

<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.4.023>
УДК 579.61:[616.34+616.6]:616.36-004



Малаева Е.Г. ✉, Воропаев Е.В., Стома И.О.

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Биоразнообразие микробиоты кишечника и уробиоты при циррозе печени

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Малаева Е.Г. – сбор данных, анализ и интерпретация результатов, подготовка статьи; Воропаев Е.В. – анализ и интерпретация результатов, редактирование статьи; Стома И.О. – концепция и дизайн исследования, окончательное одобрение варианта статьи для опубликования.

Подана: 01.12.2022

Принята: 12.12.2022

Контакты: dr-malaeva@mail.ru

Резюме

Цель. Изучить микробное разнообразие кала и мочи у пациентов с циррозом печени в зависимости от степени тяжести и краткосрочного прогноза заболевания.

Материалы и методы. Проведено стандартное обсервационное исследование и метагеномное секвенирование кала и мочи 30 госпитализированных пациентов с циррозом печени. Для описания результатов использованы стандартные методы описательной статистики. В качестве индексов биоразнообразия использованы индексы Шеннона, Симпсона, Chao1. Анализ бета-разнообразия осуществлялся с помощью метода главных координат (PCoA), в качестве меры расстояния выбран индекс Брея – Кертиса. Для анализа значимости различий между группами применялся перестановочный многомерный дисперсионный анализ (PERMANOVA). Уровень значимости α принят равным 0,05.

Результаты. У пациентов с циррозом печени, независимо от стадии заболевания и 30-дневной выживаемости, микробиота кишечника представлена доминирующими филотипами бактерий Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria. К таксонам, медиана относительного разнообразия которых в моче пациентов с циррозом превышает 0,5%, относятся Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Tenericutes. Филотип Armatimonadetes в большем изобилии представлен у пациентов с декомпенсированным циррозом и 30-дневной летальностью ($p < 0,05$). Установлены ассоциации плотности таксонов Proteobacteria, Fusobacteria, Tenericutes, Planctomycetes, Cyanobacteria, Armatimonadetes в фекальной микробиоте пациентов с краткосрочной выживаемостью ($p < 0,05$). Микробиота мочи у пациентов с 30-дневной летальностью по сравнению с пациентами, которые продолжают лечение, обогащена таксонами Fusobacteria ($8,57 \times 10^{-4}$ и $1,85 \times 10^{-5}$, $p = 0,016$) и Tenericutes ($0,12$ и $2,11 \times 10^{-4}$, $p = 0,048$). Бета-разнообразие микробиоты мочевыводящих путей имеет различия у живых и умерших пациентов с циррозом, значимость несходства достоверна ($p = 0,017$).

Выводы. У пациентов с циррозом печени установлены ассоциации биоразнообразия микробиоты кишечника и уробиоты со стадией заболевания (компенсации/декомпенсации) и показателем 30-дневной летальности.

Ключевые слова: микробиота, уробиота, микробное разнообразие

Ekaterina G. Malaeva ✉, Evgeny V. Voropaev, Igor O. Stoma
Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Biodiversity of Gut Microbiota and Urobiota in Liver Cirrhosis

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: data collection, analysis and interpretation of the results, preparation of the article – Malaeva E.; analysis and interpretation of the results, editing of the article – Voropaev E., concept and design of the study, final approval of the version of the article for publication – Stoma I.

Submitted: 01.12.2022

Accepted: 12.12.2022

Contacts: dr-malaeva@mail.ru

Abstract

Purpose. To study the microbial diversity of feces and urine in patients with liver cirrhosis, depending on the severity and short-term prognosis of the disease.

Materials and methods. A standard observational study and metagenomic sequencing of feces and urine of 30 hospitalized patients with liver cirrhosis were performed. Standard methods of descriptive statistics were used to describe the results. The indices of Shannon, Simpson, and Chao1 were used as biodiversity indices. Beta diversity was analyzed using the Principal Coordinates method (PCoA), the Bray – Curtis index was chosen as a distance measure. Permutation multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was used to analyze the significance of differences between groups. The significance level α is assumed to be 0.05.

Results and discussion. In patients with liver cirrhosis, regardless of the stage of the disease and 30-day survival, the gut microbiota is represented by the dominant phylum of bacteria Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria. The taxa whose median relative diversity in the urine of patients with cirrhosis exceeds 0.5% include Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Tenericutes. The phylum Armatimonadetes is more abundant in patients with decompensated cirrhosis and 30-day mortality ($p < 0.05$). Associations of the density of taxa Proteobacteria, Fusobacteria, Tenericutes, Planctomycetes, Cyanobacteria and Armatimonadetes phylum were established in the fecal microbiota of patients with short-term survival ($p < 0.05$). The urine microbiota in patients with 30-day mortality compared with patients who continue treatment is enriched with Fusobacteria (8.57×10^{-4} and 1.85×10^{-5} , $p = 0.016$) and Tenericutes (0.12 and 2.11×10^{-4} , $p = 0.048$) taxa. The beta diversity of the urinary tract microbiota has differences in alive and died patients with cirrhosis, the significance of the dissimilarity is significant ($p = 0.017$).

Conclusions. In patients with liver cirrhosis associations of the biodiversity of the gut microbiota and urobiota with the stage of the disease (compensation/decompensation) and 30-day mortality level were established.

Keywords: microbiota, urobiota, microbial diversity

■ ВВЕДЕНИЕ

Параллельно с появлением новых знаний о микробиоме и его регуляции возрастает количество публикаций, которые связывают микробиом кишечника с заболеваниями печени [1–4].

В многочисленных исследованиях, проведенных в разных странах мира, у пациентов с циррозом печени (ЦП) описаны специфические изменения фекальной микробиоты, которые преимущественно характеризуются уменьшением потенциально полезных таксонов, таких как *Lachnospiraceae* и *Ruminococaceae*, синтезирующих короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК) и вторичные желчные кислоты из первичных, и увеличением патогенных *Enterobacteriaceae*, ассоциированных с выработкой эндотоксина (липополисахарида). Исследования продемонстрировали связь не только бактериальной, но и грибковой флоры с естественным течением цирроза, что подтверждается снижением как бактериального, так и грибкового разнообразия с прогрессированием декомпенсации заболевания. Дисбаланс микробиоты может приводить к нарушению целостности эпителиального барьера кишечника и способствовать бактериальной транслокации, развитию бактериальных инфекций и системного воспалительного ответа. При прогрессировании цирроза у пациентов наблюдается развитие печеночной и внепеченочной органной недостаточности. Осложнения ЦП, такие как печеночная энцефалопатия и бактериальные инфекции, потенциально могут быть связаны с изменениями микробиома в оси кишечник – печень, в том числе за счет изменения метаболического профиля микроорганизмов [2, 3].

Учитывая лежащую в основе связь микробиоты кишечника с тяжестью цирроза, исследования были направлены на изучение микробного состава кишечника как прогностического маркера при ЦП. Например, обогащение фекальной микробиоты микроорганизмами рода *Veillonella* и *Klebsiella* у пациентов с декомпенсированным циррозом было ассоциировано с неблагоприятным прогнозом. *Veillonella* относится к грамотрицательным анаэробным коккам, которые составляют часть здоровой флоры полости рта и пищевода. Недавно микроорганизмы этого рода обнаружены в кишечнике у пациентов с декомпенсированным ЦП, и предполагается их транслокация из ротовой полости в нижние отделы желудочно-кишечного тракта [2]. В одноцентровом исследовании у госпитализированных пациентов с циррозом микробный состав кишечника был связан с развитием органной и острой-на-хроническую печеночной недостаточности и 30-дневной летальностью [1]. Опубликованы работы об ассоциации кишечного микробиома и дисбиоза с долгосрочным прогнозом при циррозе [2].

Исследователями были предложены коэффициенты дисбактериоза при ЦП, которые используют упрощенный подход с расчетом показателя «хорошие» против «плохих» бактерий, например, *Firmicutes/Bacteroidetes*, которые характеризуются достоверностью и стабильностью с течением времени. В одном из исследований было показано, что у амбулаторных пациентов с ЦП состав микробиоты кала и слюнных желез связан с риском 90-дневной госпитализации независимо от клинических показателей. Эти данные были уточнены изучением соотношения грибкового компонента *Ascomycota* к бактериальному *Bacteroidetes* [5]. Так как *Proteobacteria* и *Bacilli* связаны с бактериальной транслокацией и развитием вторичных инфекций, учеными предложена модифицированная формула $\text{Bacilli (\%)} + \text{Proteobacteria (\%)} / [\text{Clostridia (\%)} + \text{Bacteroidetes (\%)}]$ для определения дисбиоза [2].

Проводилось изучение взаимосвязи между микробиотой кишечника и показателями прогностических шкал при циррозе, такими как MELD (model for end-stage liver disease score) и Child – Pugh. По результатам таких исследований установлены прямые (положительные) корреляционные связи прогностических шкал с потенциально патогенными бактериальными таксонами и обратные (отрицательные) – с проксимальными микроорганизмами [1].

Следует отметить, что изменение микробного разнообразия и пейзажа происходит не только в кале у пациентов с ЦП, но и в других органах, тканях и биологических жидкостях – печени, сыворотке, слюне, асцитической жидкости [1]. Не опубликовано исследований по изучению микробного разнообразия мочи у пациентов с ЦП в зависимости от тяжести заболевания и прогноза, в связи с чем наш проект является пилотным.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить микробное разнообразие кала и мочи у пациентов с ЦП в зависимости от степени тяжести и краткосрочного прогноза заболевания.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Взрослые пациенты, госпитализированные в отделение гастроэнтерологии ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница № 3» (Республика Беларусь) с установленным диагнозом «цирроз печени» в 2022 году, были включены в протокол сбора и низкотемпературного замораживания образцов кала и мочи. Протокол исследования одобрен этическим комитетом УО «Гомельский государственный медицинский университет» (протокол № 4 от 30.09.2021). Исследование зарегистрировано в Clinicaltrials.gov (NCT05335213).

Проведено обсервационное одномоментное исследование 30 госпитализированных пациентов с компенсированным (n=9) и декомпенсированным (n=21) ЦП, из которых 7 пациентов имели летальный исход заболевания в период от 1 до 30 дней с момента включения в исследование. Критерии включения: возраст пациентов старше 18 лет, установленный диагноз ЦП на основании клинических, лабораторных, инструментальных и/или морфологических данных. Критерии исключения: прием антибактериальных лекарственных средств за 1 месяц до исследования, наличие аутоиммунных, онкологических заболеваний, СПИД, трансплантация органов.

Выполнено метагеномное секвенирование 30 образцов кала и 12 образцов мочи. Сбор биоматериала для метагеномного секвенирования проводился утром в специальные сухие стерильные флаконы, при сборе образцов кала использовали одноразовые стерильные лопатки. Транспортировка образцов в лабораторию осуществлялась в течение 1–2 часов после забора биоматериала, в транспортном контейнере поддерживалась температура +2 – +8 °C. Хранение образцов кала и мочи осуществлялось при температуре до –80 °C. Разморозка образцов кала и мочи для экстракции ДНК для метагеномного секвенирования проводилась при комнатной температуре [6].

Высокопроизводительное секвенирование проводилось при помощи генетического анализатора MiSeq (Illumina, США) с использованием протокола, основанного на анализе переменных регионов гена 16S рРНК. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения BaseSpace Sequence Hub (Illumina, США), приложение 16S Metagenomics и приложение DRAGEN Metagenomics (с

использованием алгоритма Kraken2). Удаление последовательностей праймеров производилось на основании использования сервиса Preprocess 16S (<https://github.com/masikol/preprocess16S>), низкокачественных прочтений – Trimmomatic. Расчет статистических показателей осуществлялся с помощью среды программирования для статистической обработки данных R (версия 4.2.1) с применением библиотеки tidyverse (version 1.3.1) и пакетов rstatix (version 0.7.0), HMP (version 2.0.1), DESeq2 (version 1.37.4), ANCOMBC (version 1.99.1), ggpubr (version 0.4.0), phyloseq (version 1.41.0), datawizard (version 0.4.1), microbiome (version 1.19.0), vegan (version 2.6-2).

Для описания результатов применяли стандартные методы описательной статистики. Анализ различия состава микробиома между группами осуществлялся с применением различных методов: теста Манна – Уитни с предварительным преобразованием данных методом CLR-преобразования (Centered log ratio transform); дифференциального анализа экспрессии генов на основе отрицательного биномиального распределения (DESeq2); анализа составов микробиома с коррекцией смещения (ANCOM-BC). Анализ различия пропорционального состава микробиома между группами осуществлялся с помощью полиномиального моделирования Дирихле (Likelihood-Ratio-Test Statistics: Several Sample Dirichlet-Multinomial Test Comparison).

В качестве индексов биоразнообразия использованы индексы Шеннона, Симпсона, Chao1. Анализ бета-разнообразия осуществлялся с помощью метода главных координат (PCoA), в качестве меры расстояния выбран индекс Брея – Кертиса. Для анализа значимости различий между группами применялся перестановочный многомерный дисперсионный анализ (PERMANOVA). Уровень значимости α принят равным 0,05.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование включено 16 мужчин и 14 женщин, средний возраст пациентов составил 51,9 года. Из них у 18 – ЦП алкогольной, 5 – неуточненной, 7 – смешанной (HCV + алкоголь) этиологии. Пациенты распределены на группы: A1 – компенсированный ЦП, A2 – декомпенсированный ЦП, B1 – продолжают лечение, B2 – умерли в течение 30 дней с момента включения в исследование (табл. 1).

Сравниваемые группы были сопоставимы по полу и возрасту, диетическим привычкам и уровню физической активности.

У пациентов с компенсированным и декомпенсированным ЦП изучалась микробиота кала, у пациентов с разным краткосрочным прогнозом заболевания – микробиота кала и мочи.

Фекальная микробиота у пациентов с компенсированным и декомпенсированным ЦП. У пациентов с ЦП, независимо от наличия декомпенсации заболевания, микробиота кишечника представлена доминирующими филотипами бактерий – Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, что соответствует данным опубликованных исследований [1–4]. Значимых различий по их изобилию у пациентов с компенсированным и декомпенсированным циррозом не обнаружено. Однако выявлены изменения в содержании других таксонов, в частности некультивируемых Armatimonadetes. Следует обратить внимание на то, что у пациентов с декомпенсированным циррозом изобилие бактерий этого филотипа достоверно выше, чем при компенсированной стадии заболевания (–0,79, 95% ДИ –1,83, –0,50 и –3,02, 95% ДИ –3,13, –1,80 соответственно, $p=0,007$) (рис. 1).

Таблица 1
Клинические и демографические базовые характеристики пациентов с циррозом печени
Table 1
Clinical and demographic basic characteristics of patients with liver cirrhosis

Параметры (для количественных – Me)	Группы			
	A1, n=9	A2, n=21	B1, n=23	B2, n=7
Пол, м/ж	4/5	12/9	15/8	1/6
Возраст, лет	57,7	49,4	51,7	52,4
Общий билирубин, мкмоль/л	22,5	118,6	71,9	148,7
Альбумин, г/л	35,5	27,1	31,6	24,7
Протромбиновый индекс	80,2	62,1	70,3	55,4
Мочевина, ммоль/л	6,3	8,5	6,1	13,1
Креатинин, мкмоль/л	88,2	94,8	86,0	114
ПЭ, стадия I–II/III–IV	9/0	14/7	19/4	4/3
Асцит, –/+	9/0	4/17	13/10	0/7
Кровотечение ВРВП, –/+	9/0	17/4	20/3	6/1

Так как большое количество микроорганизмов стало известно только после внедрения методов метагеномного секвенирования, их функции в организме человека изучены недостаточно. Возможно, *Armatimonadetes* участвует в анаэробной деградации пептидогликанов и синтезе метана, а также метаболизме азота [7, 8]. Метаногены производят метан в качестве побочного продукта в анаэробных условиях, будучи способными использовать его для метилирования других молекул, таких как тяжелые металлы, и таким образом производят токсичные метаболиты для клеток человека и бактерий, что может приводить к прогрессированию заболеваний печени. Однако их роль как патогенов еще не до конца установлена.

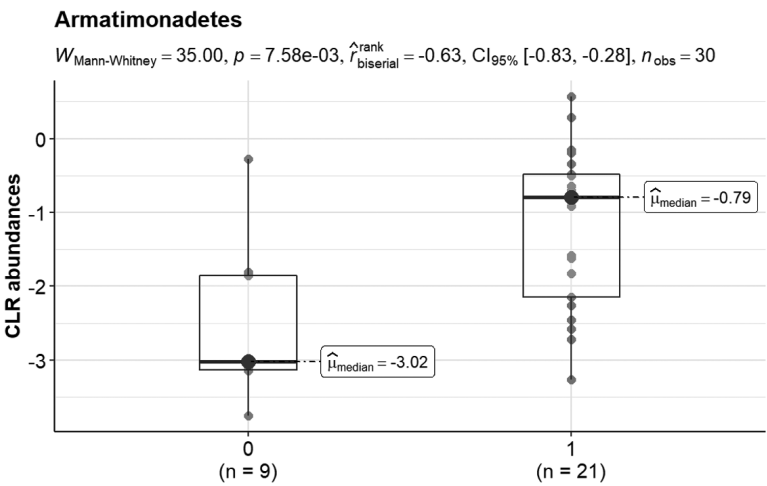


Рис. 1. Плотность филопита *Armatimonadetes* у пациентов с компенсированным (n=9) и декомпенсированным (n=21) циррозом печени
Fig. 1. Abundance *Armatimonadetes* in patients with compensated (n=9) and decompensated (n=21) liver cirrhosis



Таблица 2

Классы бактериальных таксонов кишечника с достоверным различием у пациентов с компенсированным и декомпенсированным циррозом

Table 2

Classes of gut bacterial taxa with a significant difference in patients with compensated and decompensated cirrhosis

Phylum	Class	Компенсированный ЦП Me (LQ; UQ)	Декомпенсированный ЦП Me (LQ; UQ)	P
Armatimonadetes	Chthonomonadetes	-2,70 (-2,87; -2,30)	-1,76 (-2,58; -0,80)	0,044
Chloroflexi	Ardenticatenia	-2,69 (-2,86; -1,57)	-1,29 (-2,22; -0,85)	0,044
Actinobacteria	Nitriliruptoria	-0,05 (-0,31; 0,16)	-0,66 (-2,73; -0,24)	0,031

Несмотря на отсутствие достоверных различий по содержанию большинства филотипов бактерий кишечника, у пациентов с ЦП изучаемых групп выявлены статистически значимые изменения плотности некоторых классов, порядков, семейств, родов и видов оперативных таксономических единиц. Например, анализ классов микробиоты кишечника у пациентов с компенсированным и декомпенсированным циррозом показал различия в содержании Armatimonadetes Chthonomonadetes, Chloroflexi Ardenticatenia, Actinobacteria Nitriliruptoria (табл. 2).

Предполагается, что бактерии класса Chloroflexi Ardenticatenia способны к целому ряду физиологических процессов, включая аэробное дыхание и восстановление железа, денитрификацию с помощью новой редуктазы оксида азота. Некультивируемые популяции бактерий филотипов Actinobacteria, Chloroflexi участвуют в ряде биохимических процессов, таких как восстановление сульфатов и окисление сульфидов [9].

Вполне объяснимо, что бактерии Actinobacteria Nitriliruptoria в большем изобилии присутствуют в кишечнике у пациентов с компенсированным ЦП, так как они обладают специфическими механизмами, такими как приток и отток K⁺, синтез бетаина, который обладает гепатопротективным эффектом за счет активации метаболического метилирования в печени и эктоина, стабилизирующего белковые молекулы и клеточные мембраны [10].

У пациентов с компенсированным и декомпенсированным ЦП отсутствовали достоверные различия по показателям альфа- и бета-разнообразия фекальной микробиоты ($p > 0,05$).

Фекальная микробиота у пациентов с ЦП в зависимости от краткосрочного прогноза заболевания. Микробиота кишечника у пациентов с разным показателем 30-дневной летальности была представлена теми же доминантными филотипами бактерий (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria), которые описывались ранее (рис. 2).

Несмотря на это, у пациентов сравниваемых групп наблюдались достоверные различия в общем составе микробиома с использованием метода Dirichlet-Multinomial parameter test ($Xdc=21,97$; $p < 0,001$). Далее проведено сравнение двух групп пациентов по каждому таксону непараметрическими тестами (табл. 3).

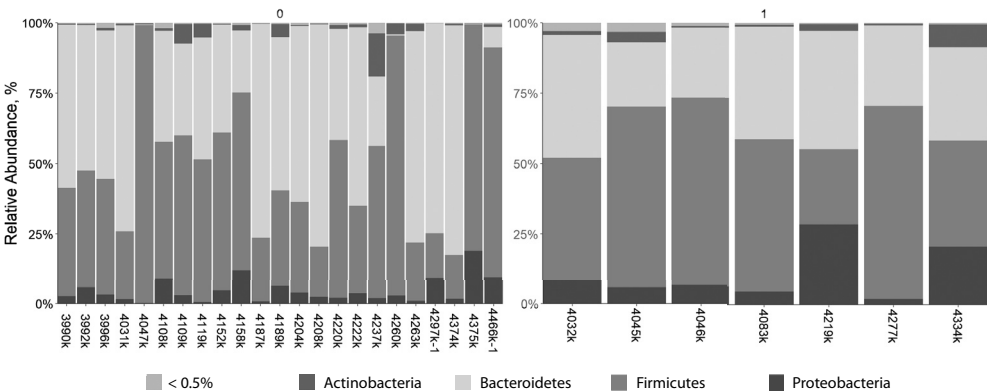


Рис. 2. Распределение таксонов микробиоты кишечника на уровне филотипов у пациентов с циррозом печени, которые продолжают лечение (слева) и умерли в течение 30 дней (справа)
Fig. 2. Abundance of gut microbiota taxa at the phylum level in patients with liver cirrhosis who continue treatment (left) and died within 30 days (right)

У пациентов с ЦП в зависимости от 30-дневной выживаемости установлены достоверные различия в изобилии таких таксонов, как Proteobacteria, Fusobacteria, Tenericutes, Planctomycetes, Cyanobacteria, Armatimonadetes, которые преобладали у лиц с летальным исходом. Как описано выше, филотип Armatimonadetes в большем изобилии представлен у пациентов с декомпенсированным циррозом, что непосредственно связано с прогнозом заболевания. Логичным является преобладание таксона Proteobacteria у пациентов с 30-дневной летальностью, так как бактерии этого таксона могут участвовать в бактериальной транслокации, которая является одним из механизмов развития инфекций и других осложнений у пациентов с циррозом [2].

Таблица 3
Различия микробиома кишечника на уровне филотипов у пациентов с циррозом печени, которые продолжают лечение и умерли в течение 30 дней
Table 3
Differences in gut microbiota at the phylum level in patients with liver cirrhosis who continue treatment and died within 30 days

Phylum	Пациенты с 30-дневной выжи- ваемостью Me (LQ; UQ)	Пациенты с 30-дневной летальностью Me (LQ; UQ)	P
Proteobacteria	0,03 (0,02; 0,06)	0,06 (0,05; 0,14)	0,04
Fusobacteria	$2,59 \times 10^{-5}$ ($8,06 \times 10^{-6}$; $9,13 \times 10^{-5}$)	$3,06 \times 10^{-4}$ ($1,05 \times 10^{-4}$; $9,03 \times 10^{-4}$)	0,02
Tenericutes	$1,67 \times 10^{-4}$ ($1,30 \times 10^{-4}$; $4,26 \times 10^{-4}$)	$5,00 \times 10^{-4}$ ($3,77 \times 10^{-4}$; $8,17 \times 10^{-4}$)	0,03
Planctomycetes	$1,83 \times 10^{-5}$ ($6,83 \times 10^{-6}$; $3,21 \times 10^{-5}$)	$8,14 \times 10^{-5}$ ($5,10 \times 10^{-5}$; $1,01 \times 10^{-4}$)	0,01
Cyanobacteria	$4,42 \times 10^{-5}$ ($2,14 \times 10^{-5}$; $7,97 \times 10^{-5}$)	$1,67 \times 10^{-4}$ ($8,89 \times 10^{-5}$; $2,51 \times 10^{-4}$)	0,008
Armatimonadetes	$6,14 \times 10^{-6}$ (0,00; $1,59 \times 10^{-5}$)	$4,37 \times 10^{-5}$ ($1,59 \times 10^{-5}$; $5,07 \times 10^{-5}$)	0,03

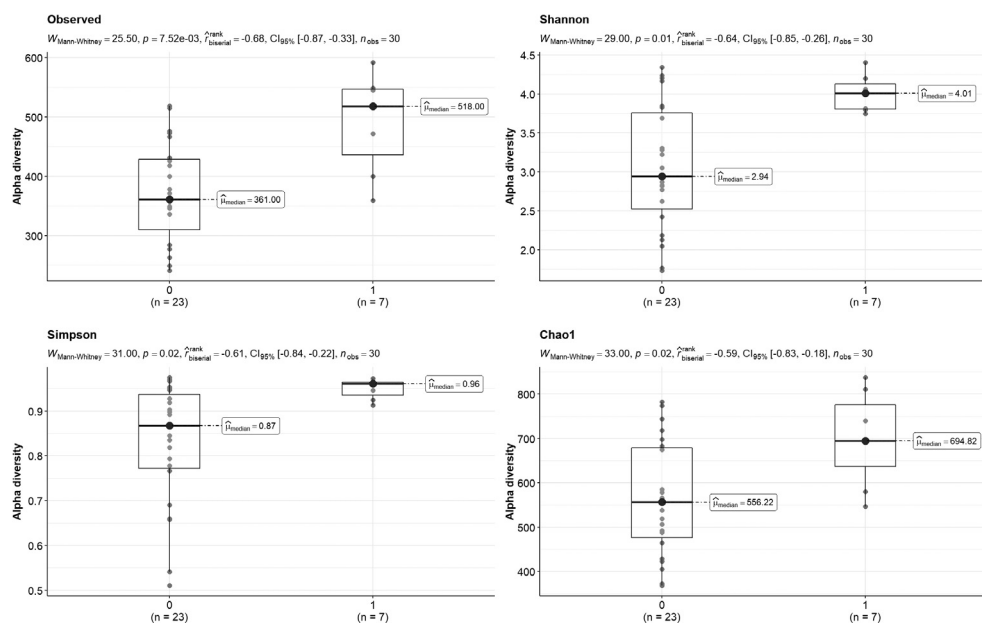


Рис. 3. Альфа-разнообразие, индексы Шеннона, Симпсона, Chao1 микробиоты кала у пациентов с циррозом печени, которые продолжают лечение / умерли в течение 30 дней
Fig. 3. Alpha diversity, Shannon, Simpson, Chao1 indices of fecal microbiota in patients with liver cirrhosis who continue treatment/died within 30 days

По данным исследований, в том числе экспериментальных, известно, что представители фило типа *Cyanobacteria* синтезируют цианотоксины, в частности цилиндроспермопсин, который ингибирует синтез белка, обладает гепатотоксичностью, вызывает некроз клеток печени, а также повреждение почек и эпителиальных клеток кишечника за счет снижения способности к регенерации [11, 12]. Бактерии таксона *Fusobacteria* связывают с прогрессированием колоректального рака, секрецией адгезинов, повреждают ткани, способствуют образованию биопленки [13]. Таким образом, установленные различия в исследуемых группах не являются случайными.

Выявлены значимые различия по всем показателям альфа-разнообразия (индекс Шеннона, Симпсона, Chao1) микробиоты кала у пациентов сравниваемых групп (рис. 3).

Биоразнообразие отражает количество различных видов / действующих таксономических единиц (OTU) бактерий в микробиоме. Важно отметить, что альфа-разнообразие характеризуется разнообразием видов в пределах биологического образца и определяется индексами Chao1, Шеннона, Симпсона. Chao1 является мерой наблюдаемого/скрытого разнообразия, в то время как индекс Шеннона является мерой разнообразия и беглости микробиома, где более высокий индекс соответствует большему разнообразию; индекс Симпсона является мерой доминирования вида в образце [14].

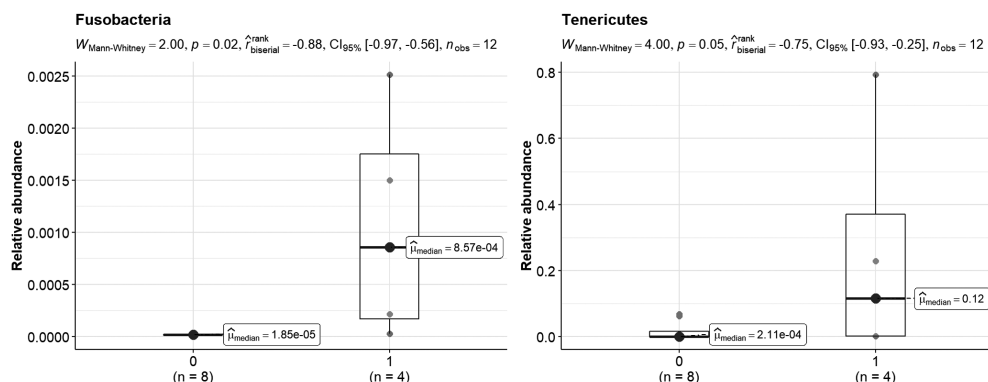


Рис. 4. Плотность филоципов Fusobacteria и Tenericutes в моче у пациентов с циррозом печени, которые продолжают лечение / умерли в течение 30 дней
Fig. 4. Abundance of Fusobacteria and Tenericutes phylum in urine in patients with liver cirrhosis who continue treatment/died within 30 days

Значимость несходства бета-разнообразия микробиоты кала у пациентов с ЦП в зависимости от выживаемости не показала различий ($p > 0.05$).

Уробиота у пациентов с ЦП в зависимости от краткосрочного прогноза заболевания. Большое количество публикаций и исследований при ЦП посвящено изучению фекальной микробиоты. Секвенирование мочи, которое является уникальным исследованием при циррозе, установило наличие доминирующих таксонов – Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Tenericutes.

Пациенты имеют различия по изобилию филоципов Fusobacteria и Tenericutes в моче (рис. 4).

Микробиота мочи у пациентов с 30-дневной летальностью по сравнению с пациентами, которые продолжают лечение, обогащена таксонами Fusobacteria (8.57×10^{-4} и 1.85×10^{-5} , $p = 0.016$) и Tenericutes (0.12 и 2.11×10^{-4} , $p = 0.048$), что коррелирует с данными изучения фекальной микробиоты у этих групп пациентов.

Индексы альфа-разнообразия уробиоты у пациентов с ЦП с разным прогнозом заболевания характеризовались отсутствием значимых различий.

При визуальном изучении с помощью расстояния Брея – Кертиса профиль микробиоты мочи у пациентов с благоприятным/неблагоприятным прогнозом ЦП перекрывался частично (рис. 5).

При дополнительном изучении бета-разнообразия микробиоты мочевыводящих путей у живых и умерших пациентов с циррозом установлены различия, значимость несходства которых подтверждается тестом Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices (PERMANOVA/ADONIS) со значением $p = 0.017$. Показатели бета-разнообразия оценивают несходство между экосистемами, сообщая, в какой степени одно сообщество отличается от другого. Таким образом, паттерн уробиоты пациентов с ЦП с 30-дневной летальностью отличался от пациентов с 30-дневной выживаемостью.

Несмотря на небольшое количество исследований, выявлены тенденции в изменении микробиоты мочевыводящих путей при циррозе, что может быть обусловлено

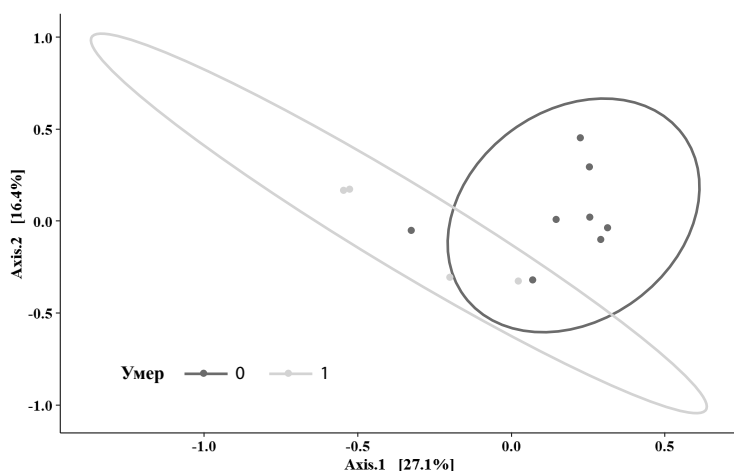


Рис. 5. Бета-разнообразие уробиоты у пациентов с циррозом печени, которые продолжают лечение / умерли в течение 30 дней
Fig. 5. Beta diversity of urobiota in patients with liver cirrhosis who continue treatment/died within 30 days

наличием осей взаимодействия между микробиотой кишечника, мочевыводящих путей и функцией печени [15] и что требует дополнительного изучения.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема биоразнообразия микробиома имеет несомненное клиническое значение, поскольку независимое влияние разнообразия микробиома на клинические исходы у госпитализированных пациентов с ЦП было подтверждено исследованиями [2, 4, 5, 16]. Прогноз и тяжесть заболевания у пациентов с циррозом могут быть связаны с определенными паттернами не только микробиоты кала, что не является удивительным, но и мочи, что установлено в нашем пилотном исследовании. При декомпенсации цирроза и неблагоприятном прогнозе заболевания микробиота кишечника и уробиота претерпевают изменения и обогащаются таксонами Proteobacteria, Armatimonadetes, Cyanobacteria, Fusobacteria, Tenericutes, которые потенциально усугубляют метаболические функции печени, почек, других органов, обладают гепатотоксичными эффектами, стимулируют фиброзообразование, участвуют в бактериальной транслокации и развитии системных воспалительных реакций. Таким образом, установленные ассоциативные связи в нашем исследовании не являются случайными, так как вполне объяснимы с точки зрения биохимических процессов, на которые влияют бактерии или их метаболиты. Большое количество бактерий являются неидентифицированными, и их функции в организме человека остаются неизвестными. Поэтому дальнейшее изучение микробиома будет способствовать пониманию патогенетических механизмов заболеваний, в том числе заболеваний печени, и появлению новых перспективных методов профилактики и лечения.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Albhaisi S.A., Bajaj J.S., Sanyal A.J. Role of gut microbiota in liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2020;318:84–98. doi: 10.1152/ajpgi.00118.2019
2. Maslennikov R., Ivashkin V., Efremova I. Gut dysbiosis is associated with poorer long-term prognosis in cirrhosis. *World J Hepatol.* 2021;13(5):557–570. doi: 10.4254/wjh.v13.i5.557
3. Giannelli V., Di Gregorio V., Iebba V. Microbiota and the gut-liver axis: bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014;20:16795–16810. doi: 10.3748/wjg.v20.i45.16795
4. Sung C.M., Lin Y.F., Chen K.F. Predicting clinical outcomes of cirrhosis patients with hepatic encephalopathy from the fecal microbiome. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;8(2):301–318.e2. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.04.008
5. Bajaj J.S., Betrapally N.S., Hylemon P.B. Gut microbiota alterations can predict hospitalizations in cirrhosis independent of diabetes mellitus. *Sci Rep.* 2015;5:18559. doi: 10.1038/srep18559
6. Byrd D.A., Sinha R., Hoffman K.L. Comparison of methods to collect fecal samples for microbiome studies using whole-genome shotgun metagenomic sequencing. *mSphere.* 2020;5(1):e00827–19. doi: 10.1128/mSphere.00827-19
7. Quaiyum S., Igarashi K., Narihiro T. Microbial community analysis of anaerobic enrichment cultures supplemented with bacterial peptidoglycan as the sole substrate. *Microbes Environ.* 2020;35(3):ME20002. doi: 10.1264/jsme2.ME20002
8. Wang D., Li T., Huang K., He X. Roles and correlations of functional bacteria and genes in the start-up of simultaneous anammox and denitrification system for enhanced nitrogen removal. *Sci Total Environ.* 2019;10(655):1355–1363. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.321
9. Hemp J., Ward L.M., Pace L.A. Draft genome sequence of *Ardenticatena maritima* 110S, a thermophilic nitrate- and iron-reducing member of the *Chloroflexi* class *Ardenticatena*. *Genome Announc.* 2015;3(6):e01347–15. doi: 10.1128/genomeA.01347-15
10. Chen D.D., Tian Y., Jiao J.Y. Comparative genomics analysis of *Nitrospirillum* reveals the genomic differences and salt adaptation strategies. *Extremophiles.* 2020;24(2):249–264. doi: 10.1007/s00792-019-01150-3
11. Adamski M., Wołowski K., Kaminski A., Hindáková A. Cyanotoxin cylindrospermopsin producers and the catalytic decomposition process: a review. *Harmful Algae.* 2020;98:101894. doi: 10.1016/j.hal.2020.101894
12. Chichova M., Tasinov O., Shkodrova M. New data on cylindrospermopsin toxicity. *Toxins (Basel).* 2021;13(1):41. doi: 10.3390/toxins13010041
13. Meng Q., Gao Q., Mehrzarin S. *Susobacterium nucleatum* secretes amyloid-like FadA to enhance pathogenicity. *EMBO Rep.* 2021;22(7):e52891. doi: 10.15252/embr.202152891
14. Stoma I., Uss M., Milanovich N. Biodiversity screening of gut microbiome during the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: data from the real-life clinical practice. *All Life.* 2022;15(1):547–554. doi: 10.1080/26895293.2022.2074546
15. Malaeva E. Urinary tract infections and microbiota. *Health and ecology issues.* 2021;18(3):5–14. doi: 10.51523/2708-6011.2021-18-3-1 (in Russian)
16. Bajaj J.S., Vargas H.E., Reddy K.R. Association between intestinal microbiota collected at hospital admission and outcomes of patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17:756–765.e3. doi: 10.1016/j.cgh.2018.07.022