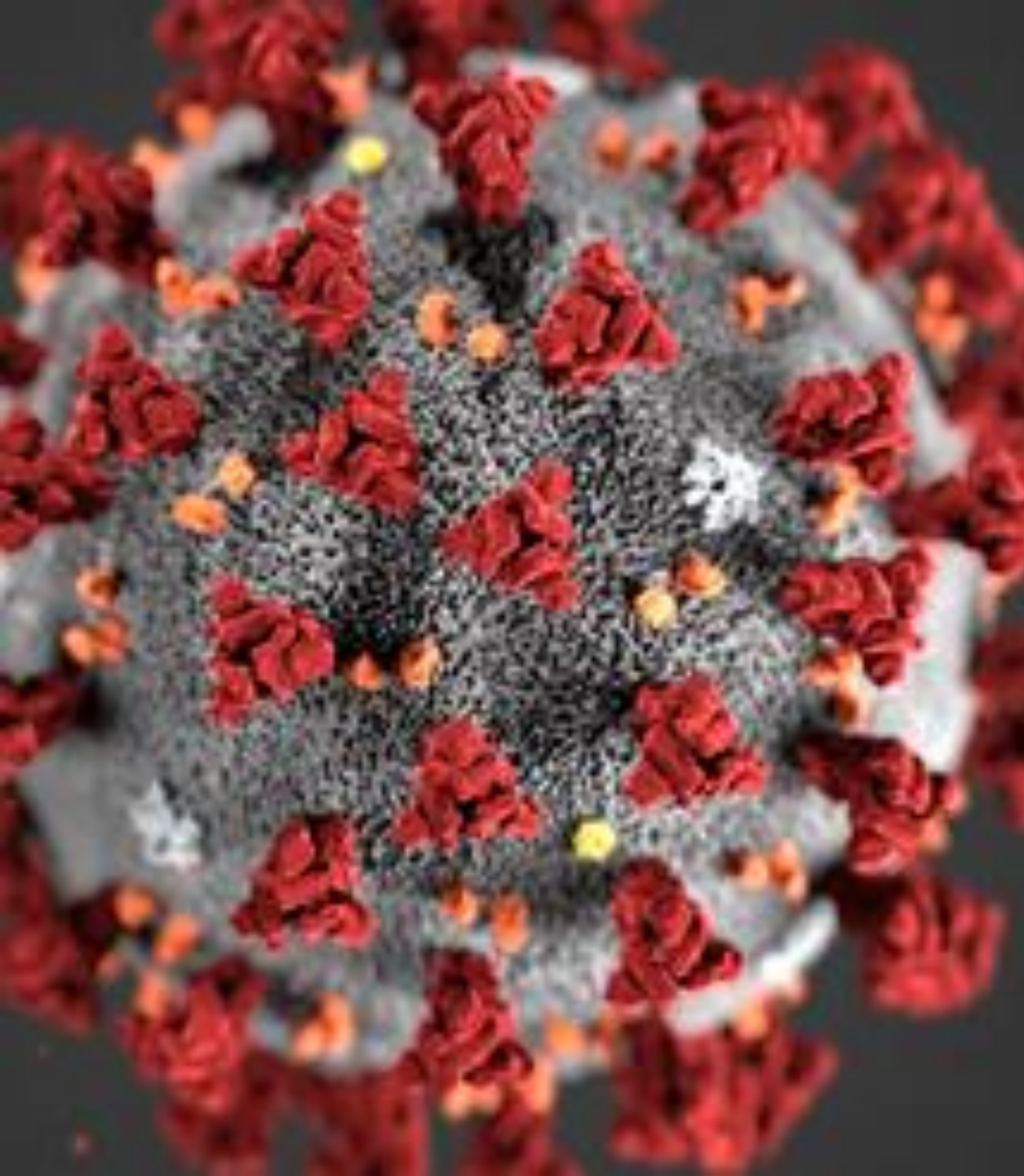




Кишечный микробиом как клинико- диагностический инструмент при тяжелых вирусных заболеваниях.

- Мусабай Қ.Н. – Докторант 3 курса специальности биология
- Кушугулова А.Р. - Руководитель Лаборатории микробиома человека и долголетия, Центр наук о жизни, ЧУ"National Laboratory Astana", д.м.н., профессор
- Дусмагамбетов М.У. - Заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии имени Ш.И.Сарбасовой НАО «МУА», д.м.н., профессор

Введение

Цитокиновый шторм при COVID-19 - это чрезмерное высвобождение воспалительных медиаторов в ответ на инфекцию SARS-CoV-2. Исследования показывают, что состояние кишечной микрофлоры может влиять на развитие цитокинового шторма. Некоторые бактерии кишечника, такие как *Collinsella*, могут сдерживать воспалительные процессы. В постковидном периоде наблюдаются изменения в микробиоме, связанные с воспалением, включая снижение числа противовоспалительных бактерий и увеличение присутствия воспалительных микроорганизмов. Эти изменения могут способствовать долгосрочным осложнениям после заболевания COVID-19.

Study design

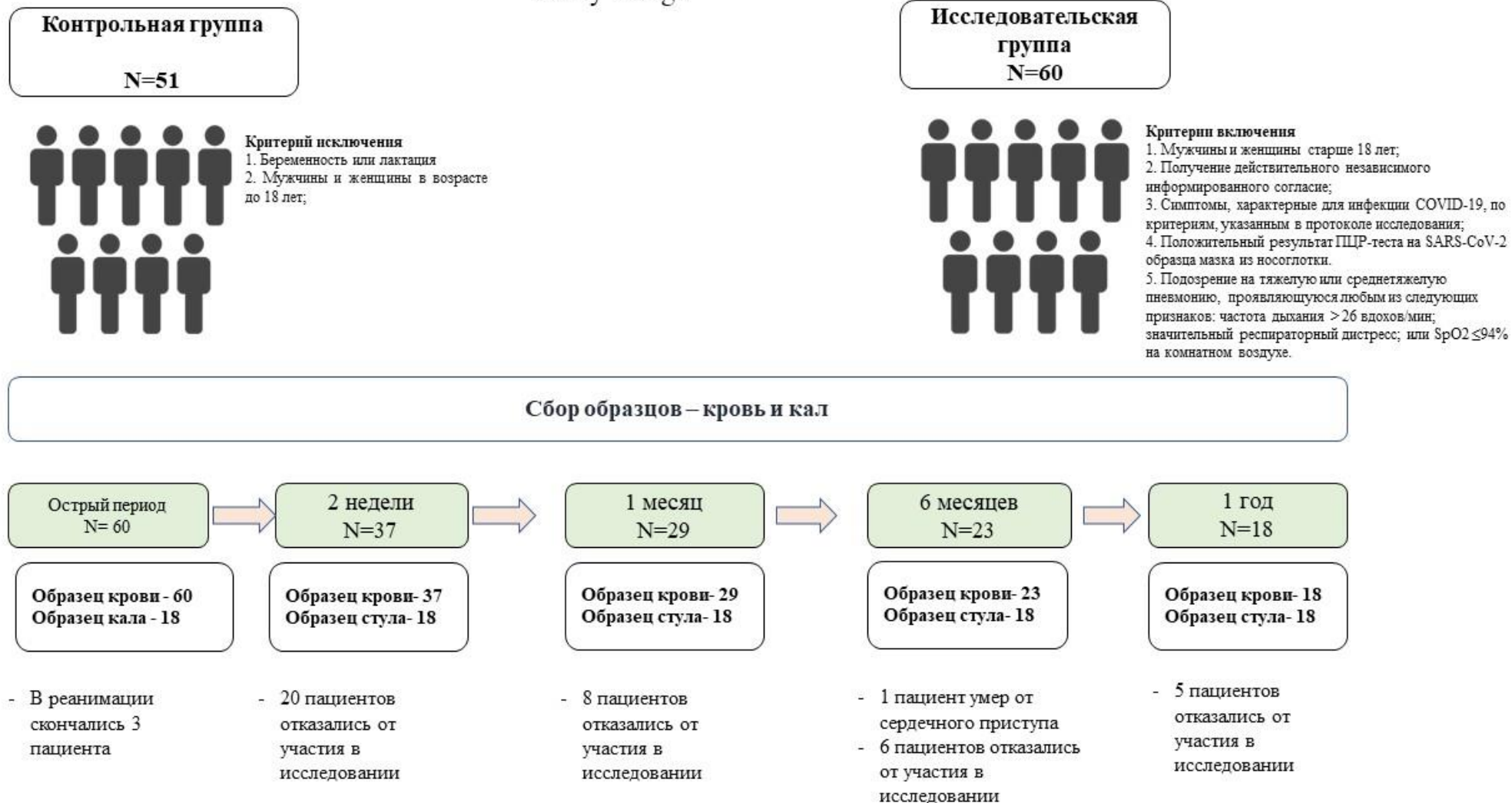
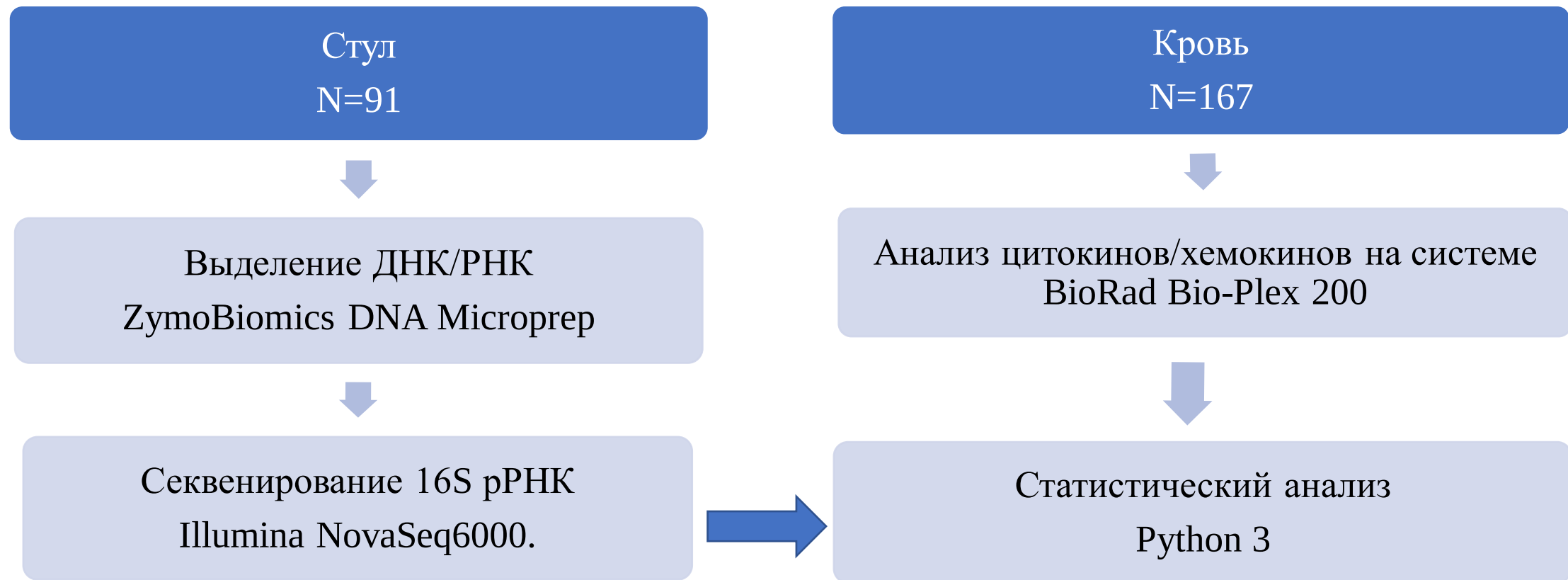


Рисунок 1. Дизайн исследования

Характеристика	Контрольная группа		Исследовательская группа		p - value
	Женщина n=26	Мужчина n=25	Женщина n=30	Мужчина n=30	
Демографические данные					
Возраст (средний, IQR)	49(28, 65)	56 (36, 68)	63 (34, 88)	60 (26, 90)	0.56
Сопутствующие заболевания (n, %)					
Ожирение	7 (27%)	6 (24%)	22 (76%)	13 (50%)	0.05
Артериальная гипертензия	-	3 (12%)	19 (63%)	11 (48%)	0.06
Сердечно-сосудистые заболевания	-	2 (8%)	10 (37%)	7 (32%)	0.57
Диабет	-	-	8 (29%)	5 (21%)	0.2
Кишечные расстройства	-	-	9 (32%)	13 (54%)	0.2
Пневмония	-	-	30 (100%)	30 (100%)	
Онкологическое заболевание	-	-	4 (14%)	0 (0%)	
Респираторная недостаточность	-	-	10 (36%)	9 (37%)	
Лабораторные данные					
Гемоглобин, g/dL	131.5 (101, 162)	137.3 (93, 164)	130 (63, 166)	137 (95, 164)	0.07
Эритроциты, 10 ³ μL	4.3 (3.78, 5.20)	4.42 (3.78, 519)	4.68 (2.70, 7.30)	4.90 (3.24, 5.59)	0.2
Тромбоциты10 ³ μL	233.1 (141, 321)	235.76 (87, 402)	207 (108, 452)	233 (150, 344)	0.16
Лейкоциты, 10 ³ μL	5.7 (4.4, 9.7)	6.26 (3.1, 8.7)	6.42 (2.3, 28.2)	7.04 (3.3, 14.7)	
Лимфоциты, 10 ³ μL	36.6 (31.5, 56.5)	34.32 (14.5,47.2)	22.9 (6, 47)	18.2 (0.5, 96)	0.19
Палочкоядерные нейтрофилы	-	-	8.1 (1, 29)	9.05 (2, 30)	0.34
Сегментоядерные нейтрофилы	-	-	59.5 (1, 78)	68.1 (5, 91)	0.08
СОЭ, mm/h	-	-	23.1 (2, 42)	11.7 (4, 29)	0.006
Общий белок, mg/dL	-	-	67.06 (59, 77.23)	64.8 (56, 75.88)	0.06
Альбумин, g/dL	-	-	36.6 (32, 47.45)	37.8(29.69,45.8)	0.2
Глюкоза, mg/dL	5.3 (4.45, 8.37)	5.4 (4.07, 8.67)	6.51 (3, 7.69)	7.04 (3.8, 15.8)	0.28
Мочевина, mg/dL	12.1 (7.39, 18.3)	11.8(5.71, 24.63)	5.93 (3.13, 14)	6.85(3.05, 17.84)	0.21
Общий билирубин, mg/dL	10.79(5.64,18.8)	16.87(9.8, 40.36)	15.9 (11.5, 28)	18.2 (7, 38.42)	0.11
АСТ, U/L	20.7 (14, 41.6)	24.3 (12.5, 38.8)	39.2 (11, 82.31)	40.2 (20, 107.66)	0.4
АЛТ, U/L	14.5 (8.1, 50.3)	23.4 (9.3, 77.8)	30.9(11.57,75.8)	34.5(11.56,153.)	0.3

Таблица 1. Демографические данные, исходные характеристики и лабораторные показатели контрольной группы и пациентов с COVID-19 в зависимости от пола.

Методы и материалы



Результаты

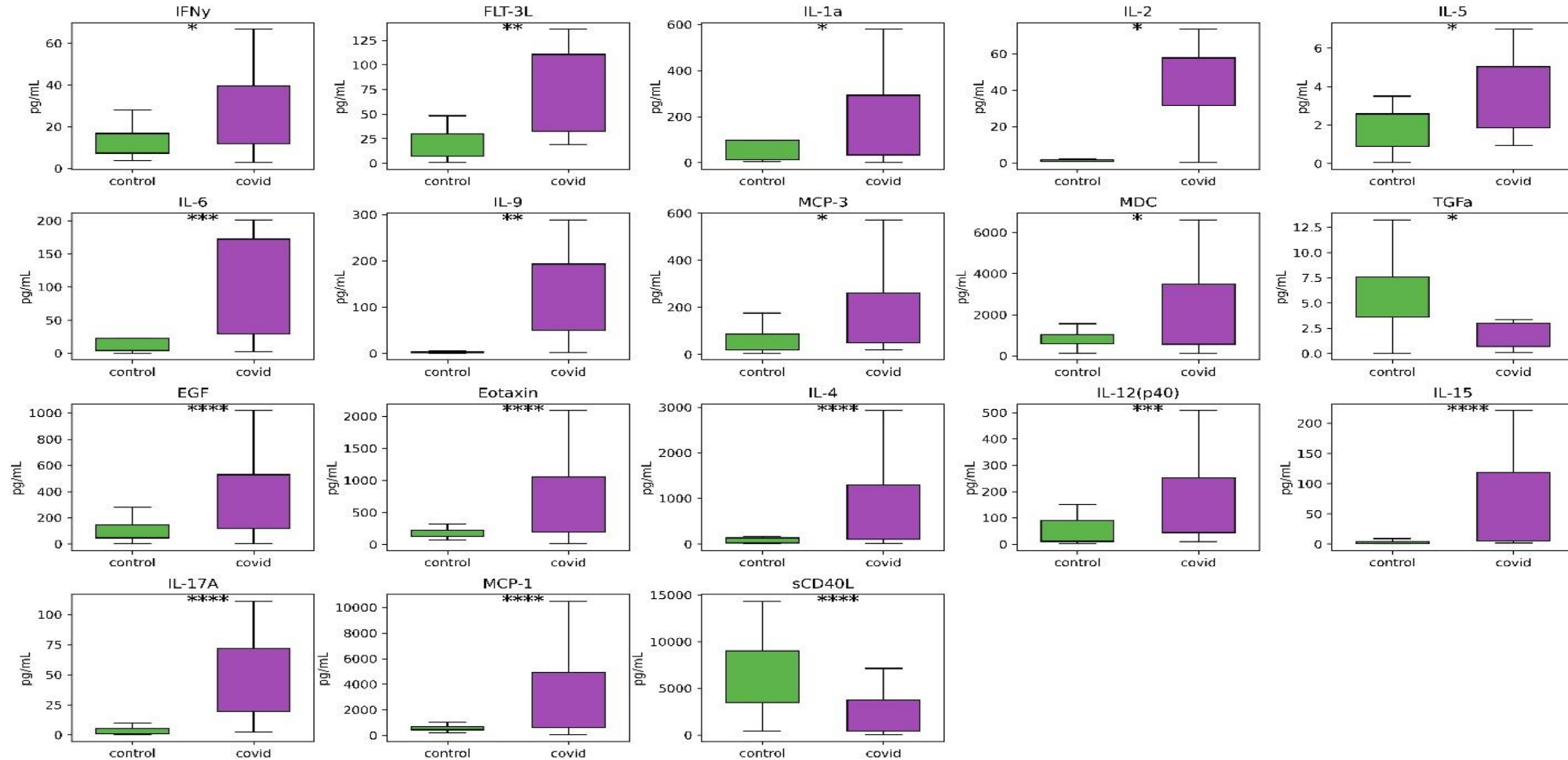


Рисунок 2. Box plot диаграммы уровней экспрессии цитокинов. На оси x показаны группы здоровых людей и пациентов с тяжелой формой COVID-19, а на оси y - концентрация анализита в пикограммах на миллилитр. Использовался тест Манна-Уитни с поправкой FDR: *p-значение ≤ 0.05 , **p-значение ≤ 0.001 , ***p-значение ≤ 0.0001 , ****p-значение ≤ 0.00001 .

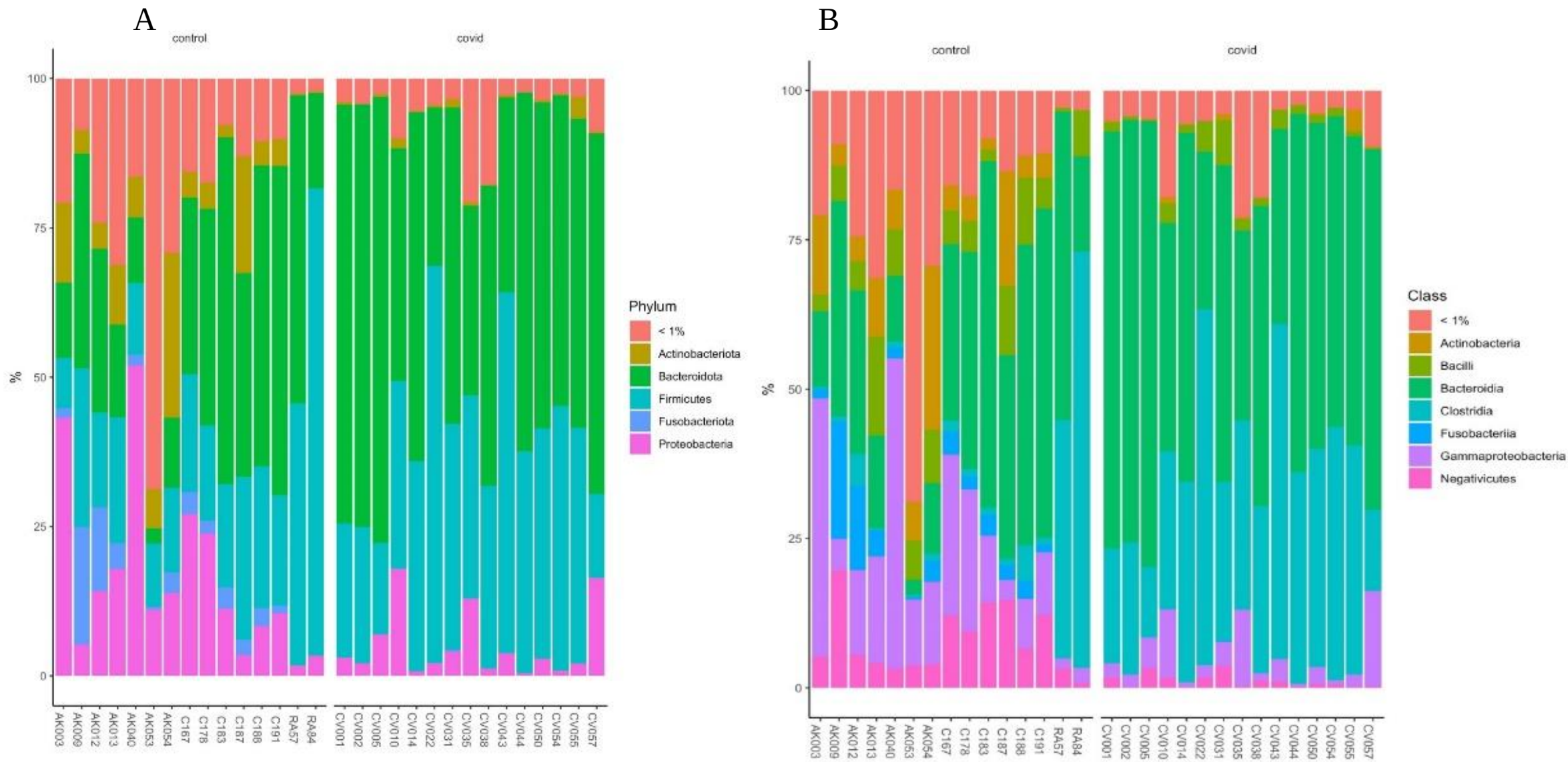


Рисунок 3. Сложенные гистограммы, показывающие относительное количество бактериальных OTU в контрольных ($n = 15$, слева) и Covid-19 ($n = 15$, справа) образцах, классифицированных по уровням: тип 3А, класс 3В. Относительное изобилие представлено высотой столбца. Отображаются только таксоны с самой высокой относительной численностью ($> 1\%$) на каждом уровне.

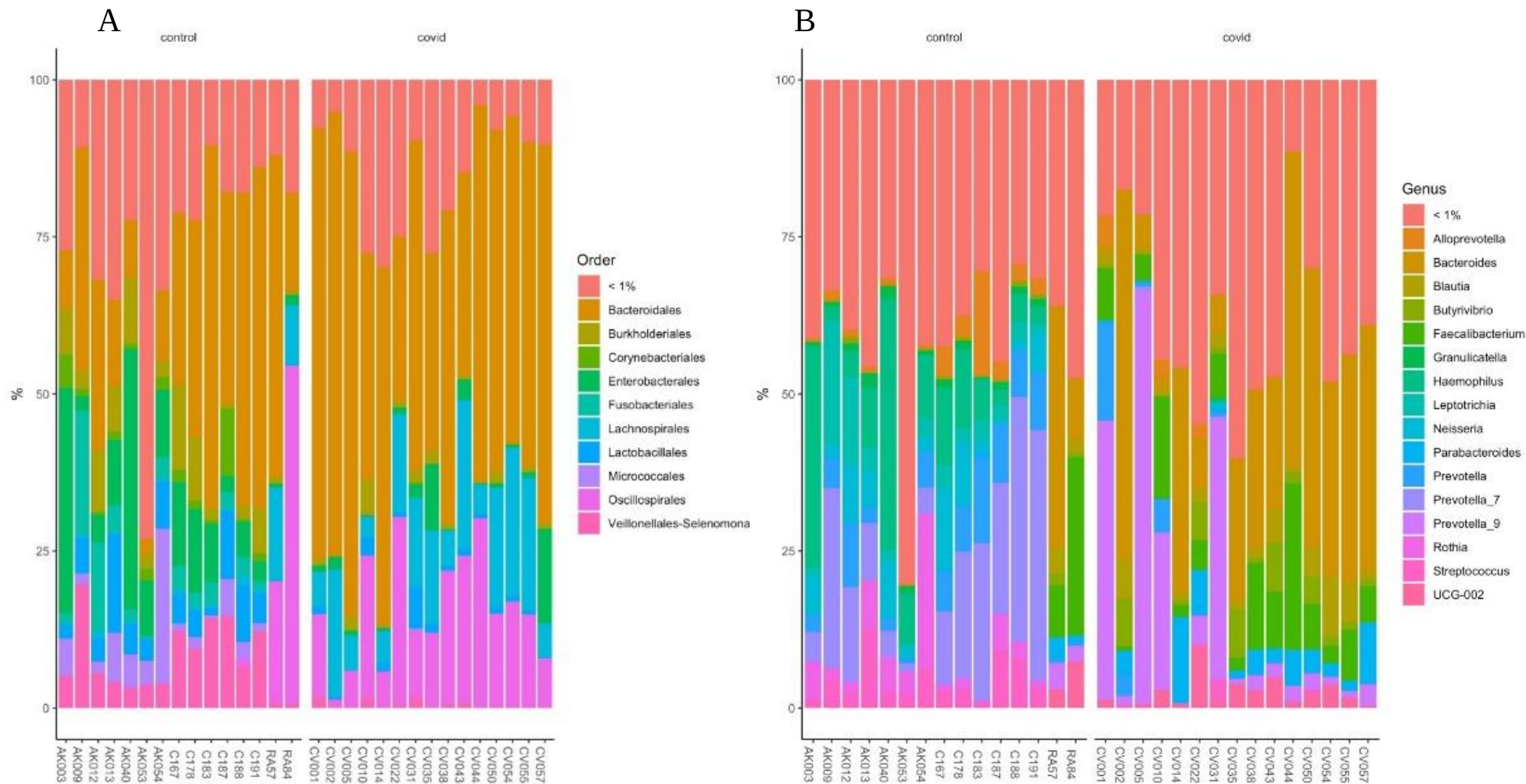


Рисунок 4. Сложенные гистограммы, показывающие относительное количество бактериальных OTU в контрольных (n = 15, слева) и Covid-19 (n = 15, справа) образцах, классифицированных по уровням: порядок 4А, уровни рода 4В. Относительное изобилие представлено высотой столбца. Отображаются только таксоны с самой высокой относительной численностью (> 1%) на каждом уровне.

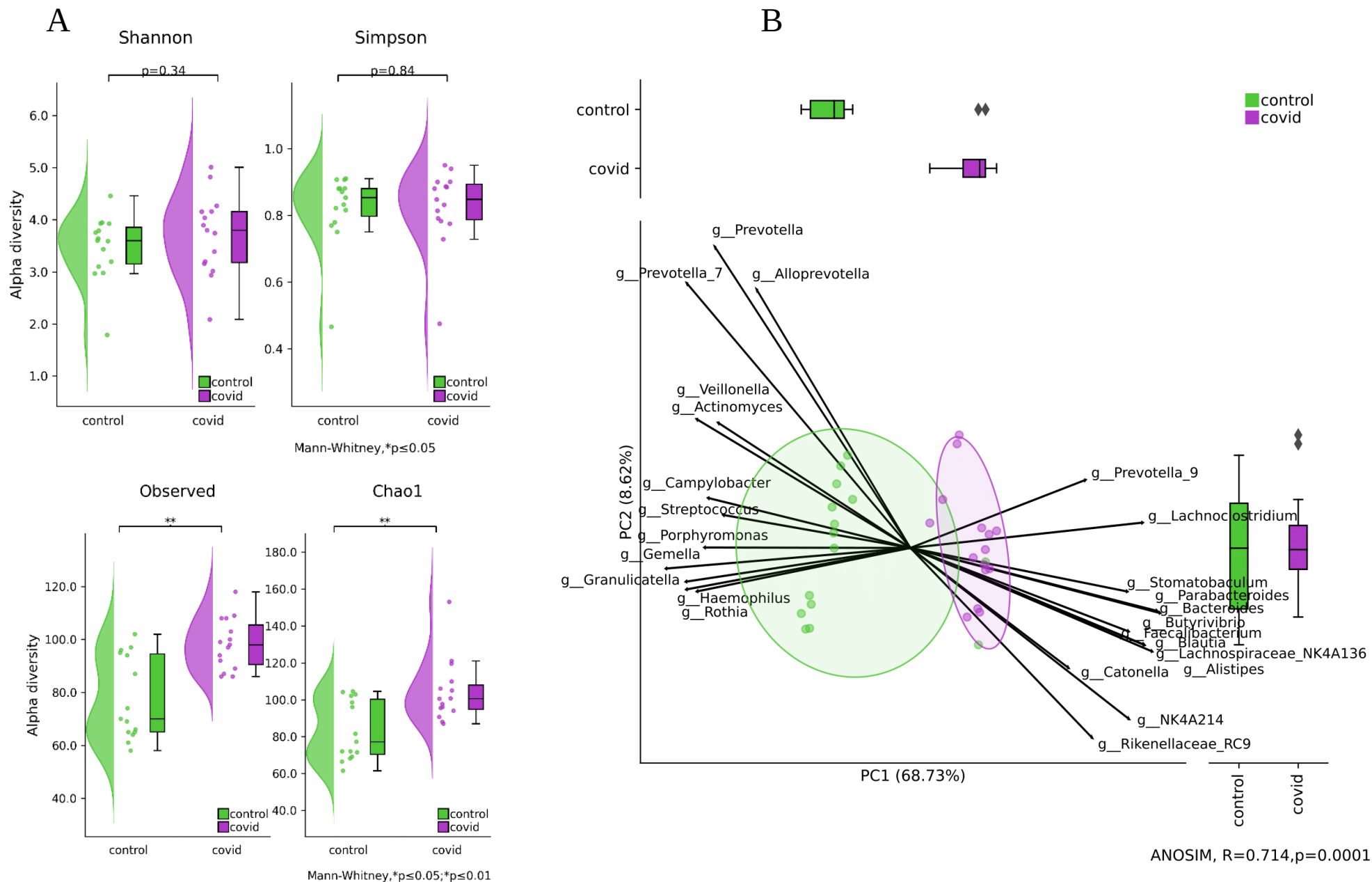
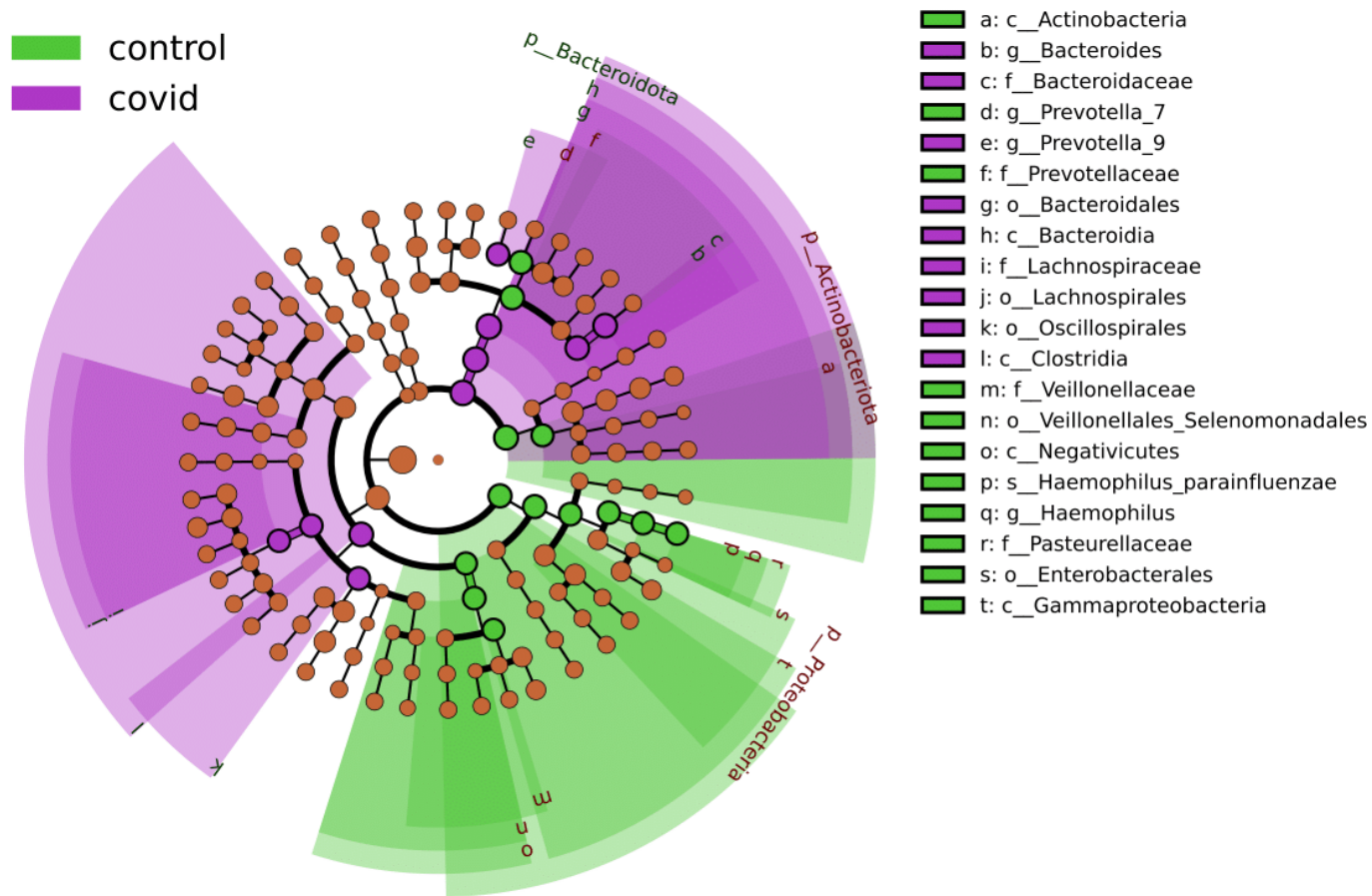


Рисунок 5. А. Альфа-биоразнообразие между контрольной группой и группой, инфицированной COVID-19. U-критерий Манна-Уитни, * p -значение $\leq 0,05$, ** p -значение $\leq 0,001$. В. Бета-разнообразие. PCoA ординация членства в сообществе на основе расстояния Брея-Кертиса в контрольной группе и группе covid-19 с тестом ANOSIM на степень разделения.

A



B

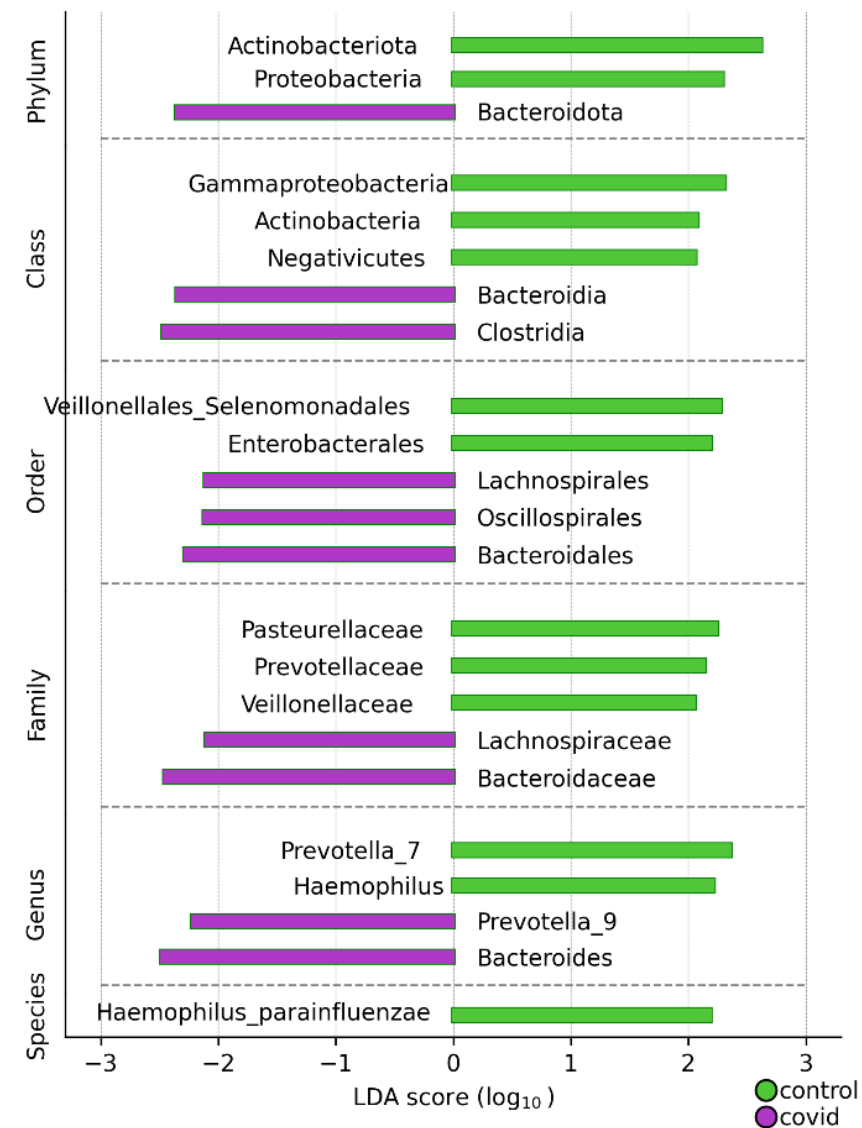
LEfSe, LDA ≥ 2 , $p \leq 0.05$

Рисунок 6. Линейный дискриминантный анализ (LDA) с размером эффекта (LEfSe). А. Кладограмма, показывающая филогенетическое распределение микробиоты между контрольной группой и группой, инфицированной COVID-19. Центральная точка обозначает корень дерева бактерий и расширяется до каждого кольца, представляющего следующий более низкий таксономический уровень от типа к роду. Диаметр каждого круга представляет собой относительную распространенность таксона в микробном сообществе кишечника (тип, класс, отряд, семейство, род, вид). В. Ключевые различающие филоциты таксонов, показатель LDA $>2,0$.

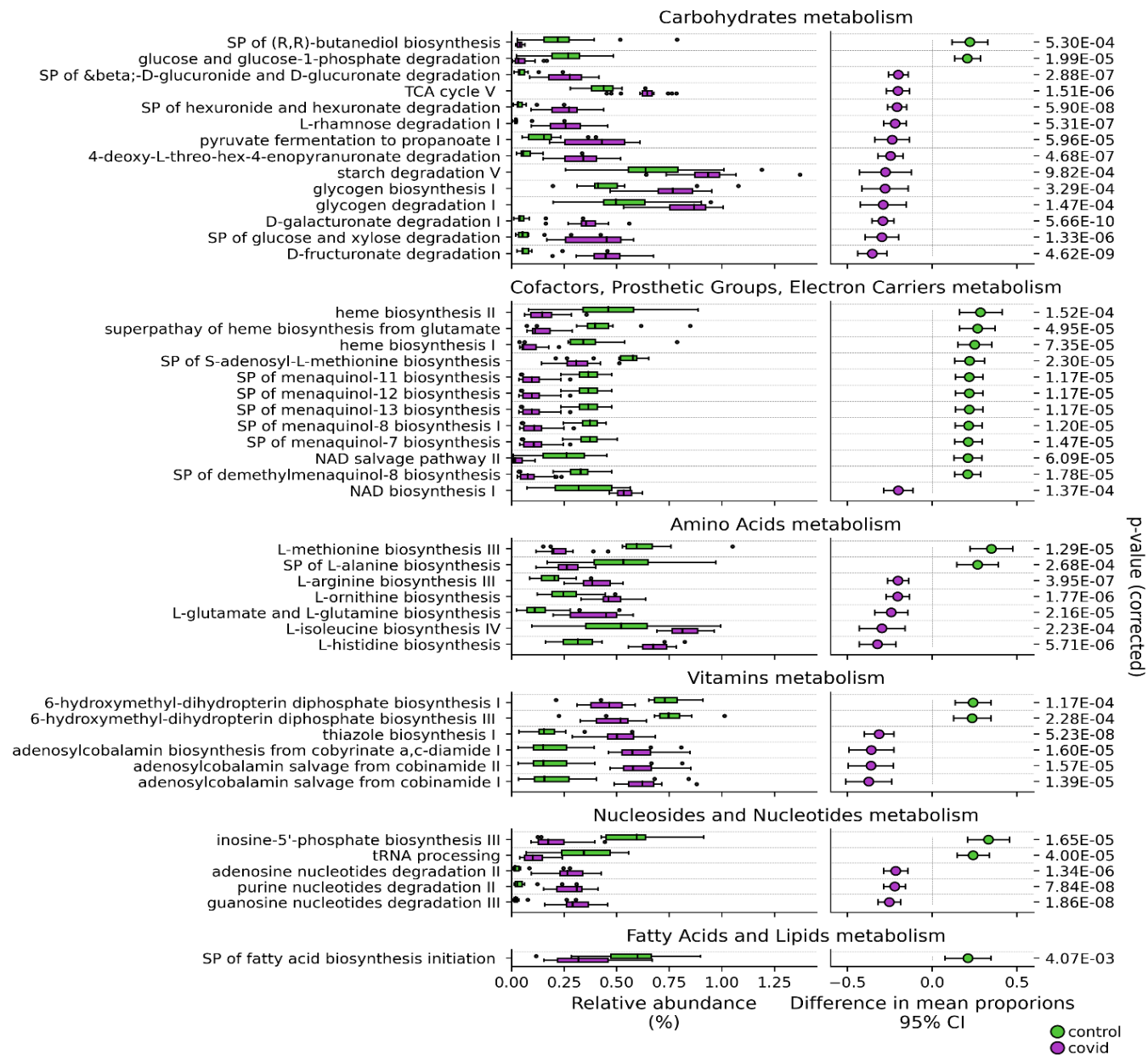


Рисунок 7. Метаболические пути кишечного микробиома. Графики с расширенной полосой погрешностей (ЕЕВ), демонстрирующие функциональные свойства, которые значительно различаются (FDR, $p < 0.05$) между контрольным микробиомом и кишечным микробиомом covid-19. Слева показано относительное количество метаболических признаков, основанное на количестве кишечного микробиома, а справа визуализирована разница в средних пропорциях между группами для каждого признака. Зеленый указывает на контрольную группу; фиолетовый указывает на группу covid-19

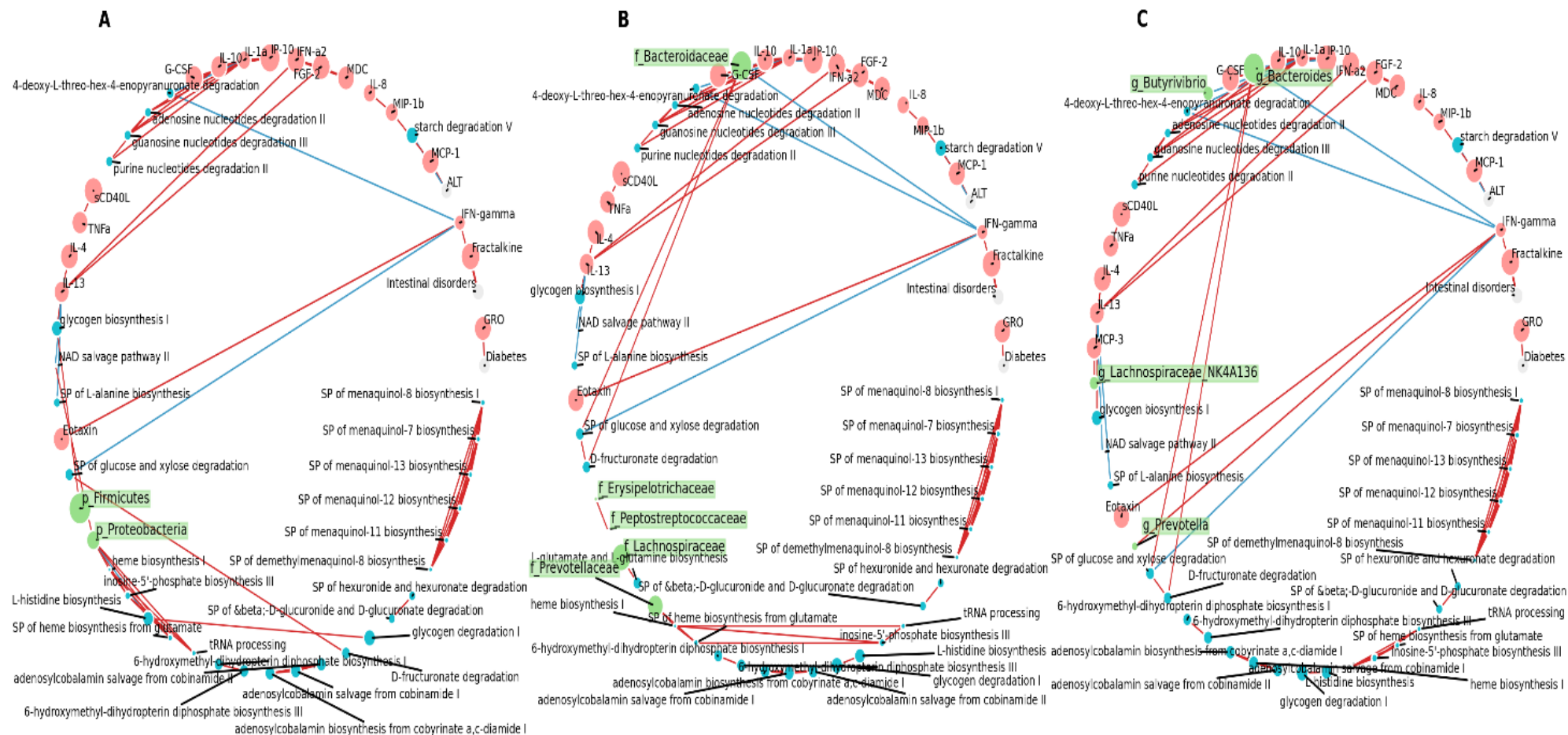


Рисунок 8. Корреляционный анализ. Сетевой график, показывающий совместное появление цитокинов и хемокинов (красные узлы), таксонов (зеленые узлы) и путей (синие узлы) в группе covid-19. 6А Тип, 6В Семейство, 6С Уровень Рода. Красные линии представляют собой положительную корреляцию, а синие линии представляют отрицательную корреляцию. Размер узла представляет собой среднее изобилие функций. Спирмен, FDR, $p < 0,05$

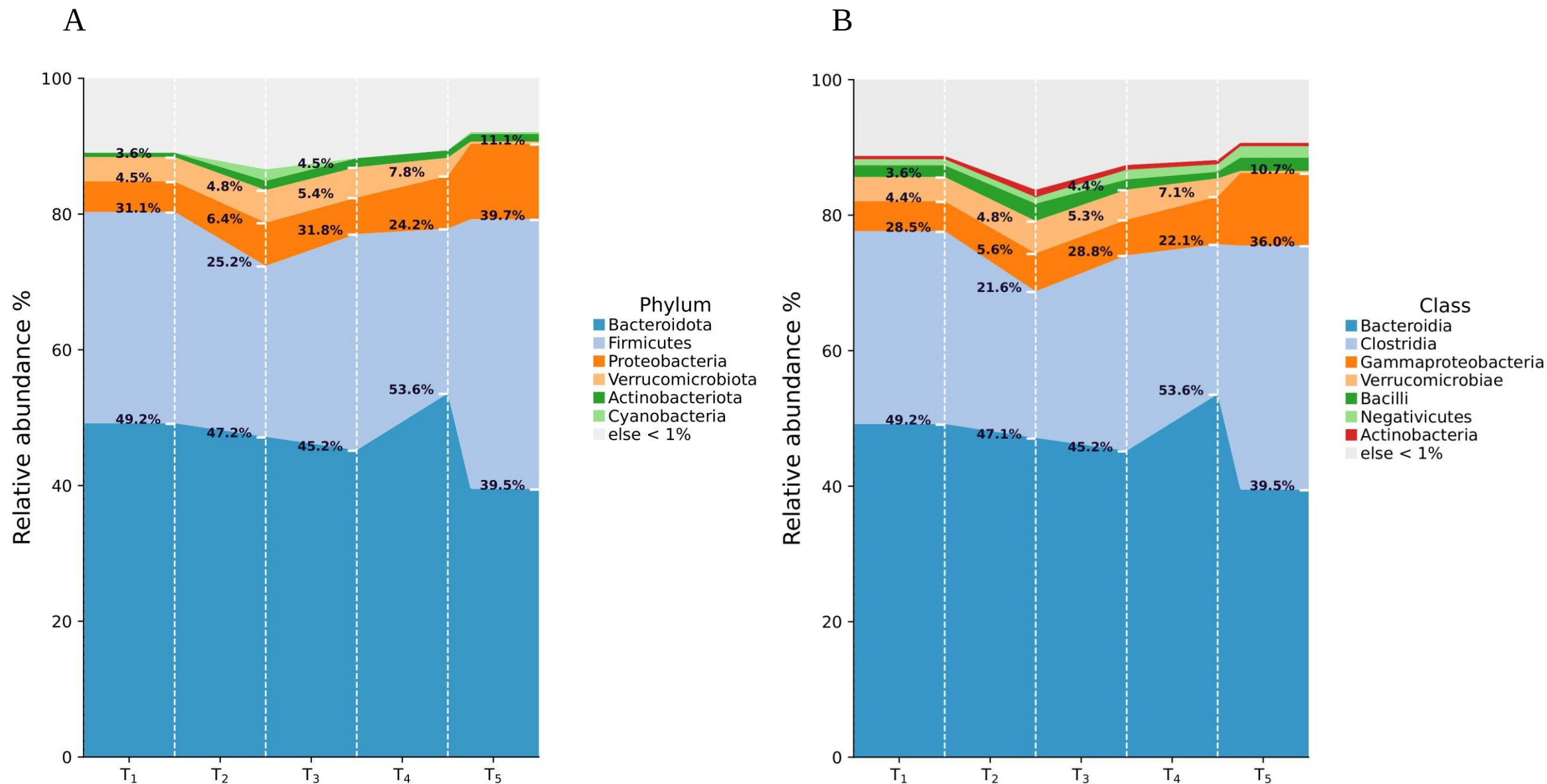


Рисунок 9. Сложенные гистограммы, показывающие среднюю относительную численность бактериальных OTU в остром периоде - T1, через 2 недели - T2, через 1 месяц - T3, через 6 месяцев - T4 и через 1 год - T5 после начала заболевания, классифицированные по типам: 9А, 9В Класс. Относительное изобилие представлено высотой столбца. Отображаются только таксоны с самой высокой относительной численностью (> 1%) на каждом уровне.

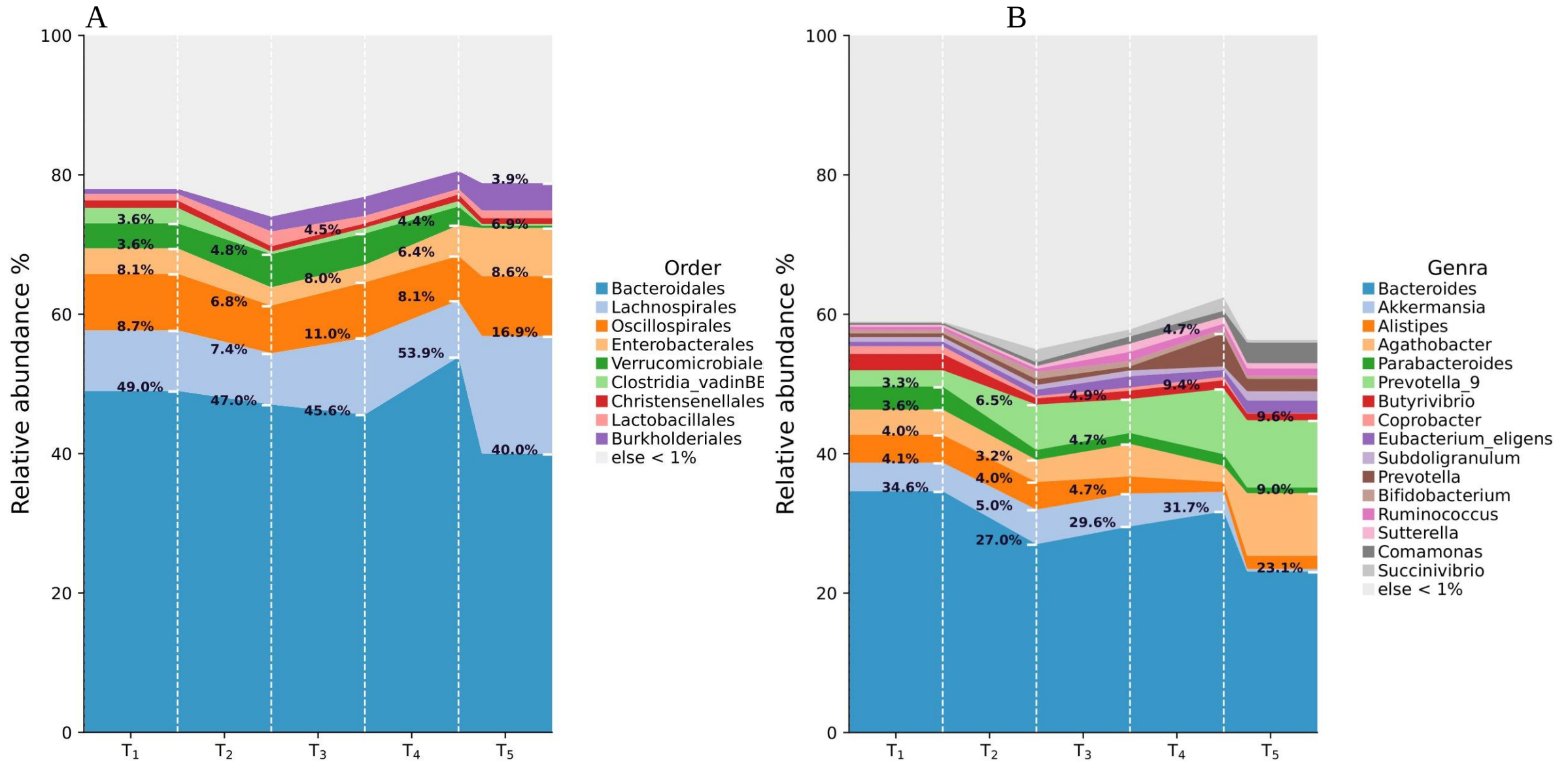


Рисунок 10. Сложенные гистограммы, показывающие среднюю относительную численность бактериальных OTU в остром периоде - T1, через 2 недели - T2, через 1 месяц - T3, через 6 месяцев - T4 и через 1 год - T5 после начала заболевания, классифицированные по типам: 10А Порядок, 10В Родовые уровни. Относительное изобилие представлено высотой столбца. Отображаются только таксоны с самой высокой относительной численностью (> 1%) на каждом уровне.

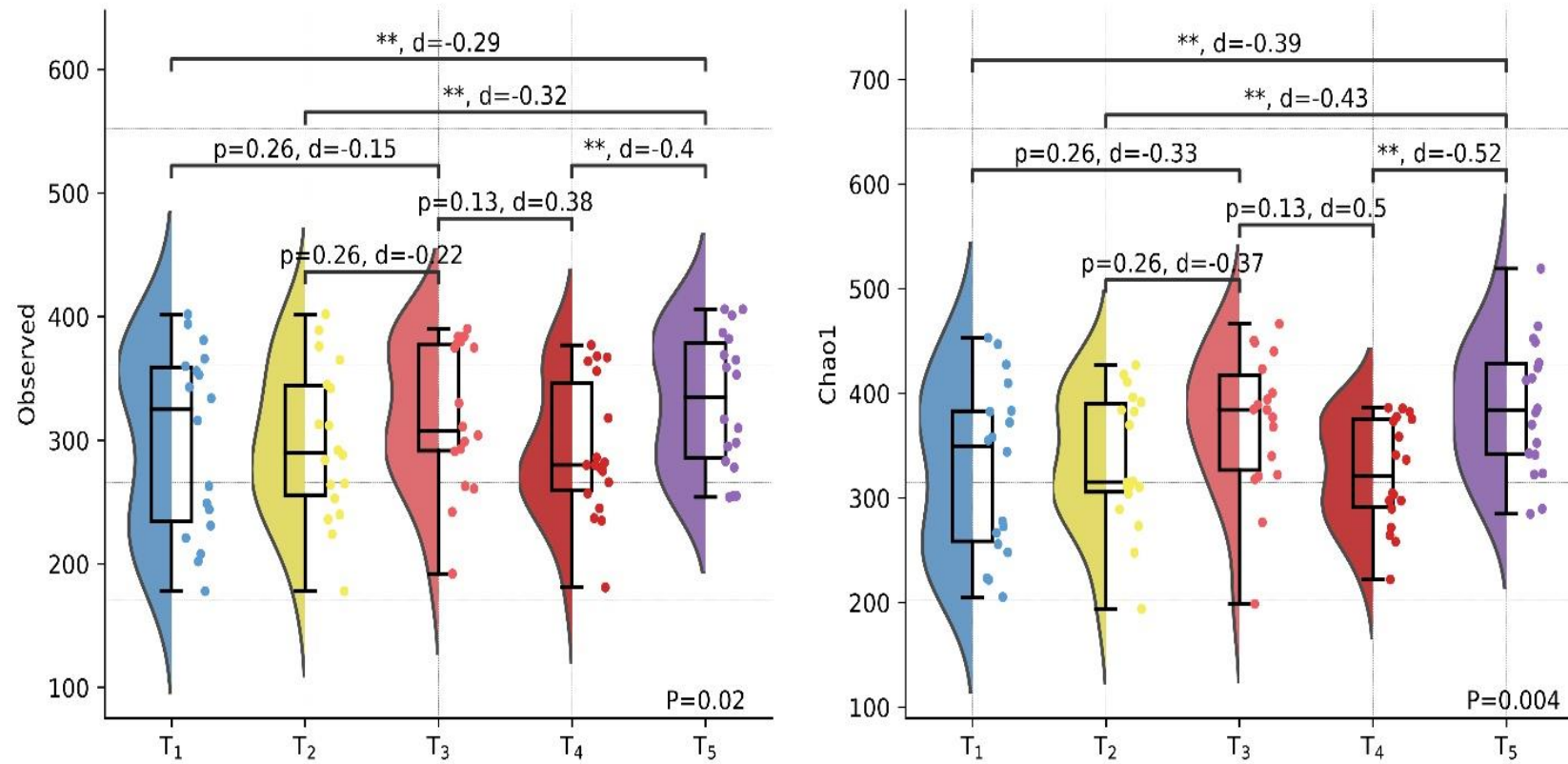


Рисунок 11. Альфа-разнообразие в группе covid-19 с течением времени. Наблюдаемое (слева) и предполагаемое (справа, Чео1) количество таксономических признаков в остром периоде - T1, через 2 недели - T2, через 1 месяц - T3, через 6 месяцев - T4 и через 1 год - T5 от начала заболевания. Критерий Фридмана с апостериорным критерием множественных сравнений Вилкоксона, FDR, $p<0,05$. Размер эффекта дельты Клиффа (d) указывает на величину разницы

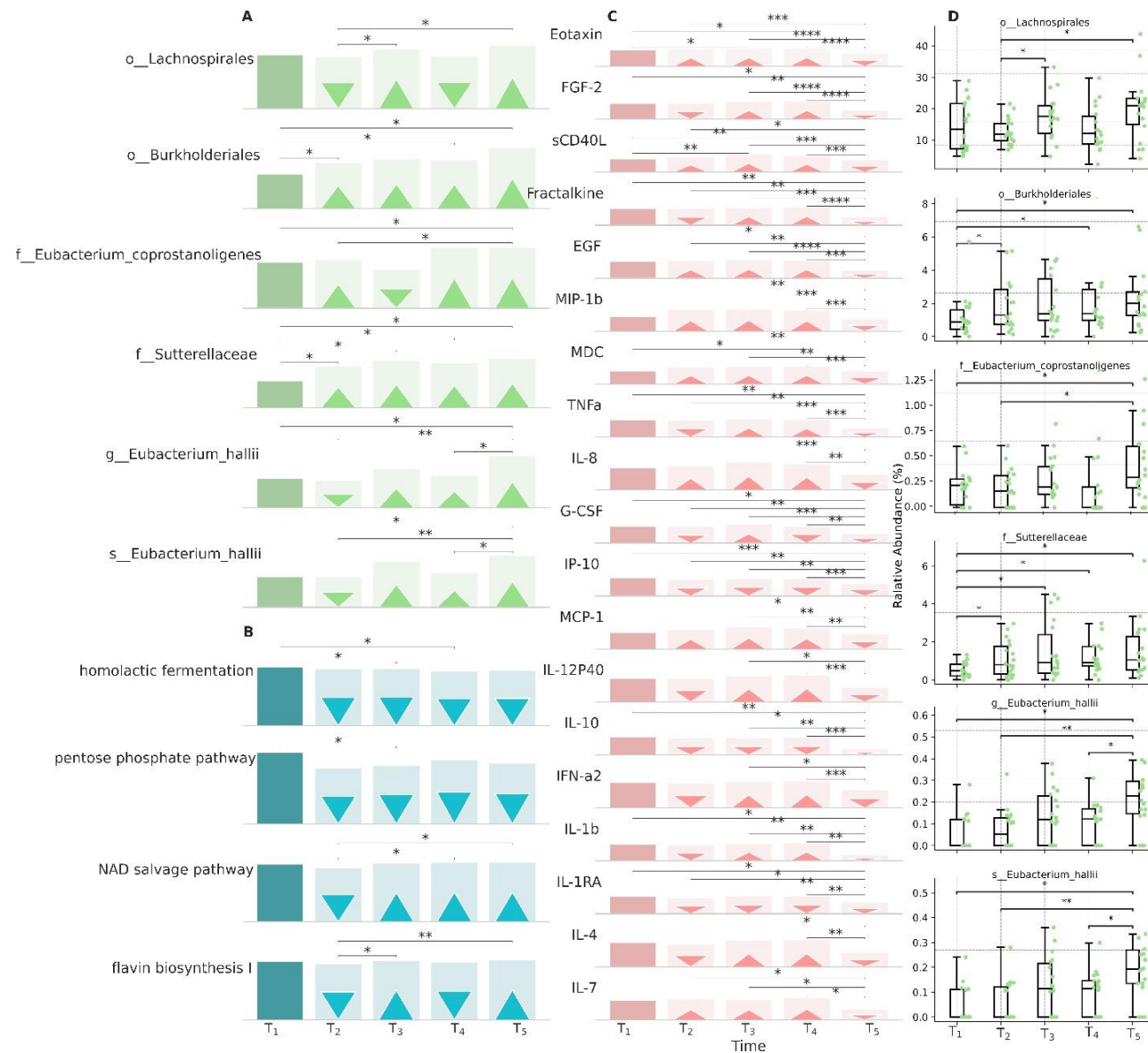


Рисунок 12. Обзор состава кишечника, метаболических путей и иммунных характеристик, которые показали значительные изменения в группе COVID-19 с течением времени. А-С. Обилие таксономических признаков (зеленый), метаболических путей (синий) и иммунных маркеров (красный). Размер маркера указывает на среднее содержание каждого компонента и направление изменения (обращение вверх: обогащение, обращение вниз: истощение) по сравнению с исходным уровнем (квадратные маркеры, T₀). D. Относительное обилие таксономических признаков. Фридман, Уилкоксон, FDR, $p < 0,05$

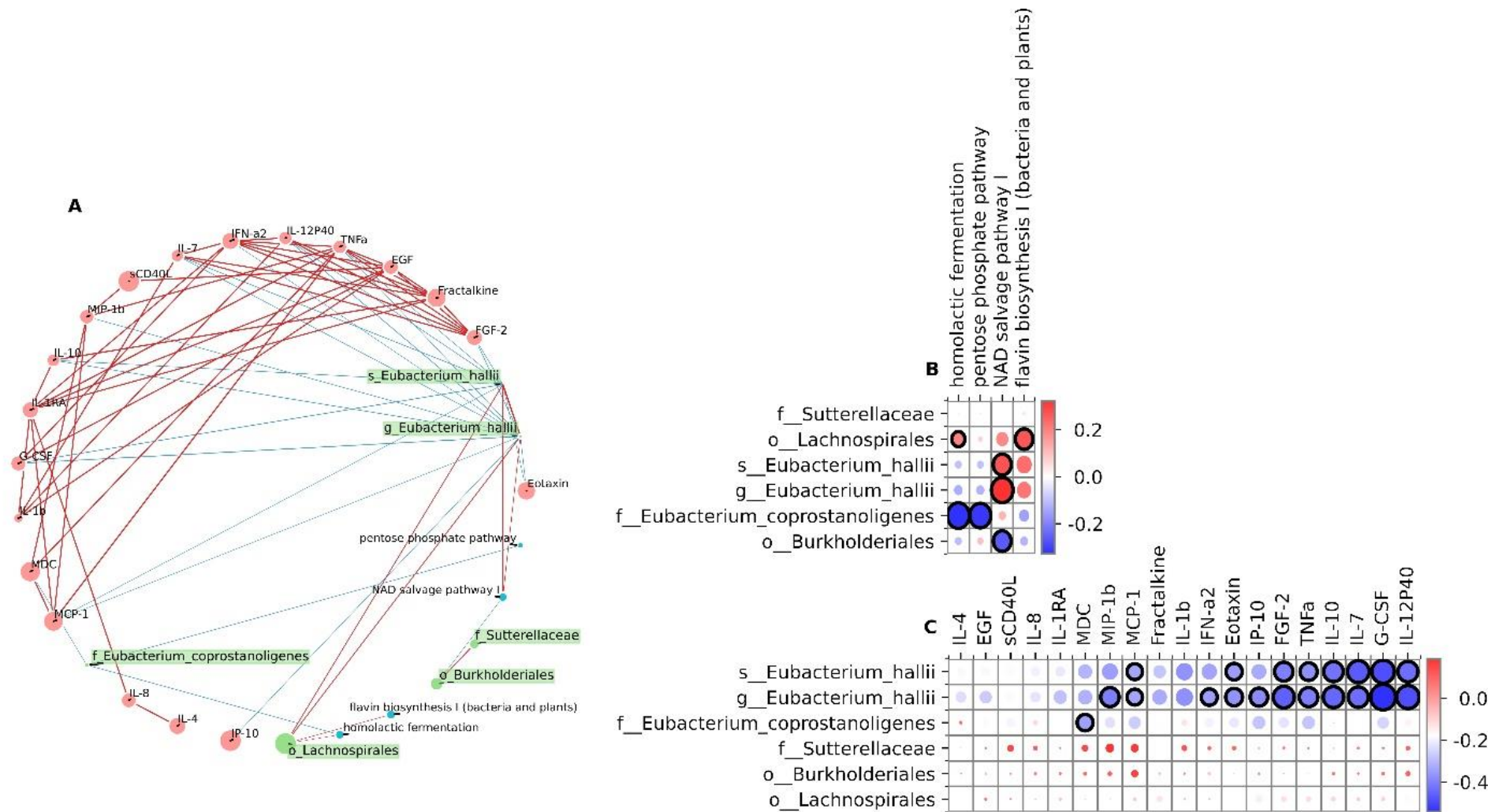


Рисунок 1. Корреляционный анализ. Сетевой график, показывающий совместное появление цитокинов и хемокинов (красные узлы), таксонов (зеленые узлы) и путей (синие узлы) в группе covid-19 с течением времени. Размер узла представляет собой среднее изобилие функций. В Корреляция тепловой карты между таксонами бактерий и метаболическими путями. С Корреляция тепловой карты между таксонами бактерий и цитокинами и хемокинами. Положительные корреляции представлены красным цветом, а отрицательные — голубым. Spearman, FDR, $p < 0,05$

Заключение

Кишечный микробиом с вырабатываемыми метаболитами, в сочетании с системным иммунитетом, вносит значительный вклад в сложный многоуровневый патогенетический механизм развития постковидного синдрома. В данном исследовании мы оцениваем микробиому кала пациентов Казахстана в различные периоды после COVID-19 и коррелируем ее с образцами цитокинов в сыворотке.

Тяжелое заболевание SARS-CoV-2, осложненное пневмонией, характеризуется сдвигом в сторону провоспалительного фенотипа с увеличением уровня IL-1a, FLT-3L, IL-2, IL-6, IL-9, MCP-3, IFN γ , IL-5, эотаксина, IL-12(p40), MDC, IL-17A, MCP-1 и IL-15; и с точки зрения кишечного микробиома, преобладанием Bacteroides, Faecalibacterium и Prevotella_9 и снижением Haemophilus, Leptotrichia, Prevotella, Prevotella_7, Neisseria и Streptococcus. Постковидный синдром, сопровождающийся продолжительными симптомами головной боли, слабости, усталости, нарушениями сна, характеризуется перекрестной корреляцией MDC, IL-1b, фракталкина, TNFa, FGF-2, EGF, IL-1RA, IFN-a2, IL-10, sCD40L, IL-8, эотаксина, IL-12(p40) и MIP-1b, а также сдвигом в микрофлоре кишечника в сторону провоспалительной микрофлоры.

В нашем исследовании E.hallii значительно снижался в остром периоде, однако через месяц после начала заболевания наблюдалась устойчивая тенденция к повышению. Изменения в количестве E.hallii могут быть связаны с тяжестью COVID-19. E.hallii может быть маркером как инсулинорезистентности, так и когнитивной дисфункции, однако это требует дополнительных исследований.