



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.10.3.008>



Старовойтова А.С.¹ ✉, Улезко Е.А.¹, Стома И.О.²

¹ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

² Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Микробиом верхних дыхательных путей у новорожденных – интеграция в клиническую практику

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Старовойтова А.С. – обзор литературы, концепция; Улезко Е.А. – редактирование, концепция и дизайн исследования; Стома И.О. – концепция и дизайн исследования, редактирование.

Подана: 31.08.2022

Принята: 26.09.2022

Контакты: truhananastas@yandex.by

Резюме

На протяжении последних двух тысячелетий микробное сообщество организма человека признавали фундаментальным фактором, определяющим физиологию и патологию хозяина. Данный обзор представляет критический анализ результатов исследований микробиома верхних дыхательных путей в педиатрической практике. Отражены актуальные сведения зарубежной и отечественной литературы о микробиоценозе у новорожденных и детей раннего возраста. Рассмотрены этапы формирования микробиоты дыхательных путей в различные периоды детского возраста. Особое внимание уделено набору генов микроорганизмов, который обеспечивает устойчивость к противомикробным препаратам. Таким образом, сегодня одним из наиболее перспективных направлений исследований в медицине является изучение набора генов, ответственных за формирование микробиоты различных локализаций. Исследование микробиома у новорожденных детей позволит реализовать принципы профилактики, персонификации, предиктивности как основные направления современной высокотехнологичной медицины у пациентов данной группы.

Ключевые слова: микробиом, резистом, новорожденные, младенцы, недоношенные, способ родоразрешения, антибиотикорезистентность

Staravoitava A.¹ ✉, Ulezko E.¹, Stoma I.²

¹ Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child", Minsk, Belarus

² Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

The Microbiome of the Upper Respiratory Tract in Newborns – Integration into Clinical Practice

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Staravoitava A. – literature review, concept; Ulezko E. – editing, study concept and design; Stoma I. – study concept and design, editing.

Submitted: 31.08.2022

Accepted: 26.09.2022

Contacts: truhananastas@yandex.by

Abstract

Over the past two millennia, the microbial community of the human body has been recognized as a fundamental factor determining the physiology and pathology of the host. This review presents a critical analysis of upper airway microbiome research findings in paediatric practice. The current information of foreign and domestic literature on microbiocenosis in newborns and young children is reported. Stages of formation of the microbiota of the respiratory tract in various periods of childhood are reviewed. Particular attention is paid to the set of microbial genes providing resistance to antimicrobial drugs. Thus, one of the most promising fields of research in today's medicine is the investigation of a set of genes responsible for the formation of microbiota of various localizations. Microbiome analysis would allow the implementation of principles of prevention, personalization, and predictability as the main directions of modern high-tech medicine.

Keywords: microbiome, resistome, newborns, infants, premature babies, method of delivery, antibiotic resistance

■ ВВЕДЕНИЕ

Особой вехой в науке и медицине стали работы по секвенированию генома. Новые открытия позволили осознать, что человек – не только результат своих собственных генов. Для полного понимания генетических основ функционирования индивидуума важно секвенировать геномы бактерий человека – из верхних и нижних дыхательных путей, а также кожных покровов. К началу XXI века для исследования микробной популяции кишечника впервые применили метод секвенирования генов 16S рибосомальной РНК (16S рРНК) [6, 12]. Ген, кодирующий 16S рРНК, стал идеальным маркером для идентификации микроорганизмов. Этот ген присутствует в геноме всех бактерий, но отсутствует у эукариот и вирусов, имеет как консервативные участки, одинаковые у всех прокариот, так и видоспецифичные. Нуклеотидные последовательности 16S рРНК всех известных бактерий в настоящее время общедоступны и отражены в генном банке (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) [1, 2, 5, 6].

■ ЦЕЛЬ РАБОТЫ

На основании анализа данных литературы оценить особенности и определить закономерности формирования микробиома верхних дыхательных путей в педиатрической практике.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск по базам данных проведен среди материалов, опубликованных до 20.08.2022. Первоначально использована стандартная стратегия поиска Cochrane Neonatal для отбора статей из баз данных Кохрановского центрального регистра контролируемых исследований, MEDLINE через PubMed, EMBASE и CINAHL. Кроме того, был проведен поиск в базах данных клинических испытаний, материалах конференций и списках ссылок найденных статей в отношении рандомизированных контролируемых исследований.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проект микробиома человека

Проект микробиома человека (ПМЧ) – инициатива исследовательской программы Национального института здравоохранения США, главной целью которой стало улучшение понимания характеристик микробиоты, связанной со здоровьем и заболеваниями человека. Первая фаза программы, начатая в 2008 году, представляла собой проект длительностью в 5 лет, позволивший выявить объем и базовые характеристики микробиоты человека. Вторая фаза, известная как интегрированный «Проект микробиома человека», была запущена в 2014 году с целью объединения ресурсов для выяснения роли микробов в поддержании здоровья человека и развитии заболеваний. Осуществляется путем изучения микробиоты некультуральными методами оценки, в частности метагеномики, а также секвенирования гена 16S рРНК бактерий микробиоты [6, 12].

Терминология

Ключевые термины, используемые в современных научных исследованиях микробиома человека, представлены в таблице.

Основная терминология при изучении микробиома человека [12]
Basic terminology regarding research on the human microbiome [12]

Термин	Раскрытие содержания термина
Микробиота	Набор микроорганизмов определенной локализации
Микробиом	Набор микроорганизмов, их генов и факторов внешней среды определенной локализации
Метатранскриптомика	Процесс определения и характеристики микробных генов, экспрессируемых микробиотой
Плотность микробиома	Общее количество бактерий в биологическом образце
Исследование гена 16S рРНК	Анализ последовательности гена 16S рибосомной РНК в экстрактах тотальной ДНК; данные используются для разработки профилей состава микробного сообщества

Особенности микробиома верхних дыхательных путей у недоношенных новорожденных

Разработка некультуральных методов идентификации микроорганизмов и снижение затрат на платформы секвенирования позволили интенсифицировать исследования в этой области, получить выводы, применяющиеся в клинической практике, и расширить представление о заболеваниях человека [13].

К 2010 году в связи с широким внедрением некультуральных методов исследования микроорганизмов произошла смена парадигмы «микробы – дыхательная система». Догма «здоровые легкие» ушла в прошлое. Основные постулаты о респираторном микробиоме в настоящее время заключаются в следующем:

- 1) здоровые нижние дыхательные пути содержат бактерии, отличающиеся от бактерий верхних дыхательных путей;
- 2) дыхательные пути пациентов с респираторными заболеваниями содержат микробные сообщества, отличающиеся от таковых у здоровых новорожденных.

В недавней публикации исследователи продемонстрировали потенциальные эффекты процесса колонизации плода микроорганизмами, начиная с эмбрионального периода [14], а также интенсификацию этого процесса заселения микробами сразу после рождения, в основном за счет материнских бактерий, среди которых преобладают представители влагалищной и кишечной микробиоты. Более того, мы уже ранее отмечали, что данный процесс заселения резко различается у детей, рожденных естественным путем и с помощью кесарева сечения [15, 16].

Состав микробиома легких определяется балансом трех факторов: микробной иммиграции в дыхательные пути, элиминации микробов из дыхательных путей и состояния местного роста воспроизводства представителей микробного сообщества, определяемых местными условиями.

Полость носа заселена относительно простым набором бактерий с небольшими различиями в составе между детьми и взрослыми. Представители *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* spp. являются первичными колонизаторами полости носа и сохраняют свое доминирование до взрослого возраста, когда к ним часто присоединяется род *Moraxella*. Профили микробиоты носа у детей сильно варьируют в зависимости от сезона, причем осенью/зимой часто преобладают *Proteobacteria* и *Fusobacteria*.

Микробиом носоглотки достаточно динамическая экосистема, претерпевающая изменения и дифференцировку в процессе взросления, что может продолжаться до 2 лет, резко отличаясь от микробиома взрослых. Первоначально носоглотка заселяется представителями *Corynebacterium* и *Staphylococcus* spp., а впоследствии дополняется родом грамположительных бактерий *Dolosigranulum* (особенно характерно для детей, находящихся на грудном вскармливании), родами *Alloiococcus* и *Moraxella*.

Ротоглотка является анатомическим барьером между дыхательными путями и желудочно-кишечным трактом, что приводит к наличию в ней наиболее вариативной бактериальной экосистемы. Верхние дыхательные пути – экологическая ниша для патобионтов: *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *S. aureus*. До 93% детей до 2 лет колонизированы одним из патобионтов на уровне верхних дыхательных путей даже при оценке классическими культуральными методами. Что определяет их как классических резидентных участников микробиома верхних дыхательных путей. Двойственная роль патобионтов в развитии респираторных заболеваний заключается в том, что,

с одной стороны, колонизация патобионтов является фактором риска инфекции, а с другой – является необязательным фактором инфекции, и даже предполагается, что обеспечивает устойчивость к приобретению новых патогенных штаммов.

Определено, что у пациентов с пневмонией отмечается более высокая плотность бактерий в нижних дыхательных путях в сочетании с меньшим разнообразием и равномерностью распределения видов. Как правило, резко доминирует один таксон с наибольшей частотой доминирования *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Moraxella* spp. У пациентов с более высоким содержанием в микробиоме кишечника бактерий, продуцирующих бутират (ингибиторная короткоцепочечная жирная кислота), снижен риск развития вирусных инфекций нижних дыхательных путей.

В первые сутки жизни у новорожденного происходит смена микробного пейзажа от переменного комбинированного микробиологического состава к профилю с преобладанием *Streptococcus viridans*. В раннем неонатальном периоде у детей наблюдается дифференциация состава носоглотки. Вначале преобладает *Staphylococcus aureus*, в дальнейшем наблюдается дифференциация с превалированием *Dolosigranulum pigrum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum/propinquum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis/nonliquefaciens* или *Haemophilus influenzae*. Младенцы, рожденные путем кесарева сечения, отстают в развитии профиля респираторной микробиоты, что отражается в сокращении *Corynebacterium* и *Dolosigranulum*. Согласно исследованиям М. Hilty, легкие являются стерильными, а бактериальная ДНК обнаруживается только в образцах из респираторного тракта [9]. Однако установлено, что пребывание ребенка на аппарате искусственной вентиляции легких приводит к образованию бактериальных биопленок вследствие контаминации интубационной трубки патогенной или условно-патогенной микрофлорой [4].

Самым разнообразным признан состав биоценоза слизистых оболочек зева (смешение микрофлоры полости рта и воздухоносных путей): *Neisseriaceae*, *Streptococcus* spp., негемолитические (зеленящие) стрептококки, *Enterococcaceae*, *Mollicutes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Moraxellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Borrelia*, *Treponema*, *Actinobacteridae*. В верхних дыхательных путях по количественному составу основное место занимают *Neisseriaceae* и *Streptococcus* spp., реже *Staphylococcus epidermidis*, *Borrelia*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacteroidaceae* [3, 7, 8, 10, 11].

В момент прохождения плода через родовые пути происходит контаминация слизистой оболочки ротоглотки новорожденного. К середине первых суток после родов к составу микрофлоры полости рта присоединяются *Streptococcus pyogenes* [3].

Караулов А.В., Афанасьев С.С. утверждали об оценке «колонизационной резистентности» открытых полостей организма как о способности микрофлоры и макроорганизма защищать экосистему слизистых от патогенных микроорганизмов. Авторы показали, что биоцидные и биостатические продукты секретов, ингибиторы микробной адгезии, механические факторы (мерцательный эпителий, целостность кожи и слизистых), местные факторы врожденного и адаптивного иммунитета определяют колонизационную резистентность микроорганизмов. В терминологию микробиологии было введено понятие «феномена колонизационной резистентности», определяющего сущность влияния микробиоценозов слизистых открытых полостей и мукозального иммунитета как интегральной структурно-функциональной системы организма [3, 8, 9].

Роль микробиома в созревании иммунной системы и калибровке иммунного ответа

Подобно тому, как это происходит с микробиомом кишечника и кожи, ранняя колонизация микробами верхних дыхательных путей ребенка играет важную роль в созревании иммунной системы и калибровке иммунного ответа, что было отражено в исследованиях, где у стерильных мышей наблюдались высокий уровень эозинофилии в дыхательных путях и накопление инвариантных NK-клеток (натуральных киллеров), что не встречалось у колонизированных микробами мышей [17–19].

Нельзя забывать о том, что инвариантные естественные киллеры, известные как классические NKT-клетки, или NKT I типа, – это популяция Т-лимфоцитов, которые экспрессируют инвариантные $\alpha\beta$ Т-клеточный рецептор и определенные молекулы, общие с NK-клетками. Хотя iNKT редко встречаются в периферической крови, составляя всего 0,001–1% мононуклеарных клеток крови, они являются важными иммунорегулирующими элементами, производящими большие количества цитокинов, влияющих на все остальные клетки иммунной системы.

Пути преодоления формирования молекулярного типа антибиотикорезистентности у недоношенных новорожденных, основанные на изучении микробиома

Устойчивые к антибиотикам бактерии сегодня являются основной угрозой мировой медицины. Тем более что гены устойчивости к антибиотикам распространены не только среди возбудителей инфекций, но и среди человеческой популяции комменсальных бактерий микробиома. Одно из первых исследований показало, что значительная часть анаэробного сообщества в микробиоме здоровых людей устойчива к одному или нескольким антибиотикам, причем доля таких бактерий значительно увеличивается после лечения антибиотиками [20]. Применение антибиотиков способствует накоплению генов антибиотикорезистентности.

Удивительным фактом является то, что гены антибиотикорезистентности были идентифицированы в микробиоме мумии из XI века, в замороженном осадке 30000-летнего возраста, а также в пещере в Нью-Мехико, которая была изолирована в течение миллионов лет [21–23]. Более того, как последовательности ДНК, так и структурная организация оперонов генов, идентифицированных в этих древних бактериях, оказались очень похожими на те, которые переносятся в настоящее время устойчивыми микробами. Таким образом, резистом – совокупность всех генов устойчивости к антибиотикам в пределах микробиома. Определяется резистом в среднем ко 2-му месяцу жизни [24].

Интересный факт: механизмы горизонтального переноса генов применяются бактериями на фоне лечения антибиотиками (конъюгация, трансдукция и трансформация) [25–27].

Повсеместность распространения обоих явлений: с одной стороны – способность отдельных микроорганизмов синтезировать антибиотики, с другой – обладать резистентностью к ним, обусловлена тем, что антибиотики в концентрациях, встречающихся в природных экосистемах, играют роль внутриклеточных сигнальных молекул, регулирующих транскрипцию генов. Изменение реакции бактериального коммуникативного сообщества на определенный сигнал, вызванное приобретением или, наоборот, утратой антибиотикорезистентности, приводит к образованию новых

экотопов. В эволюции антибиотикорезистентности плазмиды и конъюгативные транспозоны выполняют функцию генетических платформ, на которых посредством рекомбинационных систем бактерий происходит сборка и сортировка генов антибиотикорезистентности, включенных в транспозоны, интегроны, генные кассеты и инсерционные криптические последовательности.

Формирование резистентных к антибиотикам биопленок – основная стратегия противодействия грамотрицательных бактерий стрептомицетам. Приобретение резистентности к какому-либо антибиотику ведет к изменению реакции бактерии на определенный сигнал. Антибиотикорезистентные мутанты бактерий, так же как и исходные чувствительные штаммы, реагируют на данный антибиотик. Но набор транскриптов у них иной, чем у исходных штаммов. Спонтанное приобретение резистентности к тем или иным антибиотикам способствует образованию других бактериальных экотипов.

Древность генетических механизмов биосинтеза антибиотиков предполагает наличие не менее древних генетических механизмов защиты от них. Распространение генов антибиотикорезистентности между бактериями происходит благодаря активности мобильных генетических элементов. Их два типа: генетические элементы, которые могут самостоятельно перемещаться между бактериями (конъюгативные плазмиды и конъюгативные транспозоны); и генетические элементы, перемещающиеся в пределах бактериальной клетки (по хромосоме, от хромосомы к плазмиде и наоборот: транспозоны, генные кассеты, интегроны и др.). Плазмиды и конъюгативные транспозоны являются своеобразной платформой, на которой посредством различных рекомбинационных систем бактериальной клетки происходит сборка и сортировка генов антибиотикорезистентности.

Мобильные генетические элементы участвовали в переносе генов резистентности к антибиотикам между бактериями еще до внедрения антибиотиков в клиническую практику. Описан штамм кишечной палочки, выделенной до 1937 года, содержащий плазмиду (R-фактор), определяющую устойчивость к тетрациклину и стрептомицину.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Состав микробного сообщества в дыхательных путях в раннем детстве связан с последствиями развития респираторной патологии у детей более старшего возраста. Понимание процессов, которые приводят к нарушениям респираторного микробиома и, как следствие, к повышенной восприимчивости и тяжелому течению заболеваний респираторного тракта, будет способствовать разработке новых методов диагностики, определения вероятности и лечения данной патологии.

Нельзя забывать и о проблеме антибиотикорезистентности среди клинически значимых микроорганизмов, которая уходит своими корнями в сложные экологические и эволюционные отношения между самими микроорганизмами, сложившиеся задолго до появления человека как биологического вида. Огромный потенциал генов антибиотикорезистентности накоплен в суперинтегронах, еще не вовлеченных в генетический обмен среди встречающихся в клинике микроорганизмов. Интерпретация же широкого распространения в клинике антибиотикорезистентных штаммов бактерий как явления, вызванного исключительно применением антибиотиков, сильно упрощает понимание данной проблемы и порождает иллюзию возможности

ее решения путем ограничения использования антибиотиков в клинической практике.

Целесообразно расширять круг исследуемых проблем, связанных с распространением антибиотикорезистентных патогенных микроорганизмов в клинике, включив в него процессы накопления и обмена генов антибиотикорезистентности среди бактерий.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ankirskaya A., Prilepskaya V., Bayramova G., Muravyeva V. Bacterial vaginosis: clinical course features, diagnosis and treatment. *Breast cancer*. 1998;5:276–282. (in Russian)
2. Astafyeva N., Kobzev D., Gamova I., Perfilova I., Udovichenko E., Skuchaeva L., Mikhailova I. The role of the microbiome of the respiratory tract in respiratory health. *The attending physician*. 2019;5:88. (in Russian)
3. Zakharova I., Kuchina A. Microbiota of breast milk (presentation, sources, role of bacteria for the child and mother). *Medical advice*. 2022;16(1). (in Russian)
4. Nikolaeva I., Tsaregorodtsev A., Shaikhieva G. Formation of the intestinal microbiota of a child and factors influencing this process. *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2018;63(3):13–18. (in Russian)
5. Pustotina O., Seliverstov A. The influence of the microbiome of breast milk on the health of the mother and newborn. *Medical advice*. 2019;13:36–40. (in Russian)
6. Sidorova I. Microbiocenosis of the genital tract of women of reproductive age. *Obstetrics and gynecology*. 2005;2:7–9.
7. Jost T., Lacroix C., Braegger C., Chassard C. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *British Journal of Nutrition*. 2013;110(7):1253–1262.
8. Karaulov A., Afanasyev S., Aleshkin V. Microflora, colonization mucosal resistance and mucosal immunity. *Immunologia*. 2015;36(5):290–295. (in Russian)
9. Karaulov A., Aleshkin V., Voropaeva E. Colonization resistance indicators of oropharynx mucous membrane: objective criteria of mucosal immunity at bronchitis in children. *Immunologia*. 2012;33(5):255–259. (in Russian)
10. Metelskaya V., Alyoshkin V., Voropaeva E. Colonization resistance and immunological reactivity of children's oropharyngeal mucosa in health and bronchopulmonary pathology. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk*. 2010;7:10–15. (in Russian)
11. Zverev V., Boichenko M. (eds.) *Medical microbiology, virology and immunology: a textbook. Volume 1*. Moscow: GEOTAR-Media. 2010;448. (in Russian)
12. Stoma I. *Microbiome in medicine: a guide for doctors*. Moscow: GEOTAR-Media, 2020;320.
13. Lawani M.B., Morris A. The respiratory microbiome of HIV-infected individuals. *Expert Rev. Antiinfect. Ther*. 2017;15(7):703–711.
14. Stensballe L.G. Use of antibiotics during pregnancy increases the risk of asthma in early childhood. *J.Pediatr*. 2013;162(4):832–838.e3
15. Dominguez-Bello M.G. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010;107(26):11971–11975.
16. Dominguez-Bello M.G. Partial restoration of the microbiota of cesareanborn infants via vaginal microbial transfer. *Nat. Med*. 2016;22(3):250–253.
17. Guyatt G.H. Users' guides to the medical literature. A method for grading health care recommendations. Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA*. 1995;274(22):1800–1804.
18. Murad M.H. New evidence pyramid. *BMJ Evid. Based Med*. 2016;21(4):125–127.
19. Rondatelli M. Review on microbiota and effectiveness of probiotics use in older. *World J.Clin.Cases*. 2015;3(2):156–162.
20. Levy S.B. High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1988;32(12):1801–1806.
21. D'Costa V.M. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477(7365):457–461.
22. Santiago-Rodriguez T.M. Gut microbiome of an 11 th century A.D. pre-Columbian Andean mummy. *PLoS One*. 2015;10(9).
23. Bhullar K. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 2012;7(4).
24. Moore A.M. Gut resistome development in healthy twin pairs in the first year of life. *Microbiome*. 2015;3(27).
25. Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*. 2004;427(6969):72–74.
26. Slager J. Antibiotic-induced replication stress triggers bacterial competence by increasing gene dosage near the origin. *Cell*. 2014;157(2):395–406.
27. Modi S.R. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. 2013;499(7457):219–222.