

АННОТАЦИЯ

**диссертационной работы на тему: «Мультимиксные исследования взаимосвязи кишечной микробиоты и иммунной системы при тяжелых коронавирусных инфекциях», представленной на соискание ученой степени доктора философии (PhD) по образовательной программе 8D05101-«Биология»
Мусабай Қаракөз Нуржанқызы**

Актуальность темы исследования. Изучение взаимосвязи между кишечной микробиотой и иммунной системой при тяжёлой коронавирусной инфекции является одним из актуальных направлений современной биомедицинской науки. Установлено, что кишечная микробиота играет важную роль в регуляции иммунного ответа, а её дисбиоз связан с усилением воспалительных процессов, а также с развитием различных заболеваний.

Коронавирусная инфекция характеризуется дисрегуляцией иммунной системы и развитием цитокинового шторма, обусловленного чрезмерной продукцией провоспалительных цитокинов. Последние исследования показывают, что кишечная микробиота может оказывать влияние на модуляцию иммунного ответа при COVID-19. Кишечный микробиом не только играет важную роль в поддержании иммунного гомеостаза, но и способен взаимодействовать с дыхательной системой через «ось кишечник–лёгкие», а также потенциально влиять на экспрессию рецептора ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2). Дисбаланс кишечной микробиоты может влиять на тяжесть заболевания, клинические исходы и эффективность вакцинации.

В настоящее время исследования кишечного микробиома при коронавирусной инфекции проведены в европейских и азиатских популяциях, однако в странах Центральной Азии, включая Казахстан, данное направление изучено недостаточно. В связи с этим комплексное исследование взаимосвязи кишечной микробиоты и иммунной системы при тяжёлой коронавирусной инфекции позволит углубить понимание патогенеза заболевания, выявить потенциальные биомаркеры и способствовать совершенствованию терапевтических стратегий.

Целью исследования является изучить взаимосвязь между кишечной микробиотой и иммунной системой при тяжёлой коронавирусной инфекции с использованием мультимиксных подходов.

Задачи исследования:

1. Изучить цитокиновый профиль при коронавирусной инфекции в сравнении со здоровым состоянием.
2. Определить состав кишечного микробиома при коронавирусной инфекции в сравнении со здоровым состоянием.

3. Определить изменения цитокинового профиля в постковидном периоде.
4. Изучить изменения состава кишечного микробиома в постковидном периоде.
5. Определить взаимосвязь между показателями кишечного микробиома и параметрами иммунного статуса при коронавирусной инфекции.
6. Определить биомаркеры, ассоциированные с тяжестью течения коронавирусной инфекции.

Объектом исследования являются биологические образцы человека — периферическая кровь и фекальные образцы, собранные у 60 пациентов с тяжёлой формой коронавирусной инфекции, а также у здоровой контрольной группы, включающей 51 человек.

Дизайн исследования. Проспективное продольное исследование в динамике.

Методы исследования:

- Выделение ДНК из фекальных образцов и оценка её концентрации;
- Секвенирование 16S рРНК для анализа микробиоты;
- Мультиплексный анализ цитокинового профиля крови;
- Статистическая обработка данных и биоинформационный анализ результатов.

Новизна исследования. Впервые в популяции Республики Казахстан проведена корреляционная оценка иммунного ответа и состояния кишечной микробиоты при тяжёлом течении коронавирусной инфекции.

Впервые определяются уровни и динамика цитокинов в течение одного года при перенесённой тяжёлой форме COVID-19.

Впервые в динамике изучаются особенности кишечной микробиоты при коронавирусной инфекции.

Практическая значимость. Результаты исследования позволят выявить взаимосвязи между иммунным ответом организма и состоянием кишечной микробиоты при тяжёлом течении COVID-19.

Определение динамики уровней цитокинов в течение года при тяжёлом течении COVID-19 даст понимание особенностей иммунного ответа на инфекцию.

Полученные данные о цитокиновых и микробиомных биомаркерах пополнят мировую базу знаний о механизмах коронавирусной инфекции.

Исследование способствует выявлению новых биомаркеров и паттернов взаимодействия иммунной системы и кишечной микробиоты, что внесёт вклад в фундаментальные исследования иммунологии и микробиологии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У пациентов, перенёвших коронавирусную инфекцию, в остром периоде заболевания было установлено повышение уровней провоспалительных цитокинов и снижение уровней противовоспалительных цитокинов. Цитокины MDC, EGF, IP-10, IL-15 и IL-8 были определены как наиболее значимые показатели.

2. По результатам исследования кишечного микробиома между группами были выявлены статистически значимые различия: у исследуемой группы преобладали оппортунистические бактерии видов *Prevotella 9*, *Lachnospirales* и *Bacteroides*, тогда как количество *Haemophilus*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Prevotella_7*, *Neisseria* и *Streptococcus* было снижено.

3. В постковидный период по иммунным маркерам была выявлена высокая концентрация IL-6 и пониженное содержание IL-1RA. В динамике микробиома кишечника также наблюдались значительные изменения: в течение одного года количество условно-патогенных бактерий снижалось, а количество комменсальных бактерий увеличивалось.

4. При коронавирусной инфекции был выявлен статистически значимый вид комменсальных бактерий — *Eubacterium hallii*. Установлено, что при снижении количества *E. hallii* также снижается экспрессия противовоспалительных цитокинов, препятствующих развитию цитокинового шторма.

Выводы исследования:

1. У исследуемой группы по сравнению с контрольной было выявлено значительное повышение провоспалительных цитокинов: IL-1A (FDR = 0,03047), FLT-3L (FDR = 0,00302), IL-2 (FDR = 0,03924), IL-6 (FDR = 0,00048), IL-9 (FDR = 0,00778), MCP-3 (FDR = 0,01850), IFN γ (FDR = 0,06763) и IL-17A (FDR = 0,00012). Среди противовоспалительных цитокинов наблюдалось повышение уровней IL-5 (FDR = 0,09064), EGF (FDR = 0,00012), эотаксина (FDR = 0,00012), IL-4 (FDR = 0,00001), IL-12 (p40) (FDR = 0,00082), MDC (FDR = 0,05648), MCP-1 и IL-15 (FDR = 0,00004). При изучении значимости маркеров изменений наиболее важными показателями среди хемокинов оказались MDC, фактор роста EGF и IP-10, а среди интерлейкинов — IL-15 и IL-8.

2. В анализе структуры кишечного микробиома альфа-разнообразие по индексам Observed ($p = 0,005$; $d = 0,59$) и Chao1 ($p = 0,05$; $d = 0,53$), а также бета-разнообразие по индексу Bray-Curtis ($R = 0,759$; $p = 0,0001$) показали статистически значимые различия между группами. Результаты линейного дискриминантного анализа (LEfSe) показали, что в исследуемой группе преобладали оппортунистические бактерии *Prevotella 9*, *Lachnospirales* и *Bacteroides*, тогда как *Haemophilus*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Prevotella_7*, *Neisseria* и *Streptococcus* были снижены. В

контрольной группе, напротив, преобладали *Prevotella 7*, *Haemophilus* и *Veilonella*.

3. В постковидный период при сравнении 6-месячного и годовичного сроков были выявлены статистически значимые изменения иммунных маркеров: снижение уровней эотаксина ($p = 0,01619$), MCP-1 ($p = 0,00794$), MDC ($p = 0,00169$), MIP-1a ($p = 0,00072$), TGF α ($p = 0,00111$), TNF α ($p = 0,06176$) и VEGF-A ($p = 0,02385$); при этом уровни FGF-2 ($p = 0,01133$), G-CSF ($p = 0,01133$) и IL-15 ($p = 0,03340$) повышались после выздоровления. IL-6 оставался повышенным по сравнению с контрольной группой в течение 6 месяцев после острого периода, тогда как IL-1RA сохранял пониженную экспрессию полгода.

4. В динамике альфа-разнообразия по индексам Observed и Chao1 показало статистически значимые различия между точками T1 и T5 ($p = 0,005$), T2 и T5 ($p = 0,005$), а также T4 и T5 ($p = 0,005$). В анализе структуры кишечного микробиома выявлено, что уровни *Prevotella 9* и *Bacteroides* снижались от точки T1 к T5, в то время как *Parabacteroides*, *Eubacterium hallii group* и *Agathobacter* статистически значимо увеличивались за этот период.

5. В остром и постковидном периоде COVID-19 статистически значимым видом комменсальных бактерий был определён *Eubacterium hallii*. Количество *E. hallii* статистически значимо увеличивалось в динамике, однако в остром периоде его уровень был крайне низким. *E. hallii* показал отрицательную корреляцию с цитокинами MCP-1, MCP-1b, IFN- α 2, эотаксином, IP-10, EGF-2, TNF, G-CSF, а также с интерлейкинами IL-7, IL-10 и IL-12.

6. При построении прогностической модели установлено, что развитие тяжёлого течения COVID-19 связано с наличием избыточного веса ($p = 0,05$) и артериальной гипертензии ($p = 0,05$). Кроме того, повышенные уровни интерлейкинов IL-15, IL-6 и IL-8, а также сниженный уровень IL-1RA были определены как маркеры, позволяющие предсказать тяжесть течения заболевания.

Практические рекомендации:

1. Данные об иммунных и микробиомных маркерах сохранены в международной научно-технической базе данных и дополняют мировые сведения о генетической предрасположенности к изменениям кишечного микробиома и иммунных маркеров при COVID-19 в Центральной Азии. База данных генов NCBI: идентификатор — SUB13279337, дата публикации — 20 июня 2024 года.

2. Пациентам, перенёсшим коронавирусную инфекцию, рекомендуется соблюдать принципы разнообразного и сбалансированного питания с целью поддержания функционального равновесия кишечного микробиома.

3. В рамках выявления биомаркеров, связанных со степенью

тяжести заболевания при инфекции SARS-CoV-2, рекомендуется рассматривать бактерию *Eubacterium hallii* в качестве потенциального маркера кишечной микробиоты.

Личный вклад диссертанта. Написание обзора литературы, сбор биообразцов, проведение лабораторных методов, интерпретация результатов. Анализ и обобщение полученных данных, их статистическая обработка. Сбор научных материалов и литературных данных, подготовка научных статей и тезисов для публикации. Представление основных положений исследования на международных конференциях.

Апробация исследовательской работы. Основные результаты и положения исследования были представлены на следующих конференциях:

– Республиканская конференция «Здоровье органов пищеварения — здоровье всего организма! Основы канцеропревенции», 2 июня 2023 года, Астана, Казахстан.

– Научно-практическая конференция «Современные тренды в лабораторной медицине для клинической практики», 21–22 сентября 2024 года, Астана, Казахстан.

По материалам диссертационной работы опубликовано 6 печатных работ, 1 статья в издании с перцентилем 83 (Q1) по CiteScore в базе Scopus, 1 статья в издании с перцентилем 66 (Q2), 1 статья в издании с перцентилем 49 (Q3), 1 статья в издании, индексируемом в РИНЦ, 2 тезиса опубликованы в сборниках международных конференций. Получено 1 авторское свидетельство.

Внедрение результатов работы. Результаты работы прошли апробацию и были внедрены в подразделениях медицинского диагностического центра и в ГКП на ПХВ «Городская поликлиника №2» акимата города Астаны.

Связь данной работы с научно-исследовательскими проектами. Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке проектов Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан: BR10965164 «Оценка влияния клинических, функциональных, иммунологических и генетических факторов на тяжесть течения коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 и постковидного синдрома» (2021–2023 гг.) и AP23487014 «Микробиом-опосредованные взаимодействия при атеросклерозе: белки семейств SESN и APO, цитокины и клинические проявления».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, трех основных разделов, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем работы составляет 90 печатных страниц, включающих 9 таблиц и 33 рисунка. В списке использованной литературы приведено 217 источников.