

Чеботкевич В.Н.¹, Ковалёв А.А.², Стома И.О.², Грицаев С.В.¹, Бурyleв В.В.¹, Кулешова А.В.¹, Киселева Е.Е.¹, Стижак Н.П.¹, Кострома И.И.¹, Кайтанджан Е.И.¹, Бессмельцев С.С.¹

¹ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, Российская Федерация
²УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ ПРИ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Резюме. Высокодозная химиотерапия с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) остается стандартом лечения множественной миеломы (ММ). К сожалению, ТГСК часто связана с развитием тяжелой токсичности, желудочно-кишечного мукозита и инфекционными осложнениями. С 1970-х годов кишечная микробиота и ее метаболиты были признаны ключевыми медиаторами исходов аллогенной ТГСК, включая реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и общую выживаемость (ОВ). Однако меньше известно о роли микробиома при аутологичной ТГСК (аутоТГСК). В нашем исследовании изучены изменения микробиома кишечника у 15 взрослых пациентов (9 женщин, 6 мужчин, в возрасте 54–66

лет) с множественной миеломой (ММ), перенесших аутоТГСК. Выявлено достоверное ($p=0,0215$) снижение индекса разнообразия микробиома после аутоТГСК. Обнаружено значительное снижение представителей Actinobacteria ($p=0,0348$) на уровне типа. Значимых изменений в уровне других исследованных таксономических типов Bacteroides, Firmicutes, Proteobacteria не обнаружено. Также выявлено, что состав микробиоты связан с частотой и тяжестью посттрансплантационной токсичности (особенно с тошнотой и рвотой) и фебрильной нейтропенией.

Ключевые слова: множественная миелома, микробиом, аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Chebotkevich V.N.¹, Kovalev A.A.², Stoma I.O.², Gritsaev S.V.¹, Burylev V.V.¹, Kuleshova A.V.¹, Kiseleva E.E.¹, Stizhak N. P.¹, Kostroma I.I.¹, Kaytanjan E.I.¹, Bessmeltsev S.S.¹

¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation
²Gomel state medical university, Gomel, Republic of Belarus

GASTROINTESTINAL MICROBIOME CHANGES IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA DURING THE COURSE OF AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Abstract. The concept of high-dose chemotherapy followed by transplantation of hematopoietic stem cells (HSCT) remains the standard for treating multiple myeloma (MM). Unfortunately HSCT is frequently associated with severe toxicities, including graft-versus-host disease (GVHD), gastrointestinal mucositis, and opportunistic infections. Since the 1970s, the microbiome specifically, intestinal microbiota and their metabolites have been recognized as key mediators of allogeneic HSCT outcomes, including GVHD and overall survival (OS). Despite the rapidly accumulating evidence, that the fecal bacteriome plays a key role in allogeneic HSCT, less is known about its role in the context of autologous HSCT. We studied the changes in gastrointestinal bacteriome in 15 adult patients (9 women, 6 men, aged

54–66 years) with multiple myeloma, who underwent autologous HSCT. A significant ($p=0,0215$) decrease in the microbiota diversity index was revealed in the period after HSCT. We observed a continuous decrease in gastrointestinal microbiome diversity, until 35 days after HSCT. We found the significant decrease in relation to the Actinobacteria phylum ($p=0,0348$). No significant changes in the level of other studied phyla Bacteroides, Firmicutes, Proteobacteria were found. Also we found that microbiome composition present is associated with the incidence and severity of post-transplant toxicity (especially nausea and vomiting), and culture-negative neutropenic fever.

Keywords: multiple myeloma, microbiome, autologous hematopoietic stem cells transplantation.

ВВЕДЕНИЕ

Множественная миелома составляет 1% среди всех онкологических заболеваний, но 10–13% от общего числа гемобластозов и 2% летальных исходов среди всех злокачественных опухолей приходится на пациентов с ММ [1]. Высокодозная химиотерапия с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) остается стандартом лечения множественной миеломы.

Появление новых лекарственных средств, таких как иммуномодулирующие препараты, ингибиторы протеасом и моноклональные антитела, не исключили аутоТГСК и сохранили ее важную роль в лечении больных ММ [2]. Однако значение микробиома при аутоТГСК изучено крайне недостаточно [3]. Между тем нарушение баланса кишечной микробиоты (дисбиотические состояния) приводят к развитию различных нарушений, в частности воспалительных заболеваний кишечника.

Считается, что ведущим фактором, способствующим воз-

никновению нарушений микробиома, является антибактериальная терапия [4].

Целью нашего исследования явилось изучение изменений микробиома кишечника до аутоТГСК и после ее выполнения, у пациентов с множественной миеломой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было обследовано 15 пациентов с ММ в возрасте 48–67 лет (медиана 60 лет), госпитализированных в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России в период с февраля 2020 по февраль 2021 года для выполнения аутоТГСК. Режим кондиционирования состоял из высокодозной химиотерапии, включавший мелфалан в дозе 200 мг/м². Протокол исследования включал сбор и низкотемпературное замораживание образцов кала, полученных от больных до проведения аутоТГСК и в разные сроки от 7 до 35 дней после ее проведения. Среди критериев включения пациентов в исследование было наличие ≥ 3 последовательных секвенированных биологических образцов у одного пациента. После экстракции и очищения ДНК в каждом из биологических образцов выполнялась ПЦР-

Таблица 1. Демографическая и клиническая характеристика пациентов

Количество пациентов	15
Возраст (годы)	60 (48-67)
Пол	
Мужской	6
Женский	9
Почечная недостаточность	
есть	3
нет	12
Заболевание	
Множественная миелома	15
Подтип	
IgGλ	5
IgGκ	6
IgAλ	0
IgAκ	1
БД κ	3
Стадии MM (по B. Durie, S. Salmon)	
IA	1
IIA	2
IIIA	10
IIIB	2
Приживление нейтрофилов (день)	12 (10-16)
Фебрильная нейтропения	4
Инфекции	
Бактериемия	0
Легочные осложнения	0
Инфекции мочевыводящих путей	0

амплификация V5 региона гена 16S рРНК с помощью модифицированных универсальных бактериальных праймеров. Очищенные ПЦР-продукты секвенировали с помощью платформы MiSeq Illumina. Филогенетическая классификация до видового уровня выполнялась на основании базы данных Illumina. Учитывали возраст, пол пациентов, состояние функции почек, стадию MM (по B. Durie, S. Salmon) (табл.1). Приживление нейтрофилов после АТГСК определялось как первые 3 дня подряд с абсолютным числом нейтрофилов ≥ 500 клеток/мм³ ($0,5 \times 10^9$ /л).

Всем пациентам проводили стандартную профилактику инфекций флуконазолом и ацикловиром. При развитии фебрильной нейтропении больные получали антибиотики, обладающие активностью в том числе в отношении нозокомиальных грамотрицательных патогенов. Оценку токсичности осуществляли в соответствии с общими терминологическими критериями нежелательных явлений (СТСАЕ) Национального института рака, версия 4.03 [5].

СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

Статистический анализ данных реализован в среде программирования для статистической обработки данных R. Диаграммы размаха построены с помощью пакета ggpubr. Сравнение независимых групп осуществлялось с помощью непараметрических критериев Краскела-Уоллиса (с последующим апостериорным попарным сравнением) и Манна-Уитни. Сравнение связанных групп проводилось с помощью критериев Фридмана (с последующим апостериорным попарным сравнением и Уилкоксона).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Время приживления нейтрофилов составило 12 дней

(диапазон от 10 до 16 дней). Фебрильная нейтропения наблюдалась у 4 пациентов. Желудочно-кишечная токсичность 2–3 степени выявлена в 4 (27%) случаях. Всего за время наблюдения было собрано и секвенировано 58 образцов биологического материала.

На первом этапе исследования был изучен индекс альфа разнообразия микробиома (индекс Шеннона) в разные периоды аутоТГСК. Выявлено достоверное ($p=0,0215$) снижение индекса разнообразия в период после проведения аутоТГСК (рис.1).

Надо отметить, что влияние АутоТГСК достаточно подробно изучено именно в контексте микробиома. В частности, было показано достоверное снижение индекса биологического разнообразия микробиома (индекс Шеннона) у пациентов в динамике при проведении аллоТГСК, при этом выявлен негативный эффект антибиотиков и химиопрепаратов на многообразие микробиома. Кроме того, установлено, что эффект разнообразия микробиома является независимым фактором риска трансплантат-ассоциированной летальности в течение нескольких лет после аллоТГСК. Наши данные показывают, что достоверное снижение индекса биологического разнообразия микробиома (индекс Шеннона) наблюдается и при аутоТГСК. Анализ результатов изучения индекса разнообразия у отдельных больных (рис. 2) показал, что в 6 случаях наблюдалось снижение индекса Шеннона. В трех случаях данный показатель не изменился, и только у одного больного наблюдалось повышение индекса разнообразия в ранние сроки после ТГСК.

Известно, что разнообразный, высокодифференцированный кишечный микробиом имеет защитный эффект против ряда инфекций, включая способность предотвращать колонизацию кишечника высокоустойчивыми патогенами [6-7]. Применение антибиотиков является основным фактором, способствующим обеднению микробиоты и развитию дисбиотических состояний. Антибиотики способствуют отбору полирезистентных энтеробактерий. Среди полирезистентных бактерий весомую долю составляют энтеробактерии с продукцией β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Колонизацию кишечника энтеробактериями с продукцией БЛРС надо рассматривать как предиктор развития бактериемий, вызванных тем же видом бактерий. В одном из наших исследований [8] энтеробактерии с продукцией БЛРС были выявлены в 24% культур, выделенных у иммуносупрессированных онкогематологических пациентов, причем у всех 3 штаммов, выделенных из крови. Выявление в кишечнике энтеробактерий с продукцией БЛРС, вероятно следует рассценивать как предиктор развития бактериемий, вызванных тем же видом бактерий [9].

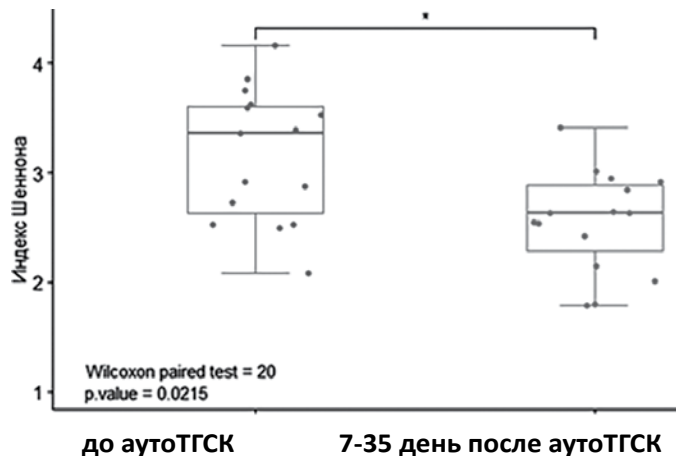


Рисунок 1. Индекс разнообразия микробиоты кишечника до и после проведения аутоТГСК

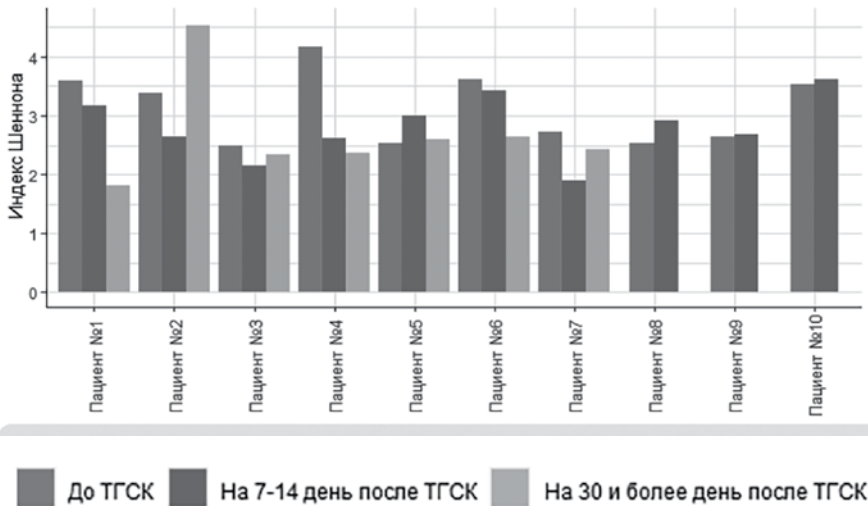


Рисунок 2. Индекс разнообразия микробиоты кишечника у пациентов до ТГСК и после ее проведения.

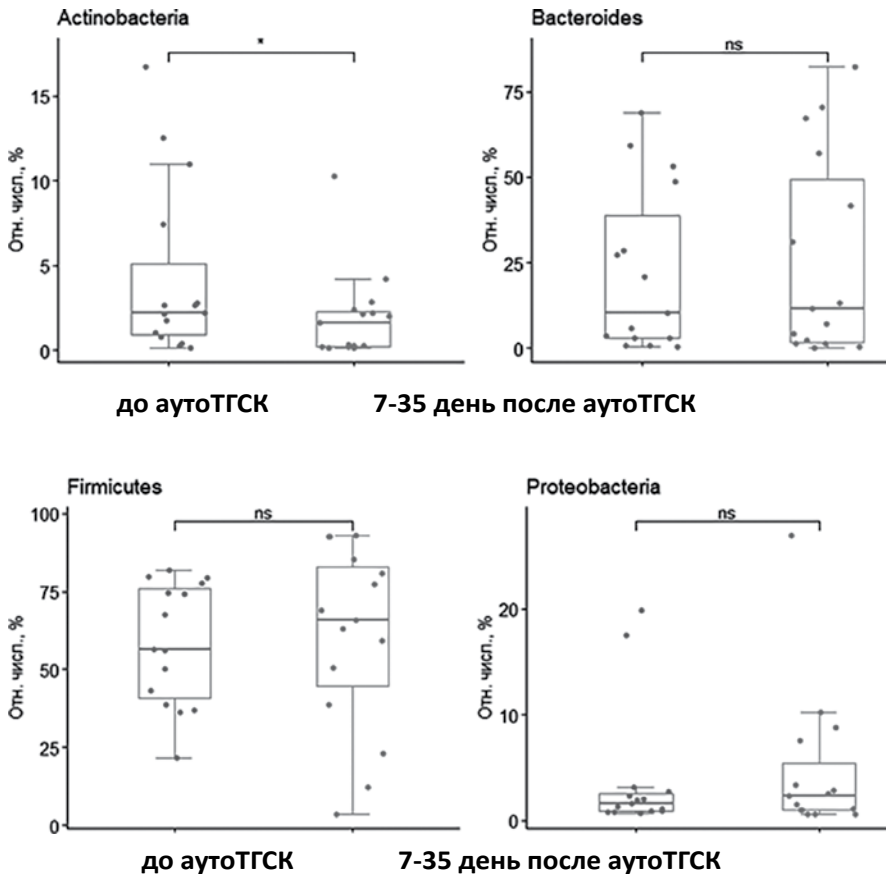


Рисунок 3. Изменение относительной численности фекальных бактериомов на уровне типа. Здесь показаны 4 самых многочисленных типа. Столбцы на левом графике - до аутоТГСК, на правом - на 7-35 день после аутоТГСК. * - значимые различия между группами.

Далее нами были проведены исследования изменения отдельных бактериальных типов в разные периоды после трансплантации с помощью парного теста Уилкоксона. Изучены особенности изменения состава микробиоты на уровне типа до и после аутоТГСК (рис. 3). Установлено, что изменение микробиоты на уровне типа выявлено только в отношении Actinobacteria (Wilcoxon paired test = 18, $p=0,0184$). Достоверных изменений на уровне типов Bacteroides, Firmicutes, Proteobacteria не обнаружено.

Мы исследовали также возможную связь изменения микробиоты кишечника и развития желудочно-кишечной токсичности. На наш взгляд, использование высоких доз мелфалана и противомикробных препаратов у пациентов, подвергавшихся аутоТГСК, приводит к микробному дисбактериозу желудочно-кишечного тракта, что значительно снижает качество жизни больных. Результаты этой серии исследований представлены на рисунке 4. Показано, что при 2 степени токсичности в микробиоте наблюдалось достоверное снижение Bacteroides (Mann-Whitney U test=16, $p=0,044$) по сравнению с группой больных, у которых выявлена 1 степень токсичности.

Нами проведено также исследование изменений кишечной микробиоты при развитии фебрильной нейтропении (рис.5)

Показано, что при развитии фебрильной нейтропении наблюдается достоверное (Mann-Whitney U test=38, $p=0,04$) снижение типа Proteobacteria. Это может быть связано с немедленным назначением эмпирической антибактериальной терапии при фебрильной нейтропении, направленной в первую очередь на грамотрицательные возбудители, что существенно снижает плотность Proteobacteria в кишечном микробиоме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Состояние микробиоты у больных гемобластозами привлекает пристальное внимание исследователей с начала 80-х годов прошлого века. Исследованиями последнего десятилетия показана ключевая роль микробиоты при аллогенной ТГСК у больных гемобластомами. Вместе с тем следует отметить, что его значение при отдельных видах гемобластозов, в частности, при множественной миеломе, имеет свои особенности и требует дальнейшего изучения [4]. Кроме того исследования микробиома касаются в основном аллогенной трансплантации. Слабее изучена его роль при аутологичной ТГСК.

Наше исследование показало, что состав микробиоты в ранние сроки после трансплантации коррелирует с тяжестью желудочно-кишечной токсичности (оцениваемой по частоте эпизодов тош-

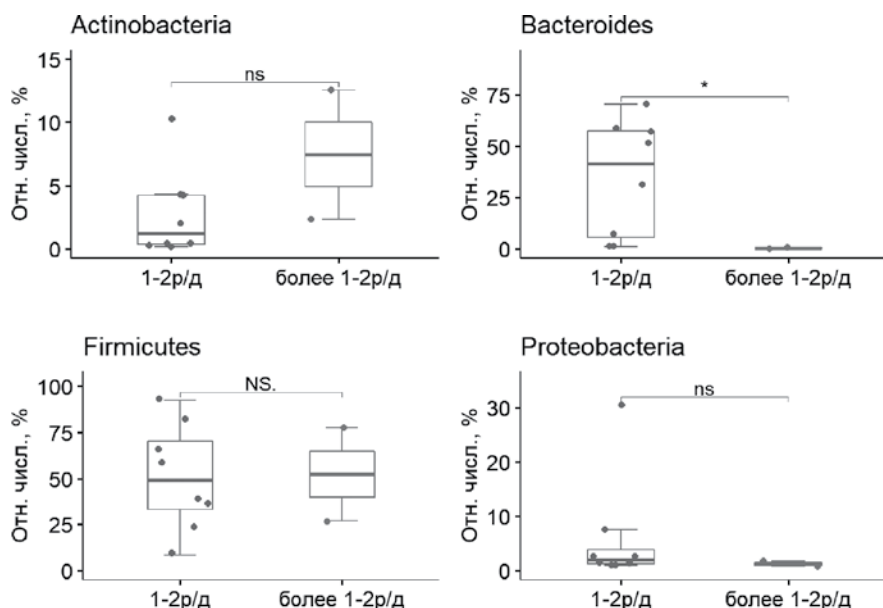


Рисунок 4. Изменение относительной численности фекальных бактериомов при 1 степени и 2 степени желудочно-кишечной токсичности

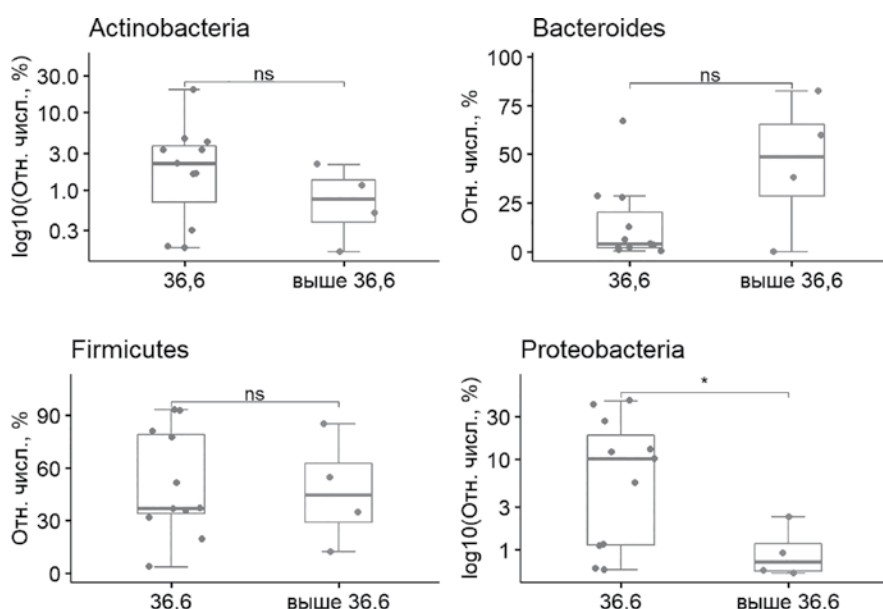


Рисунок 5. Блок-схемы изменений относительной численности фекальных бактериомов на уровне типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К. М. Множественная миелома: руководство для врачей: //М: МК, 2016.– 504 с.
2. Named, A. et al. Current status of autologous stem cell transplantation for multiple myeloma // Blood Cancer J. – 2019.– Vol. 9, № 4. - P:44. doi: 10.1038/s41408-019- 0205-209
3. El Jurdi, N. et al. Gastrointestinal microbiome and mycobiome changes during autologous transplantation for multiple myeloma: results of a prospective pilot study // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2019. – Vol. 25. – P. 1511-1519.
4. Чеботкевич, В.Н. и др. Микробиом человека и его роль в гемопоэзе и в развитии множественной миеломы // Вестник гематологии. – 2021. – Т. XVII. – № 3. – С. 4-10.
5. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Version 4.03 / U.S.Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute. – 2010 – 78 p.
6. Стома, И. О. Микробиом человека: монография / И. О. Стома, И. А. Карпов; Белорус. гос. мед. ун-т, Мин. науч.-практ. центр хирургии, трансплантологии и гематологии. - Минск: ДокторДизайн, 2018. - 122 с.
7. Стома И.О. Микробиом в медицине: руководство для врачей/ И. О. Стома.– Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020.– 320с.
8. Chebotkevich, V.N. et al. Infectious complications in multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation // Cellular Therapy and Transplantation. – 2021. – Vol. 10, № 1. - P. 63-68.
9. Кулешова, А.В. и др. Микробиом кишечника и его роль в развитии инфекционных осложнений больных гемобластозами // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2020. – № 1-2. – С. 24.

ноты и рвоты). Так, при второй степени токсичности (частота эпизодов тошноты и рвоты 3-5 в день) по сравнению с первой степенью (частота эпизодов 1-2 раза в день) наблюдалось значимое ($p=0,044$) снижение типа Bacteroides в кишечной микробиоте. Эти данные подтверждаются наблюдениями El Jurdi N. et al. [4]. В частности, описана более низкая токсичность [5] у пациентов ММ с высоким содержанием типа Bacteroides в кишечной микробиоте в ранние сроки после проведения АутоТГСК. Нами установлена также взаимосвязь состава кишечной микробиоты и случаев фебрильной нейтропении при АутоТГСК у пациентов с ММ, что подтверждает ранее опубликованные результаты [4]. Кроме того, выявлено значимое ($p=0.04$) снижение типа Proteobacteria при фебрильной нейтропении при ММ, что может быть объяснено ранними эффектами эмпирической антибактериальной терапии на микробиоту кишечника.

Таким образом, несмотря на сравнительно небольшое количество обследованных пациентов в данном пилотном клиническом исследовании, нами установлена достоверная связь изменений микробиоты с желудочно-кишечной токсичностью и развитием фебрильной нейтропении.

Конфликты интересов отсутствует
Источник финансирования
 Исследование не имело источника финансирования

Вклад авторов
 Концепция и дизайн: все авторы
 Сбор и обработка данных: все авторы
 Предоставление материалов исследования: все авторы
 Анализ и интерпретация: все авторы
 Подготовка рукописи: все авторы
 Окончательное одобрение рукописи: все авторы