

## Оценка связи между микробиотой кишечника и маркерами фиброза миокарда у пациентов с хронической сердечной недостаточностью и сохраненной фракцией выброса левого желудочка

Кабурова А. Н.<sup>1</sup>, Драпкина О. М.<sup>1</sup>, Юдин С. М.<sup>2</sup>, Корецкий С. Н.<sup>1</sup>, Макаров В. В.<sup>2</sup>, Покровская М. С.<sup>1</sup>, Краевой С. А.<sup>2</sup>, Шойбонов Б. Б.<sup>1</sup>, Ефимова И. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России. Москва; <sup>2</sup>ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства. Москва, Россия

**Цель.** Изучить связь представителей родов кишечной микробиоты (КМ) с сывороточными маркерами фиброза миокарда у пациентов с хронической сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса (ХСН-сФВ).

**Материал и методы.** Состав кишечной микробиоты среди 42 пациентов с ХСН-сФВ в возрасте 67,0 [64,0; 71,5] лет (57,1% мужчин) был оценен методом секвенирования 16S рибосомальной рибонуклеиновой кислоты. Количественное определение маркеров фиброза миокарда осуществлялось методом иммуноферментного анализа. Проведен корреляционный и многомерный регрессионный анализ связей относительной представленности кишечных бактерий с концентрацией С-концевого пропептида проколлагена I типа (PICP) и N-концевого пропептида проколлагена III типа (PIIINP).

**Результаты.** Концентрация PICP составила 918,0 [700,0;1032,8] пг/мл, концентрация PIIINP — 6,2±2,7 пг/мл. Корреляционный анализ выявил прямую связь между относительной представленностью *Allisonella* и PICP ( $r=0,32$ ), а также *Blautia*, *Enterobacteriaceae* (*unclassified*) и PIIINP ( $r=0,37$  и  $r=0,32$ ),  $p<0,05$ . Обратный характер связи был определен для относительной представленности родов *Ruminococcus* ( $r=-0,37$ ), *Ruminococcaceae* (*unclassified*) ( $r=-0,31$ ), *Gemmiger* ( $r=-0,35$ ) и PICP, а также *Bilophila* и PIIICP ( $r=-0,34$ ). Многомерный регрессионный анализ установил (нормализованный коэффициент указан в скобках), что представленность *Butyrivimonas* (0,27) и *Blautia* (0,35) прямо связана с концентрацией PICP, тогда как представленность рода *Intestinimonas* (-0,23) демонстрировала обратную ассоциацию с уровнем маркера. Представленность большинства родов имела обратную связь с PIIINP: *Atopobium* (-0,25), *Cellulosilyticum* (-0,31), *Solobacterium*

(-0,32), *Turicibacter* (-0,47), *Bilophila* (-0,30). Прямой характер ассоциации с концентрацией PIIINP продемонстрирован для относительной представленности *Paraprevotella* (0,32) и *Desulfovibrio* (0,28). Значение  $p$  для всех ассоциаций  $<0,05$ .

**Заключение.** Относительная представленность ряда родов КМ пациентов с ХСН-сФВ ассоциирована с маркерами фиброза PICP и PIIINP. Полученные результаты позволяют углубить представления о связи между КМ и патогенетическими механизмами развития ХСН-сФВ, что может стать шагом к пониманию роли КМ в прогрессировании диастолической дисфункции левого желудочка и обоснованием для проведения будущих исследований.

**Ключевые слова:** кишечная микробиота, хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса, диастолическая дисфункция, фиброз миокарда.

**Отношения и деятельность:** нет.

Поступила 10/03-2021

Получена рецензия 23/03-2021

Принята к публикации 15/06-2021



**Для цитирования:** Кабурова А. Н., Драпкина О. М., Юдин С. М., Корецкий С. Н., Макаров В. В., Покровская М. С., Краевой С. А., Шойбонов Б. Б., Ефимова И. А. Оценка связи между микробиотой кишечника и маркерами фиброза миокарда у пациентов с хронической сердечной недостаточностью и сохраненной фракцией выброса левого желудочка. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(4):2834. doi:10.15829/1728-8800-2021-2834

### Relationship between gut microbiota and markers of myocardial fibrosis in with chronic heart failure with preserved ejection fraction

Kaburova A. N.<sup>1</sup>, Drapkina O. M.<sup>1</sup>, Yudin S. M.<sup>2</sup>, Koretsky S. N.<sup>1</sup>, Makarov V. V.<sup>2</sup>, Pokrovskaya M. S.<sup>1</sup>, Kraevoy S. A.<sup>2</sup>, Shoybonov B. B.<sup>1</sup>, Efimova I. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine. Moscow; <sup>2</sup>Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks. Moscow, Russia

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: anastasiakaburova@mail.ru

Тел.: +7 (903) 150-13-12

[Кабурова А. Н.\* — м.н.с. отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения, ORCID: 0000-0001-7717-1455, Драпкина О. М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор, ORCID: 0000-0002-4453-8430, Юдин С. М. — д.м.н., профессор, генеральный директор, ORCID: 0000-0002-7942-8004, Корецкий С. Н. — с.н.с. отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения, ORCID: 0000-0001-6009-5775, Макаров В. В. — начальник отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью, ORCID: 0000-0001-9495-0266, Покровская М. С. — к.б.н., руководитель лаборатории «Банк биологического материала», ORCID: 0000-0001-6985-7131, Краевой С. А. — д.м.н., первый заместитель генерального директора, ORCID: 0000-0003-1775-9235, Шойбонов Б. Б. — к.х.н., в.н.с. отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения, ORCID: 0000-0001-7061-6706, Ефимова И. А. — лаборант исследователь, ORCID: 0000-0002-3081-8415].

**Aim.** To study the relationship of gut microbiota (GM) with serum myocardial fibrosis markers in patients with heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF).

**Material and methods.** The composition of the gut microbiota among 42 patients with HFpEF aged 67,0 [64,0; 71,5] years (men, 57,1%) was assessed by 16S ribosomal ribonucleic acid sequencing. The quantitative determination of myocardial fibrosis markers was carried out by enzyme-linked immunosorbent assay. Correlation and multivariate regression analysis of relationships between the relative abundance of intestinal bacteria and the concentration of the procollagen type I carboxy-terminal propeptide (PICP) and N-terminal propeptide of procollagen type III (PIIINP) was carried out.

**Results.** The PICP and PIIINP concentrations were 918,0 [700,0; 1032,8] pg/ml and 6,2±2,7 pg/ml, respectively. Correlation analysis revealed a direct relationship between the relative abundance of *Allisonella* and PICP ( $r=0,32$ ), as well as *Blautia*, *Enterobacteriaceae* (*unclassified*) and PIIINP ( $r=0,37$  and  $r=0,32$ ),  $p<0,05$ . The inverse relationship was determined for the relative abundance of the genera *Ruminococcus* ( $r=-0,37$ ), *Ruminococcaceae* (*unclassified*) ( $r=-0,31$ ), *Gemmiger* ( $r=(-0,35)$ ) and PICP, as well as *Bilophila* and PIIINP ( $r=(-0,34)$ ). Multivariate regression found (normalized coefficient in parentheses) that the abundance of *Butyrivibrio* (0,27) и *Blautia* (0,35) was directly related to the PICP levels, while the abundance of the genus *Intestinimonas* ((-0,23) showed an inverse association with the marker level. The abundance of most genera had an inverse relationship with PIIINP: *Atopobium* (-0,25), *Cellulosilyticum* (-0,31), *Solobacterium* (-0,32), *Turicibacter* (-0,47), *Bilophila* (-0,30). The directness of the association with PIIINP concentration was demonstrated for the relative abundance of *Paraprevotella* (0,32) и *Desulfovibrio* (0,28). The p-value for all associations is  $<0,05$ .

**Conclusion.** The relative abundance of GM genera in patients with HFpEF is associated with fibrosis markers (PICP and PIIINP). The results obtained make it possible to deepen the understanding of the relationship between GM and pathogenesis of HFpEF, which may become a step towards understanding the GM role in the progression of left ventricular diastolic dysfunction and rationale for future studies.

**Keywords:** gut microbiota, heart failure with preserved ejection fraction, diastolic dysfunction, myocardial fibrosis.

**Relationships and Activities:** none.

Kaburova A. N.\* ORCID: 0000-0001-7717-1455, Drapkina O. M. ORCID: 0000-0002-4453-8430, Yudin S. M. ORCID: 0000-0002-7942-8004, Koretsky S. N. ORCID: 0000-0001-6009-5775, Makarov V. V. ORCID: 0000-0001-9495-0266, Pokrovskaya M. S. ORCID: 0000-0001-6985-7131, Kraevoy S. A. ORCID: 0000-0003-1775-9235, Shoybonov B. B. ORCID: 0000-0001-7061-6706, Efimova I. A. ORCID: 0000-0002-3081-8415.

\*Corresponding author: anastasiakaburova@mail.ru

**Received:** 10/03-2021

**Revision Received:** 23/03-2021

**Accepted:** 15/06-2021

**For citation:** Kaburova A. N., Drapkina O. M., Yudin S. M., Koretsky S. N., Makarov V. V., Pokrovskaya M. S., Kraevoy S. A., Shoybonov B. B., Efimova I. A. Relationship between gut microbiota and markers of myocardial fibrosis in with chronic heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(4):2834. (In Russ.) doi:10.15829/1728-8800-2021-2834

АГ — артериальная гипертония, КМ — кишечная микробиота, КЦЖК — короткоцепочечная жирная кислота, ЛЖ — левый желудочек, ЛПС — липополисахарид, СН — сердечная недостаточность, рРНК — рибосомальная рибонуклеиновая кислота, ФП — фибрилляция предсердий, ХСН-сФВ — хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса, ИЛ — интерлейкин, NT-proBNP — N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида, PICP — С-концевой пропептид проколлагена I типа, PIIINP — N-концевой пропептид проколлагена III типа, E — максимальная скорость потока в фазу раннего наполнения, e' — максимальная скорость движения фиброзного кольца митрального клапана в раннюю диастолу, E/e' — их отношение.

## Введение

Хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса (ХСН-сФВ) левого желудочка (ЛЖ) представляет собой клинический синдром, в основе которого лежит диастолическая дисфункция ЛЖ. Ее детерминантами являются нарушение процессов расслабления и повышение жесткости ткани миокарда, что было подтверждено в инвазивном исследовании гемодинамики у этой группы больных [1]. Согласно современной парадигме развития ХСН-сФВ, часто сопутствующие данному синдрому коморбидные состояния индуцируют развитие системного воспаления, в результате чего эндотелий коронарных микрососудов приобретает способность продуцировать активные формы кислорода, что снижает биодоступность оксида азота для окружающих кардиомиоцитов. Итогом этого становится рост пассивного напряжения миокарда и увеличение степени гипертрофии ЛЖ. Кроме того, воспаление коронарных микрососудов способствует субэндотелиальной миграции лейкоцитов, приводя к активации фибробластов и накоплению коллагена в экстрацеллюлярном матриксе

миокарда [2]. Эндомиокардиальная биопсия демонстрирует увеличение содержания фибриллярного коллагена в популяции больных с ХСН-сФВ в сравнении с пациентами из групп артериальной гипертонии (АГ) и контроля [3]. Среди множества молекул, которые были предложены в качестве биомаркеров фиброза миокарда, большинство не продемонстрировало однозначной связи с гистологической оценкой фиброза по материалам эндомиокардиальной биопсии за исключением С-концевого пропептида проколлагена I типа (PICP) и N-концевого пропептида проколлагена III типа (PIIINP) [4]. Кроме того, повышенный сывороточный уровень PICP был связан с высокой смертностью пациентов с ХСН-сФВ [5], в то время как для PIIINP выявлена ассоциация с тяжестью [6] и исходами у лиц с ХСН независимо от ФВ ЛЖ.

Современные исследования свидетельствуют о роли кишечной микробиоты (КМ) в развитии и прогрессировании ХСН. Отмечено, что для лиц с ХСН характерны изменение микробного пейзажа или дисбаланс представителей КМ, участвующих в образовании метаболитов с протективным дей-

ствием в отношении кишечного эпителия и сердечно-сосудистой системы, таких как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), и доказавших негативные эффекты, например, триметиламин-N-оксид [7]. Стоит отметить, что в подавляющем большинстве работ группа больных ХСН была преимущественно представлена лицами с ХСН и низкой ФВ ЛЖ [8, 9]. Предполагают, что следствием снижения сердечного выброса становится периферическая вазоконстрикция и застой жидкости в тканях [10], а развивающаяся на фоне ишемии кишечника гипоксия ворсинок энтероцитов приводит к снижению барьерной функции кишечного эпителия, что потенцирует бактериальную транслокацию. Ее отражением признано увеличение концентрации липополисахарида (ЛПС). Последний способен связываться с Toll-подобными рецепторами 4-го типа с последующей инициацией сигнального каскада, итогом которого становится экспрессия широкого спектра воспалительных молекул [10].

Цель настоящей работы: изучить связь представителей родов КМ с сывороточными маркерами фиброза миокарда у пациентов с ХСН-сФВ.

## Материал и методы

В исследование были включены 42 пациента обоего пола в возрасте 18-79 лет с верифицированной ХСН-сФВ. Диагностика ХСН-сФВ проводилась на основании наличия у пациентов симптомов и клинических признаков ХСН, ФВ ЛЖ  $\geq 50\%$ , оценки отношения максимальной скорости потока в фазу раннего наполнения (E) к максимальной скорости движения фиброзного кольца митрального клапана в раннюю диастолу ( $e'$ ) ( $E/e'$ ) в ходе тканевой доплерографии, а также измерении уровня N-концевого фрагмента предшественника мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP). Пациентов включали в исследование при значении  $E/e' \geq 13$  и уровне NT-proBNP  $> 125$  пг/мл. Критериями невключения были: возраст  $< 18$  лет и  $\geq 80$  лет, индекс массы тела  $\geq 35$  мг/м<sup>2</sup>, скорость клубочковой фильтрации  $< 30$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> по формуле СКД-ЕРІ, сахарный диабет, курение или отказ от курения  $\leq 10$  лет назад, хроническая обструктивная болезнь легких средней, тяжелой и крайне тяжелой ст. тяжести, бронхиальная астма средней и тяжелой ст. тяжести по данным анамнеза, диагностированные кардиомиопатии, радиационное или лекарственное поражение сердца, констриктивный перикардит, признаки нарушения локальной сократимости миокарда при эхокардиографии, постоянная форма фибрилляции предсердий (ФП), системные заболевания соединительной ткани, онкологические заболевания без радикального излечения, перенесенные острые инфекционные заболевания или обострение хронических в течение 2 нед. до включения в исследование, беременность и период лактации, воспалительные заболевания кишечника, а также прием анти-микробных или пробиотических препаратов в течение последних 3 мес. Исследование прошло процедуру оценки и было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский

центр профилактической медицины” Минздрава России от 07.06.2018г. Всем обследованным пациентам была проведена электрокардиография в 12 отведениях, эхокардиография с доплерографией, оценка теста 6-минутной ходьбы по стандартной методике [11] и заполнение анкеты “Шкала оценки клинического состояния пациента с ХСН” (ШОКС) [12]. Проводилась оценка питания пациентов на основании опросника The Healthy Eating Index 2015 (индекс здорового питания). Он представляет собой набор компонентов рациона, который в зависимости от соответствия стандартам для минимального и максимального балла по каждому пункту оценивается от 0 до 5 или от 0 до 10 баллов [13].

Забор крови для определения биомаркеров методом иммуноферментного анализа осуществлялся из кубитальной вены утром натощак. Оценка уровня NT-proBNP проводилась с использованием реактива (Вектор-Бест, Россия) на фотометре Multiscan FC (Termofisher Scientific, Финляндия). Оценка маркеров фиброза с применением анализатора “Multiskan-MS” (Thermo Labsystems, Финляндия) и реактивов Cloud-Clone Corp (США). В соответствии с протоколом участникам выдавались стерильные контейнеры для сбора кала, проводился инструктаж по его сбору и хранению до доставки в лабораторию. За 24 ч до сбора кала испытуемым было рекомендовано воздержаться от приема алкоголя, интенсивных физических нагрузок и изменений в питании. В течение 2 нед. до сбора кала пациентам было рекомендовано не использовать слабительные или ректальные свечи. После дефекации контейнер с калом герметично закрывали крышкой и передавали курьеру, который осуществлял транспортировку в холодильной камере при температуре до  $+8^\circ$  С до лаборатории в течение  $\leq 2$  ч. В дальнейшем в лаборатории проводили пробоподготовку, выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты и последующую подготовку библиотек секвенирования.

Фильтрация ридов и таксономическая классификация проводилась при помощи программного комплекса QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Результатом классификации стало число ридов, пришедшихся на операционные таксономические единицы. С целью пробоподготовки применяли метод селективного захвата регионов V3-V4 гена 16S рибосомальной рибонуклеиновой кислоты (рРНК) бактерий. Амплификация фрагментов вариабельных регионов V3-V4 гена 16S рРНК осуществлялась с использованием универсальных праймеров. Анализ V3-V4 региона 16S рРНК КМ проводился на секвенаторе Illumina MiSeq (США) методом парно-концевого чтения с суммарным покрытием  $\geq 10000$  пар ридов на образец. Метод не является количественным, но позволяет узнать структуру микробного сообщества, а именно наиболее широко представленные его элементы, что может быть использовано для анализа ассоциаций с интересующими параметрами. Результат секвенирования 16S рРНК КМ имеет вид таблицы, в которой указываются таксоны различного уровня (тип, класс, порядок, семейство и т.д.) и относительная представленность (в %) таксонов в каждом образце.

Статистическая обработка проведена с помощью языка программирования Python v3.8. Для количественных показателей определялся характер распределения (с помощью теста Шапиро-Уилка). При нормальном распределении признака вычисляли среднее (M) и стан-

Таблица 1

Корреляционные связи между относительной представленностью родов КМ и уровнем маркеров фиброза миокарда

Маркер	Род	Размер эффекта	p
PICP	<i>Ruminococcus</i>	-0,37	0,018
	<i>Gemmiger</i>	-0,35	0,025
	<i>Allisonella</i>	0,32	0,037
	<i>Ruminococcaceae, unclassified</i>	-0,31	0,047
PIIINP	<i>Blautia</i>	0,37	0,018
	<i>Bilophila</i>	-0,34	0,03
	<i>Enterobacteriaceae, unclassified</i>	0,32	0,041

Таблица 2

Результаты многомерного регрессионного анализа связи между относительной представленностью бактерий кишечника и уровнем маркеров фиброза миокарда

PICP			
Род бактерий	Нормализованный коэффициент	ДИ [0,025; 0,975]	p
<i>Butyricimonas</i>	0,27	0,066; 0,473	0,011
<i>Blautia</i>	0,35	0,134; 0,572	0,002
<i>Intestinimonas</i>	-0,23	-0,431; -0,022	0,031
PIIINP			
<i>Atopobium</i>	-0,25	-0,475; -0,026	0,03
<i>Paraprevotella</i>	0,32	0,069; 0,574	0,014
<i>Cellulosilyticum</i>	-0,31	-0,498; -0,123	0,002
<i>Solobacterium</i>	-0,32	-0,531; -0,101	0,005
<i>Turicibacter</i>	-0,47	-0,701; -0,242	<0,001
<i>Bilophila</i>	-0,30	-0,524; -0,070	0,012
<i>Desulfovibrio</i>	0,28	0,075; 0,480	0,009

Примечание: ДИ — доверительный интервал.

дартное отклонение (SD) и результаты представляли как  $M \pm SD$ . Для количественных признаков, распределение которых не соответствовало нормальному, вычисляли медиану (Me) и интерквартильный размах (25-й процентиль; 75-й процентиль); результаты представлены как Me [25%; 75%]. Для категориальных и качественных признаков определялись доля и абсолютное количество значений. Для оценки связи факторов между собой проведен корреляционный анализ по Спирмену с определением коэффициента  $\rho$  и его значимости, а также проведен многомерный регрессионный анализ. Уровень значимости при проведении корреляционного и регрессионного анализа соответствует  $<0,05$ .

## Результаты

Возраст пациентов, включенных в исследование, составил 67,0 [64,0; 71,5] лет, среди них 57,1% мужчин. Среди испытуемых преобладали мужчины в возрасте 60–69 лет и женщины возрастной категории  $\geq 70$  лет. Все обследованные пациенты имели АГ и клинические признаки ХСН; индекс массы тела составил 30,2 [26,7; 33,3] кг/м<sup>2</sup>. У всех больных была одышка при физической нагрузке, у 35,7% — пастозность или отёки нижних конечностей, у 38,1% — перебои в работе сердца. Одна-

ко проявления сердечной недостаточности (СН) у этих больных имели преимущественно лёгкую степень тяжести: большинство пациентов (69,05%) имели I функциональный класс ХСН, пройденная в тесте 6-минутной ходьбы дистанция составила 434,5 [417,0; 441,0] метров, количество баллов по ШОКС при ХСН варьировало от 2 до 4 и составило 3,0 [2,0; 3,0]. Наиболее часто принимаемой группой препаратов среди пациентов с ХСН-сФВ оказались бета-адреноблокаторы (90,5%), тиазидные и тиазидоподобные диуретики (83,3%), статины (54,7%), антагонисты рецепторов ангиотензина II (52,4%), ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (45,2%) и антикоагулянты (40,5%). Среднее значение скорости клубочковой фильтрации у обследованных с ХСН-сФВ составило  $76,91 \pm 13,06$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>.

Стоит отметить, что у пациентов отсутствовал факт проведения чрескожного коронарного вмешательства в анамнезе. Доля диагностированной ФП и катетерной аблации ФП составили 47,6 и 21,4%, соответственно. Значения систолического и диастолического артериального давления были  $143,6 \pm 13,7$  и  $90,0$  [80,0; 90,0] мм рт.ст., соответ-

Относительная представленность родов бактерий, продемонстрировавших статистически значимую связь с уровнем P1CP и P11NP

Род бактерий	Относительная представленность
<i>Ruminococcus</i>	1,6 [1,0; 3,5]%
<i>Gemmiger</i>	0,1 [0,0; 0,5]%
<i>Allisonella*</i>	0,0 [0,0; 0,0]%
<i>Blautia</i>	0,4 [0,1; 1,2]%
<i>Bilophila*</i>	0,0 [0,0; 0,0]%
<i>Ruminococcaceae (unclassified)</i>	5,4 [2,7; 8,4]%
<i>Enterobacteriaceae (unclassified)</i>	0,0 [0,0; 0,2]%
<i>Butyricimonas</i>	0,2 [0,1; 0,5]%
<i>Intestinimonas*</i>	0,0 [0,0; 0,0]%
<i>Atopobium*</i>	0,0 [0,0; 0,0]%
<i>Paraprevotella</i>	0,0 [0,0; 0,7]%
<i>Cellulosilyticum*</i>	0,0 [0,0; 0,0]%
<i>Solobacterium*</i>	0,0 [0,0; 0,0]%
<i>Turicibacter*</i>	0,0 [0,0; 0,0]%
<i>Desulfovibrio*</i>	0,0 [0,0; 0,0]%

Примечание: \* — максимальное значение относительной представленности для *Allisonella* составило 0,3%, для *Bilophila* — 0,02%, для *Intestinimonas* — 0,2%, для *Atopobium* — 0,1%, для *Cellulosilyticum* — 0,3%, для *Solobacterium* — 0,009%, для *Turicibacter* — 0,6%, для *Desulfovibrio* — 0,3%.

ственно. Характеристика диастолической функции ЛЖ пациентов с ХСН-сФВ включала оценку пика E, значение которого составило  $76,2 \pm 13,6$ , пика e', имеющего среднее значение  $5,7 \pm 1,1$  см/с и их отношения E/e', равного  $13,0 [13,0; 14,0]$ . Концентрация NT-proBNP в группе ХСН-сФВ составила  $178,0 [136,0; 295,0]$  пг/мл. Согласно полученным данным опроса о питании, показатель потребления пациентами фруктов имел значение  $3,5 [3,0; 4,0]$  балла, в то время как потребление овощей и белковых продуктов составило по  $3,0 [3,0; 4,0]$  балла при максимально возможном значении, равном 5. Медиана потребления цельнозерновых культур составила  $6,0 [5,0; 7,0]$  баллов из максимальных 10.

По итогам секвенирования 16S рРНК, наиболее широко представленными в изученной выборке пациентов с ХСН-сФВ оказались типы *Firmicutes* ( $48,7 \pm 22,2\%$ ), *Bacteroidetes* ( $47,4 \pm 22,6\%$ ) и *Proteobacteria* ( $1,5 [0,5; 2,5]\%$ ). Содержание в крови биохимических маркеров фиброза в покое у больных ХСН-сФВ составило для P1CP  $918,0 [700,0; 1032,8]$  пг/мл и  $6,2 \pm 2,7$  пг/мл для P11NP.

Корреляционный анализ выявил, что более высокой относительной представленности рода *Allisonella* соответствует большая концентрация P1CP ( $p=0,037$ ), в то время как рост представленности *Ruminococcus*, *Ruminococcaceae (unclassified)* и *Gemmiger* ассоциирован с низким уровнем P1CP ( $p=0,018$ ,  $p=0,047$  и  $p=0,025$ , соответственно). При этом большее относительное обилие *Blautia* ( $p=0,018$ ) и *Enterobacteriaceae, unclassified* ( $p=0,041$ ) связано с большим уровнем P11NP, а высокая представленность *Bilophila* ассоциирована с низ-

ким уровнем P11NP ( $p=0,03$ ) (таблица 1). Результаты многомерного регрессионного анализа (таблица 2) позволили расширить число родов, имеющих значимую ассоциацию с маркерами, отражающими механизм патогенеза ХСН-сФВ. Так, *Butyricimonas* ( $p=0,011$ ) и *Blautia* ( $p=0,002$ ) оказались прямо связаны с концентрацией P1CP, тогда как род *Intestinimonas* демонстрировал обратную ассоциацию с уровнем маркера ( $p=0,031$ ). Большинство родов имели обратную связь с P11NP, например, *Atopobium* ( $p=0,03$ ), *Cellulosilyticum* ( $p=0,002$ ), *Solobacterium* ( $p=0,005$ ), *Turicibacter* ( $p<0,001$ ), *Bilophila* ( $p=0,012$ ). Прямой характер ассоциации с уровнем P11NP продемонстрирован для представленности родов *Paraprevotella* ( $p=0,014$ ) и *Desulfovibrio* ( $p=0,009$ ). Данные об относительной представленности вышеупомянутых родов приведены в таблице 3.

## Обсуждение

В настоящем исследовании впервые изучена связь состава КМ на уровне родов с маркерами фиброза миокарда в группе лиц с ХСН-сФВ. Обнаруженное на основании опросника Healthy Eating Index 2015 сходное число баллов, отражающих потребление пищевых волокон и белковых продуктов, нашло отражение в отсутствии значимого дисбаланса между типами *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Известно, что применение петлевых диуретиков снижает концентрацию P1CP у больных с СН [4], однако диуретическая терапия включенных в анализ пациентов базировалась на применении тиазидных и тиазидоподобных диуретиков. Большинство па-

циентов с ХСН-сФВ также принимали бета-адреноблокаторы, которые препятствуют фиброгенезу, вызванному избыточной активацией симпатической системы при ХСН [14], однако данный факт не мог повлиять на характер корреляционных связей и данные регрессии между родами бактерий и изученными маркерами фиброза миокарда.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ряд родов КМ пациентов с ХСН-сФВ ассоциирован с фиброзом миокарда, который опосредованно отражает уровень маркеров фиброза P1CP и P11NP. Предположения о природе полученных связей могут быть построены на более детальном рассмотрении научных данных о родах бактерий, которые, согласно данным настоящего исследования, были ассоциированы с уровнями P1CP и P11NP. Представители семейства *Rumonococcaceae* и рода *Ruminococcus* принадлежат к продуцентам масляной КЦЖК, которая играет значимую роль в поддержании здоровья макроорганизма и оказывает широкий круг противовоспалительных эффектов, включая влияние на миграцию иммунных клеток, экспрессию молекул адгезии и цитокинов. Бутират признан важным источником энергии для эпителиальных клеток стенки кишечника, способен регулировать пролиферацию кишечных эпителиоцитов, восстановление поврежденной слизистой оболочки и поддержание целостности эпителиального барьера, что снижает воспалительную реакцию, вызванную бактериями и их метаболитами [15]. Ввиду того, что в основе развития ХСН-сФВ у большинства обследованных нами пациентов лежала АГ, любопытно, что выполненный другими исследователями анализ КМ у мышей с АГ показал снижение относительного обилия рода *Ruminococcus* [16]. Обнаруженная ассоциация высокого уровня P1CP со сниженной относительной представленностью *Rumonococcaceae (unclassified)* и *Ruminococcus* может быть отражением влияния данных родов на системное воспаление и целостность кишечного барьера.

Высокую относительную представленность бактерий рода *Gemmiger*, которая, по результатам настоящей работы была обратно связана с уровнем P1CP, некоторые авторы относят к важным характеристикам здорового кишечника [17]. Известна попытка оценить микробный состав кишечника в популяции лиц с заболеваниями, имеющими в своей основе иммуноопосредованное воспаление: было установлено, что уровень представленности рода *Gemmiger* у них был стабильно низким [18]. Аналогичный обратный характер ассоциации с P1CP был продемонстрирован для рода *Intestinimonas*, для которого ранее была показана способность продуцировать кишечный бутират и пропионат [19]. В ранее проведенных исследованиях упоминается о прямой корреляцион-

ной связи *Intestinimonas* с противовоспалительным интерлейкином (ИЛ)-4, который продуцируется Т-хелперами [20]. Кроме того, низкая представленность *Intestinimonas* была характерна для мышей с АГ [21]. Таким образом, ряд научных данных [16-21] поддерживает представленные выше результаты о потенциально благоприятном влиянии большей представленности родов *Ruminococcus*, *Gemmiger* и *Intestinimonas* на уровень P1CP, причем данный процесс предположительно может быть опосредован модификацией проницаемости кишечника и воспалительных реакций.

Род *Allisonella* продуцирует гистамин (через декарбоксилирование гистидина) в качестве единственного механизма получения энергии. Известно, что в сердце человека определяется некоторое количество гистамина, который помимо опосредования гиперчувствительности может вносить вклад в ремоделирование сердца [22]. Стимуляция H<sub>2</sub>-гистаминовых рецепторов способствует активации фибробластов, продукции фибронектина и синтезу проколлагенов I и III типов. Проспективное 11-летнее наблюдение продемонстрировало, что применение антагонистов H<sub>2</sub>-рецепторов выразилось в снижении риска развития ХСН на 62%. Более того, прием антагонистов H<sub>2</sub>-рецепторов был связан с неизменным ударным объемом, конечно-диастолическим объемом и отношением массы к объему по данным магнитно-резонансной томографии [23]. В то же время известны положительные эффекты гистамина, продуцируемого *Lactobacillus reuteri*, что выражается в подавлении синтеза провоспалительного фактора некроза опухоли α [24]. Однако в одной из работ было показано, что повышение представленности *Allisonella* связано со снижением экспрессии белков плотных контактов в тонком кишечнике крыс и увеличением его проницаемости [25]. Эти данные могут быть полезны в понимании потенциального механизма прямой связи между представленностью *Allisonella* и уровнем P1CP при ХСН-сФВ, установленной в настоящей работе. Однако, учитывая тот факт, что в изученной группе пациентов относительная представленность данного рода была очень незначительна, описанную связь с P1CP следует трактовать с осторожностью. Последующие работы с большим числом пациентов смогут подтвердить или опровергнуть впервые полученную ассоциацию в этой группе больных.

В настоящей работе обнаружено, что относительная представленность рода *Blautia* имела прямую ассоциацию с обоими изученными маркерами фиброза миокарда, что может предполагать его патологическую роль в развитии нарушений диастолы. Известно, что *Blautia* является продуцентом масляной и уксусной КЦЖК. Ранее наблюдение Luedde M, et al. (2017) продемонстрировало сни-

женный уровень *Blautia* в группе из 20 пациентов с ХСН с низкой ФВ [9]. В то же время имеются исследования, поддерживающие представленные в настоящей работе данные о возможной негативной роли *Blautia*. Так, в популяции пациентов Москвы и Московской области род *Blautia* оказался связан с повышением АД и нарушениями углеводного обмена [26]. Tuovinen E, et al. показали, что *Blautia coccoides* способна активировать секрецию фактора некроза опухоли  $\alpha$  и других цитокинов, а также ИЛ-8. Примечательно, что секреция последнего активируется *Blautia coccoides* даже в большей степени, чем ЛПС [27]. Неожиданной находкой стала прямая связь продуцента масляной кислоты *Butyricimonas* с РСР [28]. Однако это может быть объяснено тем, что, по меньшей мере, один из ныне известных видов этого рода, *Butyricimonas virosa*, обладает патогенными свойствами и ассоциирован с развитием инфекций и бактериемии [29].

Семейство *Enterobacteriaceae*, неклассифицированный род которого продемонстрировал в настоящей работе прямую корреляционную связь с уровнем РИПНР, включает более тысячи видов и самую широкую группу патогенов, ассоциированных с кишечными инфекциями (среди которых хорошо известны *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* и др.). Их факторы патогенности включают ЛПС, образование капсулы, фимбри и жгутики, а также специфичные антигены [30], что дает им возможность оказывать негативное влияние на локальное и системное воспаление [31]. Установленная авторами ассоциация позволяет предполагать, что обилие патогенных микроорганизмов из данного семейства может быть потенциально неблагоприятно связано с фиброзом миокарда.

*Paraprevotella* и *Desulfovibrio* продемонстрировали прямую связь с концентрацией РИПНР и известны как роды с потенциально неблагоприятными эффектами. Так, показана способность *Desulfovibrio* к транслокации через слизистую оболочку кишечника и развитию генерализованных инфекций [32]. Кроме того, предполагается роль данного рода как источника ЛПС при развитии системного вялотекущего воспаления [33]. Любопытное исследование поддерживает наши данные о потенциально негативном влиянии рода *Paraprevotella* на ремоделирование миокарда при СН, а именно: была обнаружена прямая связь этого рода с гипертрофией миокарда и обратная — с фракцией укорочения волокон миокарда [21]. Известно, что *Paraprevotella* способны продуцировать янтарную кислоту, которая участвует в индукции воспаления, опосредованного ИЛ-1 $\beta$ . Интенсивная продукция янтарной кислоты ранее наблюдалась на мышинных моделях АГ и метаболических воспалительных заболеваний [34].

Согласно полученным нами данным, роды *Bilophila* и *Atopobium* обратно связаны с уровнем РИПНР. Примечательно, что они имеют сходства в метаболической активности, а именно: относятся к продуцентам сероводорода в кишечнике [35], который известен как потенциальный триггер воспаления с цитотоксическим эффектом и повреждением кишечного барьера [36]. В свете подобных данных о продуцентах сероводорода обнаруженные более низкие концентрации РИПНР при низкой представленности обоих родов видятся неожиданной находкой. Однако ранее в работе, включившей пациентов с ФП, было продемонстрировано снижение содержания *Bilophila*, что отчасти согласуется с полученными нами результатами [37]. Также следует принимать во внимание очень низкое относительное обилие данного рода у изученных нами пациентов с ХСН-сФВ, ограничивающее интерпретацию данных. Дальнейшие работы с углубленным изучением проницаемости кишечной стенки и метаболизма бактерий могут пролить свет на природу описанных выше связей.

Для родов *Cellulosilyticum* и *Solobacterium* в настоящем исследовании обнаружена обратная связь с РИПНР, что, безусловно, дополняет крайне ограниченные данные, имеющиеся в научной литературе об этих бактериях. Отмечается способность *Cellulosilyticum* разлагать целлюлозу [38], а также положительная корреляция с числом бокаловидных клеток кишечника и секрецией слизи [39]. *Solobacterium* известен как анаэроб, продуцирующий широкий круг метаболитов, клиническое значение которого, в первую очередь, определяется участием в развитии галитоза [40]. Обнаруженная обратная связь между представленностью *Turicibacter* и уровнем РИПНР находит подтверждение в работах, описывающих иммуномодулирующие свойства этого рода бактерий [41]. Имеются данные и о предполагаемой роли *Turicibacter* в развитии воспалительных заболеваний кишечника [42], что свидетельствует об отсутствии единого мнения относительно роли данного рода в организме человека. Стоит упомянуть, что представленность этой пары родов в настоящем исследовании также была низкой, что накладывает ограничения на интерпретацию данных и может быть уточнено в ходе последующих работ в этом направлении.

## Заключение

Представленные результаты описывают роды бактерий, которые могут иметь потенциальное благоприятное или негативное влияние на развитие фиброза миокарда. Анализ характеристик вышеописанных представителей КМ дает основания полагать, что в основе ассоциаций между родами

бактерий и фиброзом миокарда могут лежать пути, опосредованные эффектами КЦЖК, гистамина и провоспалительными соединениями. Результаты углубляют представления о связи между КМ и патогенетическими механизмами развития ХСН-сФВ, что может стать одним из шагов к пониманию

роли КМ в прогрессировании диастолической дисфункции ЛЖ.

**Отношения и деятельность:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## Литература/References

- Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH. Diastolic heart failure — abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med.* 2004;350:1953-9. doi:10.1056/NEJMoa032566.
- Ohanyan V, Sisakian H, Peketi P, et al. A chicken and egg conundrum: coronary microvascular dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;314(6):H1262-3. doi:10.1152/ajpheart.00154.2018.
- Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis J, et al. Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation.* 2015;131(14):1247-59. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013215.
- López B, Querejeta R, González A, et al. Effects of loop diuretics on myocardial fibrosis and collagen type I turnover in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(11):2028-35. doi:10.1016/j.jacc.2003.12.052.
- Krum H, Elsik M, Schneider HG, et al. Relation of peripheral collagen markers to death and hospitalization in patients with heart failure and preserved ejection fraction: results of the I-PRESERVE collagen substudy. *Circ Heart Fail.* 2011;4(5):561-8. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.960716.
- Zannad F, Alla F, Dousset B, et al. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). *Circulation.* 2000;102(22):2700-6. doi:10.1161/01.cir.102.22.2700.
- Cui X, Ye L, Li J, et al. Metagenomic and metabolomic analyses unveil dysbiosis of gut microbiota in chronic heart failure patients. *Sci Rep.* 2018;8(1):635. doi:10.1038/s41598-017-18756-2.
- Kamo T, Akazawa H, Suda W, et al. Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS One.* 2017;12:e0174099. doi:10.1371/journal.pone.0174099.
- Luedde M, Winkler T, Heinsen FA, et al. Heart failure is associated with depletion of core intestinal microbiota. Version 2. *ESC Heart Fail.* 2017;4(3):282-90. doi:10.1002/ehf2.12155.
- Kamo T, Akazawa H, Suzuki JI, et al. Novel Concept of a Heart-Gut Axis in the Pathophysiology of Heart Failure. *Korean Circ J.* 2017;47(5):663-9. doi:10.4070/kcj.2017.0028.
- Guyatt GH, Sullivan MJ, Thompson PJ, et al. The 6-minute walk: a new measure of exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Can Med Assoc J.* 1985;132(8):919-23.
- Belenkov YuN, Mareev VYu. Principles of heart failure rational treatment. M.: Media Medica; 2000. 266 p. (In Russ.) Беленков Ю. Н., Мареев В. Ю. Принципы рационального лечения хронической сердечной недостаточности. М.: Медиа Медика. 2000. 266 с.
- Krebs-Smith SM, Pannucci TE, Subar AF, et al. Update of the Healthy Eating Index: HEI-2015. *J Acad Nutr Diet.* 2018;118(9):1591-602. doi:10.1016/j.jand.2018.05.021.
- Fu Y, Xiao H, Zhang Y. Beta-adrenoceptor signaling pathways mediate cardiac pathological remodeling. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012;4:1625-37. doi:10.2741/484.
- Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, et al. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe.* 2015;17(5):662-71. doi:10.1016/j.chom.2015.03.005.
- Li J, Zhao F, Wang Y, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome.* 2017;5(1):14. doi:10.1186/s40168-016-0222-x.
- Anand S, Kaur H, Mande SS. Comparative In silico Analysis of Butyrate Production Pathways in Gut Commensals and Pathogens. *Front Microbiol.* 2016;7:1945. doi:10.3389/fmicb.2016.01945.
- Forbes JD, Chen CY, Knox NC, et al. A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases—does a common dysbiosis exist? *Microbiome.* 2018;6(1):221. doi:10.1186/s40168-018-0603-4.
- Bui TP, Shetty SA, Lagkouvardos I, et al. Comparative genomics and physiology of the butyrate-producing bacterium *Intestinimonas butyriciproducens*. *Environ Microbiol Rep.* 2016;8(6):1024-37. doi:10.1111/1758-2229.12483.
- Du G, Dong W, Yang Q, et al. Altered Gut Microbiota Related to Inflammatory Responses in Patients With Huntington's Disease. *Front Immunol.* 2021;11:603594. doi:10.3389/fimmu.2020.603594.
- Gutiérrez-Calabrés E, Ortega-Hernández A, Modrego J, et al. Gut Microbiota Profile Identifies Transition From Compensated Cardiac Hypertrophy to Heart Failure in Hypertensive Rats. *Hypertension.* 2020;76(5):1545-54. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15123.
- Asanuma H, Minamino T, Ogai A, et al. Blockade of histamine H<sub>2</sub> receptors protects the heart against ischemia and reperfusion injury in dogs. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40(5):666-74. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.02.001.
- Leary PJ, Tedford RJ, Bluemke DA, et al. Histamine H<sub>2</sub> Receptor Antagonists, Left Ventricular Morphology, and Heart Failure Risk: The MESA Study. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(13):1544-52. doi:10.1016/j.jacc.2016.01.045.
- Thomas CM, Hong T, van Pijkeren JP, et al. Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. *PLoS One.* 2012;7(2):e31951. doi:10.1371/journal.pone.0031951.
- Geng S, Yang L, Cheng F, et al. Gut Microbiota Are Associated With Psychological Stress-Induced Defections in Intestinal and Blood-Brain Barriers. *Front Microbiol.* 2020;10:3067. doi:10.3389/fmicb.2019.03067.
- Kashtanova DA, Tkacheva ON, Popenko AS, et al. Gut microbiota and its relations with cardiovascular risk factors in almost healthy inhabitants of Moscow and Moscow Region. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2017;16(3):56-61. (In Russ.) Каштанова Д. А., Ткачева О. Н., Попенко А. С. и др. Состав микробиоты кишечника и его взаимосвязь с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний среди относительно здоровых жителей Москвы и Московской области. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2017;16(3):56-61. doi:10.15829/1728-8800-2017-3-56-61.

27. Tuovinen E, Keto J, Nikkilä J, et al. Cytokine response of human mononuclear cells induced by intestinal Clostridium species. *Anaerobe*. 2013;19:70-6. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.11.002.
28. Konikoff T, Gophna U. Oscillospira: a Central, Enigmatic Component of the Human Gut Microbiota. *Trends Microbiol*. 2016;24(7):523-4. doi:10.1016/j.tim.2016.02.015.
29. Ogawa Y, Sato M, Yamashita T, et al. Polymicrobial Anaerobic Bacteremia Caused by Butyricimonas virosa and Brachyspira pilosicoli in a Patient with Peritonitis following Intestinal Perforation. *Ann Lab Med*. 2018;38(1):71-3. doi:10.3343/alm.2018.38.171.
30. Tagini F, Greub G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(11):2007-20. doi:10.1007/s10096-017-3024-6.
31. Farmer JJ, Farmer MK, Holmes B. The Enterobacteriaceae: General Characteristics. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 2010;2:1317-59. doi:10.1002/9780470688618.taw0051.
32. Goldstein EJ, Citron DM, Peraino VA, Cross SA. Desulfovibrio desulfuricans bacteremia and review of human Desulfovibrio infections. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2752-4. doi:10.1128/JCM.41.6.2752-2754.2003.
33. Zhang-Sun W, Augusto LA, Zhao L, Caroff M. Desulfovibrio desulfuricans isolates from the gut of a single individual: structural and biological lipid A characterization. *FEBS Lett*. 2015;589(1):165-71. doi:10.1016/j.febslet.2014.11.042.
34. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature*. 2013;496(7444):238-42. doi:10.1038/nature11986.
35. Mottawe W, Chiang CK, Mühlbauer M, et al. Altered intestinal microbiota-host mitochondria crosstalk in new onset Crohn's disease. *Nat Commun*. 2016;7:13419. doi:10.1038/ncomms13419.
36. Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Culture-independent analysis of desulfovibrios in the human distal colon of healthy, colorectal cancer and polypectomized individuals. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;69(2):213-21. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00709.x.
37. Zuo K, Li J, Li K, et al. Disordered gut microbiota and alterations in metabolic patterns are associated with atrial fibrillation. *Gigascience*. 2019;8(6):giz058. doi:10.1093/gigascience/giz058.
38. Zhao G, Zhou L, Dong Y, Cheng Y, Song Y. The gut microbiome of hooded cranes (*Grus monacha*) wintering at Shengjin Lake, China. *Microbiologyopen*. 2017;6(3):e00447. doi:10.1002/mbo3.447.
39. McCormack UM, Curião T, Buzoianu SG, et al. Exploring a Possible Link between the Intestinal Microbiota and Feed Efficiency in Pigs. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(15):e00380-17. doi:10.1128/AEM.00380-17.
40. Tanabe S, Grenier D. Characterization of volatile sulfur compound production by Solobacterium moorei. *Arch Oral Biol*. 2012c;57(12):1639-43. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.09.011.
41. Caslin B, Maguire C, Karmakar A, et al. Alcohol shifts gut microbial networks and ameliorates a murine model of neuroinflammation in a sex-specific pattern. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(51):25808-15. doi:10.1073/pnas.1912359116.
42. Bernstein CN, Forbes JD. Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease and Other Chronic Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Inflamm Intest Dis*. 2017;2(2):116-23. doi:10.1159/000481401.