

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ НА СОСТАВ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ



М.М. Юнусбаева¹, Д.Р. Терентьева^{1,2}, Л.Я. Бородина³, А.М. Закирова³, Ш.Э. Булатов³,
Ф.С. Билалов^{4,5}, Б.Б. Юнусбаев⁶

¹ ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБУЗ Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер, г. Уфа, Россия

⁴ ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр, г. Уфа, Россия

⁵ ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет г. Уфа, Россия

⁶ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Использование длительной многокомпонентной антибиотикотерапии является самым эффективным способом лечения туберкулеза (ТБ). Однако мало известно о влиянии данной химиотерапии на кишечную микрофлору человека. Целью данного исследования является изучение влияния длительной многокомпонентной антибиотикотерапии на состав и метаболический профиль кишечного микробиома больных ТБ. В исследовании использовались образцы ДНК фекалий, полученные от 23 больных туберкулезом легких. От каждого пациента было получено две пробы биоматериала: до начала лечения и через два месяца после прохождения интенсивной фазы химиотерапии. Сравнительный анализ метагеномных данных секвенирования микробиома кишечника больных ТБ показал, что длительный многокомпонентный режим лечения ТБ не нарушает общего разнообразия микробиома кишечника, однако оказывает влияние на бактериальный состав и метаболический профиль микробиома. На фоне приема противотуберкулезных препаратов (ПТП) первого ряда (изониазид, рифампицин, этамбутол, пиразинамид) наблюдается статистически значимое увеличение представителей филума *Actinobacteria*. Парное сравнение метагеномных данных пациентов выявило 28 дифференциально представленных таксонов бактерий, из которых три вида *Bacteroides cellulosilyticus*, *Enterocloster aldensis*, *Clostridium spiroforme* преобладали в микробиоме больных ТБ после прохождения химиотерапии, тогда как 25 видов преобладали в группе больных до лечения (*Bifidobacterium catenulatum*, *Enterococcus faecium*, *Bacteroides salyersiae*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bacteroides eggerthii*, *Lachnospira eligens*, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus lactaris* и др.) ($p < 0,05$). Метаболический профиль микробиома кишечника характеризовался

Адрес для переписки:

Юнусбаева Милляуша Мусиевна
191002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9,
ФГАОУ ВО Национальный исследовательский
университет ИТМО.
Тел.: 8 927 326-14-60
E-mail: milyausha_ufa@mail.ru

Contacts:

Milyausha M. Yunusbaeva
191002, Russian Federation, St. Petersburg, Lomonosova str., 9,
ITMO University.
Phone: +7 927 326-14-60
E-mail: milyausha_ufa@mail.ru

Для цитирования:

Юнусбаева М.М., Терентьева Д.Р., Бородина Л.Я., Закирова А.М.,
Булатов Ш.Э., Билалов Ф.С., Юнусбаев Б.Б. Влияние длительной
антибиотикотерапии на состав и метаболический профиль кишечного
микробиома при туберкулезе легких // Инфекция и иммунитет. 2023.
Т. 13, № 6. С. 1079–1088. doi: 10.15789/2220-7619-IOL-16867

Citation:

Yunusbaeva M.M., Terentyeva D.R., Borodina L.Ya., Zakirova A.M.,
Bulatov S.E., Bilalov F.S., Yunusbayev B.B. Influence of long-term antibiotic
therapy on gut microbiome composition and metabolic profile in pulmonary
tuberculosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1079–1088. doi: 10.15789/2220-7619-
IOL-16867

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 22-25-00272). Разработка вычислительных сценариев для метагеномных данных частично выполнена сотрудником лаборатории «Центр биоинформатики и алгоритмической биотехнологии» при поддержке гранта ID PURE: 94030965.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 22-25-00272). Bioinformatic pipelines for metagenomic analyses were developed partially by the research staff at the laboratory of "Center for Bioinformatics and Algorithmic Biotechnology" funded by grant ID PURE: 94030965.

усилением метаболических процессов, направленных на рост и деление микробных клеток. Железо является главным лимитирующим фактором роста и размножения. Кроме того, важно отметить превалирование гликолиза и ферментации лактата как основных способов получения энергии кишечной микробиотой.

Ключевые слова: туберкулез, микробиом кишечника, дисбиоз, кишечные бактерии, метаболизм, антибиотики.

INFLUENCE OF LONG-TERM ANTIBIOTIC THERAPY ON GUT MICROBIOME COMPOSITION AND METABOLIC PROFILE IN PULMONARY TUBERCULOSIS

Yunusbaeva M.M.^a, Terentyeva D.R.^{a,b}, Borodina L.Ya.^c, Zakirova A.M.^c, Bulatov S.E.^c, Bilalov F.S.^{d,e}, Yunusbayev B.B.^f

^a ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^c Republican Clinical Antituberculous Dispensary, Ufa, Russian Federation

^d Republic Medical Genetic Centre, Ufa, Russian Federation

^e Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

^f St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The use of long-term multicomponent antibiotic therapy is the most effective way to treat tuberculosis (TB). However, little is known about the effect of this chemotherapy on the human intestinal microflora. The purpose of this study was to analyze an effect of long-term antibiotic therapy on gut microbiome composition and metabolic profile in TB patients. We used deep sequencing of fecal samples from 23 treatment-naïve TB patients to reconstruct the metabolic capacity and strain/species-level abundance in the gut microbiome. Two fecal samples were obtained from each patient: before and after treatment. We showed that TB treatment regimen does not disrupt the overall diversity of the gut microbiome but does have an impact on gut bacterial microbiome composition and metabolic profile. While taking first-line anti-tuberculosis drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide), TB patients showed an apparent increase in Actinobacteria abundance. Pairwise comparison of metagenomic data revealed 28 differentially represented bacterial taxa, of which three species *Bacteroides cellulosilyticus*, *Enterocloster aldensis*, *Clostridium spiroforme* were strongly enriched in TB patients post-chemotherapy, whereas 25 species were enriched in TB patients before treatment (*Bifidobacterium catenulatum*, *Enterococcus faecium*, *Bacteroides salyersiae*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bacteroides eggerthii*, *Lachnospira eligens*, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus lactaris*, etc.) ($p < 0.05$). The metabolic profile of the gut microbiome was characterized by increased metabolic processes aimed at the growth and division of microbial cells. Iron is the main limiting factor for growth and reproduction. In addition, it is important to note the prevalence of glycolysis and lactate fermentation as the major means for energy production by intestinal microbiota.

Key words: tuberculosis, gut microbiome, dysbiosis, intestinal bacteria, metabolism, antibiotics.

Введение

Лечение туберкулеза (ТБ) подразумевает ежедневный прием как минимум 4–7 пероральных противотуберкулезных препаратов (ПП) в период от 6 месяцев до двух лет. Широкое использование данных режимов химиотерапии (ХТ) делает их одними из наиболее длительных курсов воздействия антибактериальных препаратов на организм человека. Основной пул противотуберкулезных препаратов, применяемых для лечения ТБ, обладает широким спектром действия и эффективен не только в отношении *M. tuberculosis*, но и против многих других бактерий [4, 27]. По этой причине можно сказать, что стандартное лечение как лекарственно-чувствительного ТБ, так и туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, будет иметь широкий спектр эффектов на комменсальную микрофлору всего организма. Подтверждением данного факта являются многочисленные исследования, демонстрирующие влияние приема антибиотиков на течение

и исход целого ряда заболеваний [1, 14, 21]. Хотя это всего лишь несколько примеров, современная модель такова, что лечение антибиотиками может привести к установлению альтернативного состояния, которое может иметь системные и потенциально пагубные последствия для иммунитета, микробиоты и организма в целом. Несмотря на многочисленные исследования кишечных бактериальных сообществ в норме и при различных патологиях, имеется ограниченное число исследований, посвященных изучению микробиома кишечника больных ТБ, и крайне мало лонгитюдных исследований, направленных на изучение кишечной микробиоты, подвергшейся длительной массивной антибактериальной терапии. Поскольку микробиом кишечника является ключевым игроком в поддержании иммунологической толерантности и обладает иммуномодулирующей активностью, то исследование микробиома кишечника больных ТБ до и после антибиотикотерапии является чрезвычайно актуальным. Целью данной работы является изучение влияния длитель-

ной многокомпонентной антибиотикотерапии на состав и метаболический профиль кишечного микробиома больных туберкулезом легких. Для этого нами был проведен сравнительный анализ метагеномных данных shotgun секвенирования микробиома кишечника больных ТБ до начала приема ПТП и через два месяца после прохождения интенсивной фазы химиотерапии.

Материалы и методы

В работе были использованы образцы фекалий, полученные от 23 больных туберкулезом легких. Больные ТБ отбирались на базе ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер» (ГБУЗ РКПТД), г. Уфа, в период с 2019 по 2021 г. В исследование были включены только пациенты с впервые выявленным ТБ легких, соответствующие следующим критериям: 1) возраст (25–55 лет); 2) впервые выявленный ТБ легких, подтвержденный лучевыми методами диагностики (рентгенография, компьютерная томография, цифровая флюорография) и положительными результатами микробиологических и молекулярно-генетических исследований мокроты на ТБ (ПЦР тест, мазок с окраской по Цилю–Нильсену, люминесцентная микроскопия); 3) отсутствие ВИЧ-инфекции. В исследование не включались больные с ранее леченым ТБ, больные с рецидивом или отменой лечения. Кроме того, критериями исключения были серьезные сопутствующие заболевания, кровохарканье, гипоксия, внелегочный туберкулез, беременность или кормление грудью.

В структуре клинических форм преобладали инфильтративный ТБ легких (65,2%), диссеминированный ТБ (30,4%) и казеозная пневмония (4,3%). Всем пациентам, включенным в исследование, был назначен I режим ХТ (изониазид, рифампицин, пиразинамид, этамбутол) в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению ТБ органов дыхания. Средний возраст больных, среди которых было 14 мужчин (61%) и 9 женщин (39%), составлял 43 года (IQR 34,5–55 лет). Взятие образцов фекалий от больных ТБ осуществлялось дважды: первое — в момент поступления в стационар, строго до начала приема ПТП, второе — через два месяца прохождения интенсивной фазы ХТ. Свежие образцы стула участников собирали в стерильные одноразовые контейнеры, которые доставлялись в бактериологическую лабораторию ГБУЗ РКПТД и замораживались при температуре -80°C . Взятие биоматериала осуществлялось в соответствии с нормами и требованиями законодательства РФ. Все пациенты предоставили информированное согласие на участие в исследовании и анонимную обработку данных.

Метагеномную ДНК экстрагировали из 200 мг фекалий с использованием набора «QIAamp DNA Stool Mini Kit» (Qiagen, Германия). Библиотеки секвенирования были созданы с использованием набора для подготовки образцов «TruSeq DNA PCR-Free» (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полногеномное секвенирование проводилось на платформе Illumina HiSeq2500. В среднем для каждого образца получено более 20 млн ридов секвенирования, что классифицируется как глубокое секвенирование.

Первоначальный контроль качества данных секвенирования, удаление адаптеров и чрезмерно коротких ридов, а также деконтаминация ДНК человека были выполнены последовательно с помощью программ FastQC v0.11.9, fastp v0.23.2 и KneadData v0.10.0 [6, 26]. Определение таксонов микроорганизмов и оценка относительной численности проводилась на базе маркерных генов с использованием программы MetaPhlan4 [3]. Последующий анализ метагеномных данных проводился с использованием пакетов программ microbiome программной среды R (<https://www.r-project.org>). Индекс Шеннона рассчитывали в пакете программ vegan R; достоверность различий между индексами Шеннона определяли с помощью теста Колмогорова. Суммарное сходство микробиоты между донорами визуализировали методом главных компонент (PCA) на основе дистанций Брэя–Кертиса в программе vegan. Для определения дифференциально представленных таксонов в парных данных больных ТБ до и после лечения был использован T-критерий Вилкоксона для зависимых выборок (Matched-pair Wilcoxon Rank Sum Test). Метаболическую способность микробиома определяли с использованием программы HUMAnN 3.6, которая сравнивает последовательности донорских метагеномов с известными микробными геномами и генами, определяет метаболические реакции, в которые включены эти гены, и агрегирует их в известные микробные пути. В частности, для биоинформатических запросов HUMAnN 3.6 использует базу данных ChocoPhlAn 3, содержащую 99,2 тыс. аннотированных эталонных геномов из 16,8 тыс. видов микробов в базе данных UniProt (январь 2019 г.) и соответствующие функционально аннотированные 87,3 млн семейств генов UniRef90 [20].

Результаты

В общей сложности в двух группах больных ТБ до начала лечения и после прохождения химиотерапии было обнаружено 719 и 632 бактериальных таксонов соответственно. Анализ разнообразия бактериальных сообществ с помо-

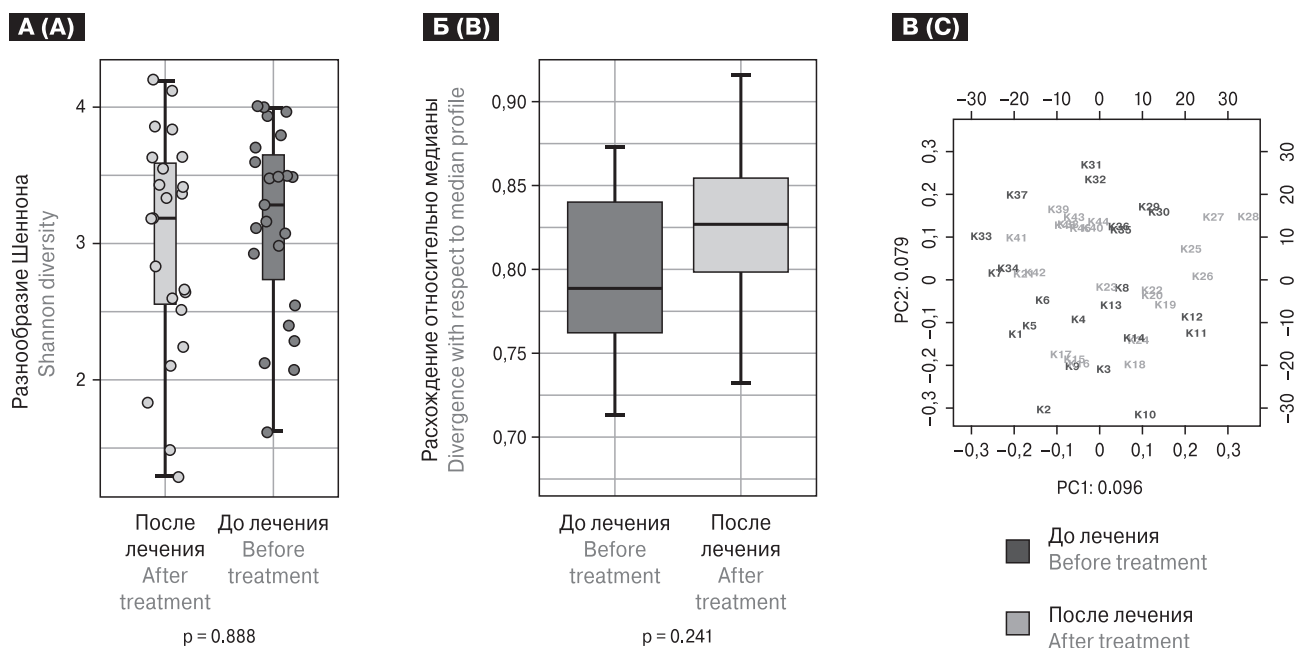


Рисунок 1. Общая характеристика бактериального сообщества кишечного микробиома больных ТБ: сравнение альфа- (А) и бета-разнообразия (Б) бактериальных сообществ микробиома больных ТБ до начала лечения и после прохождения химиотерапии; (В) анализ главных компонент варибельности микробного состава кишечника больных ТБ (PCA)

Figure 1. General characteristics of gut bacterial microbiome community in TB patients: comparison of alpha (A) and beta (B) diversity of gut microbiomes in two study groups: pre-treatment TB patients (before treatment), post-treatment TB patients (after treatment); (C) principal component analysis of microbial variability in donors (PCA)

щью параметров оценки индекса Шеннона (альфа-разнообразие) и индекса несходства Брея–Кертиса (бета-разнообразие) не показал различий между исследуемыми группами ($p = 0,888$ и $p = 0,241$ соответственно) (рис. 1А, Б). Анализ главных компонент варибельности бактериальных таксонов (PCA) также не выявил различий между группами (рис. 1В).

Сравнительный анализ таксономического состава микробиома кишечника больных ТБ до лечения и после прохождения ХТ показал, что доминирующими в обеих группах были филумы *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Суммарная доля данных филумов достигала 90,5 и 89,8% соответственно ($p > 0,05$) (рис. 2А, II обложка). На фоне антибиотикотерапии в группе пациентов после прохождения ХТ наблюдается статистически значимое увеличение представителей филума *Actinobacteria*: 4,8% против 1,9% в группе больных до лечения ($p = 0,02$). При этом основной вклад в увеличение *Actinobacteria* вызван ростом представителей рода *Bifidobacterium* (рис. 2Г, II обложка). Несмотря на, казалось бы, видимое отсутствие различий в бактериальном составе на уровне филумов, сравнение микробиомов на уровне семейства и рода демонстрирует нам статистически значимые сдвиги в структуре микробных сообществ (рис. 2, II обложка). Так, на фоне антибиотикотерапии в микробиоме больных ТБ статистически значимо уменьшается доля семейства *Prevotellaceae* (16,14% в группе

до лечения против 6,88% в группе после ХТ, $p = 0,009$). Сравнительный анализ структуры микробиома на родовом уровне демонстрирует статистически значимое увеличение родов *Phocoecicola*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Roseburia*, *Dialister* и снижение *Prevotella*, *Clostridium*, *Lachnospira* в группе больных после лечения ($p < 0,05$).

Поскольку данные микробиома представляют собой парные данные для каждого пациента (до и после), то для анализа дифференциально представленных таксонов нами также был использован критерий Вилкоксона (Matched-pair Wilcoxon Rank Sum Test). Парное сравнение метагеномных данных позволило выявить 28 дифференциально представленных таксонов бактерий ($p < 0,05$) (рис. 3, III обложка), из которых 25 видов преобладали в группе больных до лечения: *Bifidobacterium catenulatum*, *Enterococcus faecium*, *Bacteroides salyersiae*, *Bacteroides xylanisolvens*, *Bacteroides eggerthii*, *Alistipes senegalensis*, *Lachnospira eligens*, *Anaerotruncus rubiinfantis*, *Slackia isoflavoniconvertens*, *Lentisphaeria bacterium*, *Clostridia bacterium*, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus lactaris* и ряд неаннотированных бактерий *Ruminococcaceae unclassified SGB15309* и *SGB15234*, *Lachnospiraceae unclassified SGB4894*, *Dorea* sp. *AF24 7LB*, *Clostridium* sp. *AF15 49* и др.). В группе больных ТБ после лечения были увеличены только три вида бактерий *Bacteroides cellulosilyticus*, *Enterocloster aldensis*, *Clostridium spiroforme* (рис. 3А, III обложка).

Далее мы провели исследования, направленные на определение функционального профиля микробиома. После агрегации генов, идентифицированных программой HUMAnN 3.6, в метаболические пути, в общей сложности было выявлено 412 метаболических процессов, из которых 26 были дифференциально обогащены в кишечном микробиоме больных ТБ ($p < 0,05$). Причем 24 метаболических процесса были чрезмерно представлены в микробиоме больных ТБ после прохождения химиотерапии по сравнению с двумя метаболическими путями в микробиоме больных ТБ до начала лечения (табл.). Так, на фоне антибиотикотерапии усиливаются процессы, направленные на биосинтез гема (heme b biosynthesis II (oxygen-independent)), биосинтез аминокислот (superpathway of aromatic amino acid biosynthesis, superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation) и др.), нуклеотидов (superpathway of guanosine nucleotides *de novo* biosynthesis I, pyrimidine deoxyribonucleotides *de novo* biosynthesis III и др.), а также увеличивается количество метаболических процессов, направленных на потребление глюкозы и ферментацию лактата (superpathway of glycolysis,

pyruvate dehydrogenase, TCA, and glyoxylate bypass, heterolactic fermentation).

Проведя кластеризацию обнаруженных метаболических процессов в пути более высокого уровня, можно увидеть усиление метаболических процессов, направленных на активный рост и деление бактерий даже на фоне длительной многокомпонентной ХТ (рис. 4). Как хорошо видно на рис. 4, в бактериальном сообществе кишечника больных ТБ, подвергшихся массивной антибиотикотерапии, активно протекают метаболические процессы синтеза аминокислот и нуклеотидов, а также усилены процессы генерации энергии и синтеза/деградации углеводов. Косвенным показателем роста и деления бактерий также является высокое количество различных метаболических процессов синтеза клеточной стенки (рис. 4, табл.).

Обсуждение

В данном исследовании нами был проведен сравнительный анализ метагеномных данных секвенирования кишечного микробиома больных ТБ до начала приема ПТП и через два месяца после прохождения интенсивной фазы ХТ.



Рисунок 4. Иерархия метаболических путей, выявленных у больных туберкулезом

Figure 4. Hierarchy of metabolic pathways enriched in TB patients

Примечание. Размер блока отражает количество уникальных метаболических путей, принадлежащих к определенному типу метаболического пути.

Note. The block size reflects the number of unique metabolic pathways belonging to a particular type of metabolic pathway.

Таблица. Метаболические пути, дифференциально представленные в микробиоме больных ТБ

Table. Metabolic pathways differentially represented in gut microbiome of TB patients

Метаболические пути Metabolic pathways	P-значение P-value	FDR (Доля ложных открытий) FDR (False discovery rate)	Группа Groups
Биосинтез гема b II (независимый от кислорода) Heme b biosynthesis II (oxygen-independent)	0,00165	0,4928	После лечения After treatment
Путь биосинтеза <i>de novo</i> гуанозиновых нуклеотидов I Superpathway of guanosine nucleotides <i>de novo</i> biosynthesis I	0,00241	0,4928	После лечения After treatment
Биосинтез <i>de novo</i> пиримидиндезоксирибонуклеотидов III Pyrimidine deoxyribonucleotides <i>de novo</i> biosynthesis III	0,00433	0,4928	После лечения After treatment
Биосинтез СМР-легионамината I CMP-legionaminat biosynthesis I	0,00584	0,4928	После лечения After treatment
Биосинтез уридин-5'-монофосфат III UMP biosynthesis III	0,00603	0,4928	После лечения After treatment
Дегградация 5'-дезоксиаденозина II 5'-deoxyadenosine degradation II	0,00826	0,4928	После лечения After treatment
Путь биосинтеза L-цистеина (грибы) Superpathway of L-cysteine biosynthesis (fungi)	0,00837	0,4928	После лечения After treatment
Пентозофосфатный путь (неокислительная ветвь) II Pentose phosphate pathway (non-oxidative branch) II	0,01010	0,5206	До лечения Before treatment
Биосинтез строительных блоков O-антигена (<i>E. coli</i>) O-antigen building blocks biosynthesis (<i>E. coli</i>)	0,01787	0,6619	После лечения After treatment
Путь биосинтеза ароматических аминокислот Superpathway of aromatic amino acid biosynthesis	0,01787	0,6619	После лечения After treatment
Путь биосинтеза L-метионина (путем сульфгидрилирования) Superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation)	0,02086	0,6619	После лечения After treatment
Биосинтез инозин-5'-фосфата I Inosine-5'-phosphate biosynthesis I	0,02137	0,6619	После лечения After treatment
Дегградация 4-гидроксифенилацетата 4-hydroxyphenylacetate degradation	0,02249	0,6619	После лечения After treatment
Дегградация хондроитинсульфата I (бактериальная) Chondroitin sulfate degradation I (bacterial)	0,02249	0,6619	После лечения After treatment
Бифидобактериальный шунт Bifidobacterium shunt	0,02943	0,6816	После лечения After treatment
Биосинтез 4-амино-2-метил-5-дифосфометилпиримидина II 4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine biosynthesis II	0,03266	0,6816	После лечения After treatment
Ассимиляционная сульфатредукция IV Assimilatory sulfate reduction IV	0,03543	0,6816	После лечения After treatment
Биосинтез жирных кислот с анте-изо-разветвленной цепью Ante-iso-branched-chain fatty acid biosynthesis	0,03603	0,6816	После лечения After treatment
Путь гликолиза, пируватдегидрогеназы, ЦТК и обхода глиоксилата Superpathway of glycolysis, pyruvate dehydrogenase, TCA, and glyoxylate bypass	0,03702	0,6816	После лечения After treatment
Гетеролактическая ферментация Heterolactic fermentation	0,03830	0,6816	После лечения After treatment

Метаболические пути Metabolic pathways	P-значение P-value	FDR (Доля ложных открытий) FDR (False discovery rate)	Группа Groups
Биосинтез УДФ-N-ацетилмурамоилпентапептида III (содержащий мезодиаминопимелат) UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide biosynthesis III (meso-diaminopimelate containing)	0,03838	0,6816	После лечения After treatment
Разложение ацетилен (анаэробное) Acetylene degradation (anaerobic)	0,04082	0,6816	После лечения After treatment
Путь деградации орнитина Superpathway of ornithine degradation	0,04152	0,6816	После лечения After treatment
Путь деградации глюкозы и ксилозы Superpathway of glucose and xylose degradation	0,04152	0,6816	До лечения Before treatment
Редактирование ацилфосфатидилхолина Phosphatidylcholine acyl editing	0,04487	0,6816	После лечения After treatment
Биосинтез УДФ-N-ацетилмурамоилпентапептида I (содержащий мезодиаминопимелат) UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide biosynthesis I (meso-diaminopimelate containing)	0,04844	0,6816	После лечения After treatment

Сравнение разнообразия не выявило существенных различий микробиомов двух групп больных ТБ: до и после приема антибактериальных препаратов. Полученные нами результаты согласуются с ранее опубликованными данными в которых также было показано или полное отсутствие различий, или временное снижение микробного разнообразия на фоне антибиотикотерапии [16, 27]. Анализируя полученные нами данные, мы можем предположить, что отсутствие снижения альфа- и бета-разнообразия в группе больных ТБ после лечения ПТП можно охарактеризовать адаптацией кишечного бактериального сообщества к длительному приему противотуберкулезных препаратов и установлению альтернативного бактериального состава кишечника. Причем, стоит отметить, что возможно в первые недели лечения ТБ в кишечном микробиоме больных действительно происходило существенное снижение биоразнообразия, а также наблюдались сильные флуктуации бактериального состава. Подтверждением данного факта являются исследования, которые продемонстрировали резкое снижение биоразнообразия бактерий в первые две недели приема ПТП [12, 16]. Однако, впоследствии наблюдаемое снижение видового разнообразия восстанавливалось.

Детальный анализ бактериального состава кишечного микробиома больных ТБ выявил существенные сдвиги в микробиоме кишечника больных ТБ на фоне приема ПТП первого ряда (изониазид, рифампицин, этамбутол, пипразинамид). Одним из самых видимых изменений, регистрируемых на уровне филума, является статистически значимое увеличение *Actinobacteria* (в особенности *Bifidobacterium*). Стоит напомнить, что большинство используемых сегодня антибиотиков берут свое на-

чало от актинобактерий, причем почти 80% антибактериальных препаратов были получены из почвенных бактерий рода *Streptomyces (Actinobacteria)* [2]. Бифидобактерии же во многом ассоциируются с положительным эффектом на здоровье человека и часто используются в виде пробиотических продуктов [17]. Однако в последние годы накапливаются данные, указывающие на наличие генетических детерминант устойчивости в геноме *Bifidobacteria* [8, 10]. По этой причине вполне вероятно, что длительный курс ХТ может способствовать отбору бактерий рода *Bifidobacteria (Actinobacteria)*, которые могут выступать резервуаром генов антибиотикоустойчивости и, возможно, участвовать в горизонтальном переносе генов.

Попарное сравнение метагеномных данных больных ТБ выявило 28 дифференциально представленных таксонов бактерий, 25 из которых достоверно чаще встречались в группе больных ТБ до лечения. Многие обнаруженные в микробиоме больных ТБ до начала лечения бактерии являются представителями нормофлоры пищеварительного тракта человека. Однако чрезмерный рост этих бактерий может способствовать развитию и поддержанию воспалительных процессов в кишечнике, что, в свою очередь, может негативно сказаться на течение туберкулезного процесса [7, 11, 13, 19].

Интересно, что бактерии, представленные в кишечном микробиоме больных ТБ после лечения (*Bacteroides cellulosilyticus, Enterocloster aldenensis, Clostridium spiroforme*), в целом характеризуются патологическим действием на организм хозяина. Так, *C. spiroforme*, обнаруженный в кишечнике больных ТБ после ХТ, продуцирует энтеротоксин CST, основное повреждающее действие которого заключается в нарушении организации актинового цитоскелета клетки [18, 22].

Установлено, что данный токсин вызывает изменения в системе микротрубочек с образованием выпячиваний, которые расширяют клеточную поверхность, что, в свою очередь, способствует адгезии бактерий и облегчает колонизацию кишечника [22].

О другой дифференциально представленной бактерии *E. aldensis*, ранее *Clostridium aldenense*, крайне мало информации. Известно, что данный вид бактерий часто выделяют из клинических изолятов больных инфекционными заболеваниями [24]. Кроме того, недавно было показано, что геном *Enterocloster* spp. содержит профаги иновируса (семейство *Inoviridae*) [5]. Иновирусы, согласно литературным данным, могут давать преимущество своему бактериальному хозяину, влияя на такие биологические процессы, как подвижность хозяина, динамика роста, образование биопленок, вирулентность, уклонение от иммунитета и секреция токсинов [5, 15].

Существенное увеличение доли *B. cellulolyticus* в микробиоме больных ТБ после ХТ может быть связано с наличием в их геноме детерминант устойчивости. Многие представители рода *Bacteroides*, к которым относится *B. cellulolyticus*, демонстрируют самые высокие показатели устойчивости к антибиотикам среди всех анаэробных патогенов [25]. Эти бактерии обладают повышенной устойчивостью ко многим антибиотикам, включая цефокситин, клиндамицин, метронидазол, карбапенемы и фторхинолоны [23]. Наличие в их геноме различных детерминант устойчивости и патогенности дает колоссальное преимущество их хозяевам в захвате освободившейся экологической ниши, например, вследствие длительной антибактериальной терапии.

Анализ метаболического профиля кишечного микробиома больных ТБ показал, что изменения в структуре кишечного сообщества больных туберкулезом сопровождаются сильными сдвигами в метаболических процессах. В первую очередь, несмотря на ухудшение условий обитания, вызванное приемом антибактериальных препаратов, кишечная микробиота больных ТБ демонстрирует усиление метаболических процессов, направленных на рост и деление микробных клеток. Одним из важных ресурсов для роста бактерий является железо. Анализируя метаболические пути кишечного микробиома больных ТБ после лечения мы можем констатировать усиление биохимических процессов синтеза гема в бактерий. Железо, как известно, является важным микроэлементом, участвующим во множестве клеточных функций: аэробном и анаэробном дыхании, переносе электронов, огромном количестве биохимических превращений и ра-

боте ферментов (цитохром P450, каталаза, пероксидаза и др.) [9]. Проще говоря, железо имеет решающее значение для репликации и выживания почти всех бактерий (исключение — *Lactobacillus* и *Borrelia*). Поэтому одной из стратегий выживания на фоне антибиотикотерапии является борьба за данный микроэлемент, который становится главным лимитирующим фактором роста и размножения.

Другая важная стратегия, используемая условно-патогенной флорой для получения преимущества в росте, заключается в способе получения энергии. Анализ метаболических процессов, представленных в микробиоме как больных ТБ до лечения, так и больных после прохождения ХТ, демонстрирует усиление процессов, направленных на получение энергии из простых углеводов. В норме, как известно, простые сахара в основном всасываются в тонком кишечнике человека, тогда как микробиота толстого кишечника профилирована на переваривание сложных углеводов (клетчатка из растительной пищи или сложные полисахариды, полученные из организма хозяина [муцин]). Более широкая представленность вышеуказанных метаболических путей получения энергии из простых сахаров, по-видимому, указывает на более высокую, чем обычно, доступность глюкозы в толстой кишке больного ТБ, что способствует переключению метаболизма на эти метаболические программы [28]. Источник более высокой доступности глюкозы в кишечнике больных ТБ не ясен. Однако усиление процессов гликолиза и ферментации лактата может косвенно свидетельствовать об изменениях в бактериальной структуре микробиома. В частности, это может говорить о снижении ранее доминирующих обитателей толстой кишки, предпочитавших расщеплять полисахариды, и об увеличении доли бактерий (*Bifidobacteria*, *C. spiroforme*, *E. aldensis*), обладающих ферментными системами катаболизма как простых, так и сложных углеводов.

Проведенное исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, небольшой объем выборки. Во-вторых, взятие фекалий в каждой точке исследования осуществлялось однократно, что также может рассматриваться как ограничение исследования. В-третьих, не учитывались другие переменные, которые также могут оказать влияние на состояние микробиоты кишечника (например, прием алкоголя, курение и др.).

Таким образом, длительный многокомпонентный режим лечения ТБ не нарушает общего разнообразия микробиома кишечника, однако способствует изменениям в структуре бактериального сообщества и метаболическом профиле кишечного микробиома. Применение антибиотиков вызывает дисбиоз, то есть на-

рушение нормального состава и функций кишечной микрофлоры. В первую очередь это характеризуется разрастанием устойчивой к действию антибактериальных препаратов флоры. Анализ метаболического профиля микробиома кишечника больных ТБ демонстрирует активный рост и размножение большого количества бактерий, где основным лимитирующим фактором выступает железо. Кроме того, важно отметить превалирование гликолиза и ферментации лактата как основных способов получения

энергии кишечной микробиотой. Таким образом, результаты нашего исследования подтверждают влияние противотуберкулезных препаратов на микробиоту толстого кишечника и указывают на необходимость дальнейших исследований в данном направлении.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Список литературы/References

- Arrieta M.C., Arevalo A., Stiemsma L., Dimitriu P., Chico M.E., Loores S., Vaca M., Boutin R., Morien E., Jin M., Turvey S.E., Walter J., Parfrey L., Cooper P.J., Finlay B. Associations between infant fungal and bacterial dysbiosis and childhood atopic wheeze in a nonindustrialized setting. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2018, vol. 142, no. 2, pp. 424–434.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.041
- Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Meier-Kolthoff J.P., Klenk H.P., Clement C., Ouhdouch Y., van Wezel G.P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2015, vol. 80, no. 1, pp. 1–43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15
- Blanco-Miguez A., Beghini F., Cumbo F., McIver L.J., Thompson K.N., Zolfo M., Manghi P., Dubois L., Huang K.D., Maltez A.T., Nickols W.A., Piccinno G., Piperni E., Punčochář M., Valles-Colomer M., Tett A., Giordano F., Davies R., Wolf G., Berry S.E., Spector T.D., Franzosa E.A., Pasolli E., Asnicar F., Huttenhower C., Segata N. Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlAn 4. *Nat. Biotechnol.*, 2023. doi: 10.1038/s41587-023-01688-w
- Brennan P.J., Young D.B., Robertson B.D., Andersen P., Barry III C.E., Britton W. Handbook of anti-tuberculosis agents. Introduction. *Tuberculosis*, 2008, vol. 88, no. 2, pp. 85–86. doi: 10.1016/S1472-9792(08)70002-7
- Burckhardt J.C., Chong D.H.Y., Pett N., Tropini C. Gut commensal Enterocloster species host inoviruses that are secreted in vitro and in vivo. *Microbiome*, 2023, vol. 11, no. 1: 65. doi: 10.1186/s40168-023-01496-z
- Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 2018, vol. 34, no. 17, pp. i884–i890. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560
- Elias-Oliveira J., Leite J.A., Pereira I.S., Guimaraes J.B., Manso G.M.D.C., Silva J.S., Tostes R.C., Carlos D. NLR and intestinal dysbiosis-associated inflammatory illness: drivers or dampers? *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11: 1810. doi: 10.3389/fimmu.2020.01810
- Esaiassen E., Hjerde E., Cavanagh J.P., Simonsen G.S., Klingenberg C.; Norwegian Study Group on Invasive Bifidobacterial Infections. Bifidobacterium bacteremia: clinical characteristics and a genomic approach to assess pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.*, 2017, vol. 55, no. 7, pp. 2234–2248. doi: 10.1128/JCM.00150-17
- Frankenberger N., Moser J., Jahn D. Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, vol. 63, no. 2, pp. 115–127. doi: 10.1007/s00253-003-1432-2
- Gueimonde M., Arbolea S. Resistance of Bifidobacteria toward antibiotics. *Methods Mol. Biol.*, 2021, vol. 2278, pp. 195–208. doi: 10.1007/978-1-0716-1274-3_16
- Guo P., Zhang K., Ma X., He P. Clostridium species as probiotics: potentials and challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 2020, vol. 11: 24. doi: 10.1186/s40104-019-0402-1
- Hu Y., Yang Q., Liu B., Dong J., Sun L., Zhu Y., Su H., Yang J., Yang F., Chen X., Jin Q. Gut microbiota associated with pulmonary tuberculosis and dysbiosis caused by anti-tuberculosis drugs. *J. Infect.*, 2019, vol. 78, no. 2, pp. 317–322. doi: 10.1016/j.jinf.2018.08.006
- Kamada N., Chen G.Y., Inohara N., Nunez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.*, 2013, vol. 14, no. 7, pp. 685–690. doi: 10.1038/ni.2608
- Korten V., Murray B.E. Impact of the fluoroquinolones on gastrointestinal flora. *Drugs*, 1993, vol. 45, suppl. 3, pp. 125–133. doi: 10.2165/00003495-199300453-00021
- Mai-Prochnow A., Hui J.G.K., Kjelleberg S., Rakonjac J., McDougald D., Rice S.A. Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 39, no. 4, pp. 465–487. doi: 10.1093/femsre/fuu007
- Namasivayam S., Maiga M., Yuan W., Thovarai V., Costa D.L., Mittereder L.R., Wiperman M.F., Glickman M.S., Dzutsev A., Trinchieri G., Sher A. Longitudinal profiling reveals a persistent intestinal dysbiosis triggered by conventional anti-tuberculosis therapy. *Microbiome*, 2017, vol. 5, no. 1: 71. doi: 10.1186/s40168-017-0286-2
- Saarela M., Matto J., Mattila-Sandholm T. Safety aspects of Lactobacillus and Bifidobacterium species originating from human oro-gastrointestinal tract or from probiotic products. *Microb. Ecol. Health. Dis.*, 2002, vol. 14, no. 4, pp. 234–241. doi: 10.1080/08910600310002127
- Schaechter M. Encyclopedia of Microbiology (3rd ed.). Oxford, San Diego: Academic Press, 2009. 4600 p.
- Seishima J., Iida N., Kitamura K., Yutani M., Wang Z., Seki A., Yamashita T., Sakai Y., Honda M., Yamashita T., Kagaya T., Shiota Y., Fujinaga Y., Mizukoshi E., Kaneko S. Gut-derived Enterococcus faecium from ulcerative colitis patients promotes colitis in a genetically susceptible mouse host. *Genome Biol.*, 2019, vol. 20, no. 1: 252. doi: 10.1186/s13059-019-1879-9
- Suzek B.E., Wang Y., Huang H., McGarvey P.B., Wu C.H., UniProt Consortium. UniRef clusters: a comprehensive and scalable alternative for improving sequence similarity searches. *Bioinformatics*, 2015, vol. 31, no. 6, pp. 926–932. doi: 10.1093/bioinformatics/btu739
- Trompette A., Gollwitzer E.S., Yadava K., Sichelstiel A.K., Sprenger N., Ngom-Bru C., Blanchard C., Junt T., Nicod L.P., Harris N.L., Marsland B.J. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.*, 2014, vol. 20, no. 2, pp. 159–166. doi: 10.1038/nm.3444

22. Uzal F.A., Navarro M.A., Li J., Freedman J.C., Shrestha A., McClane B.A. Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals. *Anaerobe*, 2018, vol. 53, pp. 11–20. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.06.002
23. Veloo A.C.M., Baas W.H., Haan F.J., Coco J., Rossen J.W. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* spp. and *Prevotella* spp. Dutch clinical isolates. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2019, vol. 25, no. 9, pp. 1156.e9–1156.e13. doi: 10.1016/j.cmi.2019.02.017
24. Warren Y.A., Tyrrell K.L., Citron D.M., Goldstein E.J.C. *Clostridium aldenense* sp. nov. and *Clostridium citroniae* sp. nov. isolated from human clinical infections. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 7, pp. 2416–2422. doi: 10.1128/JCM.00116-06
25. Wexler H.M. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007, vol. 20, no. 4, pp. 593–621. doi: 10.1128/cmr.00008-07
26. Wingett S.W., Andrews S. FastQ Screen: a tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*, 2018, vol. 7: 1338. doi: 10.12688/f1000research.15931.2
27. Wiperman M.F., Fitzgerald D.W., Juste M.A.J., Taur Y., Namasivayam S., Sher A., Bean J.M., Bucci V., Glickman M.S. Antibiotic treatment for tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome that persists long after therapy is completed. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1: 10767. doi: 10.1038/s41598-017-10346-6
28. Wolfe A.J. Glycolysis for microbiome generation. *Microbiol. Spectr.*, 2015, vol. 3, no. 3: 10.1128/microbiolspec.MBP-0014-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0014-2014

Авторы:

Юнусбаева М.М., к.б.н., старший научный сотрудник химико-биологического кластера ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

Терентьева Д.Р., инженер химико-биологического кластера ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия; младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Бородина Л.Я., врач-фтизиатр высшей категории, зам. главного врача по организационно-методической работе ГБУЗ Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер, г. Уфа, Россия;

Закирова А.М., врач-фтизиатр, зав. кабинетом мониторинга туберкулеза ГБУЗ Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер, г. Уфа, Россия;

Булатов Ш.Э., к.м.н., главный врач ГБУЗ Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер, г. Уфа, Россия;

Билалов Ф.С., д.м.н., главный врач ГБУЗ Республиканский медико-генетический центр, г. Уфа, Россия; доцент кафедры лабораторной диагностики ИДПО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия;

Юнусбаев Б.Б., к.б.н., старший научный сотрудник, доцент ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Yunusbaeva M.M., PhD (Biology), Senior Researcher, ChemBio Cluster, ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation;

Terentyeva D.R., Engineer, ChemBio Cluster, ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation; Junior Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Borodina L.Ya., Phthisiologist, Deputy Chief Physician for Organizational and Methodological Work, Republican Clinical Antituberculous Dispensary, Ufa, Russian Federation;

Zakirova A.M., Head of the Tuberculosis Monitoring Office, Republican Clinical Antituberculous Dispensary, Ufa, Russian Federation;

Bulatov S.E., PhD (Medicine), Head Physician, Republican Clinical Antituberculous Dispensary, Ufa, Russian Federation;

Bilalov F.S., DSc (Medicine), Head Physician, Republican Medical Genetics Center, Ufa, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Laboratory Diagnostics, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;

Yunusbayev B.B., PhD (Biology), Senior Researcher, Associate Professor, St. Petersburg State University, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.10.2023
Отправлена на доработку 14.10.2023
Принята к печати 18.10.2023

Received 04.10.2023
Revision received 14.10.2023
Accepted 18.10.2023

Иллюстрации к статье «Влияние длительной антибиотикотерапии на состав и метаболический профиль кишечного микробиома при туберкулезе легких» (авторы: М.М. Юнусбаева, Д.Р. Терентьева, Л.Я. Бородина, А.М. Закирова, Ш.Э. Булатов, Ф.С. Билалов, Б.Б. Юнусбаев) (с. 1079–1090)

Illustrations for the article “Influence of long-term antibiotic therapy on gut microbiome composition and metabolic profile in pulmonary tuberculosis” (authors: Yunusbaeva M.M., Terentyeva D.R., Borodina L.Ya., Zakirova A.M., Bulatov S.E., Bilalov F.S., Yunusbayev B.B.) (pp. 1079–1090)

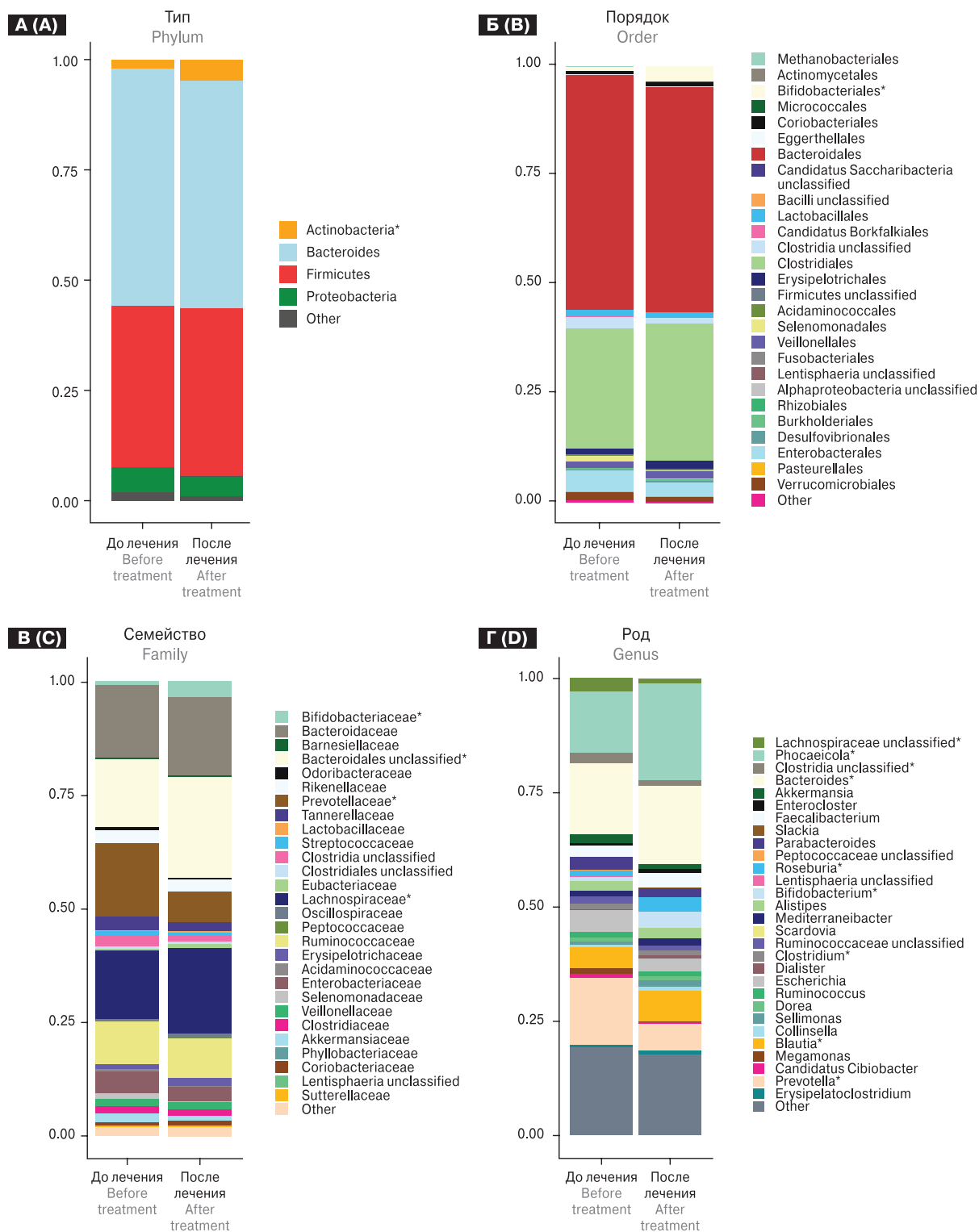


Рисунок 2. Таксономический состав микробиоты кишечника в исследуемых группах больных ТБ на уровне типа, порядка, семейства и рода

Figure 2. Taxonomic composition of the intestinal microbiota in the TB groups at the level of phylum, order, family, and genus

Примечание. * — указаны статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Note. * — significant at the 0.05 level ($p < 0.05$).

Иллюстрации к статье «Влияние длительной антибиотикотерапии на состав и метаболический профиль кишечного микробиома при туберкулезе легких» (авторы: М.М. Юнусбаева, Д.Р. Терентьева, Л.Я. Бородина, А.М. Закирова, Ш.Э. Булатов, Ф.С. Билалов, Б.Б. Юнусбаев) (с. 1079–1090)

Illustrations for the article “Influence of long-term antibiotic therapy on gut microbiome composition and metabolic profile in pulmonary tuberculosis” (authors: Yunusbaeva M.M., Terentyeva D.R., Borodina L.Ya., Zakirova A.M., Bulatov S.E., Bilalov F.S., Yunusbayev B.B.) (pp. 1079–1090)

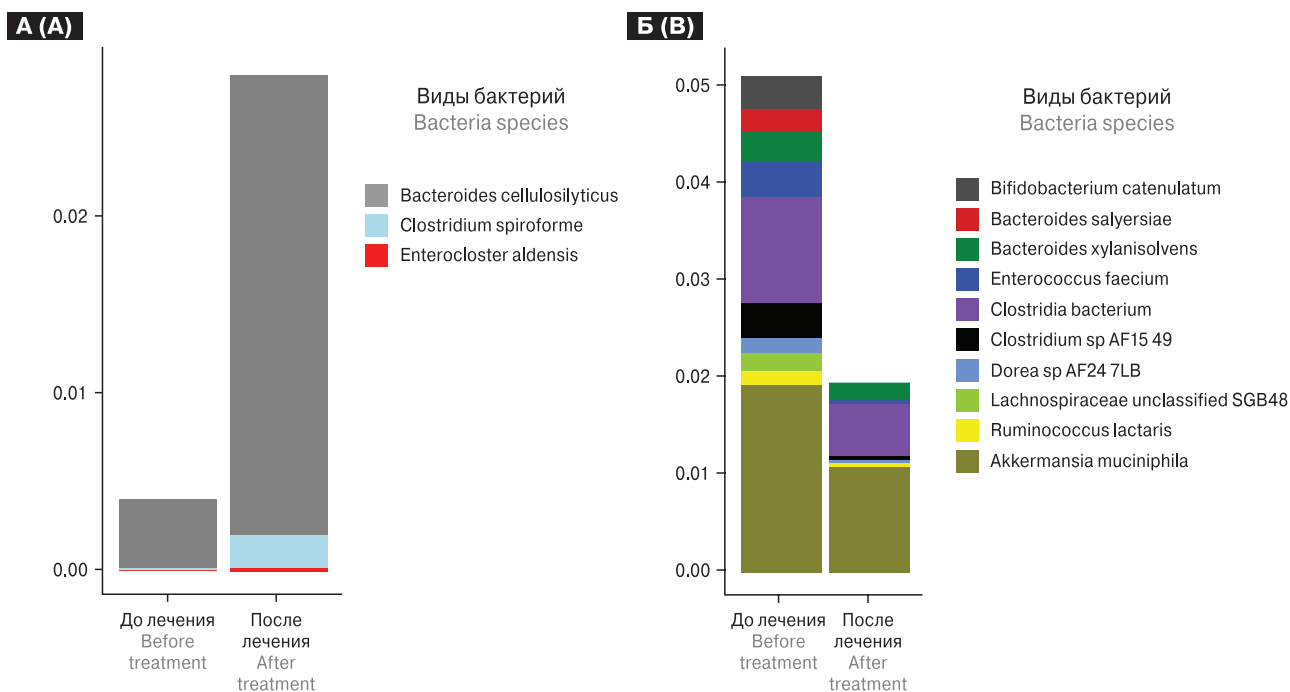


Рисунок 3. Частота дифференциально представленных таксонов, выявленных у больных ТБ до и после лечения

Figure 3. Percentage of differentially abundant taxa identified between pre-treatment and post-treatment TB pairs