

МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА КАК ПРЕДИКТОР РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИЙ У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Чеботкевич В.Н., Кулешова А.В., Бессмельцев С.С., Грицаев С. В., Сидоркевич С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение “Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Россия

Резюме

Системные инфекции кровеносного русла являются грозными, жизненно опасными осложнениями у иммунокомпрометированных онкогематологических пациентов. Их микробиологическая диагностика, основанная на выявлении патогенов в крови, занимает не менее 24 часов и позволяет высевать возбудитель только в 40-60% случаев. Известно, что системные инфекции кровеносного русла у больных гемобластозами при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) значительно чаще наблюдаются при аллогенной, чем при аутологичной ТГСК (АТГСК). Это, а также указанные выше трудности микробиологической диагностики бактериемий, значительно затрудняют выявление инфекций именно у больных при АТГСК и диктуют необходимость разработки методов их прогнозирования. В настоящее время показано, что в развитии граммотрицательных инфекций кровотока ведущую роль играет эндогенное инфицирование из кишечника.

Цель. Определить качественные и количественные характеристики кишечного микробиома, способствующие развитию инфекций у пациентов с множественной миеломой при высокодозной химиотерапии и аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Материалы и методы. В исследование было включено 30 пациентов с множественной миеломой в возрасте 48-67 лет. Протокол исследования включал сбор и низкотемпературное замораживание образцов кала, полученных от больных до проведения АТГСК и в разные сроки от 7 до 35 дней после ее проведения. Всего было получено 98 образцов биоматериала. В каждом из биологических образцов выполнялась ПЦР-амплификация V5 региона гена 16S рРНК с помощью модифицированных универсальных бактериальных праймеров. Наряду с секвенированием проводили ПЦР-РВ с использованием набора «Колонофлор», позволяющим выявлять ДНК облигатных представителей микрофлоры толстого кишечника (бифидобактерий, лактобацилл,

кишечной палочки), а также условно-патогенных и патогенных микроорганизмов включая *Clostridium difficile*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp* и др.

Результаты. Наши исследования показали, что достоверное ($p=0,0215$) снижение индекса разнообразия наблюдается и при АТГСК. Доминирование типа Proteobacteria в спектре кишечного микробиома является независимым фактором развития грамотрицательных инфекций кровотока. У наблюдаемых нами больных частота типа Proteobacteria в микробиоте колебалась от 1 до 6 % и только в одном случае составила 40.66%.

Выводы. Состав микробиома кишечника значимо влияет на частоту развития инфекций у пациентов с множественной миеломой после проведения аутологичной ТГСК. При мониторинге состава микробиома следует оценивать образцы как до, так и после выполнения ТГСК.

Ключевые слова: микробиота кишечника, предикторы развития инфекции, множественная миелома, аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

INTESTINAL MICROBIOTA AS A PREDICTOR OF INFECTION DEVELOPMENT IN HEMATOLOGICAL CANCER PATIENTS DURING HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Chebotkevich V.N., Kuleshova A.V., Bessmeltsev S.S., Gritsaev S.V., Sidorkevich V.S.

Russian Research Institute of hematology and Transfusiology, Russia

Abstract

Systemic infections of the bloodstream are formidable, life-threatening complications in immunocompromised oncohematological patients. Their microbiological diagnostics, based on the detection of pathogens in the blood, takes at least 24 hours and allows seeding the pathogen only in 40-60% of cases. It is known that systemic infections of the bloodstream in patients with hemoblastoses during hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) are much more often observed with allogeneic than with autologous HSCT. This, as well as the above difficulties in the microbiological diagnosis of bacteremia, significantly complicate the detection of infections in patients with autologous HSCT and dictate the need to develop methods for their prediction. It has been shown that endogenous infection from the intestine plays a leading role in the development of Gram-negative bloodstream infections.

Aim. To determine the qualitative and quantitative characteristics of the intestinal microbiome that contribute to the development of infections in patients with multiple myeloma during high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation.

Materials and methods. The study included 30 patients with multiple myeloma aged 48-67 years (median 60 years), from 2020 to 2022, who underwent an autologous HSCT procedure. The study protocol included the collection and low-temperature freezing of stool samples obtained from patients before autologous HSCT and at different times from 7 to 35 days after it. A total of 98 biomaterial samples were obtained. In each of the biological samples, PCR amplification of the V5 region of the 16S rRNA gene was performed using modified universal bacterial primers. Along with sequencing, real-time PCR was performed at the same time, which allows to detect DNA of obligate representatives of the colon microflora (*Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, *Escherichia coli*), as well as opportunistic and pathogenic microorganisms, including *Clostridium difficile*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp, etc.

Results. Our studies have shown that a significant ($p=0.0215$) decrease in the diversity index is also observed in autologous HSCT. The dominance of the Proteobacteria type in the spectrum of the intestinal microbiome is an independent factor in the development of Gram-negative bloodstream infections. Of the patients we observed, the frequency of the type of Proteobacteria averaged from 1 to 6%, only in one case, the detection of the type of Proteobacteria was 40%.

Conclusion. The composition of the gut microbiome significantly affects the incidence of infections in patients with multiple myeloma after autologous HSCT. When monitoring microbiome composition, samples should be assessed both before and after HSCT.

Key words: gut microbiota, predictors of infection, multiple myeloma, autologous hematopoietic stem cell transplantation

ВВЕДЕНИЕ

Множественная миелома (ММ) составляет 1% среди всех онкогематологических заболеваний и 10% от общего числа гемобластозов. Заболевают ММ преимущественно пожилые люди (медиана возраста на момент установления диагноза – около 70 лет) и только единичные пациенты с множественной миеломой моложе 30 лет [1]. В последние годы возможности лечения ММ значительно расширились. Эти успехи связаны с применением таргетной терапии и трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Однако использование современных программ терапии увеличило риск возникновения инфекционных осложнений у онкогематологических больных, наиболее опасными из которых являются системные инфекции кровеносного русла. Инфекционные процессы усугубляют тяжесть состояния больных, приводят к отмене специфической терапии, удлинению перерывов в лечении и, как следствие, к прогрессии основного заболевания [2].

Ранее тяжелые бактериальные инфекции кровеносного русла рассматривались как экзогенные инфекции. Однако работы, проведенные в последнее десятилетие, показали, что эндогенное заражение из кишечника является основным путем проникновения микробов в кровоток у онкогематологических больных, чему способствует иммуносупрессия и частое развитие мукозитов у пациентов [3]. Выполнение этих работ стало возможным благодаря использованию принципиально новых молекулярных методов исследования кишечной микробиоты. До последнего времени основной проблемой диагностики качественного состава микробиоты кишечника оставалась неэффективность классических бактериологических методов обнаружения анаэробных микроорганизмов. Внедрение в практику новых методов идентификации микроорганизмов – полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) и секвенирования генома бактерий, коренным образом изменило подход к оценке кишечной микробиоты. Их использование позволило наиболее полно оценить видовой состав микробиоты, включающей более 1000 видов бактерий, 80 % из которых составляют некультивируемые микроорганизмы. Такие сведения послужили основой для проведения широких исследований по изучению показателей микробиоты кишечника, как предикторов развития инфекций кровотока, в частности, у иммуносупрессированных онкогематологических больных.

Цель. Определить качественные и количественные характеристики кишечного микробиома, способствующие развитию инфекций у пациентов с множественной миеломой при высокодозной химиотерапии и аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (АТГСК).

Материалы и методы. В исследование было включено 30 пациентов с множественной миеломой в возрасте 48-67 лет (медиана 60 лет), перенесших процедуру АТГСК в период с 2020 по 2022 годы. Клиническая характеристика обследованных больных представлена в таблице 1. Диагноз ММ устанавливали на основании критериев, разработанных International Myeloma Working Group (IMWG) в 2014 г. [4]. Стадирование ММ проводили по классификациям Durie–Salmon [5]. Протокол исследования включал сбор и низкотемпературное замораживание образцов кала, полученных от взрослых больных ММ, госпитализированных в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России для выполнения ТГСК до проведения АТГСК и в сроки от 7 до 35 дней после ее проведения.

Таблица 1

Клиническая характеристика обследованных больных

Количество пациентов	30
Возраст (годы)	60 (48-67)
Пол	
Мужской	15
Женский	15
Почечная недостаточность	
есть	3
нет	27
Заболевание	
Стадии ММ (по B. Durie, S. Salmon)	
IA	2
IIA	5
IIIB	1
IIIA	18
IIIB	4
Фебрильная нейтропения	4
Инфекции	
Сепсис, септический шок	1
Легочные осложнения	0
Инфекции мочевыводящих путей	1

В каждом из биологических образцов выполнялась ПЦР-амплификация V5 региона гена 16S рРНК с помощью модифицированных универсальных бактериальных праймеров. Очищенные ПЦР-продукты секвенировали с помощью платформы MiSeq Illumina. Филогенетическая классификация до видового уровня выполнялась на основании базы данных Illumina. После экстракции и очищения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в каждом из биологических образцов, выполняли ПЦР амплификацию V3-V4 региона гена 16SS рРНК. После формирования 16S метагеномной библиотеки осуществлялось секвенирование подготовленных образцов. Выполнялась ПЦР-амплификация V4–V5 региона гена 16SS р-РНК с помощью модифицированных универсальных бактериальных праймеров. Очищенные ПЦР-продукты секвенировали с помощью платформы MiSeq Illumina. Определение до видового уровня выполнялась на основании Байесовской модели, а также базы данных Greengenes: проверенной на химеризм базы генов 16S рРНК. Сиквенс-

последовательности группировались в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на основании 97 % идентичности. Общее количество генов 16S рРНК в расчёте на грамм биологического материала, т.е. мера бактериальной плотности, рассчитывалась с помощью количественного ПЦР исходя из общего количества ДНК, выделенного из каждого образца. Видовое разнообразие микробиоты оценивали с помощью индекса Шеннона по формуле $-\sum(p_i \cdot \log_2(p_i))$, где p_i - доля той или иной бактерии по отношению к всему микробному сообществу. Рассчитывали индекс разнообразия микробиоты в разные периоды до и после ТГСК.

Наряду с методом секвенирования все биологические материалы были исследованы в ПЦР в реальном времени с использованием тест-системы «Колонофлор-16» на основе количественной полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией. Система позволяет количественно оценивать видовой состав кишечной микробиоты, как основных традиционно определяемых групп и видов, так и важнейших противовоспалительных микроорганизмов, таких как фирмикуты (Firmicutes), провоспалительные протеобактерии (Proteobacteria). Для изучения микробиома толстого кишечника использовали ПЦР в мультипраймерном формате с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Использовали набор Колонофлор-16 (ООО «АльфаЛаб»), позволяющий оценивать общую биологическую массу *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Bacteroides spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli enteropathogenic.*, *Staphylococcus aureus.*, *Clostridium difficile.*, *Clostridium perfringens*, *Proteus vulgaris/mirabilis.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Fusobacterium nucleatum.*, *Parvimonas micra.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* Полученные данные с использованием специальной программы (ООО «АльфаЛаб») были представлены как количество колониеобразующих единиц (КОЕ) каждого микроорганизма в 1 г кала в десятичных логарифмах (lg КОЕ/г) Оценивали качественный и количественный состав облигатных представителей микрофлоры толстого кишечника (бифидобактерий, лактобацилл, кишечной палочки) и качественный и количественный состав условно-патогенной флоры (при их выявлении), а также наличие дисбиотических сдвигов (количественное соотношение отдельных видов и групп микроорганизмов). Заключение формировали на основе сравнения показателей, полученных при анализе биологического материала с референтными интервалами для каждой группы микроорганизмов.

Статистический анализ реализован в среде программирования для статистической обработки данных R. Диаграммы размаха построены с помощью пакета ggpubr. Сравнение независимых групп осуществляли с помощью непараметрических критериев Краскела-

Уоллиса (с последующим апостериорным попарным сравнением) и Манна-Уитни. Достоверность различий определяли в парном тесте Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Важным показателем для оценки микробиоты кишечника является индекс ее разнообразия (индекс Шеннона) [6]. Результаты оценки изменения индекса разнообразия Шеннона у обследованных нами больных ММ в разные периоды до и после ТГСК представлены на рисунке 1.

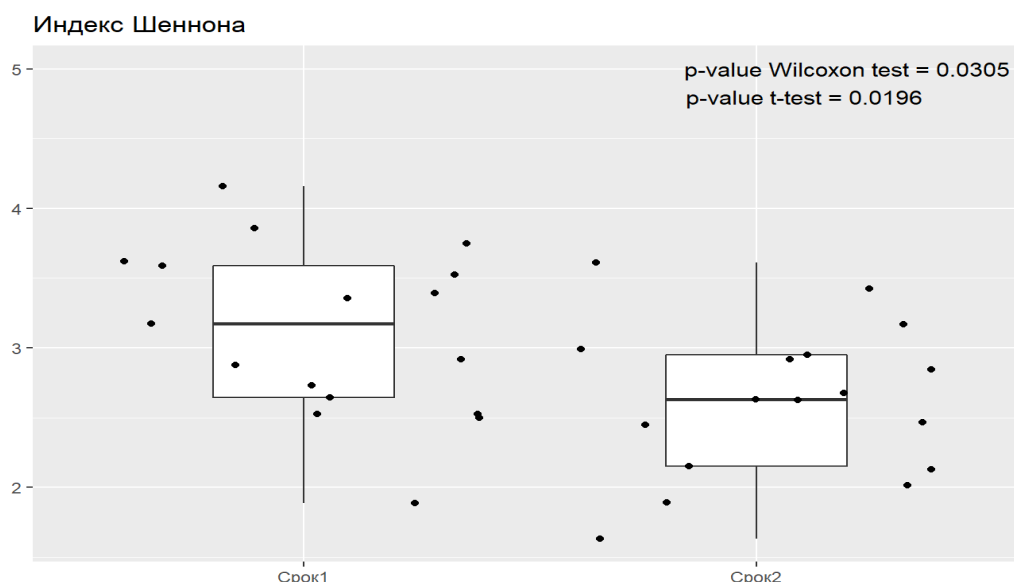


Рисунок 1. Индекс разнообразия у пациентов до (срок 1) и после (срок 2) аутологичной ТГСК.

Как видно из рисунка, наблюдалось достоверное ($p = 0,0305$) снижение индекса разнообразия микробиоты после аутологичной ТГСК, причем не зависимо от стадии множественной миеломы или почечной недостаточности. Надо отметить, что установлено существенное снижение индекса разнообразия микробиоты (индекса Шеннона) у пациентов в динамике при проведении аллоТГСК, при этом выявлен негативный эффект антибиотиков и химиотерапевтических препаратов на многообразие микробиоты. Наши результаты показывают, что достоверное снижение индекса биологического разнообразия микробиоты наблюдается и при АТГСК.

Анализ результатов изучения индекса разнообразия у отдельных больных в нашем исследовании (рис. 2) показал, что в 6 случаях наблюдалось снижение индекса Шеннона в период от 7 до 35 дней после проведения трансплантации. В трех случаях данный показатель не изменился, и только у одного больного наблюдалось повышение индекса разнообразия после ТГСК (пациент №2). Известно, что высокодифференцированный кишечный микробиом обладает защитным эффектом против ряда инфекций, включая способность предотвращать колонизацию кишечника высокоустойчивыми патогенами [7].

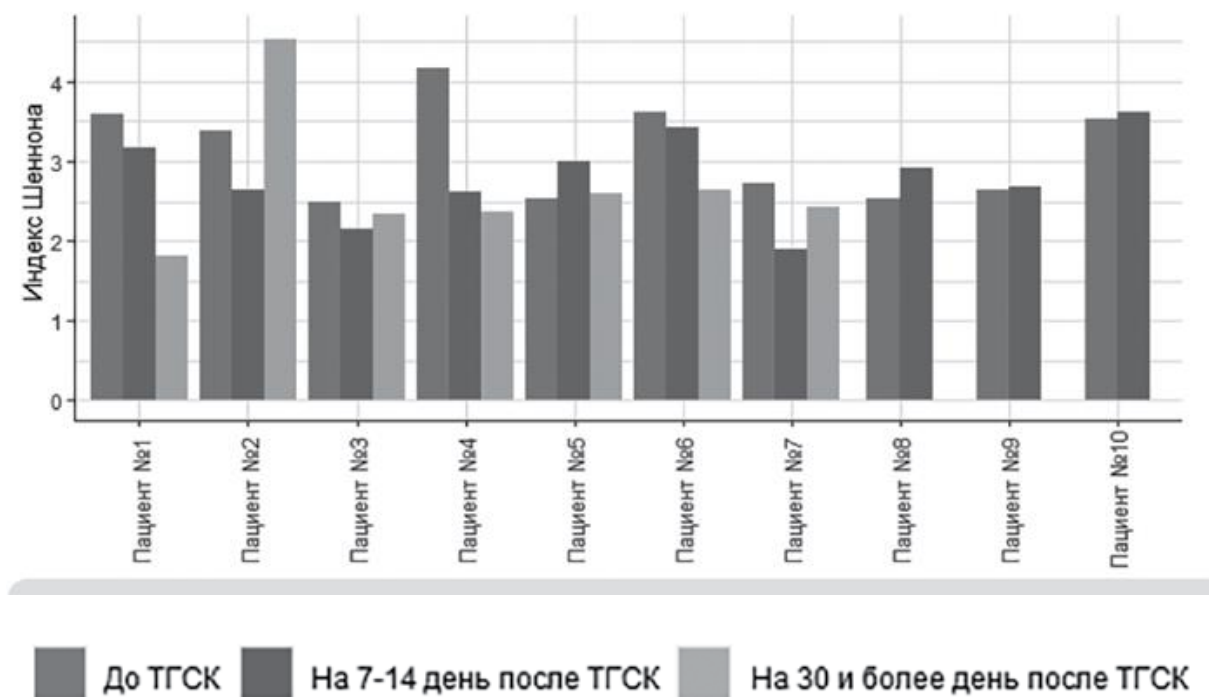


Рисунок 2. Индекс разнообразия микробиоты кишечника у пациентов до ТГСК и после ее проведения.

Наряду с секвенированием в эти же сроки проводили ПЦР-РВ с использованием набора «Колонофлор» (ООО «АльфаЛаб»). Исследования с помощью ПЦР в реальном времени подтвердило нарушения микробиома кишечника, которые характеризовались разной степенью угнетения симбиотических микроорганизмов.

Так, снижение содержания *Lactobacillus spp.* выявлено у 75 % больных. У 100% пациентов установлено снижение титра *Bifidobacterium spp.* Наряду со снижением симбиотических микроорганизмов у 50% пациентов при исследовании после проведения АТГСК выявлены условно патогенные микробы — *Proteus spp.* (n = 1), *Klebsiella pneumoniae* (n = 2), *Staphylococcus aureus* (n=1). Наиболее весомые нарушения микробиоты были получены при оценки соотношения *Bacteroides fragilis/Faecalibacterium prausnitzii*, которые наблюдались у 87 % больных. Повышение этого соотношения свидетельствует о наличии анаэробного дисбиоза в кишечнике и рассматривается как важный маркер нарушения микробиоты.

Как было указано выше микробиологическая диагностика системных инфекций кровеносного русла, основанная на выявлении патогенов в крови, занимает не менее 24 часов и позволяет высевать возбудитель только в 40-60% случаев. Кроме того, эти методы не позволяют прогнозировать вероятность развития системных инфекций, что важно для их активной профилактики. Наиболее тяжелыми жизненно опасными являются системные инфекции, вызванные грамотрицательными бактериями. Показано, что в развитии

грамотрицательных инфекций кровотока ведущую роль играет эндогенное инфицирование из кишечника [8]. При этом определяющую роль в этом процессе играет состав кишечной микробиоты. Помимо уменьшения биоразнообразия при ТГСК может наблюдаться почти полная замена микробиома одним типом бактерий.

Нами установлено, что доминирование типа *Proteobacteria* более 30% в общей микробиоте кишечника является надежным предиктором риска развития грамотрицательных инфекций кровотока, что согласуется с литературными данными [9]. Продемонстрирована возможность использовать этот феномен (доминирование типа *Proteobacteria*) в клинической практике для диагностики системных инфекций кровеносного русла у пациентов при аллогенной ТГСК [10]. Из наблюдавшихся нами больных, частота типа *Proteobacteria* в микробиоте колебалась от 1 до 6 %, и только в одном случае (больной К), выявление типа *Proteobacteria* составил 40,66% (таблица 2).

Таблица 2 - Удельный вес основных типов бактерий в кишечной микробиоте больного К (расчет проведен на основании базы данных Illumina)

Тип бактерий	Проценты
Actinobacteria	0.45%
Bacteroidetes	41.74%
Firmicutes	5.38%
Proteobacteria	40.66%

Важно отметить, что у 4 больных наблюдалась лишь фебрильная нейтропения и только у больного К. в этот период был диагностирован сепсис с развитием инфекционно-токсического шока. Это, на наш взгляд, позволяет рассматривать кишечный микробиом в качестве одного из важных предикторов развития инфекций кровотока при аутологичной ТГСК.

Выводы.

1. В период проведения АТГСК выявлены нарушения микробиоты в кишечнике, характеризующиеся разной степенью угнетения симбиотических микроорганизмов и нарушением соотношения *Bacteroides fragilis*/*Faecalibacterium prausnitzii*, которые были выявлены у 87 % больных, что свидетельствует о наличии анаэробного дисбиоза.
2. При аутологичной ТГСК происходит достоверное ($p = 0,0305$) снижение индекса разнообразия микробиоты после проведения трансплантации в период от 7 до 35 дней.
3. Увеличение типа *Proteobacteria* в спектре кишечного микробиома выше уровня 30% является предиктором развития системных грамотрицательных инфекций кровотока у больных множественной миеломой при проведении высокодозной терапии и ТГСК.

4. При мониторинге состава микробиоты следует оценивать образцы кала как до, так и после выполнения ТГСК

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Бессмельцев С. С. Множественная миелома / С. С. Бессмельцев, К. М. Абдулкадыров. - М., МК, 2016. - 504 с.
2. Averbuch D., Tridello G., Hoek J. et al. Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Rods Causing Bacteremia in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Intercontinental Prospective Study of the Infectious Diseases Working Party of the European Bone Marrow Transplantation Group // *Clinical Infectious Diseases*. – 2017. – V. 65. – № 11. – P. 1819–1828.
3. Stoma I., Littmann E.R., Peled J.U. et al. Compositional Flux Within the Intestinal Microbiota and Risk for Bloodstream // *Clinical Infectious Diseases*. –2021.– Vol.73. – P. 4627–4635.
4. Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma // *Lancet Oncol*. – 2014; –Vol.15, – №12. –P. 538–548.
5. Durie B.G., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival // *Cancer*. – 1975. – Vol. 36. №3.– P. 842–854.
6. Taur Y., Xavier J.B., Pamer E.G. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // *Clinical Infectious Diseases* . – 2012. – Vol. 55, No 7. – P. 905–914.
7. Ayres J.S., Trinidad N.J., Vance R.E. Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. // *Nat Med*. – 2012 – Vol.18 – № 5 – 799–806.
8. Стома И.О. Микробиота кишечника у пациентов с иммуносупрессией: переоценка взглядов на патогенез инфекций кровотока // *Клиническая инфектология и паразитология*. – 2018. – Т 7, № 2. – С. 224–233.
9. Stoma I, Littmann E.R., Pamer E.G. et al. Compositional flux within the intestinal microbiota and risk for bloodstream infection with gram-negative bacteria // *Clinical Infectious Diseases*.–Vol. 73.– № 11.– P. e4627-e4635.