

© Е.С. Филиппова, И.В. Баженов, А.В. Зырянов, 2020

УДК 615.217.34:616.61-008.222:577.2

DOI 10.21886/2308-6424-2020-8-3-85-96

ISSN 2308-6424



Влияет ли ботулинотерапия на микробиом мочи больных нейрогенным мочевым пузырём? Результаты метагеномного секвенирования

Екатерина С. Филиппова^{1,2}, Игорь В. Баженов^{1,2}, Александр В. Зырянов^{1,2}¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3

²ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница №1»

620102, Россия, г. Екатеринбург, ул. Волгоградская, д. 185

Введение. Реорганизация микробиома мочи больных нейрогенным мочевым пузырём играет важную роль в патогенезе инфекции мочевыводящих путей (ИМП). Сведения о составе мочевого микробиома при нейрогенной дисфункции нижних мочевыводящих путей (НДНМП) ограничены, в частности, неизвестно, как на него влияют различные виды терапии НДНМП.

Цель исследования. Оценить влияние инъекций ботулинического токсина на микробиом мочи больных НДНМП.

Материалы и методы. Образцы мочи были взяты у шести пациентов с НДНМП (четырёх женщин и двух мужчин) до введения 200 ЕД ботулинического токсина типа А в стенку мочевого пузыря и через 6 недель после. Образцы исследовали методом микроскопии, выполняли посев на микробиологические среды, а также метагеномное 16S рРНК секвенирование. С использованием платформы Illumina MiSeq получено, в общей сложности, 144 562 16S рДНК прочтений.

Результаты. Результаты посевов мочи коррелировали с данными 16S рРНК секвенирования, однако анализ метагенома позволил выявить и идентифицировать большее количество микроорганизмов. В каждом образце выделено от 2 до 21 рода микроорганизмов. В моче всех больных до ботулинотерапии преобладали Enterobacterales. После ботулинотерапии у трех пациенток, на фоне клинического и уродинамического улучшения, произошла смена микрофлоры с преобладанием Enterobacterales на Lactobacillales. В остальных случаях принципиальных изменений микробиома отмечено не было.

Заключение. Впервые в рамках пилотного исследования проведено сравнение микробиома мочи у больных НДНМП до и после введения ботулинического токсина. Небольшое число участников является существенным ограничением данной работы, однако продемонстрирована возможность положительного влияния ботулинотерапии на микрофлору мочевыводящих путей.

Ключевые слова: нейрогенный мочевого пузырь; инфекция мочевыводящих путей; микробиом мочи; ботулинический токсин

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки. **Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Информированное согласие.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Вклад авторов: Екатерина С. Филиппова – идея исследования, сбор материала, обработка данных, написание текста статьи; Игорь В. Баженов – организация исследования, сбор материала, редактирование текста статьи; Александр В. Зырянов – разработка дизайна исследования, финальное редактирование.

Поступила в редакцию: 20.05.2020. **Принята к публикации:** 14.07.2020. **Опубликована:** 26.09.2020.

Автор для связи: Екатерина Сергеевна Филиппова; тел.: +7 (912) 638-02-86; e-mail: filippova.cat@yandex.ru

Для цитирования: Филиппова Е.С., Баженов И.В., Зырянов А.В. Влияет ли ботулинотерапия на микробиом мочи больных нейрогенным мочевым пузырём? Результаты метагеномного секвенирования. *Вестник урологии*. 2020;8(3):85-96. <https://doi.org/10.21886/2308-6424-2020-8-3-85-96>

Does botulinum therapy affect the urine microbiome of patients with neurogenic bladder? Metagenomic sequencing results

Ekaterina S. Philippova^{1,2}, Igor V. Bazhenov^{1,2}, Alexander V. Zyrianov^{1,2}¹Ural State Medical University

620028, Russian Federation, Yekaterinburg, 3 Repina str.

²Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No.1

620102, Russian Federation, Yekaterinburg, 185 Volgogradskaya str.

Introduction. Reorganization of the urinary microbiome in patients with neurogenic low urinary tract dysfunction (NLUTD) plays an important role in the pathogenesis of urinary tract infections (UTIs). However, we still do not know how the different types of NLUTD therapy affect the microbiome.

Purpose of the study. Was to assess the influence of botulinum toxin (BoNT) injections on the urinary microbiome.

Materials and methods. Urine samples were obtained from 6 persons (4 females and 2 males) with NLUTD before BoNT therapy (200 UI) and 6 weeks after. Standard urine analysis, urine culture and 16S rRNA gene sequencing were performed. A total of 144,562 quality-filtered 16S rDNA sequence reads were processed through an Illumina MiSeq platform.

Results. The results of the urine culture correlated with 16S rRNA sequencing results, but the greater number of bacterial taxa were detected. Analysis of the bacterial community in urine samples revealed between 2 and 21 species-level reads per individual. All patients before BoNT demonstrated abnormal urinary microbiome with a predominance of Enterobacteriales. In three cases in females, clinical and urodynamic improvement after botulinum therapy was associated with changing of the microbiome from Enterobacteriaceae to Lactobacillales. In one female and two males, no principal changes had happened.

Conclusions. This is the first report comparing in pilot study the urinary microbiome before and after BoNT injections into the bladder wall. The results are restricted by the small number of participants. However, the promising observation about the influence of botulinum toxin therapy on urinary microbiome was obtained.

Key words: neurogenic bladder; urinary tract infection; urinary microbiome; botulinum toxin

Financing. The study did not have sponsorship. **Conflict of interest.** Authors have no conflict of interest to declare. **Informed consent.** All patients signed an informed consent to participate in the study.

Authors contribution: Ekaterina S. Filippova – study idea, obtaining data and analysis of the results, writing the text of the manuscript; Igor V. Bazhenov – study organization process, obtaining data, manuscript editing; Alexander V. Zyrianov – study design development, final editing.

Received: 20.05.2020. **Accepted:** 14.07.2020. **Published:** 26.09.2020.

For correspondence: Ekaterina S. Filippova; tel.: +7 (912) 638-02-86; e-mail: filippova.cat@yandex.ru

For citation: Philippova E.S., Bazhenov I.V., Zyrianov A.V. Does botulinum therapy affect the urine microbiome of patients with neurogenic bladder? Metagenomic sequencing results. *Urology Herald*. 2020;8(3):85-96. (In Russ.). <https://doi.org/10.21886/2308-6424-2020-8-3-85-96>

Введение

Длительное время считалось, что моча здорового человека стерильна. Однако за последнее десятилетие представления о микрофлоре мочевыводящих путей кардинально изменились. В 2010 году D.E. Nelson et al. [1] с помощью секвенирования 16S рРНК обнаружили бактерии в моче здоровых мужчин, а М.И. Коган и соавт. (2010), используя культуральное исследование с расширенным набором сред, показали, что моча здоровых женщин также не стерильна [2]. Н. Siddiqui et al. в 2011 году подтвердили эти данные путём метагеномного секвенирования [3]. В дальнейшем рядом учёных был исследован микробиом мочи в норме [4–10] и при некоторых заболеваниях: гиперактивном мочевом пузыре [10, 11], недержании мочи [12], хроническом простатите [13], интерстициальном цистите [14, 15], раке мочевого пузыря [16, 17], раке предстательной железы [18], мочекаменной болезни [19] и других.

Новые знания о микрофлоре мочи побудили урологов изменить взгляд на бессимптомную

бактериурию и вопросы профилактики инфекций мочевыводящих путей (ИМП) [20].

Рецидивирующие ИМП являются одной из ведущих проблем в лечении больных нейрогенным мочевым пузырём. Каждый пациент с НДНМП переносит около 2,5 эпизодов ИМП в год [21], что обуславливает прогрессирование хронической почечной недостаточности [22] и может приводить к серьёзным септическим осложнениям, вплоть до летального исхода [23]. Профилактика ИМП у больных нейрогенным мочевым пузырём основывается, в первую очередь, на коррекции уродинамических нарушений, борьбе с детрузорной гиперактивностью, пузырно-мочеточниковым рефлюксом, правильном выборе способа отведения мочи [24].

Изменения, характерные для микробиома пациентов с нейрогенной дисфункцией мочевыводящих путей (НДНМП), были продемонстрированы D.E. Fouts et al. [5] в 2012 году и S.I. Groah et al. [9] в 2016 году с помощью секвенирования 16S рРНК. В литературе отсутствуют данные о том, как меняется микробиом мочи больных НДНМП на фоне различных видов лечения, в частности, детрузоростабилизирующей терапии.

Цель исследования: проанализировать микробиом мочи больных НДНМП при проведении ботулинотерапии.

Материалы и методы

В исследовании участвовали шесть больных НДМП, страдающих частыми рецидивами ИМП. Характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Все пациенты дважды прошли обследование, включавшее общеклинические анализы, бактериологическое исследование мочи, ультразвуковое исследование мочевого пузыря, а также комплексное уродинамическое исследование (КУДИ) до введения ботулотоксина и через 6 недель после.

В момент забора образцов мочи для исследования никто из пациентов не имел клинических симптомов ИМП. Также пациенты были предупреждены о том, что не должны принимать антибактериальные препараты в течение не менее, чем двух недель, до сдачи анализа.

В госпитальных условиях пациентам были

выполнены внутридетрузорные инъекции ботулотоксина. В операционной под внутривенной анестезией пациентам выполняли уретроцистоскопию, после чего, при наполнении мочевого пузыря до 200 мл по манипуляционному каналу уретроцистоскопа проводили эндоскопическую иглу, через которую вводили в стенку мочевого пузыря внутридетрузорно 200 ЕД онаботулотоксина типа А (Ботокс, Аллерган) в 20 точках (10 ЕД/точка) на глубину 2 – 3 – 5 мм в зависимости от толщины его стенки.

Забор образцов мочи для метагеномного секвенирования выполняли с письменного согласия пациентов до процедуры ботулинотерапии и через 6 недель после неё. Мочу в стерильный контейнер забирал врач путём катетеризации мочевого пузыря одноразовым лубрицированным катетером. Образцы мочи подвергали немедленной заморозке и хранили при температуре -25°C. С соблюдением температурного режима образцы транспортировали в лабораторию.

Выделение и контроль качества ДНК. Выделение ДНК было проведено протоколом с использованием силикатных колонок из 12 об-

Таблица 1. Характеристика пациентов
Table 1. Patients` characteristics

Номер случая Case number	Маркировка образцов Samples numbers	Возраст (лет) Age (years)	Пол Gender	Причина НДНМП Cause of NLU/D	Длительность симптомов НДНМП (лет) NLU/D duration (years)	Способ опорожнения моче- вого пузыря Bladder management	Количество эпизодов ИМП в течение последнего года Frequency of UTI (last year)	Последний приём антибио- тиков перед ботулинотера- пией (неделя) Last time using of antibiotics (weeks before procedure)
1	PN6513 QD1117	47	М Male	ПСМТ SCI	17	ИК IC	8	6
2	MR7654 FU1690	22	Ж Female	Spina Bifida	22	ИК IC	10	4
3	GC3025 HS1160	24	Ж Female	Spina Bifida	24	ИК IC	4	8
4	GR9877 GV1176	18	М Male	ПСМТ SCI	5	ИК IC	7	4
5	JN3720 MM3401	20	Ж Female	Spina Bifida	20	ИК IC	6	9
6	YG6199 JW4447	28	Ж Female	ПСМТ SCI	4	ИК IC	10	8

Примечание: НДНМП — нейрогенная дисфункция нижних мочевыводящих путей; ИМП — инфекция мочевыводящих путей; ПСМТ — позвоночно-спинномозговая травма; ИК — интермиттирующая катетеризация

Note: NLU/D — neurogenic low urinary tract dysfunction; UTI — urinary tract infection; SCI — spinal cord injury; IC — intermittent catheterization

разцов. Контроль качества полученной ДНК был проведён с помощью электрофореза в агарозном геле (рис. 1 – 2).

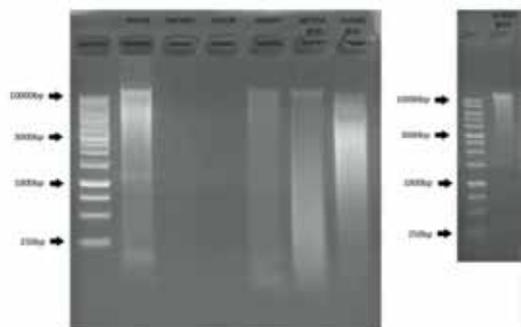


Рисунок 1. Электрофорез ДНК, содержащейся в моче (образцы 1 – 8)

Figure 1. Electrophoresis of the DNA contained in the urine (samples 1 – 8)

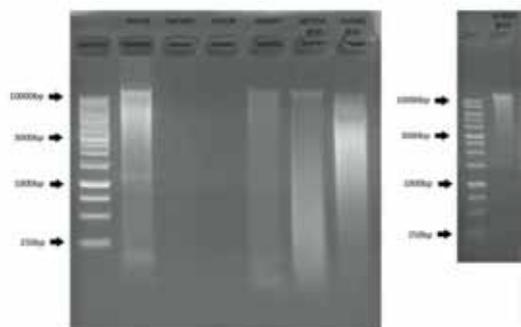


Рисунок 2. Электрофорез ДНК, содержащейся в моче (образцы 9 – 12)

Figure 2. Electrophoresis of the DNA contained in the urine (samples 9 – 12)

Для оценки бактериальных геномов и контроля отсутствия ПЦР-ингибиторов была проведена количественная ПЦР с праймерами на варибельный регион V3 – V4 16S рРНК на приборе Step One Plus (Applied Biosystems).

Подготовка библиотек фрагментов ДНК. Из входящего биоматериала были приготовлены библиотеки ДНК для секвенирования варибельных регионов V3 – V4 гена 16S рРНК согласно протоколу Illumina [25]. Контроль качества библиотек проведен на приборе LabChip GX Touch 24.

Секвенирование ДНК. Образцы были разведены и секвенированы в соответствии с протоколами Illumina [25]. Исходные данные были получены в формате FASTQ, 250 PE. Для каждого образца получено более 10 000 пар прочтений.

Полученные прочтения были обработаны при помощи следующих программ:

- cutadapt1 v2.7 — удаление адаптерных последовательностей и нуклеотидов с низким качеством прочтения;

- FLASH2 v1.2 — объединение парноконцевых прочтений в цельные последовательности;

- UCHIME3 v4.2 — удаление химерных последовательностей в соответствии с базой данных Greengenes;

- RDPTools4 v2.11 — классификация прочтений в соответствии с базой данных RDP5 v11.5.

Контроль качества прочтений. У исходных прочтений были удалены адаптерные последовательности и нуклеотиды с низким качеством прочтения при помощи инструмента cutadapt1 v2.7. В результате доля нуклеотидов с качеством прочтения не менее 30 (Phred ≥ 30) составляет 90 – 95% в каждом образце. Парноконцевые прочтения были объединены в цельные последовательности варибельных регионов V3 – V4 гена 16S рРНК при помощи инструмента FLASH2 v1.2 (рис. 3). Медианная доля прочтений, объединённых в цельные последовательности, составляет 96%.

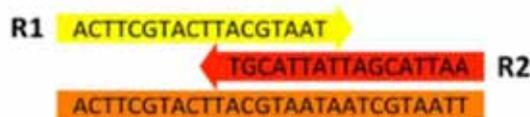


Рисунок 3. Схема объединения парноконцевых прочтений в цельные последовательности при помощи инструмента FLASH

Figure 3. Scheme of paired-end reads adjustment using FLASH tool

Химерные последовательности были удалены при помощи инструмента UCHIME3 v4.2. В качестве референса использовали выравненные последовательности из базы данных Greengenes, предоставленные ресурсом Broad Institute [26]. В среднем в образцах содержалось 1,4% химерных последовательностей.

В результате для каждого образца было получено более 9 500 пар прочтений хорошего качества (в среднем 12 000 пар прочтений), среди которых отсутствовали химеры.

Прочтения хорошего качества, среди которых отсутствуют химеры, были классифицированы при помощи инструмента RDPTools v2.11. Классификацию прочтений проводили в соответствии с базой данных RDP v11.5, с порогом сходства 90%.

В среднем 94% прочтений в каждом образце было классифицировано до семейства и 85% прочтений в каждом образце было классифицировано до рода.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного пакета SPSS 23.0 for Windows. Данные представлены в виде $m \pm SD$, где m — среднее значение, SD — стандартное отклонение. Для оценки достоверности

различий средних использовался U-критерий Манна-Уитн. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Все пациенты, участвовавшие в исследовании, имели клиническое и уродинамическое улучшение на фоне лечения (табл. 2). Цистометрическая ёмкость мочевого пузыря увеличилась в среднем, на $187,3 \pm 79,51$ мл. Объём мочевого пузыря, при котором возникало первое непроизвольное сокращение детрузора (эпизод гиперактивности) на $285,5 \pm 94,8$ мл, максимальное давление детрузора в момент непроизвольного сокращения снизилось на $34,8 \pm 25,0$ см H_2O .

Бактериальный профиль образцов мочи, направленных на метагеномное секвенирование, представлен в таблице 3.

Результаты посевов мочи коррелировали с данными 16S рПНК секвенирования, однако секвенирование позволило выявить и идентифицировать большее количество микроорганизмов.

Среди бактерий, которые никогда не появлялись в посевах мочи, но были обнаружены у ряда больных по данным секвенирования метагенома представители семейств: Cellulomonadaceae

(Cellulomonas spp.), Prevotellaceae (Prevotella melaninogenica, Prevotella spp.), Flavobacteriaceae, Bacillales Family X. Incertae Sedis, Gemella (Gemella asaccharolytica), Carnobacteriaceae (Carnobacterium spp.), Veillonellaceae (Veillonella spp.), Peptoniphilaceae (Parvimonas spp.), Sphingomonadaceae (Sphingomonas spp.), Pseudoalteromonadaceae (Pseudoalteromonas spp.), Moraxellaceae (Acinetobacter spp.), Vibrionaceae (Vibrio spp.).

Образцы HS1160 и YG6199, забранные у пациентов после ботулинотерапии, не дали бактериального роста на питательных средах, но при этом секвенирование позволило идентифицировать в них представителей нормальной микрофлоры. Аналогичную картину имел образец MM3401, но при посеве были выявлены Lactobacillus 10*3. В данных трёх образцах низким было и содержание лейкоцитов, не более 1 – 2 в поле зрения.

Во всех образцах концентрация ДНК и количество лейкоцитов через шесть недель после ботулинотерапии были меньше, чем до лечения.

В ходе метагеномного секвенирования проанализировано 144562 16S рДНК прочтений. В каждом образце идентифицировано от 2 до 21 рода микроорганизмов. Наиболее часто встречающимися микроорганизмами были Escherichia,

Таблица 2. Уродинамические параметры пациентов до и после ботулинотерапии
Table 2. Clinical und urodynamic results of botulinum toxin injections

Номер случая Case number	Маркировка образца Samples numbers	Пол Gender	Ургентное недержание мочи Urgency incontinence		Максимальное давление детрузора во время не- произвольного сокраще- ния (см H_2O) Pdetmax IDC-maximal detrusor pressure during involuntary detrusor con- traction (cm H_2O)		Объём мочевого пузыря при первом эпизоде гиперактивности (мл) Vfirst/DC Bladder volume at the time of first involun- tary detrusor contraction (ml)		Максимальная цистометрическая ём- кость (мл) MCC – maximal cystomet- ric capacity (ml)	
			До Before	После After	До Before	После After	До Before	После After	До Before	После After
1	PN6513 QD1117	М Male	Есть Yes	Нет No	10	5	320	580	480	580
2	MR7654 FU1690	Ж Female	Есть Yes	Есть Yes	50	6	55	430	350	660
3	GC3025 HS1160	Ж Female	Есть Yes	Нет No	60	10	107	460	326	500
4	GR9877 GV1176	М Male	Есть Yes	Есть Yes	15	10	350	460	350	460
5	JN3720 MM3401	Ж Female	Есть Yes	Нет No	81	14	200	505	280	520
6	YG6199 JW4447	Ж Female	Есть Yes	Нет No	43	5	160	470	380	570

Таблица 3. Бактериальный профиль образцов мочи
Table 3. Bacterial profiles of urinary samples

Номер случая Case number	Маркировка образца Samples numbers	Пол Gender	Бактериальный рост (КОЕ/мл) Urine culture (CFU/ml)	Концентрация ДНК (нг/мкл) DNA concentration (ng/ul)	Преобладающие возбудители по данным 16S рРНК секвенирования 16S rRNA sequencing (predominantly)	Лейкоциты в ОАМ White blood cells (no./hpf)
1	PN6513 (До / Before)	М Male	<i>Klebsiella pneu- moniae</i> 10*2	38	<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , неклассифицированные / <i>unclassified</i> , <i>Enterobacterales</i>	10 – 15
	QD1117 (После / After)		<i>Klebsiella pneu- moniae</i> 10*2	3,99	<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , неклассифицированные / <i>unclassified</i> , <i>Enterobacterales</i>	5 – 6
2	MR7654 (До / Before)	Ж Female	<i>Escherichia Coli</i> 10*7	165	<i>Prevotella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Gardnerella</i>	10 – 14
	FU1690 (После / After)		<i>Escherichia Coli</i> 10*6	333	<i>Escherichia</i> , неклассифицированные / <i>unclassified</i> , <i>Enterobacterales</i>	7 – 8
3	GC3025 (До / Before)	Ж Female	<i>Escherichia Coli</i> 10*7	115	<i>Escherichia</i> , неклассифицированные / <i>unclassified</i> , <i>Enterobacterales</i>	6 – 7
	HS1160 (После / After)		Нет роста No growth	0,87	<i>Lactobacillus</i> , <i>Gardnerella</i>	1 – 2
4	GR9877 (До / Before)	М Male	<i>Escherichia Coli</i> 10*6	1,35	<i>Enterococcus</i> , неклассифицированные / <i>unclassified</i>	5 – 6
	GV1176 (После / After)		<i>Escherichia Coli</i> 10*5	22,1	<i>Escherichia</i> , неклассифицированные / <i>unclassified</i> , <i>Enterobacterales</i>	3 – 4
5	JN3720 (До / Before)	Ж Female	<i>Escherichia Coli</i> 10*3	21,3	<i>Escherichia</i> , неклассифицированные / <i>unclassified</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	3 – 4
	MM3401 (После / After)		<i>Lactobacillus</i> 10*3	0,73	<i>Lactobacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Thermicanus</i>	1 – 2
6	JW4447 (До / Before)	Ж Female	<i>Escherichia Coli</i> 10*7	5,53	<i>Escherichia</i> , неклассифицированные / <i>unclassified</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	6 – 7
	YG6199 (После / After)		Нет роста No growth	0,34	<i>Lactobacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Cellulomonas</i>	1 – 2

Klebsiella, *Lactobacillus* and *Enterococcus* (рис. 4). В целом, в моче больных НДНМП преобладали *Enterobacterales*.

Наглядно состав микробиома мочи представлен на рисунке 5. Как видно на тепловой карте микробиом мочи женщин после ботулинотера-

пии чаще был представлен лактобактериями, чем до процедуры. У трех пациенток (случаи №3, №5 и №6) произошла смена микрофлоры с преобладанием *Enterobacteriaceae* на *Lactobacillales*. У мужчин подобных изменений отмечено не было. В случае №1 пациент после инъекций бо-

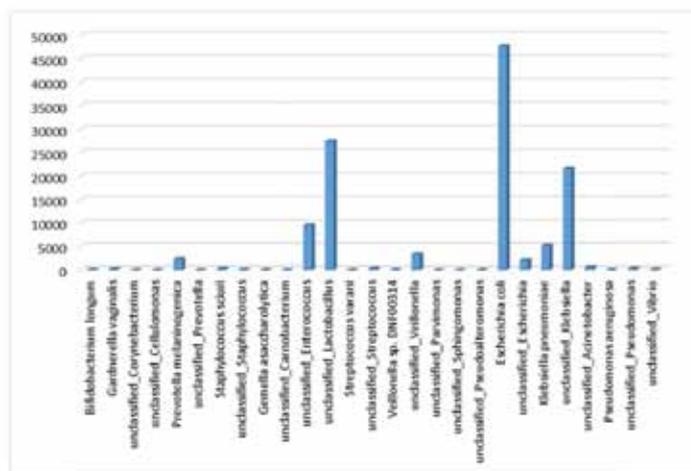


Рисунок 4. Суммарное число прочтений различных видов бактерий, идентифицированных в образцах мочи
Figure 4. Sequences counts of bacterial species summarizing all urine samples

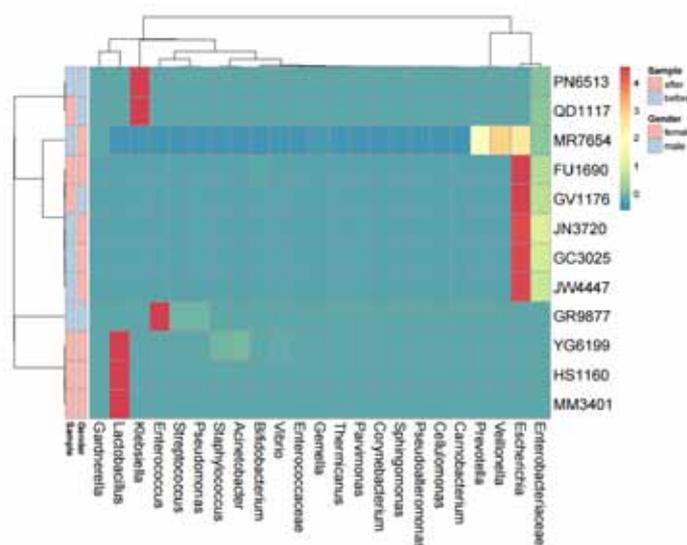


Рисунок 5. Различия в относительном распределении долей различных родов бактерий в микробиоме мочи и женщин с НДНМП до и после внутридурозорных инъекций ботулотоксина
Figure 5. Differences in relative sequences count between males and females before and after botulinum toxin injections

тулотоксина по-прежнему имел в моче в большом количестве представителей рода *Klebsiella*. У женщины в случае №2 *Veillonella* заменилась *E. Coli*. У мужчины в случае №4 бактерии рода *Enterococcus* сменились представителями *Escherichia*.

В исследовании не было выявлено корреляции между уродинамическими изменениями и трансформациями микробиома. Так, пациенты №1, №2 и №4 имели функциональные улучшения по данным уродинамического исследования, но позитивных изменений микробиома зарегистрировано не было.

Клиническое наблюдение за пациентами в течение последующих 6 месяцев показало, что частота ИМП снизилась во всех случаях (табл. 4).

У мужчин в течение полугода не возникло эпизодов ИМП. У двух пациенток с позитивными изменениями микробиома также не было ИМП в течение указанного периода, третья пациентка с нормофлорой перенесла один эпизод ИМП. Пациентка (случай №2), у которой в моче после инъекций ботулотоксина сохранилось преобладание энтеробактерий, дважды имела ИМП в течение 6 месяцев после процедуры, что является худшим результатом в группе.

Таблица 4. Частота рецидивов ИМП до и после ботулинотерапии

Table 4. Urinary tract infections recurrence rate and urinary microbiome status in neurogenic bladder patients before and after botulinum toxin injections

Номер случая Case number	Маркировка образцов Samples numbers	Пол Gender	Частота ИМП в течение 6 месяцев до процедуры UTI frequency (six months before procedure)	Изменение микробиома по данным 16S рНК секвенирования Microbiome changed (yes/no)	Частота ИМП в течение 6 месяцев после процедуры UTI frequency (six months after procedure)
1	PN6513 QD1117	М Male	5	Нет No	0
2	MR7654 FU1690	Ж Female	6	Нет No	2
3	GC3025 HS1160	Ж Female	3	Да Yes	1
4	GR9877 GV1176	М Male	3	Нет No	0
5	JN3720 MM3401	Ж Female	3	Да Yes	0
6	YG6199 JW4447	Ж Female	6	Да Yes	0

Примечание: ИМП — инфекция мочевыводящих путей

Note: UTI — urinary tract infection

Обсуждение

Ранее было показано, что эндоскопические инъекции ботулотоксина уменьшают частоту рецидивов ИМП, однако не было известно, сопровождается ли это изменениями микробиома мочевого пузыря [27].

Впервые проведено исследование, сравнивающее микробиом мочи больных нейрогенным мочевым пузырём до и после инъекций ботулинического токсина в стенку мочевого пузыря. Для достижения максимально достоверных результатов использован метод секвенирования 16S рНК.

D.E. Fouts et al. в 2012 году с помощью метагеномного секвенирования сравнили микробиом мочи здоровых добровольцев и больных нейрогенной дисфункцией нижних мочевыводящих путей, использующих различные методы отведения мочи [5]. Преобладающими микроорганизмами в моче пациентов с НДНМП оказались представители Enterobacterales. Как показали авторы, доля энтеробактерий в микробиоме мочи женщин и мужчин с нейрогенной дисфункцией нижних мочевыводящих путей растёт с увеличением длительности НДНМП. Количество лактобактерий при этом пропорционально снижается. В первые месяцы после развития функциональных нарушений мочеиспускания микробиом пациентов имеет нормальный состав, но

уже к концу первого года заболевания микробиома оказывается обеднена лактобактериями и обильно населена энтеробактериями [5]. В нашем исследовании все пациенты исходно имели длительность НДНМП $15,3 \pm 8,7$ лет. Ожидается, что в микробиоме мочи методом метагеномного секвенирования были идентифицированы, преимущественно, Enterobacterales.

S.L. Groah et al. в 2016 году подтвердили данные D.E. Fouts et al. о том, что в моче больных НДНМП чаще встречаются *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumonia* [9]. Это также соотносится с полученными нами данными.

S. Bank et al. проанализировали образцы мочи 142 пациентов с различными урогенитальными заболеваниями (мочекаменной болезнью, ИМП, мочевыми дренажами) с помощью стандартного микробиологического исследования и ПЦР [28]. Авторы обнаружили, что наибольшая бактериальная колонизация характерна для пациентов старшего возраста и тех, кто имеет постоянные дренажи. Чаще всего в посевах мочи катетеризированных больных обнаруживались энтеробактерии.

Наличие лактобактерий в уретре и мочевом пузыре, вероятно, играет протективную роль в отношении инфекций мочевыводящих путей. Бактерии, продуцирующие молочную кислоту способны контролировать рост более вирулентных микроорганизмов, которые не способны

существовать в более кислой среде [29]. D.E. Fouts et al. продемонстрировали уменьшение количества лактобактерий в моче женщин с НДНМП, которые мочатся самостоятельно, периодически катетеризируются или имеют постоянный катетер [5]. Это может быть одним из важнейших факторов риска ИМП в популяции больных нейрогенным мочевым пузырем. Потенциальная возможность изменить микробиом обратно в сторону лактобактериальной флоры, воздействуя на мочевой пузырь с помощью ботулотоксина, кажется многообещающей. Кроме того, это вносит важный вклад в понимание патогенетических механизмов развития и рецидивирования ИМП у больных НДНМП.

Мы продемонстрировали, что несмотря на длительность заболевания и использование метода периодической катетеризации на фоне детрузоростабилизирующей терапии моча у трёх пациентов с НДНМП приобрела микробиом, близкий по составу к нормальному. Взаимосвязь функционального состояния мочевого пузыря и состава микробиома требует дальнейшего изучения.

Патогенетическая связь НДНМП с микрофлорой мочи, вероятно имеет несколько механизмов. С одной стороны, это ишемия стенки мочевого пузыря, связанная как с гиперрефлексией детрузора, так и с его перерастяжением в случае задержки мочи. Как ещё в 1972 году описывали J. Lapidus et al. [30] кровоснабжение стенки мочевого пузыря может быть нарушено за счёт высокого внутрипузырного давления и/или перерастяжения органа. Ишемия тканей делает возможной колонизацию уротелия грамм-отрицательными представителями кишечной микрофлоры. Избегать повышения давления и перерастяжения — основа профилактики ИМП [31].

Другая проблема, вызванная нарушением питания стенки мочевого пузыря, замещение мышечных волокон соединительной тканью, что приводит к формированию трабекул и уменьшению пластичности мочевого пузыря, что, в свою очередь, усиливает ишемию [32].

Кроме того, высокое внутрипузырное давление обуславливает формирование пузырно-мочеточникового рефлюкса, что также является доказанным фактором риска ИМП у больных нейрогенным мочевым пузырём [21, 32].

В нашем исследовании микробиома путём метагеномного секвенирования было невозможно оценить морфологические изменения в стенке мочевого пузыря, однако снижение внутрипузырного давления за счёт ботулотоксина, должно было улучшить кровоснабжение стенки мочевого пузыря, уменьшить явления ишемии, а также ретроградный ток мочи, обусловленный пузырно-мочеточниковым рефлюксом.

Проведённое исследование методом метагеномного секвенирования имеет ограничения, связанные с небольшим числом образцов, что обусловлено высокой стоимостью методики. Также важно учитывать, что с целью антибактериальной профилактики пациенты получали однократно 3 г фосфомицина треметамола per os, что могла оказать влияние на состав микробиома. Однако в анамнезе всех пациентов отмечалось многократное употребление различных антибактериальных препаратов. После введения ботулотоксина больные не получали антибактериальных препаратов до следующего забора мочи, однако могли использовать растительные препараты, что также могло повлиять на характер микрофлоры мочевыводящих путей.

Также необходимо учитывать, что состав микробиоты, вероятно, может подвергаться естественным временным колебаниям. Этот вопрос мало изучен. Как показали Ю.Л. Набока и соавт. [33], существуют незначительные различия в спектре микроорганизмов в моче и уровнях бактериурии у отдельных индивидуумов в течение дневного времени, однако, в целом, характерный спектр мочи идентифицируется независимо от дневного времени взятия материала для исследования.

Заключение

Пилотное исследование продемонстрировало значимость и перспективность изучения микробиома мочевыводящих путей больных НДНМП в динамике. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы подтвердить положительные изменения видового состава микробиоты мочи на фоне детрузоростабилизирующей терапии и снижение рисков рецидива ИМП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson DE, Van Der Pol B, Dong Q, Revanna KV, Fan B, Easwaran S, Sodergren E, Weinstock GM, Diaio L, Fortenberry JD. Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. *PLoS One*. 2010;5(11):e14116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014116>

REFERENCES

1. Nelson DE, Van Der Pol B, Dong Q, Revanna KV, Fan B, Easwaran S, Sodergren E, Weinstock GM, Diaio L, Fortenberry JD. Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. *PLoS One*. 2010;5(11):e14116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014116>

2. Набока Ю.Л., Гудима И.А., Коган М.И., Черницкая М.Л. Микробный спектр мочи молодых здоровых женщин. *Урология*. 2010;(5):7–10. eLIBRARY ID: 15242297
3. Siddiqui H, Nederbragt AJ, Lagesen K, Jeansson SL, Jakobsen KS. Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *BMC Microbiol*. 2011;11:244. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-244>
4. Dong Q, Nelson DE, Toh E, Diao L, Gao X, Fortenberry JD, Van der Pol B. The microbial communities in male first catch urine are highly similar to those in paired urethral swab specimens. *PLoS One*. 2011;6(5):e19709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019709>
5. Fouts DE, Pieper R, Szpakowski S, Pohl H, Knoblach S, Suh MJ, Huang ST, Ljungberg I, Sprague BM, Lucas SK, Torralba M, Nelson KE, Groah SL. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *J Transl Med*. 2012;10:174. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-174>
6. Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, Rong R, Kenton K, Fitzgerald M, Mueller ER, Schreckenberger P, Dong Q, Nelson DE, Brubaker L. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1376–1383. <https://doi.org/10.1128/JCM.05852-11>
7. Lewis DA, Brown R, Williams J, White P, Jacobson SK, Marchesi JR, Drake MJ. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:41. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00041>
8. Коган М.И., Набока Ю.Л., Ибишев Х.С., Гудима И.А. Не стерильность мочи здорового человека — новая парадигма в медицине. *Урология*. 2014;(5):48–52. eLIBRARY ID: 22809344
9. Groah SL, Pérez-Losada M, Caldovic L, Ljungberg IH, Sprague BM, Castro-Nallar E, Chandel NJ, Hsieh MH, Pohl HG. Redefining Healthy Urine: A Cross-Sectional Exploratory Metagenomic Study of People With and Without Bladder Dysfunction. *J Urol*. 2016;196(2):579–587. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.01.088>
10. Karstens L, Asquith M, Davin S, Stauffer P, Fair D, Gregory WT, Rosenbaum JT, McWeeney SK, Nardos R. Does the Urinary Microbiome Play a Role in Urgency Urinary Incontinence and Its Severity? *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:78. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00078>
11. Pearce MM, Hilt EE, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, Thomas-White K, Fok C, Kliethermes S, Schreckenberger PC, Brubaker L, Gai X, Wolfe AJ. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *mBio*. 2014;5(4):e01283-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01283-14>
12. Govender Y, Gabriel I, Minassian V, Fichorova R. The Current Evidence on the Association Between the Urinary Microbiome and Urinary Incontinence in Women. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:133. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00133>
13. Коган М.И., Набока Ю.Л., Исмаилов Р.С. Микробиота секрета простаты: сравнительный анализ хронического простатита категорий II и IIIA. *Урология*. 2020;(2):16–22. <https://dx.doi.org/10.18565/urology.2020.2.16-22>
14. Meriwether KV, Lei Z, Singh R, Gaskins J, Hobson DTG, Jala V. The Vaginal and Urinary Microbiomes in Premenopausal Women With Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome as Compared to Unaffected Controls: A Pilot Cross-Sectional Study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:92. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00092>
15. Abernethy MG, Rosenfeld A, White JR, Mueller MG, Lewicky-Gaupp C, Kenton K. Urinary Microbiome and Cy-
2. Naboka Yu.L., Gudima I.A., Kogan M.I., Chernitskaya M.L. Bacterial spectrum of the urine in young healthy women. *Urologiia*. 2010;(5):7–10. (In Russ.). eLIBRARY ID: 15242297
3. Siddiqui H, Nederbragt AJ, Lagesen K, Jeansson SL, Jakobsen KS. Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *BMC Microbiol*. 2011;11:244. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-244>
4. Dong Q, Nelson DE, Toh E, Diao L, Gao X, Fortenberry JD, Van der Pol B. The microbial communities in male first catch urine are highly similar to those in paired urethral swab specimens. *PLoS One*. 2011;6(5):e19709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019709>
5. Fouts DE, Pieper R, Szpakowski S, Pohl H, Knoblach S, Suh MJ, Huang ST, Ljungberg I, Sprague BM, Lucas SK, Torralba M, Nelson KE, Groah SL. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *J Transl Med*. 2012;10:174. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-174>
6. Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, Rong R, Kenton K, Fitzgerald M, Mueller ER, Schreckenberger P, Dong Q, Nelson DE, Brubaker L. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1376–1383. <https://doi.org/10.1128/JCM.05852-11>
7. Lewis DA, Brown R, Williams J, White P, Jacobson SK, Marchesi JR, Drake MJ. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:41. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00041>
8. Kogan M.I., Naboka Yu.L., Ibishev Kh.S., Gudima I.A. Unsterile urine in health human — new paradigm in medicine. *Urologiia*. 2014;(5):48–52. (In Russ.). eLIBRARY ID: 22809344
9. Groah SL, Pérez-Losada M, Caldovic L, Ljungberg IH, Sprague BM, Castro-Nallar E, Chandel NJ, Hsieh MH, Pohl HG. Redefining Healthy Urine: A Cross-Sectional Exploratory Metagenomic Study of People With and Without Bladder Dysfunction. *J Urol*. 2016;196(2):579–587. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.01.088>
10. Karstens L, Asquith M, Davin S, Stauffer P, Fair D, Gregory WT, Rosenbaum JT, McWeeney SK, Nardos R. Does the Urinary Microbiome Play a Role in Urgency Urinary Incontinence and Its Severity? *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:78. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00078>
11. Pearce MM, Hilt EE, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, Thomas-White K, Fok C, Kliethermes S, Schreckenberger PC, Brubaker L, Gai X, Wolfe AJ. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *mBio*. 2014;5(4):e01283-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01283-14>
12. Govender Y, Gabriel I, Minassian V, Fichorova R. The Current Evidence on the Association Between the Urinary Microbiome and Urinary Incontinence in Women. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:133. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00133>
13. Kogan M.I., Naboka Y.L., Ismailov R.S. Prostatic secretion microbiota: a comparative analysis of the chronic prostatitis II and IIIA category. *Urologiia*. 2020;(2):16–22. (In Russ.). <https://dx.doi.org/10.18565/urology.2020.2.16-22>
14. Meriwether KV, Lei Z, Singh R, Gaskins J, Hobson DTG, Jala V. The Vaginal and Urinary Microbiomes in Premenopausal Women With Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome as Compared to Unaffected Controls: A Pilot Cross-Sectional Study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:92. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00092>
15. Abernethy MG, Rosenfeld A, White JR, Mueller MG, Lewicky-Gaupp C, Kenton K. Urinary Microbiome and Cy-

- tokine Levels in Women With Interstitial Cystitis. *Obstet Gynecol.* 2017;129(3):500–506. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001892>
16. Bučević Popović V, Šitum M, Chow CT, Chan LS, Roje B, Terzić J. The urinary microbiome associated with bladder cancer. *Sci Rep.* 2018;8(1):12157. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29054-w>
 17. Wu P, Zhang G, Zhao J, Chen J, Chen Y, Huang W, Zhong J, Zeng J. Profiling the Urinary Microbiota in Male Patients With Bladder Cancer in China. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:167. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00167> Erratum in: *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:429. PMID: 29904624.
 18. Kirmusaoglu S, Yurdugül S, Metin A, Vehid S. The Effect of Urinary Catheters on Microbial Biofilms and Catheter Associated Urinary Tract Infections. *Urol J.* 2017;14(2):3028–3034. PMID: 28299769.
 19. Mehta M, Goldfarb DS, Nazzal L. The role of the microbiome in kidney stone formation. *Int J Surg.* 2016;36(Pt D):607–612. <https://doi.org/10.1016/j.ijisu.2016.11.024>
 20. Tornic J, Wöllner J, Leitner L, Mehnert U, Bachmann LM, Kessler TM. The Challenge of Asymptomatic Bacteriuria and Symptomatic Urinary Tract Infections in Patients with Neurogenic Lower Urinary Tract Dysfunction. *J Urol.* 2020;203(3):579–584. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000000555>
 21. Siroky MB. Pathogenesis of bacteriuria and infection in the spinal cord injured patient. *Am J Med.* 2002;113 Suppl 1A:67S–79S. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(02\)01061-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(02)01061-6)
 22. Sung BM, Oh DJ, Choi MH, Choi HM. Chronic kidney disease in neurogenic bladder. *Nephrology (Carlton).* 2018;23(3):231–236. <https://doi.org/10.1111/nep.12990>
 23. Vigil HR, Hickling DR. Urinary tract infection in the neurogenic bladder. *Transl Androl Urol.* 2016;5(1):72–87. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2016.01.06>
 24. Linsenmeyer TA. Catheter-associated urinary tract infections in persons with neurogenic bladders. *J Spinal Cord Med.* 2018;41(2):132–141. <https://doi.org/10.1080/10790268.2017.1415419>
 25. Pichler M, Coskun ÖK, Ortega-Arbulú AS, Conci N, Wörheide G, Vargas S, Orsi WD. A 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the Illumina MiniSeq platform. *Microbiologyopen.* 2018;7(6):e00611. <https://doi.org/10.1002/mbo3.611>
 26. *Microbiome Utilities Portal of the Broad Institute.* Доступно по: <http://microbiomeutil.sourceforge.net/> Ссылка активна на 03.04.2020.
 27. Gamé X, Castel-Lacanal E, Bentaleb Y, Thiry-Escudié I, De Boissezon X, Malavaud B, Marque P, Rischmann P. Botulinum toxin A detrusor injections in patients with neurogenic detrusor overactivity significantly decrease the incidence of symptomatic urinary tract infections. *Eur Urol.* 2008;53(3):613–618. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.08.039>
 28. Bank S, Hansen TM, Sjøby KM, Lund L, Prag J. Actinobaculum schaalii in urological patients, screened with real-time polymerase chain reaction. *Scand J Urol Nephrol.* 2011;45(6):406–410. <https://doi.org/10.3109/00365599.2011.599333>
 29. Lee JW, Shim YH, Lee SJ. Lactobacillus colonization status in infants with urinary tract infection. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(1):135–139. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-0974-z>
 30. Lapides J, Diokno AC, Silber SJ, Lowe BS. Clean, Intermittent Self-Catheterization in the Treatment of Urinary Tract Disease. *J Urol.* 2017;197(2S):S122–S124. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.10.097>
 31. Lapides J, Diokno AC, Silber SJ, Lowe BS. Clean, intermittent self-catheterization in the treatment of urinary tract disease. *Gynecol.* 2017;129(3):500–506. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001892>

31. Lapides J, Diokno AC, Silber SJ, Lowe BS. Clean, intermittent self-catheterization in the treatment of urinary tract disease. *J Urol.* 1972;107(3):458–461. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)61055-3](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)61055-3)
32. Vasudeva P, Madersbacher H. Factors implicated in pathogenesis of urinary tract infections in neurogenic bladders: some revered, few forgotten, others ignored. *Neurourol Urodyn.* 2014;33(1):95–100. <https://doi.org/10.1002/nau.22378>
33. Набока Ю.Л., Коган М.И., Гудима И.А., Заруцкий С.А., Джалагония К.Т. Есть ли дневные вариации микробиоты мочи у здоровых женщин? *Нефрология.* 2016;20(5):36–42. eLIBRARY ID: 26727702.
- J Urol.* 1972;107(3):458–461. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)61055-3](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)61055-3)
32. Vasudeva P, Madersbacher H. Factors implicated in pathogenesis of urinary tract infections in neurogenic bladders: some revered, few forgotten, others ignored. *Neurourol Urodyn.* 2014;33(1):95–100. <https://doi.org/10.1002/nau.22378>
33. Naboka Yu.L., Kogan M.I., Gudima I.A., Zarutskiy S.A., Jalagonia K.T. Does the urine microbiota of healthy women vary during daytime? *Nephrology.* 2016;20(5):36–42. (In Russ.). eLIBRARY ID: 26727702.

Сведения об авторах

Екатерина Сергеевна Филиппова – к.м.н.; доцент кафедры урологии Уральского государственного медицинского университета; врач-уролог Свердловской областной клинической больницы №1

г. Екатеринбург, Россия

ORCID iD 0000-0003-3065-3953

e-mail: filippova.cat@yandex.ru

Игорь Владимирович Баженов – д.м.н., профессор; профессор кафедры урологии Уральского государственного медицинского университета; заведующий 3 урологическим отделением Свердловской областной клинической больницы № 1

г. Екатеринбург, Россия

ORCID iD 0000-0003-1745-700X

e-mail: biv@okb1.ru

Александр Владимирович Зырянов – д.м.н., профессор; заведующий кафедрой урологии Уральского государственного медицинского университета; руководитель Областного урологического центра Свердловской областной клинической больницы №1

г. Екатеринбург, Россия

ORCID iD 0000-0001-8105-7233

e-mail: zav1965@mail.ru

Information about the authors

Ekaterina S. Philippova – M.D., Cand.Sc. (M); Assist. Prof., Dept. of Urology, Ural State Medical University; Urologist, Urological Division No.3, Sverdlovsk Regional Hospital No.1

ORCID ID 0000-0003-3065-3953

e-mail: filippova.cat@yandex.ru

Igor V. Bazhenov – M.D. Dr. Sc. (M), Full Prof.; Prof., Dept. of Urology, Ural State Medical University; Head, Urological Division No.3, Sverdlovsk Regional Hospital No.1

ORCID ID 0000-0003-1745-700X

e-mail: biv@okb1.ru

Alexander V. Ziryaynov – M.D. Dr. Sc. (M), Full Prof.; Head, Dept. of Urology, Ural State Medical University; Head, Regional Urological Center, Sverdlovsk Regional Hospital No.1

ORCID ID 0000-0001-8105-7233

e-mail: zav1965@mail.ru