

Кишечная микробиота при хронических заболеваниях печени у детей

Г.В. Вольтнец^{1,2}, А.В. Никитин¹⁻³, Т.А. Скворцова¹⁻³, А.С. Потапов⁴, В.В. Дудурич⁵,
Л.Г. Данилов^{5,6}

¹Научно-исследовательский клинический институт педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;

³ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница ДЗМ», Москва, Россия;

⁴ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва, Россия;

⁵Медико-генетический центр «СЕРБАЛАБ», Санкт-Петербург, Россия;

⁶ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Gut microbiota in chronic liver diseases in children

G.V. Volynets^{1,2}, A.V. Nikitin¹⁻³, T.A. Skvortsova¹⁻³, A.S. Potapov⁴, V.V. Dudurich⁵,
L.G. Danilov^{5,6}

¹Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

³Morozov Children's Municipal Clinical Hospital, Moscow, Russia;

⁴National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia;

⁵Medical Genetic Center CERBALAB, Saint Petersburg, Russia;

⁶Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Влияние кишечной микробиоты на развитие различных заболеваний вызывает огромный интерес исследователей. Однако данные об аксономическом разнообразии кишечной микробиоты при хронических заболеваниях печени у детей отсутствуют. Цель исследования. Изучение таксономического разнообразия кишечной микробиоты у детей с хроническими заболеваниями печени в сравнении с здоровыми пациентами.

Материалы и методы. Проведен метагеномный анализ кишечной микробиоты 24 детей с хроническими заболеваниями печени (средний возраст 10,3±4,7 года) с выделением целевого фрагмента гена 16S рРНК. В основную группу вошли 18 детей с аутоиммунными заболеваниями печени и 6 детей с неаутоиммунными заболеваниями печени. Группу сравнения составили 34 условно здоровых ребенка.

Результаты. Исследование выявило 684 вида микроорганизмов в исследуемых образцах кала пациентов. Анализ исследований показал, что образцы кала здоровых детей и пациентов с хроническими заболеваниями печени различаются по бактериальному разнообразию. Доминирующим таксоном у здоровых детей были *Neisseria flavescens*, у пациентов с хроническими заболеваниями печени — *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Blautia massiliensis*. При этом *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Blautia massiliensis* в образцах кала пациентов с хроническими заболеваниями печени повышено в 8 раз.

Заключение. Выявлены показатели различия в составе кишечной микробиоты у здоровых детей и детей с хроническими заболеваниями печени.

Ключевые слова: дети, кишечная микробиота, хронические болезни печени.

Для цитирования: Вольтнец Г.В., Никитин А.В., Скворцова Т.А., Потапов А.С., Дудурич В.В., Данилов Л.Г. Кишечная микробиота при хронических заболеваниях печени у детей. Рос вестн перинатол и педиатр 2023; 68:(2): 69–73. DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-2-69-73

The impact of gut microbiota on the development of various diseases is of great interest to researchers. However, data on the taxonomic diversity of the intestinal microbiota in chronic liver diseases in children are lacking.

Purpose. To study the taxonomic diversity of the fecal microbiota in children with chronic liver diseases in comparison with healthy patients.

Material and methods. A metagenomic analysis of the intestinal microbiota of 24 children with chronic liver diseases (mean age 10.3 ± 4.7 years) was carried out with the isolation of the target fragment of the 16S rRNA gene. The group included 18 children with autoimmune liver diseases and 6 children with non-autoimmune liver diseases. The comparison group consisted of fecal samples of 34 apparently healthy children.

Results. The conducted study revealed 684 types of microorganisms in the studied samples of patients' feces. An analysis of the conducted studies showed that fecal samples of healthy children and patients with chronic liver diseases differ in bacterial diversity. The dominant taxa in healthy children were *Neisseria flavescens*, in patients with chronic liver diseases, the dominant taxa were *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Blautia massiliensis*. At the same time, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Blautia massiliensis* in fecal samples of patients with chronic liver diseases was 8 times as high.

Conclusion. Studies have shown differences in the composition of the intestinal microbiota in healthy children and children with chronic liver diseases.

Key words: children, gut microbiota, chronic liver disease.

For citation: Volynets G.V., Nikitin A.V., Skvortsova T.A., Potapov A.S., Dudurich V.V., Danilov L.G. Gut microbiota in chronic liver diseases in children Ros Vestn Perinatol i Pediatr 2023; 68:(2): 69–73 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-2-69-73

В желудочно-кишечном тракте — самом большом и многофункциональном органе — персистируют микроорганизмы по количеству, в 10 раз превышающие количество клеток организма человека. В состав кишечного микробиома, который играет огромную роль в важнейших функциях организма человека, входит множество сообществ микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности. Исследования показывают тесную взаимосвязь кишечного микробиома с развитием таких заболеваний органов пищеварения, как воспалительные заболевания кишечника, болезни печени, онкологические заболевания. Предполагается, что этиопатогенез болезни Крона и язвенного колита, которые относятся к хроническим и рецидивирующим формам воспалительных заболеваний кишечника, является многофакторным процессом, связанным со сложным взаимодействием генетических факторов, факторов окружающей среды, иммунной дисрегуляцией слизистой оболочки и инфекционными агентами [1–4].

Кишечная микробиота представляет собой разнообразное и динамичное сообщество, биохимические

функции которого на исходном уровне обычно стабильны, но структура и функции его могут быть нарушены такими внешними воздействиями, как изменения в рационе, использование антибиотиков, воздействие ксенобиотиков [5–8]. Кроме того, члены этого сообщества могут исчезнуть из микробиоты, что приведет к потере их видового (и биохимического) разнообразия [9]. Продукты жизнедеятельности кишечной микробиоты влияют на функцию печени и метаболизм желчных кислот.

Однако, несмотря на огромный интерес к исследованиям влияния кишечной микробиоты и ее дисбаланса на развитие заболеваний, в том числе заболеваний органов пищеварения, нерешенных вопросов остается значительно больше, чем полученных ответов. Это обуславливает необходимость дальнейших исследований в этой области, особенно у детей.

Цель исследования: изучение таксономического разнообразия кишечной микробиоты у детей с хроническими заболеваниями печени по сравнению с таковым у здоровых пациентов.

Характеристика детей и методы исследования

Проведен метагеномный анализ кишечной микробиоты 24 детей с хроническими заболеваниями печени (средний возраст $10,3 \pm 4,7$ года) с выделением целевого фрагмента гена 16S рРНК. В группу вошли 18 детей с аутоиммунными заболеваниями печени и 6 детей с неаутоиммунными заболеваниями печени. Группу сравнения составили 34 условно здоровых ребенка.

Протоколы исследования одобрены независимыми локальными этическими комитетами и учеными советами ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» и ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница ДЗМ», в которых проводилось наблюдение пациентов. Представителями пациентов, а также самими пациентами в возрасте старше 14 лет было подписано информированное согласие на обработку персональных данных.

Метагеномное исследование образцов кала проводили в генетической лаборатории Медико-генетического центра «СЕРБАЛАБ» (Санкт-Петербург).

Статистическая обработка. Сравнение численности различных таксонов в разных когортах выполняли с помощью U-теста Манна–Уитни (для парных сравнений). Коррекцию множественных тестов проводили с помощью метода Бенджамина–Хохберга в R. Для расчета индекса разнообразия Шеннона матрица, содержащая общее количество ASV на уровне вида на образец, была предоставлена в качестве входных данных в пакет «vegan» на языке программирования R. Для идентификации специальных таксонов для каждой группы был проведен sPLS-DA анализ с помощью пакета «mulimix» на языке программирования R.

© Коллектив авторов, 2023

Адрес для корреспонденции: Волюнец Галина Васильевна — д.м.н., гл. науч. сотр., рук. отдела гастроэнтерологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, проф. кафедры инновационной педиатрии и детской хирургии факультета дополнительного профессионального образования Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, ORCID: 0000–0002–5413–9599 e-mail: volynec_g@mail.ru

Никитин Артем Вячеславович — к.м.н., вед. науч. сотр. отдела гастроэнтерологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева, врач–детский гастроэнтеролог отделения гастроэнтерологии Морозовской детской городской клинической больницы, асс. кафедры гастроэнтерологии факультета дополнительного профессионального образования Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, ORCID: 0000–0001–8837–9243

Скворцова Тамара Андреевна — к.м.н., вед. науч. сотр. отдела гастроэнтерологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева; доц. кафедры 2 гастроэнтерологии факультета дополнительного профессионального образования Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, зав. отделением гастроэнтерологии Морозовской детской городской клинической больницы; гл. внештатный детский специалист-гастроэнтеролог Департамента здравоохранения города Москвы, ORCID: 0000–0002–6525–8665

125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

Потапов Александр Сергеевич — д.м.н., проф., гл. науч. сотр., зав. гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей, ORCID: 0000–0003–4905–2373

119296 Москва, Ломоносовский просп., д. 2

Дудурин Василиса Валерьевна — рук. отдела «Микробиом» лаборатории «СЕРБАЛАБ», ORCID: 0000–0002–6271–5218

Данилов Лаврентий Глебович — биоинформатик лаборатории «СЕРБАЛАБ», лаборант-исследователь кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета, ORCID: 0000–0002–4479–3095

199106 Санкт-Петербург, Большой проспект Васильевского острова, д. 90, корп. 2

Результаты

Проведенное исследование выявило 684 вида микроорганизмов в исследуемых образцах кала пациентов, при этом установлено, что образцы кала здоровых детей и пациентов с хроническими заболеваниями печени различаются по бактериальному разнообразию (рис. 1). Доминирующим таксоном у здоровых детей были *Neisseria flavescens*, в то время как у пациентов с хроническими заболеваниями печени доминирующими таксонами были *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Blautia massiliensis* (рис. 2). При этом статистически значимо различалось процентное соотношение видов кишечной микробиоты у здоровых детей и пациентов с хроническими заболеваниями печени. *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Blautia massiliensis* в образцах кала пациентов с хроническими заболеваниями печени повышено в 8 раз (рис. 3).

Обсуждение

Изучение кишечного микробиома и его влияния на здоровье человека быстро развивалось за последние два десятилетия и стало одной из самых изучаемых областей медицинских исследований. Изучение микробиома составляет глобальную проблему, и кишечный микробиом — не исключение в этом отношении.

Несмотря на значительное разнообразие кишечной микробиоты у здоровых людей, результаты

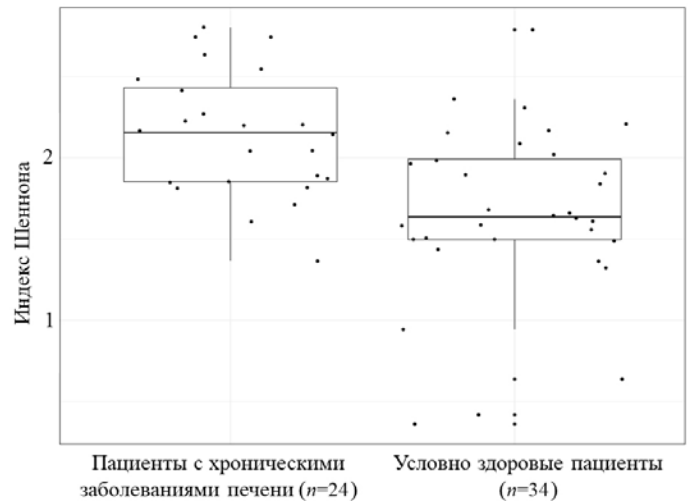


Рис. 1. Различия по бактериальному разнообразию кишечной микробиоты у здоровых детей и детей с хроническими заболеваниями печени.

Fig. 1. Differences in bacterial diversity of the intestinal microbiota in healthy children and children with chronic liver disease.

исследований свидетельствуют о ее дисбалансе при воспалительных заболеваниях кишечника со значительным снижением количества таких микробов, как *Prevotella copri* или бактерия *Faecalibacterium prausnitzii*, продуцирующими бутират. В то же время у здоровых людей отмечается высокая численность таких бактерий, как *Ruminococceae* [10, 11]. При этом печень как орган, функция которого непосредственно связана с функциями кишечника вследствие того, что она находится на границе между

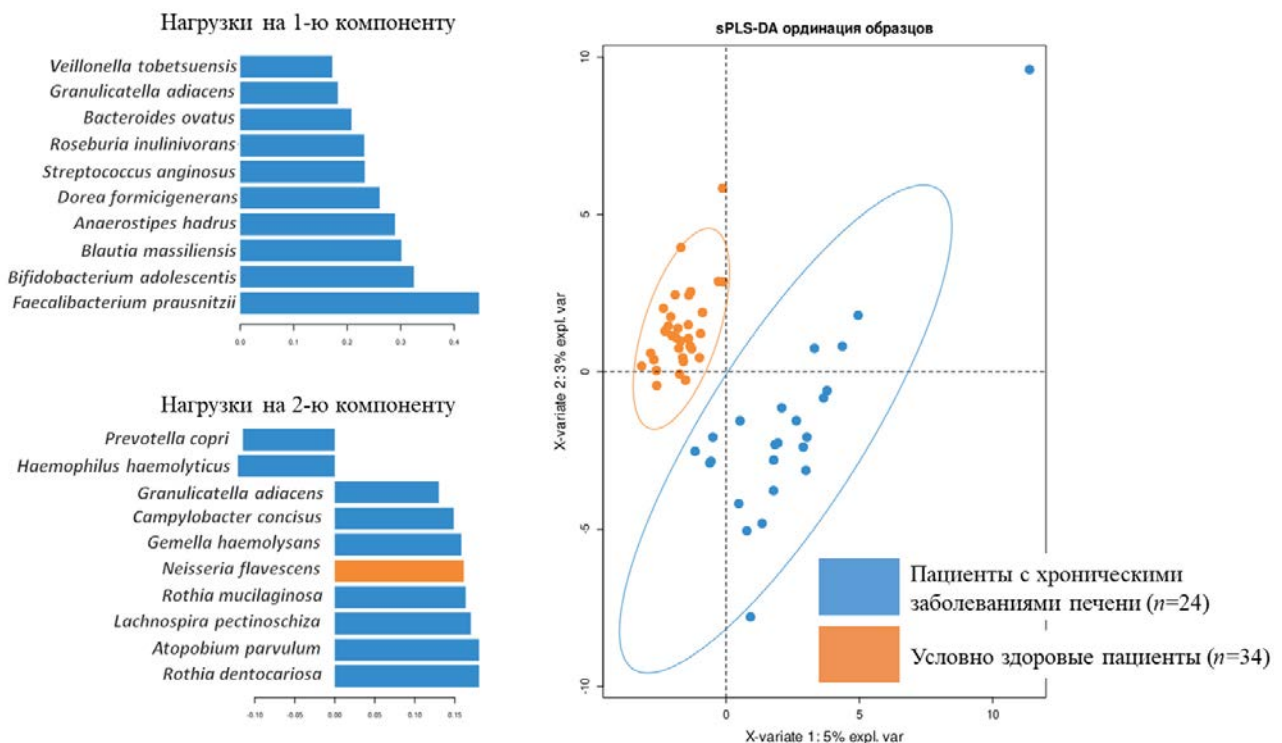


Рис. 2. Таксономический состав кишечной микробиоты у здоровых детей и пациентов с хроническими заболеваниями печени.
Fig. 2. Taxonomic composition of the gut microbiota in healthy children and patients with chronic liver disease.

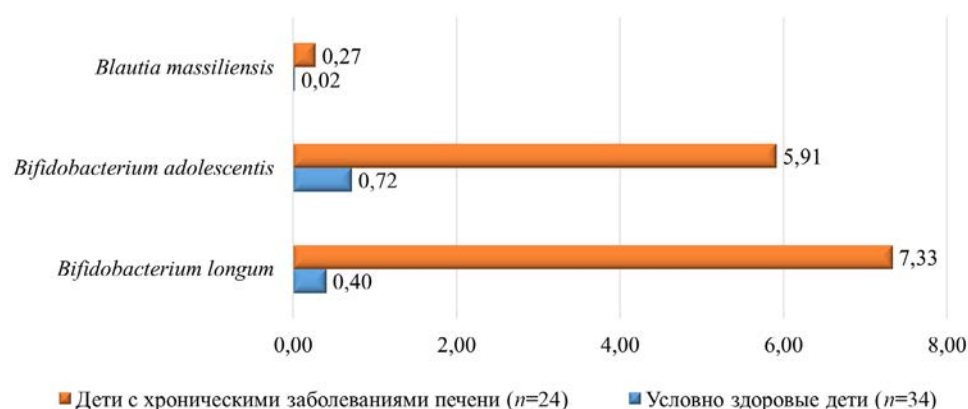


Рис. 3. Процентное соотношение видов бактерий кишечной микробиоты у здоровых детей и пациентов с хроническими заболеваниями печени.

Fig. 3. Percentage of bacterial species of the gut microbiota in healthy children and patients with chronic liver disease.

системным кровообращением и потоком молекул ксенобиотиков и микробно-ассоциированных молекулярных паттернов, поступающих в результате абсорбции в кишечнике, еще служит и продуцентом желчных кислот, метаболизм которых тесно ассоциирован с деятельностью кишечной микробиоты.

Известно, что иммунные/аутоиммунные воспалительные заболевания билиарной системы связаны с изменениями микробиоты. Первичный билиарный холангит и первичный склерозирующий холангит являются хроническими прогрессирующими воспалительными заболеваниями с поражением как крупных, так и мелких желчных протоков, что приводит к циррозу и печеночной недостаточности. Хорошо известная ассоциация первичного склерозирующего холангита с язвенным колитом и снижением функции эпителиального барьера кишечника подчеркивает косвенную связь первичного склерозирующего холангита с микробиотой. Многочисленные таксономические анализы образцов кала и слизистых оболочек у пациентов выявили дисбактериозы с обычно применимыми оговорками относительно коррелятивного характера этих исследований [12]. Однако эти исследования проводились у взрослых. Таких исследований у детей в доступной литературе мы не обнаружили. Механический перенос микробиоты человека, страдающего первичным склерозирующим холангитом, стерильным мышам вызывал снижение барьерной функции эпителия кишечника и индукцию печеночных Th17-ответов [13]. Кроме того, в этих моделях описаны изменения проницаемости кишечника и NLRP3-опосредованное воспаление печени [14].

Анализ проведенных исследований показал, что у здоровых детей доминирует бактерия *Neisseria flavescens*, активно редуцирующая кислород, что снижает окислительно-восстановительный потенциал среды обитания и создает условия для развития анаэробной микрофлоры. В то же время у пациентов с хроническими заболеваниями печени доминирующими таксонами были *Bifidobacterium longum* (улуч-

шают деятельность мозга, снижают уровень фактора некроза опухоли альфа, С-реактивного белка, аспаратаминотрансферазы, сывороточного эндотоксина, стеатоза и индекса активности при неалкогольной жировой болезни печени, а также играют важную роль в развитии и созревании иммунной системы); *Bifidobacterium adolescentis* (производят гамма-аминомасляную кислоту, влияющую на нервно-психические функции, регуляцию артериального давления и деятельность сердца, а также контролируют гормон роста); *Blautia massiliensis* (обладают пробиотическими свойствами, производят ацетат). Известна их антибиотикорезистентность к аминогликозидам, сульфаметоксазолу, азтреонаму и ципрофлоксацину. Связь между обилием *Blautia* и болезнями пока неясна, но отмечено снижение их количества в кишечной микробиоте у больных колоректальным раком, при циррозе печени, при болезни Крона.

Таким образом, известно, что бифидобактерии обеспечивают множество важных процессов в организме, влияя на обмен витаминов, в том числе витамина D, и микроэлементов; вырабатывают органические жирные кислоты, участвуют в синтезе белков, в том числе иммуноглобулинов, активируют процессы пищеварения, обеспечивают защиту кишечного барьера от патогенных микроорганизмов. Однако избыток бифидобактерий может быть источником воспаления слизистой оболочки, что снижает образование ферментов и сопровождается еще более тяжелыми нарушениями переваривания и всасывания пищи и обуславливает возникновение болевого синдрома, метеоризм, диарею и снижение массы тела ребенка. Проведенные исследования показали, что в образцах кала пациентов с хроническими заболеваниями печени количество *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Blautia massiliensis* повышено в 8 раз.

Заключение

Проведенные исследования показали различия в составе кишечной микробиоты у здоровых детей и детей с хроническими заболеваниями печени.

Новые подходы к секвенированию позволяют проводить беспристрастные анализы для выявления патогенов, пропущенных методами целевого секвенирования и культивирования. Хотя метагеномные исследования еще не получили широкого распространения, они уже использовались для диагностики инфекций у детей, выявления генов резистентности в клинических образцах и характеристики вспышек заболеваний. В настоящее время стоимость и дли-

тельность выполнения работ ограничивают их применение в клинических лабораториях, но новые платформы и повышенный комфорт при использовании этих методов продолжают продвигать диагностическую метагеномику в клиническую педиатрию [15]. В этой области еще предстоит провести много исследований. В ближайшем будущем педиатры будут все чаще использовать метагеномные методы при обследовании и выборе лечения детей.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Xu X.R., Liu C.Q., Feng B.S., Liu Z.J. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(12): 3255–3264. DOI: 10.3748/wjg.v20.i12.3255
2. Carrière J., Darfeuille-Michaud A., Nguyen H.T. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(34): 12102–12117. DOI: 10.3748/wjg.v20.i34.12102
3. Abraham C., Cho J.H. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009; 361(21): 2066–2078. DOI: 10.1056/NEJMra0804647
4. Kaser A., Zeissig S., Blumberg R.S. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 573–621. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409–101225
5. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014; 505(7484): 559–563. DOI: 10.1038/nature12820
6. Sonnenburg E.D., Smits S.A., Tikhonov M., Higginbottom S.K., Wingreen N.S., Sonnenburg J.L. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* 2016; 529(7585): 212–215. DOI: 10.1038/nature16504
7. Modi S.R., Collins J.J., Relman D.A. Antibiotics and the gut microbiota. *Clin Invest* 2014; 124(10): 4212–4218. DOI: 10.1172/JCI72333
8. Maurice C.F., Haiser H.J., Turnbaugh P.J. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell* 2013; 152(1–2): 39–50. DOI: 10.1016/j.cell.2012.10.052
9. Sonnenburg J.L., Backhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 2016; 535(7610): 56–64. DOI: 10.1038/nature18846
10. Huttenhower C., Gevers D., Knight R., Abubucker S., Badger J.H., Chinwalla A.T. et al. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486(7402): 207–214. DOI: 10.1038/nature11234
11. Gevers D., Kugathasan S., Denson L.A., Vázquez-Baeza Y., Van Treuren W., Ren B. et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 2014; 15(3): 382–392. DOI: 10.1016/j.chom.2014.02.005
12. Kummel M., Hov J.R. The gut microbial influence on cholestatic liver disease. *Liver Int* 2019; 39(7): 1186–1196. DOI: 10.1111/liv.14153
13. Nakamoto N., Sasaki N., Aoki R., Miyamoto K., Suda W., Teratani T. et al. Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. *Nat Microbiol* 2019; 4(3): 492–503. DOI: 10.1038/s41564-018-0333-1
14. Liao L., Schneider K.M., Galvez E.J.C., Frissen M., Marschall H.U., Su H. et al. Intestinal dysbiosis augments liver disease progression via NLRP3 in a murine model of primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2019; 68(8): 1477–1492. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316670
15. Волынец Г.В., Никитин А.В., Скворцова Т.А. Кишечный микробом и современные методы его исследования у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2022; 67 (4): 5–13. [Volynets G.V., Nikitin A.V., Skvortsova T.A. Intestinal microbiome and modern methods of its study in children. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Peditrii* 2022; 67(4): 5–13. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027-4065-2022-67-4-5-13

Поступила: 23.01.23

Received on: 2023.01.23

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Биокодекса Микробиота Фонд, Национальный грант 2021, Россия.

The study was supported by the Biocodex Microbiota Foundation, National Grant 2021, Russia.

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.