

ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА И ИХ СВЯЗЬ С КОРТИЗОЛОМ, МЕЛАТОНИНОМ И ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-6 У ЛИЦ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИНСОМНИЕЙ

А. А. Масютина, Л. Н. Гуменюк ✉, Ю. В. Фатовенко, Л. Е. Сорокина, С. С. Байрамова, А. И. Алексеенко, Ю. В. Шавров, А. А. Романова, Д. И. Сейдаметова

Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь, Россия

На сегодняшний день актуальной остается проблема взаимосвязи микробиоты кишечника и хронической инсомнии. Целью исследования было изучить изменения таксономического состава микробиоты кишечника и характер их взаимосвязи с кортизолом, мелатонином и IL6 у лиц с хронической инсомнией. В одномоментном сравнительном проспективном исследовании приняли участие 55 лиц с хронической инсомнией (основная группа: женщины — 58,2%, мужчины — 41,8%; средний возраст — $31,6 \pm 7,4$ лет) и 50 лиц без инсомнии (контрольная группа: женщины — 68,0%, мужчины — 32,0%; средний возраст — $33,2 \pm 6,6$ лет). Оценивали таксономический состав микробиоты кишечника методом секвенирования гена 16S rRNA. Определяли уровни кортизола и IL6 в плазме крови, мелатонина в моче с помощью иммуноферментного анализа. Для оценки качества сна использовали опросник PSQI. У лиц с хронической инсомнией обнаружены статистически значимое снижение численности *Faecalibacterium* ($p = 0,048$), *Prevotella 9* ($p < 0,001$) и *Lachnospira* ($p = 0,036$) и повышение численности *Blautia* ($p = 0,012$) и *Eubacteriumhallii* ($p = 0,003$). Установлены статистически значимые корреляции значений IL6 с уровнем бактерий *Faecalibacterium* ($r = -0,44$; $p = 0,001$) и *Blautia* ($r = 0,42$; $p < 0,001$), концентрации кортизола и уровня бактерий *Lachnospira* ($r = -0,41$; $p = 0,048$). Выявлена сопряженность уровня бактерий *Faecalibacterium*, *Blautiac* с более высокими баллами по опроснику PSQI ($r = -0,47$, $p = 0,001$; $r = 0,45$, $p < 0,001$ соответственно). Таким образом, получены дополнительные данные об особенностях изменений микробиоты кишечника и их связи с некоторыми гормональными и воспалительными биомаркерами при хронической инсомнии, позволяющие применять новые терапевтические стратегии в персонализированном лечении и диагностике инсомнии, направленные на нормализацию кишечной микробиоты.

Ключевые слова: инсомния, микробиота кишечника, ось «микробиота–кишечник–мозг», кортизол, мелатонин, IL6

Вклад авторов: А. А. Масютина, Ю. В. Фатовенко — сбор, анализ и интерпретация данных; Л. Н. Гуменюк — замысел и дизайн исследования; Л. Е. Сорокина, С. С. Байрамова, А. А. Алексеенко — статистическая обработка данных; Ю. В. Шавров, А. А. Романова, Д. И. Сейдаметова — подготовка статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Крымской медицинской академии имени С. И. Георгиевского (протокол № 10 от 16 ноября 2020 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации. Все лица, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Леся Николаевна Гуменюк
бульвар Ленина, 5/7, г. Симферополь, Республика Крым, 295006; lesya_gumenyuk@mail.ru

Статья получена: 07.03.2021 **Статья принята к печати:** 14.04.2021 **Опубликована онлайн:** 27.04.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.017

CHANGES IN GUT MICROBIOTA COMPOSITION AND THEIR ASSOCIATIONS WITH CORTISOL, MELATONIN AND INTERLEUKIN 6 IN PATIENTS WITH CHRONIC INSOMNIA

Masyutina AA, Gumenyuk LN ✉, Fatovenko YuV, Sorokina LE, Bayramova SS, Alekseenko AI, Shavrov YuV, Romanova AA, Seydametova DI

Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

The relationship between the gut microbiota and chronic insomnia remains understudied. The aim of this paper was to investigate changes in the taxonomic composition of the gut microbiota and their associations with the levels of cortisol, melatonin and IL6 in patients with chronic insomnia. Our comparative prospective cross-sectional study enrolled 55 patients with chronic insomnia, who formed the main group (female patients: 58.2%, male patients: 41.8%; mean age 31.6 ± 7.4 years), and 50 healthy volunteers, who comprised the control group (females: 68.0%, males: 32.0%; mean age 33.2 ± 6.6 years). The taxonomic composition of the gut microbiota was profiled using 16S rRNA gene sequencing. Plasma cortisol and IL 6 and urine melatonin were measured by means of ELISA. Sleep quality was evaluated using the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI). In patients with chronic insomnia, the abundance of *Faecalibacterium* ($p = 0.048$), *Prevotella 9* ($p < 0.001$) and *Lachnospira* ($p = 0.036$) was lower, whereas the abundance of *Blautia* ($p = 0.012$) and *Eubacteriumhallii* ($p = 0.003$) was higher than in healthy volunteers. Significant correlations were established between the levels of IL6 and the abundance of *Faecalibacterium* ($r = -0.44$; $p = 0.001$) and *Blautia* ($r = 0.42$; $p < 0.001$), as well as between cortisol concentrations and the abundance of *Lachnospira* ($r = -0.41$; $p = 0.048$). The abundance of *Faecalibacterium* and *Blautiac* was correlated with higher PSQI ($r = -0.47$, $p = 0.001$; $r = 0.45$, $p < 0.001$, respectively). Our study contributed to the pool of data about changes in the gut microbiota and their associations with some endocrine and inflammation markers in patients with chronic insomnia. These data can be exploited to propose new strategies for the diagnosis and personalized treatment of insomnia aimed at normalizing the patient's gut microbiota.

Keywords: insomnia, gut microbiota, gut-brain axis, cortisol, melatonin, IL6

Author contribution: Masyutina AA, Fatovenko YuV collected, analyzed and interpreted the obtained data; Gumenyuk LN proposed the concept and design for the study; Sorokina LE, Bayramova SS, Alekseenko AA performed statistical analysis; Shavrov YuV, Romanova AA, Seydametova DI wrote the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Georgievsky Medical Academy (Protocol № 10 dated November 16, 2020) and complied with the Declaration of Helsinki. Voluntary informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Lesya N. Gumenyuk
Lenin boulevard, 5/7, Simferopol, Republic of Crimea, 295006; lesya_gumenyuk@mail.ru

Received: 07.03.2021 **Accepted:** 14.04.2021 **Published online:** 27.04.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.017

Инсомния является широко распространенным в общей популяции состоянием и сопряжена с многочисленными медицинскими и социальными последствиями [1, 2]. В настоящее время инсомнию рассматривают как психобиологическое расстройство, связанное с психологическими, нейроэндокринными, нейроиммунными, электро- и нейрофизиологическими, структурными и функциональными изменениями [3]. В современной литературе активно обсуждается участие в развитии инсомнии таких биомаркеров, как кортизол [4], мелатонин [5] и IL6 [6].

В последние годы появляется все больше данных, указывающих на тесное взаимодействие кишечной микробиоты и центральной нервной системы. Оно реализуется посредством оси «микробиота–кишечник–мозг» и выполняет роль центрального звена в перекрестных нейроиммуноэндокринных взаимодействиях [7, 8]. В ряде экспериментальных и клинических работ показана связь микробиоты кишечника со сном. Так, сообщалось, что в группе лабораторных мышей вмешательство в режим сна вызывало изменения структуры и разнообразия кишечной микробиоты [9]. Аналогичные изменения в структуре микробного сообщества наблюдали и у вахтовых рабочих [10]. Кроме того, показано, что лечение дисбиоза кишечной микробиоты способствовало увеличению продолжительности сна и повышению его эффективности [11–12]. Однако многие аспекты взаимосвязи микробиоты кишечника с воспалительными и гормональными биомаркерами у лиц с хронической инсомнией остаются не до конца изученными. Отсутствуют сведения о взаимосвязи между представителями микробиоты кишечника и уровнем кортизола при хронической инсомнии.

В ряде исследований указывается, что инсомния индуцирует системное гипозергическое воспаление, характеризующееся повышением уровня провоспалительных цитокинов. В данном аспекте особый интерес представляет IL6, рассматриваемый рядом авторов как значимый сомногенный фактор [13]. Показано, что у пациентов с инсомнией повышение сывороточного уровня IL6 характеризуется отрицательной взаимосвязью с субъективным качеством сна [6]. Кроме того, имеются данные о связи дисбиоза кишечника и изменениями концентрации IL6 [13, 14]. Однако сведения относительно влияния родового состава кишечной микробиоты на уровень IL6 противоречивы. Так, у лиц мужского пола, страдающих инсомнией, была описана положительная взаимосвязь численности *Proteobacteria* и IL6 [13]. Установлена ассоциация между численностью бактерий *Faecalibacterium* и *Blautia* и уровнем IL6 у лиц с хронической инсомнией [14]. Таким образом, проблема взаимосвязи микробиоты кишечника и хронической инсомнии остается актуальной.

Целью исследования было изучить изменения таксономического состава микробиоты кишечника и характер их взаимосвязи с кортизолом, мелатонином и IL6 у лиц с хронической инсомнией.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проведено сравнительное проспективное одномоментное исследование. Методом сплошной выборки в исследование были включены 55 лиц с ранее установленной хронической инсомнией (основная группа) (32 женщины (58,2%), 23 мужчины (41,8%); средний возраст составил $31,6 \pm 7,4$ лет), обратившиеся за помощью в Сомнологический центр г. Симферополя, и 50 здоровых добровольцев без инсомнии

(контрольная группа, КГ) (34 женщины (68,0%), 16 мужчин (32,0%); средний возраст — $33,2 \pm 6,6$ лет), проходивших ежегодный профилактический медицинский осмотр на базе медицинского центра «Гемокод» г. Симферополя, соответствующих критериям включения/невключения. Группы были сопоставимы по полу ($p = 0,95$; χ^2), возрасту ($p = 0,91$; χ^2) и индексу массы тела ($p = 0,055$; χ^2).

Критерии включения пациентов в исследование: наличие установленного диагноза хронической инсомнии (продолжительность инсомнии более трех месяцев); возраст 18–45 лет.

Критерии исключения: температура тела выше $36,9$ °С; наличие сахарного диабета I и II типа; ожирение; инфаркт миокарда, тяжелые нарушения ритма сердца, сердечная недостаточность; гипертоническая болезнь, транзиторная ишемическая атака в анамнезе; острое нарушение мозгового кровообращения (за предшествующие шесть месяцев до начала исследования); тяжелые или декомпенсированные сопутствующие соматические заболевания, которые могут затруднять участие больного в исследовании и влиять на его результаты; синдром раздраженного кишечника; хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, печени; гематологические и онкологические заболевания; бактериальные и вирусные инфекционные заболевания, микозы; наличие нарушений стула (запоры/диарея) в предшествующий месяц до начала исследования; психические расстройства, алкоголизм или наркомания в анамнезе; прием антибиотиков, пробиотиков, пребиотиков, симбиотических или кислотоподавляющих препаратов, психотропных или других препаратов, влияющих на сон, в предшествующие три месяца до начала исследования; прием препаратов, влияющих на стул, в предшествующий месяц до начала исследования; психотерапевтическое лечение инсомнии в предшествующие 3 месяца до начала исследования; работа посменно или при смене часовых поясов в предшествующий месяц до начала исследования.

Критерии включения здоровых добровольцев: возраст 18–45 лет; отсутствие депрессивного расстройства (по шкале депрессии опросника оценки здоровья пациента «Patient Health Questionnaire» (PHQ) — PHQ-9 < 5 баллов), тревоги (по шкале тревоги опросника PHQ — GAD-7 < 5 баллов), соматоформного расстройства (по шкале соматических симптомов опросника PHQ — PHQ-15 < 5 баллов); отсутствие хронических заболеваний и аллергических реакций; отсутствие инфекционных и острых заболеваний в течение двух предыдущих месяцев перед исследованием; отсутствие нарушений стула (запоры/диарея) в предшествующий месяц до начала исследования; отсутствие работы посменно или при смене часовых поясов в предшествующий месяц до начала исследования; не принимавшие пробиотики, пребиотики, симбиотические препараты в предшествующие три месяца до начала исследования; не принимавшие препараты, влияющие на стул, в предшествующий месяц до начала исследования; отсутствие психических расстройств, алкоголизма или наркомании в анамнезе; информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения здоровых добровольцев: температура тела выше $36,9$ °С; работа посменно или при смене часовых поясов в предшествующий месяц до начала исследования.

Для диагностики инсомнии использовали критерии Международной классификации расстройств сна версии 3 (2014) [15]. Качество сна оценивали с помощью

Питтсбургского опросника качества сна «Pittsburgh Sleep Quality Index» (PSQI) [16]. Выраженность инсомнии определяли с помощью опросника для оценки тяжести инсомнии «Insomnia Severity Index» (ISI) [16].

Для анализа таксономического состава микробиоты кишечника брали образцы кала утром (с 8.00 до 11.00), замораживали и хранили в одноразовых пластиковых контейнерах при температуре -80°C до проведения метагеномного анализа. Выделение тотальной ДНК проводили методом фенольной экстракции. Нуклеотидную последовательность выделенной ДНК устанавливали методом шотган-секвенирования с использованием высокопроизводительного секвенатора SOLiD5500 Wildfire (Applied Biosystems; США) [17].

Фильтрацию прочтений по качеству и их таксономическую классификацию проводили с помощью программного обеспечения QIIME версии 1.9.1 (Caporaso labs; США) [18]. Для определения таксономической принадлежности прочтений применяли подход, включающий в себя использование двух таксономических баз данных. На первом этапе осуществляли подбор референсного набора операционных таксономических единиц бактерий (OTE) на основании сравнения полученных прочтений генов 16S рПНК с базой данных GreenGenes версии 13.5 [19]. На втором этапе с использованием алгоритма RDP определение таксономической принадлежности данных OTE проводили на основе специализированной базы данных кишечной микробиоты человека HITdb [20].

Изучение качественного и количественного составов микробиоты кишечника осуществляли на основании определения видов, родов и фил микроорганизмов. Оценку α -разнообразия сообщества путем расчета индекса Chao1, показателя числа обнаруженных таксонов (Sobs) и показателя, оценивающего реальное количество таксонов (ACE), проводили с помощью программы Mothur v.1.22.0 (<http://www.mothur.org>).

Уровень кортизола и IL6 в сыворотке крови изучали с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА), используя набор тест-системы («Вектор-Бест»; Новосибирск, Россия). Забор крови из периферической вены выполняли натощак в утренние часы (7.00–9.00) в состоянии покоя (не менее 15 мин).

Определение продукции мелатонина на основании экскреции его основного метаболита 6-сульфатоксимелатонина (6-COMT) в ночной порции (сбор в 6.00 ч) и дневной порции мочи (сбор в 20.00 ч) проводили с помощью твердофазного ИФА с помощью стандартного набора тест-систем Elisa (Buhlmann; Швейцария). Использовали полуавтоматический анализатор StatFax 2100 (Awareness Technology; США). Пробирки с сывороткой

крови и мочой хранили в замороженном состоянии при температуре -20°C .

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc.; США). При нормальном распределении показателей определяли среднее значение и стандартное отклонение; при распределении, отличном от нормального, — медиану, 25-й и 75-й процентиля. Нормальность распределения проверяли при помощи распределения Гаусса. Для качественных признаков определяли долю и абсолютное количество значений. Сравнительный анализ для нормально распределенных количественных признаков проводили с помощью параметрического t -критерия Стьюдента; при распределении, отличном от нормального, — с помощью U -критерия Манна-Уитни, для качественных признаков — с помощью критерия χ^2 (хи-квадрат). Для оценки взаимосвязи признаков рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Кроме того, проводили корреляционный анализ и множественную ранговую корреляцию, достоверность корреляционных связей проверяли при помощи таблиц достоверности корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика обследованных с наличием и отсутствием инсомнии представлена в табл. 1. Длительность инсомнии у лиц основной группы варьировала от 5 месяцев до 3,5 лет (в среднем составила 1,7 лет [1,1; 2,4]). В анамнезе лечение по поводу инсомнии имело место у 21 (38,6%) обследованного основной группы. С целью лечения инсомнии 10 обследованных (47,6%) применяли седативные растительные средства, 8 (38,1%) — препараты на основе мелатонина и у 3 (14,3%) — осуществляли психотерапевтические интервенции.

При изучении таксономического состава микробиоты кишечника обнаружено, что у лиц с хронической инсомнией по сравнению с лицами без инсомнии наблюдалось статистически значимое снижение α -разнообразия бактериального сообщества (индекс Chao1; $p = 0,016$). Индексы ACE и Sobs в группе лиц с инсомнией по сравнению с КГ также были несколько снижены, при этом статистически значимых различий не найдено ($p = 0,054$; $p = 0,052$ соответственно) (рис. 1). Статистически значимые различия между группами обследованных установлены по представленности типа *Actinobacteria*: у лиц с хронической инсомнией по сравнению с КГ наблюдалась более высокая численность бактерий филы ($p = 0,0003$).

Таблица 1. Характеристика лиц с наличием и отсутствием инсомнии

Показатель	Основная группа ($n = 55$)	Контрольная группа ($n = 50$)
Женщины / мужчины (n , %)	32 (58,2) / 23 (41,8)	34 (68,0) / 16 (32,0%)
Средний возраст, годы ($M \pm CD$)	31,6 \pm 7,4	33,2 \pm 6,6
Индекс массы тела, кг/м ² ($M \pm CD$)	25,2 \pm 4,4	25,6 \pm 3,9
PSQI	15,4 \pm 3,7*	3,3 \pm 1,4
ИТИ по опроснику ISI, баллы	5,3 [3,6;6,4]	13,2 [10,4; 16,7]
PHQ-9	9,1 \pm 4,2*	3,4 \pm 1,2
GAD-7	7,9 \pm 4,5*	2,9 \pm 1,3
PHQ-15	9,9 \pm 3,2*	3,3 \pm 1,5

Примечание: * — $p < 0,001$ по отношению к КГ, ИТИ — индекс тяжести инсомнии.

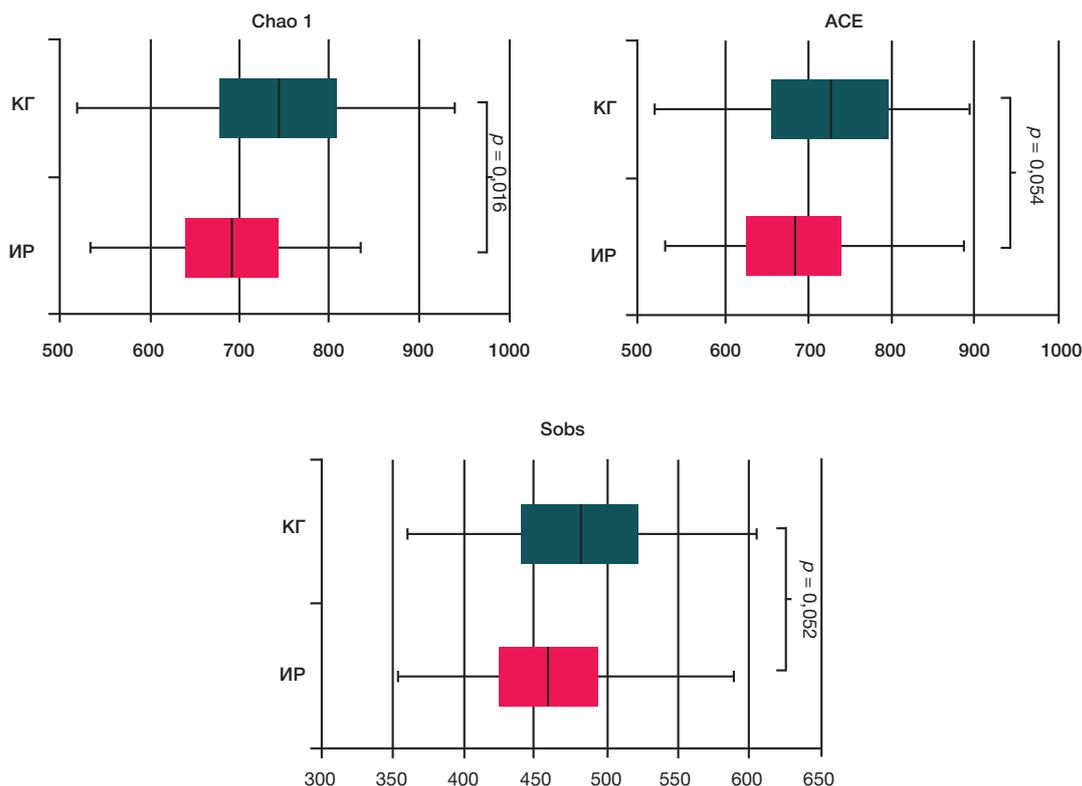


Рис. 1. Сравнительный анализ филогенетического состава микробиоты кишечника у лиц с наличием и отсутствием инсомнии. ИП — инсомния, КГ — контрольная группа

При сравнении родового состава кишечной микробиоты в группах обследованных у лиц с хронической инсомнией по сравнению с КГ выявлено статистически значимое снижение численности *Faecalibacterium* ($p = 0,048$), *Prevotella 9* ($p = 0,0002$) и *Lachnospira* ($p = 0,036$) и повышение численности *Blautia* ($p = 0,012$) и *Eubacterium hallii* ($p = 0,003$) (рис. 2).

Значения IL6 и кортизола у лиц с инсомнией по сравнению с показателями КГ статистически значимо выше. Уровень мелатонина был ниже показателя в КГ, однако различия между группами не достигали статистической значимости (табл. 2).

В ходе уточнения взаимосвязи изменений микробиоты кишечника с гормональными и воспалительными биомаркерами у лиц с хронической инсомнией получены статистически значимые корреляционные связи значений IL6 с численностью бактерий *Faecalibacterium* ($r = -0,44$; $p = 0,001$) и *Blautia* ($r = 0,42$; $p < 0,001$), концентрации кортизола и численности бактерий *Lachnospira* ($r = -0,41$; $p = 0,048$).

В ходе корреляционного анализа выявлена также сопряженность численности бактерий *Faecalibacterium*, *Blautia* с более высокими баллами по опроснику PSQI ($r = -0,47$, $p = 0,001$; $r = 0,45$, $p < 0,001$ соответственно)

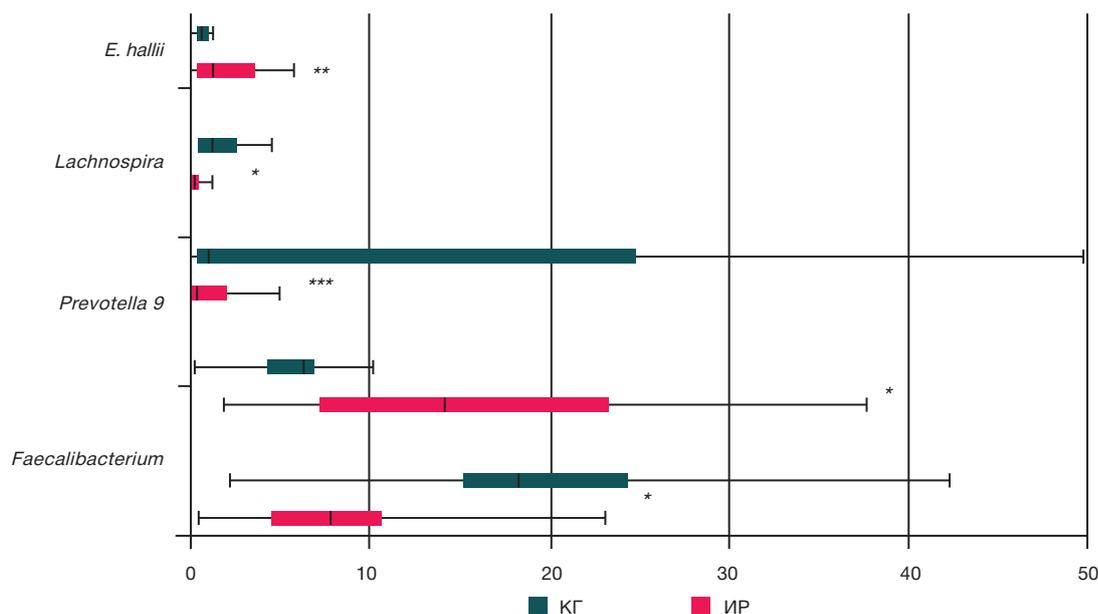


Рис. 2. Сравнительный анализ родового состава микробиоты кишечника у лиц с наличием и отсутствием инсомнии. ИП — инсомния, КГ — контрольная группа

Таблица 2. Сравнительный анализ воспалительных и гормональных биомаркеров у лиц с наличием и отсутствием инсомнии (mean ± SD)

Показатель	Основная группа n = 55	Контрольная группа n = 50	p
Кортизол, нмоль/л	581,5 ± 110,6	323,5 ± 108,1	p = 0,036
Мелатонин (8.00 ч), пг/мл	12,2 ± 2,4	13,8 ± 2,6	p = 0,652
Мелатонин (20.00 ч), пг/мл	3,5 ± 1,2	4,4 ± 1,1	p = 0,581
IL6, пг/мл	5,6 ± 0,9	2,8 ± 0,8	p = 0,014

и опроснику ISI ($r = -0,51$, $p = 0,002$; $r = 0,48$, $p < 0,001$ соответственно). Численность бактерий *Faecalibacterium* обратно коррелировала с более высокими баллами по опроснику депрессии ($r = -0,44$; $p < 0,001$) и численность бактерий *Lachnospira* — с более высокими баллами по опроснику тревоги ($r = -0,51$; $p < 0,001$) и опроснику ISI ($r = -0,52$; $p < 0,001$).

Получены статистически значимые корреляционные связи значений IL6 с численностью бактерий *Faecalibacterium* ($r = -0,44$; $p = 0,001$) и *Blautia* ($r = 0,42$; $p < 0,001$). Удалось также установить связь между численностью бактерий (*Faecalibacterium*, *Blautia*) и оценкой качества сна по опроснику PSQI ($r = 0,37$; $p = 0,001$; $r = 0,54$; $p = 0,011$ соответственно). Выраженность инсомнии по опроснику ISI имеет прямую корреляционную связь с численностью указанных выше бактерий ($r = 0,67$; $p = 0,005$; $r = 0,29$; $p = 0,0001$ соответственно). Выраженность депрессивных расстройств по опроснику PHQ-9 имеет корреляционную связь с показателями численности бактерий (*Faecalibacterium*, *Blautia*) при $r = 0,19$; $p = 0,005$; $r = 0,32$; $p = 0,003$ соответственно. Выявлена взаимосвязь уровня кортизола с численностью бактерий *Lachnospira* и выраженностью инсомнии по опроснику ISI ($r = 0,37$; $p = 0,002$).

Кроме того, в ходе корреляционного анализа выявлена сопряженность численности бактерий *Lachnospira* с более высокими баллами по опроснику ISI ($r = -0,38$; $p < 0,001$) и опроснику GAD-7 ($r = -0,47$; $p < 0,0001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перспективным направлением исследовательского поиска является изучение особенностей метаболической интеграции, реализующейся посредством оси «микробиота–кишечник–мозг» (gut-brain axis), выполняющей роль центрального звена в перекрестных нейро-иммуно-эндокринных взаимодействиях [21]. Сегодня многие мировые ученые сходятся во мнении о значимой роли изменений в микробиоте кишечника в развитии психических расстройств и нарушений физиологического гомеостаза [22, 23]. В ряде работ показана связь микробиоты кишечника со сном. Так, вмешательство в режим сна вызывало изменение в составе микробиоты кишечника [9]. Лечение дисбиоза кишечной микробиоты способствовало увеличению продолжительности сна и повышению его эффективности [11]. Вместе с тем многие аспекты взаимосвязи микробиоты кишечника и гормональных, воспалительных биомаркеров у лиц с хронической инсомнией остаются не до конца изученными.

По результатам настоящего исследования, составы микробиоты кишечника у лиц, страдающих хронической инсомнией, и у лиц без инсомнии значительно различаются: у лиц с хронической инсомнией по сравнению с лицами без инсомнии наблюдается более низкое бактериальное α -разнообразие, что подтверждается статистически более низким индексом Chao1 и согласуется с результатами ранее

выполненного исследования [24]. У лиц с хронической инсомнией дисбиотические изменения кишечника характеризовались снижением численности анаэробных бактерий — представителей типа *Faecalibacterium*, *Prevotella* 9 и *Lachnospira*, являющихся продуцентами короткоцепочечных жирных кислот, которые, как известно, обладают противовоспалительным действием [25, 26], и повышением численности потенциальных патобионтов — бактерий *Blautia* и *Eubacterium hallii*, характеризующихся способностью к индукции дисрегуляторных изменений в иммунном ответе с участием регуляторных Т-клеток (Treg) кишечника, противовоспалительного IL10 и восстанавливающего островкового белка 3 γ (REGIII γ , REG3G). Полученные результаты частично соотносятся с данными работы, в которой снижение относительной численности бактерий *Lachnospira* было характерно для лиц, страдающих острой инсомнией [14]. Контрастирование полученных данных может быть обусловлено различиями в методологии включения обследованных в эксперимент. Группы значительно различались по возрасту — 31,6 ± 7,4 лет в нашем исследовании против 43,5 ± 6,9 лет в работе коллег. Кроме того, мы не включали в настоящее исследование лиц с психическими расстройствами с целью нивелирования их влияния на результаты исследования, в то время как в сравниваемой работе [14] наличие психической патологии не являлось критерием исключения.

Установленная в нашей работе сопряженность сниженного содержания бактерий *Faecalibacterium* и повышенного содержания *Blautia* с более высокими баллами по опроснику PSQI и опроснику ISI позволяет предположить, что изменения численности данных бактерий характерны для хронической инсомнии. Кроме того, возможно, что терапевтическое повышение численности *Faecalibacterium* и снижение численности *Blautia* эффективны в отношении выраженности инсомнии, однако для подтверждения данной гипотезы необходимо проведение дополнительных исследований с соответствующим дизайном.

Анализ гормональных и воспалительных биомаркеров показал у лиц с хронической инсомнией по сравнению с лицами без инсомнии статистически значимые различия в уровнях кортизола и IL6. У лиц с инсомнией установлены статистически значимые корреляции биомаркеров с численностью некоторых представителей микробиоты кишечника, что может свидетельствовать о наличии связи состава и численности микробиоты кишечника с нарушениями сна. Так, выявлены обратные корреляции показателей кортизола и численности бактерий *Lachnospira*. Полученные нами результаты противоречат данным исследования, в котором сообщалось об отсутствии значимой корреляции между кортизолом и разнообразием микробиоты кишечника при инсомнии [13]. Несогласованность полученных данных, возможно, обусловлена тем, что в нашем исследовании выборка обследованных включала лиц обоих полов, в то время как

в работе коллег принимали участие только лица мужского пола [13]. Эти данные позволяют сделать предположение о существовании гендерных различий ассоциаций уровня кортизола и состава микробиоты кишечника. Данный вопрос необходимо дополнительно изучать.

Настоящее исследование не подтвердило сопряженность экскреции основного метаболита мелатонина 6-COMT с изменениями микробиоты кишечника у лиц с хронической инсомнией. Мы не встретили работ, посвященных изучению данного вопроса при хронической инсомнии. Вместе с тем, имеются подтверждения роли мелатонина в регуляции состава микробиоты кишечника [27]. Противоречивость данных, возможно, обусловлена тем, что в упомянутом исследовании концентрации мелатонина изучали по уровню экскреции 6-COMT в моче, который в свою очередь характеризует количественную продукцию эпифизарного мелатонина [28], в то время как в ранее выполненной работе [29] авторы изучали уровень энтерального мелатонина в ЖКТ, вырабатываемого энтерохромаффинными клетками кишечника.

Хроническое воспаление может быть значимым патогенетическим звеном, связывающим микробиоту кишечника и регуляцию сна. Так, показано, что хроническая депривация сна связана с повышением концентрации IL6 в плазме крови [30]. Обнаружено, что с уровнем IL6 в плазме крови прямо коррелирует продолжительность сна [31]. Наличие дисбиоза может запускать формирование иммунологического и воспалительного ответа с ростом уровня системных провоспалительных цитокинов. Отмеченная в исследовании [14] корреляция уровня IL6 с численностью бактерий *Faecalibacterium* и *Blautia* у лиц с хронической инсомнией подтвердилась в нашей

работе, что позволяет предположить значимую роль данных бактерий в поддержании воспалительной реакции и, как следствие, в усугублении инсомнии и ее последствий. Несмотря на то что роль бактерий *Blautia* в развитии воспаления доказана, данные о их взаимосвязи неоднозначны. Так, одни авторы указывают на наличие прямой корреляционной связи между численностью *Blautia* и воспалительной дисрегуляцией [32], другие пишут об обратной [33]. Полученные нами результаты показали, что увеличение численности бактерий *Blautia* способствует повышению уровня IL6 в плазме крови. При этом необходимо отметить, что ограничение анализа только определением уровня цитокина IL6 не позволяет нам охарактеризовать воспалительный статус в целом у пациентов с хронической инсомнией.

ВЫВОДЫ

У лиц с хронической инсомнией выявлены выраженные нарушения численности и таксономического состава микробиоты кишечника. Обнаруженные статистически значимые корреляции некоторых представителей микробиоты с PSQI и гормональными, воспалительными биомаркерами свидетельствуют в пользу концепции о связи между численностью и составом микробиоты кишечника и хронической инсомнией. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения значимой роли микробиоты кишечника в патогенезе хронической инсомнии. Актуальным остается вопрос о связи изменений микробиоты кишечника и гормональными биомаркерами. Целенаправленная коррекция микробиоты кишечника может способствовать повышению эффективности терапии хронической инсомнии.

Литература

- Mai E, Buysse DJ. Insomnia: prevalence, impact, pathogenesis, differential diagnosis, and evaluation. *Sleep Med Clin*. 2008; 3 (2): 167–174. DOI: 10.1016/j.smj.2008.02.001.
- Ohayon MM. Epidemiology of insomnia: what we know and what we still need to learn. *Sleep Med Rev*. 2002; 6 (2): 97–111. DOI: 10.1053/smr.2002.0186.
- Levenson JC, Kay DB, Buysse DJ. The pathophysiology of insomnia. *Chest*, 2015, 147: 1179–1192. DOI: 10.1378/chest.14-1617.
- Rodenbeck A, Hajak G. Neuroendocrine dysregulation in primary insomnia. *Rev Neurol (Paris)*. 2001; 157 (11 Pt 2): S57–61.
- Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Stone TW, Darlington LG. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br J Clin Pharmacol*. 2007; 64 (4): 517–26. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2007.02911.x.
- Hurtado-Alvarado G, Dominguez-Salazar E, Pavon L, Velazquez-Moctezuma J, Gomez-Gonzalez B. Blood-brain barrier disruption induced by chronic sleep loss: low-grade inflammation may be the link. *J Immunol Res*. 2016; 2016 (4576012): 1–15. DOI: 10.1155/2016/4576012.
- Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2012; 13 (10): 701–712. DOI: 10.1038/nrn3346.
- Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4 (6): 478–85. DOI: 10.1038/nri1373.
- Thaiss CA, Levy M, Korem T. Microbiota diurnal rhythmicity programs host transcriptome oscillations. *Cell*. 2016; 167 (6): 1495–510.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.003.
- Reynolds AC, Paterson JL, Ferguson SA, Stanley D, Wright KP Jr, Dawson D. The shift work and health research agenda: considering changes in gut microbiota as a pathway linking shift work, sleep loss and circadian misalignment, and metabolic disease. *Sleep Med Rev*. 2017; 34: 3–9. DOI: 10.1016/j.smrv.2016.06.009.
- Jackson ML, Butt H, Ball M, Lewis DP, Bruck D. Sleep quality and the treatment of intestinal microbiota imbalance in chronic fatigue syndrome: a pilot study. *Sleep Sci*. 2015; 8 (3): 124–33. DOI: 10.1016/j.slsci.2015.10.001.
- Poroyko V, Carreras A, Khalyfa A, et al. Chronic Sleep Disruption Alters Gut Microbiota, Induces Systemic and Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Mice. *Sci Rep*. 2016; 6: 35405. DOI: 10.1038/srep35405.
- Smith RP, Easson C, Lyle SM, et al. Gut microbiome diversity is associated with sleep physiology in humans. *PLoS ONE*. 2019; 14 (10): e0222394. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222394/>
- Li Y, Zhang B, Zhou Y, Wang D, et al. Gut Microbiota Changes and Their Relationship with Inflammation in Patients with Acute and Chronic Insomnia. *Nat Sci Sleep*. 2020; 12: 895–905. Available from: <https://doi.org/10.2147/NSS.S271927>.
- American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders: Diagnostic and coding manual. Westchester, Ill.: American Academy of Sleep Medicine, 2014.
- Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, et al. The Pittsburgh sleep quality index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiat Res*. 1989; 28: 193–213.
- Mitra S, Forster-Fromme K, Damms-Machado A, et al. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 2013; 14 (5): 16.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010; 7 (5): 335–36. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.

19. DeSantis, TZ, Hugenholtz P, Larsen N. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 5069–72.
20. Ritari J, Salojärvi J, Lahti L, de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics.* 2015; 16 (1): 1056. DOI: 10.1186/s12864-015-2265-y.
21. Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nat Rev Neurosci.* 2011; 12 (8): 453–66. DOI: 10.1038/nrn3071.
22. Lima-Ojeda JM, Rupprecht R, Baghai TC. «I am I and my bacterial circumstances»: linking gut microbiome, neurodevelopment, and depression. *Front Psychiatry.* 2017; 8: 153. DOI: 10.3389/fpsyt.2017.00153.
23. Vuong HE, Yano JM, Fung TC, Hsiao EY. The microbiome and host behavior. *Annu Rev Neurosci.* 2017; 40: 21–49. DOI: 10.1146/annurev-neuro-072116-031347.
24. Liu B, Lin W, Chen S, et al. Gut Microbiota as a subjective measurement for auxiliary diagnosis of insomnia disorder. *Front Microbiol.* 2019; 10: 1770. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01770.
25. Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology.* 2013; 145 (2): 396–406. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.04.056.
26. Kim CH, Park J, Kim M. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Netw.* 2014; 14 (6): 277–88. DOI: 10.4110/in.2014.14.6.277.
27. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012; 7: 887–902. DOI: 10.2217/fmb.12.61.
28. Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol.* 2011; 17: 3888–98. DOI: 10.3748/wjg.v17.i34.3888.
29. Park YS, Kim SH, Park JW, et al. Melatonin in the colon modulates intestinal microbiota in response to stress and sleep deprivation. *Intest Res.* 2020; 18 (3): 325–36. DOI: 10.5217/ir.2019.00093.
30. Zielinski MR, Kim Y, Karpova SA, McCarley RW, Strecker RE, Gerashchenko D. Chronic sleep restriction elevates brain interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha and attenuates brain-derived neurotrophic factor expression. *Neurosci Lett.* 2014; 580: 27–31. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.07.04.
31. Patel SR, Zhu X, Storer-Isser A, et al. Sleep duration and biomarkers of inflammation. *Sleep.* 2009; 32 (2): 200–4. DOI: 10.1093/sleep/32.2.200.
32. Juste C, Kreil DP, Beauvallet C, et al. Bacterial protein signals are associated with Crohn's disease. *Gut.* 2014; 63 (10): 1566–77. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303786.
33. Zhang J, Guo Z, Xue Z, et al. A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *ISME J.* 2015; 9 (9): 1979–90. DOI: 10.1038/ismej.2015.11.

References

1. Mai E, Buysse DJ. Insomnia: prevalence, impact, pathogenesis, differential diagnosis, and evaluation. *Sleep Med Clin.* 2008; 3 (2): 167–174. DOI: 10.1016/j.jsmc.2008.02.001.
2. Ohayon MM. Epidemiology of insomnia: what we know and what we still need to learn. *Sleep Med Rev.* 2002; 6 (2): 97–111. DOI: 10.1053/smr.2002.0186.
3. Levenson JC, Kay DB, Buysse DJ. The pathophysiology of insomnia. *Chest.* 2015; 147: 1179–1192. DOI: 10.1378/chest.14-1617.
4. Rodenbeck A, Hajak G. Neuroendocrine dysregulation in primary insomnia. *Rev Neurol (Paris).* 2001; 157 (11 Pt 2): S57–61.
5. Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Stone TW, Darlington LG. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br J Clin Pharmacol.* 2007; 64 (4): 517–26. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2007.02911.x.
6. Hurtado-Alvarado G, Dominguez-Salazar E, Pavon L, Velazquez-Moctezuma J, Gomez-Gonzalez B. Blood-brain barrier disruption induced by chronic sleep loss: low-grade inflammation may be the link. *J Immunol Res.* 2016; 2016 (4576012): 1–15. DOI: 10.1155/2016/4576012.
7. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13 (10): 701–712. DOI: 10.1038/nrn3346.
8. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4 (6): 478–85. DOI: 10.1038/nri1373.
9. Thaiss CA, Levy M, Korem T. Microbiota diurnal rhythmicity programs host transcriptome oscillations. *Cell.* 2016; 167 (6): 1495–510.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.003.
10. Reynolds AC, Paterson JL, Ferguson SA, Stanley D, Wright KP Jr, Dawson D. The shift work and health research agenda: considering changes in gut microbiota as a pathway linking shift work, sleep loss and circadian misalignment, and metabolic disease. *Sleep Med Rev.* 2017; 34: 3–9. DOI: 10.1016/j.smr.2016.06.009.
11. Jackson ML, Butt H, Ball M, Lewis JP, Bruck D. Sleep quality and the treatment of intestinal microbiota imbalance in chronic fatigue syndrome: a pilot study. *Sleep Sci.* 2015; 8 (3): 124–33. DOI: 10.1016/j.slsci.2015.10.001.
12. Poroyko V, Carreras A, Khalyfa A, et al. Chronic Sleep Disruption Alters Gut Microbiota, Induces Systemic and Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Mice. *Sci Rep.* 2016; 6: 35405. DOI: 10.1038/srep35405.
13. Smith RP, Easson C, Lyle SM, et al. Gut microbiome diversity is associated with sleep physiology in humans. *PLoS ONE.* 2019; 14 (10): e0222394. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222394/>
14. Li Y, Zhang B, Zhou Y, Wang D, et al. Gut Microbiota Changes and Their Relationship with Inflammation in Patients with Acute and Chronic Insomnia. *Nat Sci Sleep.* 2020; 12: 895–905. Available from: <https://doi.org/10.2147/NSS.S271927>.
15. American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders: Diagnostic and coding manual. Westchester, Ill.: American Academy of Sleep Medicine, 2014.
16. Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, et al. The Pittsburgh sleep quality index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiat Res.* 1989; 28: 193–213.
17. Mitra S, Forster-Fromme K, Damms-Machado A, et al. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics.* 2013; 14 (5): 16.
18. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010; 7 (5): 335–36. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.
19. DeSantis, TZ, Hugenholtz P, Larsen N. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 5069–72.
20. Ritari J, Salojärvi J, Lahti L, de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics.* 2015; 16 (1): 1056. DOI: 10.1186/s12864-015-2265-y.
21. Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nat Rev Neurosci.* 2011; 12 (8): 453–66. DOI: 10.1038/nrn3071.
22. Lima-Ojeda JM, Rupprecht R, Baghai TC. «I am I and my bacterial circumstances»: linking gut microbiome, neurodevelopment, and depression. *Front Psychiatry.* 2017; 8: 153. DOI: 10.3389/fpsyt.2017.00153.
23. Vuong HE, Yano JM, Fung TC, Hsiao EY. The microbiome and host behavior. *Annu Rev Neurosci.* 2017; 40: 21–49. DOI: 10.1146/annurev-neuro-072116-031347.
24. Liu B, Lin W, Chen S, et al. Gut Microbiota as a subjective measurement for auxiliary diagnosis of insomnia disorder. *Front Microbiol.* 2019; 10: 1770. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01770.
25. Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells

- to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology*. 2013; 145 (2): 396–406. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.04.056.
26. Kim CH, Park J, Kim M. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Netw*. 2014; 14 (6): 277–88. DOI: 10.4110/in.2014.14.6.277.
 27. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol*. 2012; 7: 887–902. DOI: 10.2217/fmb.12.61.
 28. Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol*. 2011; 17: 3888–98. DOI: 10.3748/wjg.v17.i34.3888.
 29. Park YS, Kim SH, Park JW, et al. Melatonin in the colon modulates intestinal microbiota in response to stress and sleep deprivation. *Intest Res*. 2020; 18 (3): 325–36. DOI: 10.5217/ir.2019.00093.
 30. Zielinski MR, Kim Y, Karpova SA, McCarley RW, Strecker RE, Gerashchenko D. Chronic sleep restriction elevates brain interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha and attenuates brain-derived neurotrophic factor expression. *Neurosci Lett*. 2014; 580: 27–31. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.07.04.
 31. Patel SR, Zhu X, Storfer-Isser A, et al. Sleep duration and biomarkers of inflammation. *Sleep*. 2009; 32 (2): 200–4. DOI: 10.1093/sleep/32.2.200.
 32. Juste C, Kreil DP, Beauvallet C, et al. Bacterial protein signals are associated with Crohn's disease. *Gut*. 2014; 63 (10): 1566–77. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303786.
 33. Zhang J, Guo Z, Xue Z, et al. A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *ISME J*. 2015; 9 (9): 1979–90. DOI: 10.1038/ismej.2015.11.