

Сравнительный анализ кишечной микробиоты у больных с экзокринной недостаточностью поджелудочной железы различной степени тяжести

И.В. Маев¹, А.И. Левченко^{✉1}, Ю.С. Галеева², Д.Н. Андреев¹, Ю.В. Осипенко³, Д.С. Бордин^{1,3,4}, Е.Н. Ильина²

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия;

²ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

³ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, Тверь, Россия

Аннотация

Обоснование. Экзокринная функция поджелудочной железы (ПЖ) является критическим фактором хозяина в определении состава кишечной микробиоты (КМ). Экзокринная недостаточность ПЖ (ЭНПЖ) может влиять на КМ, что может потенцировать прогрессирование основного заболевания и развитие осложнений. До настоящего времени недостаточно изучена связь ЭНПЖ при различных патологиях ПЖ с дисбиотическими изменениями КМ. Имеющиеся данные неоднородны и противоречивы, что определяет потребность дальнейших исследований.

Цель. Провести сравнительный анализ таксономического состава КМ пациентов с хроническим панкреатитом (ХП) различной этиологии, без или с наличием ЭНПЖ различной степени тяжести, а также пациентов с тяжелой степенью ЭНПЖ, имеющих в анамнезе оперативное вмешательство (ОВ) на ПЖ.

Материалы и методы. Всего в исследование включены 85 пациентов. Пациенты определены в группы в соответствии со степенью тяжести ЭНПЖ: 1-я группа ($n=16$) – пациенты с ХП без ЭНПЖ; 2-я группа ($n=11$) – пациенты с ХП и наличием ЭНПЖ легкой степени; 3-я группа ($n=17$) – пациенты с ХП и ЭНПЖ тяжелой степени; 4-я группа ($n=41$) – ЭНПЖ тяжелой степени у лиц с ОВ на ПЖ в анамнезе. Верификация ХП осуществлялась по клинико-анамнестическим и инструментальным данным. Степень ЭНПЖ определялась уровнем панкреатической эластазы-1 кала. Для каждого пациента получены информированное согласие на исследование, собран анамнез, проведены физикальное, лабораторное обследования, получен образец кала. Из каждого образца кала экстрагировали ДНК, посредством секвенирования генов бактериальной 16S рРНК определяли таксономический состав КМ с последующим биоинформатическим анализом.

Результаты. Мы проследили изменения КМ от группы пациентов с ХП без ЭНПЖ до группы с тяжелой ЭНПЖ, в частности у лиц, перенесших ОВ. На уровне филума КМ всех групп показала доминирование *Firmicutes*, с наименьшей представленностью в группе тяжелой ЭНПЖ, как с ОВ и с ХП, и доминированием типов *Actinobacteria*, *Verrococcimicrobiota* и *Fusobacteria*. Дифференциальная представленность родов варьировала: у пациентов с тяжелой ЭНПЖ и ХП в сравнении с легкой степенью статистически значимые рода – *Akkermansia*, *Ruminococcus gauvreauii* group и *Holdemanelia* в сравнении с ХП без ЭНПЖ, где доминировали *Prevotella*, *Ruminococcus gauvreauii* group, *Peptostreptococcus* и *Blautia*. В группе ХП с легкой ЭНПЖ доминировали рода: *Lachnospiraceae_ND_2004* group, *Faecalitalea*, *Fusobacterium*, *Catenibacterium*, *Roseburia*, *Atopobium*, *Cloacibacillus*, *Clostridium innococum* group, *Ruminococcus torques* group. Все группы продемонстрировали преобладание условно-патогенной флоры, в том числе участников онкогенеза.

Заключение. Результаты исследования показывают, что пациенты с ХП различной этиологии и пациенты с тяжелой ЭНПЖ, перенесшие ОВ на ПЖ, имеют дисбиоз КМ, на выраженность которого, вероятно, оказывает влияние степень ЭНПЖ.

Ключевые слова: хронический панкреатит, экзокринная недостаточность поджелудочной железы, кишечная микробиота, 16S рРНК

Для цитирования: Маев И.В., Левченко А.И., Галеева Ю.С., Андреев Д.Н., Осипенко Ю.В., Бордин Д.С., Ильина Е.Н. Сравнительный анализ кишечной микробиоты у больных с экзокринной недостаточностью поджелудочной железы различной степени тяжести. Терапевтический архив. 2023;95(2):130–139. DOI: 10.26442/00403660.2023.02.202056

© ООО «КОНСИЛИУМ МЕДИКУМ», 2023 г.

Информация об авторах / Information about the authors

✉ **Левченко Анна Игоревна** – врач-гастроэнтеролог, ассистент каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». E-mail: alevchenko914@gmail.com; ORCID: 0000-0003-3184-7426

Маев Игорь Вениаминович – акад. РАН, д-р мед. наук, проф., зав. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0001-6114-564X

Галеева Юлия Сергеевна – мл. науч. сотр. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0001-6304-4607

Андреев Дмитрий Николаевич – канд. мед. наук, доц. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-4007-7112

Осипенко Юлия Владимировна – врач-гастроэнтеролог отделения патологии поджелудочной железы и желчных путей ГБУЗ «МКНЦ им. А.С. Логинова». ORCID: 0000-0002-6254-3233

Бордин Дмитрий Станиславович – д-р мед. наук, проф. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова», зав. отд. патологий поджелудочной железы, желчных путей и верхних отделов пищеварительного тракта ГБУЗ «МКНЦ им. А.С. Логинова», проф. каф. общей врачебной практики и семейной медицины ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ». ORCID: 0000-0003-2815-3992

✉ **Anna I. Levchenko.** E-mail: alevchenko914@gmail.com; ORCID: 0000-0003-3184-7426

Igor V. Maev. ORCID: 0000-0001-6114-564X

Julia S. Galeeva. ORCID: 0000-0001-6304-4607

Dmitry N. Andreev. ORCID: 0000-0002-4007-7112

Julia V. Osipenko. ORCID: 0000-0002-6254-3233

Dmitry S. Bordin. ORCID: 0000-0003-2815-3992

Comparative analysis of the intestinal microbiota in patients with exocrine pancreatic insufficiency of various severity

Igor V. Maev¹, Anna I. Levchenko^{✉1}, Julia S. Galeeva², Dmitry N. Andreev¹, Julia V. Osipenko³, Dmitry S. Bordin^{1,3,4}, Elena N. Ilyina²

¹Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia;

²Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia;

³Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow, Russia;

⁴Tver State Medical University, Tver, Russia

Abstract

Background. Exocrine pancreatic insufficiency (EPI) is a critical host factor in determining the composition of the gut microbiota. Diseases that cause exocrine insufficiency can affect the gut microbiome, which can potentiate disease progression and complications. To date, the relationship of exocrine insufficiency in various pancreatic (PA) pathologies, in chronic pancreatitis (CP), with dysbiotic changes in the intestinal microbiota (IM) has not been reliably studied. The available data are heterogeneous and contradictory, which determines the need for further research.

Aim. To conduct a comparative analysis of the taxonomic composition of the intestinal microbiota in patients with CP of various etiologies, without or with the presence of EPI of varying severity, as well as patients with severe EPI with a history of surgical intervention (SI) on the pancreas.

Materials and methods. A total of 85 patients were included in the study. Patients were divided into groups according to the severity of EPI: Group 1 ($n=16$) – patients with CP without EPI; Group 2 ($n=11$) – patients with CP and mild EPI; Group 3 ($n=17$) – patients with severe CP and EPI; Group 4 ($n=41$) – severe EPI in persons with a history of SI on the pancreas. Verification of CP was carried out according to clinical, anamnestic and instrumental data. The degree of EPI was determined by the level of pancreatic elastase-1 (PE-1) feces. Informed consent for the study was obtained for each patient, an anamnesis was collected, physical and laboratory examinations were performed, and a stool sample was obtained. DNA was extracted from each stool sample, the taxonomic composition of BM was determined by sequencing the bacterial 16S rRNA genes, followed by bioinformatic analysis.

Results. We followed the changes in the gut microbiota from a group of patients with CP without EPI to a group with severe EPI, in those who underwent SI. At the level of the phylum, the IM of all groups showed the dominance of *Firmicutes*, with the lowest representation in the severe EPI group, both with SI and CP, and the growth of the *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota* and *Fusobacteria* types. The differential representation of childbirth varied: in patients with severe EPI and CP, compared with mild, statistically significant genera – *Akkermansia*, *Ruminococcus gauvreauii* group and *Holdemanella*; compared with CP without exocrine insufficiency, *Prevotella*, *Ruminococcus gauvreauii* group, *Peptostreptococcus* and *Blautia* dominated. The CP group with mild EPI was dominated by the following genera: *Lachnospiraceae_ND 2004* group, *Faecalitalea*, *Fusobacterium*, *Catenibacterium*, *Roseburia*, *Atopobium*, *Cloacibacillus*, *Clostridium innococum* group, *Ruminococcus torques* group. All groups showed a low diversity of taxa with a predominance of opportunistic flora, including participants in oncogenesis.

Conclusion. The results of the study show that patients with CP of various etiologies and patients with severe EPI who underwent specific intervention on the pancreas have intestinal microbiota dysbiosis, the severity of which is significantly influenced by the degree of EPI.

Keywords: chronic pancreatitis, exocrine pancreatic insufficiency, intestinal microbiota, 16S rRNA

For citation: Maev IV, Levchenko AI, Galeeva JuS, Andreev DN, Osipenko JuV, Bordin DS, Ilyina EN. Comparative analysis of the intestinal microbiota in patients with exocrine pancreatic insufficiency of various severity. *Terapevticheskii Arkhiv (Ter. Arkh.)*. 2023;95(2):130–139. DOI: 10.26442/00403660.2023.02.202056

Введение

Хронический панкреатит (ХП) – это патологический фиброзно-воспалительный синдром поджелудочной железы (ПЖ) у людей с генетическими, средовыми и/или другими факторами риска, у которых развиваются стойкие патологические реакции на повреждение паренхимы [1]. Длительное и прогрессирующее воспаление неизбежно вовлекает в патологический процесс ацинусы, протоковую систему, островковый аппарат и другие структуры органа [2, 3]. Наиболее частым осложнением ХП является экзокринная недостаточность ПЖ (ЭНПЖ) [4]. Клиническое значение ЭНПЖ обусловлено формированием персистирующей клинической симптоматики, значительно снижающей качество жизни пациентов [1, 4]. Нарушение синтеза пищеварительных ферментов, бикарбонатов и антибактериальных пептидов ПЖ на фоне ЭНПЖ приводит к нарушению симбиотических отношений хозяин – кишечная микробиота (КМ) и негативным изменениям бактериального пейзажа [5, 6]. КМ является ключевым участником метаболизма хозяина, играя важную роль в поддержании иммунного гомеостаза [7]. Изменения КМ активно изучаются мировым медицинским сообществом в контексте

патогенеза различных заболеваний, таких как сахарный диабет 2-го типа [8, 9], ожирение [10, 11], воспалительные заболевания кишечника [12–14], синдром раздраженного кишечника [15, 16], немаловажная роль отводится изучению связи нарушений КМ при ХП [17–20].

Одним из наиболее перспективных методов изучения состава КМ человека является метагеномное ДНК-секвенирование последовательностей бактериальных генов 16S рРНК [21]. В ряде исследований определены количественные и качественные изменения таксономического состава КМ, ассоциированные с ХП различной этиологии [22], в частности с ЭНПЖ [23, 24], алкогольным панкреатитом [25], сахарным диабетом панкреатогенного генеза [26], аутоиммунным панкреатитом [27]. ХП ассоциирован с сокращением разнообразия, истощением таксонов, играющих потенциально полезную роль в барьерной функции кишечника, увеличением числа условно-патогенных микроорганизмов [22]. Исследования, касающиеся изменений микробиоты при ХП и/или ЭНПЖ, представлены в единичном количестве [26]. Обнаружено снижение представителей рода *Faecalibacterium*, в частности *Faecalibacterium prausnitzii* (продуцентов короткоцепочечных жирных кислот – КЦЖК), повыше-

Ильина Елена Николаевна – чл.-кор. РАН, проф. РАН, д-р биол. наук, гл. науч. сотр., зам. ген. дир. по научной работе ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0003-0130-5079

Elena N. Ilyina. ORCID: 0000-0003-0130-5079

ние представленности *Ruminococcus bromii* [26], *Serratia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Enterococcus* [25], *Bacteroides ovatus*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus gordonii*, *Clostridium lavalense*, *Clostridium lactatifermentans* [27], *Escherichia-Shigella*, *Dialister*, *ParaBacteroides*, *Prevotella_7* [23]. К текущему моменту остается неизвестным, является ли дестабилизация эубиоза причиной или следствием ХП. Также не определен паттерн влияния заместительной ферментной терапии (ЗФТ) на гомеостаз КМ.

Таким образом, представляется актуальным дальнейшее изучение изменений КМ у пациентов с ХП, в частности с ЭНПЖ, что позволит определить бактериальные маркеры, ассоциированные с течением заболевания, а в перспективе создать диагностический инструмент, позволяющий предиктивно оценить эффективность ЗФТ, риски прогрессирования заболевания и развития ряда осложнений.

Цель исследования – провести сравнительный анализ таксономического состава КМ пациентов с ХП различной этиологии, с наличием/без ЭНПЖ, а также пациентов с тяжелой степенью ЭНПЖ, с оперативным вмешательством (ОВ) на ПЖ в анамнезе.

Материалы и методы

Дизайн

Проведено одномоментное сравнительное неинтервенционное исследование, в рамках которого произведен анализ КМ у пациентов с ХП и лиц, перенесших ОВ на ПЖ. Набор пациентов осуществлялся на клинических базах ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» в период с октября 2019 по октябрь 2021 г. Всего в исследование вошли 85 пациентов (мужчины и женщины в возрасте от 31 до 80 лет), включая больных с верифицированным диагнозом ХП ($n=44$) и пациентов, перенесших ОВ на ПЖ в анамнезе ($n=41$). Разделение пациентов на группы осуществлялось в зависимости от степени тяжести ЭНПЖ, что позволило сформировать 4 группы из общего пула больных: 1-я группа ($n=16$) – пациенты с ХП без ЭНПЖ; 2-я группа ($n=11$) – пациенты с ХП с наличием ЭНПЖ легкой степени; 3-я группа ($n=17$) – пациенты с ХП с ЭНПЖ тяжелой степени; 4-я группа ($n=41$) – ЭНПЖ тяжелой степени у лиц с ОВ на ПЖ в анамнезе (рис. 1). Все пациенты давали письменное информированное согласие на включение в исследование.

Пациенты, получающие антибиотики, про-, пре-, синбиотики, ингибиторы протонной помпы в течение месяца до сбора образца кала, пациенты имеющие клинико-лабораторные признаки острого панкреатита (ОП), гепатита, цирроза печени любой этиологии и кислотозависимых заболеваний, не включались в исследование.

Методы клинического обследования

Для каждого пациента собран анамнез жизни, зафиксированы метадаанные: пол, возраст, индекс массы тела (ИМТ), доза принимаемых полиферментных препаратов, консистенция стула по Бристольской шкале, симптомы диспепсии, данные мультиспиральной компьютерной томографии; данные лабораторных анализов: панкреатическая эластаза-1 кала, нейтральный жир в кале, гемоглобин, общий белок, альбумин, абсолютное число лимфоцитов (abs. LYM); документированное ОВ на ПЖ.

Верификация диагноза ХП осуществлялась по клинико-анамнестическим и инструментальным данным:

- 1) один/несколько анамнестических критериев ХП – регулярное употребление алкоголя (более 100 г/сут); табакокурение в течение нескольких лет; докумен-

ально подтвержденная патология билиарного тракта; документированный ОП в анамнезе;

- 2) признаки ХП по данным мультиспиральной компьютерной томографии.

Степень ЭНПЖ оценивалась путем определения уровня панкреатической эластазы-1 кала, где показатель >200 мкг/г – отсутствие ЭНПЖ, 200–100 мкг/г – ЭНПЖ легкой степени, <100 мкг/г – тяжелая степень ЭНПЖ.

Сбор и обработка клинического материала

Для проведения исследования производился сбор кала каждого пациента, включенного в исследование. Образцы фекалий собирались в индивидуальные стерильные пластиковые контейнеры, исключая попадание туалетной бумаги и мочи. Каждый образец подвергали немедленной заморозке при температуре -20°C . В течение 2 ч в термосумке с замороженными хладоэлементами образцы транспортированы в лабораторию, где хранились при температуре -80°C до анализа. Из образцов кала выделяли тотальную ДНК согласно стандартной методике.

Метагеномное секвенирование

Выделение тотальной ДНК проводили с помощью набора MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit (Roche) и автоматической выделительной станции KingFisher Flex. Подготовку библиотек и их секвенирование осуществляли в соответствии с протоколом 16S Metagenomic Sequencing Library preparation для MiSeq, Illumina.

Для амплификации использовали варибельный регион V3-V4 гена 16S рРНК. Приготовление библиотек 16S проводили набором Tersus PCR kit (Evrogen, Россия), использовали праймеры 341F и 801R для амплификации региона V3-V4 гена 16S рРНК, для баркодирования образцов использовались уникальные комбинации индексирующих праймеров, являющихся аналогами праймеров из набора Nextera XT Index kit v2.

Процедуру секвенирования осуществляли с помощью инструмента MiSeq с использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Kit v2 (500cycle) (Illumina) согласно рекомендациям производителя.

Биоинформатическая обработка полученных данных секвенирования

Обработку низкокачественных последовательностей проводили методом фильтрации filterAndTrim из пакета DADA2. Из пакета DADA2 получали варианты последовательностей ампликонов – ВПА (аналог ОТЕ-операционная таксономическая единица). Полученные ВПА таксономически аннотировали методом idTaxa из пакета DECIPHER (версия 11.7) с использованием базы последовательностей рРНК Silva (версия 138.1, nr99). Статистический анализ представленности последовательностей ампликонов выполняли на языке программирования R (версия 4.0.2).

Для расчета индекса β -разнообразия значения представленности ВПА (ASV, Amplicon Sequence Variant) нормализовали при помощи функции transform пакета microbiome (версия 1.10.0). Матрица попарных расстояний рассчитывалась по метрике Брея–Кертиса с помощью функции dist пакета phyloseq (версия 1.32.0). Значения меры α -разнообразия рассчитывали как индекс Шеннона при помощи функции plot_richness пакета phyloseq (версия 1.32.0). Анализ дифференциальной представленности для групп сравнения выполнен с использованием инструмента Deseq 2 (версия 1.28.1). Учитывая факт, что между исследуемыми группами пациентов отмечены различия в

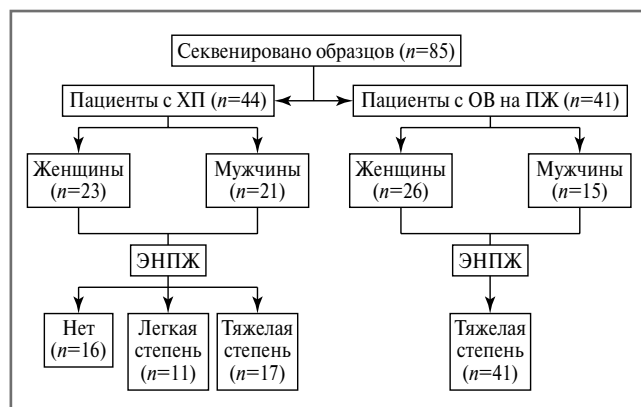


Рис. 1. Участники исследования. Деление на группы.

Fig. 1. Study participants. Division into groups.

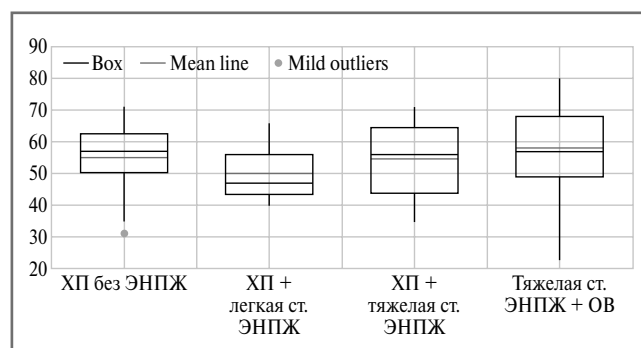


Рис. 2. Соотношение исследуемых групп по возрасту.

Fig. 2. The distribution of participants in study groups by age.

наборе метаданных, анализ дифференциальной представленности проводили с учетом влияния данных факторов на состав микробиоты в качестве ковариат. При проверке статистических гипотез минимальный уровень α составил 0,05 (по методу Бенджамини–Хохберга), а размер эффекта $\log_2\text{foldchange} > 1.5$.

Этическая экспертиза

Настоящий протокол исследования одобрен Межвузовским Комитетом по этике ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» (выписка из протокола №01–21). Заключение комиссии: работа соответствует требованиям этической экспертизы.

Результаты

Клиническая характеристика пациентов

В исследование включены 85 пациентов (см. рис. 1), из которых 47 (55%) женщин и 38 (45%) мужчин, средний возраст обследованных лиц составил $56,2 \pm 12,7$ года. Среди женщин медиана 56 лет (интерквартильный размах – ИК 45,5; 64,5), мужчин – 58 лет (ИК 47,0; 66,7) без статистически значимой разницы ($p < 0,001$).

Распределение по полу – с незначительным перевесом в сторону женщин в 1-й (68,7%), 3-й (58,8%) и 4-й (63,4%) группах. Соотношение по возрасту статистически не значимо ($p < 0,001$); рис. 2.

Показатель ИМТ (рис. 3) – без значимых отличий между пациентами с ХП и лицами, перенесшими ОВ на ПЖ в анамнезе. Медиана в 1-й группе – $24,5 \text{ кг/м}^2$ (ИК 20,8; 27,9), во 2-й группе – $23,4 \text{ кг/м}^2$ (ИК 20,3; 26,2), в 3-й группе – $22,1 \text{ кг/м}^2$ (ИК 17,9; 24,4), в 4-й группе – $23,0 \text{ кг/м}^2$

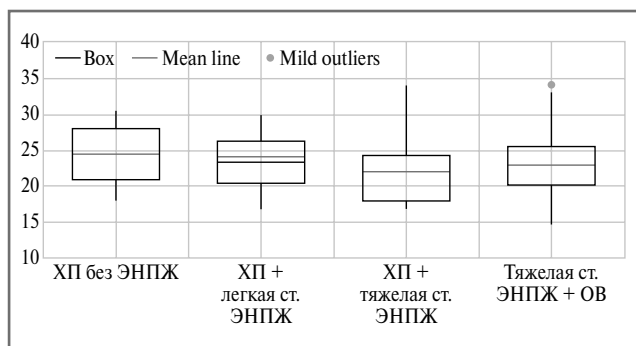


Рис. 3. Соотношение по ИМТ в группах.

Fig. 3. Ratios of participants in study groups by body mass index.

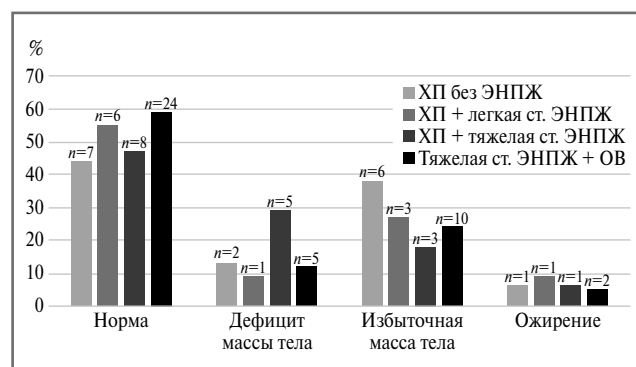


Рис. 4. Распределение в группах по показателю ИМТ.

Fig. 4. The distribution of participants in study groups by body mass index.

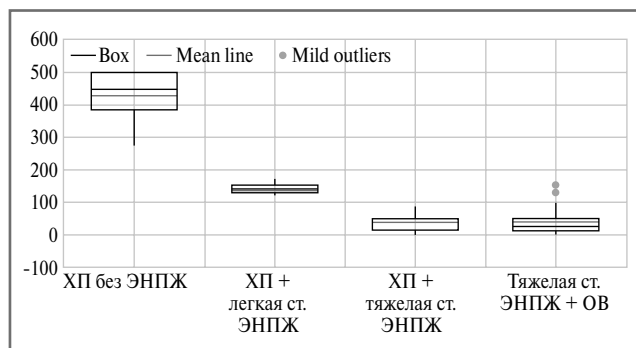


Рис. 5. Соотношение количества панкреатической эластазы-1 кала в исследуемых группах.

Fig. 5. The distribution of pancreatic fecal elastase-1 levels in the study groups.

(ИК 20,2; 25,5). Внутригрупповое распределение по ИМТ продемонстрировано на рис. 4.

Медиана панкреатической эластазы-1 кала в 1-й группе – $446,8 \text{ мкг/г}$ (ИК 385,2; 500,0), во 2-й группе – 139 мкг/г (ИК 129,0; 152,5), в 3-й группе – $48,0 \text{ мкг/г}$ (ИК 15,0; 50,0), в 4-й группе – $24,4 \text{ мкг/г}$ (ИК 11,0; 50,0); рис. 5.

В этиологической структуре ХП (рис. 6), в частности с ЭНПЖ, преобладали рецидивирующий и тяжелый ОП ($n=17$; 39%).

Наиболее частые анамнестические причины ОВ на ПЖ: аденокарцинома ПЖ ($n=8$; 20%); кальцифицирующая панкреатит ($n=5$; 12%); солидная псевдопапиллярная опухоль ($n=5$; 12%) и др. (рис. 7).



Рис. 6. Этиологическая структура ХП в соответствии с международной классификацией TIGAR-O.

Fig. 6. Etiology of chronic pancreatitis according to the international classification TIGAR-O.

Обобщенные демографические и клинические характеристики пациентов представлены в табл. 1.

Общая оценка таксономического состава КМ в исследуемых группах

Тепловая карта (рис. 8) иллюстрирует представленность родов в образцах кала 85 пациентов с ХП и ЭНПЖ; цвета отражают значения представленности соответствующих бактериальных родов после преобразования CLR (centered log ratio transform).

Для определения α -разнообразия использовали индекс разнообразия Шеннона, количественно оценивающий неопределенность в прогнозировании видовой идентичности, которая берется случайным образом из набора данных. Между исследуемыми группами не выявлено значимой разницы в α -разнообразии ($p < 0,05$), а внутри сообществ обнаружено общее снижение бактериального разнообразия (рис. 9).

Описание линейной диаграммы блока: снизу вверх – первый квартиль, показывает минимальное значение (нижняя строка прямоугольника); медиана (линия в середине прямоугольника); третий квартиль (верхняя линия прямоугольника), показывает максимальное значение; данные вне выносных линий на обоих концах являются выбросами.

β -Разнообразие КМ 85 пациентов представлено в виде проекций графика неметрического многомерного шкалирования (NMDS) на двухмерное пространство (рис. 10). Образцы всех пациентов образуют облака с частичным

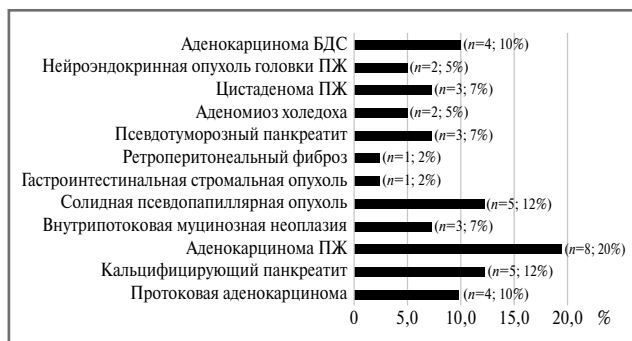


Рис. 7. Диаграмма этиологических факторов ОП по данным анамнеза.

Fig 7. Etiological factors of surgery according to medical history.

перекрытием в центре, большая часть которых расположена в зоне пересечения, что свидетельствует об отсутствии значимой разницы.

Относительная представленность бактериального состава на уровне типа в исследуемых группах

На уровне типов доминирующими во всех группах оказались *Firmicutes* (рис. 11). Наибольший процент – у пациентов 2-й группы (81,5% от общего процента представленных типов).

Представленность бактериального состава на уровне семейств в исследуемых группах

Для анализа выбраны топ-10 распространенных семейств (рис. 12). Для пациентов 4-й группы определено семейство *Akkermansia*; два семейства для 3-й группы – *Oscillospiraceae*, *Bacteroidaceae*.

Дифференциальная представленность бактериального состава на уровне рода в исследуемых группах

Анализ дифференциальной представленности бактериального состава в группах выполнен с использованием метода DeSeq2, на уровне рода, с включением пола, batch

Таблица 1. Демографические, клинические, лабораторные данные участников исследования

Table 1. Demographic, clinical, and laboratory data of study participants

Переменные	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
Мужчины, абс. (%)	31,25	63,64	41,18	36,59
Женщины, абс. (%)	68,75	34,36	58,82	63,41
Возраст, лет, среднее \pm CO	55 \pm 11,1	50 \pm 8,6	51,6 \pm 11,59	60,2 \pm 13,2
ИМТ, кг/м ² , среднее \pm CO	24,47 \pm 3,84	24,12 \pm 5,6	22,39 \pm 4,09	22,96 \pm 4,21
Консистенция (тип по Bristol scale), среднее	4	4	6	6
Частота стула, ≥ 3 в сут, да, %	18,75	45,45	64,71	85,37
Диспепсия (тошнота, вздутие), да, %	18,75	36,36	70,59	85,37
Абдоминальная боль, да, %	50	36,36	76,47	65,85
Нейтральный жир в кале, обнаружено, %	0	9,09	5,88	7,32
Гемоглобин, г/дл, среднее \pm CO	129,18 \pm 14,87	135,36 \pm 18,12	134,47 \pm 13,59	127,78 \pm 16,46
Абсолютное число лимфоцитов, $\times 10^9$ /л, среднее \pm CO	1,58 \pm 0,47	1,97 \pm 0,66	1,89 \pm 0,63	2,09 \pm 0,94
Общий белок, г/л, среднее \pm CO	76,46 \pm 6,74	73,38 \pm 6,16	69,75 \pm 5,49	70,9 \pm 6,66
Альбумин, г/л, среднее \pm CO	43,91 \pm 4,92	43,6 \pm 3,51	42,92 \pm 2,94	39,55 \pm 5,1

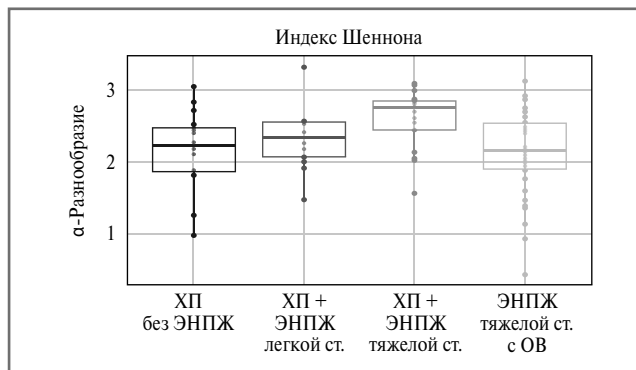


Рис. 9. Таксономическое α -разнообразие КМ в исследуемых группах.

Fig. 9. Taxonomic α -diversity of the intestinal microbiota in the study groups.

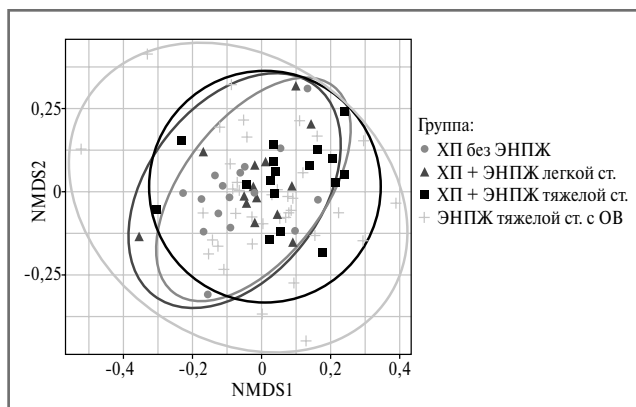


Рис. 10. График сходства таксономического состава (β -разнообразия) КМ пациентов с ХП и ЭНПЖ, проведенный на основании неметрического многомерного шкалирования (NMDS) по видовому разнообразию (метрика различия: мера Брея–Кертиса) методом главных компонент.

Fig. 10. Graph of the similarity of the taxonomic composition (β -diversity) of the intestinal microbiota in patients with chronic pancreatitis and exocrine pancreatic insufficiency, measured using non-metric multidimensional scaling (NMDS) by species diversity (Brea–Curtis dissimilarity) using the principle component analyses.

Roseburia; тип *Actinobacteria* – *Atopobium*; тип *Synergistota* – *Cloacibacillus*.

Первая группа представлена типом *Firmicutes* со статистически значимыми родами *Erysipelatoclostridium* и *Merdibacter*. В 3-й группе представители филума *Firmicutes* – *Ruminococcus gauvreauii* group, *Peptostreptococcus* и *Blautia*; тип *Bacteroides* – *Prevotella*. У пациентов 2-й группы рода типа *Firmicutes*: *Faecalitalea*, *Lachnospiraceae*_ND 2004 group и др. В 3-й группе тип *Firmicutes* представлен родами *Ruminococcus gauvreauii* group и *Holdemanella*; тип *Verrucomicrobiota* – *Akkermansia*. В 4-й группе тип *Actinobacteria* представлен родом *Lawsonella* (рис. 14).

Обсуждение

Согласно результатам нашего исследования уровень таксономического разнообразия варьировал между четырьмя группами, с самыми низкими показателями в группе оперированных пациентов с тяжелой ЭНПЖ, что потенциально может играть роль в прогрессировании сим-

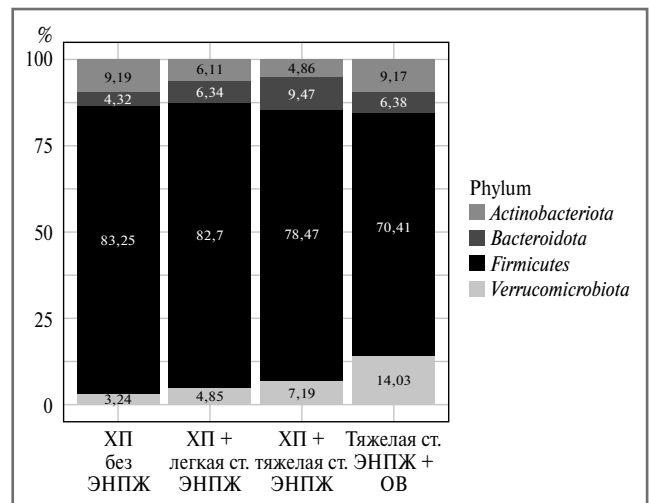


Рис. 11. График относительной представленности четырех наиболее распространенных типов образцов кала всех случаев с ХП и различной степенью ЭНПЖ.

Fig. 11. Graph of the relative abundance of the four most common types of fecal specimens of all patients with chronic pancreatitis and different degrees of exocrine pancreatic insufficiency.

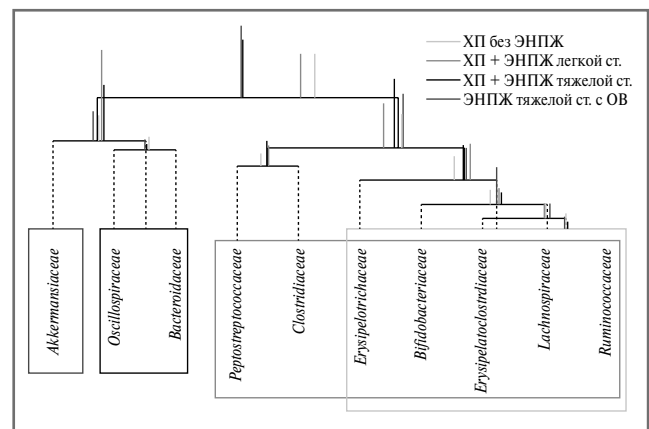


Рис. 12. Визуализация балансов КМ пациентов с различной степенью ЭНПЖ с помощью CoDa-дендрограммы (для анализа выбраны топ-10 распространенных семейств).

Fig. 12. Visualization of the intestinal microbiota balance in patients with varying degrees of exocrine pancreatic insufficiency using a CoDa-dendrogram (top-10 common families were selected for analysis).

птомов, связанных с ЭНПЖ. Снижение α -разнообразия не показало зависимости от ЭНПЖ, что демонстрирует схожесть с предыдущими исследованиями [22, 23].

У пациентов всех групп преобладал тип *Firmicutes*. Схожие данные у S. Jandhyala и соавт. (2017 г.), сообщающих об увеличении типов *Firmicutes* и *Actinobacteria* [26]. Другие исследования, напротив, отмечают снижение численности *Firmicutes* и *Actinobacteria* у пациентов с ХП и ЭНПЖ [22–25, 27].

На уровне рода в группе ХП с легкой ЭНПЖ мы обнаружили увеличение рода *Fusobacterium*, что стало находкой и у пациентов с хроническим алкогольным панкреатитом в исследовании D. Ciocan и соавт. (2018 г.) [25].

Другой находкой оказалось увеличение рода *Prevotella* филума *Bacteroides* у пациентов с ХП без ЭНПЖ в сравнении

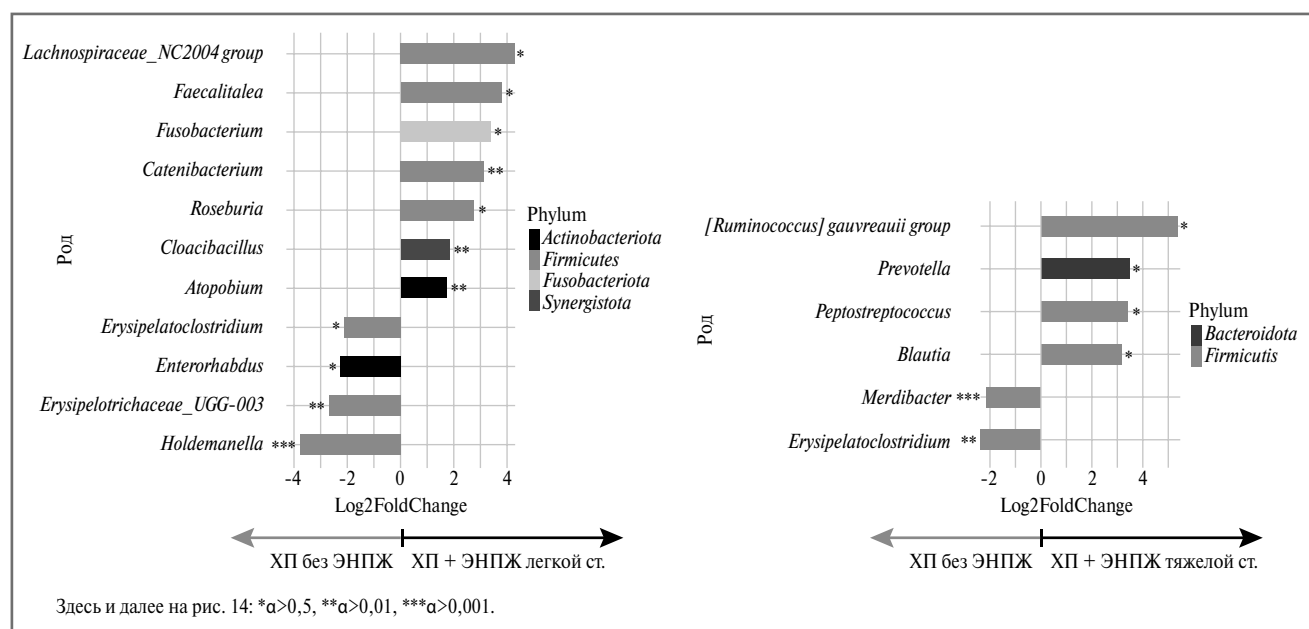


Рис. 13. Анализ дифференциальной представленности 16S ампликонов бактерий, агрегированных на уровне рода и ассоциированных с 1, 2, 3-й группами. Справа и слева от столбцов отображен уровень статистической значимости, рассчитанный по результатам анализа для каждого дифференциально представленного рода.

Fig. 13. Analysis of the differential abundance of 16S bacterial amplicons agglomerated at the genus level and associated with groups 1, 2, and 3. The statistical significance level calculated from the analysis results for each differentially abundant genus is displayed to the right and left of the columns.

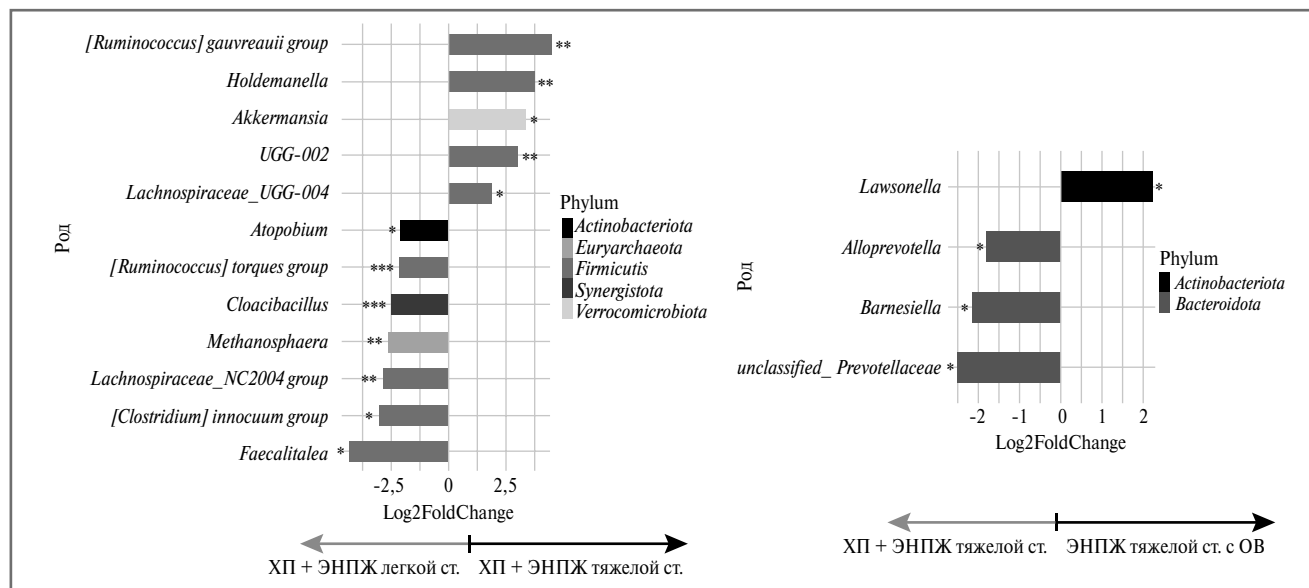


Рис. 14. Анализ дифференциальной представленности 16S ампликонов бактерий, агрегированных на уровне рода и ассоциированных со 2, 3 и 4-й группами. Справа и слева от столбцов отображен уровень статистической значимости, рассчитанный по результатам анализа для каждого дифференциально представленного рода.

Fig. 14. Analysis of the differential abundance of 16S bacterial amplicons agglomerated at the genus level and associated with groups 2, 3, and 4. The statistical significance level calculated from the analysis results for each differentially abundant genus is displayed to the right and left of the columns.

с группой пациентов с ОВ и тяжелой ЭНПЖ, который также статистически значим для группы хронического алкогольного панкреатита в исследовании D. Сюсан и соавт. (2018 г.) [25]. Отмечается, что *Prevotella* – род, обнаруженный в ткани ПЖ пациентов с панкреатодуоденальной резекцией.

Наше исследование показало значимую представленность бактерий рода *Peptostreptococcus* и *Erysipelotrichaceae_*

UGG-003 у пациентов с ХП без ЭНПЖ и *Lachnospiraceae_* *ND 2004 group* у пациентов с ХП и легкой степенью ЭНПЖ, что частично совпадает с результатами С. Zhou и соавт. (2019) [23].

Мы обнаружили ряд таксонов, о которых не сообщалось в предыдущих исследованиях, – рода *Holdemanella*, *Atopobim*, *Blautia*.

Насколько нам известно, исследования с включением в исследование пациентов, перенесших ОВ на ПЖ, отсутствовали. У пациентов с тяжелой ЭНПЖ и ОВ на ПЖ в сравнении с пациентами с ХП и тяжелой ЭНПЖ дифференцирован род *Lawsonella*, к которому в настоящее время относится один новый типовой вид семейства *Corynebacterineae* – *Lawsonella clevelandensis* [28]. Также обнаружили статистически значимую представленность рода *Akkermansia* типа *Verrucomicrobiota* у пациентов с ХП и тяжелой степенью ЭНПЖ.

Заключение

У пациентов с ХП независимо от степени тяжести ЭНПЖ наблюдается снижение бактериального разнообразия. У пациентов с легкой степенью ЭНПЖ отмечается увеличение доли условно-патогенных бактерий (*Atopobium*, *Cloacibacillus*, *Faecalitalea*, *Fusobacterium* и др.); мало представлены производители КЦЖК. В группе ХП без ЭНПЖ обнаружены рода с условно-патогенным потенциалом: *Erysipelatoclostridium*, *Erysipelotrichaceae_UGG-003*, *Holdemanella*, *Enterorhabdus*, *Merdibacter*; у пациентов с тяжелой ЭНПЖ условно-патогенная микробиота представлена родами *Blautia*, *Peptostreptococcus*, *Holdemanella*, *Prevotella* в отсутствие представителей продуцентов КЦЖК.

Поскольку мы использовали секвенирование бактериального гена 16S рРНК для характеристики изменений в составе КМ, нельзя точно определить, имеет ли каждый штамм явные патогенные свойства и какой вклад вносит каждый. Однако общее их увеличение с одновременным истощением потенциально защитных таксонов делают вероятным, что наблюдаемые изменения КМ имеют определенный эффект на прогрессирование и развитие осложненной ХП, вплоть до инициации онкогенеза. В перспективе для установления достоверных связей изменения таксономического состава КМ с патогенезом и прогрессированием ХП, в частности с учетом степени ЭНПЖ, эффективностью проводимой ЗФТ, необходимо изучение видовой представленности бактерий их метаболического потенциала и взаимодействия друг с другом при помощи полногеномного секвенирования с дальнейшим использованием полученных результатов в качестве биомаркеров.

Раскрытие интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Авторы декларируют отсутствие внешнего финансирования для проведения исследования и публикации статьи.

Funding source. The authors declare that there is no external funding for the exploration and analysis work.

Информированное согласие на публикацию. Пациенты подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

Consent for publication. Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information and all of accompanying images within the manuscript.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом при ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» (выписка из протокола №01–21 от 28.01.2021). Одобрение и процедуру проведения протокола получали по принципам Хельсинкской конвенции.

Ethics approval. The study was approved by the local ethics committee of Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (protocol №01–21 from 28.01.2021). The approval and procedure for the protocol were obtained in accordance with the principles of the Helsinki Convention.

Список сокращений

ВПА – варианты последовательностей ампликонов
ЗФТ – заместительная ферментальная терапия
ИК – интерквартильный размах
ИМТ – индекс массы тела
КМ – кишечная микробиота
КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты

ОВ – оперативное вмешательство
ОП – острый панкреатит
ПЖ – поджелудочная железа
ХП – хронический панкреатит
ЭНПЖ – экзокринная недостаточность поджелудочной железы

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Gardner TB, Adler DG, Forsmark CE, et al. ACG Clinical Guideline: Chronic Pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2020;115(3):322-39. DOI:10.14309/ajg.0000000000000535
- Löhr JM, Dominguez-Munoz E, Rosendahl J, et al. United European Gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis (HaPanEU). *United European Gastroenterol J.* 2017;5(2):153-99. DOI:10.1177/2050640616684695
- Ивашкин В.Т., Маев И.В., Охлобыстин А.В., и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению экзокринной недостаточности поджелудочной железы. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2017;27(2):54-80 [Ivashkin VT, Maev IV, Okhlobystin AV, et al. Diagnostics and treatment of exocrine pancreatic insufficiency: clinical guidelines of the Russian gastroenterological Association. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2017;27(2):54-80 (in Russian)]. DOI:10.22416/1382-4376-2017-27-2-54-80
- Маев И.В., Кучерявый Ю.А., Андреев Д.Н., Бидеева Т.В. Статус питания больных хроническим панкреатитом. *Терапевтический архив.* 2016;88(2):81-9 [Maev IV, Kucheryavyi YuA, Andreev DN, Bideeva TV. Nutritional status in patients with chronic pancreatitis. *Terapevticheskii Arkhiv (Ter. Arkh.).* 2016;88(2):81-9 (in Russian)].
- Ammer-Herrmenau C, Pfisterer N, Weingarten MF, Neesse A. The microbiome in pancreatic diseases: Recent advances and future perspectives. *United European Gastroenterol J.* 2020;8(8):878-85. DOI:10.1177/2050640620944720

6. Gesualdo M, Rizzi F, Bonetto S, et al. Pancreatic Diseases and Microbiota: A Literature Review and Future Perspectives. *J Clin Med.* 2020;9(11):3535. DOI:10.3390/jcm9113535
7. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(6):341-52. DOI:10.1038/nri.2016.42
8. Scheithauer TPM, Rampanelli E, Nieuwdorp M, et al. Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. *Front Immunol.* 2020;11:571731. DOI:10.3389/fimmu.2020.571731
9. Gurung M, Li Z, You H, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine.* 2020;51:102590. DOI:10.1016/j.ebiom.2019.11.051
10. Forte N, Fernández-Rilo AC, Palomba L, et al. Obesity Affects the Microbiota-Gut-Brain Axis and the Regulation Thereof by Endocannabinoids and Related Mediators. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1554. DOI:10.3390/ijms21051554
11. Coppola S, Avagliano C, Calignano A, Berni Canani R. The Protective Role of Butyrate against Obesity and Obesity-Related Diseases. *Molecules.* 2021;26(3):682. DOI:10.3390/molecules26030682
12. Dong LN, Wang M, Guo J, Wang JP. Role of intestinal microbiota and metabolites in inflammatory bowel disease. *Chin Med J (Engl).* 2019;132(13):1610-4. DOI:10.1097/CM9.000000000000290
13. Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res.* 2019;2019:7247238. DOI:10.1155/2019/7247238
14. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol.* 2017;52(1):1-8. DOI:10.1007/s00535-016-1242-9
15. Moser G, Fournier C, Peter J. Intestinal microbiome-gut-brain axis and irritable bowel syndrome. Intestinale Mikrobiom-Darm-Hirn-Achse und Reizdarmsyndrom. *Wien Med Wochenschr.* 2018;168(3-4):62-6. DOI:10.1007/s10354-017-0592-0
16. Ивашкин В.Т., Зольникова О.Ю. Синдром раздраженного кишечника с позиций изменений микробиоты. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2019;29(1):68-76 [Ivashkin VT, Zolnikova OYu. Irritable Bowel Syndrome in Terms of Changes in the Microbiota. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2019;29(1):68-76 (in Russian)]. DOI:10.22416/1382-4376-2019-29-1-84-92
17. Евсютина Ю.В., Ивашкин В.Т. Роль микробиома в развитии заболеваний поджелудочной железы. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2017;27(3):11-7 [Evsyutina YuV, Ivashkin VT. Microbiome role in pancreatic diseases development. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2017;27(3):11-7 (in Russian)]. DOI:10.22416/1382-4376-2017-27-3-11-17
18. Brubaker L, Luu S, Hoffman K, et al. Microbiome changes associated with acute and chronic pancreatitis: A systematic review. *Pancreatology.* 2021;21(1):1-14. DOI:10.1016/j.pan.2020.12.013
19. Schepis T, De Lucia SS, Nista EC, et al. Microbiota in Pancreatic Diseases: A Review of the Literature. *J Clin Med.* 2021;10(24):5920. DOI:10.3390/jcm10245920
20. Pan LL, Li BB, Pan XH, Sun J. Gut microbiota in pancreatic diseases: possible new therapeutic strategies. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(7):1027-39. DOI:10.1038/s41401-020-00532-0
21. Шаликиани Н.В., Бакулин И.Г., Дубинкина В.Б., и др. Особенности состава микробиоты кишечника у пациентов с алкогольным циррозом печени. *Терапевтический архив.* 2015;87(12):59-65 [Shalikiani NV, Bakulin IG, Dubinkina VB, et al. Specific features of the enteric microbiota composition in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Terapevticheskiy Arkhiv (Ter. Arkh.).* 2015;87(12):59-65 (in Russian)]. DOI:10.17116/terarkh2015871259-65
22. Frost F, Weiss FU, Sendler M, et al. The Gut Microbiome in Patients With Chronic Pancreatitis Is Characterized by Significant Dysbiosis and Overgrowth by Opportunistic Pathogens. *Clin Transl Gastroenterol.* 2020;11(9):e00232. DOI:10.14309/ctg.0000000000000232
23. Zhou CH, Meng YT, Xu JJ, et al. Altered diversity and composition of gut microbiota in Chinese patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology.* 2020;20(1):16-24. DOI:10.1016/j.pan.2019.11.013
24. Frost F, Kacprowski T, Rühlemann M, et al. Impaired Exocrine Pancreatic Function Associates With Changes in Intestinal Microbiota Composition and Diversity. *Gastroenterology.* 2019;156(4):1010-5. DOI:10.1053/j.gastro.2018.10.047
25. Ciocan D, Rebours V, Voican CS, et al. Characterization of intestinal microbiota in alcoholic patients with and without alcoholic hepatitis or chronic alcoholic pancreatitis. *Sci Rep.* 2018;8:4822. DOI:10.1038/s41598-018-23146-3
26. Jandhyala SM, Madhulika A, Deepika G, et al. Altered intestinal microbiota in patients with chronic pancreatitis: implications in diabetes and metabolic abnormalities. *Sci Rep.* 2017;7:43640. DOI:10.1038/srep43640
27. Hamada S, Masamune A, Nabeshima T, Shimosegawa T. Differences in Gut Microbiota Profiles between Autoimmune Pancreatitis and Chronic Pancreatitis. *Tohoku J Exp Med.* 2018;244(2):113-7. DOI:10.1620/tjem.244.113
28. Bell ME, Bernard KA, Harrington SM, et al. *Lawsonella clevelandensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder Corynebacterineae isolated from human abscesses. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(8):2929-35. DOI:10.1099/ijsem.0.001122

Статья поступила в редакцию / The article received: 28.04.2022



OMNIDOCTOR.RU