

Костюк С.А., Гаврусев А.А., Алкаралех А.Х., Полуян О.С.
Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

МИКРОБНЫЙ СОСТАВ ЛОХАНОЧНОЙ МОЧИ И МОЧИ ИЗ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ У ЖЕНЩИН ПРИ ОСТРОМ ОБСТРУКТИВНОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ НА ФОНЕ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ

Введение. Микробиом мочевыводящих путей играет важную роль в поддержании здоровья за счет воздействия на гомеостаз, он важен для поддержания целостности уротелия и предотвращения инфекции мочевыводящих путей (ИМП), а также для регуляции нейротрансмиссии и укрепления местной иммунной функции, содействия правильному функционированию иммунной системы [1, 2]. В настоящее время состав, характеристики и роль микробиоты мочевыводящих путей все еще до конца не изучены [3, 4]. Дисбактериоз мочевых путей микробиома, в том числе чрезмерный рост ранее существовавшего микроорганизма, может привести к ИМП. Острый пиелонефрит характеризуется этиологической мультифакторностью. Насколько нам известно, ранее не проводилось исследований по сравнительному анализу у женщин микробного состава пузырной мочи и мочи, полученной при катетеризации из лоханки почек, при остром обструктивном пиелонефрите на фоне мочекаменной болезни, чтобы определить, существующие различия в микробиоме мочи.

Цель. Установить особенности микробного состава мочи при остром обструктивном пиелонефрите у женщин с акцентом на инфекции мочевыводящих путей при разном способе получения биологического материала для исследования – пузырной мочи и мочи, полученной при катетеризации из лоханки почек.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе кафедры урологии и нефрологии с курсом повышения квалификации и переподготовки и научно-исследовательской лаборатории Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины УО «Белорусского государственного медицинского университета» в период 2024-2025 гг. Оно было одобрено университетским комитетом по этике. Устное и письменное информированное согласие было предоставлено всеми пациентами до включения в это исследование. Всего исследование были включены 35 пациентов женского пола. Основную группу составили 25 женщин с острым обструктивным пиелонефритом на фоне мочекаменной болезни. Пациенты, которые принимали антибиотики или пробиотики в течение последних 8 недель, также были исключены. Десять человек практически здоровых лиц вошли в контрольную группу, ни у кого из них не было в анамнезе ИМП или заболеваний мочевыделительной системы.

Материалом для исследования явились образцы пузырной и лоханочной мочи. Образцы свежей мочи объемом 50 мл у всех участников были собраны путем стерильного катетерного дренажа с соблюдением строгих асептических процедур и обработаны тем же методом после взятия пробы, заморожены в стерильном контейнере при -80°C в течение 12 часов после взятия пробы. Чистая средняя порция мочи пациентов была получена в стерильном устройстве для сбора мочи. 50 мл мочи были перенесены в Vacuette. (greiner-bioone®) после десятиминутного центрифугирования в 4000 г/мин. Супернатант отбрасывали, осадок растворяли в 1000 мкл TriFast™ (peqlab®) и замораживали при -20°C .

Выделение ДНК проводили фенол-хлороформной экстракцией при комнатной температуре, добавив 200 мкл хлороформа и центрифугированием при 12000 г в течение 5 минут. Водная фаза была исключена из исследования из-за преципитации РНК. Далее было добавлено 100 мкл этанола и после многократного переворачивания пробирки ДНК осаждали центрифугированием при 2000 г в течение 15 минут при 4°C . Затем осадок ДНК промывали 0,1 моль цитрата натрия и 10% этанолом путем повторной инкубации при комнатной температуре в течение 30 минут. После двух промываний в 75% этаноле осадок ДНК сушили на воздухе и повторно растворяли в 8 ммоль NaOH. Полученную солибилизованную ДНК нейтрализовали буферным раствором HEPES.

ПЦР-амплификация. Фрагмент гена 16S рРНК был амплифицирован методом ПЦР в режиме реального времени, используя область переменной 3 (V3) и переменной 4 (V4) гена 16S рРНК. Прямой праймер и обратный праймер содержал выступающие нуклеотидные последовательности адаптера. Область V3–V4 16S рибосомальной РНК из выделенных образцов ДНК амплифицировали с помощью универсального прямого праймера (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') и обратного праймера

(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') с одним мультиплексным идентификатором и адаптерами. Для исключения загрязнения во время амплификации обрабатывали ПЦР-отрицательный контроль без матричной ДНК. Затем параллельно проводили ПЦР-амплификацию в 25 мкл 2 × Phanta Max Master Mix, 2 мкл прямого праймера (10 мкМ), 2 мкл обратного праймера (10 мкМ), 50 мкл ddH₂O и матричной ДНК. ПЦР проводили при следующих условиях: 95 °C в течение 3 мин; 25 циклов 95 °C в течение 30 с, 55 °C в течение 30 с и 72 °C в течение 30 с; и окончательное удлинение при 72 °C в течение 5 мин. Очищенная ДНК (2,5 мкл), выделенная из осадка мочи, была использована для исследования. Выявление ДНК условно-патогенной флоры проводили с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Аэробы», ДНК *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* – с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Баквагиноз» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ).

Статистический анализ. Была определена приверженность распределению Гаусса с помощью теста Колмогорова – Смирнова. Нормально распределенные данные описывались как средние значения ± стандартные отклонения. Качественные переменные описывались с помощью чисел и процентов, а сравнивали с использованием точного критерия Фишера. Двустороннее р-значение значение 0,05 считалось статистически значимым. Данные были проанализированы с помощью SPSS® Statistics (версия 21 для Mac).

Результаты и обсуждение. Поскольку несколько наших предыдущих исследований не смогли подтвердить наличие бактерий в 100% мочи проб, первым шагом была проверка существования бактериального микробиома мочи в нашей исследуемой популяции. Поэтому была выделена ДНК мочи и проведено выявление ДНК бактериальной ДНК в моче пациентов по наличию 16S рРНК.

Мы наблюдали резкий сдвиг в сторону увеличения микробного разнообразия в моче у пациентов основной группы с острым обструктивным пиелонефритом, однако особенности состава микробиома у данной группы пациентов в моче мочевого пузыря и лоханочной мочи были схожи. Микробиота лоханочной и пузырной мочи при остром обструктивном пиелонефрите вследствие камня мочеточника у пациентов была идентична как по спектру, так и по уровням бактериурии различных таксонов микроорганизмов. При этом стерильные образцы мочи отсутствовали, у пациентов были выявлены микробные ассоциации: в 92,0±8,42% случаев (n=23) – аэробно-анаэробные, в 4,0±3,92% случаев (n=1) – аэробно-аэробные. Из 60 верифицированных в моче уропатогенов среди представителей семейства Enterobacteriaceae преобладали *E. coli* (52,0±6,73%, n=13), а среди грампозитивной флоры – *Enterococcus* spp. (12,0±3,41%, n=3), более чем в 90,0% случаев им сопутствовали неклостридиальные анаэробы. Таким образом, впервые в клинических условиях доказано, что микробиота лоханочной мочи при остром обструктивном пиелонефрите достоверно не отличается от микробиоты мочи из мочевого пузыря,

Известно, что бактерии не только существуют в мочевыводящих путях здоровых людей, но и играют важную роль в поддержании микрoэкологического баланса. Наше исследование показало, что наиболее распространенными микроорганизмами

в моче женщин при остром обструктивном пиелонефрите являются *E. coli*, за которыми следуют грамположительные кокки и другие энтеробактерии. Микроорганизмы, которые содержатся в моче, могут участвовать в метаболизме токсинов, которые выводятся через почки. В связи с этим выявление условно-патогенных микроорганизмов с уровнем концентрации $>10^3$ ГЭ/мл из мочи деблокированной лоханки или из мочевого пузыря при обструктивном пиелонефрите однозначно говорит об их возможной причастности к развитию острого пиелонефрита. У большинства пациентов острый пиелонефрит развивается вследствие восходящей инфекции. После заражения периретральной области патогеном из прямой кишки бактерии сначала прикрепляются к эпителиальным клеткам слизистой оболочки уретры и в конечном итоге перемещаются в мочевой пузырь. Оттуда бактерии должны преодолеть естественную защиту хозяина и размножиться достаточно быстро, чтобы продвинуться по мочеточнику к почкам. Инфекции мочевыводящих путей чаще встречаются у женщин из-за их более коротких уретр, гормональных изменений и близости уретры к анусу. Любая обструкция оттока мочи может привести к неполному опорожнению мочевого пузыря и застою мочи, что позволяет бактериям размножаться без вымывания. Обструкция мочевыводящих путей, вызванная камнем в почках, может также привести к потенциально смертельной и опасной форме острого пиелонефрита, известной как обструктивный пиелонефрит.

Другой отличительной особенностью у женщин при остром обструктивном пиелонефрите явилось обнаружение в мочевой моче ДНК *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, при этом отсутствовала статистически значимая разница ($p=0,61$) с присутствием данных микробных ДНК в лоханочной моче этих пациенток. Также у женщин с диагнозом «острый обструктивный пиелонефрит» в моче мочевого пузыря и в лоханочной моче были обнаружены лактобактерии, составившие 33,0% от всех выявляемых микроорганизмов, тогда как в моче практически здоровых женщин их содержание составило 70,0% от общего количества «микробных» находок. Возможно, что лактобактерии подавляют пролиферацию уропатогенных микробов аналогично тому, как это происходит во влагалище и уретре. Эти бактерии обладают сложными геномными инструментами для сдерживания роста потенциальных бактериальных конкурентов в устойчивом состоянии и в динамическом равновесии. Наряду с конкуренцией за питательные вещества, их геномный функционал гарантирует, что ни один из других микробных обитателей не сможет зарастать. Среди этих геномных инструментов есть различные быстрые отвечающие опероны, кодирующие поликетид-синтазы, циклические липопептидсинтазы и экстрарибосомальный пептид синтазы, генерирующие биологически высокоактивные соединения, ответственные за конкурентное вмешательство и антагонистическое взаимодействие. Они производятся в сбалансированный режим поддерживает здоровую микробиоту мочи у женщин в условиях гомеостаза. Поэтому вполне вероятно, что нарушение физиологического количества и разнообразия микробиота приводит к ИМП. Предполагается, что представители нормальной микрофлоры мочи обеспечивают регуляцию гомеостаза мочевого тракта. Бактерии могут быть источниками нейротрансмиттеров, влияющих

на нервную систему, они могут нейтрализовать потенциальные патогены, разрушать молекулы, влиять на межклеточные контакты в эпителии, влиять на развитие и дифференцировку клеток. Нормальные симбионты мочи могут предотвращать адгезию патогенных микробов к клеткам, стимулировать развитие защитных систем в эпителии и иммунной системе.

Заключение. При остром обструктивном пиелонефрите у женщин наблюдается увеличения микробного разнообразия в моче по сравнению с группой контроля, однако особенности состава микробиома у данной группы пациентов в моче мочевого пузыря и лоханочной мочи были схожи и не имеют статистически значимых различий. Результаты нашего исследования показывают, что в развитии острого обструкционного пиелонефрита у женщин ведущую роль играют представители семейства *Enterobacteriaceae*, в частности *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., а также *Staphylococcus aureus* и вирусы семейства *Herpesviridae*. Особую актуальность в будущих научных исследованиях приобретают изучение молекулярных механизмов вирулентности уропатогенных микробов и звеньев патогенеза инфекционного процесса, а также особенности экспрессии различных молекул, участвующих в ответной реакции на внедрение микробов, связанные с генетическими полиморфизмами, которые смогут объяснить наследственную предрасположенность к уроинфекции и индивидуальные особенности развития воспаления у пациентов.

Литература

1. The Numan Microbiome Project Consortium. Структура, функция и разнообразие здорового микробиома человека // *Nature*. – 2012. – Vol. 486. – P. 207–221.
2. Lloyd-Price J., Mahurkar A., Rahnavard G. et al. Штаммы, функции и динамика в расширенном проекте человеческого микробиома / Lloyd-Price J., Mahurkar A., Rahnavard G. et al. // *Nature*. – 2017. – Vol. 550. – P. 61–66.
3. Алкаралех А.Х., Костюк С.А., Гаврусев А.А. Микробные сообщества, колонизирующие мочевыводящие пути и мочу: новый взгляд на проблему. Сообщение 1 / Алкаралех А.Х., Костюк С.А., Гаврусев А.А. // *Медицинские новости*. – 2024. – № 11 (362). – С. 11–16.
4. Алкаралех А.Х., Костюк С.А., Гаврусев А.А. Микробные сообщества, колонизирующие мочевыводящие пути и мочу: новый взгляд на проблему. Сообщение 1 / Алкаралех А.Х., Костюк С.А., Гаврусев А.А. // *Медицинские новости*. – 2024. – № 12 (363). – С. 9–14.