https://doi.org/10.22416/1382-4376-2019-29-4-38-49

Влияние рифаксимина и мультиштаммового пробиотика на кишечный микробиом и показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ишемической болезнью сердца

Е.А. Кашух[1,*], Е.А. Полуэктова[1], А.В. Кудрявцева[2], Г.С. Краснов[2], В.И. Казей[3], П.Д. Соболев[3], П.В. Гремякова[3], В.Т. Ивашкин[1]

[1] *ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация*
[2] *ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва, Российская Федерация*
[3] *Лаборатория «Экзактэ Лабс», Москва, Российская Федерация*

Цель исследования: оценить влияние рифаксимина и мультиштаммового пробиотика на кишечный микробиом и показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС).

Материалы и методы. В исследование, проводившееся с 2016 по 2019 год, было включено 120 человек в возрасте старше 50 лет, разделенных на 3 группы. Группа 1 — пациенты с ИБС, получающие стандартное лечение; группа 2 — пациенты с ИБС, получающие в дополнение пробиотик (*Bifidobacterium bifidum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium longum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium infantis* не менее 1×10^9 КОЕ; *Lactobacillus rhamnosus* не менее 1×10^9 КОЕ) в течение 28 дней; группа 3 — пациенты с ИБС, получающие в дополнение к основному лечению рифаксимин курсом 7 дней, а затем мультиштаммовый пробиотик в течение 21 дня. Группу 4 составили здоровые лица, сопоставимые по возрасту и полу с участниками исследования с ИБС. В группе 4 анализы крови и кала выполнялись однократно для сравнения с группой 1. Определение концентрации ТМАО выполнено с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Для изучения состава фекальной микрофлоры использовалось 16S-секвенирование с последующим графическим представлением результатов. Анализ результатов производился с помощью программы обработки статистических данных IBM SPSS 22.0.

Результаты. Дополнительный прием пробиотика (*Bifidobacterium bifidum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium longum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium infantis* не менее 1×10^9 КОЕ; *Lactobacillus rhamnosus* не менее 1×10^9 КОЕ) не повлиял на липидный профиль, скорость агрегации тромбоцитов. Терапия рифаксимином повлияла на снижение уровня общего холестерина, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), очень низкой плотности (ЛПОНП), триглицеридов ($p < 0,05$) и не оказала влияние на уровень липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Отмечалась тенденция к снижению ТМАО во всех группах, статистически незначимая ($p > 0,05$).

В составе фекальной микробиоты по завершению приема пробиотика отмечены тенденции к повышению доли бактерий семейств *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, снижению доли семейства *Ruminococcaceae* ($p > 0,05$). После терапии рифаксимином отмечена тенденция к снижению долей бактерий семейства *Clostridiaceae* ($p < 0,05$), *Peptostreptococcaceae* ($p < 0,05$), тенденция к снижению *Enterobacteriaceae* ($p > 0,05$), уменьшение количества бактерий родов *Clostridium* и *Escherichia/Shigella* ($p > 0,05$). Применение пробиотика после курса лечения рифаксимином не оказало существенного влияния на состав микрофлоры.

В целом высокая вариабельность фекальной микробиоты между различными пациентами (значительно превосходящая межгрупповые отличия) не позволяет сделать однозначных выводов.

Выводы. Применение мультиштаммового пробиотика в качестве дополнительной терапии у пациентов с ИБС в течение 28 дней не оказало значимого влияния на обмен липидов, уровень ТМАО и состав фекальной микрофлоры. Последовательное применение рифаксимина и пробиотика оказало благоприятное воздействие на такие факторы, как обмен липидов (снижение уровня общего холестерина, ЛПНП, ЛПОНП, триглицеридов), однако не повлияло на концентрацию ТМАО и состав кишечной микрофлоры у пациентов с ИБС.

Ключевые слова: атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, микробиом, пробиотик, рифаксимин, триметиламин, L-карнитин, ТМАО.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Кашух Е.А., Полуэктова Е.А., Кудрявцева А.В., Краснов Г.С., Казей В.И., Соболев П.Д., Гремякова П.В., Ивашкин В.Т. Влияние рифаксимина и мультиштаммового пробиотика на кишечный микробиом и показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ишемической болезнью сердца. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2019;29(4):38–49. https://doi.org/10.22416/1382-4376-2019-29-4-38-49

Effect of Rifaximin and a Multi-Strain Probiotic on the Intestinal Microbiome and Cardiovascular Risk Indicators in Patients with Coronary Heart Disease

Ekaterina A. Kashukh[1,*], Elena A. Poluektova[1], Anna V. Kudryavtseva[2], Georgiy S. Krasnov[2], Vasily I. Kazey[3], Pavel D. Sobolev[3], Polina V. Gremyakova[3], Vladimir T. Ivashkin[1]

[1] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation*

[2] *Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[3] *Laboratory Exacte Labs, Moscow, Russian Federation*

Aim. To assess the effect of rifaximin and a multi-strain probiotic on the intestinal microbiome and the indicators of cardiovascular risk in patients with coronary heart disease (CHD).

Materials and methods. A study conducted during the 2016–2019 period included 120 people over 50 years old divided into 3 groups. Group 1 comprised patients with coronary heart disease receiving standard treatment. Group 2 comprised patients with coronary heart disease receiving additionally a probiotic (*Bifidobacterium bifidum* no less than $1x10^9$ CFU; *Bifidobacterium longum* no less than $1x10^9$ CFU; *Bifidobacterium infantis* no less than $1x10^9$ CFU; *Lactobacillus rhamnosus* no less than $1x10^9$ CFU) within 28 days. Group 3 comprised CHD patients receiving rifaximin for 7 days followed by addition of the multi-strain probiotic under test for 21 days. Group 4 consisted of healthy individuals, comparable in age and sex with the examined CHD patients. In group 4, blood and stool tests were performed once to provide a comparison with group 1. TMAO concentration was determined using liquid chromatography–mass spectrometry. To study the composition of fecal microflora, 16S sequencing was used followed by a graphical representation of the results. The results were analysed using the IBM SPSS 22.0 statistical data processing software.

Results. An additional administration of the probiotic (*Bifidobacterium bifidum* no less than $1x10^9$ CFU; *Bifidobacterium longum* no less than $1x10^9$ CFU; *Bifidobacterium infantis* no less than $1x10^9$ CFU; *Lactobacillus rhamnosus* no less than $1x10^9$ CFU) is found to have no effect on the lipid profile and the platelet aggregation rate. Rifaximin therapy reduced the amount of total cholesterol, low density lipoproteins (LDL), very low density (VLDL) lipoproteins and triglycerides (p <0.05), although not affecting the level of high density lipoproteins (HDL). TMAO showed a statistically insignificant (p>0.05) downward trend in all groups. The composition of the fecal microbiota, at the end of administration of the probiotic, showed an increase in the proportion of bacteria of the *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae* families and a decrease in the *Ruminococcaceae* family (p>0.05). After rifaximin therapy, a decrease in the proportion of bacteria of the *Clostridiaceae* (p <0.05) and *Peptostreptococcaceae* (p <0.05) families, a decrease in *Enterobacteriaceae* (p > 0.05) family and a decrease in the *Clostridium* and *Escherichia/Shigella* (p > 0.05) genera was observed. The use of the probiotic after a course of treatment with rifaximin did not have a significant effect on the composition of the microflora. In general, the high variability of fecal microbiota between different patients (significantly superior to intergroup differences) does not allow us to draw unambiguous conclusions.

Conclusions. The use of a multi-strain probiotic as an additional therapy in patients with coronary heart disease within 28 days did not have a significant effect on lipid metabolism, TMAO level and the composition of fecal microflora. The consecutive use of rifaximin and the probiotic had a beneficial effect on such factors as lipid metabolism (decrease in the level of total cholesterol, LDL, VLDL, triglycerides), but did not affect the concentration of TMAO and the composition of the intestinal microflora in patients with coronary heart disease.

Keywords: atherosclerosis, coronary heart disease, microbiome, probiotic, rifaximin, trimethylamine, L-carnitine, TMAO

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Kashukh E.A., Poluektova E.A., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Kazey V.I., Sobolev P.D., Gremyakova P.V., Ivashkin V.T. Effect of Rifaximin and a Multi-Strain Probiotic on the Intestinal Microbiome and Cardiovascular Risk Indicators in Patients with Coronary Heart Disease. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2019;29(4):38–49. https://doi.org/10.22416/1382-4376-2019-29-4-38-49

Атеросклероз представляет собой хроническое заболевание артерий эластического и мышечно-эластического типа, сопровождающееся сложным комплексом реакций с участием холестерина, макрофагов и других факторов, приводящих последовательно к формированию атеросклеротической бляшки с последующей возможностью нарушения стабильности ее существования. Прогрессирование атеросклеротического поражения артерий приводит к развитию ишемической болезни сердца (ИБС), нарушению мозгового кровообращения, поражению сосудов конечностей.

Длительное время среди множества гипотез развития атеросклероза ведущей служила липидная теория, связывающая развитие данного заболевания с нарушением обмена холестерина. Тем не менее в настоящее время очевидно, что атеросклероз представляет собой заболевание, в развитии и прогрессировании которого могут участвовать много различных факторов. Среди них наиболее распространены курение, дислипидемия, метаболический синдром, ожирение [1].

Поиск неизвестных факторов риска развития атеросклероза и способов воздействия на них продолжается. С появлением возможностей углубленного изучения состава и метаболизма микроорганизмов открылись новые перспективы в оценке влияния тех или иных веществ на сердечно-сосудистый риск. Забытая на многие годы инфекционно-воспалительная теория атеросклероза приобрела

новое значение [1]. Так, в недавнем исследовании A. Fialho и соавт. было продемонстрировано, что наличие избыточного бактериального роста в тонкой кишке (СИБР) может служить независимым фактором риска развития ИБС [2].

В 2011 г. Z. Wang и соавт. выявили существенное и статистически значимое повышение уровня триметиламин-N-оксида (ТМАО) в крови у пациентов с ИБС и последующими неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями, такими как инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения. Связь с повышением уровня ТМАО при сосудистых осложнениях сохранялась также при устранении влияния других факторов риска [3].

ТМАО представляет собой продукт окисления триметиламина (ТМА), образующегося, в свою очередь, из фосфатидилхолина и L-карнитина при участии кишечной микробиоты. Превращение ТМА в ТМАО происходит в печени с помощью фермента печеночная флавин-монооксигеназа-3 (рис. 1) [4]. Бактерии, ответственные за продукцию ТМАО у человека, до сих пор не до конца изучены. Предположительно, в метаболизме фосфатидилхолина и L-карнитина участвуют микроор-

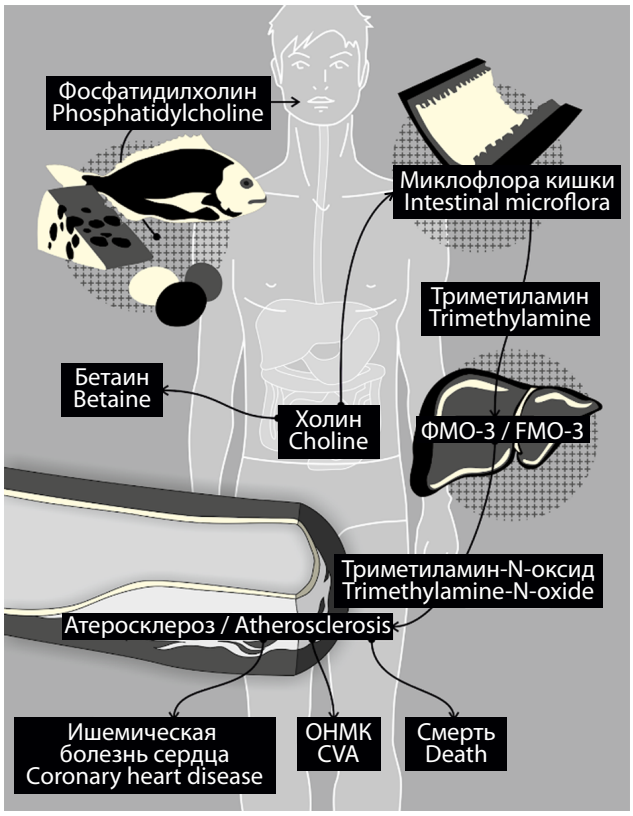

Рис. 1. Механизм возникновения атеросклероза при употреблении пищи, содержащей карнитин и холин. При поступлении в организм продуктов, содержащих L-карнитин (красное мясо) и фосфатидилхолин (яйца, морепродукты, брокколи, бобовые) под воздействием кишечной микрофлоры происходит метаболическое превращение «Фосфатидилхолин — Холин — Бетаин-ТМА» и «L-карнитин — Карнитин-ТМА» в просвете кишки и «ТМА — ТМАО» в печени с участием ферментов из группы ФМО. ТМАО способствует нарушению равновесия прямого и обратного транспорта холестерина на множестве уровней: изменяя активность рецепторов в энтероцитах, гепатоцитах, макрофагах, воздействуя на продукцию желчных кислот. В результате таких изменений происходит ускоренное отложение холестерина в стенках артерий, что ведет к развитию атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. ТМА — триметиламин, ТМАО — триметиламин-N-оксид, ФМО — флавинмонооксидазы, ФМО-3 — флавинмонооксигеназа-3, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения

Fig.1. Carnitine and choline containing foods and the mechanism of the atherosclerosis development. When products containing L-carnitine (red meat) and phosphatidylcholine (eggs, seafood, broccoli, legumes) are transformed by intestinal microflora, the metabolic conversions “phosphatidylcholine-choline-betaine-TMA” and “L-carnitine-carnitine-TMA” occur in the lumen of the intestine and “TMA — TMAO” in the liver with the participation of enzymes from the FMO group. TMAO contributes to the imbalance in the direct and reverse cholesterol transport at many levels: by changing the activity of receptors in enterocytes, hepatocytes and macrophages, affecting the production of bile acids. Such changes result in an accelerated deposition of cholesterol on the walls of the arteries, which leads to the development of atherosclerosis and cardiovascular diseases. TMA — trimethylamine, TMAO-trimethylamine-N-oxide, FMO - Flavin-containing monooxygenase, FMO-3 — Flavin-containing Monooxygenase-3, CVA - acute cerebrovascular accident.

ганизмы, относящиеся к семействам *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Enterobacteriaceae*, типам *Verrucomicrobiaceae*, *Streptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Veillonellaceae* [5].

Проведенные W.H. Tang и соавт. эксперименты с участием ApoE–/– мышей продемонстрировали, что добавление животным в корм избыточного количества фосфатидилхолина и L-карнитина приводит к ускоренному развитию атеросклеротического поражения артерий без существенного изменения со стороны липидного и углеводного обмена. При этом добавление в корм животным антибиотиков широкого спектра действия позволило редуцировать изменения в сосудах и перитонеальных макрофагах. На основании полученных данных учеными была предложена гипотеза, согласно которой ТМАО способен влиять на замедление обратного и ускорение прямого транспорта холестерина, что приводит к ускоренному его накоплению в периферических тканях [5].

Более поздние эксперименты с участием ApoE–/– мышей, у которых был сохранен переносчик эфиров холестерина CETP, а также скорректировано количество L-карнитина в диете животных, выявили противоположные результаты, согласно которым наблюдалась обратная связь между увеличением концентрации ТМАО и площадью атеросклеротического поражения аорты [6].

Неоднозначные данные получены и в исследованиях с участием людей. Так, прием антибиотика широкого спектра действия здоровыми добровольцами (n = 40) привел к выраженному подавлению концентрации ТМАО с последующим восстановлением через некоторый промежуток времени [5]. Применение антибиотиков сопряжено с множеством побочных эффектов, а также с возрастающей резистентностью многих бактерий к ним. Ввиду этих причин рутинное применение антибиотиков, вероятно, не может быть рассмотрено в качестве способа воздействия на сердечно-сосудистый риск.

Другим потенциальным способом модулирования микрофлоры кишечника служит прием пробиотиков [7]. Эксперименты на мышах продемонстрировали положительные результаты в отношении снижения уровня ТМАО при добавлении к корму животных пробиотического штамма *Enterobacter aerogenes ZDY01* [8]. Однако применение *Lactobacillus casei Shirota* у здоровых добровольцев, так же как и мультиштаммового пробиотика VSL#3 (*Streptococcus thermophiles* DSM24731, *Lactobacillus acidophilus* DSM24735, *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* DSM24734, *Lactobacillus paracasei* DSM24733, *Lactobacillus plantarum* DSM24730, *Bifidobacterium longum* DSM24736, *Bifidobacterium infantis* DSM24737, *Bifidobacterium breve* DSM24732) у пациентов с метаболическим синдромом, не привело к изменению продукции ТМАО и состава фекальной микробиоты [9, 10].

За основу настоящего исследования взята гипотеза о возможности влияния на факторы сердечно-сосудистого риска при ИБС посредством модулирования кишечного микробиома пациентов с помощью антибиотика рифаксимина и мультиштаммового пробиотика Флорасан Д. Оценивали как традиционные факторы риска: дислипидемия, ожирение, нарушение агрегации тромбоцитов, так и новые, потенциально связанные с прогрессированием ИБС, наличие СИБР, повышение уровня ТМАО.

Материалы и методы исследования

На базе Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко УКБ № 2 Сеченовского университета было проведено проспективное контролируемое исследование с участием пациентов с ИБС обоих полов (n = 119).

Подтверждением наличия ИБС служили данные анамнеза, результаты суточного мониторирования ЭКГ по Холтеру, данные ультразвукового исследования брахиоцефальных артерий. Пациенты, получавшие за месяц до исследования пробиотики, антибиотики, страдающие сахарным диабетом 2 типа или любым другим хроническим заболеванием в стадии декомпенсации, а также при выявлении онкологического заболевания, исключались из исследования.

Все пациенты с ИБС получали антигипертензивную терапию, аспирин, статины, нитраты длительного действия, в то время как участники из группы сравнения не принимали препараты.

После рандомизации пациенты получали: стандартное лечение (группа 1, n = 29), дополнительно к стандартному лечению мультиштаммовый пробиотик Флорасан Д в течение 28 дней (группа 2, n = 30) или рифаксимин в течение 7 дней, затем пробиотик Флорасан Д в течение 21 дня (группа 3, n = 30). Участники из группы сравнения (группа 4, n = 30) не получали никаких препаратов за время исследования.

Определение концентрации ТМАО в крови

Накануне исследования из диеты участников исключались продукты с высоким содержанием фосфатидилхолина и L-карнитина. За 12 ч до взятия образцов крови пациенты принимали 800 мг холина для стандартизации результатов, после этого следовал период голодания и забор крови натощак. Забор крови для определения концентрации ТМАО осуществляли в 0, 7 и 28-й дни исследования. После центрифугирования цельной венозной крови аликвоты сыворотки крови распределялись в пробирки эппендорф 1 мл с последующим хранением в морозильной камере при температуре -80 °C.

Анализ образцов крови выполнен на жидкостном хромато-масс-спектрометре с тройным квадруполем Shimadzu 8050 (Япония) с электрораспылительной ионизацией. Хроматографическое

разделение компонентов проводили методом гидрофильной хроматографии на диольной стационарной фазе в изократическом режиме элюирования.

Анализ фекальной микрофлоры

Сбор анализов кала для определения состава фекальной микрофлоры осуществляли в 0, 7 и 28-й дни исследования, для чего накануне пациентам выдавали стерильные контейнеры. Пациенты были проинструктированы относительно правил сбора анализа кала. После получения образца от пациента его сохраняли в морозильной камере при температуре –80 °C до последующего анализа.

Для выделения ДНК после разморозки образцы массой 10 мкг подвергали гомогенизации, центрифугированию при 14 000 об./мин в течение 10 мин с последующим выделением нуклеиновых кислот.

Первый раунд амплификации вариабельных участков V3-V4 гена 16Sр РНК осуществляли с использованием прямого праймера CCTACGGGNGGCWGCAG и обратного GACTACHVGGGTATCTAATCC (ампликон 440–460 нуклеотидов) и обратного праймеров. Программа амплификации Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, США). Второй раунд амплификации образцов выполняли с участием комбинации специфических праймеров и амплификатора Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, США). Очистка ПЦР-продуктов проводилась с помощью шариков Agencourt AM Pure XP. Подготовку 16S метагеномных библиотек осуществляли в соответствии с протоколом 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США). Концентрацию полученных библиотек 16S определяли с помощью флуориметра Qubit® 2.0 (Invitrogen, США) и набора QuantiT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit.

Обработку данных проводили в среде R с использованием пакета DADA2 (включая коррекцию ошибок секвенирования, удаление химер и выделение RSV) после склеивания прямого и обратного ридов при помощи MeFiT. Аннотацию полученных последовательностей RSV осуществляли с использованием базы RDP алгоритмами DADA2. Оценка бета-разнообразия, т.е. меры сходства между различными образцами, проводилась с использованием метрики расстояний Брея — Кёртиса. На основе этой метрики проведена иерархическая кластеризация образцов.

Статистический анализ

Анализ исследуемых показателей выполняли с применением стандартных методов статистической обработки данных в программе IBM SPSS 22.0. Оценку различий количественных признаков между группами участников производили с использованием критерия Манна — Уитни, позволяющего выявить различия в малых выборках. Для сопоставления показателей в одной и той же выборке испытуемых был рассчитан непараметрический критерий Уилкоксона. Для анализа отличий в структуре фекальной микрофлоры, а именно представленности различных родов, семейств бактерий, использовался критерий Вилкоксона, *t*-тест Стьюдента.

Результаты

У пациентов, страдающих ИБС 2–3 функционального класса, средний возраст составил 65,0 ± 3,7 года, средний ИМТ = 29,99 ± 2,10 кг/м². У участников из группы сравнения средний возраст составлял 59,83 ± 3,15 года, средний ИМТ = 25,30 ± 1,90 кг/м². Основные характеристики участников исследования представлены в таблице 1.

Липидный профиль на фоне применения антибиотика и мультиштаммового пробиотика

Изменений липидного профиля на фоне дополнительной терапии мультиштаммовым пробиотиком не отмечено. Прием рифаксимина в течение 7 дней способствовал незначительному, но стати-

Таблица 1. Характеристика участников исследования

Table 1. Baseline characteristics of the study participants

Показатели Parameter	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	p
Возраст Age	65,90 ± 4,00	64,90 ± 3,54	64,53 ± 3,84	59,83 ± 3,15	$p_{1-2} > 0,05$; $p_{1-3} > 0,05$; $p_{1-4} > 0,05$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{2-4} > 0,05$; $p_{3-4} > 0,05$
Рост Height	167,03 ± 4,83	168,20 ± 6,26	169,40 ± 6,77	170,70 ± 6,31	$p_{1-2} > 0,05$; $p_{1-3} > 0,05$; $p_{1-4} > 005$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{2-4} > 0,05$; $p_{3-4} > 0,05$
Вес Weight	84,31 ± 6,93	84,33 ± 6,94	87,40 ± 7,07	73,83 ± 8,67	$p_{1-2} > 0,05$; $p_{1-3} > 0,05$; $p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{2-4} < 0,05$; $p_{3-4} < 0,001$
ИМТ BMI	29,97 ± 1,90	29,93 ± 1,91	30,07 ± 2,75	25,30 ± 1,47	$p_{1-2} > 0,05$; $p_{1-3} > 0,05$; $p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{2-4} < 0,05$; $p_{3-4} < 0,001$

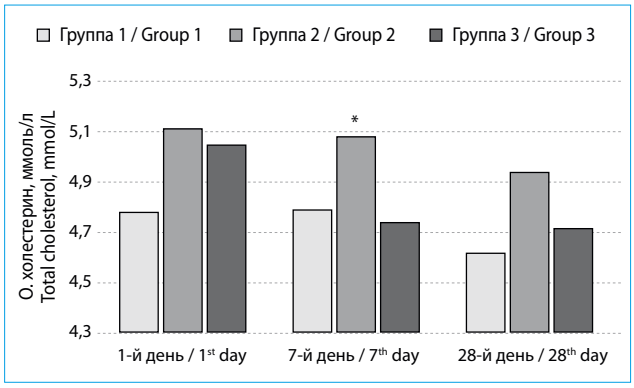

Рис. 2a. Изменение концентрации общего холестерина в липидном профиле пациентов с ИБС.

Примечание: * — $p < 0,05$.

Fig. 2a. Changes in the total cholesterol concentration in the lipid profile of CHD patients.

Note: * — $p < 0.05$.

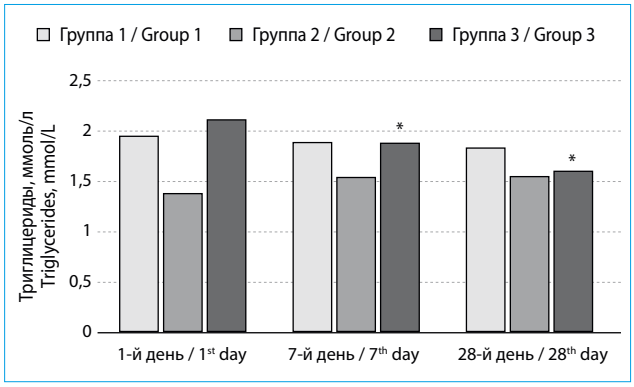

Рис. 2b. Изменение концентрации триглицеридов в липидном профиле пациентов с ИБС.

Примечание: * — $p < 0,05$.

Fig. 2b. Changes in the triglyceride concentration in the lipid profile of CHD patients.

Note: * — $p < 0.05$.

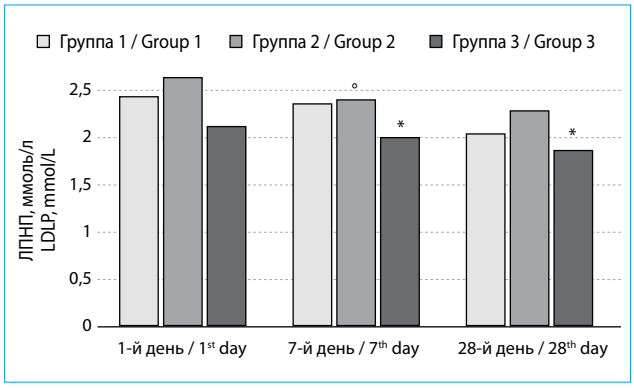

Рис. 2c. Изменение концентрации липопротеидов низкой плотности в липидном профиле пациентов с ИБС.

Примечание: * — $p < 0,05$.

Fig. 2c. Changes in the low-density lipoprotein concentration in the lipid profile of CHD patients.

Note: * — $p < 0.05$.

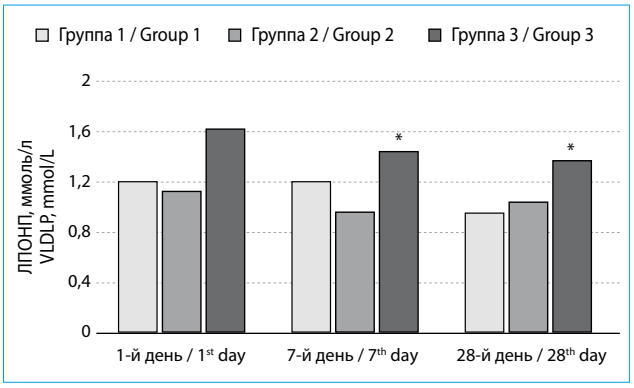

Рис. 2d. Изменение концентрации липопротеидов очень низкой плотности в липидном профиле пациентов с ИБС.

Примечание: * — $p < 0,05$.

Fig. 2d. Changes in the very low-density lipoprotein concentration in the lipid profile of CHD patients.

Note: * — $p < 0.05$.

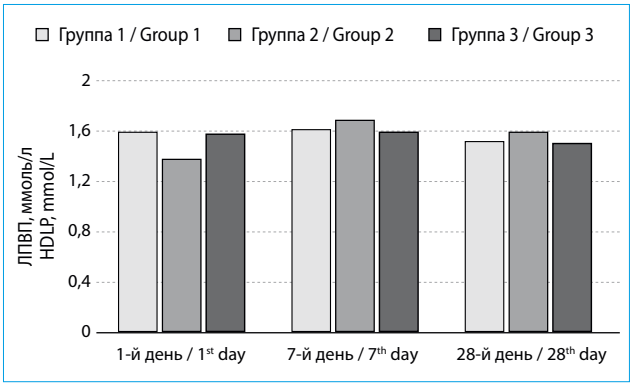

Рис. 2e. Изменение концентрации липопротеидов высокой плотности в липидном профиле пациентов с ИБС.

Примечание: * — $p < 0,05$.

Fig. 2e. Changes in the high-density lipoprotein concentration in the lipid profile of the CHD patients.

Note: * — $p < 0.05$.

стически достоверному изменению показателей липидного профиля пациентов с ИБС — снижению уровня общего холестерина, ЛПНП, ЛПОНП, триглицеридов ($p < 0,05$).

Уровень агрегации тромбоцитов оставался в пределах нормальных значений у всех участников исследования, изменений при добавлении к терапии рифаксимина или Флорасана Д не продемонстрировано (рис. 2).

Агрегация тромбоцитов на фоне применения антибиотика и мультиштаммового пробиотика

Между пациентами с ИБС и относительно здоровыми людьми — участниками исследования не было отмечено различий в скорости агрегации тромбоцитов (50,28 ± 14,74 vs 54,83 ± 12,22, $p > 0,05$) (рис. 3).

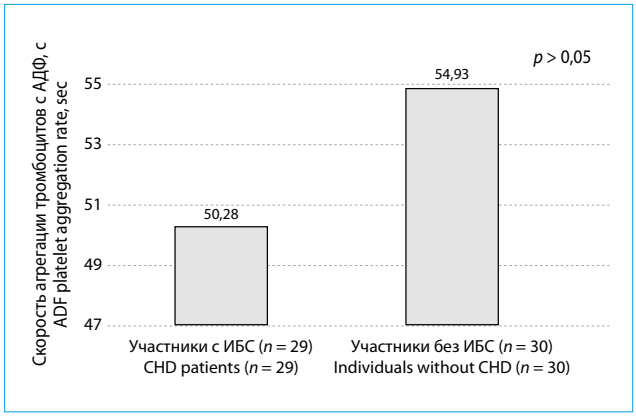

Рис. 3. Сравнение скорости агрегации тромбоцитов у пациентов с ИБС и здоровых лиц, $p > 0,05$

Fig. 3. Comparison of the platelet aggregation rate in CHD patients and healthy persons, $p > 0.05$

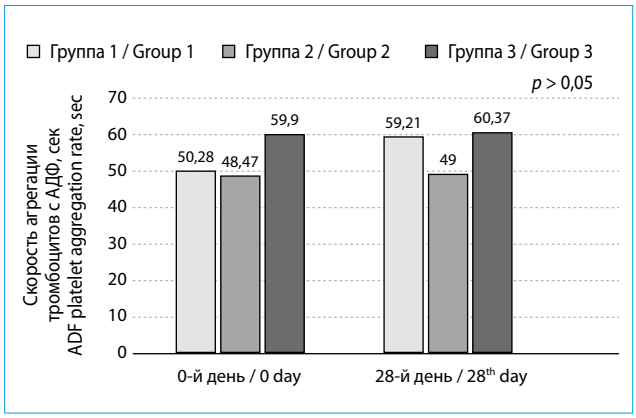

Рис. 4. Изменение скорости агрегации тромбоцитов среди пациентов с ИБС в динамике, p > 0,05

Fig. 4. Dynamic change in the platelet aggregation rate in CHD patients, p>0.05

Также не выявлено различий в динамике скорости агрегации тромбоцитов между пациентами с ИБС, получавшими стандартную терапию, дополнительное лечение антибиотиком и пробиотиком ($p > 0,05$ для всех групп) (рис. 4).

Концентрация ТМАО на фоне применения антибиотика и мультиштаммового пробиотика

Одним из наиболее значимых в настоящем исследовании был анализ изменений концентрации метаболита кишечной микрофлоры ТМАО у пациентов с ИБС в сравнении с относительно здоровыми участниками, а также в динамике среди пациентов с ИБС при добавлении в схему лечения антибиотика и пробиотика.

При сравнении концентраций ТМАО пациентов с ИБС и участников исследования без ИБС выявлено 3-кратное повышение ТМАО в группе 1. Так, средняя концентрация ТМАО участников с ИБС составила 1036,39 ± 748,22 нг/мл, в то время как в группе сравнения 376,53 ± 147,95 нг/мл ($p = 0,0001$).

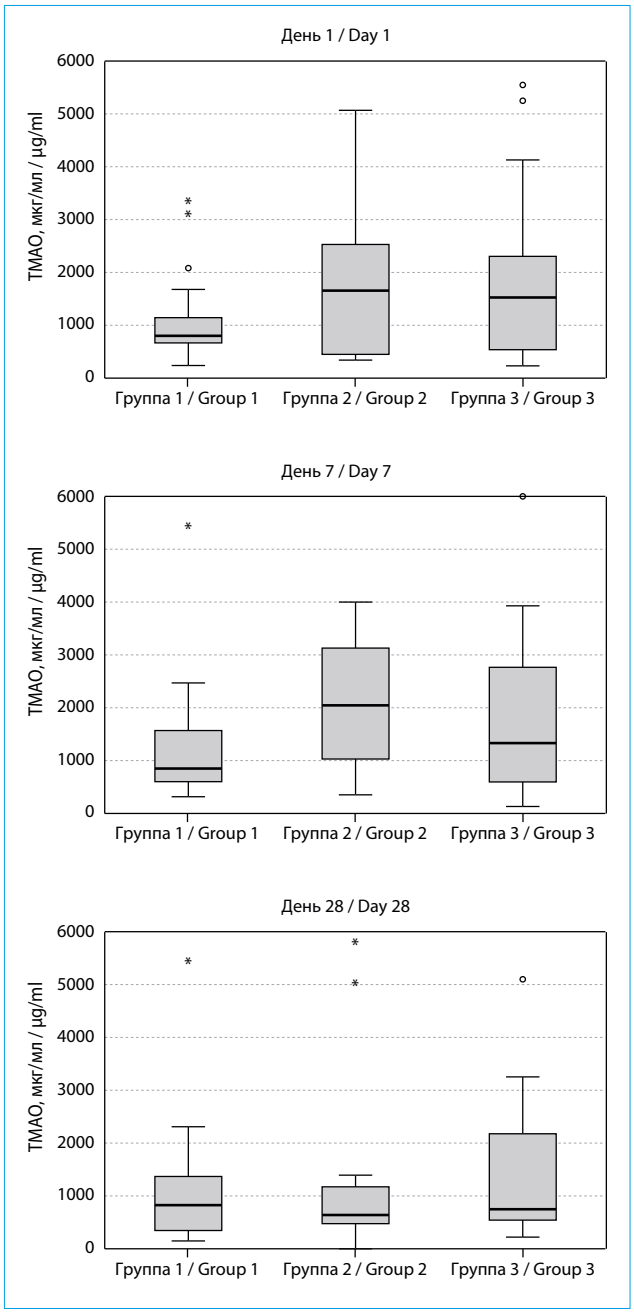

Рис. 5. Концентрация ТМАО в динамике у пациентов с ИБС

Fig. 5. Dynamics of the TMAO concentration in CHD patients

При изучении изменения концентрации ТМАО в динамике у пациентов с ИБС выявлена тенденция к его снижению во всех группах в завершающей точке исследования ($p > 0,05$). Прием рифаксимина и Флорасана Д незначительно повлиял на концентрацию ТМАО ($p = 0,066$ для группы 2 и для $p = 0,558$ группы 3 на 28-й день соответственно) (рис. 5).

Изменения фекальной микрофлоры при лечении антибиотиком и пробиотиком

Изучение фекальной микрофлоры проведено у пациентов с ИБС и относительно здоровых лиц аналогичного возраста и пола, а также между группами с ИБС, принимающими различную терапию. Анализ был выполнен на уровне таких таксономических единиц, как семейство, род.

При сравнении микрофлоры пациентов с ИБС с участниками исследования без ИБС на уровне семейств определялось в среднем многократное повышение *Verrucomicrobiaceae* ($p < 0,05$) и *Enterobacteriaceae* ($p < 0,05$), снижение *Ruminococcaceae* вдвое ($p = 0,065$). В отношении бактерий семейств *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae* имелась лишь возможная тенденция к росту их относительной численности ($p > 0,05$). Тем не менее высокая вариабельность фекальной микробиоты между различными пациентами (значительно превосходящая межгрупповые отличия) не позволяет сделать однозначных выводов.

При анализе родов микроорганизмов у пациентов с ИБС отмечалось относительное увеличение долей *Escherichia/Shigella* ($p < 0,05$), тенденция к увеличению относительного количества бактерий *Clostridium XlV* (a и b) ($p = 0,98$ и $p = 0,2$ соответственно). Роды *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* также сохранили статистически не подтвержденную тенденцию к увеличению их численности у пациентов с ИБС ($p = 0,18$ и $p = 0,28$ соответственно).

При изучении изменений фекальной микрофлоры у пациентов с ИБС, получавших стандартную терапию, в динамике не отмечено статистически значимых отличий в структуре бактерий на уровне семейств (рис. 6). На уровне родов микроорганизмов имелась незначимая тенденция к увеличению количества представителей *Streptococcus* ($p = 0,5$), *Escherichia/Shigella* ($p = 0,76$), снижению *Bifidobacterium* ($p = 0,53$).

У пациентов с ИБС, получавших дополнительную терапию пробиотиком Флорасан Д в течение 28 дней, также не выявлено статистически значимых согласованных между различными индивидуумами изменений на уровне семейств и родов бактерий в сравнении с пациентами, получавшими стандартную терапию ($p > 0,05$), тем не менее имелась определенная тенденция к повышению количества *Streptococcaceae* (p = 0,083), *Lactobacillaceae* ($p = 0,19$), *Enterobacteriaceae*, снижению *Ruminococcaceae* ($p = 0,23$) (рис. 7).

Добавление к терапии рифаксимина обнаружило тенденцию в среднем к 2-кратному снижению относительного количества потенциально проатерогенных бактерий семейств *Clostridiaceae 1* ($p < 0,05$), *Peptostreptococcaceae* ($p < 0,05$; главным образом рода *Clostridium sensu stricto*). Общая численность бактериальных единиц в образцах фекальной микрофлоры после приема антибиотика также имела тенденцию к уменьшению (рис. 8). Тем не менее малый размер сравниваемых групп (4 против 4) не позволяет сделать достоверных выводов. При анализе родов микроорганизмов

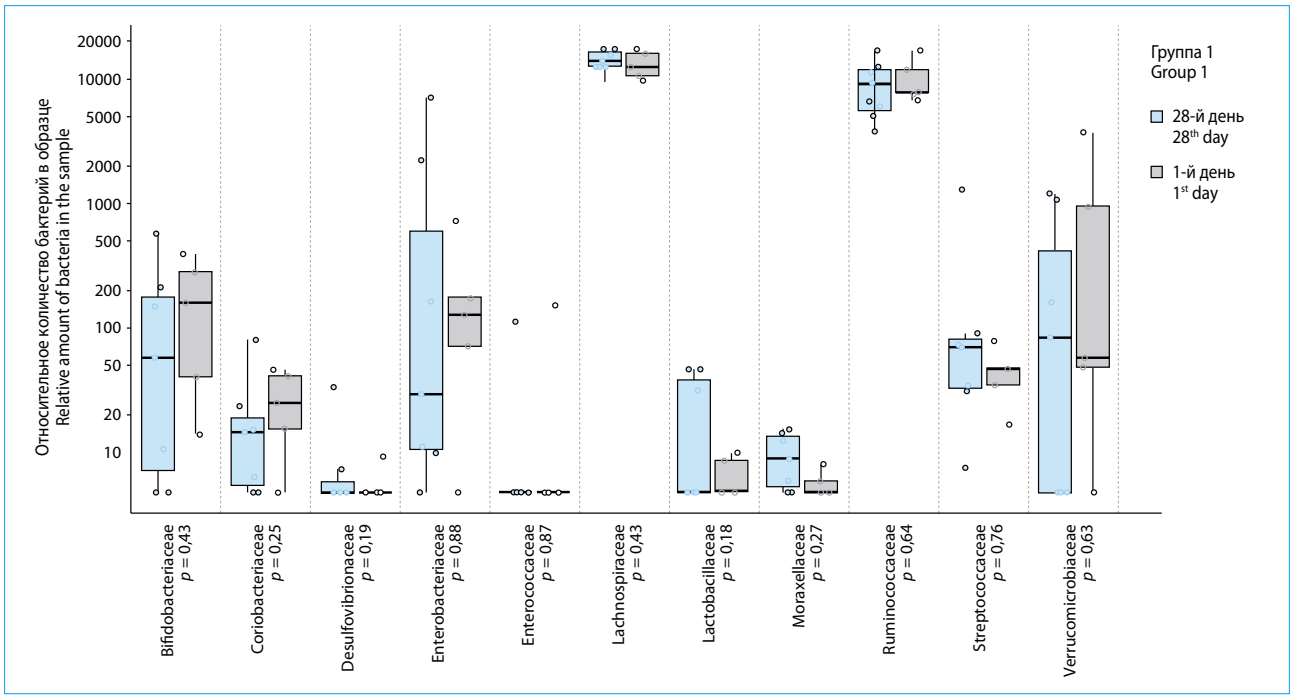

Рис. 6. Сравнение фекальной микрофлоры пациентов с ИБС в динамике, уровень семейств

Fig. 6. Dynamic comparison of the fecal microflora of CHD patients, familial level

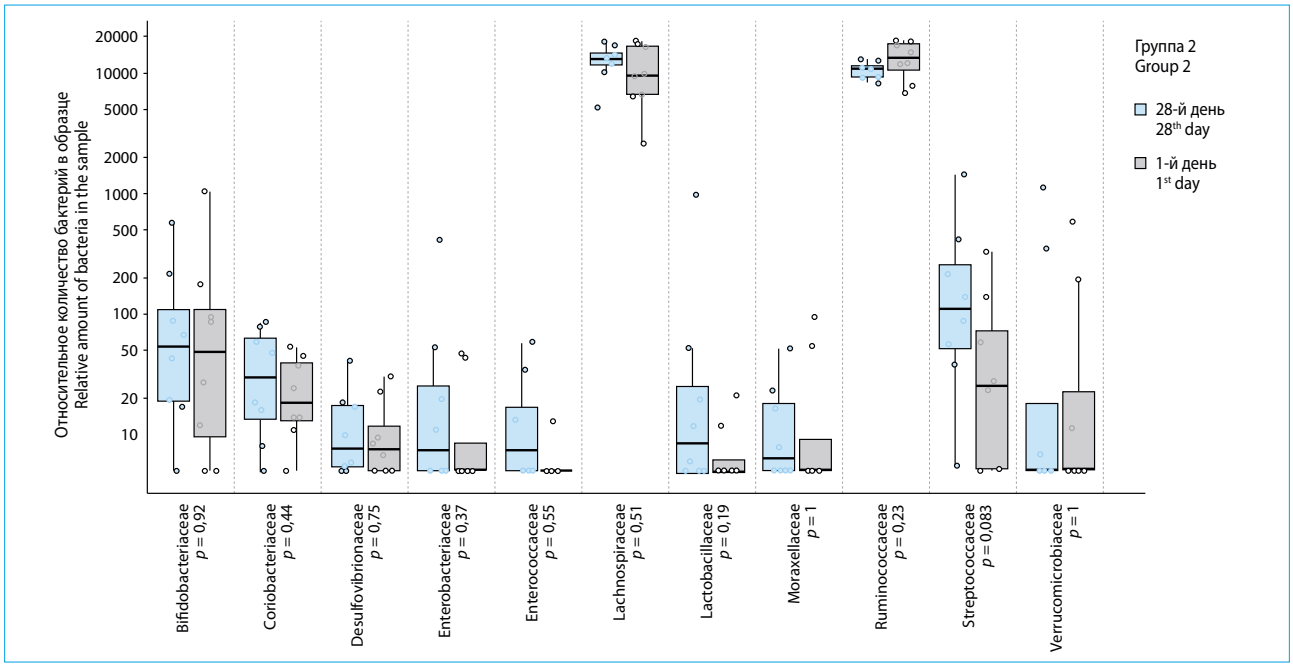

Рис. 7. Сравнение фекальной микрофлоры пациентов с ИБС, получавших пробиотик Флорасан Д, в динамике

Fig. 7. Dynamic comparison of the fecal microflora of CHD patients receiving the Florasan D probiotic

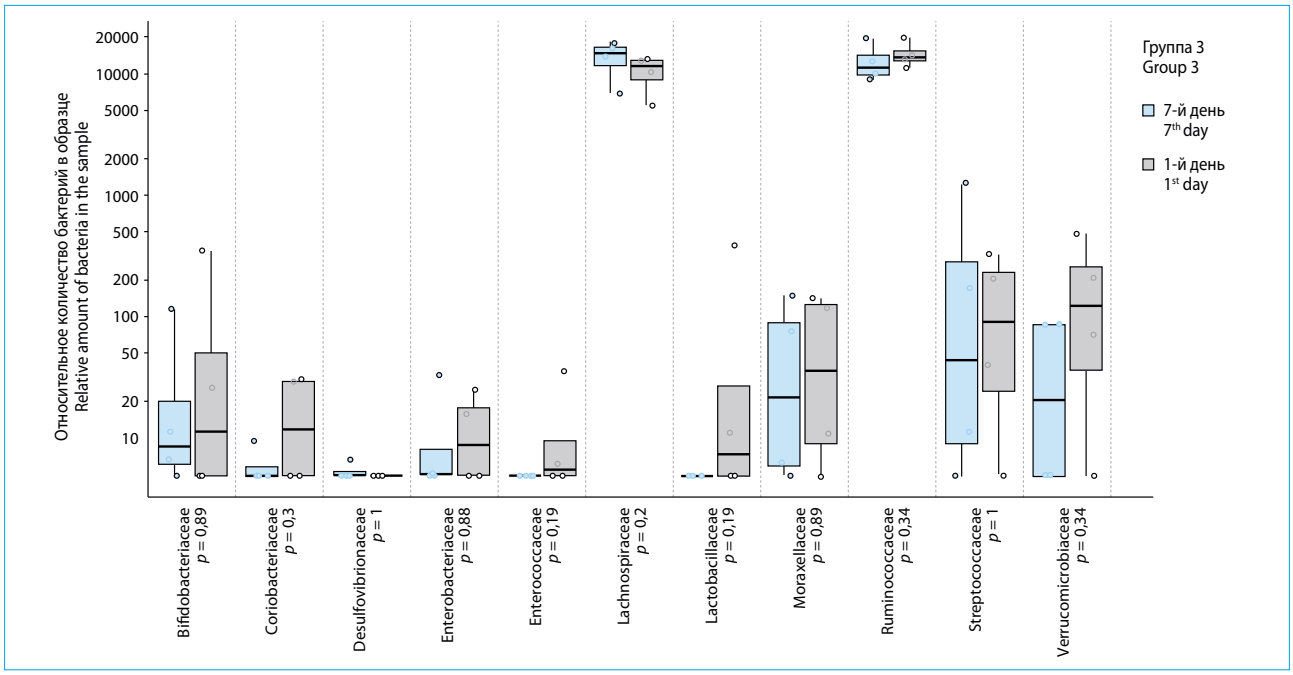

Рис. 8. Сравнение фекальной микрофлоры пациентов с ИБС, получавших рифаксимин, в динамике

Fig. 8. Dynamic comparison of the fecal microflora of CHD patients receiving rifaximin

обнаружена тенденция к снижению бактерий-анаэробов *Clostridium sensu stricto*, *Clostridium* XI ($p = 0,05$), отмечалась тенденция к уменьшению количества *Lactobacillus* ($p = 0,2$) и *Bifidobacterium* ($p = 0,49$).

Последующее применение мультиштаммового пробиотика Флорасан Д в течение 21 дня статистически значимо не повлияло на изменение состава фекальной микрофлоры у пациентов с ИБС. Отмечено уменьшение количества в образцах продуцирующих ТМАО бактерий из семейств *Streptococcaceae, Enterobacteriaceae, Coriobacteriaceae,* наряду с этим снижение количества *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae* ($p > 0,05$).

Обсуждение результатов

Опубликованный ранее фрагмент исследования, проведенного на базе Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко, позволил выявить различия в питании у пациентов с ИБС в сравнении со здоровыми людьми. У больных ИБС было отмечено употребление большего количества продуктов - предшественников ТМАО, что согласовалось с увеличением численности микробов — продуцентов триметиламина в образцах фекалий [11].

Настоящее исследование служит продолжением изучения особенностей микробиома пациентов с ИБС и возможностей его коррекции для улучшения прогноза заболевания. Воздействие использованных в исследовании препаратов для изменения состава и метаболизма тонко- и толстокишечной микрофлоры демонстрирует противоречивые результаты.

С учетом данных, полученных ранее, в качестве терапевтических агентов в настоящем исследовании были выбраны рифаксимин и мультиштаммовый пробиотик Флорасан Д (*Bifidobacterium bifidum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium longum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium infantis* не менее 1×10^9 КОЕ; *Lactobacillus rhamnosus* не менее 1×10^9 КОЕ). В отличие от других антибиотиков, рифаксимин практически не подлежит резорбции и накапливается в высокой концентрации в просвете кишечника, что позволяет минимизировать побочные эффекты терапии. Кроме того, полученные данные относительно изменения микрофлоры кишечника на фоне терапии рифаксимином свидетельствуют об увеличении количества лакто- и бифидобактерий, что позволяет рассматривать указанный препарат в качестве эубиотика [12, 13].

До настоящего времени мультиштаммовый пробиотик Флорасан Д не был изучен с точки зрения возможности снижения сердечно-сосудистого риска, тем не менее существует ряд исследований, подтверждающих благоприятное влияние отдельных бактерий, входящих в его состав, на липидный обмен [14, 15].

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии достоверного эффекта мультиштаммового пробиотика на изменение концентрации ТМАО и состав микрофлоры кишечника, что согласуется с полученными ранее данными в других исследованиях.

При последовательном добавлении к терапии рифаксимина и пробиотика Флорасан Д отмечены благоприятные изменения липидного профиля: уменьшение уровня общего холестерина, проатерогенных ЛПНП, ЛПОНП, триглицеридов. При этом влияния на уровень ЛПВП и агрегацию тромбоцитов не обнаружено. В группе с дополнительной терапией пробиотиком и антибиотиком наблюдалась тенденция к снижению уровня ТМАО, что открывает перспективы для исследований с большим количеством участников и, вероятно, более длительным применением указанных средств.

Было отмечено изменение фекальной микрофлоры у пациентов с ИБС в сравнении с относительно здоровыми людьми, что выражается в увеличении количества бактерий — продуцентов триметиламина. Возможно, это обусловлено употреблением указанной группой пациентов большего количества продуктов, содержащих L-карнитин и холин. Соблюдение определенного рациона в течение длительного времени приводит к изменению состава кишечной микрофлоры соответственно потребностям организма, что в данном случае может отражаться в увеличении доли бактерий ТМА-продуцентов.

При попытке терапевтического воздействия на кишечный микробиом наблюдавшиеся изменения в составе фекальной микрофлоры были наиболее выражены после применения рифаксимина. Положительная динамика в виде снижения количества бактерий, потенциально продуцирующих ТМА (*Clostridiaceae, Peptostreptococcaceae, Lactobacillaceae*) тем не менее нивелировалась в конечной точке исследования. Ограниченный размер выборки не позволяет сделать однозначных выводов.

Настоящее исследование явилось пилотным и имеет ряд ограничений, например, небольшой объем выборки, отсутствие стандартизации диеты участников, не выполнялась оценка состава пристеночной микробиоты тонкой и толстой кишки ввиду. К ограничениям работы возможно отнести небольшую длительность приема рифаксимина и пробиотика Флорасан Д, можно предположить, что увеличение времени дополнительной терапии сможет повлиять на метаболизм кишечной микрофлоры. Также необходимо учесть, что продукцию триметиламина в кишечнике определяет не столько состав микробиома, сколько наличие у бактерий генов CutC/CutD, способствующих превращению холина и L-карнитина в данный метаболит. Изучение наличия указанных генов у бактерий в рамках настоящего исследования не выполнялось.

Таким образом, применение в качестве дополнительной терапии антибиотика рифаксимин и пробиотика Флорасан Д оказало умеренное положительное влияние на факторы риска прогрессирования атеросклероза и развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, такие как уменьшение выраженности дислипидемии, однако не наблюдалось эффекта в отношении влияния на агрегацию тромбоцитов, существенного изменения метаболизма и состава кишечной микрофлоры у пациентов с ИБС.

Ввиду сложности метаболических процессов в среде кишечной микробиоты необходимы эксперименты с регулированием состава и дозы пробиотических штаммов для оценки возможного влияния их на продукцию ТМАО у пациентов с клинически значимым атеросклерозом. Также увеличение длительности приема рифаксимина, возможно, будет способствовать изменению уровня ТМАО.

Литература / References

1. *Wilson D.P., Gidding S.S.* Atherosclerosis: Is a cure in sight? J Clin Lipidol. 2015;9(5 Suppl):S1–4. DOI: 10.1016/j.jacl.2015.06.010
2. *Fialho A., Kochhar G., Schenone A.L., Thota P., McCullough A.J., Shen B.* Association Between Small Intestinal Bacterial Overgrowth by Glucose Breath Test and Coronary Artery Disease. Dig Dis Sci. 2018;63(2):412–21. DOI: 10.1007/s10620-017-4828-z
3. *Wang Z., Klipfell E., Bennett B.J., Koeth R., Levison B.S.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. Nature. 2011;472:57–63.
4. *Romano K.A., Vivas E.I., Amador-Noguez D., Rey F.E.* Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. MBio. 2015;6(2):e02481. DOI: 10.1128/mBio.02481-14
5. *Tang W.H., Wang Z., Levison B.S., Koeth R.A., Britt E.B., Fu X. et al.* Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. New Eng J Med. 2013;368:1575–84.
6. *Collins H.L., Drazul-Schrader D., Sulpizio A.C., Koster P.D., Williamson Y., Adelman S.J., Owen K., Sanli T., Bellamine A.* L-Carnitine intake and high trimethylamine N-oxide plasma levels correlate with low aortic lesions in ApoE(-/-) transgenic mice expressing CETP. Atherosclerosis. 2016;244:29–37
7. *Кашух Е.А., Ивашкин В.Т.* Пробиотики, метаболизм и функциональное состояние сердечно-сосудистой системы. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол. 2016;26(1):8–14. [*Kashukh Y.A., Ivashkin V.T.* Probiotics, metabolism and the functional condition of cardio-vascular system. Russ J Gastroenterol Hepatol Coloproctol. 2016;26(1):8–14 (In Russ.)]. DOI: 10.22416/1382-4376-2016-26-1-8-14
8. *Qiu L., Yang D., Tao X., Yu J., Xiong H., Wei H.* Enterobacter aerogenes ZDY01 Attenuates Choline-Induced Trimethylamine N-Oxide Levels by Remodeling Gut Microbiota in Mice. J Microbiol Biotechnol. 2017;27(8):1491–9. DOI: 10.4014/jmb.1703.03039
9. *Tripolt N.J., Leber B., Triebl A., Köfeler H., Stadlbauer V., Sourij H.* Effect of Lactobacillus casei Shirota supplementation on trimethylamine-N-oxide levels in patients with metabolic syndrome: An open-label, randomized study. Atherosclerosis. 2015;242(1):141–4.
10. *Boutagy N.E., Neilson A.P., Osterberg K.L., Smithson A.T., Englund T.R., Davy B.M., Hulver M.W., Davy K.P.* Probiotic supplementation and trimethylamine-N-oxide production following a high-fat diet. Obesity (Silver Spring). 2015;23(12):2357–63.
11. *Ивашкин В.Т., Кашух Е.А.* Влияние потребления продуктов, содержащих L-карнитин и фосфатидилхолин, на продукцию проатерогенного метаболита триметиламин-N-оксида и кишечный микробиом у пациентов с ишемической болезнью сердца. Вопр. питания. 2019; 88(4): 25-33. doi: 10.24411/0042-8833-2019-10038 [*Ivashkin V.T., Kashukh Ye.A.* Impact of L-carnitine and phosphatidylcholine containing products on the proatherogenic metabolite TMAO production and gut microbiome changes in patients with coronary artery disease. Voprosy pitaniia [Problems of Nutrition]. 2019; 88 (4): 25-33. (In Russ.)]. doi: 10.24411/0042-8833-2019-10038
12. *Ponziani F.R., Zocco M.A., D'Aversa F., Pompili M., Gasbarrini A.* Eubiotic properties of rifaximin: Disruption of the traditional concepts in gut microbiota modulation. World J Gastroenterol. 2017;23(25):4491–9. DOI: 10.3748/wjg.v23.i25.4491
13. *Масленников Р.В., Дрига А.А., Ивашкин К.В., Жаркова М.С., Маевская М.В., Павлов Ч.С., Арсланян М.Г., Мусина Н.Б., Березина Е.Н., Ивашкин В.Т.* Роль синдрома избыточного бактериального роста и системного воспаления в патогенезе гемодинамических изменений у больных циррозом печени. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол. 2017;27(3):45–56. [*Maslennikov R.V., Driga A.A., Ivashkin K.V., Zharkova M.S., Mayevskaya M.V., Pavlov C.S., Arslanyan M.G., Musina N.B., Berezina Y.N., Ivashkin V.T.* Small intestinal bacterial overgrowth syndrome and systemic inflammation in pathogenesis of hemodynamic changes at liver cirrhosis. Russ J Gastroenterol Hepatol Coloproctol. 2017;27(3):45–56 (In Russ.)]. DOI: 10.22416/1382-4376-2017-27-3-45-56
14. *Rerksuppaphol S., Rerksuppaphol L.A.* Randomized Double-blind Controlled Trial of Lactobacillus acidophilus Plus Bifidobacterium bifidum versus Placebo in Patients with Hypercholesterolemia. J Clin Diagn Res. 2015;9(3):KC01–4. DOI: 10.7860/JCDR/2015/11867.5728
15. *Tomaro-Duchesneau C., Jones M.L., Shah D., Jain P., Saha S., Prakash S.* Cholesterol assimilation by Lactobacillus probiotic bacteria: an in vitro investigation. Biomed Res Int. 2014;2014:380316. DOI: 10.1155/2014/380316

Сведения об авторах

Кашух Екатерина Андреевна* — аспирант кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации.
Контактная информация: katrin1.10@mail.ru;
119991, г. Москва, ул. Погодинская, д. 1, стр. 1.
ORCID: https://orcid.org/ 0000-0002-1244-0201

Полуэктова Елена Александровна — доктор медицинских наук, профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации.
Контактная информация: polouektova@rambler.ru;
119991, г. Москва, ул. Погодинская, д. 1, стр. 1.

Кудрявцева Анна Викторовна — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной биологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук».
Контактная информация: risamoeba@rambler.ru;
119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Краснов Георгий Сергеевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук».
Контактная информация: gskrasnov@mail.ru;
119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Казей Василий Игоревич — кандидат биологических наук, директор лаборатории «Экзактэ Лабс».
Контактная информация: vasily.kazey@exactelabs.com;
117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2.

Соболев Павел Дмитриевич — сотрудник лаборатории «Экзактэ Лабс».
Контактная информация: pavel.sobolev@exactelabs.com;
117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2.

Гремякова Полина Владиславовна — сотрудник лаборатории «Экзактэ Лабс».
Контактная информация: polina.gremyakova@exactelabs.com;
117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2.

Ивашкин Владимир Трофимович — доктор медицинских наук, академик РАН, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации.
Контактная информация: kont087@mail.ru;
119991, г. Москва, ул. Погодинская, д. 1, стр. 1.

Information about the authors

Ekaterina A. Kashukh* — Post-graduate student, Propaedeutics of Internal Diseases Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
Contact information: katrin1.10@mail.ru;
19991, Moscow, Pogodinskaya str., 1, building 1.

Elena A. Poluektova — Dr. Sci. (Med.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
Contact information: polouektova@rambler.ru;
19991, Moscow, Pogodinskaya str., 1, building 1.

Anna V. Kudryavtseva — Cand. Sci. (Med.), Laboratory Head, Laboratory of Molecular Biology, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences.
Contact information: risamoeba@rambler.ru;
119991, Moscow, Vavilova str., 32.

Georgiy S. Krasnov — Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences.
Contact information: gskrasnov@mail.ru;
119991, Moscow, Vavilova str., 32.

Vasily I. Kazey — Cand. Sci. (Med.), Director, Exacte Labs.
Contact information: vasily.kazey@exactelabs.com;
117246, Moscow, Nauchny Proezd, 20, building 2.

Pavel D. Sobolev — Employee, Exacte Labs.
Contact information: pavel.sobolev@exactelabs.com;
117246, Moscow, Nauchny Proezd, 20, building 2.

Polina V. Gremyakova — Employee, Exacte Labs.
Contact information: polina.gremyakova@exactelabs.com;
117246, Moscow, Nauchny Proezd, 20, building 2.

Vladimir T. Ivashkin — Dr. Sci. (Med.), RAS Academician, Prof., Departmental Head, Propaedeutics of Internal Diseases Department, Medical Faculty, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).
Contact information: kont087@mail.ru;
119991, Moscow, Pogodinskaya str., 1, building 1.

Поступила: 25.04.2019 Принята после доработки: 25.05.2019 Опубликована: 30.08.2019
Submitted: 25.04.2019 Revised: 25.05.2019 Published: 30.08.2019

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author