

Исследование содержания маркеров микробиоты в цереброспинальной жидкости пациентов с рассеянным склерозом и радиологически изолированным синдромом

Бойко А.Н.^{1,2}, Мельников М.В.^{1,2}, Бойко О.В.^{1,2}, Кабаева А.Р.¹,
Омарова М.А.^{1,2}, Жиленкова О.Г.⁴, Затевалов А.М.⁵, Роговский В.С.^{1,3}

¹Отдел нейроиммунологии ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА России, Москва;

²кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики и ³кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии им. П.В. Сергеева ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

⁴лаборатория биологии бифидобактерий и ⁵лаборатория диагностики и профилактики инфекционных заболеваний ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва

¹Россия, 117997, Москва, улица Островитянова, 1, стр. 10; ^{2,3}Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1;

^{4,5}Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

Согласно многочисленным исследованиям, кишечная микробиота играет значительную роль в развитии рассеянного склероза (РС). Зачастую данные об изменениях кишечной микробиоты при РС во многом противоречивы. Наиболее распространенный подход при исследованиях кишечной микробиоты — секвенирование гена 16S рибосомальной РНК фекальной микробиоты. Указанный подход не дает картины состава всего микробиома организма. Также в настоящее время отсутствуют данные об исследованиях маркеров микробиоты в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) пациентов с РС и предрасполагающими состояниями.

Цель исследования — оценка уровня микробных маркеров в ЦСЖ пациентов с РС и радиологически изолированным синдромом (РИС).

Пациенты и методы. Оценка уровня микробных маркеров проводилась при помощи метода газовой хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ГХ-МС), у восьми пациентов с РС, пяти пациентов с РИС и семи лиц контрольной группы.

Результаты и обсуждение. Нами обнаружено увеличение микробной нагрузки у пациентов с РС, свидетельствующее о возможной ассоциации РС с полимикробной инфекцией. В частности, обнаружено увеличение содержания маркеров *Streptococcus*, а также тенденция к трехкратному увеличению содержания кампестерола, маркера кампестерол-продуцирующих микроорганизмов, в ЦСЖ пациентов с РС, по сравнению с контрольной группой (диагностические пункты, различные заболевания нервной системы не аутоиммунного или воспалительного характера, не острые состояния).

Заключение. Метод ГХ-МС микробных маркеров может применяться для оценки наличия микробных маркеров в ЦСЖ. В ЦСЖ пациентов с РС содержится повышенное количество различных микробных маркеров, что может свидетельствовать о возможной ассоциации РС с полимикробной инфекцией.

Ключевые слова: рассеянный склероз; микробиота; полимикробная инфекция; микробные маркеры.

Контакты: Владимир Станиславович Роговский; qwer555@mail.ru

Для ссылки: Бойко АН, Мельников МВ, Бойко ОВ и др. Исследование содержания маркеров микробиоты в цереброспинальной жидкости пациентов с рассеянным склерозом и радиологически изолированным синдромом. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2021;13(Прил. 1):27–30. DOI: 10.14412/2074-2711-2021-1S-27-30

Microbiota markers level in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and radiologically isolated syndrome

Boyko A.N.^{1,2}, Melnikov M.V.^{1,2}, Boyko O.V.^{1,2}, Kabaeva A.R.¹,
Omarova M.A.^{1,2}, Zhilenkova O.G.⁴, Zatevalov A.M.⁵, Rogovskii V.S.^{1,3}

¹Department of Neuroimmunology, Federal Center of Brain and Neurotechnologies, FMBA of Russia, Moscow;

²Department of Neurology, Neurosurgery, and Medical Genetics and ³P.V. Sergeev Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow;

⁴Laboratory of Bifidobacteria Biology and ⁵Laboratory of the Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian consumer protection agency (Rospotrebnadzor), Moscow

¹1, Ostrovityanov St., Build 10, Moscow 117997, Russia; ^{2,3}1, Ostrovityanov St., Moscow 117997, Russia;

^{4,5}10, Admirala Makarova St., Moscow 125212, Russia

According to numerous studies, gut microbiota plays a significant role in multiple sclerosis (MS) development. However, data on changes in the gut microbiota in MS is often contradictory. The most common approach in gut microbiota research is the 16S ribosomal RNA sequencing of fecal microbiota. However, such data do not reflect the composition of the entire body microbiota. There is also a lack of data on microbiota markers in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with MS and predisposing conditions.

Objective: to assess the level of microbial markers in the CSF of patients with MS and radiologically isolated syndrome (RIS).

Patients and methods. We used gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to evaluate microbial markers levels in eight patients with MS, five patients with RIS, and seven controls.

Results and discussion. We found an increase in microbial load in patients with MS, indicating a possible association of MS with polymicrobial infection. In particular, an increase in the content of *Streptococcus* markers was observed, as well as a tendency to a three-fold increase in the campesterol content (a marker of campesterol-producing microfungi) in the CSF of patients with MS, compared to the control group (diagnostic punctures, various diseases of the nervous system of a non-autoimmune or inflammatory nature, not acute states).

Conclusion. GC-MS of microbial markers can be used to assess the presence of microbial markers in the CSF. The CSF of patients with MS contains an increased amount of various microbial markers, which may indicate a possible association of MS with polymicrobial infection.

Keywords: multiple sclerosis; microbiota; polymicrobial infection; microbial markers.

Contact: Vladimir Stanislavovich Rogovskii; qwer555@mail.ru

For reference: Boyko AN, Melnikov MV, Boyko OV, et al. Microbiota markers level in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and radiologically isolated syndrome. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika* = *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2021;13(Suppl. 1):27–30. DOI: 10.14412/2074-2711-2021-1S-27-30

Рассеянный склероз (РС) — одно из наиболее часто встречающихся у пациентов молодого возраста воспалительных неврологических заболеваний. В 2016 г. в мире было выявлено более 2 млн случаев РС, что соответствует увеличению примерно на 10% с 1990 г. [1]. Этиология, а также патогенез РС во многом остаются неясными. Основная парадигма заключается в том, что этиология РС мультифакторна и включает в себя как генетическую предрасположенность, так и факторы окружающей среды, такие как инфекции, дефицит витамина D и курение [2]. Также предполагается значительная роль кишечной микробиоты в развитии РС [3]. Изменение кишечной микробиоты способно влиять на физиологию головного мозга, функционирование иммунной системы, а также может повышать вероятность аутоиммунных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) на мышиных моделях [4].

Эффекты изменений микробиоты могут проявляться на уровне всего организма. Состав кишечной микробиоты различается в зависимости от локализации на протяжении кишечника. Однако в большинстве исследований оценивается именно состав фекальной микробиоты с помощью анализа бактериальной 16S рибосомальной РНК (рРНК). При этом анализ фекальной микробиоты не дает полной картины состава микробиоты всего желудочно-кишечного тракта [5].

Один из альтернативных подходов к выявлению микробиологических нарушений в организме человека — анализ специфических маркеров микробиоты, составляющих широкий спектр жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов, разветвленными цепями и гидроксильными группами. В настоящее время известно более 250 таких маркеров (в организме человека их всего около 25). Они способны распределяться по всему организму и могут быть обнаружены даже в низких концентрациях при помощи метода газовой хроматографии с масс-селективным детектированием ионов (ГХ-МС) [6–8]. Данный метод использовался нами в настоящем исследовании. Высокая чувствительность метода ГХ-МС позволяет количественно обнаружить маркеры микробиоты в очень низких концентрациях, что делает возможным анализ состава цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), который тесно связан с изменениями в ЦНС.

Цель исследования — оценка уровня микробных маркеров в ЦСЖ пациентов с РС и радиологически изолированным синдромом (РИС).

Пациенты и методы. В настоящей работе мы выполнили первоначальную оценку маркеров микробиоты в ЦСЖ

пациентов с впервые диагностированным РС по критериям McDonald 2017 г. (восемь образцов), пациентов с РИС (пять образцов) и лиц контрольной группы (различные заболевания нервной системы не аутоиммунного или воспалительного характера, не острые состояния — семь диагностических образцов) с использованием ГХ-МС [6]. Все образцы ЦСЖ были собраны для диагностических целей в соответствии со стандартным протоколом и одобрением местного этического комитета. Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Пациенты с диагнозом РС имели ремиттирующее течение заболевания, диагноз был подтвержден данными магнитно-резонансной томографии, наличием характерных олигоклональных полос в ЦСЖ. Средний возраст больных с РС составлял 28,5 года, пациентов с РИС — 25,3 года, преобладали женщины (8 из 13 случаев). Тяжесть состояния пациентов с РС была невысокая — в пределах 0–1,5 балла по Расширенной шкале оценки степени инвалидизации (Expanded Disability Status Scale, EDSS). Все пациенты не получали препараты, изменяющие течение РС, а также у всех не было глюкокортикоидной терапии в течение не менее чем 1 мес до забора ЦСЖ. Лица с РИС не получали никакого лечения.

Анализ микробных маркеров заключается в прямом извлечении ионов жирных кислот, альдегидов и стероидов из ЦСЖ, их хроматографическом разделении и последующем масс-спектрометрическом обнаружении [9]. Для анализа образец ЦСЖ в количестве 80 мкл подсушивали в термостате при 80 °С с добавлением 80 мкл метанола для ускорения сушки. Анализ был проведен согласно методике, описанной Г.А. Осиповым и соавт. [10]. Жирные кислоты высвобождались в виде метиловых эфиров и диметилацеталей в результате метанолиза. Полученные продукты экстрагируются и подвергаются дериватизации для улучшения хроматографической подвижности гидроксикислот и стероидов. На этапе пробоподготовки в пробу вводится внутренний стандарт (дейтерированная тридекановая кислота), по которому в дальнейшем происходит количественный расчет. Аналит в количестве 2 мкл вводили в систему ГХ-МС Maestro 7820 А с масс-селективным детектором (детектор серии 5975 Agilent Technologies, США) [10]. Масс-спектрометр работал в режиме селективного сканирования ионов, регистрируя 37 спектральных линий (масс-ионов). Алгоритм определения масс-спектральных параметров биологического образца может обнаруживать около 200 известных микробных маркеров, что достаточно для выявления и ана-

Концентрация микробных маркеров в ЦСЖ пациентов с РС, РИС и лиц контрольной группы, нмоль/г

Microbial markers concentration in CSF of patients with MS, RIS, and controls, nmol/g

Маркер	Предполагаемый источник	Контрольная группа	Пациенты с РС	Пациенты с РИС
i12	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0,0003 [0,0002; 0,0007]	0,0009 [0,0005; 0,001]*	0,0005 [0,0005; 0,0011]
2h12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,0003 [0,0002; 0,0007]	0,0012 [0,0008; 0,0023]*	0,0005 [0,0004; 0,0005]
15:1d9	<i>Clostridium propionicum</i>	0,0005 [0,0003; 0,0014]	0,0026 [0,0017; 0,0027]*	0,0005 [0,0005; 0,0017]
19cyc	<i>Enterococcus</i>	0,0003 [0,0002; 0,0006]	0,0011 [0,0004; 0,0055]*	0,0005 [0,0003; 0,001]
20:1d11	<i>Streptococcus</i> (anaerobic)	0,0007 [0,0007; 0,0014]	0,0018 [0,0016; 0,0032]*	0,0013 [0,0013; 0,0022]
Campesterol	Кампестерол-продуцирующие микрогрибы	0,0061 [0,0027; 0,0131]	0,0186 [0,0038; 0,0262]	0,0154 [0,0107; 0,0162]
14:1d7	<i>Kingella</i>	0,0003 [0,0002; 0,0006]	0,0012 [0,0009; 0,0017]*	0,0008 [0,0008; 0,001]*
20:1	<i>Actinomyces</i>	0,0013 [0,0009; 0,0041]	0,004 [0,0032; 0,0136]*	0,0013 [0,0013; 0,0017]

Примечания. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Ме [25-й; 75-й перцентили]). * – различия между РС (или РИС) и контрольной группой статистически значимы ($p < 0,05$). Маркеры: i12 – iso-dodecanoic; 2h12 – 2-hydroxy-lauric; 15:1d9 – cis-9-pentadecanoic; 19cyc – cyclopropyl nonadecanoic; 20:1d11 – cis-11-eicosenoic; 14:1d7 – 7-tetradecenoic; 20:1 – eicosenoic [6, 8].

лиза более 170 таксонов клинически значимых микроорганизмов на уровне рода или вида. Точный подбор временных интервалов и оптимизированный набор детектируемых ионов позволяют избирательно регистрировать минорные компоненты микробного происхождения на фоне подавляющих сигналов молекул биоматериала (биоматрицы) и химических соединений, содержащихся в средствах отбора. Это позволяет устранить эффекты хроматографического наложения пиков [11].

Для определения статистической значимости использовался U-тест Манна–Уитни. Значения $p < 0,05$ принимались как статистически значимые.

Результаты. Концентрации изучаемых маркеров микробиоты в ЦСЖ имеют относительно низкие значения (поскольку мы изучали пациентов без острых состояний), однако при этом мы обнаружили признаки значимого увеличения микробной нагрузки у пациентов с РС по сравнению с контрольной группой. Наиболее существенные различия (в 3 раза и более) между группой больных РС и контрольной группой наблюдались по содержанию маркеров *Clostridium propionicum*, *Enterococcus*, синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*), *Kingella*, кампестерол-продуцирующих микрогрибов (тенденция к увеличению в 3 раза), маркеров *Streptococcus* (анаэробных), *Peptostreptococcus anaerobius*, *Actinomyces* (см. таблицу).

В данном исследовании ЦСЖ, полученная от пациентов с РИС, также была исследована на содержание маркеров микробиоты. Было обнаружено, что содержание маркеров *Streptococcus*, *Kingella* и кампестерол-продуцирующих микрогрибов у лиц с РИС имеет тенденцию быть промежуточным по сравнению с группой с РС и контрольной группой: выше, чем в контрольной группе, и ниже, чем в группе с РС.

Обсуждение. Полученные нами результаты в определенной степени согласуются с опубликованными данными по определению состава микробиоты путем секвенирования бактериальных генов 16S субъединицы рРНК. Например, было показано повышенное относительное содержание *Streptococcus* у пациентов с РС с высокой активностью

заболевания и повышенным содержанием Th17-лимфоцитов в желудочно-кишечном тракте [12].

Мы также обнаружили тенденцию к увеличению содержания маркеров микрогрибов в ЦСЖ пациентов с РС по сравнению с контрольной группой. В недавнем исследовании было показано наличие грибковой инфекции в ткани ЦНС пациентов с РС [13]. В нервной ткани пациентов с РС также были обнаружены бактериальные структуры, в то время как в нервной ткани лиц контрольной группы не было обнаружено бактериальных структур. Таким образом, возможна ассоциация РС и полимикробной инфекции [13].

Стоит отметить, что многие препараты, применяемые при РС, обладают противомикробным и противогрибковым действием. В частности, диметилфумарат обладает фунгицидной активностью, которая может вносить значительный вклад в его общую фармакологическую активность при РС [14, 15].

Заключение. Таким образом, нами показано достоверное увеличение содержания маркеров микробиоты в ЦСЖ пациентов с РС по сравнению с контрольной группой. При этом стоит отметить невозможность на данный момент определить какую-либо единственную группу микроорганизмов, ассоциированную с РС в наибольшей степени. Однако полученные данные позволяют предположить справедливость гипотезы о важности полимикробного инфицирования в развитии РС. Дальнейшие исследования профиля маркеров микробиоты при РС и predisposing состояниях необходимы для установления характера причинной связи между РС, полимикробной инфекцией и иммунным ответом на нее. Настоящие результаты являются предварительными; требуются дальнейшие исследования на выборках увеличенного объема.

Благодарность

Авторы благодарят Г.А. Осипова, автора используемой методики по анализу микробных маркеров, за консультацию по поводу анализа полученных данных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- GBD 2016 Multiple Sclerosis Collaborators. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019 Mar;18(3):269–85. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30443-5. Epub 2019 Jan 21.
- Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J*. Apr-Jun 2017;19(1):1–10. doi: 10.22074/cellj.2016.4867. Epub 2016 Dec 21.
- Кожиева МХ, Мельников МВ, Роговский ВС и др. Кишечная микробиота человека и рассеянный склероз. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017;117(10):11–9. doi: 10.17116/jnevro201711710211-19 [Kozhieva MKh, Mel'nikov MV, Rogovsky VS, et al. Gut human microbiota and multiple sclerosis. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii im. S.S. Korsakova*. 2017;117(10-2):11–9. doi: 10.17116/jnevro201711710211-19 (In Russ.)].
- Reynders T, Devolder L, Valles-Colomer M, et al. Gut microbiome variation is associated to Multiple Sclerosis phenotypic subtypes. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020 Apr;7(4):406–19. doi: 10.1002/acn3.51004. Epub 2020 Mar 12.
- Yan W, Sun C, Zheng J, et al. Efficacy of Fecal Sampling as a Gut Proxy in the Study of Chicken Gut Microbiota. *Front Microbiol*. 2019 Sep 13;10:2126. doi: 10.3389/fmicb.2019.02126. eCollection 2019.
- Osipov GA, Verkhovtseva NV. Study of human microecology by mass spectrometry of microbial markers. *Benef Microbes*. 2011 Mar;2(1):63–78. doi: 10.3920/BM2010.0017
- Yang Y, Misra BB, Liang L, et al. Integrated microbiome and metabolome analysis reveals a novel interplay between commensal bacteria and metabolites in colorectal cancer. *Theranostics*. 2019 May 31;9(14):4101–14. doi: 10.7150/thno.35186. eCollection 2019.
- Ktsoyan ZA, Beloborodova NV, Sedrakyan AM, et al. Profiles of Microbial Fatty Acids in the Human Metabolome are Disease-Specific. *Front Microbiol*. 2011 Jan 20;1:148. doi: 10.3389/fmicb.2010.00148. eCollection 2010.
- Осипов ГА. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах. В кн.: *Химический анализ в медицинской диагностике*. Москва: Наука; 2010. [Osipov GA. Chromato-mass spectrometric analysis of microorganisms and communities in clinical samples for infections and dysbiosis. In: *Khimicheskii analiz v meditsinskoy diagnostike* [Chemical analysis in medical diagnostics]. Moscow: Nauka; 2010 (In Russ.)].
- Osipov GA, Boiko NB, Fedosova NF, et al. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces. *Microb Ecol Health Dis*. 2009;21(3–4):159–71.
- Баранов ВМ, Осипов ГА, Мухамедиева ЛН и др. Оценка микроэкологического статуса человека методом хромато-масс-спектрометрии. Новая медицинская технология МЗ РФ № НЮ-40006. 2009. [Baranov VM, Osipov GA, Mukhamediyeva LN, et al. *Otsenka mikroekologicheskogo statusa cheloveka metodom khromatomass-spektrometrii. Novaya meditsinskaya tekhnologiya MZ RF № NYU-40006*. 2009 [Assessment of the microecological status of a person by chromatomass spectrometry. New medical technology of the Ministry of Health of the Russian Federation No. NYU-40006. 2009] (In Russ.)].
- Cosorich I, Dalla-Costa G, Sorini C, et al. High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. *Sci Adv*. 2017 Jul 12;3(7):e1700492. doi: 10.1126/sciadv.1700492. eCollection 2017 Jul.
- Alonso R, Fernandez-Fernandez AM, Pisa D, Carrasco L. Multiple sclerosis and mixed microbial infections. Direct identification of fungi and bacteria in nervous tissue. *Neurobiol Dis*. 2018 Sep;117:42–61. doi: 10.1016/j.nbd.2018.05.022. Epub 2018 Jun 1.
- Wang HH, Sun DW, Kuang R. Inhibition of *Escherichia coli* by dimethyl fumarate. *Int J Food Microbiol*. 2001 Apr 11;65(1–2):125–30. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00504-3
- Ma N, Wu Y, Xie F, et al. Dimethyl fumarate reduces the risk of mycotoxins via improving intestinal barrier and microbiota. *Oncotarget*. 2017 Jul 4;8(27):44625–38. doi: 10.18632/oncotarget.17886

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

4.07.2021/17.08.2021/22.08.2021

Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Бойко А.Н. <https://orcid.org/0000-0002-2975-4151>,
 Мельников М.В. <https://orcid.org/0000-0001-6880-3668>
 Бойко О.В. <https://orcid.org/0000-0001-715305617>
 Кабаева А.Р. <https://orcid.org/0000-0002-0982-8520>
 Омарова М.А. <https://orcid.org/0000-0002-6744-2191>
 Жиленкова О.Г. <https://orcid.org/0000-0003-3206-6648>
 Затевалов А.М. <https://orcid.org/0000-0002-1460-4361>
 Роговский В.С. <https://orcid.org/0000-0002-3682-6571>