

Влияние урсодезоксихолевой кислоты на кишечную микробиоту у детей с хроническими заболеваниями печени

Г.В. Вольнец¹, А.В. Никитин^{1, 2}, Т.А. Скворцова^{1–3}, А.С. Потапов⁴, В.В. Дудурич⁵, Л.Г. Данилов^{5, 6}

¹ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева» (Институт Вельтищева) ФГАУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГАУ 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 CERBALAB, Санкт-Петербург, Россия;

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

Effect of ursodeoxycholic acid on the intestinal microbiota in children with chronic liver disease

G.V. Volynets¹, A.V. Nikitin^{1, 2}, T.A. Skvortsova^{1–3}, A.S. Potapov⁴, V.V. Dudurich⁵, L.G. Danilov^{5, 6}

¹Veltishev 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», St. Petersburg, Russia;

⁶Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Урсодезоксихолевая кислота представляет собой третичную желчную кислоту, у человека она содержится в низкой концентрации, обладает хорошо известными терапевтическими свойствами и первоначально использовалась для лечения холестаических заболеваний печени. Однако исследований по влиянию урсодезоксихолевой кислоты на состав кишечной микробиоты очень мало, особенно у детей с хроническими заболеваниями печени.

Цель исследования. Определить различия в таксономическом разнообразии микробиоты кала у детей с хроническими заболеваниями печени, которые получают или не получают урсодезоксихолевую кислоту.

Материал и методы. Проведен метагеномный анализ кишечной микробиоты у 24 детей с хроническими заболеваниями печени (средний возраст 10,3±4,7 года) с выделением региона V3–V4 гена *16S rPHK*. В исследуемую группу вошли 18 детей с аутоиммунными заболеваниями печени и 6 детей с неаутоиммунными заболеваниями печени. В основную группу вошли 17 детей, которые получали урсодезоксихолевую кислоту. Группу сравнения составили 7 детей, не получавшие урсодезоксихолевую кислоту.

Результаты. Выявлено, что образцы кала, полученные у пациентов, получающих препараты урсодезоксихолевой кислоты, не отличаются по таксономическому разнообразию кишечной микробиоты от образцов пациентов, не получающих этот препарат. Более детальное исследование по определению таксономического разнообразия в образцах пациентов, получающих урсодезоксихолевую кислоту, и детей, не получающих препараты урсодезоксихолевой кислоты, с использованием метода sPLS-DA, показало, что у пациентов, не получающих препараты урсодезоксихолевой кислоты, доминируют такие таксоны, как *Streptococcus anginosus*, *Coprococcus eutactus*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Angelakissella massiliensis* и *Gemella haemolysans*. При этом для пациентов, получающих препараты урсодезоксихолевой кислоты, характерно доминирование таксона *Anaerostipes hadrus*. Анализ различий процентного соотношения видов бактерий кишечной микробиоты показал, что у пациентов, получающих урсодезоксихолевую кислоту, повышена концентрация *A. hadrus*, в то время как у пациентов, не получающих эти препараты, значительно увеличено содержание *Bacteroides dorei*, *Akkermansia muciniphila*, а также увеличено количество других бактерий.

Заключение. Урсодезоксихолевая кислота положительно влияет на кишечную микробиоту у детей с хроническими заболеваниями печени, увеличивая количество микроорганизмов, вырабатывающих короткоцепочечные жирные кислоты.

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

Для цитирования: Вольнец Г.В., Никитин А.В., Скворцова Т.А., Потапов А.С., Дудурич В.В., Данилов Л.Г. Влияние урсодезоксихолевой кислоты на кишечную микробиоту у детей с хроническими заболеваниями печени. Рос вестн перинатол и педиатр 2023; 68:(3): 46–54. DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-3-46-54

Триллионы микробов, обитающих в кишечнике человека — кишечная микробиота — участвуют в различных метаболических и иммунных процессах в организме и играют важную роль в поддержании гомеостаза кишечника. Регуляторные функции кишечной микробиоты основаны преимущественно на микробных метаболитах, в том числе таких субстратах, как желчные кислоты, которые играют жизненно важную роль в обмене веществ и иммунологической регуляции, и короткоцепочечные жирные кислоты

(включая ацетат, пропионат и бутират), которые могут быстро абсорбироваться в толстой кишке, после чего входят в цикл трикарбоновых кислот для образования АТФ и служат ключевым источником энергии для колоноцитов и гепатоцитов [1–3].

У млекопитающих существуют два основных класса желчных кислот: первичные и вторичные, третичные. В то время как первичные желчные кислоты синтезируются в результате катаболизма холестерина в гепатоцитах, вторичные и третичные желчные кислоты

Ursodeoxycholic acid is a secondary bile acid (BA), present in humans at low concentrations, with well-known therapeutic properties, and was originally used to treat cholestatic liver disease. However, there are very few studies on the effect of ursodeoxycholic acid on the composition of the gut microbiota, especially in children with chronic liver diseases.

Purpose. To determine differences in the taxonomic diversity of the fecal microbiota in children with chronic liver disease who receive or do not receive ursodeoxycholic acid.

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 identification of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene. The group included 18 children with autoimmune liver diseases and 6 children with non-autoimmune liver diseases. 17 children received ursodeoxycholic acid. The comparison group consisted of 7 children who did not receive ursodeoxycholic acid.

Results. This study found that fecal samples from patients treated with ursodeoxycholic acid do not differ in the taxonomic diversity of the gut microbiota from samples from patients not treated with ursodeoxycholic acid. A more detailed study to determine the existing taxonomic diversity in samples of patients treated with ursodeoxycholic acid and not treated with ursodeoxycholic acid, using the sPLS-DA method, showed that taxa such as *Streptococcus anginosus*, *Coprococcus eutactus*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Angelakissella massiliensis* and *Gemella haemolysans* dominated in patients not treated with ursodeoxycholic acid. And for patients receiving drugs with ursodeoxycholic acid, the dominance of the taxon *Anaerostipes hadrus* is typical. An analysis of differences in the percentage of intestinal microbiota bacterial species showed that patients receiving ursodeoxycholic acid had a higher count of *Anaerostipes hadrus*, while in patients not receiving ursodeoxycholic acid preparations, the count of *Bacteroides dorei*, *Akkermansia muciniphila* was significantly increased, and the counts of other bacteria were also increased.

Conclusion. Studies have shown that ursodeoxycholic acid has a positive effect on the intestinal microbiota in children with chronic liver disease by increasing the number of microorganisms that produce short-chain fatty acids.

Key words: children, gut microbiota, chronic liver diseases, ursodeoxycholic acid.

For citation: Volynets G.V., Nikitin A.V., Skvortsova T.A., Potapov A.S., Dudurich V.V., Danilov L.G. Effect of ursodeoxycholic acid on the intestinal microbiota in children with chronic liver/Ros Vestn Perinatol i Pediatr 2023; 68:(3): 46–54 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-3-46-54

являются производными первичных желчных кислот и образуются в результате взаимодействия с кишечной микробиотой и микробного метаболизма [4, 5].

Первичные желчные кислоты — холевая и хенодезоксихолевая — синтезируются в гепатоцитах из холестерина в результате сложных ферментативных реакций, инициируемых ферментами холестерин-7 α -гидроксилазой (CYP7A1) и стерол-27-гидроксилазой (CYP27A1). После образования первичные желчные кислоты ферментом N-ацилтрансферазой конъюгируются с аминокислотами таурином или глицином. Это и позволяет желчным кислотам сохранять свою амфипатическую структуру, что имеет решающее значение для их эмульгирующей активности в двенадцатиперстной кишке в отношении липидов пищи [3, 5]. Конъюгированные желчные кислоты после попадания с желчью в кишечник деконъюгируются, подвергаясь гидролизу, опосредованному гидролазой желчных солей, которая обнаруживается в бактериях многочисленных родов, включая *Lactobacillus*, *Bifidobacte-*

rium, *Clostridium*, *Bacteroides* и *Enterococcus*, с последующим 7 α -дегидроксилированием и эпимеризацией и превращаются в вторичные желчные кислоты, а именно дезоксихолевую, литохолевую и третичную урсодезоксихолевую [6–8]. Однако достижения в области масс-спектрометрического анализа желчных кислот привели к идентификации и характеристике более 20 различных видов вторичных желчных кислот у человека и грызунов [9]. Это разнообразие первичных желчных кислот и их вторичных метаболитов подчеркивает сложную и динамическую природу, благодаря которой желчные кислоты могут влиять на иммунный ответ слизистой оболочки, поскольку каждый вид желчных кислот обладает уникальными физико-химическими свойствами (например, гидрофобностью, критическими концентрациями мицелл, проницаемостью мембран), а также различным сродством к рецепторам клеток и белкам-транспортёрам.

В подвздошной кишке желчные кислоты реабсорбируются по четко организованному пути трансклеточного транспорта. Люминальные желчные кислоты,

© Коллектив авторов, 2023

Адрес для корреспонденции: Вольнец Галина Васильевна — д.м.н., гл. науч. сотр., рук. отдела гастроэнтерологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е. Вельтищева; 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, 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; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, ORCID: 0000-0003-4905-2373

119296 Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1

Дудурич Василиса Валерьевна — рук. отдела «Микробиом» лаборатории «CERBALAB», ORCID: 0000-0002-6271-5218

Данилов Лаврентий Глебович — биоинформатик лаборатории «CERBALAB», 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

достигающие подвздошной кишки, сначала связываются с апикальным натрий-зависимым переносчиком желчных кислот, с помощью которого и транспортируются через апикальную поверхность энтероцитов (ASBT; кодируется *SLC10A2*) [8]. При попадании в цитоплазму желчные кислоты быстро связываются и сопровождаются к базолатеральной поверхности белком подвздошной кишки, связывающим желчные кислоты (IBABP; кодируется *FABP6*), где они транспортируются через базолатеральную мембрану и в нижележащую ткань слизистой оболочки с помощью комплекса гетеродимерных переносчиков органических растворенных веществ α/β (OST α/β ; кодируется *SLC51A/B*) [10]. Желчные кислоты, реабсорбированные в подвздошной кишке, накапливаются в слизистой оболочке и диффундируют в фенестрированные капилляры для портальной рециркуляции в печень. Эта энтерогепатическая циркуляция желчных кислот совершается примерно от 6 до 8 раз в сутки в зависимости от режима питания и поддерживает циркулирующее количество желчных кислот на уровне от 4 до 6 г [11, 12].

Желчные кислоты обладают мощными сигнальными функциями через набор специализированных рецепторов на клетках, включая рецептор 1-го типа желчных кислот, связанный с белком G (TGR5), фарнезоидный X-рецептор (FXR) и рецептор витамина D (VDR) [2, 5, 8]. Таким образом, желчные кислоты и кишечная микробиота оказывают двунаправленное влияние друг на друга. Синтез и метаболизм желчных кислот в значительной степени регулируются микробиотой кишечника. Влияние на процесс образования вторичных желчных кислот относят к ограниченному количеству бактерий с ферментами, индуцируемыми желчными кислотами (BAI — bile acid-inducible), в том числе кластеру *Clostridium XIVa* (например, *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae*) и *Eubacterium* в типе *Firmicutes* [8]. Микробиота кишечника через продукты своего метаболизма может регулировать также ферменты печени CYP7A1 и CYP27A1, тем самым влияя на продукцию желчных кислот [10]. Важно, что микробиота кишечника участвует в биотрансформации желчных кислот с помощью микробных ферментов.

Желчные кислоты также взаимно регулируют микробную колонизацию в желудочно-кишечном тракте благодаря как прямой бактериостатической активности, так и зависимой от желчных кислот передаче сигналов в интестинальные эпителиальные клетки. Например, конститутивно высокие концентрации желчных кислот в просвете тонкой кишки (1–10 ммоль) приближаются к наиболее критическим концентрациям мицеллообразования. Это не только облегчает эмульгирование пищевых липидов, но также и приводит к прямому лизису чувствительных к желчи бактерий. Соответственно как клиническое, так и экспериментально индуцированное повреждение печени снижает секрецию

желчных кислот и приводит к избыточному бактериальному росту в тонкой кишке [3, 5, 11]. К аналогичному повышению уровня бактерий в тонкой кишке на модели животных приводит лигирование желчных протоков, в то время как кормление грызунов желчью или конъюгированными желчными кислотами во время состояний относительной недостаточности желчных кислот снижает рост бактерий в тонкой кишке до нормального уровня [12, 13].

Активность желчных кислот, наблюдаемая *in vivo*, не проявляется при их физиологических концентрациях *in vitro* [14–17]. Поэтому были предложены два дополнительных механизма для объяснения антимикробной активности желчных кислот *in vivo*. Во-первых, бактериостатические функции желчных кислот усиливаются в присутствии других компонентов желчи, так как желчные кислоты, содержащиеся в желчи *in vivo*, существуют в виде смешанных мицелл вместе с фосфолипидами, длинноцепочечными жирными кислотами и билирубином [18]. Во-вторых, недавние исследования показали, что зависимый от желчных кислот фарнезоидный X-рецептор (FXR) в интестинальных эпителиальных клетках способствует экспрессии антимикробных пептидов [19, 20]. Таким образом, антимикробные эффекты желчных кислот *in vivo*, а также их иммунорегуляторные функции, вероятно, включают ряд синергетических механизмов.

В подвздошной кишке активно рециркулируют только конъюгированные желчные кислоты — это один из процессов, с помощью которого микробный метаболизм напрямую влияет на реабсорбцию желчных кислот в подвздошной кишке. Действительно, одной из причин диареи, вызванной желчными кислотами, служит избыточный бактериальный рост в тонкой кишке, который вызывает чрезмерную деконъюгацию желчных кислот и снижение их реабсорбции в подвздошной кишке [21].

Урсодезоксихолевая кислота и кишечная микробиота. Урсодезоксихолевая кислота представляет собой третичную желчную кислоту, полученную из хенодесоксихолевой кислоты, и у человека она содержится в низкой концентрации. Урсодезоксихолевая кислота обладает хорошо известными терапевтическими свойствами и первоначально использовалась для лечения холестатических заболеваний печени [22–27]. Она также может улучшить колитогенный дисбактериоз. В частности, в модели на животных нормализовывалось соотношение *Firmicutes/Bacteroidetes* и увеличивалась численность *Clostridium cluster XIVa* и *Akkermansia muciniphila*. В результате у мышей уменьшались проявления колита [22]. Урсодезоксихолевая кислота может усиливать экспрессию FXR и VDR и восстанавливать гомеостаз желчных кислот [24]. Кроме того, урсодезоксихолевая кислота может снижать выработку провоспалительных цитокинов, ингибировать гибель энтероцитов и защищать целостность кишечного

УРСОСАН® ФОРТЕ

БОЛЬШЕ ЧЕМ ГЕПАТОПРОТЕКТОР

В форме таблеток в дозе 500 мг



• Помогает:

- ЗАЩИЩАТЬ ПЕЧЕНЬ
- ЗАБОТИТЬСЯ О СОСУДАХ*
- ОБЛЕГЧАТЬ СИМПТОМЫ РЕФЛЮКСА



реклама ЛП-003388 от 28.12.15

УРСОСАН® – препарат с множественными регуляторными эффектами для патогенетической терапии заболеваний печени, желчевыводящих путей и билиарного рефлюкса.

Способствует комплексному подходу к лечению коморбидных пациентов с НАЖБП на фоне метаболического синдрома.

УРСОСАН® – ЭТАЛОННЫЙ ПРЕПАРАТ УДХК В РОССИИ

- Основные исследования эффективности УДХК в России выполнены именно на препарате Урсосан*.
- Урсосан – лидер врачебных назначений среди препаратов УДХК и гепатопротекторов в России.**

PRO.MED.CS
Praha a.s.

WWW.URSOSAN.RU

* Мультицентровое исследование РАКУРС,
исследование СТОПЭРБ,
Мультицентровое исследование УСПЕХ

** Prindex «Мониторинг назначений ЛП» 2022

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ РАБОТНИКОВ

эпителиального барьера [24, 25]. Указанные эффекты в значительной степени сопровождались подавлением воспаления кишечника. Однако клиническая практика терапии урсодезоксихолевой кислотой в период ремиссии воспалительных заболеваний кишечника пока ограничивается небольшим числом случаев. Пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника имеют высокий риск развития колоректальной дисплазии и рака [26]. Клинические испытания показали, что урсодезоксихолевая кислота может снижать этот риск у пациентов с язвенным колитом [5]. Обилие *F. prausnitzii* увеличивалось, а *Ruminococcus gnavus* уменьшалось при лечении урсодезоксихолевой кислотой, и этот результат лечения ассоциировался с низким риском развития колоректальной аденомы у мужчин. У женщин такой взаимосвязи не наблюдалось, вероятно, из-за небольшого размера выборки [27]. Таким образом, клиническое использование урсодезоксихолевой кислоты у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, особенно с точки зрения дозировки и продолжительности лечения, требует дальнейшего изучения.

Первичный склерозирующий холангит обычно связан с воспалительными заболеваниями кишечника, особенно с язвенным колитом [28]. Почти 66% пациентов с первичным склерозирующим холангитом имеют сопутствующие воспалительные заболевания кишечника (75% приходится на язвенный колит). У пациентов при сочетании первичного склерозирующего холангита с воспалительным заболеванием кишечника существенно различаются профили микробиоты и нарушений метаболизма желчных кислот по сравнению с таковыми у здоровых людей. Активируются также сигнальные пути желчных кислот [29]. Урсодезоксихолевая кислота — наиболее изученный препарат при первичном склерозирующем холангите. Ее потенциальные преимущества при первичном склерозирующем холангите включают увеличение оттока желчи, прямую и непрямую цитопротекцию, стабилизацию клеточных мембран, иммуномодуляцию, разбавление гидрофобного пула желчных кислот, подавление апоптоза, противовоспалительный эффект. Урсодезоксихолевая кислота улучшает биохимические показатели функции печени в сыворотке крови и гистологические показатели при лечении первичного склерозирующего холангита. Практическое руководство AASLD (2022) по первичному склерозирующему холангиту рекомендует пациентам с устойчиво повышенным уровнем показателей холестаза (щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтранспептидаза) лечение урсодезоксихолевой кислотой в дозе 13–23 мг/кг сут. При хорошей переносимости урсодезоксихолевой кислоты терапия может быть продолжена, если наблюдается снижение или нормализация уровня щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтранспептидазы или нивелирование симптомов заболевания через 12 мес от начала лечения [30, 31].

Цель исследования: определить различия в таксономическом разнообразии микробиоты кала у детей с хроническими заболеваниями печени, которые получают или не получают урсодезоксихолевую кислоту.

Характеристика детей и методы исследования

Проведен метагеномный анализ кишечной микробиоты у 24 детей с хроническими заболеваниями печени (средний возраст $10,3 \pm 4,7$ года) с выделением целевого фрагмента гена *16S rPHK*. В исследуемую группу вошли 18 детей с аутоиммунными заболеваниями печени и 6 детей с неаутоиммунными заболеваниями печени. Исследование сплошное — материал собирали одновременно у всех детей с заболеваниями печени, находившихся на обследовании на момент сбора материала. В основную группу вошли 17 детей, которые получали урсодезоксихолевую кислоту в дозе 15 мг/кг/сут в течение не менее 6 нед. Группу сравнения составили 7 пациентов с хроническими заболеваниями печени, которые не получали урсодезоксихолевую кислоту.

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 проводилось в генетической лаборатории Медико-генетического центра CERBALAB (Санкт-Петербург).

Биоинформационный анализ секвенирования *16S rPHK*. Данные секвенирования *16S rPHK* проанализированы с использованием биоинформационного конвейера, реализованного на языках программирования R v.3.6 (R Core Team, 2014) и Python. На первом этапе конвейера праймерные последовательности обрезались в начале парных считываний, при этом пары считываний, не содержащие праймерных последовательностей, отбрасывались. Далее мы обрезаем 25 пар оснований с конца каждого прочтения как некачественные основания и обрабатывали полученные данные с помощью пайплайна DADA2 для идентификации точных вариантов последовательности [32]. После определения точных вариантов последовательности прямые и обратные чтения объединялись путем конкатенации и полученные последовательности использовались для наивной байесовской таксономической классификации с использованием базы данных SILVA v138 в качестве эталона [33, 34]. Определение вида проводилось с помощью алгоритма точного соответствия в DADA2 с использованием последовательностей SILVA v138, предварительно обработанных соответствующим образом с помощью пользовательских скриптов.

Статистическая обработка. Сравнение численности различных таксонов в разных когортах проводилось с помощью критерия *U* Манна–Уитни (для парных сравнений). Коррекцию множественных тестов осуществляли 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. В целях идентификации специальных таксонов для каждой группы был проведен sPLS-DA анализ с помощью пакета *multmix* на языке программирования R.

Результаты

Проведенное исследование выявило 684 вида микроорганизмов в исследуемых образцах кала пациентов. Анализ проведенных исследований показал, что образцы кала, взятые у пациентов, получающих лечение урсодезоксихолевой кислотой, не отличаются в таксономическом разнообразии кишечной

микробиоты от образцов кала пациентов, не получающих урсодезоксихолевую кислоту (рис. 1).

Более детальное исследование по определению таксономического разнообразия в образцах пациентов, получающих урсодезоксихолевую кислоту и не получающих препараты урсодезоксихолевой кислоты, с использованием метода sPLS-DA (позволяет при построении ординации выявить таксоны, характерные для каждой группы), показало, что у пациентов, не получающих препараты урсодезоксихолевой кислоты, преобладают такие таксоны, как *Streptococcus anginosus*, *Coprococcus eutactus*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Angelakissella massiliensis* и *Gemella haemolysans*. При этом для пациентов, получающих препараты урсодезоксихолевой кислоты, характерно увеличение количества *Anaerostipes hadrus* (рис. 2).

Анализ различий процентного соотношения видов бактерий кишечной микробиоты в образцах кала у детей с хроническими заболеваниями печени в зависимости от лечения урсодезоксихолевой кислотой показал, что у пациентов, получаю-

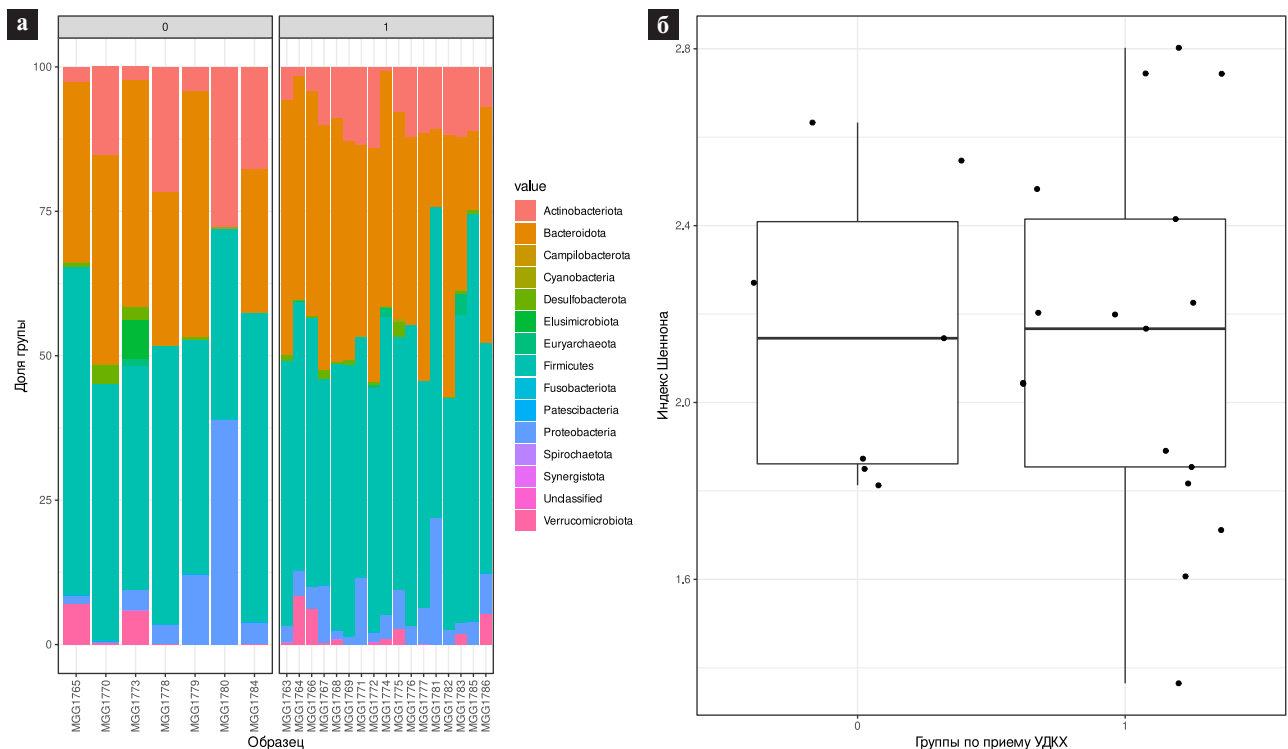


Рис. 1. Различия по бактериальному разнообразию кишечной микробиоты у детей с хроническими заболеваниями печени, получающих и не получающих урсодезоксихолевую кислоту (УДХК).

Образцы пациентов, получающих лечение препаратами УДХК, не отличаются в таксономическом разнообразии от образцов пациентов без лечения: а — распределение таксонов для пациентов, получающих УДХК, и пациентов, не получающих препараты УДХК; б — индекс разнообразия Шеннона не различается для пациентов, получающих препараты УДХК (1) и пациентов, не получающих УДХК (0). Сравнение проводилось с помощью теста Вилкоксона и выявило отсутствие различий между группами ($W=60; p=1$).

Fig. 1. Differences in bacterial diversity of the intestinal microbiota in children with chronic liver disease receiving and not receiving ursodeoxycholic acid (UDCA). Samples from patients treated with UDCA do not differ in taxonomic diversity from samples from patients without treatment: а — distribution of taxa for patients receiving UDCA and patients not receiving UDCA preparations; б — the Shannon Diversity Index does not differ between patients treated with UDCA (1) and patients not treated with UDCA (0). Comparison was performed using the Wilcoxon test and showed no difference between the groups ($W=60, p\text{-value}=1$).

ших урсодезоксихолевую кислоту, было повышена концентрация *A. hadrus*, в то время как у пациентов, не получающих препараты урсодезоксихолевой кислоты, значительно повышено количество *Bacteroides dorei*, *Akkermansia muciniphila*, а также повышено количество других бактерий (рис. 3).

Обсуждение

Показано, что вторичные и третичные желчные кислоты дают более выраженный противовоспалительный эффект, чем первичные желчные кислоты [35, 36]. Установлено, что вторичные желчные кислоты и их производные способствуют дифференцировке клеток Treg и ингибируют дифференцировку клеток Th17 [1, 37]. Кроме того, желчные кислоты играют решающую роль во врожденном иммунитете кишечника через рецепторы, активируемые желчными кислотами [38]. Однако в недавних исследованиях на модели животных показано, что высокие дозы и длительный прием дезоксихолевой кислоты могут усугубить воспаление кишечника [39].

Установлена также тесная взаимосвязь желчных кислот с микробиотой кишечника. Урсодезоксихолевая кислота (Урсосан®) относится к третичным желчным кислотам. В нашем исследовании показано, что у детей с хроническими заболеваниями печени, получающих урсодезоксихолевую кислоту, в сравнении с пациентами, не получающими препараты урсодезоксихолевой кислоты, практически в 2 раза выше уровень *A. hadrus*, который в норме составляет 2% от общей микробиоты в здоровой толстой кишке человека. *A. hadrus* производят бутират, который положительно влияет на гомеостаз желудочно-кишечного тракта, поскольку способствует

росту эпителиальных клеток кишечника, увеличивает экспрессию белков плотных контактов и действует как противовоспалительное средство [40]. Это позволяет сделать вывод, что урсодезоксихолевая кислота способствует развитию микроорганизмов, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты.

Другие микроорганизмы, доминирующие в кишечной микробиоте пациентов, которые не получали препараты урсодезоксихолевой кислоты: *B. dorei* (снижают выработку микробных липополисахаридов в кишечнике, способствуют развитию некоторых заболеваний, включая аутоиммунный сахарный диабет 1-го типа и атеросклеротические заболевания), *Ak. muciniphila* (питается муцином и влияет на деградацию слизистой оболочки, а также влияет на жировой и углеводный обмен) не относятся к микроорганизмам, продуцирующим короткоцепочечные жирные кислоты [41–43].

Заключение

Микробиота кишечника участвует в метаболизме желчных кислот и влияет на их состав. И наоборот, измененный состав желчных кислот может еще больше усугубить дисбаланс кишечной микробиоты. Таким образом, дисбаланс кишечной микробиоты, аномальный состав желчных кислот и рецепторы, активируемые желчными кислотами, синергически способствуют развитию заболеваний органов пищеварения, в том числе печени. Проведенные исследования показывают, что урсодезоксихолевая кислота положительно влияет на кишечную микробиоту у детей с хроническими заболеваниями печени, увеличивая количество микроорганизмов, вырабатывающих короткоцепочечные жирные кислоты, которые

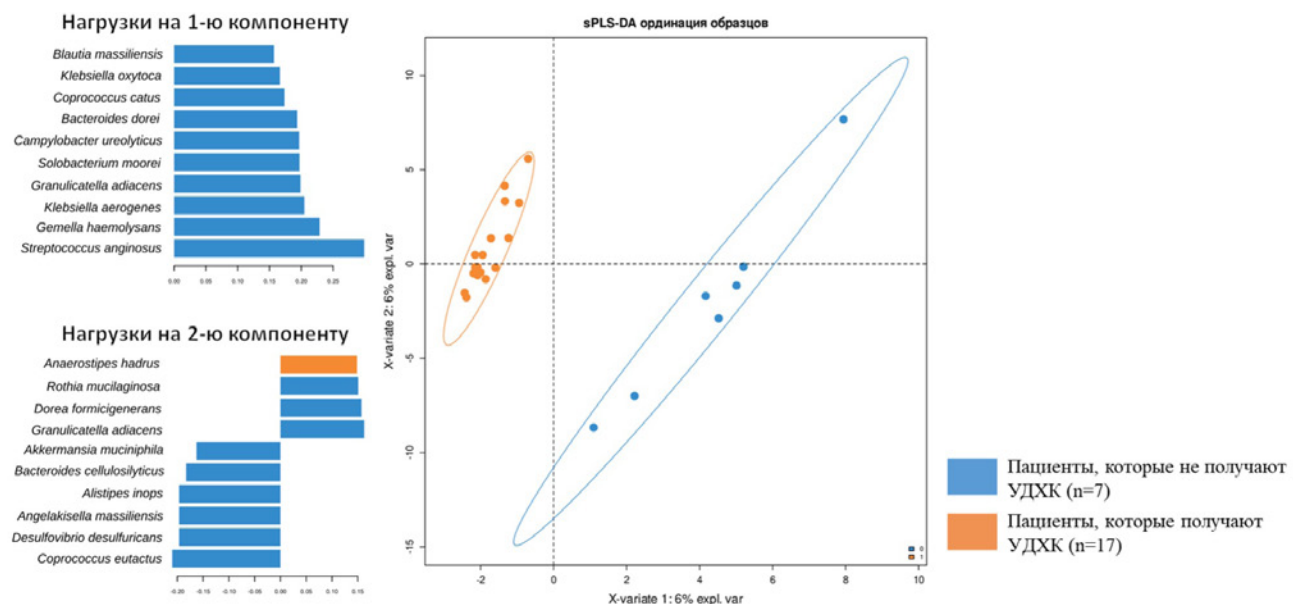


Рис. 2. Различия в таксономическом разнообразии кишечной микробиоты в образцах, полученных от пациентов, которые получают урсодезоксихолевую кислоту (УДХК), и пациентов, не получавших препараты УДХК.

Fig. 2. Differences in the taxonomic diversity of the gut microbiota in samples obtained from patients receiving ursodeoxycholic acid (UDCA) and not receiving UDCA.

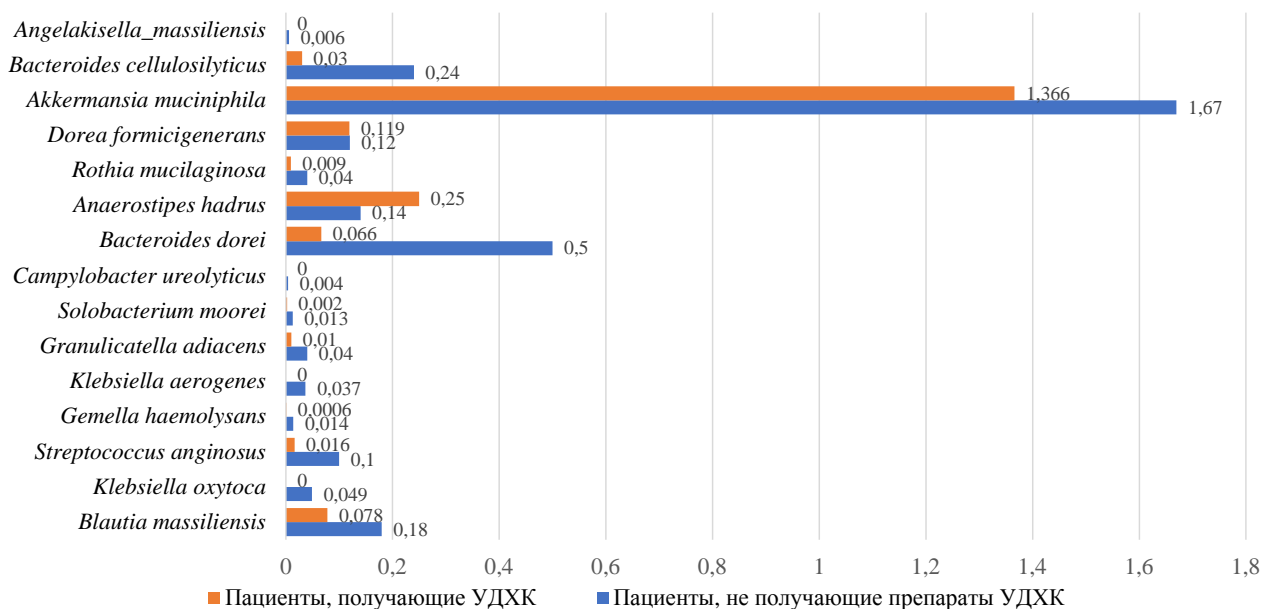


Рис. 3. Различия в процентном соотношении видов бактерий в образцах кишечной микробиоты у детей с хроническими заболеваниями печени в зависимости от лечения урсодезоксиколевой кислотой (УДХК).

Fig. 3. Differences in the percentage of bacterial species in intestinal microbiota samples in children with chronic liver disease depending on treatment with ursodeoxycholic acid.

оказывают множественное воздействие на различные клетки, участвующие в воспалительных и иммунных

реакциях и являются регуляторами метаболических процессов в организме.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Song X., Sun X., Oh S.F., Wu M., Zhang Y., Zheng W. et al. Microbial bile acid metabolites modulate gut RORγ regulatory T cell homeostasis. *Nature* 2020; 577(7790): 410–415. DOI: 10.1038/s41586–019–1865–0
- Jia W., Xie G., Jia W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018; 15(2): 111–128. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.119
- Jones R.M., Neish A.S. Gut Microbiota in Intestinal and Liver Disease. *Annu Rev Pathol* 2021; 16: 251–275. DOI: 10.1146/annurev-pathol-030320–095722
- Yang M., Gu Y., Li L., Liu T., Song X., Sun Y. et al. Bile Acid-Gut Microbiota Axis in Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside. *Nutrients* 2021; 13(9): 3143. DOI: 10.3390/nu13093143
- Chen M.L., Takeda K., Sundrud M.S. Emerging roles of bile acids in mucosal immunity and inflammation. *Mucosal Immunol* 2019; 12(4): 851–861. DOI: 10.1038/s41385–019–0162–4
- Song Z., Cai Y., Lao X., Wang X., Lin X., Cui Y. et al. Taxonomic profiling and populational patterns of bacterial bile salt hydrolase (BSH) genes based on worldwide human gut microbiome. *Microbiome* 2019; 7(1): 9. DOI: 10.1186/s40168–019–0628–3
- Gérard P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens*. 2013; 3(1): 14–24. DOI: 10.3390/pathogens3010014
- Wahlström A., Sayin S.I., Marschall H.U., Bäckhed F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab* 2016; 24(1): 41–50. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.05.005
- Xiao L., Pan G. An important intestinal transporter that regulates the enterohepatic circulation of bile acids and cholesterol homeostasis: the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2/ASBT). *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2017; 41(5): 509–515. DOI: 10.1016/j.clinre.2017.02.001
- Sayin S.I., Wahlström A., Felin J., Jäntti S., Marschall H.U., Bamberg K. et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* 2013; 17(2): 225–235. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.01.003
- Ilan Y. Leaky gut and the liver: a role for bacterial translocation in nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18(21): 2609–2618. DOI: 10.3748/wjg.v18.i21.2609
- Fouts D.E., Torralba M., Nelson K.E., Brenner D.A., Schnabl B. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. *J Hepatol* 2012; 56(6): 1283–1292. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.01.019
- Hackstein C.P., Assmus L.M., Welz M., Klein S., Schwandt T., Schultze J. et al. Gut microbial translocation corrupts myeloid cell function to control bacterial infection during liver cirrhosis. *Gut* 2017; 66(3): 507–518. DOI: 10.1136/gutjnl-2015–311224
- Hartmann P., Haimerl M., Mazagova M., Brenner D.A., Schnabl B. Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor I contribute to liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2012; 143(5): 1330–1340.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.07.099
- Corpechot C. Primary biliary cirrhosis and bile acids. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36 Suppl 1: S13–20. DOI: 10.1016/S2210–7401(12)70016–5
- Sannasiddappa T.H., Lund P.A., Clarke S.R. In Vitro Antibacterial Activity of Unconjugated and Conjugated Bile Salts on *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2017; 8:1581. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01581
- Watanabe M., Fukuya S., Yokota A. Comprehensive evaluation of the bactericidal activities of free bile acids in the large intes-

- tine of humans and rodents. *J Lipid Res* 2017; 58(6): 1143–1152. DOI: 10.1194/jlr.M075143
18. Tremblay S., Romain G., Roux M., Chen X.L., Brown K., Gibson D.L. et al. Bile acid administration elicits an intestinal antimicrobial program and reduces the bacterial burden in two mouse models of enteric infection. *Infect Immun* 2017; 85(6): e00942–16. DOI: 10.1128/IAI.00942–16
 19. Ding L., Yang L., Wang Z., Huang W. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. *Acta Pharm Sin B* 2015; 5(2): 135–144. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.01.004
 20. Parséus A., Sommer N., Sommer F., Caesar R., Molinaro A., Ståhlman M. et al. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut* 2017; 66(3): 429–437. DOI: 10.1136/gutjnl-2015–310283
 21. Camilleri M. Bile Acid diarrhea: prevalence, pathogenesis, and therapy. *Gut Liver*. 2015; 9(3): 332–339. DOI: 10.5009/gnl14397
 22. Van den Bossche L., Hindryckx P., Devisscher L., Devriese S., Van Welden S., Holvoet T. et al. Ursodeoxycholic Acid and Its Taurine- or Glycine-Conjugated Species Reduce Colitogenic Dysbiosis and Equally Suppress Experimental Colitis in Mice. *Appl Environ Microbiol* 2017; 83(7): e02766–16. DOI: 10.1128/AEM.02766–16
 23. Van den Bossche L., Borsboom D., Devriese S., Van Welden S., Holvoet T., Devisscher L. et al. Ursodeoxycholic acid protects bile acid homeostasis under inflammatory conditions and dampens Crohn's disease-like ileitis. *Lab Invest* 2017; 97(5): 519–529. DOI: 10.1038/labinvest.2017.6
 24. Ward J.B.J., Lajczak N.K., Kelly O.B., O'Dwyer A.M., Giddam A.K., Ni Gabhann J. et al. Ursodeoxycholic acid and lithocholic acid exert anti-inflammatory actions in the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017; 312(6): G550–G558. DOI: 10.1152/ajpgi.00256.2016
 25. Laukens D., Devisscher L., Van den Bossche L., Hindryckx P., Vandembroucke R.E., Vandewynckel Y.P. et al. Tauroursodeoxycholic acid inhibits experimental colitis by preventing early intestinal epithelial cell death. *Lab Invest* 2014; 94(12): 1419–30. DOI: 10.1038/labinvest.2014.117
 26. Nadeem M.S., Kumar V., Al-Abbasi F.A., Kamal M.A., Anwar F. Risk of colorectal cancer in inflammatory bowel diseases. *Semin Cancer Biol* 2020; 64: 51–60. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.05.001
 27. Pearson T., Caporaso J.G., Yellowhair M., Bokulich N.A., Padi M., Roe D.J. et al. Effects of ursodeoxycholic acid on the gut microbiome and colorectal adenoma development. *Cancer Med* 2019; 8(2): 617–628. DOI: 10.1002/cam4.1965
 28. Boonstra K., van Erpecum K.J., van Nieuwkerk K.M., Drenth J.P., Poen A.C., Witteman B.J. et al. Primary sclerosing cholangitis is associated with a distinct phenotype of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18(12): 2270–2276. DOI: 10.1002/ibd.22938
 29. Quraishi M.N., Acharjee A., Beggs A.D., Hornblow R., Tselepis C., Gkoutos G. et al. A Pilot Integrative Analysis of Colonic Gene Expression, Gut Microbiota, and Immune Infiltration in Primary Sclerosing Cholangitis-Inflammatory Bowel Disease: Association of Disease With Bile Acid Pathways. *J Crohns Colitis* 2020; 14(7): 935–947. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjaa021
 30. Dyson J.K., Beuers U., Jones D.E.J., Lohse A.W., Hudson M. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 2018; 391(10139): 2547–2559. DOI: 10.1016/S0140–6736(18)30300–3
 31. Bowlus C.L., Arrivé L., Bergquist A., Deneau M., Forman L., Ilyas S.I. et al. AASLD practice guidance on primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2023; 77(2): 659–702. DOI: 10.1002/hep.32771
 32. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J., Holmes S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016; 13(7): 581–583. DOI: 10.1038/nmeth.3869
 33. Wang E.T., Moyzis R.K. Genetic evidence for ongoing balanced selection at human DNA repair genes ERCC8, FANCC, and RAD51C. *Mutat Res* 2007; 616(1–2): 165–174. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.11.030
 34. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(Database issue): D590–596. DOI: 10.1093/nar/gks1219
 35. Duboc H., Rajca S., Rainteau D., Benarous D., Maubert M.A., Quervain E. et al. Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases. *Gut* 2013; 62(4): 531–539. DOI: 10.1136/gutjnl-2012–302578
 36. Sinha S.R., Haileselassie Y., Nguyen L.P., Tropini C., Wang M., Becker L.S. et al. Dysbiosis-Induced Secondary Bile Acid Deficiency Promotes Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe* 2020; 27(4): 659–670.e5. DOI: 10.1016/j.chom.2020.01.021
 37. Hang S., Paik D., Yao L., Kim E., Trinath J., Lu J. et al. Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation. *Nature*. 2019; 576(7785): 143–148. DOI: 10.1038/s41586–019–1785–z
 38. Fiorucci S., Biagioli M., Zampella A., Distrutti E. Bile Acids Activated Receptors Regulate Innate Immunity. *Front Immunol* 2018; 9: 1853. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01853
 39. Xu M., Shen Y., Cen M., Zhu Y., Cheng F., Tang L. et al. Modulation of the Gut Microbiota-farnesoid X Receptor Axis Improves Deoxycholic Acid-induced Intestinal Inflammation in Mice. *J J Crohns Colitis* 2021; 15(7): 1197–1210. DOI: 10.1093/ecco-jcc/ijab003
 40. Kant R., Rasinkangas P., Satokari R., Pietilä T.E., Palva A. Genome sequence of the butyrate-producing anaerobic bacterium *Anaerostipes hadrus* PEL 85. *Genome Announc* 2015; 3(2): e00224–15. DOI: 10.1128/genomeA.00224–15
 41. Yoshida N., Emoto T., Yamashita T., Watanabe H., Hayashi T., Tabata T. et al. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis. *Circulation* 2018; 138(22): 2486–2498. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033714
 42. Matsuoka T., Shimizu T., Minagawa T., Hiranuma W., Takeda M., Kakuta R. et al. First case of an invasive *Bacteroides dorei* infection detected in a patient with a mycotic aortic aneurysm-raising a rebellion of major indigenous bacteria in humans: a case report and review. *BMC Infect Dis* 2021; 21(1): 625. DOI: 10.1186/s12879–021–06345–8
 43. Abuqwider J.N., Mauriello G., Altamimi M. *Akkermansia muciniphila*, a New Generation of Beneficial Microbiota in Modulating Obesity: A Systematic Review. *Microorganisms* 2021; 9(5): 1098. DOI: 10.3390/microorganisms9051098

Поступила: 16.12.23

Received on: 2023.12.16

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке «Биокодекс Микробиота Фонд», Национальный грант 2021, Россия.

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

Конфликт интересов:

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

Conflict of interest:

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