям некротической среды гранулёмы. В конечном итоге, в совокупности с МБТ эти бактерии образуют патогенетически значимую микробиоту туберкулёзного очага, изменяя течение специфической иммунной реактивности поражённого организма больного ТБ.

Взаимодействие патогенетически значимой микробиоты с микобактериями существенно повышает эффективность утилизации казеозного содержимого, что приводит к разжижению казеозных масс, снижению доступности патогена для механизмов иммунитета, лекарственной терапии и усиливает его патологические свойства. Это, в конечном итоге, способствует прогрессированию патологического процесса и приводит к неблагоприятному исходу ТБ лёгких.

Результаты выполненного диссертационного исследования позволяют охарактеризовать патогенетически значимую микробиоту туберкулёзного очага как важного участника иммунопатогенеза при развитии гранулёматозного воспаления. Выявленные закономерности открывают новые перспективы для патогенетического обоснования иммунопрофилактики ТБ.

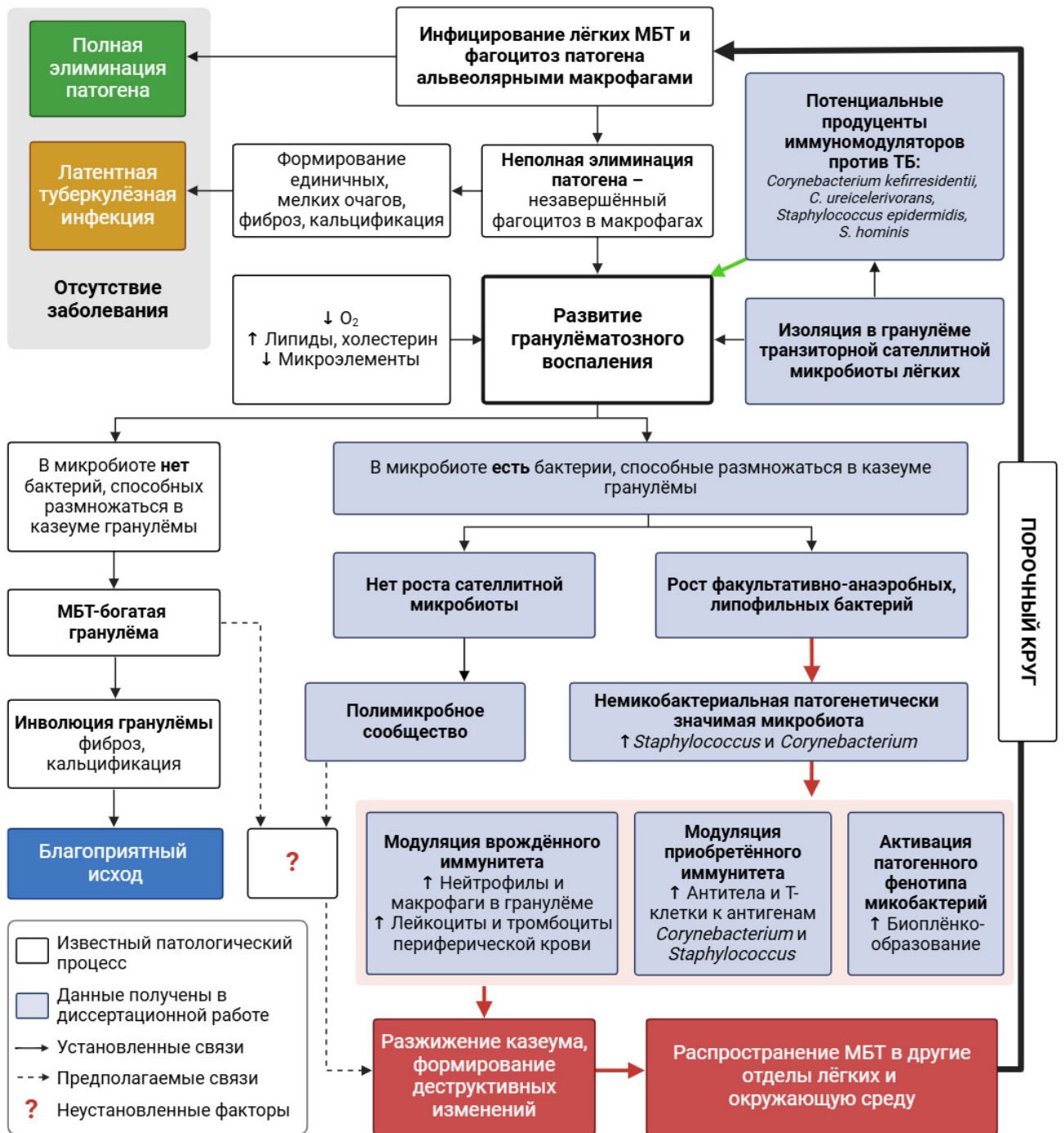


Рисунок 19 – Концептуальная схема участия патогенетически значимой сателлитной микробиоты туберкулёзного очага в патологических процессах гранулёматозного воспаления при ТБ лёгких.

ВЫВОДЫ

1. В половине случаев микробиота туберкулёзных очагов отличается высоким содержанием *Mycobacterium tuberculosis*, в остальных случаях она представляет собой полимикробное сообщество, которое характеризуется увеличением доли сателлитных таксономически различных факультативно-анаэробных бактерий, не относящихся к роду *Mycobacterium*. Согласно *in silico* прогнозам, патогенетически значимая микробиота чаще имеет гены метаболических путей, связанных с адаптацией к гипоксии, дефициту микроэлементов и высокому содержанию липидов в очагах некроза ($p < 0,05$).

2. Нарушением гомеостаза лёгочной микробиоты является присутствие в некротическом содержимом туберкулёзных очагов устойчивых к неблагоприятным условиям среды представителей родов *Corynebacterium* и *Staphylococcus*, способных к деградации казеозного центра и повышению его pH до нейтральных значений благодаря липазной, коллагеназной и уреазной активностям.

3. У пациентов с туберкулёзом *Corynebacterium kefirresidentii* вызывает повышенную реактивность гуморального компонента иммунитета у 20% больных ($p = 0,001$), а также усиливает высвобождение Т-лимфоцитами γ -интерферона ($p = 0,03$) и IL-4 ($p = 0,00005$). *Staphylococcus epidermidis* способствуют усилению Т-регуляторного иммунного ответа у больных туберкулёзом с повышением уровня IL-10 ($p = 0,02$ и $p = 0,009$), а увеличение уровня IL-4 в ответ на *Staphylococcus epidermidis* коррелирует с сопутствующей эозинофилией крови ($p = 0,03$).

4. В модели *in vitro* активные компоненты *Corynebacterium kefirresidentii* и *Staphylococcus epidermidis* способствуют двукратному увеличению количества гранулёмоподобных макрофагальных структур ($p = 0,001$) и появлению крупных клеточных скоплений ($p = 0,02$), при этом слабо влияя на рост микобактерий. *Corynebacterium kefirresidentii* стимулирует образование корд-фактора

Mycobacterium bovis var. BCG, признанного фактора патогенности микобактерий ($p = 0,004$).

5. Для больных туберкулёзом лёгких с полимикробным сообществом в инфекционном очаге характерно усиление воспалительного процесса в виде выраженной нейтрофильной инфильтрации гранулём ($p = 0,04$), а также лейкоцитоза ($p = 0,046$) и тромбоцитоза ($p = 0,045$) периферической крови ($9,4 \times 10^9$ /л лейкоцитов и 355×10^9 /л тромбоцитов).

6. Значимыми для патогенетически обоснованной иммунопрофилактики хронического, прогрессирующего туберкулёза являются биологически активные вещества с иммуномодулирующими свойствами, продуцируемые факультативно-анаэробными микроорганизмами видов *Corynebacterium kefirresidentii*, *Corynebacterium ureicelerivorans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, выделенными из казеозного некроза туберкулёзных очагов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

GF – Germ-Free, безмикробные животные

IFN- γ – интерферон- γ

Ig – иммуноглобулин

IGRA-тест – Interferon Gamma Release Assay, тест высвобождения интерферона- γ

IL – интерлейкин

NGS – Next-Generation Sequencing, высокопроизводительное секвенирование нового поколения

OTU – Operational Taxonomic Unit, оперативные таксономические единицы

PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Patterns, патоген-ассоциированные молекулярные структуры

SCFAs – Short-Chain Fatty Acids, короткоцепочечные жирные кислоты

SPF – Specific Pathogen-Free, свободные от патогенов животные

TDM – трегалоза-6,6'-димиколат

TLR – Toll-like Receptors, Toll-подобные рецепторы

TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α , фактор некроза опухоли- α

Treg – регуляторные Т-клетки

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

ВДП – верхние дыхательные пути

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛТБИ – латентная туберкулёзная инфекция

МБТ – *Mycobacterium tuberculosis*

НДП – нижние дыхательные пути

ОАК – общий анализ крови

ОП – оптическая плотность

кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ПТП – противотуберкулёзные препараты

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТБ – туберкулёз

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь лёгких

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буслаев, В.Ю. Сравнительный анализ микробиома мокроты у больных с различными гистологическими подтипами рака легкого / В.Ю. Буслаев, М.А. Винокуров // *VIII Международная научно-практическая конференция молодых учёных: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов.* – 2021. – С. 269–270.
2. Воронина, О.Л. Особенности микробиома респираторного тракта больных муковисцидозом / О.Л. Воронина, Н.Н. Рыжова, М.С. Кунда и др. // *Биохимия.* – 2020. – Т. 85, №1. – С. 3–14.
3. Гульнева, М.Ю. Особенности гуморального иммунного ответа на антигены оппортунистических микроорганизмов у больных системной красной волчанкой / М.Ю. Гульнева // *Актуальные проблемы медицины.* – 2021. – Т. 44, №3. – С. 278–285.
4. Дружинин, В.Г. Бактериальный микробиом дыхательных путей больных раком легкого и его связь с повреждениями генома в лимфоцитах крови / В.Г. Дружинин, Е.Д. Баранова, В.П. Волобаев и др. // *Современная биотехнология: актуальные вопросы, инновации и достижения : Сборник тезисов Всероссийской с международным участием онлайн-конференции.* – 2020. – С. 247–248.
5. Дружинин, В.Г. Состав бактериального микробиома мокроты у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легких / В.Г. Дружинин, Е.Д. Баранова, П.С. Деменков и др. // *Пульмонология.* – 2023. – Т. 33, №5. – С. 645–656.
6. Ероина, П.И. Бронхиальная микробиота при различных фенотипах хронической обструктивной болезни легких / П.И. Ероина, Р.С. Костин // *Forcipe.* – 2020. – №3. – С. 347–348.
7. Есимова, И.Е. Причины дисрегуляции иммунного ответа при туберкулёзе лёгких: влияние *M. tuberculosis* на течение иммунного ответа / И.Е. Есимова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2012. – Т. 11, №3. – С. 79–86.

8. Зверева, В.В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / В.В. Зверева, М.Н. Бойченко (ред.). – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 480 с.
9. Зигангирова, Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*. Ассистенты и конкуренты в микробиоме инфицированных легких больных муковисцидозом / Н.А. Зигангирова, Л.Н. Капотина, С.А. Сайдакова и др. // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2020. – Т. 15, №2. – С. 186–191.
10. Каминская, Г.О. Туберкулез и обмен липидов / Г.О. Каминская, Р.Ю. Абдуллаев // *Туберкулез и болезни легких*. – 2016. – Т. 94, №6. – С. 53–63.
11. Каюкова, С.И. Состояние легочной микробиоты у мышей C57BL/6 в модели экспериментального туберкулеза / С.И. Каюкова, А.Е. Панова, М.М. Авербах и др. // *Туберкулез и болезни легких*. – 2023. – Т. 101, №2. – С. 94–99.
12. Колобовникова, Ю.В. Особенности функциональной активности эозинофильных гранулоцитов крови при туберкулезе легких / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2014. – Т. 13, №5. – С. 42–48.
13. Колобовникова, Ю.В. Показатели клеточного и гуморального иммунного ответа при туберкулезе легких, сопровождающемся эозинофилией / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2012. – Т. 11, №1. – С. 39–45.
14. Кошечкин, В.А. Туберкулез: учебное пособие / В.А. Кошечкин, З.А. Иванова. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 304 с.
15. Линге, И.А. Нейтрофилы: неоднозначная роль в патогенезе туберкулеза / И.А. Линге, А.С. Апт // *Инфекция и иммунитет*. – 2021. – Т. 11, №5. – С. 809–819.
16. Мазурина, С.А. Микробиота нижних отделов дыхательных путей при хронических обструктивных заболеваниях легких / С.А. Мазурина, Г.А. Данилина, М.Ю. Смирнова и др. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2018. – №5. – С. 53–60.
17. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук // *Мир*. – 1984. – 480 с.

18. Николаян, Л.Т. Сопутствующая неспецифическая микрофлора у больных туберкулезом при разной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза / Л.Т. Николаян, А.Г. Давтян // *Туберкулез и болезни легких*. – 2018. – Т. 96, №7. – С. 68–69.
19. Ножевникова, А.Н. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии / А.Н. Ножевникова, Е.А. Бочкова, В.К. Плакунов и др. // *Микробиология*. – 2015. – Т. 84, №6. – С. 623–644.
20. Огарков, О. Продукция биофильмов клиническими штаммами возбудителя туберкулеза / О. Огарков, А. Суздальницкий, П. Хромова и др. // *Инфекция и иммунитет*. – 2018. – Т. 8, №4. – С. 435–440.
21. Огарков, О.Б. Феномен образования биопленок штаммами *Brevibacillus* spp. и *Bacillus* spp. в присутствии клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* / О.Б. Огарков, М.В. Бадлеева, Н.Л. Белькова и др. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2017. – Т. 35, №3. – С. 103.
22. Огарков, О.Б. Выделение и полногеномное секвенирование липофильной анаэробной бактерии, представителя видового комплекса *Corynebacterium tuberculostearicum*, из туберкулёзного очага / О.Б. Огарков, А.Е. Суздальницкий, И.Г. Кондратов и др. // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2023. – Т. 8, № 4. – С. 12–19.
23. Орлова, Е.А. Анализ микробного разнообразия казеозного некроза туберкулёзных очагов / Е.А. Орлова, О.Б. Огарков, А.Е. Суздальницкий и др. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2021. – Т. 39, №3. – С. 18–24.
24. Орлова, Е.А. Анализ разнообразия и функционального потенциала бактериальных сообществ туберкулёзных очагов / Е.А. Орлова, О.Б. Огарков, И.Г. Кондратов и др. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2024а. – №1. – С. 29–36.
25. Орлова, Е.А. Метагеномный анализ казеозного содержимого туберкулёзных очагов / Е.А. Орлова, В.В. Синьков, О.Б. Огарков и др. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2024б. – Т. 178, №11. – С. 569–573.

26. Орлова, Е.А. Особенности микробиоты лёгких при туберкулёзной инфекции / Е.А. Орлова, О.Б. Огарков, Л.И. Колесникова // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2024с. – Т. 23, №1. – С. 166–175.
27. Патент № 2702609 С1 Российская Федерация, МПК G09В 23/28, С12N 5/0786, С12N 5/077, Способ моделирования туберкулёзной инфекции *in vitro*, № 2018129016 : заявл. 06.08.2018 : опубл. 08.10.2019 2019 / Белогородцев С. Н., Шварц Я. Ш., Краснов В. А.; заявитель Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение "Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "ННИИТ" Минздрава России).
28. Синьков, В.В. Геном *Staphylococcus epidermidis* из казеозного некроза туберкулемы / В.В. Синьков, Е.А. Орлова, О.Б. Огарков и др. // *Генетика*. – 2024. – Т. 60, №10. – С. 129–134.
29. Турченко, С.Ю. Патоморфология туберкулеза: учеб.-метод. пособие для студентов 3 курса лечебного и медико-диагностического факультетов медицинских вузов, врачей-интернов патологоанатомов / С.Ю. Турченко, А.С. Терешковец, Л.А. Мартемьянова и др. – Гомель: ГомГМУ, 2017. – 32 с.
30. Холодок, О.А. Туберкулема легкого как форма туберкулезного процесса / О.А. Холодок, А.А. Григоренко, М.И. Черемкин // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. – 2014. – №53. – С. 126–131.
31. Alvarez-Curto, E. Metabolism meets immunity: The role of free fatty acid receptors in the immune system / E. Alvarez-Curto, G. Milligan // *Biochem Pharmacol*. – 2016. – Vol. 114. – P. 3–13.
32. Aravena-Román, M. *Corynebacterium aquatimens* sp. nov., a lipophilic *Corynebacterium* isolated from blood cultures of a patient with bacteremia / M. Aravena-Román, C. Spröer, C. Siering et al. // *Syst Appl Microbiol*. – 2012. – Vol. 35, №6. – P. 380–384.
33. Arbués, A. Generating three-dimensional human granulomas in vitro to study *Mycobacterium tuberculosis*-host interaction / A. Arbués, M. Kammüller, D. Portevin // *BioProtocol*. – 2020. – Vol. 10, №22. – P. e3820.

34. Balcells, M.E. The lung microbiome, vitamin D, and the tuberculous granuloma: A balance triangle / M.E. Balcells, N. Yokobori, B. young Hong et al. // *Microb Pathog.* – 2019. – Vol. 131. – P. 158–163.
35. Baranova, E. Sputum Microbiome composition in patients with squamous cell lung carcinoma / E. Baranova, V. Druzhinin, L. Matskova et al. // *Life.* – 2022. – Vol. 12, №9. – P. 1365.
36. Barber, D.L. Th1-driven immune reconstitution disease in *Mycobacterium avium*-infected mice / D.L. Barber, K.D. Mayer-Barber, L.R.V. Antonelli et al. // *Blood.* – 2010. – Vol. 116, №18. – P. 3485–3493.
37. Basaraba, R.J. Mycobacterial biofilms: revisiting tuberculosis bacilli in extracellular necrotizing lesions / R.J. Basaraba, A.K. Ojha // *Microbiol Spectr.* – 2017. – Vol. 5, №3.
38. Beck, J.M. Multicenter comparison of lung and oral microbiomes of HIV-infected and HIV-uninfected individuals / J.M. Beck, P.D. Schloss, A. Venkataraman et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2015. – Vol. 192, №11. – P. 1335–1344.
39. Berger, G. Lung microbiota: genuine or artifact? / G. Berger, R.G. Wunderink // *Isr Med Assoc J.* – 2013. – Vol. 15. – P. 731–733.
40. Bjarnsholt, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients / T. Bjarnsholt, P.Ø. Jensen, M.J. Fiandaca et al. // *Pediatr Pulmonol.* – 2009. – Vol. 44, №6. – P. 547–558.
41. Bolyen, E. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 / E. Bolyen, J.R. Rideout, M.R. Dillon et al. // *Nat Biotechnol.* – 2019. – Vol. 37, №8. – P. 852–857.
42. Botero, L.E. Respiratory tract clinical sample selection for microbiota analysis in patients with pulmonary tuberculosis / L.E. Botero, L. Delgado-Serrano, M.L. Cepeda et al. // *Microbiome.* – 2014. – Vol. 2, №1. – P. 29.
43. Bregenzer, T. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a butcher / T. Bregenzer, R. Frei, H. Ohnacker et al. // *Clin Microbiol Infect.* – 1997. – Vol. 3, №6. – P. 696–698.

44. Brighenti, S. Friends and foes of tuberculosis: modulation of protective immunity / S. Brighenti, S.A. Joosten // *J Intern Med.* – 2018. – Vol. 284, №2. – P. 125–144.
45. Brown, S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria / S. Brown, J.P. Santa Maria, S. Walker // *Annu Rev Microbiol.* – 2013. – Vol. 67. – P. 313–336.
46. Browne, H.P. Culturing of ‘unculturable’ human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation / H.P. Browne, S.C. Forster, B.O. Anonye et al. // *Nature.* – 2016. – Vol. 533, №7604. – P. 543–546.
47. Brown-Elliott, B.A. Antimycobacterial susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria / B.A. Brown-Elliott, G.L. Woods // *J Clin Microbiol.* – 2019. – Vol. 57, №10. – P. 834–853.
48. Buchmeier, N.A. Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics / N.A. Buchmeier, G.L. Newton, T. Koledin et al. // *Mol Microbiol.* – 2003. – Vol. 47, №6. – P. 1723–1732.
49. Budden, K.F. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis / K.F. Budden, S.L. Gellatly, D.L.A. Wood et al. // *Nat Rev Microbiol.* – 2016. – Vol. 15, №1. – P. 55–63.
50. Caccamo, N. Phenotypical and functional analysis of memory and effector human CD8 T cells specific for mycobacterial antigens / N. Caccamo, S. Meraviglia, C. La Mendola et al. // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 177, №3. – P. 1780–1785.
51. Canetti, G. The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man / G. Canetti // *Yale J Biol Med.* – 1955. – P. 72–73.
52. Carney, S.M. Methods in lung microbiome research / S.M. Carney, J.C. Clemente, M.J. Cox et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2020. – Vol. 62, №3. – P. 283–299.
53. Chang, Y.S. Metatranscriptomic analysis of human lung metagenomes from patients with lung cancer / Y.S. Chang, M.H. Hsu, S.J. Tu et al. // *Genes (Basel).* – 2021. – Vol. 12, №9. – P. 1458.
54. Charlson, E.S. Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers / E.S. Charlson, J. Chen, R. Custers-Allen et al. // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, №12. – P. e15216.

55. Charlson, E.S. Topographical Continuity of Bacterial Populations in the Healthy Human Respiratory Tract / E.S. Charlson, K. Bittinger, A.R. Haas et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2012. – Vol. 184, №8. – P. 957–963.
56. Cheng, H.Y. Interactions between the gut microbiota and the host innate immune response against pathogens / H.Y. Cheng, M.X. Ning, D.K. Chen et al. // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 607.
57. Cheng, Y. The proliferation and colonization of functional bacteria on amorphous polyethylene terephthalate: Key role of ultraviolet irradiation and nonionic surfactant polysorbate 80 addition / Y. Cheng, J. Chen, M. Bao et al. // *Chemosphere.* – 2022. – Vol. 291. – P. 132940.
58. Cheung, M.K. Sputum microbiota in tuberculosis as revealed by 16S rRNA pyrosequencing / M.K. Cheung, W.Y.W. Lam, P.T.W. Law et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, №1. – P. e54574.
59. Comberiati, P. The role of gut and lung microbiota in susceptibility to tuberculosis / P. Comberiati, M. Di Cicco, F. Paravati et al. // *Int J Environ Res Public Health.* – 2021. – Vol. 18, №22. – P. 12220.
60. Corleis, B. Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils / B. Corleis, D. Korbil, R. Wilson et al. // *Cell Microbiol.* – 2012. – Vol. 14, №7. – P. 1109–1121.
61. Corrêa-Oliveira, R. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids / R. Corrêa-Oliveira, J.L. Fachi, A. Vieira et al. // *Clin Transl Immunol.* – 2016. – Vol. 5, №4. – P. e73.
62. Council, S.E. Diversity and evolution of the primate skin microbiome / S.E. Council, A.M. Savage, J.M. Urban et al. // *Proc R Soc B Biol Sci.* – 2016. – Vol. 283, №1822. – P. 20152586.
63. Cronan, M.R. In the thick of it: Formation of the tuberculous granuloma and its effects on host and therapeutic responses / M.R. Cronan // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 820134.

64. Cui, Z. Complex sputum microbial composition in patients with pulmonary tuberculosis / Z. Cui, Y. Zhou, H. Li et al. // *BMC Microbiol.* – 2012. – Vol. 12. – P. 276.
65. Cvejic, L. Laryngeal penetration and aspiration in individuals with stable COPD / L. Cvejic, R. Harding, T. Churchward et al. // *Respirology.* – 2011. – Vol. 16, №2. – P. 269–275.
66. Davis, J.M. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection / J.M. Davis, L. Ramakrishnan // *Cell.* – 2009. – Vol. 136, №1. – P. 37–49.
67. de Souza, C. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak / C. de Souza, Y.V. Faria, L. de O. Sant'Anna et al. // *Mem Inst Oswaldo Cruz.* – 2015. – Vol. 110, №2. – P. 242–248.
68. de Steenhuijsen Piters, W.A.A. Early life microbiota and respiratory tract infections / W.A.A. de Steenhuijsen Piters, J. Binkowska, D. Bogaert // *Cell Host Microbe.* – 2020. – Vol. 28, №2. – P. 223–232.
69. Dekaboruah, E. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role / E. Dekaboruah, M.V. Suryavanshi, D. Chettri et al. // *Arch Microbiol.* – 2020. – Vol. 202, №8. – P. 2147–2167.
70. del Carmen Guerra de Blas, P. Potential effect of statins on *Mycobacterium tuberculosis* infection / P. del Carmen Guerra de Blas, P. Torres-González, M. Bobadilla-Del-Valle et al. // *J Immunol Res.* – 2018. – Vol. 12. – P. 1–14.
71. Di Simone, S.K. Understanding respiratory microbiome-immune system interactions in health and disease / S.K. Di Simone, I. Rudloff, C.A. Nold-Petry et al. // *Sci Transl Med.* – 2023. – Vol. 15, №678. – P. eabq5126.
72. Dickson, R.P. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography / R.P. Dickson, J.R. Erb-Downward, C.M. Freeman et al. // *Ann Am Thorac Soc.* – 2015. – Vol. 12, №6. – P. 821–830.
73. Dickson, R.P. The microbiome and the respiratory tract / R.P. Dickson, J.R. Erb-Downward, F.J. Martinez et al. // *Annu Rev Physiol.* – 2016. – Vol. 78. – P. 481–504.

74. Ding, L. Pathogen metagenomics reveals distinct lung microbiota signatures between bacteriologically confirmed and negative tuberculosis patients / L. Ding, Y. Liu, X. Wu et al. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 708827.
75. Djossou, F. *Corynebacterium mucifaciens* in an immunocompetent patient with cavitary pneumonia / F. Djossou, M.C. Bézian, D. Moynet et al. // *BMC Infect Dis.* – 2010. – Vol. 10. – P. 355.
76. Dmitrijeva, M. Strain-resolved dynamics of the lung microbiome in patients with cystic fibrosis / M. Dmitrijeva, C.R. Kahlert, R. Feigelman et al. // *mBio.* – 2021. – Vol. 12, №2. – P. e02863-20.
77. Doan, T.N. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection: A latent-class analysis / T.N. Doan, D.P. Eisen, M.T. Rose et al. // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, №11. – P. e0188631.
78. Domingue, J.C. Host responses to mucosal biofilms in the lung and gut / J.C. Domingue, J.L. Drewes, C.A. Merlo et al. // *Mucosal Immunol.* – 2020. – Vol. 13, №3. – P. 413–422.
79. Douglas, G.M. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions / G.M. Douglas, V.J. Maffei, J.R. Zaneveld et al. // *Nat Biotechnol.* – 2020. – Vol. 38, №6. – P. 685–688.
80. Dover, L.G. Phylogenomic reappraisal of fatty acid biosynthesis, mycolic acid biosynthesis and clinical relevance among members of the genus *Corynebacterium* / L.G. Dover, A.R. Thompson, I.C. Sutcliffe et al. // *Front Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 802532.
81. Druzhinin, V.G. Sputum microbiota in coal workers diagnosed with pneumoconiosis as revealed by 16S rRNA gene sequencing / V.G. Druzhinin, E.D. Baranova, L.V. Matskova et al. // *Life.* – 2022. – Vol. 12, №6. – P. 830.
82. Druzhinin, V.G. Taxonomic diversity of sputum microbiome in lung cancer patients and its relationship with chromosomal aberrations in blood lymphocytes / V.G. Druzhinin, L.V. Matskova, P.S. Demenkov et al. // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10, №1. – P. 9681.

83. Earl, J.P. Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes / J.P. Earl, N.D. Adappa, J. Krol et al. // *Microbiome*. – 2018. – Vol. 6, №1. – P. 190.
84. Eisenstein, M. The skin microbiome and its relationship with the human body explained / M. Eisenstein // *Nature*. – 2020. – Vol. 588, №7838. – P. S210–S211.
85. Ekanayake, A. Respiratory bacterial microbiota and individual bacterial variability in lung cancer and bronchiectasis patients / A. Ekanayake, D. Madegedara, V. Chandrasekharan et al. // *Indian J Microbiol*. – 2020. – Vol. 60, №2. – P. 196.
86. Erb-Downward, J.R. Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD / J.R. Erb-Downward, D.L. Thompson, M.K. Han et al. // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, №2. – e16384.
87. Ernst, J.D. The immunological life cycle of tuberculosis / J.D. Ernst // *Nat Rev Immunol*. – 2012. – Vol. 12, №8. – P. 581–591.
88. Esteban, J. Mycobacterium biofilms / J. Esteban, M. García-Coca // *Front Microbiol*. – 2017. – Vol. 8, JAN. – P. 2651.
89. Facciponte, D.N. Identifying aerosolized cyanobacteria in the human respiratory tract: a proposed mechanism for cyanotoxin-associated diseases / D.N. Facciponte, M.W. Bough, D. Seidler et al. // *Sci Total Environ*. – 2018. – Vol. 645. – P. 1003–1013.
90. Fagundes, C.T. Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice / C.T. Fagundes, F.A. Amaral, A.T. Vieira et al. // *J Immunol*. – 2012. – Vol. 188, №3. – P. 1411–1420.
91. Falkinham, J.O. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment / J.O. Falkinham // *J Appl Microbiol*. – 2009. – Vol. 107, №2. – P. 356–367.
92. Field, S.K. Prevalence of gastroesophageal reflux symptoms in asthma / S.K. Field, M. Underwood, R. Brant et al. // *Chest*. – 1996. – Vol. 109, №2. – P. 316–322.
93. Flemming, H.C. The biofilm matrix / H.C. Flemming, J. Wingender // *Nat Rev Microbiol*. – 2010. – Vol. 8, №9. – P. 623–633.

94. Frei, R. Environmental influences on childhood allergies and asthma – The Farm effect / R. Frei, K. Heye, C. Roduit et al. // *Pediatr Allergy Immunol.* – 2022. – Vol. 33, №6. – e13807.
95. Glickman, M.S. The *mmaA2* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes the distal cyclopropane synthase of the alpha-mycolic acid / M.S. Glickman // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278, №10. – P. 7844–7849.
96. Gollwitzer, E.S. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1 / E.S. Gollwitzer, S. Saglani, A. Trompette et al. // *Nat Med.* – 2014. – Vol. 20, №6. – P. 642–647.
97. Gouzy, A. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* at acidic pH depends on lipid assimilation and is accompanied by reduced GAPDH activity / A. Gouzy, C. Healy, K.Y. Rhee et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2021. – Vol. 118, №32. – P. e2024571118.
98. Guarner, F. Gut flora in health and disease / F. Guarner, J.R. Malagelada // *Lancet.* – 2003. – Vol. 361, №9356. – P. 512–519.
99. Guilloux, C.A. Les bactéries anaérobies, ces inconnues du microbiote pulmonaire / C.A. Guilloux, C. Lamoureux, G. Héry-Arnaud // *Med Sci.* – 2018. – Vol. 34, №3. – P. 253–260.
100. HaileMariam, M. Protein and microbial biomarkers in sputum discern acute and latent tuberculosis in investigation of pastoral ethiopian cohort / M. HaileMariam, Y. Yu, H. Singh et al. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 595554.
101. Hall-Stoodley, L. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases / L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley // *Nat Rev Microbiol.* – 2004. – Vol. 2, №2. – P. 95–108.
102. Hammer, D.A.T. Past: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis / D.A.T. Hammer, P.D. Ryan, Ø. Hammer et al. // *Palaeontol Electron.* – 2001. – Vol. 4, №1. – 9 p.
103. Herbst, T. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization / T. Herbst, A. Sichelstiel, C. Schär et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2011. – Vol. 184, №2. – P. 198–205.

104. Hilty, M. Disordered microbial communities in asthmatic airways / M. Hilty, C. Burke, H. Pedro et al. // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, №1. – P. e8578.
105. Hinić, V. *Corynebacterium tuberculostearicum*: a potentially misidentified and multiresistant *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens / V. Hinić, C. Lang, M. Weisser et al. // *J Clin Microbiol*. – 2012. – Vol. 50, №8. – P. 2561–2567.
106. Høiby, N. Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients / N. Høiby, T. Bjarnsholt, C. Moser et al. // *APMIS*. – 2017. – Vol. 125, №4. – P. 339–343.
107. Hong, B. Meta-analysis of the lung microbiota in pulmonary tuberculosis / B. Hong, J.N. Paulson, O.C. Stine et al. // *Tuberculosis*. – 2018. – Vol. 109. – P. 102–108.
108. Hu, C. Non-photosynthetic *Melainabacteria* (*Cyanobacteria*) in human gut: characteristics and association with health / C. Hu, P. Rzymiski // *Life*. – 2022. – Vol. 12, №4. – P. 476.
109. Hu, Y. Distinct lung microbial community states in patients with pulmonary tuberculosis / Y. Hu, Y. Kang, X. Liu et al. // *Sci China Life Sci*. – 2020b. – Vol. 63, №10. – P. 1522–1533.
110. Hu, Y. Metagenomic analysis of the lung microbiome in pulmonary tuberculosis – a pilot study / Y. Hu, M. Cheng, B. Liu et al. // *Emerg Microbes Infect*. – 2020a. – Vol. 9, №1. – P. 1444–1452.
111. Hunter, R.L. Trehalose 6,6'-dimycolate and lipid in the pathogenesis of caseating granulomas of tuberculosis in mice / R.L. Hunter, M. Olsen, C. Jagannath et al. // *Am J Pathol*. – 2006. – Vol. 168, №4. – P. 1249–1261.
112. Hunter, R.L. Tuberculosis as a three-act play: A new paradigm for the pathogenesis of pulmonary tuberculosis / R.L. Hunter // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2016. – Vol. 97. – P. 8–17.
113. Iebba, V. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota / V. Iebba, V. Totino, A. Gagliardi et al. // *New Microbiol*. – 2016. – Vol. 39. – P. 1–12.
114. Ito, K. Eosinophilic pleural effusion due to *Staphylococcus epidermidis* infection: A case report / K. Ito, T. Ogawa, T. Tanigaki et al. // *Respir Med Case Reports*. – 2024. – Vol. 51. – P. 102075.

115. Jin, C. Commensal microbiota promote lung cancer development via $\gamma\delta$ T cells / C. Jin, G.K. Lagoudas, C. Zhao et al. // *Cell*. – 2019. – Vol. 176, №5. – P. 998–1013.e16.
116. Julián, E. Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic *Mycobacteria* / E. Julián, M. Roldán, A. Sánchez-Chardi et al. // *J Bacteriol*. – 2010. – Vol. 192, №7. – P. 1751–1760.
117. Kalsum, S. The cording phenotype of *Mycobacterium tuberculosis* induces the formation of extracellular traps in human macrophages / S. Kalsum, C. Braian, V.A.C.M. Koeken et al. // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2017. – Vol. 7. – P. 278.
118. Kapoor, N. Human granuloma *in vitro* model, for TB dormancy and resuscitation / N. Kapoor, S. Pawar, T.D. Sirakova et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, №1. – P. e53657.
119. Kateete, D.P. Sputum microbiota profiles of treatment-naïve TB patients in Uganda before and during first-line therapy / D.P. Kateete, M.M. Mbabazi, F. Nakazzi et al. // *Sci Rep*. – 2021. – Vol. 11, №1. – P. 24486.
120. Keslin, M.H. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A new cause of infectious and eosinophilic pneumonia / M.H. Keslin, J.J. McCusker, L.S. Lutch et al. // *Am J Med*. – 1979. – Vol. 67, №2. – P. 228–231.
121. Kim, M.J. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism / M.J. Kim, H.C. Wainwright, M. Locketz et al. // *EMBO Mol Med*. – 2010. – Vol. 2, №7. – P. 258–274.
122. Kitsoulis, P.V. A case of eosinophilic granuloma of the skull in an adult man: a case report / P.V. Kitsoulis, G. Paraskevas, A. Vrettakos et al. // *Cases J*. – 2009. – Vol. 2, №12. – P. 9144.
123. Kline, S.N. *Staphylococcus aureus* proteases trigger eosinophil-mediated skin inflammation / S.N. Kline, N.A. Orlando, A.J. Lee et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2024. – Vol. 121, №6. – P. e2309243121.
124. Koh, W.J. Prevalence of gastroesophageal reflux disease in patients with nontuberculous mycobacterial lung disease / W.J. Koh, J.H. Lee, Y.S. Kwon et al. // *Chest*. – 2007. – Vol. 131, №6. – P. 1825–1830.

125. Kojima, Y. Antibody to the capsular polysaccharide/adhesin protects rabbits against catheter-related bacteremia due to coagulase-negative staphylococci / Y. Kojima, M.A. Tojo, D.A. Goldmann et al. // *J Infect Dis.* – 1990. – Vol. 162, №2. – P. 435–441.
126. Kosma, P. Glycan structure of a heptose-containing S-layer glycoprotein of *Bacillus thermoaerophilus* / P. Kosma, T. Wugeditsch, R. Christian et al. // *Glycobiology.* – 1995. – Vol. 5, №8. – P. 791–796.
127. Kovaleva, O. Lung microbiome differentially impacts survival of patients with non-small cell lung cancer depending on tumor stroma phenotype / O. Kovaleva, P. Podlesnaya, M. Rashidova et al. // *Biomedicines.* – 2020. – Vol. 8, №9. – P. 349.
128. Kovaleva, O.V. Diagnostic and prognostic potential of the resident non-small cell lung cancer microbiome / O.V. Kovaleva, N.E. Kushlinskii, P.A. Podlesnaya et al. // *Klin Lab Diagn.* – 2022. – Vol. 67, №8. – P. 458–462.
129. Krishna, P. Microbiome diversity in the sputum of patients with pulmonary tuberculosis / P. Krishna, A. Jain, P.S. Bisen // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2016. – Vol. 35, №7. – P. 1205–1210.
130. Kulka, K. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms / K. Kulka, G. Hatfull, A.K. Ojha // *J Vis Exp.* – 2012. – Vol. 60. – P. e3820.
131. Kumar, P. Adult pulmonary tuberculosis as a pathological manifestation of hyperactive antimycobacterial immune response / P. Kumar // *Clin Transl Med.* – 2016. – Vol. 5, №1. – P. 38.
132. Kumar, P. IFN γ -producing CD4⁺ T lymphocytes: the double-edged swords in tuberculosis / P. Kumar // *Clin Transl Med.* – 2017. – Vol. 6, №1. – P. 21.
133. Kumar, R. Immunometabolism of phagocytes during *Mycobacterium tuberculosis* infection / R. Kumar, P. Singh, A. Kolloli et al. // *Front Mol Biosci.* – 2019. – Vol. 6. – P. 105.
134. Kurthkoti, K. The capacity of *Mycobacterium tuberculosis* to survive iron starvation might enable it to persist in iron-deprived microenvironments of human granulomas / K. Kurthkoti, H. Amin, M.J. Marakalala et al. // *MBio.* – 2017. – Vol. 8, №4. – P. e01092–17.

135. Lal, C.V. The airway microbiome at birth / C.V. Lal, C. Travers, Z.H. Aghai et al. // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 31023.
136. Lardeux, F. Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls / F. Lardeux, M.M. Torrico, C. Aliaga et al. // *Mem Inst Oswaldo Cruz.* – 2016. – Vol. 111, №8. – P. 501–504.
137. Larsen, J.M. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma-associated *Proteobacteria*, but not commensal *Prevotella* spp., promote Toll-like receptor 2-independent lung inflammation and pathology / J.M. Larsen, H.S. Musavian, T.M. Butt et al. // *Immunology.* – 2015. – Vol. 144, №2. – P. 333–342.
138. Lerner, T.R. *Mycobacterium tuberculosis* cords within lymphatic endothelial cells to evade host immunity / T.R. Lerner, C.J. Queval, R.P. Lai et al. // *JCI Insight.* – 2020. – Vol. 5, №10. – P. e136937.
139. Lewis, K.N. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guérin attenuation / K.N. Lewis, R. Liao, K.M. Guinn et al. // *J Infect Dis.* – 2003. – Vol. 187, №1. – P. 117–123.
140. Lighthart, B. Mini-review of the concentration variations found in the alfresco atmospheric bacterial populations / B. Lighthart // *Aerobiologia.* – 2000. – Vol. 16, №1. – P. 7–16.
141. Lin, P.L. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing / P.L. Lin, C.B. Ford, M.T. Coleman et al. // *Nat Med.* – 2014. – Vol. 20, №1. – P. 75–79.
142. Lowe, D.M. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? / D.M. Lowe, P.S. Redford, R.J. Wilkinson et al. // *Trends Immunol.* – 2012. – Vol. 33, №1. – P. 14–25.
143. Mahajan, S. *Mycobacterium tuberculosis* modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPAR γ and TR4 for survival / S. Mahajan, H.K. Dkhar, V. Chandra et al. // *J Immunol.* – 2012. – Vol. 188, №11. – P. 5593–5603.
144. Man, W.H. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health / W.H. Man, W.A.A. De Steenhuijsen Piters, D. Bogaert // *Nat Rev Microbiol.* – 2017. – Vol. 15, №5. – P. 259–270.

145. Mancabelli, L. Mapping bacterial diversity and metabolic functionality of the human respiratory tract microbiome / L. Mancabelli, C. Milani, F. Fontana et al. // *J Oral Microbiol.* – 2022. – Vol. 14, №1. – P. 2051336.
146. Marakalala, M.J. Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized / M.J. Marakalala, R.M. Raju, K. Sharma et al. // *Nat Med.* – 2016. – Vol. 22, №5. – P. 531–538.
147. Marotz, C.A. Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion / C.A. Marotz, J.G. Sanders, C. Zuniga et al. // *Microbiome.* – 2018. – Vol. 6, №1. – P. 42.
148. Marsland, B.J. Host–microorganism interactions in lung diseases / B.J. Marsland, E.S. Gollwitzer // *Nat Rev Immunol.* – 2014. – Vol. 14, №12. – P. 827–835.
149. Martens, G.W. Hypercholesterolemia impairs immunity to tuberculosis / G.W. Martens, M.C. Arikian, J. Lee et al. // *Infect Immun.* – 2008. – Vol. 76, №8. – P. 3464–3472.
150. Mattila, J.T. Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms / J.T. Mattila, O.O. Ojo, D. Kepka-Lenhart et al. // *J Immunol.* – 2013. – Vol. 191, №2. – P. 773–784.
151. Matucci, A. Cellular and humoral immune responses during tuberculosis infection: useful knowledge in the era of biological agents / A. Matucci, E. Maggi, A. Vultaggio // *J Rheumatol Suppl.* – 2014. – Vol. 91. – P. 17–23.
152. Mellmann, A. Sequencing and staphylococci identification / A. Mellmann, K. Becker, C. Von Eiff et al. // *Emerg Infect Dis.* – 2006. – Vol. 12, №2. – P. 333–336.
153. Meza, A.N. *Mycobacterium tuberculosis* CysA2 is a dual sulfurtransferase with activity against thiosulfate and 3-mercaptopyruvate and interacts with mammalian cells / A.N. Meza, C.C.N. Cambui, A.C.R. Moreno et al. // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9, №1. – P. 16791.
154. Mezouar, S. Tumor necrosis factor-alpha antagonist interferes with the formation of granulomatous multinucleated giant cells: New insights into *Mycobacterium*

- tuberculosis* infection / S. Mezouar, I. Diarra, J. Roudier et al. // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1947.
155. Mihret, A. The role of dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection / A. Mihret // *Virulence.* – 2012. – Vol. 3, №7. – P. 654–659.
156. Milani, C. The human gut microbiota and its interactive connections to diet / C. Milani, C. Ferrario, F. Turroni et al. // *J Hum Nutr Diet.* – 2016. – Vol. 29, №5. – P. 539–546.
157. Moreau-Marquis, S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway / S. Moreau-Marquis, B.A. Stanton, G.A. O’Toole // *Pulm Pharmacol Ther.* – 2008. – Vol. 21, №4. – P. 595–599.
158. Morse, C.A. Is there a relationship between obstructive sleep apnea and gastroesophageal reflux disease? / C.A. Morse, S.F. Quan, M.Z. Mays et al. // *Clin Gastroenterol Hepatol.* – 2004. – Vol. 2, №9. – P. 761–768.
159. Murakami, K. Eosinophilic granuloma with splendore-hoepli material caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans* in a heifer / K. Murakami, E. Hata, S. Hatama et al. // *J Vet Med Sci.* – 2014. – Vol. 76, №6. – P. 931–935.
160. Nakhaee, M. Relation between lower respiratory tract microbiota and type of immune response against tuberculosis / M. Nakhaee, A. Rezaee, R. Basiri et al. // *Microb Pathog.* – 2018. – Vol. 120. – P. 161–165.
161. Natalini, J.G. The dynamic lung microbiome in health and disease / J.G. Natalini, S. Singh, L.N. Segal // *Nat Rev Microbiol.* – 2022. – Vol. 21. – P. 222–235.
162. Neville, B.A. Commensal Koch’s postulates: establishing causation in human microbiota research / B.A. Neville, S.C. Forster, T.D. Lawley // *Curr Opin Microbiol.* – 2018. – Vol. 42. – P. 47–52.
163. Nguyen, T.H. Host response to *Staphylococcus epidermidis* colonization and infections / T.H. Nguyen, M.D. Park, M. Otto et al. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – Vol. 7. – P. 90.
164. Nureki, S.I. *Corynebacterium ulcerans* infection of the lung mimicking the histology of Churg-Strauss syndrome / S.I. Nureki, E. Miyazaki, O. Matsuno et al. // *Chest.* – 2007. – Vol. 131, №4. – P. 1237–1239.

165. Ogarkov, O. 'Lethal' combination of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and human CD209 -336G allele in Russian male population / O. Ogarkov, I. Mokrousov, V. Sinkov et al. // *Infect Genet Evol.* – 2012. – Vol. 12, №4. – P. 732–736.
166. Ogarkov, O. Metagenomic analysis of the lung tuberculomas microbiome: paucibacillary bacterial community / O. Ogarkov, P. Khromova, V. Sinkov et al. // *Int J Mycobacteriology.* – 2021. – Vol. 9, №5. – P. 13.
167. Ojha, A. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria / A. Ojha, M. Anand, A. Bhatt et al. // *Cell.* – 2005. – Vol. 123, №5. – P. 861–873.
168. Ojha, A.K. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria / A.K. Ojha, A.D. Baughn, D. Sambandan et al. // *Mol Microbiol.* – 2008. – Vol. 69, №1. – P. 164–174.
169. Olson, M.E. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics / M.E. Olson, H. Ceri, D.W. Morck et al. // *Can J Vet Res.* – 2002. – Vol. 66, №2. – P. 86–92.
170. Orlova, E. Isolation and immunogenicity assessment of facultative anaerobic microorganisms from the caseum of tuberculosis foci / E. Orlova, E. Nemkova, Y. Schwartz et al. // *Biomed Biotechnol Res J.* – 2024. – Vol. 8, Abstract Supplement. – P. S20.
171. Orme, I.M. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis / I.M. Orme // *Tuberculosis.* – 2014. – Vol. 94, №1. – P. 8–14.
172. Orme, I.M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung / I.M. Orme, R.T. Robinson, A.M. Cooper // *Nat Immunol.* – 2015. – Vol. 16, №1. – P. 57–63.
173. Orme, I.M. The formation of the granuloma in tuberculosis infection / I.M. Orme, R.J. Basaraba // *Semin Immunol.* – 2014. – Vol. 26, №6. – P. 601–609.
174. Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen / M. Otto // *Nat Rev Microbiol.* – 2009. – Vol. 7, №8. – P. 555–567.
175. Ozdemir, S. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of non-diphtheria *Corynebacterium* strains isolated from blood cultures: first report from Turkey / S.

- Ozdemir, O. Aydogan, C. Koksak Cakirlar // *Medeni Med J.* – 2021. – Vol. 36, №2. – P. 123–129.
176. Pabst, M.J. Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis* / M.J. Pabst, J.M. Gross, J.P. Brozna et al. // *J Immunol.* – 1988. – Vol. 140, №2. – P. 634–640.
177. Park, C.H. Mycobacterial infection after intravesical Bacillus Calmette-Guërin treatment for bladder cancer: a case report / C.H. Park, M.A. Jang, Y.H. Ahn et al. // *Korean J Lab Med.* – 2011. – Vol. 31, №3. – P. 197–200.
178. Pattaroni, C. Early-life formation of the microbial and immunological environment of the human airways / C. Pattaroni, M.L. Watzenboeck, S. Schneidegger et al. // *Cell Host Microbe.* – 2018. – Vol. 24, №6. – P. 857–865.e4.
179. Pechkovsky, D.V. Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection in vitro and in vivo / D.V. Pechkovsky, O.M. Zalutskaya, G.I. Ivanov et al. // *FEMS Immunol Med Microbiol.* – 2000. – Vol. 29, №1. – P. 27–33.
180. Persson, Y.A.Z. *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils trigger a pro-inflammatory response in macrophages through release of heat shock protein 72, acting in synergy with the bacteria / Y.A.Z. Persson, R. Blomgran-Julinder, S. Rahman et al. // *Microbes Infect.* – 2008. – Vol. 10, №3. – P. 233–240.
181. Pinto, R. The *Mycobacterium tuberculosis* *cysD* and *cysNC* genes form a stress-induced operon that encodes a tri-functional sulfate-activating complex / R. Pinto, Q.X. Tang, W.J. Britton et al. // *Microbiology.* – 2004. – Vol. 150, №6. – P. 1681–1686.
182. Prakash Babu, S. Eosinophil polymorphonuclear leukocytes in TB: what we know so far / S. Prakash Babu, P.B. Narasimhan, S. Babu // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 2639.
183. Puhvel, S.M. Levels of antibody to *Staphylococcus epidermidis* in patients with acne vulgaris / S.M. Puhvel, T.H. Warnick, J.H. Sternberg // *Arch Dermatol.* – 1965. – Vol. 92, №1. – P. 88–90.
184. Ramakrishnan, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis / L. Ramakrishnan // *Nat Rev Immunol.* – 2012. – Vol. 12, №5. – P. 352–366.

185. Rao, V. *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule / V. Rao, N. Fujiwara, S.A. Porcelli et al. // *J Exp Med.* – 2005. – Vol. 201, №4. – P. 535–543.
186. Reitermayer, D. Interrelation between Tween and the membrane properties and high pressure tolerance of *Lactobacillus plantarum* / D. Reitermayer, T.A. Kafka, C.A. Lenz et al. // *BMC Microbiol.* – 2018. – Vol. 18, №1. – P. 72.
187. Remot, A. Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice / A. Remot, D. Descamps, M.L. Noordine et al. // *ISME J.* – 2017. – Vol. 11, №5. – P. 1061–1074.
188. Ribeiro-Rodrigues, R. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis / R. Ribeiro-Rodrigues, Co T. Resende, R. Rojas et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2006. – Vol. 144, №1. – P. 25–34.
189. Richmond, B.W. Airway bacteria drive a progressive COPD-like phenotype in mice with polymeric immunoglobulin receptor deficiency / B.W. Richmond, R.M. Brucker, W. Han et al. // *Nat Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 11240.
190. Rijnink, W.F. B-cells and antibodies as contributors to effector immune responses in tuberculosis / W.F. Rijnink, T.H.M. Ottenhoff, S.A. Joosten // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 640168.
191. Rodríguez-Sevilla, G. Non-Tuberculous Mycobacteria multispecies biofilms in cystic fibrosis: development of an in vitro *Mycobacterium abscessus* and *Pseudomonas aeruginosa* dual species biofilm model / G. Rodríguez-Sevilla, M. García-Coca, D. Romera-García et al. // *Int J Med Microbiol.* – 2018. – Vol. 308, №3. – P. 413–423.
192. Rogan, M.P. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence / M.P. Rogan, P. Geraghty, C.M. Greene et al. // *Respir Res.* – 2006. – Vol. 7, № 1. – P. 29.
193. Rogers, G.B. Clinical measures of disease in adult non-CF bronchiectasis correlate with airway microbiota composition / G.B. Rogers, C.J. Van Der Gast, L. Cuthbertson et al. // *Thorax.* – 2013. – Vol. 68, №8. – P. 731–737.
194. Rognes, T. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics / T. Rognes, T. Flouri, B. Nichols et al. // *PeerJ.* – 2016. – Vol. 4, №10. – P. e2584.

195. Rooks, M.G. Gut microbiota, metabolites and host immunity / M.G. Rooks, W.S. Garrett // *Nat Rev Immunol.* – 2016. – Vol. 16, №6. – P. 341–352.
196. Ruiz-Pino, M. Male genitourinary infections by *Corynebacterium glucuronolyticum*. A review and clinical experience / M. Ruiz-Pino, C. Foronda-García-Hidalgo, P. Alarcón-Blanco et al. // *Rev Española Quimioter.* – 2019. – Vol. 32, №5. – P. 479–484.
197. Russell, D.G. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma / D.G. Russell, P.J. Cardona, M.J. Kim et al. // *Nat Immunol.* – 2009. – Vol. 10, №9. – P. 943–948.
198. Ryan, M.P. *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens / M.P. Ryan, J.T. Pembroke // *Virulence.* – 2018. – Vol. 9, №1. – P. 480–493.
199. Ryzhova, N.N. Respiratory tract microbiome in children with cystic fibrosis / N.N. Ryzhova, O.L. Voronina, E.V. Loseva et al. // *Sib Med Rev.* – 2019. – №2. – P. 19–28.
200. Sala, C. Multicenter analysis of sputum microbiota in tuberculosis patients / C. Sala, A. Benjak, D. Goletti et al. // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, №10. – P. e0240250.
201. Salamzade, R. Comparative genomic and metagenomic investigations of the *Corynebacterium tuberculostearicum* species complex reveals potential mechanisms underlying associations to skin health and disease / R. Salamzade, M.H. Swaney, L.R. Kalan et al. // *Microbiol Spectr.* – 2023. – Vol. 11, №1. – P. e0357822.
202. Salter, S.J. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses / S.J. Salter, M.J. Cox, E.M. Turek et al. // *BMC Biol.* – 2014. – Vol. 12. – P. 87.
203. Sánchez Montalvo, A. The role of IgA in chronic upper airway disease: friend or foe? / A. Sánchez Montalvo, S. Gohy, P. Rombaux et al. // *Front Allergy.* – 2022. – Vol. 3. – P. 852546.
204. Sarathy, J.P. Caseum: a niche for *Mycobacterium tuberculosis* drug-tolerant persists / J.P. Sarathy, V. Dartois // *Clin Microbiol Rev.* – 2020. – Vol. 33, №3. – P. e00159-19.

205. Schaefer, W.B. Effect of oleic acid on growth and cell structure of Mycobacteria / W.B. Schaefer, C.W. Lewis // *J Bacteriol.* – 1965. – Vol. 90, №5. – P. 1438–1447.
206. Schulze-Robbecke, R. Mycobacteria in biofilms / R. Schulze-Robbecke, R. Fischer // *Zentralblatt für Hyg und Umweltmedizin.* – 1989. – Vol. 188, №3–4. – P. 385–390.
207. Scott, R.B. Gastroesophageal reflux in patients with cystic fibrosis / R.B. Scott, E.V. O’Loughlin, D.G. Gall // *J Pediatr.* – 1985. – Vol. 106, №2. – P. 223–227.
208. Segal, L.N. Anaerobic bacterial fermentation products increase tuberculosis risk in antiretroviral treated HIV-patients / L.N. Segal, J.C. Clemente, Y. Li et al. // *Cell Host Microbe.* – 2017. – Vol. 21, №4. – P. 530–537.
209. Segal, L.N. Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype / L.N. Segal, J.C. Clemente, J.C.J. Tsay et al. // *Nat Microbiol.* – 2016. – Vol. 1. – P. 16031.
210. Severn, M.M. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection / M.M. Severn, A.R. Horswill // *Nat Rev Microbiol.* – 2023. – Vol. 21, №2. – P. 97–111.
211. Shah, T. The role of microbiota in respiratory health and diseases, particularly in tuberculosis / T. Shah, Z. Shah, Z. Baloch et al. // *Biomed Pharmacother.* – 2021. – Vol. 143. – P. 112108.
212. Sharma, P.K. FoxP3+ regulatory T cells suppress effector T-cell function at pathologic site in miliary tuberculosis / P.K. Sharma, S.K. Saha, A. Singh et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2009. – Vol. 179, №11. – P. 1061–1070.
213. Siwicka-Gieroba, D. Lung microbiome – a modern knowledge / D. Siwicka-Gieroba, K. Czarko-Wicha // *Cent J Immunol.* – 2020. – Vol. 45, №3. – P. 342–345.
214. Soriano, F. *In vitro* activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum* / F. Soriano, L. Huelves, P. Naves et al. // *J Antimicrob Chemother.* – 2009. – Vol. 63, №2. – P. 353–356.

215. Starner, T.D. *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis / T.D. Starner, N. Zhang, G.H. Kim et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2006. – Vol. 174, №2. – P. 213–220.
216. Suárez, N. Bacterial lysates as immunotherapies for respiratory infections: methods of preparation / N. Suárez, F. Ferrara, A. Rial et al. // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2020. – Vol. 8. – P. 545.
217. Sulaiman, I. Evaluation of the airway microbiome in nontuberculous mycobacteria disease / I. Sulaiman, B.G. Wu, Y. Li et al. // *Eur Respir J.* – 2018. – Vol. 52, №4. – P. 1800810.
218. Sulaiman, I. Functional lower airways genomic profiling of the microbiome to capture active microbial metabolism / I. Sulaiman, B.G. Wu, Y. Li et al. // *Eur Respir J.* – 2021. – Vol. 58, №1. – P. 2003434.
219. Swaney, M.H. Sweat and sebum preferences of the human skin microbiota / M.H. Swaney, A. Nelsen, S. Sandstrom et al. // *Microbiol Spectr.* – 2023. – Vol. 11, №1. – P. e0418022.
220. Thomas, S.T. Pathway profiling in *Mycobacterium tuberculosis*: elucidation of cholesterol-derived catabolite and enzymes that catalyze its metabolism / S.T. Thomas, B.C. VanderVen, D.R. Sherman et al. // *J Biol Chem.* – 2011. – Vol. 286, №51. – P. 43668–43678.
221. Ticlla, M.R. The sputum microbiome in pulmonary tuberculosis and its association with disease manifestations: a cross-sectional study / M.R. Ticlla, J. Hella, H. Hiza et al. // *Front Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 633396.
222. Trompette, A. Dietary fiber confers protection against flu by shaping Ly6c-patrolling monocyte hematopoiesis and CD8⁺ T cell metabolism / A. Trompette, E.S. Gollwitzer, C. Pattaroni et al. // *Immunity.* – 2018. – Vol. 48, №5. – P. 992–1005.e8.
223. Trompette, A. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis / A. Trompette, E.S. Gollwitzer, K. Yadava et al. // *Nat Med.* – 2014. – Vol. 20, №2. – P. 159–166.

224. Tunney, M.M. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis / M.M. Tunney, T.R. Field, T.F. Moriarty et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2012. – Vol. 177, №9. – P. 995–1001.
225. Turankar, R.P. Association of non-tuberculous mycobacteria with *Mycobacterium leprae* in environment of leprosy endemic regions in India / R.P. Turankar, V. Singh, H. Gupta et al. // *Infect Genet Evol.* – 2019. – Vol. 72. – P. 191–198.
226. Twigg, H.L. Use of bronchoalveolar lavage to assess the respiratory microbiome: signal in the noise / H.L. Twigg, A. Morris, E. Ghedin et al. // *Lancet Respir Med.* – 2013. – Vol. 1, №5. – P. 354–356.
227. Ueckermann, V. The lung microbiome in HIV-positive patients with active pulmonary tuberculosis / V. Ueckermann, P. Lebre, J. Geldenhuys et al. // *Sci Rep.* – 2022. – Vol. 12, №1. – P. 8975.
228. Ufimtseva, E.G. Drug-tolerant *Mycobacterium tuberculosis* adopt different survival strategies in alveolar macrophages of patients with pulmonary tuberculosis / E.G. Ufimtseva, N.I. Eremeeva // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, №19. – P. 14942.
229. Ulrichs, T. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis / T. Ulrichs, S.H.E. Kaufmann // *J Pathol.* – 2006. – Vol. 208, №2. – P. 261–269.
230. Valdes, A.M. Role of the gut microbiota in nutrition and health / A.M. Valdes, J. Walter, E. Segal et al. // *BMJ.* – 2018. – Vol. 361. – P. 36–44.
231. Valdez-Palomares, F. Altered microbial composition of drug-sensitive and drug-resistant TB patients compared with healthy volunteers / F. Valdez-Palomares, M.M. Torrico, B. Palacios-González et al. // *Microorganisms.* – 2021. – Vol. 9, №8. – P. 1762.
232. Vázquez-Pérez, J.A. Alveolar microbiota profile in patients with human pulmonary tuberculosis and interstitial pneumonia / J.A. Vázquez-Pérez, C.O. Carrillo, M.A. Iñiguez-García et al. // *Microb Pathog.* – 2020. – Vol. 139. – P. 103851.
233. Veldhuizen, R. The role of lipids in pulmonary surfactant / R. Veldhuizen, K. Nag, S. Orgeig et al. // *Biochim Biophys Acta.* – 1998. – Vol. 1408, №2–3. – P. 90–108.

234. Větrovský, T. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses / T. Větrovský, P. Baldrian // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, №2. – P. e57923.
235. Visconti, A. Interplay between the human gut microbiome and host metabolism / A. Visconti, C.I. Le Roy, F. Rosa et al. // *Nat Commun*. – 2019. – Vol. 10, №1. – P. 4505.
236. Volkman, H.E. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium / H.E. Volkman, T.C. Pozos, J. Zheng et al. // *Science*. – 2010. – Vol. 327, №5964. – P. 466–469.
237. von Mutius, E. Farm living: effects on childhood asthma and allergy / E. Von Mutius, D. Vercelli // *Nat Rev Immunol*. – 2010. – Vol. 10, №12. – P. 861–868.
238. Wallner, G. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms / G. Wallner, R. Amann, W. Beisker // *Cytometry*. – 1993. – Vol. 14. – P. 136–143.
239. Wang, X.Q. Gut microbiota as important modulator of metabolism in health and disease / X.Q. Wang, A.H. Zhang, J.H. Miao et al. // *RSC Adv*. – 2018. – Vol. 8, №74. – P. 42380–42389.
240. Werner, J.L. Induction of pulmonary granuloma formation by propionibacterium acnes is regulated by MyD88 and Nox2 / J.L. Werner, S.G. Escolero, T.N. Mak et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol*. – 2017. – Vol. 56, №1. – P. 121–130.
241. Williams, S.J. 5'-adenosinephosphosulfate lies at a metabolic branch point in mycobacteria / S.J. Williams, R.H. Senaratne, J.D. Mougous et al. // *J Biol Chem*. – 2002. – Vol. 277, №36. – P. 32606–32615.
242. Wood, D.E. Improved metagenomic analysis with Kraken 2 / D.E. Wood, J. Lu, B. Langmead // *Genome Biol*. – 2019. – Vol. 20, №1. – P. 257.
243. World Health Organization. Global tuberculosis report 2022 / Geneva, Switzerland: WHO, 2022. – 51 p.
244. Wu, B.G. Episodic aspiration with oral commensals induces a MyD88-dependent, pulmonary T-helper cell type 17 response that mitigates susceptibility to *Streptococcus*

- pneumoniae* / B.G. Wu, I. Sulaiman, J.C.J. Tsay et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2021. – Vol. 203, №9. – P. 1099–1111.
245. Wu, J. Sputum microbiota associated with new, recurrent and treatment failure tuberculosis / J. Wu, W. Liu, L. He et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, №12. – P. e83445.
246. Xia, X. Comparative analysis of the lung microbiota in patients with respiratory infections, tuberculosis, and lung cancer: A preliminary study / X. Xia, J. Chen, Y. Cheng et al. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2022. – Vol. 12. – P. 1024867.
247. Xiao, G. Insights into the unique lung microbiota profile of pulmonary tuberculosis patients using metagenomic Next-Generation Sequencing / G. Xiao, Z. Cai, Q. Guo et al. // *Microbiol Spectr.* – 2022a. – Vol. 10, №1. – P. e0190121.
248. Xiao, T. Comparative respiratory tract microbiome between carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and ventilator associated pneumonia / T. Xiao, Q. Guo, Y. Zhou et al. // *Front Microbiol.* – 2022b. – Vol. 13. – P. 782210.
249. Yadava, K. Microbiota promotes chronic pulmonary inflammation by enhancing IL-17A and autoantibodies / K. Yadava, C. Pattaroni, A.K. Sichelstiel et al. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2016. – Vol. 193, №9. – P. 975–987.
250. Yang, M. A distinct MaoC-like enoyl-CoA hydratase architecture mediates cholesterol catabolism in *Mycobacterium tuberculosis* / M. Yang, K.E. Guja, S.T. Thomas et al. // *ACS Chem Biol.* – 2014. – Vol. 9, №11. – P. 2632–2645.
251. Yassin, A.F. *Corynebacterium ureicelerivorans* sp. nov., a lipophilic bacterium isolated from blood culture / A.F. Yassin // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2007. – Vol. 57, Pt. 6. – P. 1200–1203.
252. Yeoh, Y.K. *Prevotella* species in the human gut is primarily comprised of *Prevotella copri*, *Prevotella stercorea* and related lineages / Y.K. Yeoh, Y. Sun, L.Y.T. Ip et al. // *Sci Rep.* – 2022. – Vol. 12, №1. – P. 9055.
253. Yu, G. Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features / G. Yu, M.H. Gail, D. Consonni et al. // *Genome Biol.* – 2016. – Vol. 17, №1. – P. 163.

254. Yuan, Y. Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* / Y. Yuan, R.E. Lee, G.S. Besra et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1995. – Vol. 92, №14. – P. 6630-6634.
255. Yun, Y. Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture / Y. Yun, G. Srinivas, S. Kuenzel et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, №12. – P. e113466.
256. Zambrano, M.M. Mycobacterial biofilms: a greasy way to hold it together / M.M. Zambrano, R. Kolter // *Cell*. – 2005. – Vol. 123, №5. – P. 762–764.
257. Zhang, H. Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells / H. Zhang, Y. Yin, G. Wang et al. // *Sci Rep*. – 2014. – Vol. 4. – P. 4260.
258. Zhang, M. The microbiota of human lung of pulmonary tuberculosis and the alteration caused by anti-tuberculosis drugs / M. Zhang, L. Shen, X. Zhou et al. // *Curr Microbiol*. – 2022. – Vol. 79, №11. – P. 321.
259. Zheng, D. Interaction between microbiota and immunity in health and disease / D. Zheng, T. Liwinski, E. Elinav // *Cell Res*. – 2020. – Vol. 30, №6. – P. 492–506.
260. Zhou, Y. Correlation between either *Cupriavidus* or *Porphyromonas* and primary pulmonary tuberculosis found by analysing the microbiota in patients' bronchoalveolar lavage fluid / Y. Zhou, F. Lin, Z. Cui et al. // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, №5. – P. e0124194.

Приложение А

Таблица А – Обзор оригинальных исследований, посвящённых микробиоте лёгких при ТБ у людей, опубликовано автором в обзорной статье [Орлова и др., 2024с]

Источник	Тип образцов (количество)		Метод анализа	Доминантная микробиота при ТБ	Таксоны, значимо отличающиеся по численности при ТБ	Основные выводы исследования
	ТБ	Контроль				
Cui et al., 2012	Мокрота (31)	Образцы ротоглотки (24)	16S рРНК	Pseudomonadota (<i>Phenylobacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Cupriavidus</i> , <i>Pseudomonas</i>), Actinomycetota, Crenarchaeota	↑ <i>Sphingomonas</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Diaphorobacter</i> , <i>Mobilicoccus</i> , <i>Brevibacillus</i>	При ТБ микробиота мокроты более разнообразна, в ней встречаются многие чужеродные бактерии
Cheung et al., 2013	Мокрота (22)	Мокрота (14)	16S рРНК	Bacillota (<i>Streptococcus</i>), Pseudomonadota (<i>Neisseria</i>), Bacteroidota (<i>Prevotella</i>), Actinomycetota (<i>Actinomyces</i>), Fusobacteriota (<i>Fusobacterium</i> , <i>Leptotrichia</i>)	↑ Pseudomonadota, Bacteroidota, <i>Mogibacterium</i> , <i>Moryella</i> , <i>Oribacterium</i>	МБТ представляет очень небольшую относительную численность микробиоты. Разнообразие микробиоты одинаково у здоровых доноров и ТБ-пациентов
Wu et al., 2013	Мокрота (75)	Образцы ротоглотки (20)	16S рРНК	Bacillota (<i>Streptococcus</i> , <i>Gramulicatella</i>), Pseudomonadota (<i>Pseudomonas</i>)	↑ <i>Pseudomonas</i>	У больных рецидивирующим ТБ и у пациентов с неудачным лечением часто выделяются <i>Pseudomonas</i> , снижены частота и обилие других бактериальных родов
Botero et al., 2014	Назальные пробы, образцы ротоглотки и мокроты (6)	Назальные пробы, образцы ротоглотки и мокроты (6)	16S рРНК	Bacillota, Bacteroidota, Pseudomonadota, Actinomycetota, Fusobacteriota	↑ <i>Streptococcaceae</i>	Разнообразие микробиоты одинаково у здоровых доноров и ТБ-пациентов по составу, но различается по относительной численности и индексам разнообразия. Бактериальное разнообразие выше в образцах мокроты, а грибковое – в назальных пробах

Zhou et al., 2015	БАЛ (32)	Слюна (24)	16S рПНК	Pseudomonadota (<i>Cupriavidus</i> , <i>Acinetobacter</i>), Actinomycetota (<i>Mycobacterium</i>), Bacteroidota (<i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i>)	↑ <i>Mycobacterium</i> , <i>Porphyromonas</i>	<i>Cupriavidus</i> играет важную роль во вторичной ТБ-инфекции. <i>Porphyromonas</i> могут вносить вклад в поражение лёгких
Krishna et al., 2016	Мокрота (25)	Мокрота (16)	16S рПНК	Pseudomonadota (<i>Neisseria</i>), Bacillota (<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i>), Fusobacteriota, Actinomycetota, Bacteroidota	↑ <i>Corynebacterium</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Rothia mucilaginosa</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Veillonella dispar</i> , <i>Lautropia</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i>	При ТБ значительно выше относительная численность типов Bacillota и Actinomycetota, доминирующие роды – <i>Streptococcus</i> , <i>Neisseria</i> и <i>Veillonella</i>
Николаян и др., 2018	Мокрота (196), плевральная жидкость (36)	Не проводилось	Культивирование	В мокроте: <i>Streptococcus pyogenes</i> (<i>haemolyticus</i>), <i>Enterococcus</i> , <i>Candida</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> . В плевральной жидкости: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> (<i>haemolyticus</i>), <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Не проводилось	При лекарственно-устойчивом ТБ из мокроты чаще высеваются грибы рода <i>Candida</i> , стрептококки и возбудители семейства энтеробактерий. При лекарственно-чувствительном ТБ из всех видов биологического материала высеваются грибы рода <i>Candida</i>
Nakhaee et al., 2018	БАЛ (10)	БАЛ (5)	Культивирование	Bacillota (<i>Streptococcus</i>), Pseudomonadota (<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>)	↑ <i>Streptococcus</i>	При ТБ распространённость рода <i>Streptococcus</i> выше. На Th1-ответ при ТБ могут оказывать влияние <i>Neisseria</i> и <i>Haemophilus</i>
Vázquez-Pérez et al., 2020	БАЛ (6)	БАЛ (10)	16S рПНК	Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota, Actinomycetota, Fusobacteriota, Cyanobacteriota	↑ Pseudomonadota, Bacillota ↓↓ <i>Streptococcus</i> Только при ТБ встречаются <i>Lactococcus</i> и <i>Leuconostoc</i>	При ТБ снижено микробное биоразнообразие. Значительно снижена численность <i>Streptococcus</i> , увеличена численность МБТ

Hu et al., 2020a	БАЛ (6 МБТ ⁺)	БАЛ (6 МБТ ⁻)	Shotgun, 16S рРНК	Actinomycetota (<i>Mycobacterium</i> , <i>Rothia</i> , <i>Actinomyces</i>), Bacillota (<i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>), Pseudomonadota (<i>Pseudomonas</i>), Bacteroidota, Fusobacteriota	↑ Actinomycetota, в особенности <i>Mycobacterium</i> ↓ Bacillota, Bacteroidota	У пациентов с МБТ ⁺ снижено α-разнообразие микробиоты, есть существенная разница в β-разнообразии. Сообщества МБТ ⁺ и МБТ ⁻ имеют разные функциональные особенности (в метагеномах пациентов с МБТ ⁺ значительно снижено количество генов в путях метаболизма пентозофосфата и пурина). Секвенирование гена 16S рРНК недопредставляет МБТ и является не лучшим способом изучения микробиома, связанного с ТБ
Hu et al., 2020b	БАЛ (12)	Не проводилось	16S рРНК	Bacillota	↑ <i>Mycobacterium</i> , <i>Bacillaceae</i> , в особенности <i>Anoxybacillus</i>	При ТБ у пациентов с МБТ ⁺ значительно снижено α-разнообразие лёгочной микробиоты по сравнению с МБТ ⁻ мазками. При этом МБТ представляет небольшую относительную численность микробиоты
Sala et al., 2020	Мокрота (30)	Мокрота (30)	16S рРНК	Actinomycetota, Bacteroidota, Bacillota, Fusobacteriota, Pseudomonadota	Не выявлено	Не выявлены общие закономерности между образцами. ПТП не вызывают значительных изменений в разнообразии микробиоты. Доля МБТ немногочисленна из-за ограничений амплификации и секвенирования 16S рРНК микобактерий
Kateete et al., 2021	Мокрота (120)	Не проводилось	16S рРНК	Bacteroidota (<i>Prevotella</i> , <i>Alloprevotella</i> , <i>Porphyromonas</i>), Bacillota (<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Gemella</i>), Pseudomonadota (<i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i>), Fusobacteriota (<i>Fusobacterium</i>), Actinomycetota (<i>Rothia</i>)	Не проводилось	ПТП снижают микробное разнообразие

HaileMariam et al., 2021	Мокрота (72)	Мокрота (54)	16S pPHK	Bacillota (<i>Streptococcus</i>), Pseudomonadota (<i>Haemophilus</i>), Actinomycetota (<i>Rothia</i> , <i>Atopobium</i>)	↑ <i>Haemophilus</i> ↓ <i>Rothia</i>	Не выявлены различия α-разнообразия. При ТБ меньше относительная численность рода <i>Rothia</i> , который является комменсалом дыхательных путей и может быть чувствителен к воспалительной среде, вызванной инфекцией МБТ
Valdez-Palomares et al., 2021	Мокрота (39)	Мокрота (6)	16S pPHK	Bacillota (<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i>), Bacteroidota (<i>Prevotella</i>), Pseudomonadota (<i>Neisseria</i> , <i>Moraxella</i>), Fusobacteriota, Actinomycetota	↑ <i>Ralstonia</i> , <i>Moraxella</i>	При ТБ повышено микробное разнообразие и дифференциальное обилие бактерий
Ding et al., 2021	БАЛ (101)	Не проводилось	Shotgun	Pseudomonadota, Bacillota, Bacteroidota, Actinomycetota	↑ <i>S. aureus</i>	Обилие МБТ отрицательно коррелирует с сывороточной концентрацией альбумина и общего белка, положительно коррелирует с уровнем нейтрофилов
Ticlla et al., 2021	Мокрота (334)	Не проводилось	16S pPHK, Shotgun	Bacillota (<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i>), Pseudomonadota (<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Lautropia</i>), Bacteroidota (<i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i>), Fusobacteriota (<i>Fusobacterium</i>), Actinomycetota (<i>Rothia</i>), Saccharibacteria, Spirochaetes, Gracilibacteria, Absconditabacteria, Tenericutes	↑ <i>Campylobacter</i>	При ТБ наблюдается обратная корреляция между <i>Streptococcus</i> и анаэробами <i>Selenomonas</i> и <i>Fusobacterium</i>

Xiao et al., 2022a	БАЛ (38)	БАЛ, образцы ротоглотки (15)	Shotgun	Pseudomonadota (<i>K. pneumoniae</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>), Bacillota (<i>S. aureus</i>)	↑ <i>S. aureus</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>	При ТБ снижено микробное разнообразие. ПТП изменяют микробиоту лёгких: снижается доля <i>S. aureus</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>E. coli</i> и <i>N. gonorrhoeae</i> ; увеличивается доля <i>Prevotella melaninogenica</i> , <i>P. jejuni</i> , <i>Ralstonia pickettii</i> , <i>Neisseria subflava</i> , <i>Prevotella intermedia</i>
Ueckermann et al., 2022	Мокрота, БАЛ (20 коинфекция ВИЧ-ТБ)	Мокрота, БАЛ (51 ВИЧ ⁺ , МБТ ⁻)	16S рПНК	Pseudomonadota (<i>Burkholderiaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Neisseriaceae</i>), Bacillota (<i>Lachnospiraceae</i> , <i>Veilonellaceae</i> , <i>Peptostreptococcaceae</i> , <i>Staphylococcaceae</i>), Actinomycetota (<i>Micrococcaceae</i> , <i>Microbacteriaceae</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Actinomycetaceae</i>), Bacteroidota (<i>Prevotellaceae</i>)	↑ <i>Achromobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i>	При ТБ снижено микробное биоразнообразие и наблюдается дисбиоз
Zhang et al., 2022	БАЛ (23)	БАЛ (13)	16S рПНК	Bacteroidota, Bacillota, Pseudomonadota, Actinomycetota	↑ Pseudomonadota, Actinomycetota, Acidobacteria, Chloroflexi, AD3	При ТБ изменения в микробиоте незначительны: значимо повышено только β-разнообразие. ПТП значительно снижают состав, разнообразие и структуру микробиоты лёгких
Xia et al., 2022	БАЛ (21)	БАЛ (57: пациенты с раком лёгкого (8) и пневмонией (49))	16S рПНК	Bacillota, Bacteroidota, Pseudomonadota, Actinomycetota, Fusobacteriota	↑ <i>Mycobacterium</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leptotrichia</i> , <i>Campylobacter</i>	При ТБ в жидкости БАЛ повышаются уровни цитокинов, которые коррелируют с ключевыми обнаруженными бактериями

Дружинин и др., 2023	Мокрота (14)	Мокрота (14)	16S рРНК	Firmicutes, Bacteroidetes	↓ Fusobacteriota, TM7, Tenericutes, Spirochaetes, <i>Dialister</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Filifactor</i>	Нет различий в видовом богатстве или β-разнообразии, снижение индекса равномерности при ТБ
----------------------	--------------	--------------	----------	---------------------------	--	--

Примечание. С учётом значительных различий в экспериментальных условиях представленных исследований, в группу ТБ включены МБТ⁺ пациенты, не получавшие лечение (если не указано иное), при этом пациенты с ЛТБИ исключены. Контрольную группу по возможности составили здоровые лица, однако в некоторых работах она включает ВИЧ⁺ пациентов или лиц с другими респираторными инфекциями, не связанными с ТБ. Условные обозначения: ↑ – численность таксона увеличена, ↓ – численность таксона уменьшена, ↓↓ – численность таксона значительно уменьшена, ПТП – противотуберкулёзные препараты, Shotgun – секвенирование метагенома «методом дробовика».

Приложение Б

Таблица Б – Результаты компьютерной томографии, патогистологических заключений, общего и биохимического анализов крови пациентов с ТБ, анализируемые в ходе изучения микробиома туберкулём (1-й этап исследования)

№	Размер очага, мм	Бактерио-выделение	Кальци-наты	Дополни-тельные очаги	Инфильтра-ция очага, тип клеток	ОАК											Биохимический анализ крови			
						Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Эозинофилы, %	Базофилы, %	Палочкоядерные нейтрофилы, %	Сегментоядерные нейтрофилы, %	Моноциты, %	Лимфоциты, %	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	СОЭ, мм/ч	Общий белок, г/л	Билирубин, мкмоль/л	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л
6	13×22	п/а	п/а	да	нет	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а
8	п/а	п/а	п/а	нет	нет	4,8	148	10,8 ↑	16 ↑	0	3	53	4	24	544 ↑	5	67	10,7	5,1	86
9	8×8	п/а	да	п/а	нет	п/а	п/а	4,6	1	0	1	55	3	40	225	3	63	10,8	п/а	100
777	14×16	нет	да	нет	Лимфоциты, макрофаги	4,6	140	4,8	6 ↑	0	3	42	8	41 ↑	350	10	70	17,2	5	57 ↓
1010	18×19 12×12	нет	нет	да	нет	4,4	137	12,3 ↑	0	0	1	79 ↑	3	17 ↓	355	5	65	19,2	4	69
1124	27×27	да	да	да	Лимфоциты	3,8	142	7,1	3	1	1	69	7	19	327	19	68	9,3	2,7	46 ↓
1197	34×34	да	да	да	Лейкоциты, лимфоциты	4,5	145	4,3	3	0	1	54	6	36	327	3	64 ↓	7,9 ↓	3,8	73
1198	17×21	нет	нет	п/а	нет	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а
1647	28×26	нет	да	да	нет	4,2	132	5,1	1	0	3	50	6	40 ↑	249	3	80	13,8	6,8	83
1731	46×38	нет	нет	да	Лимфоциты	4,7	146	10,5 ↑	4	0	1	53	8	34	289	1	57 ↓	16,8	6,1	92
1742	28×28 2,4×2,4	да	да	да	нет	4,3	135	10,5 ↑	2	0	1	31 ↓	7	31	433 ↑	22 ↑	57 ↓	8,5	3,2	87
1828	13x13	да	нет	да	Нейтрофилы, лимфоциты	5,3	161	8,9 ↑	3	0	1	54	7	35	516 ↑	10	65	12,9	3,7	80
1881	20×30	п/а	да	да	нет	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а
1882	25×25	нет	да	да	нет	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а
10169	10×10 40×40 28×28	нет	да	да	нет	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а

2202	21×13	п/а	да	да	Лимфоциты	4,8	154	4,2	2	0	1	50	8 ↑	39	245	20	70	10,1	2,8	80
2204	19×12	да	нет	да	нет	4,3	132	3,6	2	0	3	51	9	35	226	7	78	16,1	4,4	74
2206	22×16	нет	нет	да	нет	3,9	130	3,3	12	0	1	36 ↓	7	44 ↑	158	13	69	7,8	4,3	46 ↓
2208	33×43	нет	нет	да	нет	4,2	135	7,0	2	0	2	47	8	41 ↑	231	6	63	11,2	4,4	63

Примечание: п/а – данные отсутствуют; стрелками отмечены отклонения от референсных значений.

Приложение В

Таблица В – Результаты исследований биоматериала на МБТ, патогистологических заключений, общего и биохимического анализов крови пациентов с ТБ, анализируемые в ходе изучения Т-клеточного иммунитета (2-й этап исследования)

№	Бактерио-выделение	МБТ в очаге	Кальци наты	Инфильтрация очага, тип клеток	ОАК											Биохимический анализ крови			
					Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Эозинофилы, %	Базофилы, %	Палочкоядерные нейтрофилы, %	Сегментоядерные нейтрофилы, %	Моноциты, %	Лимфоциты, %	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	СОЭ, мм/ч	Общий белок, г/л	Билирубин, мкмоль/л	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л
23-28	нет	1-10	нет	Лимфоциты	4,4	155	14,8 ↑	0	0	7 ↑	81 ↑	6	6 ↓	215	7	66	12,4	4,5	77
23-29	нет	1-10	нет	Лейкоциты	5	164	26,8 ↑	0	0	16 ↑	78 ↑	2	4 ↓	255	3	77	10,8	4,6	78
23-30	нет	нет	да	нет	4,1	147	6,6	8 ↑	1	0	57	8	26	170	4	65	24 ↑	3	140 ↑
23-31	нет	4-9	да	Лимфоциты	3,7	123	4,7	1	0	2	60	6	31	190	28 ↑	71	26,3 ↑	5,5	136 ↑
23-32	нет	>10	n/a	n/a	5,1	154	13,4 ↑	0	1	1	82 ↑	6	10 ↓	229	10	68	11,9	7,8	70
23-33	да	n/a	да	Лейкоциты	4,4	130	17 ↑	0	0	9 ↑	87 ↑	2	2 ↓	277	10	68	7,2 ↓	5	73
23-34	да	4-9	да	Лимфоциты, макрофаги	4,8	150	9	7 ↑	0	2	57	6	28	227	13	70	12,3	5,9	81
23-36	да	нет	n/a	n/a	4,9	155	5,2	5	0	1	43	8	43 ↑	191	3	62 ↓	10,8	6	65
23-37	нет	нет	нет	нет	5,4 ↑	95 ↓	8,4	3	0	0	60	5	31	455 ↑	11	69	6,2 ↓	4,7	76
23-38	да	нет	нет	Лимфоциты	3,6	111	3,3 ↓	2	1	2	41	4	50	263	13	62 ↓	6,6 ↓	7	132 ↑
23-39	да	нет	нет	Лимфоциты	3,8	113 ↓	7,6	0	1	7 ↑	76 ↑	6	10 ↓	189	6	59 ↓	28,2 ↑	5,2	74
23-к1	да	n/a	n/a	n/a	4,3	142	4,5	0	1	0	30 ↓	11 ↑	58 ↑	258	8	75	14,5	4,9	70
23-к2	да	нет	да	нет	3,7 ↓	131	13,2 ↑	3	0	0	55	7	35	297	22 ↑	51 ↓	8 ↓	10,2 ↑	107 ↑
23-к3	нет	10-99	да	Лимфоциты	5	150	5,4	8 ↑	1	0	44	3	44 ↑	179	2	71	13	8,2	72
23-к4	нет	нет	n/a	n/a	3,9 ↓	145	5,5	9 ↑	0	0	53	8	30	255	14	59 ↓	12,3	3,6	55 ↓

Примечание: n/a – данные отсутствуют; стрелками отмечены отклонения от референсных значений.

Приложение Г

Таблица Г – Сравнение клинических показателей ТБ-пациентов с высоким и умеренным выбросом IFN-γ в ответ на обработку клеток крови антигенами МБТ, *C. kefirresidentii*, *S. epidermidis* 2206/1 и *S. epidermidis* 2206/2

Клинический показатель	Уровень IFN-γ на антигены МБТ			Уровень IFN-γ на антигены <i>C. kefirresidentii</i>			Уровень IFN-γ на антигены <i>S. epidermidis</i> 2206/1			Уровень IFN-γ на антигены <i>S. epidermidis</i> 2206/2		
	< 100 пг/мл <i>n</i> = 9	≥ 100 пг/мл <i>n</i> = 6	<i>p</i>	< 100 пг/мл <i>n</i> = 7	≥ 100 пг/мл <i>n</i> = 8	<i>p</i>	< 100 пг/мл <i>n</i> = 9	≥ 100 пг/мл <i>n</i> = 6	<i>p</i>	< 100 пг/мл <i>n</i> = 8	≥ 100 пг/мл <i>n</i> = 7	<i>p</i>
Бактерио-выделение, да/нет	4/5	3/3	0,83 ^a	4/3	3/5	0,81 ^a	5/4	2/4	0,75 ^a	4/4	3/4	0,78 ^a
МБТ в операционном материале, да/нет	3/6	3/1	0,43 ^a	3/4	3/3	0,8 ^a	3/6	3/1	0,43 ^a	2/6	4/1	0,17 ^a
Кальцинаты, да/нет	2/4	4/1	0,35 ^a	2/2	4/3	0,82 ^a	3/4	3/1	0,69 ^a	1/4	5/1	0,14 ^a
Лейкоцитарная инфильтрация ТБ очага, да/нет	4/2	4/1	0,62 ^a	3/1	5/2	0,9 ^a	5/1	3/1	0,9 ^a	3/2	5/1	0,85 ^a
Эритроциты, 10 ¹² /л	3,9 [3,7; 5,1]	4,4 [4,3; 4,9]	0,63 ^b	4,8 [3,7; 5]	4,4 [3,9; 4,9]	0,95 ^b	3,9 [3,7; 5,0]	4,4 [4,3; 5]	0,35 ^b	4,4 [3,7; 5,1]	4,4 [4,1; 4,8]	0,95 ^b
Гемоглобин, г/л	131 [112; 154,5]	148,5 [139; 151,3]	0,41 ^b	150 [131; 155]	136 [115,5; 149,3]	0,22 ^b	131 [112; 152,5]	148,5 [139; 154,3]	0,32 ^b	138 [111,5; 154,8]	147 [130; 150]	0,73 ^b
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,6 [5; 13,3]	7,8 [5,2; 15,4]	0,77 ^b	9 [5,2; 13,4]	7,1 [4,9; 13,2]	0,77 ^b	7,6 [5,0; 11,1]	10 [5,2; 15,4]	0,6 ^b	8 [5,3; 13,4]	6,6 [4,7; 14,8]	0,86 ^b
Эозинофилы,%	1 [0; 3]	3,5 [0; 8]	0,49 ^b	2 [0; 5]	0,5 [0; 6,8]	0,99 ^b	2 [0; 4]	0 [0; 8]	0,76 ^b	1 [0; 3]	1 [0; 8]	0,5 ^b
Базофилы,%	0 [0; 1]	0,5 [0; 1]	0,58 ^b	0 [0; 1]	0,5 [0; 1]	0,45 ^b	0 [0; 0,5]	1 [0; 1]	0,11 ^b	0 [0; 1]	0 [0; 1]	0,89 ^b
Нейтрофилы палочкоядерные, %	1 [0; 4,5]	1 [0; 7,5]	0,95 ^b	1 [0; 2]	1 [0; 7]	0,95 ^b	2 [0; 4,5]	0,5 [0; 7,5]	0,71 ^b	1 [0; 5,8]	2 [0; 7]	0,95 ^b
Нейтрофилы сегментоядерные,	60 [48; 77]	57 [40,5; 82,5]	0,95 ^b	55 [43; 78]	60 [47,3; 79,8]	0,48 ^b	57 [48; 68]	69 [40,5; 83,3]	0,48 ^b	57,5 [45,5; 81]	57 [44; 81]	0,91 ^b

%										77,5]		
Моноциты,%	6 [4,5; 7,5]	6 [2,8; 8,8]	0,99 ^b	6 [4; 8]	6 [3,5; 7,5]	0,81 ^b	6 [4,5; 7,5]	6 [2,8; 8,75]	0,99 ^b	6 [4,3; 7,8]	6 [3; 8]	0,98 ^b
Лимфоциты,%	31 [10; 39]	27 [5; 47,5]	0,77 ^b	30 [10; 43]	28,5 [7; 40,8]	0,82 ^b	31 [19; 39]	18 [5; 47,5]	0,55 ^b	30,5 [10; 41]	28 [6; 44]	0,91 ^b
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	255 [190,5; 280]	221 [176,8; 262,8]	0,38 ^b	255 [227; 263]	202,5 [181,5; 272,3]	0,33 ^b	255 [190,5; 280]	222 [176,8; 262,8]	0,44 ^b	255 [200,5; 288,5]	215 [179; 258]	0,18 ^b
СОЭ, мм/ч	11 [4,5; 18]	7,5 [3,5; 10,8]	0,26 ^b	13 [3; 14]	7,5 [4,5; 10,8]	0,42 ^b	13 [4,5; 18]	7,5 [3,5; 10]	0,14 ^b	10,5 [3,8; 13,8]	8 [4; 13]	0,77 ^b
Общий белок, г/л	62 [59; 70]	69 [65,8; 72]	0,21 ^b	62 [59; 70]	68,5 [65,3; 71]	0,32 ^b	62 [59; 70,5]	68 [65,8; 72]	0,34 ^b	62 [59; 68,8]	70 [66; 71]	0,08 ^b
Билирубин, мкмоль/л	10,8 [7,3; 19,3]	12,7 [11; 16,9]	0,29 ^b	10,8 [8; 12,3]	13,75 [8,5; 25,7]	0,09 ^b	10,8 [7,3; 19,3]	12,7 [10,7; 16,9]	0,38 ^b	10,8 [6,95; 12,2]	13 [12,3; 24]	0,02 ^b
Мочевина, ммоль/л	5,5 [4,7; 7,4]	5 [4,1; 6,5]	0,44 ^b	6 [4,6; 7,8]	4,95 [4,6; 5,4]	0,22 ^b	5,5 [4,7; 6,5]	4,95 [4,1; 7,9]	0,68 ^b	5,6 [4,6; 7,6]	5 [4,5; 5,9]	0,52 ^b
Креатинин, мкмоль/л	76 [67,5; 119,5]	75 [71,5; 95,8]	0,91 ^b	78 [65; 107]	75 [72,3; 121,3]	0,73 ^b	78 [69,5; 119,5]	72,5 [70; 92,8]	0,52 ^b	75 [66,3; 99,8]	77 [72; 136]	0,42 ^b

Примечание: а – уровень значимости критерия χ^2 Пирсона, б – уровень значимости U -критерия Манна-Уитни.