

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМ. Г.Н. ГАБРИЧЕВСКОГО»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи



Федоров Денис Сергеевич

**Изменения кишечной микробиоты и ассоциированного с ней метаболома у
больных колоректальным раком: диагностическая значимость и
возможности коррекции**

1.5.11. Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Митрохин Сергей Дмитриевич

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Колоректальный рак и причины заболевания.....	12
1.2. Противоопухолевая защита микробиты человека.....	17
1.3. Роль кишечной микробиоты в поддержании иммунного гомеостаза	19
1.4. Методы системной медицины в диагностике колоректального рака и мониторинге состояния здоровья пациентов	22
1.5. Роль пробиотических препаратов в поддержании защитной функции микробиоты.....	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	58
2.1. Критерии включения, невключения и исключения из исследования пациентов с колоректальным раком.....	58
2.2. Общая характеристика включенных в исследование лиц и дизайн исследования.....	59
2.3. Исследуемое средство микрoэкологической коррекции	61
2.4. Питательные среды, использованные в работе.....	61
2.5. Микробиологические методы исследования.....	62
2.6. Копрологическое исследование.....	63
2.7. Метод определения концентрации летучих жирных кислот в биологических субстратах газожидкостной хроматографией.....	65
2.8. Хромато-масс-спектрометрический анализ	66
2.9. Определение некоторых типов клеточных жирных кислот и альдегидов микроорганизмов.....	68
2.10. Статистические методы исследования	72
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	74
3.1. Качественные, количественные и функциональные изменения кишечной микробиоты и копрологические сдвиги у пациентов с колоректальным раком	74

3.1.1. Родовой и видовой состав микрофлоры кишечника у пациентов с аденокарциномой кишечника	74
3.1.2. Оценка функциональной активности микробиоты кишечника у пациентов с аденокарциномой кишечника.....	85
3.1.3. Копрологические показатели пациентов с аденокарциномой кишечника ...	92
3.2. Изменения гематологических и биохимических показателей, а также концентраций минорных липидных компонентов в крови пациентов с колоректальным раком	95
3.2.1. Изменения показателей общего и биохимического анализа крови пациентов с колоректальным раком и их диагностическая значимость	96
3.2.2. Изменения концентраций минорных липидных компонентов в крови пациентов с колоректальным раком и их диагностическая значимость	103
3.3. Мониторинг системы макроорганизм-микробиота у пациентов с колоректальным раком на фоне микрoэкологической коррекции.....	121
3.3.1. Влияние курсового приема комбинации <i>L. rhamnosus</i> GG, витаминов B1, B2, B6 и цинка на микробный пейзаж кишечника у пациентов с колоректальным раком	122
3.3.2. Влияние пробиотико-витаминно-минерального комплекса на динамику функциональной активности микробиоты кишечника у пациентов с колоректальным раком	132
3.3.3. Оценка эффективности влияния пробиотика на систему макроорганизм-микробиота у пациентов с аденокарциномой в периоперационном периоде	135
3.4. Схема использования пробиотических препаратов при лечении аденокарциномы кишечника.....	137
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	140
ВЫВОДЫ	147
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	148
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ	149
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	150
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	151

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Колоректальный рак сохраняет лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости, оставаясь одной из самых распространённых злокачественных опухолей. По данным мировой статистики, он занимает второе место среди причин онкологической смертности в США, европейских странах и России [105]. В европейском регионе показатель заболеваемости держится в пределах 0,4–0,44 на 100 тысяч населения, причём тенденция к его снижению выражена слабо – даже несмотря на ощутимый прогресс в ранней диагностике и терапии опухолей желудочно-кишечного тракта [111].

Прогноз исхода напрямую определяется тем, на каком этапе выявлен опухолевый процесс: пятилетняя выживаемость достигает 90% при выявлении на I стадии и снижается до 10% при IV стадии [278].

Основным методом лечения остаётся хирургический. При этом неизбежная контаминация зоны операционного поля микрофлорой желудочно-кишечного тракта создаёт риск хирургической инфекции вне зависимости от выбранного способа резекции. Последующая микробная транслокация способна инициировать внекишечные гнойно-септические осложнения, которые ухудшают отдалённые результаты и сокращают общую выживаемость пациентов [95].

Собственная микрофлора кишечника играет важнейшую роль в обеспечении колонизационной резистентности и защите от инфекции. Включение пробиотических и синбиотических средств в схему усиления антимикробной защиты доказало свою клиническую результативность, в том числе в онкологической практике [167].

Клинические критерии оценки эффективности лечения целесообразно дополнять объективными маркерами, полученными путём метаболомного и липидомного профилирования биологических субстратов [179]. Применение

ОМИК-подходов к исследованию метаболома даёт возможность более точно отслеживать терапевтический эффект пробиотиков, а также выявлять колоректальный рак на доклиническом этапе – в условиях бессимптомного течения или при нечётко выраженной симптоматике [201].

Таким образом, выявление и валидация биомаркеров, определение их пороговых значений и прогностической значимости представляют собой крайне востребованную задачу, решение которой направлено на рост выживаемости за счёт раннего выявления заболевания и внедрения более чувствительных инструментов динамического контроля.

Степень разработанности темы исследования

Потребность в разработке диссертационной темы продиктована необходимостью создания принципиально нового инструмента скрининга колоректального рака, опирающегося на методологию точной медицины и арсенал ОМИК-технологий [83]. Выявление ранее не описанных закономерностей, связывающих опухолевый процесс с функциональной активностью кишечной микробиоты, требует комплексного – метаболомного и липидомного – профилирования биологических субстратов. Определение специфического молекулярного паттерна, отражающего метаболическую и липидную активность микробиоценоза, с целью идентификации ранних диагностических маркеров колоректального рака рассматривается как одно из приоритетных направлений персонализированной медицины [79]. Особый интерес представляет анализ экспосома: в отличие от генома, протеома и метаболома, экспосом не ограничен внутриклеточным или межклеточным уровнем, что даёт возможность исследовать систему взаимосвязей между микробным сообществом и макроорганизмом в целом [64].

Таким образом, приведённые данные обосновывают необходимость углублённого изучения функциональной активности микробиома человека – как

для уточнения ранней диагностики колоректального рака, так и для объективной оценки эффективности проводимого лечения.

Цель и задачи исследования

Цель работы – определить критерии оценки метаболома и микробиома человека для эффективного применения средств микроэкологической коррекции у пациентов с аденокарциномой кишечника в периоперационный период.

Задачи исследования:

1. Изучить параметры оценки метаболома человека и кишечной микрофлоры у пациентов с аденокарциномой кишечника на различных стадиях заболевания.
2. Рассчитать критерии оценки метаболома у пациентов с аденокарциномой в периоперационный период.
3. Оценить влияние пробиотических препаратов на функциональную активность микрофлоры кишечника и уровень эндотоксемии.
4. Предложить схему микроэкологической коррекции микробиоты кишечника в периоперационный период для пациентов с аденокарциномой кишечника.

Научная новизна

Впервые установлены биохимические параметры, характеризующие функциональную активность кишечного микробиоценоза у больных аденокарциномой, на основании количественного содержания короткоцепочечных жирных кислот в копрофильtrate; определены соответствующие референсные интервалы.

Впервые с применением линейного дискриминантного анализа вычислены диагностические коэффициенты, позволяющие проводить скрининг колоректального рака по данным общего анализа крови.

Впервые на основе биохимических показателей крови с использованием метода линейного дискриминантного анализа получены расчётные диагностические коэффициенты для скринингового выявления колоректального рака.

Впервые путём липидомного profiling крови с применением линейного дискриминантного анализа определены диагностические коэффициенты, пригодные для скрининга колоректального рака.

Впервые показано, что терапевтический курс синбиотики Комплинекс у пациентов с I–III стадией колоректального рака способствует усилению протективных свойств кишечной микрофлоры, тогда как у больных с IV стадией тот же препарат вызывает развитие эндотоксемии.

Получены свидетельство о регистрации программ для ЭВМ: Федоров Д.С., Метаэкспосом ОНКО-СКРИН/ Д.С. Федоров, А.М. Затевалов, С.Д. Митрохин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, О.Г. Жиленкова // Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2024617289, 01.04.2024. Заявка от 25.03.2024.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработана комплексная система критериев для оценки функциональной активности кишечного микробиоценоза – она базируется на многофакторном анализе взаимосвязей между макроорганизмом и его микробиотой.

Аргументирована целесообразность применения интегрального подхода к оценке состояния микробиоценоза у пациентов с колоректальным раком. В качестве ключевого показателя, отражающего реакцию микробиоты на опухолевый процесс, использована относительная концентрация изовалериановой кислоты.

Установлены пороговые (референсные) значения относительной концентрации изовалериановой кислоты в копрофильtrate для пациентов с колоректальным раком: допустимый уровень не должен превышать 0,05 ед.

Продemonстрирована применимость методов математического моделирования для комплексной оценки функциональной активности микробиоценоза кишечника и метаболома человека. Разработанные и валидированные математические модели обеспечивают прогнозирование наличия колоректального рака с определённой точностью – на основании данных общего и биохимического анализов крови, а также липидного профиля (в том числе по концентрациям минорных липидных компонентов).

Практическая реализация подхода обеспечена созданием программного продукта «Метаэкспосом Онко-скрин». Программа подтверждает потенциал математического моделирования в решении прикладных задач: она расширяет возможности оценки состояния кишечного микробиоценоза, в том числе в динамике на фоне терапии онкологического заболевания.

Результаты исследования интегрированы в практическую деятельность клинко-диагностического центра ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора и в рабочие процессы ЗАО «ЭКОлаб».

Методология и методы исследования

Методологическая база исследования сформирована с учётом заявленной цели и задач работы. В качестве объектов исследования выступали микробные сообщества, выделенные из образцов кала пациентов. Предметом изучения послужили количественные показатели – в частности, уровни короткоцепочечных жирных кислот в копрофильтратах, а также концентрации низкомолекулярных соединений микробного происхождения в сыворотке крови.

Анализ массива научной литературы, посвящённой особенностям функционирования микробиоценозов и подходам к коррекции их нарушений, выполнен с применением формально-логических методов: систематизации, сопоставления и критического обобщения данных. Реализация исследовательских задач обеспечена сочетанием общенаучных методов (сравнительный анализ,

индукция, дедукция) со специализированными методиками, релевантными для микробиологических и метаболомных исследований.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие во всех стадиях реализации научного проекта – от определения объекта исследования до формулирования итоговых выводов и практических рекомендаций. В его задачи входила разработка методологии исследования, предусматривавшей поэтапное применение комплекса методов: на начальном этапе – биохимических, микроскопических и бактериологических, а на последующих – построение системы интегральной оценки состояния микробиоценозов с использованием инструментов математического моделирования и базовых методов статистической обработки данных.

Хроматографические, масс-спектрометрические и микробиологические анализы проводились в кооперации со специалистами ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора. При этом систематизация, аналитическая обработка, статистический анализ и обобщение всех полученных в ходе работы материалов выполнены автором лично.

Положения, выносимые на защиту

1. Реакция микробиоты на колоректальный рак до и после развития метастазов различна и может быть распознана с помощью методов системной медицины.
2. Критерии оценки функциональной активности микробиоты кишечника и липидома человека позволяют диагностировать колоректальный рак, проводить мониторинг состояния микробиоты при лечении колоректального рака.

3. Применения пробиотиков эффективно усиливает защитную функцию микрофлоры кишечника у пациентов с колоректальным раком на ранних стадиях до развития метастазов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа в полной мере соответствует паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология, а именно следующим пунктам направлений исследований: п. 5. Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов; п. 12. Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности; п. 13. Симбиотические микробные сообщества, в том числе микробиота человека и животных.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена репрезентативным объёмом проведённых исследований, а также использованием современных аналитических методик, отличающихся высокой чувствительностью и специфичностью. В работе применены инструменты математического моделирования и статистические методы, адекватные поставленным задачам и характеру полученных данных, – это позволило минимизировать погрешности и повысить надёжность выводов.

Апробация диссертационного исследования проведена на заседании Учёного совета ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора 11 марта 2025 года.

Основные положения диссертации доложены на: XIII Национальном конгрессе бактериологов, Москва 27-28 сентября 2023г.; XIII Всероссийской научно-практической онлайн-конференции, Ростов-на-Дону, 2023 г.; X

Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Электрогорск, 2023 г.; НТК «Кишечный микробиом: профилактика нарушений и пути коррекции». Москва, 04.05.2024.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 10 работ, в том числе 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук; 1 научная статья в издании, индексируемом в международной базе Scopus; 1 иная публикация по теме исследования; 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ; 4 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации изложены на 186 страницах машинописного текста, иллюстрированы 17 таблицами, 16 рисунками. Диссертационная работа включает обзор литературы, материалы и методы исследования, четыре главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы, содержащий 80 отечественных и 242 зарубежных источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Колоректальный рак и причины заболевания

Колоректальный рак представляет собой группу злокачественных новообразований, развивающихся из эпителия слизистой оболочки кишечной стенки ободочной, сигмовидной и прямой кишки [82]. По данным Всемирной организации здравоохранения, по распространённости это заболевание занимает третье место среди всех онкологических патологий, а по частоте летальных исходов – второе [318]. У мужчин колоректальный рак диагностируется чаще, чем у женщин, при этом локализация опухоли в сигмовидной и прямой кишке встречается чаще, чем в ободочной [22].

К факторам, провоцирующим развитие заболевания, относятся наличие аденоматозных полипов, особенности пищевого поведения, возраст старше пятидесяти лет, наследственная предрасположенность, хронические воспалительные заболевания толстого кишечника и иммунодефицитные состояния [19].

К факторам, провоцирующим развитие заболевания, относятся наличие аденоматозных полипов, особенности пищевого поведения, возраст старше пятидесяти лет, наследственная предрасположенность, хронические воспалительные заболевания толстого кишечника и иммунодефицитные состояния [55]. Для оценки риска важны также множественный полипоз, крупные размеры образований – особенно на широком основании, ворсинчатая структура аденоматозных полипов и длительный срок их существования [277]. Пищевые привычки также вносят существенный вклад в риск развития заболевания: содержимое кишечника задерживается в прямой или сигмовидной кишке, что увеличивает продолжительность контакта потенциально канцерогенных компонентов с эпителием; повышенное употребление продуктов животного происхождения, богатых жирами и белками, ассоциировано с ростом вероятности

колоректального рака, тогда как пищевые волокна стимулируют перистальтику и сокращают время контакта кишечной стенки с канцерогенами, снижая риск патологии [14].

Клинические проявления заболевания определяются локализацией опухоли и стадией процесса. На ранних этапах пациенты могут не предъявлять никаких жалоб, и опухоль до определённой стадии выявляется только при специальном обследовании; одним из первых симптомов считается скрытое кровотечение, диагностируемое с помощью специальных тестов [21]. Одним из наиболее выраженных специфических проявлений рака толстой кишки на поздних стадиях является кишечная непроходимость, тяжесть которой зависит от локализации опухоли. В правом отделе толстой кишки, где просвет достаточно широкий, а содержимое имеет кашицеобразную или мягкую консистенцию, заметная непроходимость развивается на терминальных стадиях. В сигмовидной и прямой кишке, где просвет более узкий и содержимое плотнее, обтурация может возникать раньше и проявляется задержкой стула, вздутием живота и схваткообразными болями; по мере прогрессирования присоединяются рвота, отрыжка, признаки дегидратации, а на фоне распада опухоли и активизации гнилостной микрофлоры – зловонные диареи. Переход от компенсированной непроходимости к полной нередко осложняется кровотечением, характер которого зависит от уровня поражения: в ободочной кишке формируется дёгтеобразный стул вследствие ферментации крови кишечным содержимым, а при локализации в прямой или сигмовидной кишке отмечается выделение алой крови из заднего прохода и развитие острой постгеморрагической анемии [118].

К неспецифическим симптомам, характерным и для других заболеваний, относятся общая слабость, раздражительность, тревожность, снижение массы тела, потеря аппетита, вздутие живота и запоры [283].

Рак восходящего отдела толстой кишки имеет некоторые особенности течения. По статистике он чаще развивается у пациентов старше 60 лет. Женщины заболевают чаще чем мужчины. Опухоли в восходящем отделе толстой кишки отличаются высокой иммуногенностью и более успешно поддаются лечению

иммунотерапией. Для опухолей левого фланга на фоне заболевания I и II стадиях прогноз более благоприятный, а на III и IV стадиях менее благоприятный. Высокий риск смертности колоректального рака в восходящем отделе толстой кишки связан с большей шириной просвета по сравнению с нисходящей. Клинические проявления не появляются до того момента пока опухоль не достигнет больших размеров [232].

Отдельную сложность представляют первично-множественные злокачественные опухоли, не связанные между собой и не являющиеся метастазами друг друга: если новообразования диагностированы с промежутком более полугода, их классифицируют как метакронные; такие опухоли могут локализоваться в разных органах либо в различных участках одного органа, нередко встречаясь при сочетании поражений желудочно-кишечного тракта и женской репродуктивной системы; метакронный рак сложнее поддается лечению, однако при ранней диагностике и радикальной терапии вероятность ремиссии выше [264]. Известно, что наиболее частым источником злокачественных новообразований служат аденоматозные полипы толстого кишечника, развитие которых обусловлено мутацией гена APC; длительное существование полипа приводит к изменению гистологической структуры и возникновению дисплазии, а при нарастании её степени отдельные клетки трансформируются в злокачественные – опухоль увеличивается, прорастает новые слои ткани, выходит за пределы органа и инфильтрирует соседние ткани [270].

Среди всех гистологических форм колоректального рака чаще всего встречается аденокарцинома, составляющая 80–85 % случаев, наряду с которой описаны мелкоклеточный, перстневидноклеточный, медуллярный, плоскоклеточный рак и недифференцированные опухоли [274].

В зависимости от характера роста различают экзофитный, эндофитный и смешанный варианты: при экзофитном росте опухоль нарастает в просвете кишки в виде полипов и наростов, а для эндофитного характерен инфильтративный рост вглубь стенки с циркулярным распространением по новым слоям ткани [240]. Клинические формы рака ободочной кишки включают токсико-анемическое

течение, энтероколитическое, диспепсическое, обтурационное, псевдовоспалительное, опухолевое, а также осложнённые варианты. Токсико-анемическая форма проявляется ухудшением общего состояния вследствие интоксикации, гипертермией и снижением уровня эритроцитов и гемоглобина в клиническом анализе крови; энтероколитическая – желудочно-кишечным расстройством на фоне воспалительного процесса с диспепсическими проявлениями, брожением кишечного отделяемого и нарушением проходимости; диспепсическая – кишечной коликой, дискомфортом, вздутием живота и нарушениями стула; обтурационная – симптомами кишечной непроходимости при достижении опухолью больших размеров; псевдовоспалительная – болью в животе, лихорадкой, раздражением брюшины и лейкоцитозом; опухолевая (атипичная) – бессимптомным течением и случайным обнаружением при пальпации; к осложнённым формам относят кишечную непроходимость, перфорацию стенки кишки, кровотечение и воспаление в брюшной полости [107].

Для определения распространённости опухолевого процесса применяется международная классификация TNM (Tumor–Node–Metastasis), являющаяся наиболее распространённой в мире системой стадирования злокачественных заболеваний. В рамках этой системы предусмотрены три категории: распространённость первичной опухоли (T), наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах (N) и наличие отдалённых метастазов (M); на основании их комбинации выделяют четыре стадии: I – опухоль локализуется на подслизистой основе стенки кишки; II – в процесс вовлекается мышечный слой; III – поражение всех слоёв стенки кишки с возможным регионарным метастазированием; IV – наличие отдалённых метастазов [107].

Клиническая картина КР зависит от множества факторов, поэтому данных о клинических симптомах недостаточно для диагностики и определения стадии заболевания. Ранние стадии КР редко имеют выраженные симптомы, поэтому рекомендуется регулярно проходить скрининговые исследования, особенно людям из группы риска. Людям из группы риска рекомендуется обращать внимание на клинические проявления, которые могут быть маркерами КР, а именно

диспепсические расстройства (запоры, диарея, изменения характера стула, вздутие из-за скопления газов метеоризм) боли и чувство дискомфорта в животе [30].

Клиническая картина зависит от множества факторов, поэтому данных о симптомах недостаточно для диагностики и стадирования: ранние стадии редко имеют выраженные проявления, в связи с чем рекомендуется регулярное прохождение скрининговых исследований, особенно лицам из группы риска, которым следует обращать внимание на диспепсические расстройства – запоры, диарею, изменения характера стула, вздутие живота и метеоризм, а также на боли и дискомфорт в животе [30]. При достижении опухолью больших размеров развивается полная или частичная кишечная непроходимость, требующая экстренной медицинской помощи; перфорация стенки кишки на фоне длительного запора приводит к картине острого живота, а кровотечение из опухоли вызывает анемию с бледностью кожных покровов, слабостью, быстрой утомляемостью, снижением работоспособности, головными болями и головокружениями; тяжёлое течение может осложняться перитонеальным канцероматозом и асцитом. На III–IV стадиях возникают симптомы, зависящие от локализации метастатических очагов: при поражении печени – боль и дискомфорт в верхней части живота справа, отсутствие аппетита, тошнота, рвота, а при обширном поражении – желтуха; при метастазах в лёгкие – одышка, упорный хронический кашель, боли в грудной клетке; при поражении костей и позвоночника – мучительные боли и патологические переломы; при метастазах в головной мозг – головные боли, головокружения, нарушение координации движений и походки, судороги и другие неврологические расстройства [175].

Лечение колоректального рака развивается достаточно динамично, однако основным и наиболее эффективным методом остаётся оперативное вмешательство для радикального удаления опухоли. Отмечается прогресс в совершенствовании техники резекции злокачественных опухолей толстой и прямой кишки и снижение частоты послеоперационных осложнений, характеризующихся летальностью пациентов в течение тридцати дней после хирургических вмешательств; данный показатель варьирует в пределах 3–10 % и зависит от стадии и локализации

заболевания, возраста пациента, сопутствующих патологий, экстренности, типа и продолжительности операции [2]. Всё шире применяются малоинвазивные способы хирургии, а эффективность лечения возрастает за счёт комплексного подхода – присоединения лучевой, химиотерапии и таргетной терапии; при возможности проводятся эндоскопические щадящие органосохраняющие вмешательства, а при невозможности эндоскопической операции резекция поражённого участка выполняется с соблюдением правил абластики [75]. Хирургическое лечение колоректального рака сопровождается лимфодиссекцией, поскольку морфологическое исследование удалённых лимфоузлов имеет диагностическое значение, позволяя уточнить наличие метастазов, более точно определить стадию заболевания и определить дальнейшую тактику; помимо поражённого участка кишечника удаляется около 30-40см визуально неизменённой ткани, гистологическое исследование которой позволяет определить наличие опухолевых клеток в краях резекции [61]. Радикальное лечение рака прямой кишки дополняется химиолучевой терапией, позволяющей сохранить прямую кишку и анальный сфинктер; основной задачей хирургов является удаление опухоли и восстановление непрерывности кишечника. При одноэтапном лечении, когда края резекции соединяются анастомозом в ходе одной операции, необходимо, чтобы соединяемые участки имели достаточное кровоснабжение, сшивание проводилось без натяжения, а риски инфекционных осложнений – анастомозита, несостоятельности, некроза и септических осложнений – оставались низкими; для предотвращения септического процесса проводят двухэтапные вмешательства, при которых на первом этапе удаляется опухоль, а на втором выполняются реконструктивные операции по восстановлению непрерывности кишечника [56].

1.2. Противоопухолевая защита микробиоты человека

В современной науке накоплены данные о том, что специфика видового состава микробиоты коррелирует с повышенной вероятностью возникновения

целого ряда неопластических процессов. Так, развитие плоскоклеточного рака полости рта ассоциировано с возрастанием титра в слюне таких микроорганизмов, как *Carnocytophaga gingivalis*, *C. ochracea*, *Eubacterium sabureum*, *Leptotrichia buccalis* и *Streptococcus mitis*. При раке пищевода наблюдается увеличение обсеменённости ротовой полости *Campylobacter consisus*, *C. rectus*, *Treponema denticola*, *S. anginosus*, *S. mitis* на фоне снижения представленности *Helicobacter pylori*. Одновременное нарастание количества *S. mitis* и убыль *Neisseria elongata* могут рассматриваться как признак рака поджелудочной железы. Появление в желчи *Salmonella typhi* и *S. paratyphi* связывают с опухолевым поражением желчного пузыря. Что касается колоректального рака, то для него характерно повышение содержания в кале штаммов *S. bovis*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, представителей родов *Clostridium* и *Bacteroides* при одновременном снижении *Lactobacillus spp.*, *Roseburia*, *Fecalibacterium*, *Microbacterium*, *Anoxybacillus*, *Akkermansia muciniphilia* [103]. Перечень ассоциированных микроорганизмов непрерывно расширяется по мере накопления новых знаний о микробных сообществах кишечника, причём большинство исследований микробиома толстой кишки выполнено на образцах кала – наиболее доступном биологическом материале; вместе с тем микробные сообщества, полученные при колоноскопии, отличаются как по видовому составу, так и по количественным характеристикам [122, 130, 322].

Развитие методов секвенирования микробиома человека открывает новые взаимосвязи между отдельными представителями микробных сообществ и различными формами неоплазий, что подкрепляется интенсивными исследованиями и публикациями в научной литературе. Наибольшее внимание уделяется карциномам респираторного тракта, кишечника и мочеполовых путей, поскольку именно эти биотопы наиболее активно колонизированы микрофлорой, а барьерная функция их слизистых оболочек дополняется выраженными иммунорегуляторными механизмами [307]. Опухолевые процессы, подобно ряду других патологий – в частности, болезни Крона, – способствуют нарушению целостности слизистых покровов, при этом нарастание проницаемости тканей

происходит за счёт дефектов плотных контактов между колоноцитами и эпителиоцитами, что влечёт за собой дизрегуляцию E-кадгерина, β -катенина и иных компонентов плотных клеточных соединений [307].

Микробно-тканевый комплекс слизистой оболочки кишечника представляет собой многокомпонентную структуру, в которой представители индигенной микрофлоры находятся в тесной взаимосвязи с макроорганизмом, поэтому реакцию микробиоты на любые изменения в системе затруднительно интерпретировать при анализе сдвигов одного вида микроорганизма или одного метаболита, особенно если речь идёт о функциональной активности микробиоценоза в целом. Методологические подходы к изучению такой сложной многофакторной системы лежат в русле системной биологии и системной медицины. Тем не менее поиск специфических микроорганизмов-маркеров продолжается, и существуют убедительные примеры доказанной патогенности – в частности, вируса папилломы человека при раке шейки матки и *H. pylori* в патогенезе рака желудка [300]. С помощью метагеномного анализа продемонстрирована способность опухолеассоциированных вирусов вносить в организм протоонкогены. При исследовании метагеномных последовательностей большого числа парных образцов толстой кишки – участков злокачественного новообразования и смежных участков нормальной ткани – выявлены существенные микробиологические различия между соседними биотопами: на участке опухолевого роста наблюдалось снижение обсеменённости Bacteroidota и Bacillota при одновременном увеличении *Fusobacterium nucleatum* [148, 152], что подтверждает значимость изучения микробиома как неотъемлемой составляющей персонализированной медицины [2].

1.3. Роль кишечной микробиоты в поддержании иммунного гомеостаза

В лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой желудочно-кишечного тракта и обозначаемой аббревиатурой GALT, синтезируется

приблизительно шестьдесят процентов всего иммуноглобулина А в организме. Клетки иммунной системы – иммуноциты – сконцентрированы в пейеровых бляшках и лимфоидных фолликулах, а также рассредоточены в собственной пластинке слизистой оболочки, в подслизистом слое и непосредственно среди эпителиальных клеток. За счёт паттернраспознающих рецепторов (PRR) и структурно-функционального полиморфизма CD4⁺-Т-лимфоцитов обеспечивается трансляция разнообразных сигналов через эпителиальные барьеры как из просвета пищеварительного тракта к иммуноцитам, так и в противоположном направлении [23]. Кишечный микробиом поддерживает иммунный гомеостаз посредством воздействия симбионтных и комменсальных микроорганизмов на рецепторно-сигнальные механизмы врождённого иммунитета. Эти механизмы контролируют направление дифференцировки посттимических Т-клеток-предшественников (T-naïve) в сторону эффекторных либо регуляторных популяций, формируя тем самым как иммуностимулирующие, так и толерогенные импульсы. В результате кишечная микробиота усиливает противоинфекционную защиту и предупреждает чрезмерные иммунные реакции как в желудочно-кишечном тракте, так и в прочих биотопах организма [2, 24].

Колонизация желудочно-кишечного тракта микроорганизмами в неонатальном и постнатальном периодах определяет характер онтогенетического становления системного и мукозального иммунитета, что в свою очередь задаёт эффективность противоинфекционного ответа и уровень колонизационной резистентности [174]. Показано также, что равновесие иммунных реакций в дыхательных путях способно регулироваться кишечной микрофлорой [38, 101, 158, 273]. Передача иммунорегулирующих сигналов от кишечных бактерий к макроорганизму осуществляется через Toll-подобные рецепторы (TLR) [25]. При этом TLR2 плазматической мембраны выполняют функцию сенсоров липотейхоевых кислот и липопротеинов бактериальных клеточных стенок. Распознавание липополисахаридов грамотрицательных бактерий обеспечивается поверхностными рецепторами TLR4/MD2 и TLR5, а передачу сигналов от

неметилированных CpG-последовательностей микробной ДНК осуществляют эндосомальные TLR9 [2, 25].

Представители кишечного микробиома способны инициировать противовирусный ответ посредством активации факторов транскрипции и продукции ключевых цитокинов, которые обеспечивают запуск, усиление и регуляцию иммунных реакций. Это подкрепляет концепцию иммунной солидарности слизистых оболочек, согласно которой сигналы, воспринятые в дистальных отделах желудочно-кишечного тракта, активизируют противoinфекционную защиту слизистых других биотопов – в частности, респираторного тракта [2, 220].

Функция NOD-подобных рецепторов (NLR) как сенсоров мурамилпептидов хорошо документирована. Мурамилпептиды представляют собой фрагменты пептидогликана бактериальной клеточной стенки, обладающие способностью активировать противoinфекционный ответ [144]. Будучи низкомолекулярными продуктами деградации клеточной стенки бактерий, они характеризуются широким спектром иммунокорригирующих эффектов и существенно повышают резистентность организма к бактериальным, вирусным и грибковым агентам [15, 60, 67, 230]. По своей химической природе мурамилпептиды относятся к низкомолекулярным гликопептидам и служат лигандами цитоплазматических рецепторов NOD2 [31]. Мурамилпептиды, а также пептиды, содержащие γ -D-глутамил-диаминопимелиновую кислоту, запускают RIP2-зависимую активацию транскрипционных факторов NF- κ B и AP-1, что приводит к продукции фактора некроза опухоли, интерлейкина-1, интерлейкина-18 и ряда других ключевых медиаторов противoinфекционного ответа [10, 17, 25]. Установлено, что мурамилпептиды стимулируют синтез α/β -интерферонов по RIP2-, NOD2-, TBK1- и IRF5/IRF7-опосредованному пути [27]. Интерфероны I типа индуцируют экспрессию интерферонстимулированных генов (ISG), продукты которых блокируют репродукцию вирусов [25]. Мурамилпептиды задействованы и в механизмах противоопухолевого иммунитета, поскольку отдельные паттернраспознающие рецепторы наряду со стимулирующими сигналами

передают от кишечных микроорганизмов также и толерогенные [1, 2, 26]. Постепенно расширяются сведения и о других рецепторных структурах и внутриклеточных сигнальных каскадах, обеспечивающих иммуногомеостатическую функцию микробиоты.

1.4. Методы системной медицины в диагностике колоректального рака и мониторинге состояния здоровья пациентов

Современная наука располагает целым комплексом технологий, объединяемых под общим названием «омиксных» и опирающихся на достижения геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики. В борьбе с опухолевыми процессами эти подходы получили широкое распространение. Секвенирование генома позволяет выявлять конкретные мутации, присущие раковым клеткам, которые могут как усиливать, так и подавлять активность определённых генов, что приводит к изменению концентрации соответствующих белков. Для коррекции этих нарушений требуются препараты, способные либо ингибировать, либо стимулировать синтез белкового продукта, и подбор таких средств осуществляется на основе результатов секвенирования в рамках personalised подхода [50].

Персонализированная медицина представляет собой модель оказания медицинской помощи, адаптированную к индивидуальным характеристикам конкретного пациента, и реализуется через фармакогеномику и ДНК-ориентированную терапию. Её ключевое направление – подбор оптимальных диагностических, лечебных и профилактических стратегий с учётом генетических, физиологических и биохимических особенностей каждого человека. На сегодняшний день онкология и фармакогеномика являются теми отраслями, где персонализированный подход применяется наиболее активно с использованием ОМИК-технологий. Именно онкология стоит на пороге качественного перехода, при котором лечение опухоли будет определяться её генетическим профилем, а не

только анатомической локализацией. Однако учитывая многообразие генетических механизмов, которыми опухолевые клетки обеспечивают собственный рост, dissemination и устойчивость к терапии, для полной реализации этого направления необходим масштабный объём дальнейших исследований. Злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта относятся к числу наиболее распространённых патологий, и определение молекулярного типа опухоли имеет решающее значение для оценки прогноза и выбора тактики лечения [36].

Начало XXI века ознаменовалось формированием ряда дисциплин, получивших названия по объекту исследования: геномика, протеомика, метаболомика. Метаболомика занимает среди них особое положение, поскольку отражает фенотипические изменения и сдвиги в патофизиологических состояниях биологических систем на наиболее дистальном уровне. Эта научная область изучает совокупность всех исходных, промежуточных и конечных продуктов обмена веществ и их количественное содержание в организме. Метаболом представляет собой конечный результат экспрессии генов и, следовательно, отображает изменения как транскриптома, так и протеома, являясь наиболее «ключевым» уровнем молекулярной жизни клетки. В организме человека присутствует около 17 000 компонентов с молекулярной массой до 1500 Да [33]. Изменения в метаболитном профиле отражают сдвиги в концентрации ферментов, клеточной регуляции, сигнальных путях, генетических вариациях, а также в катаболических и анаболических реакциях. Метаболиты наиболее непосредственно характеризуют физиологическое и молекулярное состояние организма [66]. Данный подход применяется, в частности, для выявления метаболических различий между разными типами рака щитовидной железы, а методы масс-спектрометрии и магнитной спектроскопии позволяют проводить качественное и количественное профилирование малых молекул в биологических системах.

Применение ОМИК-технологий в клинической практике представляется крайне перспективным и актуальным, и в обозримом будущем они способны трансформировать подходы как к дифференциальной диагностике, так и к

классификации колоректального рака [77]. Дальнейшие исследования и клинические испытания открывают значительные перспективы для молекулярной поддержки традиционной диагностики этого заболевания, и такие методы должны стать неотъемлемой частью стандартного диагностического алгоритма. Метаболомика предоставляет ценную информацию о метаболизме злокачественных клеток и обладает значительным потенциалом в изучении колоректального рака, а также в поиске новых диагностических и прогностических маркеров [90]. Внедрение метаболомических исследований в контексте ОМИК-технологий персонализированной медицины позволит охватить различные возрастные группы населения, снизить вероятность врачебных ошибок и повысить эффективность профилактики и лечения онкологических заболеваний. Это создаёт предпосылки для раннего выявления рака и других патологий, трудно поддающихся диагностике на начальных стадиях. В связи с этим существует настоятельная потребность в применении молекулярных инструментов в диагностической практике с последующей разработкой рентабельных протоколов и совершенствованием существующих подходов.

Методология системной медицины постепенно трансформирует представления о стратегии охраны здоровья человека. По мере совершенствования технологий диагностики и лечения различных заболеваний исследовательский фокус смещается в сторону профилактики и предиктивной диагностики, выявляющей паттерны патологии по характеру реакций организма и микробиоты. Комплексное изучение макроорганизма и его микробного сообщества как единого биологического объекта на современном технологическом уровне требует внедрения новой терминологии, критериев и форм организации медицинской помощи. Терапевтическое вмешательство должно начинаться задолго до появления клинических признаков болезни, а необходимость его проведения должна определяться результатами скрининговых и предиктивных исследований, становящихся неотъемлемым элементом регулярного диспансерного наблюдения [50].

К числу основных причин смертности от болезней относятся сердечно-сосудистые, респираторные и онкологические патологии, в основе которых лежат нездоровый образ жизни и недооценка хронических заболеваний, прогрессирующих с годами. Внедрение принципов партисипаторной, профилактической и персонифицированной медицины открывает значительные перспективы в снижении заболеваемости и улучшении качества жизни [234].

В фундаменте предиктивной диагностики лежат ОМИК-технологии, использующие реакцию макроорганизма и микробиоты в качестве сенсора патологических сдвигов. Микробиом представляет собой неотъемлемый орган макроорганизма, который во взаимодействии с другими тканями и системами обеспечивает его жизнедеятельность. Это взаимодействие базируется на взаимовлиянии целых клеток, а также продуцируемых ими регуляторных макро- и микромолекул, которые играют определяющую роль в поддержании гомеостаза [77].

Короткоцепочечные жирные кислоты представляют собой эпигенетически значимые молекулы, продуцируемые исключительно комменсальными микроорганизмами в процессе ферментации сложных неперевариваемых углеводов и клетчатки. В экспериментах на лабораторных мышах-гнотобионтах было продемонстрировано, что эти кислоты подавляют деацетилазную активность гистондеацетилаз, что приводит к повышению ацетилирования гистонов и изменениям структуры хроматина, обычно ассоциированным с усилением экспрессии генов-мишеней. У мышей-гнотобиотов регистрируются минимальные уровни как кишечных, так и периферических короткоцепочечных жирных кислот [112, 200, 296], а добавление последних способно в значительной мере восстановить транскрипционные и эпигенетические профили, приближая их к показателям животных с нормальной микробиотой [120]. Наряду с ингибированием гистондеацетилаз, короткоцепочечные жирные кислоты способствуют поддержанию уровня ацетил-коэнзима А, который служит донором ацетильных групп и впоследствии влияет на промежуточные соединения цикла трикарбоновых кислот – альфа-кетоглутарат, фумарат и сукцинат, модулирующие

ферментативную активность ТЕТ-метилцитозиндиоксигеназ, задействованных в метилировании ДНК [138].

Метилирование ДНК представляет собой эпигенетическую модификацию, при которой метильные группы ковалентно присоединяются к основаниям цитозина или аденина с участием ДНК-метилтрансфераз и использованием донорного метаболита SAM. Метилированные остатки ДНК часто располагаются в CpG-островках и обычно ассоциированы с репрессией генов за счёт физического ограничения доступа регуляторных факторов к ДНК, особенно в случаях, когда они локализованы вблизи промоторных областей. Изменения в паттернах метилирования ДНК стали одним из первых свидетельств влияния микробиоты на эпигеном хозяина. В частности, метилирование 5' CpG-островков гена Toll-подобного рецептора 4 было снижено в эпителиальных клетках толстой кишки мышей-гнотобиотов по сравнению с животными в обычных условиях, что приводило к снижению экспрессии Tlr4 и чувствительности к липополисахариду [134]. Деметилирование также было зафиксировано в гене хемокинового лиганда Cxcl16 в толстой кишке и лёгких гнотобиотических мышей, что свидетельствует о сниженном накоплении инвариантных естественных Т-киллеров слизистой оболочки при отсутствии микробиоты [207]. Микробиота также направляла метилирование ДНК в регуляторных Т-клетках путём увеличения экспрессии Uhrf1 – белка-адаптера метилирования ДНК, формирующего комплексы с Dnmt1 и HDAC1 [290]. Специфическая для Т-клеток делеция Uhrf1 нарушала экспрессию генов нормального клеточного цикла в Treg и приводила к спонтанному развитию колита.

Последующие исследования обнаружили, что микробиота в более широком смысле влияет на метилом ДНК млекопитающих во многих типах клеток и тканей – как в условиях гомеостаза, так и при патологии. Анализ транскриптома и глобального метилирования ДНК в клетках эпителия толстой кишки у мышей показал, что воздействие микробиоты индуцировало гипометилирование ДНК и усиленную экспрессию антибактериальных и противовоспалительных генов [298]. Это зависимое от микробиоты деметилирование коррелировало с повышенной

экспрессией и активностью ферментов ДНК-деметилазы Tet3 и Dnmt1 [151]. В модели химически индуцированного колита с использованием декстран-сульфата натрия у мышей с нормальной микробиотой в клетках кишечного эпителия происходило дальнейшее гипометилирование ДНК, тогда как у животных без микробиома метилирование оставалось неизменным [298]. У людей метилирование ДНК в биоптатах толстой кишки коррелировало с составом микробиоты – увеличением *Enterbacteriaceae* и *Bacteroides*, обладающих провоспалительным действием *in vitro* и коррелирующих с эпигенетическими маркерами генов иммунного ответа, а также с воспалительным статусом. Воспалённые и невоспалённые сегменты толстой кишки как при болезни Крона, так и при язвенном колите различаются по составу микробиоты и эпигенетическим профилям [109]. Показано, что язвенный колит у ряда пациентов предшествует развитию колоректального рака, а прогрессирование заболевания ассоциировано с микробным дисбиозом [128, 190]. Примечательно, что высокие уровни *Fusobacterium* коррелировали с повышенным метилированием ДНК в генах, ассоциированных с колоректальным раком, у пациентов с язвенным колитом [247]. Микробиота, связанная с колоректальным раком, дополнительно коррелировала с метилированием ДНК в большой когорте пациентов, а при колонизации кишечника мышей-гнотобиотов способствовала гиперплазии эпителия и метилированию ДНК [110]. Связь между микробным составом кишечника и метилированием ДНК также наблюдалась у людей с ожирением, особенно в отношении генов, участвующих в регуляции энергетического обмена в крови и жировой ткани [161]. В совокупности эти результаты подчёркивают взаимосвязь между микробиотой и паттернами метилирования ДНК в гомеостатических и патологических условиях, а также то, что изменения метилирования, ассоциированные с микробиотой, могут предсказывать воспалительно-обусловленный канцерогенез в кишечнике.

Помимо зависящего от микробиоты метилирования ДНК у взрослых, недавние исследования подчеркнули значимость метилирования, индуцируемого комменсальными микробами в раннем возрасте. Кишечник новорождённого обладает уникальной чувствительностью к первоначальной микробной

колонизации после рождения, при этом сложность и плотность микробиоты постепенно нарастают по мере взросления. Это критическое раннее окно имеет важнейшее значение для постнатального развития тканей и формирования нормальных иммунных реакций [155, 168, 188, 243]. Чувствительное к микробиоте дифференциальное метилирование ДНК и экспрессия генов были обнаружены в эпителиальных клетках тонкой кишки мышей в ходе постнатального развития и коррелировали со сдвигами уровней транскриптов ферментов метилирования и деметилирования ДНК Dnmt3a и Tet3 [140]. Ранняя микробная колонизация также ассоциировалась с изменением метилирования ДНК в генах, связанных с иммунитетом, метаболизмом и сосудистой регуляцией, в клетках эпителия подвздошной кишки у недоношенных поросят, получавших антибиотики [129]. Аналогичные изменения продемонстрированы в кишечных стволовых клетках толстой кишки, где установленные в процессе развития закономерности метилирования ДНК, особенно на 3' CpG-островках генов гликозилирования, участвующих в клеточной дифференцировке, были существенно ослаблены при отсутствии кишечной микробиоты [246]. При этом не наблюдалось связи с нарушением активности Dnmt1, в отличие от результатов в зрелых клетках кишечного эпителия [151, 298]. Неонатальная колонизация также защищает от заболеваний лёгких и кишечника, предотвращая накопление инвариантных естественных Т-киллеров в этих органах за счёт снижения метилирования ДНК Sxcl16 и экспрессии данного гена [207]. *In vitro* дифференциальное метилирование ДНК наблюдалось в линиях эпителиальных клеток плода и зрелого кишечника человека, подвергшихся воздействию комменсальных или патогенных бактерий, причём клетки плода демонстрировали большую чувствительность к модификациям, вызванным патогенами, по сравнению со взрослыми клетками [136].

Посттрансляционные модификации белков-гистонов представляют собой ещё один ключевой механизм микробной регуляции хроматина хозяина. Эти модификации, в отличие от прямого воздействия на ДНК, обычно ковалентно присоединяются к остаткам лизина на хвостах гистонов, влияя на конформацию

хроматина и экспрессию генов. Хотя описано более двадцати уникальных классов модификаций гистонов, ацетилирование и метилирование наиболее часто изучаются в контексте микробной регуляции [321]. Эти модификации уравниваются активностью противоположных классов эпигенетических ферментов: гистонацетилтрансфераз и гистондеацетилаз, гистоновых метилтрансфераз и деметилаз. Однако новые исследования выявляют потенциальную роль дополнительных модификаций, таких как кротонилирование и этилирование, во взаимодействии микробиоты и хозяина [214, 309].

Изменения доступности хроматина, обусловленные модификациями гистонов под влиянием микробиоты, описаны во многих тканях и клеточных популяциях. Показано, что кишечная микробиота глобально изменяет ацетилирование и метилирование гистонов H3 и H4 в различных тканях – толстой кишке, печени и жировой ткани – в зависимости от характера питания, а добавление короткоцепочечных жирных кислот в рацион мышей-гнотобиотов частично восстанавливало чувствительные к микробиоте модификации гистонов и экспрессию соответствующих генов [120]. Недавнее исследование также продемонстрировало, что перенос микробиоты слепой кишки от самок к детёнышам, получавшим антибиотики в раннем возрасте, восстанавливал модификации гистонов в подвздошной кишке и печени [196]. В частности, перенос микробиоты привёл к деацетилированию и триметилированию лизина 27, потенциально за счёт усиления активности лизиндиметилазы D3 семейства Jumanji в ответ на индукцию Tlr2, что указывает на способность микробиоты предотвращать экспрессию генов, индуцированных антибиотиками. В кишечном эпителии дифференциальное метилирование гистонов H3K4me3, ассоциированное с активной транскрипцией, было идентифицировано в генах эпителиальных клеток подвздошной кишки гнотобиотов в сравнении с мышами в обычных условиях. Часть обнаруженных модификаций перекрывалась с профилями H3K4me3, уникальными для пациентов с впервые диагностированными воспалительными заболеваниями кишечника по сравнению со здоровыми контролями [221]. Также установлено, что модификация H3K4me3 специфически регулируется на

промоторах Wnt-чувствительных генов под действием галловой кислоты – одного из метаболитов микробного происхождения [292], что подтверждает влияние микробиоты на хроматин хозяина посредством модификаций гистонов не только в норме, но и в условиях воспаления и заболевания.

В соответствии с глобальными изменениями ацетилирования гистонов, вызванными микробиотой, исследования показали, что ферменты HDAC участвуют в поддержании зависимого от микробиоты гомеостаза кишечника. В частности, HDAC3 – деацетилаза гистонов класса I, высоко экспрессируемая в эпителии кишечника – чувствительна к микробным сигналам. Специфическая для клеток кишечника делеция HDAC3 увеличивала ацетилирование H3K9 и экспрессию генов, изменяла гомеостаз клеток Панета и барьерную функцию кишечника, а также нарушала реакцию на воспаление, индуцированное декстран-сульфатом натрия [165]. Важно отметить, что аномалии у мышей с делецией HDAC3 проявлялись только у животных с нормальной микрофлорой, но не у гнотобиотов, что свидетельствует о необходимости этого фермента для интеграции сигналов от комменсальных бактерий и калибровки ответов эпителиальных клеток, обеспечивающих нормальные взаимоотношения между хозяином и комменсалами. В условиях диеты с высоким содержанием жиров изменения сигналов микробиоты и нарушение HDAC3 в кишечном эпителии предотвращали развитие ожирения [123, 294]. В соответствии с этими данными было описано повышение H3K27Ac – маркера активных энхансеров – в метаболических генах эпителия толстой кишки в ответ на перенос микробиоты, ассоциированной с ожирением, по сравнению с реципиентами контрольной микробиоты [89]. Микробиота также усиливала защиту от бактериального патогена *Citrobacter rodentium* посредством зависимой от микробиоты регуляции специфической для кишечника HDAC3 [137, 218].

Наиболее распространённые короткоцепочечные жирные кислоты в просвете кишечника млекопитающих – ацетат, пропионат и бутират – обнаруживаются в молярном соотношении 60:20:20 и могут достигать пиковых концентраций до 100 мМ [275]. Они ингибируют гистондеацетилазы, что часто приводит к увеличению ацетилирования гистонов на прямых мишенях этих ферментов. Несмотря на

обилие короткоцепочечных жирных кислот, ингибирующих HDAC в кишечнике, недавняя работа показала, что активность HDAC3 была повышена в клетках эпителия кишечника мышей с нормальным микробиомом по сравнению с гнотобиотами за счёт продукции кишечными комменсалами активирующего метаболита – инозитолтрифосфата [213]. В соответствии с этим, клетки эпителия кишечника мышей, колонизированных только бактериями, продуцирующими IP3, демонстрировали снижение H3K9Ac в генах-мишенях HDAC3. В эпителиальных стволовых клетках кишечника, расположенных у основания крипт и анатомически защищённых от воздействия короткоцепочечных жирных кислот, введение бутирата непосредственно в эти клетки ингибировало активность HDAC и повышало ацетилирование H3K9 и H3K27, что сопровождалось нарушением пролиферации и ответа на повреждение [288]. Таким образом, регуляция HDAC3 микробиотой происходит во многих популяциях эпителиальных клеток и отражает нечто большее, чем простое ингибирование, опосредованное короткоцепочечными жирными кислотами, а опирается на интеграцию множества микробных сигналов. Требуются дополнительные исследования для выяснения того, регулируются ли микробиотой другие модификаторы гистонов, контролирующие физиологию кишечника, такие как HDAC1 и HDAC2 [125, 164, 286].

Кротонилирование лизина представляет собой относительно малоизученную модификацию гистонов, распространённую в активных промоторах и энхансерах клеток млекопитающих [170]. Хотя добавление или удаление кротонильных мотивов может катализироваться специализированными гистон-кротонилтрансферазами и декротонилазами, также сообщалось, что НАТ и HDAC проявляют гистон-модифицирующую активность по отношению к кротонилу [147]. В соответствии с этим, уровни кротонилирования гистонов H3 и H4 были значительно снижены в толстой кишке мышей, получавших антибиотики, а введение ингибитора HDAC бутирата способствовало кротонилированию гистонов [214]. В совокупности эти исследования показывают, что микробиота стимулирует несколько типов модификаций гистонов и регулирует активность гистон-

модифицирующих ферментов для настройки как локального, так и внекишечного состояния хроматина.

Иммунные клетки аналогичным образом подвергаются масштабным модификациям гистонов в ответ на микробную колонизацию. Мононуклеарные фагоциты – макрофаги и дендритные клетки – нуждаются в микробных сигналах для эпигенетической и транскрипционной активации генов, участвующих в передаче сигналов интерферона и инициации нормальных Т-клеточных ответов [217, 250]. У мышей-гнотобиотов или животных, получавших антибиотики, наблюдалось снижение уровня H3K4me3 в генах, вовлечённых в провоспалительные реакции, включая интерферон I типа, и увеличение H3K27me3 в метаболических путях по сравнению с клетками, подвергшимися воздействию микробиоты. Микробиота дополнительно поддерживает противовоспалительный фенотип в макрофагах посредством HDAC3-опосредованного деацетилирования гистонов гена провоспалительного цитокина IL-12 β [172]. Подобные изменения в доступности хроматина, определяемые повышением H3K4me2, были показаны в регуляторных элементах врождённых лимфоидных клеток, что благоприятствует фенотипу ILC3 по сравнению с ILC1 или ILC2 в ответ на микробные стимулы [275]. Недавно был обнаружен новый метаболит микробиоты – этионин, продуцируемый комменсальной бактерией *Lactobacillus reuteri* через двухуглеродный фолатный цикл [309]. Этионин ингибирует метилирование гистонов [306], и масс-спектрометрический анализ показал, что моноцитарные клетки человека линии THP-1, обработанные этионином, преимущественно включали этильные группы в остатки лизина гистона H3 вместо метильных групп. Более того, моноциты, обработанные этионином, не смогли активировать передачу сигналов через NF- κ B или экспрессию TNF- α в ответ на воздействие липополисахарида [309].

Подобно тому, как это происходит в эпителиальных клетках кишечника, отдельные бактериальные популяции влияют на модификации гистонов в иммунных клетках. Колонизация сегментированными нитчатыми бактериями или введение индуцированного ими сывороточного амилоида A увеличивала экспрессию деметилазы *Jmjd3* и повышала глобальный уровень H3K27me3 в

клетках костномозгового происхождения, что приводило к улучшению защиты от инфекции *Entamoeba histolytica* [266]. Колонизация *Clostridium scindens* способствовала экспрессии той же деметилазы *Jmjd3*, нацеленной на H3K27, в костномозговых предшественниках гранулоцитов-моноцитов, а также повышала H3K4me3 и снижала H3K27Ac в промоторных областях генов гранулопоэза СЕВРА и СЕВРВ, что приводило к увеличению количества нейтрофилов и усилению защиты от *E. histolytica* [160]. *C. scindens* метаболизирует холевую кислоту в дезоксихолевую, а внешнее введение дезоксихолата увеличивало экспрессию *Jmjd3* в предшественниках гранулоцитов-моноцитов [160]. Также было показано, что *C. scindens* метаболизирует холевую кислоту из группы желчных кислот в дезоксихолевую, а внешнее введение дезоксихолата увеличивает экспрессию *Jmjd3* в предшественниках гранулоцитов-моноцитов [160]. В совокупности эти исследования демонстрируют, что кишечная микробиота или отдельные комменсальные виды изменяют состояние хроматина в нескольких типах иммунных клеток, регулируя ковалентные модификации гистонов или активность модифицирующих ферментов.

Помимо глобальных изменений в модификациях гистонов, недавние открытия показывают, что микробиота демонстрирует циркадную ритмичность, регулируемую транскриптом и эпигеном хозяина на уровне модификаций гистонов [216, 294]. Суточные циклы в составе и численности микробиоты соответствовали аналогичной ритмичности модификаций гистонов, маркирующих активные промоторы и энхансеры, а также экспрессию циркадных генов в эпителии толстой кишки. Колебания в ландшафте хроматина и транскрипционные реакции в значительной степени утрачивались при нарушении микробиоты антибиотиками или у гнотобиотов, что указывает на необходимость нормальных колебаний микробиоты для поддержания циркадных циклов [216]. Подобные циклические закономерности ацетилирования H3K27 и H3K9 обнаружены в тонкой кишке мышей с нормальным микробиомом, но не у гнотобиотов, что было связано с отсутствием осциллирующей экспрессии HDAC3 под действием комменсальных микробов [294]. Моно-колонизация *Bacteroides thetaiotaomicron* оказалась

достаточной для увеличения экспрессии HDAC3 [294], подтверждая, что определённые виды-комменсалы способны оказывать выраженное воздействие на эпигеном хозяина, а естественная циркадная ритмичность микробиоты добавляет дополнительный уровень сложности в регуляцию эпигенома.

Короткоцепочечные жирные кислоты стали широко признанными посредниками между микробиотой и популяциями иммунных клеток слизистой оболочки. Регуляция с их помощью распространяется на компартменты как врождённого, так и адаптивного иммунитета – как локально в кишечнике, так и системно, что осуществляется за счёт комбинации ингибирования HDAC и активации специфических G-белок-связанных рецепторов [199, 260]. Обработка кишечных или костномозговых макрофагов бутиратом ингибировала активность HDAC и повышала ацетилирование гистона H3 в генах вторичного ответа, включая IL-6, IL-12 и гены медиаторов сигнального пути STAT6 [208, 296]. Однако экспрессия этих генов в ответ на бутират не повышалась, а снижалась, что отражает противовоспалительный фенотип макрофагов M2, ослабляющий воспаление при колите, индуцированном декстран-сульфатом натрия. Бутират и в меньшей степени пропионат улучшали защиту от кишечных патогенов, способствуя дифференцировке моноцитов в макрофаги и активируя антимикробную транскрипционную программу через ингибирование HDAC3 [302]. Короткоцепочечные жирные кислоты также способствуют продукции IL-22 и ацетилированию гистонов соответствующего гена во врождённых лимфоидных клетках и CD4⁺ Т-клетках посредством комбинации активации GPCR-рецептора GPR41 и ингибирования HDAC, что усиливает защиту от воспаления кишечника при бактериальной инфекции [2, 181]. Бутират ингибирует HDAC и активирует GPR109A в макрофагах толстой кишки и дендритных клетках, позволяя им стимулировать дифференцировку противовоспалительных регуляторных Т-клеток [85, 104, 200].

Регуляторные Т-клетки характеризуются экспрессией фактора транскрипции Foxp3 и действуют путём подавления aberrантных воспалительных и эффекторных реакций, играя значительную роль в иммунном гомеостазе и поддержании

толерантности к микробиоте. Колонизация клостридиями или введение продуцируемого ими бутирата увеличивают частоту циркулирующих Treg, индуцируя ацетилирование гистона H3 в регуляторных областях локуса Foxp3 [112]. Введение пропионата или делеция HDAC3, HDAC6 или HDAC9 приводили как к усилению ацетилирования H3K9 в локусе Foxp3, так и к повышению стабильности белка Foxp3 при его посттрансляционном ацетилировании в присутствии короткоцепочечных жирных кислот [146, 166, 297]. Бутират, продуцируемый *Faecalibacterium prausnitzii*, подавлял дифференцировку Th17 и одновременно стимулировал Treg, ингибируя активность HDAC3 и HDAC1 *in vitro* и *in vivo* [142, 143]. Ацетат также ингибировал HDAC и повышал общее ацетилирование гистонов H3 и H4 в активируемых первичных CD4⁺ Т-клетках человека [133], хотя прямое ингибирование HDAC ацетатом остаётся дискуссионным вопросом [176, 183, 200]. Помимо бутирата, пентаноат – пятиуглеродная жирная кислота – снижает выработку IL-17A CD4⁺ Т-клетками через HDAC и индуцирует ацетилирование гистонов гена IL-10 и его экспрессию в CD4⁺ Т-клетках и регуляторных В-клетках, ослабляя аутоиммунные реакции [303].

В отличие от физиологических концентраций, повышенные уровни бутирата в Т-клетках индуцировали экспрессию и ацетилирование гистонов H3 в генах, ассоциированных с Th1, включая IFN γ и Tbx21, в условиях, соответствующих дифференцировке в Treg, тогда как экспрессия факторов транскрипции ROR γ t и Gata3 не индуцировалась [295]. Высокие концентрации бутирата, введённые мышам-гнотобиотам, приводили к повышенной продукции IFN γ и усугубляли состояние в модели колита, вызванного декстран-сульфатом натрия. Другое исследование показало, что бутират способствует развитию Th1, но подавляет дифференцировку Th17 из наивных Т-клеток *in vitro* и *in vivo*, ингибируя HDAC независимо от активации GPR43, которая способна индуцировать экспрессию T-bet и противовоспалительного цитокина IL-10 [219]. Таким образом, короткоцепочечные жирные кислоты оказывают зависящие от иммунологического контекста и концентрации эффекты, которые обычно способствуют фенотипу с низким уровнем Th17 и высоким Treg, защищающему от воспаления кишечника.

Цитотоксические Т-лимфоциты CD8⁺ защищают от внутриклеточных патогенов и способны разрушать раковые клетки. Бутират и в некоторой степени пропионат увеличивают экспрессию эффекторных молекул, включая CD25, IFN- γ и TNF- α , в селезённых и мезентериальных CD8⁺ Т-клетках независимо от активации GPR41 или GPR43, что приводит к усилению противоопухолевой активности [261]. Данная регуляция была обусловлена ингибированием HDAC с соответствующим увеличением ацетилирования гистона H4 на промоторах IFN γ и Tbx21 [226, 295]. Бутират и пентаноат, продуцируемые *Megasphaera massiliensis*, улучшают противоопухолевую реактивность антигенспецифичных CD8⁺ Т-клеток за счёт увеличения выработки эффекторных цитокинов IFN γ и TNF- α через ингибирование HDAC [210]. Повышенное содержание короткоцепочечных жирных кислот в результате диеты с высоким содержанием клетчатки способствует активации CD8⁺ Т-клеток и их последующему переходу в клетки памяти в контексте вирусных инфекций [121, 215].

Короткоцепочечные жирные кислоты, продуцируемые микробиотой, поддерживают дифференцировку В-клеток кишечника и выработку антител путём ингибирования HDAC, что приводит к усилению ацетилирования гистонов и экспрессии нескольких генов, связанных с функцией В-клеток [159]. Подобные эффекты наблюдались в В-клетках человека и мыши, обработанных бутиратом и пропионатом, которые дозозависимо противодействовали деацетилированию H3K9 и репрессии транскрипции микроРНК, нацеленных на гены дифференцировки В-клеток [94]. Бутират и пропионат также ограничивали внутренние функции нормальных В-клеток, включая переключение классов иммуноглобулинов и соматическую гипермутацию. Таким образом, микробные короткоцепочечные жирные кислоты оказывают выраженное иммуномодулирующее действие как на врождённые, так и на адаптивные иммунные клетки, поддерживая гомеостаз и ослабляя воспаление в кишечнике.

Реализация мультиомных подходов показала, что микробиота ответственна за выработку множества биологически активных метаболитов, способствующих эпигенетическим модификациям. Сравнительный метагеномный анализ

микробиома у людей и выявление видоспецифичных эпигенетических модификаций показывают, что обогащение определёнными видами бактерий потенциально может модулировать уникальные характеристики экспрессии генов. Связи между составом микробиоты и эпигенетическими модификациями при воспалительных заболеваниях кишечника, раке и ожирении указывают на то, что эпигенетические паттерны могут служить диагностическими инструментами, связывающими генетическую предрасположенность и микробный дисбиоз с патогенезом. Усовершенствованные методы анализа хроматина, включая возможности single-cell подходов, способны выявить эпигенетическую гетерогенность внутри клеточной популяции или в редких типах клеток в ответ на микробные воздействия. Генетически модифицированные бактерии, специфически влияющие на эпигенетические характеристики хозяина или продуцирующие определённые модифицирующие метаболиты, могут представлять собой новое направление в пре- или пробиотических подходах к профилактике и терапии заболеваний, обеспечивая более целенаправленный контроль эпигенетических факторов в организме человека.

Микробиом-ассоциированная метаболомика и экспосомика исследует метаболиты и иные малые молекулы микробного происхождения для оценки физиологического состояния микробной системы. Протокол данного метода включает экстракцию метаболитов и их разделение методами ЯМР или хроматографии с последующей идентификацией масс-спектрометрией. Эта методика позволяет исследовать как таксономический состав, так и функциональные характеристики микроорганизмов, а также анализировать взаимодействие между членами микробного сообщества и между макроорганизмом и микробиомом. К ограничениям метода относятся ограниченное число исследуемых метаболитов, отсутствие комплексных справочных баз данных и биоинформатических инструментов, а также трудности интеграции с другими ОМИК-технологиями.

Разнообразие видов рака и метастазирование при прогрессировании опухолевого процесса представляют собой серьёзные препятствия для разработки

эффективных терапевтических средств [186]. Метастазирование является наиболее распространённой характеристикой злокачественных новообразований, однако точный механизм каскада метастазирования остаётся недостаточно определённым. Ряд протеомных исследований предпринял попытки раскрыть причины увеличения метастазирования. В одном из них с использованием транскриптомики, протеомики и фосфопроотеомики для изучения модели ксенотрансплантата мыши анализ мечения TMT показал, что повышение уровня гормона стресса при прогрессировании рака молочной железы вызывает увеличение активности глюкокортикоидного рецептора в метастатических областях, что в конечном итоге снижает выживаемость. Повышенная активность GR была вовлечена в активацию множественных процессов метастазирования и увеличение уровней экспрессии киназы ROR1, оба фактора коррелировали со снижением выживаемости. Истощение ROR1 снижало рост метастазов и увеличивало выживаемость на доклинических моделях [154].

Рак может рецидивировать даже после хирургического лечения и химиотерапии, что позволяет предположить наличие в рецидивирующей опухоли клеток, устойчивых к противораковым препаратам [127].

Развитие протеомных исследований в направлении функциональной протеомики – интерактомики – позволяет определять взаимоотношения всего комплекса белков в мультибелковых комплексах с помощью масс-спектрометрии. Протеомные исследования клеточного метаболизма открывают функциональные взаимосвязи между компонентами живой клетки на разных уровнях их структурной организации [320]. Raffel S. и соавторы предположили, что неблагоприятные клинические исходы при остром миелоидном лейкозе обусловлены устойчивостью лейкозных стволовых клеток к химиотерапии. Анализ популяций гемопоэтических стволовых клеток и лейкозных стволовых клеток показал, что IL3RA и CD99 могут служить маркерами последних [256].

Многочисленные исследовательские учреждения по всему миру вносят вклад в интеграцию ОМИК-данных, создавая базы данных, предоставляющие информацию исследователям рака. HUPO фокусируется на анализе опухолей

человека с целью выявления специфических признаков, связанных с несколькими типами рака, и расширения формата геномных данных в рамках «Инициативы по стандартам протеомики». CPTAC провёл углублённые протеомные исследования с публикацией ключевых результатов по нескольким опухолям [252], доступных через портал данных. Протеомные данные в CPTAC были интегрированы с cBioPortal – информационным ресурсом для исследований геномики рака – для облегчения комплексного анализа протеомных наборов данных с клиническими и геномными данными [178]. Веб-приложение LinkedOmics содержит три аналитических модуля, обеспечивающих платформу для доступа, анализа и сравнения данных по множественности раковых заболеваний. База данных содержит мультимаркерные и клинические данные из программы Cancer Genome Atlas и объединяет глобальные протеомные данные, полученные CPTAC по образцам опухолей TCGA [255]. CMPD представляет собой ещё одну базу данных, объединяющую геномные и протеомные наборы данных и используемую для изучения сложных биологических свойств рака, облегчая идентификацию связанных с раком мутированных белков, кодируемых мутировавшими генами [255]. Таким образом, для получения более точной информации о раке некоторые базы данных включают протеомные данные в исследования на геномном уровне, предоставляя унифицированные описания раковых мутаций на уровне ДНК, РНК и белка.

Высокое разнообразие белковых молекул существенно затрудняет их молекулярный анализ, поэтому в качестве биоинформационного инструмента применяются искусственные нейронные сети глубокого обучения [205]. Благодаря глубокому обучению стало возможным точное предсказание физико-химических свойств пептидов на основе их последовательности. Показано, что глубокое обучение может напрямую классифицировать образцы на больных и здоровых на основе необработанных данных – так, доброкачественные узлы щитовидной железы отличались от папиллярной карциномы с точностью 91%.

Мета-метабомика, или микробиом-ассоциированная метабомика, изучает функциональную активность макроорганизмов и микробиома на основе

соотношений максимально широкого спектра низкомолекулярных метаболитических продуктов и компонентов клеточной стенки. Метаболомика связывает микробный и генетический состав суперорганизма макроорганизм-микробиота с фенотипами через метаболиты [157]. Мета-метаболомика или микробиом-ассоциированная метаболомика изучает функциональную активность макроорганизмов и микробиома на основании соотношений максимально возможного спектра низкомолекулярных метаболитических продуктов и компонентов клеточной стенки. Метаболомика связывает микробный и генетический состав суперорганизма макроорганизм-микробиота с фенотипами через метаболиты [308]. Она является незаменимым компонентом транскрипционных исследований микробиома, позволяя определять функции неизвестных генов, характеризовать микробные сообщества по ассоциации между микроорганизмами и метаболитами, открывать новые ферменты, идентифицировать потенциальные биомаркеры и проводить молекулярно-эпидемиологические исследования [195].

Протокол метаболомного исследования состоит из экстракции метаболитов из биообразца, количественной идентификации метаболитов с помощью ядерного магнитного резонанса, газовой или жидкостной хроматографии, капиллярного электрофореза и биоинформационного анализа данных [153]. Метод экстракции метаболитов выбирается в зависимости от цели исследования, вида химических соединений и свойств биоматериала. Различают целевой и нецелевой анализ метаболитов: первый применяется при оценке определённой группы ожидаемых соединений, второй – для скрининга всего спектра веществ, участвующих в физиологической деятельности клеток. Идентификация проводится с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса или масс-спектрометрии в сочетании с жидкостной или газовой хроматографией. Для целевого анализа ограниченного количества метаболитов может использоваться газовая хроматография без модуля масс-спектрометрии, когда для идентификации достаточно времён удерживания пиков [36].

Спектроскопия ЯМР является прямым методом количественного определения, но обладает относительно низкой чувствительностью и пропускной

способностью по сравнению с масс-спектрометрией. Если типичное ЯМР-исследование позволяет идентифицировать 50–200 метаболитов с концентрациями более 1 мкмоль/г, то типичное метаболомное исследование с масс-спектрометрией позволяет идентифицировать более 1000 метаболитов с концентрациями менее 10–100 наномоль/г [239].

Биоинформационный анализ метаболомных данных включает контроль качества, снижение зашумлённости, химическую идентификацию и количественную оценку [251]. Связь метаболитов с путями и механизмами взаимодействий внутри микробных сообществ и между микробиомом и макроорганизмом оценивается методами многофакторного анализа, многомерной статистики и математического моделирования [209]. Для аннотирования полученных метаболитов используют базы данных метаболитов человека, из которых крупнейшей на сегодняшний день является база данных тандемной масс-спектрометрии METLIN, содержащая информацию о 240 000 метаболитов и размещённая в исследовательском институте Скриппса (США).

Метаболомика позволяет получить специфический метаболический портрет, на основании которого формируется наиболее полная информация о геноме, микробиоме, эпигеноме и фенотипе микроорганизмов [156, 285]. Тканевые и микробные ферменты расщепляют пищевые компоненты с образованием большого числа конечных и промежуточных низкомолекулярных метаболитов. Множество разнонаправленных процессов создаёт высокую дисперсию значений, что с позиций системной биологии делает всю систему сильнозашумлённой. Тем не менее из концентраций метаболитов можно получить информацию о фенотипической экспрессии генов, их активности, эпигеномных механизмах взаимодействия человека с факторами окружающей среды. С помощью метаболомики проводится интегральная оценка внутри- и межпопуляционных взаимоотношений эукариотических и симбиотических микроорганизмов, а также взаимодействия микробиома и макроорганизма. Для определения концентраций метаболитов в различных биосубстратах используют физико-химические методы –

газовую и жидкостную хроматографию, масс-спектрометрию, спектроскопию, ядерный магнитный резонанс [7, 198].

Метаболомные исследования широко применяются для предиктивной диагностики, прогноза эффективности лечения и выявления механизмов развития заболеваний. В исследовании M. R. Medcalf с соавторами с помощью метаболомного анализа плазмы крови оценивали эффективность метотрексата и идентифицировали метаболические биомаркеры при ревматоидном артрите. Промежуточные продукты первичного метаболизма измеряли автоматической газовой хроматографией с системой холодного впрыска и времяпролётной масс-спектрометрией. Биогенные амины анализировали жидкостной хроматографией с гидрофильным взаимодействием и квадрупольной времяпролётной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением. Липиды анализировали гибридной хроматографией с заряженной поверхностью и квадрупольной времяпролётной масс-спектрометрией. Идентификация пиков основывалась на времени удерживания и масс-спектральных данных из MassBank of North America. В качестве биоинформатических средств использовали анализ главных компонент, факторный и линейный дискриминантный анализ. Были определены триглицериды, жирные кислоты и церамиды, нормализующиеся при лечении метотрексатом. Определены метаболомные отпечатки ревматоидного артрита у лиц, отвечающих и не отвечающих на терапию, представлявшие собой соотношение концентраций глюкозилцерамидов, фосфатидилхолинов, сфингомиелинов, фосфатидилэтаноламинов, холина, инозина, гипоксантина, гуанозина, никотинамида и итаконовой кислоты [244].

Наряду с масштабными ОМИК-технологиями развиваются и подходы с меньшим масштабом охвата, решающие задачи практического здравоохранения. Метабономика определяется как систематическое изучение уникальных химических «отпечатков пальцев», специфичных для процессов, протекающих в живых клетках. Если метаболомика связана преимущественно с изучением метаболического профиля на клеточном и органном уровне, то метабономика использует метаболические профили для регистрации изменений обмена веществ,

зависящих от экзогенных факторов окружающей среды и патологических процессов, а не генетических изменений. Метаболомика, напротив, исключает изменения под воздействием негенетических факторов как внешние для изучаемой системы. Метабономика отличается тем, что обычно использует лишь часть метаболома, что упрощает процесс как аппаратно, так и вычислительно, но позволяет проводить предиктивную и скрининговую диагностику многих заболеваний. В большинстве практических исследований цель не сводится к оценке исключительно эндогенных или только экзогенных факторов, поэтому разделение на метаболомику и метабономику используется редко, а чаще применяется общий термин «метаболомика» [20, 234].

Микробиом-ассоциированная метаболомика, или метабономика, изучает взаимное влияние метаболома микрофлоры и макроорганизма. Эта методика количественно измеряет динамический многопараметрический ответ живых биосистем на патофизиологическую стимуляцию или генетические модификации [234]. В целях предиктивной диагностики функциональная активность микробиома служит детерминантой здоровья человека. Реакция микробиоты регистрируется по изменению концентраций микробных метаболитов и их соотношений с помощью методов математического моделирования и систем распознавания образов; накапливаются данные о метаболомных отпечатках болезней, используемые для скрининговой диагностики или как дополнение к клинико-лабораторным методам при отсутствии клинических проявлений или стёртой картине заболевания. Концентрации короткоцепочечных жирных кислот в различных субстратах, вырабатываемых микроорганизмами при метаболизме, являются источником информации для микробиом-ассоциированной метаболомики. Протокол определения концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне, крови, моче, кале состоит из экстракции 0,1 Н раствором соляной кислоты с последующим центрифугированием. Подкисленный супернатант разделяется с помощью газожидкостной хроматографии, а концентрации идентифицируются по временам удерживания пиков эталонных компонентов. Расчёт проводится по методике внутреннего стандарта. Соотношения концентраций компонентов

короткоцепочечных жирных кислот характеризуют функциональную активность микробиоценоза, а с помощью многомерной статистики и математического моделирования появляется возможность определять метаболомный отпечаток заболевания [16, 49].

Поиск наиболее эффективных для прогноза ОМИК-технологий связан с воздействием факторов окружающей среды на здоровье человека. Факторы влияния на здоровье включают как внешние – качество воздуха, тип жилья, оснащённость рабочего места, – так и внутренние факторы, такие как химические соединения, образующиеся при лизисе бактерий или их биоплёнок [269]. Метаболом человека составляют химические вещества, используемые для оценки состояния системы, которые можно разделить на продуцируемые клетками человека и привнесённые извне, но влияющие на функциональную активность органов и клеток. Метаболиты, относящиеся к экспосому, влияют на регуляцию генов и индивидуальное развитие организма [314]. Экспосом не является внутри- или межклеточным параметром, в отличие от генома, протеома и метаболома, но учёт его вклада необходим для оценки здоровья и предиктивной диагностики. Если при анализе экспосома внешние факторы используются для прогнозирования фенотипа, то влияние внутренних факторов позволяет сосредоточиться на системе взаимодействий микробиота – макроорганизм [4].

Исследования влияния малых молекул микробного происхождения на иммунные реакции и течение патологических процессов проводятся с 1990-х годов. К малым молекулам микробного происхождения относятся альдегиды, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, гидроксикислоты с длиной углеродной цепи от 10 до 24 атомов углерода, а также стерины. Источником этих молекул служат белки мембраны клеточной стенки микроорганизмов [5]. Микробное происхождение малых молекул подтверждается многочисленными исследованиями с учётом метаболических карт организма человека [5, 98]. Продукция малых молекул зависит от количества и соотношения микроорганизмов, скорости всасывания в кровь, скорости выведения с мочой и других процессов. Высокая дисперсия значений связана с множеством

одновременно протекающих разнонаправленных процессов, влияющих на текущую концентрацию малых молекул в крови [57]. Поэтому исследование патологических процессов по концентрациям малых молекул в крови наиболее эффективно с применением многомерной статистики и систем распознавания образов [4, 6, 34].

Идентификация и определение концентрации малых молекул микробного происхождения в крови проводится путём экстракции клеточных липидов реакцией кислотного метанолиза с получением метиловых эфиров и диметилацеталей. В результате газожидкостной хроматографии определяются концентрации веществ, идентифицируемых с помощью масс-спектра, работающего в тандеме с газовым хроматографом [44].

Микробиом-ассоциированная экспосомика определяет не только реакцию микробиоты на экзогенные и эндогенные факторы, влияющие на здоровье, но и учитывает реакцию взаимодействия микробиоты и макроорганизма по большому числу аспектов, включая проницаемость слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, оксидативный стресс, интенсивность метаболизма клетками печени и выведения токсинов. Вовлечённость такого большого числа факторов делает микробиом-ассоциированную экспосомику высокочувствительным методом предиктивной диагностики [58].

Для обработки больших объёмов данных, получаемых в результате множества разнонаправленных процессов в многофакторной системе, требуются методы многомерной статистики и математического моделирования. Унификация приёмов обработки и программного обеспечения выделила эту область ОМИК-технологий в отдельное направление – биоинформатику. Её целью является хранение, объединение, распределение, анализ, моделирование и распространение биологической, метаболомной, протеомной, генетической, клинической и биомедицинской информации. Математическое моделирование и многомерная статистика позволяют более детально расшифровывать механизмы, определяющие биологические феномены, генерировать новые гипотезы и визуализировать их [78, 271]. Благодаря биоинформатическим подходам в исследованиях метабенома и

протеома была установлена роль симбионтной кишечной микрофлоры в эпигеномике ожирения, метаболического синдрома и сахарного диабета 2 типа [7, 287].

Параллельно с увеличением количества и разнообразия ОМИК-технологий сформировалась тенденция объединения больших массивов данных для комплексного анализа – мультиомиксные технологии. Это не столько технология, сколько парадигма экспериментальной работы и научных открытий, заключающаяся в объединении данных, полученных с помощью нескольких ОМИК-методов, для поиска взаимосвязей и расшифровки механизмов, объясняющих предпосылки и развитие заболеваний. Интеграция нескольких ОМИК-технологий даёт возможность увидеть полную картину заболевания и его предпосылок при высокой степени детализации. Объединение геномики с информацией о ДНК, транскрибируемой в РНК и транслируемой в белки, каталитически преобразующиеся в метаболиты, позволяет получить более полное представление о потоке информации в сложных живых системах [90].

Математическое моделирование и многофакторный анализ позволяют значительно улучшить диагностику аденокарциномы лёгкого. Исследователи Yu K. с соавторами предсказали степень карциномы лёгкого и прогноз выживаемости по данным транскриптомного и протеомного анализа [93]. Регрессионные модели были обучены на выборке 538 пациентов из Атласа генома рака, где в качестве группирующих данных использовали гистологический анализ, а в качестве анализируемых – протеомные и транскриптомные данные. Полученные сигнатуры были валидированы на независимой выборке и показали статистически значимые результаты прогноза. С помощью мультирегрессионного анализа были определены 15 генов, уровни экспрессии которых наилучшим образом коррелируют с гистопатологическими показателями. Соответствующие 15 белков показали уровень классификации $AUC = 0,81 \pm 0,00071$. Повышение прогностической точности было достигнуто за счёт создания интегративной модели, использующей транскриптомные, протеомные данные и формализованные данные гистологического анализа. Соотнесение транскриптомных данных с

морфологическими показателями выявило связь мутации гена TP53 с нарушением регуляции генов, участвующих в репликации ДНК, репарации несоответствий и путях клеточного цикла.

Бурное развитие ОМИК-технологий, сопровождающееся совершенствованием и унификацией методик, снижением стоимости и ростом объёмов накопленных данных, стимулирует развитие интегративного подхода и широкое распространение мультиомиксных технологий. По данным анализа публикационной активности, каждый четвёртый учёный планирует участие в мультиомиксных исследованиях [229]. Мультиомиксные технологии позволяют выявить неочевидные закономерности в больших массивах данных, однако выводы существенно зависят от исходного дизайна исследования, интерпретации данных и квалификации исследователя. Время, затраченное на поиск статистически значимых закономерностей, может быть не меньше времени, затраченного на проведение эксперимента. Мультиомиксные технологии представляют собой значительный шаг вперёд по сравнению с традиционными исследованиями, но не заменяют их, а дополняют и оптимизируют работу по поиску причин и механизмов заболеваний.

В мини-обзоре Lehang Lin с соавторами [189] представлены последние достижения в области изменений метилирования ДНК при инициации и прогрессировании плоскоклеточного рака пищевода. Показано, что аберрантно метилированные гены, обнаруженные в плазме или сыворотке крови, могут служить неинвазивными диагностическими маркерами. Отдельные метилированные гены позволяют диагностировать плоскоклеточный рак пищевода с 82% чувствительностью и 100% специфичностью. С помощью биоинформационного анализа 86 пациентов была установлена сигнатура метилирования, ассоциированная с метастазированием в лимфатические узлы, что позволяет индивидуализировать терапию – применять более агрессивное лечение пациентам с плохим прогнозом и отказаться от радикальной терапии при низком риске.

В исследовании Bady P. с соавторами описаны возможности регрессионной прогностической модели эффективности терапии глиобластомы алкилирующими препаратами [96]. Для прогноза используются данные чипов метилирования Illumina (HM-27K и HM-450K). Авторы исследовали влияние контекста генетических и эпигенетических изменений и типа опухоли на пороговое значение экспрессии генов. Выявлена особенность экспрессии MGMT при глиомах низшей степени в отличие от глиобластом, заключающаяся в появлении двух копий хромосомы 10q26.3, связанных с экспрессией MGMT, что потенциально снижает терапевтический эффект алкилирующих агентов. Предлагаемая модель прогнозирования статуса метилирования промотора MGMT оформлена в виде R-пакета `mgmtstp27`, адаптированного для прогнозирования одного образца и независимого от типа опухоли.

По результатам анализа метилирования пяти генов-маркеров (ASCL1, GHSR, LHX8, SST, ZIC1) в моче можно диагностировать CIN 3 и рак шейки матки. Исследования Helder R. с соавторами показали, что рак шейки матки диагностируется с высокой прогностической точностью AUC 0,87–0,99. Для диагностики вируса папилломы человека CIN 3 наиболее диагностически значимым является осадок мочи по сравнению с полностью очищенной мочой или надосадочной жидкостью [204].

Существует несколько классов противоопухолевых препаратов, действующих на эпигенетическом уровне: ингибиторы ДНК-метилтрансферазы, гистондеацетилазы, лизинспецифической деметилазы 1, гомолога *zeste 2*, а также белков с бромодоменными и внутерминальными мотивами (BET) [126]. Белки BET выполняют множество функций, включая инициацию и удлинение транскрипции и регуляцию клеточного цикла. Их ингибиторы проявляют селективность в отношении опухолевых клеток, преимущественно связываясь с суперинхансерами – некодирующими участками ДНК, критичными для транскрипции генов, определяющих клеточную идентичность. Применение BET вызывает токсические эффекты – тяжёлую тромбоцитопению, повышенную утомляемость, тошноту, рвоту, диарею и дисгевзию, что ограничивает их использование. Анализ

публикаций по доклиническим исследованиям показал, что ингибиторы ВЕТ и HDAC оказывают синергическое действие в сниженных дозах, что позволяет предположить потенциальный способ избежать перекрывающейся токсичности двух классов лекарств.

Микробиом-ассоциированная метаболомика проводится сравнением концентраций различных химических соединений массой не более 2000 Да. Ведущее место среди них занимают короткоцепочечные жирные кислоты – насыщенные монокарбоновые кислоты с длиной углеродной цепи до шести атомов [153]. Их функции в толстом кишечнике хорошо изучены и включают снижение интенсивности размножения патогенных и гнилостных микроорганизмов, регуляцию апоптоза клеток и антиканцерогенный эффект [284]. Большинство эффектов реализуется не только на слизистой оболочке кишечника, но и на слизистых ротоглотки и урогенитального тракта. Эффект короткоцепочечных жирных кислот зависит от концентрации, и как гиперпродукция, так и дефицит могут отрицательно повлиять на работу слизистой. Они служат главным источником ацетил-коэнзима А и дыхательного субстрата для энтероцитов и колоноцитов, участвуют в пролиферации клеток за счёт влияния на кровоток в слизистой [276]. Масляная кислота выделяется как основной энергосубстрат для клеток кишечника, участник биосинтеза жирных кислот и холестерина; снижение её концентрации коррелирует с риском возникновения рака кишечника. Всасывание масляной кислоты связано с всасыванием натрия, что имеет значение для всасывания воды колоноцитами [46]. Пропионовая кислота участвует в образовании пропионил-КоА, обладающего регуляторными функциями в углеводном и липидном обмене, обладает антибактериальным эффектом и участвует в регулировке моторики кишечника [311].

Распространены интегральные критерии оценки функциональной активности микробиоценозов с помощью структурного индекса и индекса изокилот. Структурный индекс характеризует функциональную активность индигенной микрофлоры как соотношение концентраций компонентов короткоцепочечных жирных кислот, продуцируемых анаэробными

микроорганизмами, к концентрации уксусной кислоты, продуцируемой анаэробной и аэробной микрофлорой. Индекс изокислот является критерием протеолитической активности микрофлоры и рассчитывается как соотношение разветвлённых кислот, полученных при деградации белка, и неразветвлённых, полученных при деградации полисахаридов [13, 16].

В качестве биоинформатических инструментов используется линейный дискриминантный анализ, позволяющий находить метаболомные отпечатки экзогенного и эндогенного воздействия на организм, заболеваний и синдромов. В публикации Затевалова А. М. с соавторами исследовалось функциональное состояние микробиоценоза ротоглотки, ранжированное по степеням тяжести. Показано, что первая степень, отличающаяся незначительными изменениями состава микробиоценоза, имеет наибольшие изменения соотношений концентраций короткоцепочечных жирных кислот по сравнению со второй и третьей степенью дисбиоза ротоглотки [49]. С помощью линейного дискриминантного анализа концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне определяется принадлежность ребёнка к группе часто болеющих, выявляется вирусная или микробная этиология дисбиоза ротоглотки, а также проводится дифференциальная диагностика острого бронхита, пневмонии или тонзиллита [16, 51, 62]. В исследовании Мануйловой Е. Б. с соавторами микробиом-ассоциированная метаболомика по концентрациям короткоцепочечных жирных кислот используется для предиктивной диагностики хронического тонзиллита. Соотношение концентраций пропионовой, масляной и валериановой кислот позволяет определить тонзиллит с прогностической точностью 97,1% [36].

В исследовании Безродного С. Л. с соавторами изучается взаимодействие микробиома и макроорганизма у лиц пожилого возраста с дислипидемией и сахарным диабетом 2 типа. Концентрации компонентов клеточной стенки микроорганизмов были разделены на группы в зависимости от принадлежности к одному из четырёх основных фило типов микробиома: Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes. В качестве критериев интегральной оценки использовали

суммарную концентрацию малых молекул микробного происхождения, концентрацию октадеценового альдегида, отражающую количество бактериального плазмогена, и сумму 3-гидроксикислот, отражающих концентрацию бактериального эндотоксина. Отмечено увеличение суммарной концентрации малых молекул в крови, а также увеличение концентрации октадеценового альдегида и 3-гидроксикислот при нарушении углеводного обмена по типу сахарного диабета 2 типа. При этом снижаются относительные концентрации малых молекул, ассоциированные с *Bacteroidetes*, и увеличиваются ассоциированные с *Actinobacteria*. Увеличение содержания глюкозы в крови имеет обратную корреляцию с концентрациями малых молекул, ассоциированными с *Firmicutes* [48]. Применение линейного дискриминантного анализа концентраций малых молекул в крови позволило рассчитать модель «Диабет-скрин», позволяющую с 85,9% прогностической точностью диагностировать сахарный диабет 2 типа, а также модель «Дислипидемия-скрин», позволяющую с 75,3% прогностической точностью диагностировать сочетанную дислипидемию у лиц пожилого возраста [4, 59].

1.5. Роль пробиотических препаратов в поддержании защитной функции микробиоты

Хирургическое вмешательство по-прежнему остаётся главным методом радикального лечения колоректального рака. Когда форма заболевания позволяет выполнить резекцию, предпочтительным вариантом хирургического пособия считается колэктомия с региональной лимфаденэктомией [91, 272]. Лимфатические узлы, лежащие вблизи сосудов, кровоснабжающих опухоль, а также те, что находятся за пределами зоны резекции и вызывают подозрение на метастатическое поражение, подлежат биопсии либо, по возможности, удалению [191, 194]. Значительная потеря лимфоидной ткани в ходе операционного вмешательства и иммуносупрессия, обусловленная как самим опухолевым

процессом, так и перенесённой хирургией, указывают на необходимость адъювантной иммунотерапии [2, 76]. Вопросы подготовки кишечника к хирургическим процедурам остаются предметом дискуссий, хотя для большинства хирургов такая подготовка является стандартной практикой. Мнения специалистов по поводу её значимости расходятся. Основные разногласия касаются применения препаратов, предназначенных для очищения кишки от фекальных масс, а также использования антибактериальных средств. В недавно опубликованном мета-анализе [197], были рассмотрены различные методы предоперационной подготовки у 5805 пациентов. Сравнивались случаи с проведением очистки кишечника, без неё и с использованием только очистительной клизмы. Выявлены статистически значимые различия по таким показателям, как частота несостоятельности швов, летальность, перитониты, повторные операции и инфекционные осложнения. Исследование привело к выводу о важности механической подготовки кишечника, поскольку она способствует улучшению исходов хирургического вмешательства с точки зрения послеоперационных осложнений. Резекция толстой кишки относится к категории условно чистых операций, что подразумевает назначение антибиотиков. Существует множество противоречивых рекомендаций, опирающихся на клинические протоколы, индивидуальные особенности пациентов и личный опыт врачей. Основные расхождения связаны с выбором конкретного антибактериального препарата, схемой его применения и продолжительностью курса. Несмотря на периоперационное назначение антибиотиков, уровень послеоперационных инфекций варьирует от 10% до 30% [233]. Большинство таких инфекций обусловлены сапрофитной флорой [307]. Широкое применение антимикробных средств ведёт к распространению антибиотикоустойчивых штаммов бактерий [224, 249]. После хирургических вмешательств наблюдаются изменения в микробиоте желудочно-кишечного тракта, что проявляется нарушением функции кишечного барьера и микробным дисбалансом. Это может спровоцировать системное воспаление и ослабление иммунного ответа [282]. Все перечисленные факторы повышают риск послеоперационных инфекций и сепсиса [2, 141], что подчёркивает

необходимость разработки альтернативных подходов к подготовке пациентов перед операциями на органах пищеварения.

Пробиотические препараты способны смягчить действие ряда факторов, способствующих возникновению послеоперационных инфекций. Они улучшают состояние кишечного барьера, стимулируя рост эпителиальных клеток, продуцирующих слизь. Помимо этого, пробиотики влияют на врождённый иммунитет, активируя функции дендритных клеток, макрофагов и нейтрофилов, и усиливают адаптивные иммунные реакции за счёт повышения секреции IgA. Результаты исследований подтвердили, что кишечные микроорганизмы способны снижать интенсивность избыточного воспаления и регулировать продукцию интерлейкина-10 [2, 319].

Пробиотики также подавляют рост потенциально опасных микроорганизмов. Эти свойства могут быть востребованы в клинической практике в периоперационный период для профилактики послеоперационных инфекций.

В двух исследованиях, выполненных в Берлине, пациенты проходили хирургические вмешательства на верхних отделах желудочно-кишечного тракта. В одном из них сравнивалась эффективность *Lactobacillus plantarum* 299v с плацебо и термоинактивированными бактериями [258]. Пробиотик назначался за пять-семь дней до операции. В группах, получавших лактобактерии – как живые, так и инактивированные, – уровень послеоперационных инфекций составил 10%, тогда как в контрольной группе достиг 30% ($p < 0,01$). Однако влияние пробиотиков на кишечную микрофлору и иммунные показатели в данном исследовании не являлось предметом анализа [2].

В другом исследовании участвовали 89 пациентов, перенёсших резекцию поджелудочной железы [88]. Участники были разделены на две группы: одной назначался синбиотик, другой – плацебо. Приём начинался за день до операции и продолжался восемь дней. Состав синбиотика включал четыре вида лактобактерий и четыре типа биоактивных волокон – бета-глюкан, инулин, пектин и резистентный крахмал. Применение синбиотика привело к снижению частоты послеоперационных инфекций с 40% до 12,5% ($p < 0,05$). Также зафиксировано

сокращение продолжительности пребывания пациентов в стационаре, а медиана длительности антибактериальной терапии уменьшилась с 10 до 2 дней [2].

В рамках ещё одного рандомизированного исследования анализировалась эффективность комбинации *Lactobacillus casei* и *Bifidobacterium breve* с галактоолигосахаридами в предотвращении послеоперационных инфекций [88]. Состав синбиотика включал четыре вида лактобактерий и четыре типа биоактивных волокон: β -глюкан, инулин, пектин и резистентный крахмал. Употребление синбиотика привело к уменьшению частоты послеоперационных инфекций, снизив её с 40% до 12,5% ($p < 0,05$). Кроме того, наблюдалось сокращение времени пребывания пациентов в стационаре, а медиана продолжительности антибактериальной терапии уменьшилась с 10 до 2 дней [2].

В рамках другого рандомизированного исследования была проанализирована эффективность комбинации *Lactobacillus casei* и *Bifidobacterium breve* с галактоолигосахаридами в предотвращении послеоперационных инфекций [180]. Участники были разделены на две группы: первая получала синбиотик до и после хирургического вмешательства, вторая – только после операции. Обе группы также проходили профилактическую антибиотикотерапию. У пациентов, принимавших синбиотик как до, так и после операции, уровень послеоперационных инфекций оказался значительно ниже – 12% против 30% во второй группе. Различий в проницаемости кишечника по лактулозо-маннитоловому тесту не выявлено [2]. После завершения курса пробиотические штаммы обнаруживались в фекалиях участников. Применение синбиотика в пред- и послеоперационном периоде способствовало повышению активности натуральных киллеров и числа лимфоцитов, снижению уровня С-реактивного белка и увеличению концентрации интерлейкина-6 в периферической крови.

В более раннем исследовании проводилось сравнение *Lactobacillus plantarum* 299v и плацебо у пациентов, перенёсших хирургические операции на верхних и нижних отделах желудочно-кишечного тракта, как до, так и после вмешательства. Существенных различий в частоте послеоперационных инфекций выявлено не было [235]. Дозировка пробиотика была ниже – разовая доза составила 5×10^7 КОЕ,

что может отчасти объяснить ограниченное влияние на частоту послеоперационных осложнений. В эту группу вошли пациенты, перенёсшие вмешательства на обоих отделах ЖКТ, но большинство составляли те, кому выполнялась колоректальная резекция (82 против 129). Отдельный анализ инфекционных осложнений не проводился, однако общий уровень послеоперационного сепсиса составил 13% для группы, получавшей *Lactobacillus plantarum* 299v, и 15% для группы плацебо [2].

В другом исследовании на сходной группе пациентов оценивалась эффективность комбинации из четырёх видов бактерий и волокон в сравнении с плацебо [180]. Синбиотик начинали принимать за две недели до операции. Доза пробиотических бактерий была выше, чем в предыдущем исследовании – 4×10^9 КОЕ [235], однако статистически значимых изменений частоты послеоперационного сепсиса, бактериальной транслокации или уровня воспалительных маркеров зафиксировано не было [2, 235].

Примечательно, что в работах [41, 42] указывается, что уровень послеоперационных инфекций в этом исследовании оказался в три раза выше по сравнению с другими исследованиями с аналогичными группами пациентов и типами оперативных вмешательств. Для проведения колэктомии 88 пациентов были разделены на четыре группы по 20–24 человека. В первой группе проводилась только подготовка кишечника к операции, во второй – подготовка с добавлением неомицина, в третьей – подготовка с применением синбиотиков, в четвёртой – назначение синбиотиков и неомицина без предварительной очистки кишечника. Доза вводимых бактерий составляла 4×10^9 . Существенных изменений в показателях бактериальной транслокации обнаружено не было, однако установлено, что её уровень был несколько ниже у пациентов, прошедших очищение кишечника, получавших неомицин и синбиотические препараты. У этой группы также зафиксировано достоверное уменьшение численности энтеробактерий в кишечнике. Тем не менее эти наблюдения не отразились на частоте послеоперационных инфекций, составившей 17% без статистически значимых различий между группами [2, 131].

У пациентов после резекции толстой кишки сравнивалась эффективность синбиотиков и пребиотиков в сочетании с термоинактивированными бактериями и плацебо [131]. Использовался тот же бактериальный состав, что и в исследовании [103], но в большем количестве. Приём смеси бактерий начинали за три дня до операции, однако влияния на уровень септических осложнений выявлено не было. Отчасти это может объясняться ограниченной численностью исследуемой выборки и коротким периодом приёма синбиотика [131]. Обращает на себя внимание существенная вариабельность эффективности пробиотиков в профилактическом применении в зависимости от типа хирургического вмешательства. Доказана высокая эффективность пробиотиков и синбиотиков в снижении послеоперационных инфекционных осложнений – главным образом у пациентов, перенёвших операции на верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Результаты же применения этих препаратов у больных, подвергшихся вмешательствам на толстой и прямой кишке, оказались менее однозначными [2].

Использование пробиотиков в контексте колоректального рака может преследовать разнообразные цели. В толстой кишке наблюдается значительно большее по сравнению с другими отделами желудочно-кишечного тракта преобладание бактерий, ассоциированных со слизистой. Поэтому коррекция дисбаланса микрофлоры именно в этом сегменте может стать эффективной стратегией иммуномодуляции в период колоректальной хирургии, способствуя уменьшению частоты и тяжести послеоперационных осложнений и активации репаративных процессов. Следует также учитывать, что состояние кишечной микробиоты может существенно влиять на развитие и течение основного заболевания. Для достижения наилучших результатов при применении пробиотиков у пациентов, перенёвших операцию по поводу колоректального рака, требуется корректный подбор комбинаций пробиотических штаммов, их дозировок и режимов введения [2].

На основании множества исследований установлено, что пробиотики способны снижать риск инфекционных осложнений после операций на желудочно-кишечном тракте [180]. В то же время данные о влиянии пробиотиков на уровень

бактериальной транслокации остаются неоднозначными [28, 131, 289]. Ключевым ограничением этих исследований является недостаточное изучение микрофлоры слизистой оболочки, что затрудняет оценку эффективности и обоснованности применения пробиотиков для профилактики послеоперационных инфекций. Ряд работ демонстрирует, что пробиотики уменьшают количество потенциально патогенных микроорганизмов за счёт бактериального антагонизма, однако влияние этих изменений на уровень послеоперационных инфекций не было должным образом проанализировано [235, 289, 313]. Таким образом, необходимы дополнительные исследования для более точной оценки роли пробиотиков в профилактике инфекционных осложнений после хирургических вмешательств [2].

Исследования в этой области должны сосредоточиться на решении ряда нерешённых вопросов. Требуется уточнить такие параметры, как продолжительность применения, доза и тип пробиотика, а также изучить его воздействие на кишечную микрофлору. Несмотря на данные отдельных исследований, сравнивающих эффективность приёма живых и термически обработанных симбиотических бактерий, вопрос о преимуществах лекарственных форм, обеспечивающих доставку пробиотических штаммов в нужные участки желудочно-кишечного тракта в жизнеспособном состоянии, нуждается в дополнительных клинических подтверждениях. В частности, следует более детально проанализировать влияние живых бактерий на системные иммунологические показатели и частоту послеоперационных инфекций [2]. Такие исследования могут существенно расширить понимание роли пробиотиков в клинической практике и их потенциального вклада в улучшение здоровья пациентов [131].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии с поставленными целью и задачами работы было выполнено комплексное исследование, включавшее копрологический, биохимический и микробиологический анализ кала, а также общий, биохимический и хромато-масс-спектрометрический анализы крови. Дополнительно проводился анализ липидома человека по концентрациям минорных липидных компонентов в крови, в том числе имеющих микробное происхождение. В исследование были включены пациенты с колоректальным раком и здоровые добровольцы в возрасте от 45 до 75 лет. Лечение и обследование пациентов с колоректальным раком осуществлялось на базе стационара хирургического отделения Городской клинической больницы имени Л.А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы.

2.1. Критерии включения, невключения и исключения из исследования пациентов с колоректальным раком

Критерии включения в исследование предполагали наличие колоректального рака с первой по четвёртую стадию, потребность в плановом хирургическом лечении – правосторонней гемиколонэктомии, левосторонней гемиколонэктомии или прямой резекции прямой кишки, а также возраст пациента в диапазоне от сорока пяти до семидесяти пяти лет.

К критериям невключения относили приём системных антибактериальных средств, пробиотиков или противоопухолевых химиотерапевтических препаратов в течение трёх месяцев, предшествовавших включению в исследование.

Из исследования исключались пациенты, у которых в ходе планового оперативного вмешательства возникла необходимость выведения колостомы. Также исключение применялось при развитии инфекционных осложнений в раннем послеоперационном периоде, если они требовали назначения системной антибиотикотерапии. Повторная операция в раннем послеоперационном периоде

на фоне несостоятельности сформированного анастомоза или инфекционных осложнений также служила основанием для исключения из исследования. Помимо этого, исключались иные осложнения, препятствующие дальнейшему участию пациента, а также случаи летального исхода. Развитие новой коронавирусной инфекции или других тяжёлых и среднетяжёлых острых респираторных инфекций являлось основанием для исключения. Отказ пациента от продолжения участия в исследовании также приводил к его исключению из выборки.

2.2. Общая характеристика включенных в исследование лиц и дизайн исследования

Общая численность участников исследования составила 128 человек, из которых 49 были женщинами и 79 – мужчинами.

Контрольную группу сформировали 68 клинически здоровых добровольцев, проходивших плановую диспансеризацию. Их средний возраст составил $57,4 \pm 12,1$ года. Эти лица на протяжении трёх месяцев, предшествовавших включению в исследование, не принимали системные антибактериальные препараты и пробиотические средства. Нарушений углеводного и липидного обмена у участников контрольной группы не выявлено.

Опытная группа, сформированная в соответствии с описанными ранее критериями включения и невключения, насчитывала 60 пациентов с гистологически подтверждённой аденокарциномой толстой кишки. Средний возраст больных в данной группе составил $62,1 \pm 10$ лет. Распределение по стадиям опухолевого процесса было следующим: 13 человек имели первую стадию, 14 – вторую, 17 – третью и 16 – четвёртую.

Пациенты с колоректальным раком, вошедшие в исследование, были разделены на две подгруппы. В основную подгруппу вошли 28 человек, которым в периоперационном периоде назначали курс микробиологической коррекции. Препарат содержал *Lactobacillus rhamnosus* GG, витамины B1, B2, B6 и цинк.

Приём средства начинали за три-семь дней до хирургического вмешательства и возобновляли на вторые-третьи сутки после операции, продолжая ещё три-семь дней. Общая продолжительность курса микроэкологической коррекции составляла от восьми до четырнадцати дней. Подгруппа сравнения также состояла из 28 пациентов, которым проводили только хирургическое лечение без дополнительной микробиологической коррекции.

Сопоставимость подгрупп по возрасту и распределению стадий опухолевого процесса была подтверждена. Статистически значимых различий по типам выполненных оперативных вмешательств между подгруппами также не наблюдалось. Левосторонняя гемиколонэктомия была выполнена 12 пациентам основной подгруппы и 16 пациентам подгруппы сравнения. Правостороннюю гемиколонэктомию провели 6 больным в каждой из подгрупп. Резекцию прямой кишки выполнили 10 пациентам в основной подгруппе и 10 – в подгруппе сравнения.

Всем больным колоректальным раком, включённым в исследование, проводили периоперационную антибиотикопрофилактику. За 30 минут до хирургического разреза внутривенно вводили комбинацию амоксициллина натрия в дозе 1060,2 мг, что эквивалентно 1000 мг амоксициллина, и клавуланата калия в дозе 238,3 мг, что эквивалентно 200 мг клавулановой кислоты. Последующие введения осуществляли каждые три часа, не превышая трёх введений в сутки.

При поступлении в стационар всем пациентам с колоректальным раком, а также всем добровольцам контрольной группы проводили комплекс исследований. Он включал копрологическое, биохимическое и микробиологическое исследование кала с определением концентрации короткоцепочечных жирных кислот, общий и биохимический анализы крови, хромато-масс-спектрометрическое исследование крови для оценки содержания микробных маркеров и анализ липидома человека по концентрациям минорных липидных компонентов в крови. Пациентам основной подгруппы эти исследования выполняли до начала приёма средства микроэкологической коррекции.

Хромато-масс-спектрометрическое исследование крови на содержание микробных маркеров, определение концентрации короткоцепочечных жирных кислот в кале и уровня холестерина в сыворотке крови повторяли у пациентов с колоректальным раком дважды в послеоперационном периоде. Первый повторный забор проводили на пятые-восемье сутки после операции, что соответствовало дню завершения приёма пробиотика. Второй – на девятые-двенадцатые сутки, то есть через три-пять дней после окончания курса микрoэкологической коррекции.

2.3. Исследуемое средство микрoэкологической коррекции

В рамках исследования в качестве средства микрoэкологической коррекции применяли БАД «Комплинекс» (производитель – компания LEK, Словения; дистрибьютор – АО «Сандоз», Россия). Состав одной капсулы включал комплекс активных компонентов: не менее 1×10^{10} КОЕ лиофилизированных бактерий *Lactobacillus rhamnosus* GG, 23,75 мг цинка в форме глюконата, а также витамины группы В – 0,535 мг тиаминa гидрохлорида (В₁), 0,5 мг рибофлавина (В₂) и 0,486 мг пиридоксина гидрохлорида (В₆).

Схема применения предусматривала ежедневный приём одной капсулы в течение установленного периода – до и после оперативного вмешательства. Режим дозирования строго соответствовал протоколу исследования, учитывавшему периоперационный этап ведения пациентов.

2.4. Питательные среды, использованные в работе

В работе использованы питательные среды для бактериологического исследования микробиоценоза кишечника:

1. *Питательная среда Эндо* (НПО «Питательные среды» г. Махачкала).
2. *Желточно-солевой агар Чистовича* (М.О.Биргер 1982 г.).

3. *Кровяной агар* предназначенный для выявления энтерококков и гемолизирующих форм бактерий (М.О.Биргер, 1982 г.).
4. *Питательная среда для выделения грибов рода Candida* (ФБУН «РостовНИИМП» Роспотребнадзора) (Патент № 2299237 г. Москва 30 мая 2007г.).
5. *Среда УС* (ФГУП ГНЦПМ, г. Оболенск).
6. *Среда Симмонса* (ФГУП ГНЦПМ, г. Оболенск) [12].

2.5. Микробиологические методы исследования

Бактериологическое исследование фекалий выполняли методом культивирования на жидких и полужидких агаризованных питательных средах. Оценку численности микроорганизмов осуществляли с применением десятикратных серийных разведений исходного материала. Таксономическую идентификацию выделенных культур до рода, вида и типа проводили на основе комплексного анализа морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных и антигенных характеристик в соответствии с методическими указаниями Приказа Минздрава СССР № 535 от 22.04.1985 и определителем бактерий Берджи издания 1997 года [12, 40, 47, 71, 72].

Подсчёт колониеобразующих единиц аэробных и факультативно-анаэробных бактерий осуществляли на мясопептонном агаре, обогащённом пятью процентами эритроцитов барана производства «Микроген» (Махачкала). Выделение и количественную оценку энтеробактерий выполняли на полужидкой агаризованной среде Эндо того же производителя.

Принадлежность выделенных культур к родам *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Hafnia* устанавливали путём сопоставления комплекса биохимических реакций, включавших оценку ферментации глюкозы, лактозы, рамнозы, сорбита и маллоната, гидролиза мочевины, образования сероводорода, а также анализа характера роста на среде Симмонса. Дополнительно учитывали продукцию индола, степень подвижности микроорганизмов в жидкой среде,

активность лизиндекарбоксилазы, реакцию с метиловым красным и наличие фенилаланиндезаминазы [12].

Идентификацию стафилококков проводили на желточно-солевом агаре Чистовича («Микроген», Махачкала). Разграничение *Staphylococcus* и *Micrococcus* основывали на результатах теста на анаэробное сбраживание глюкозы и способности ферментировать глицерин в присутствии эритромицина [12, 40].

2.6. Копрологическое исследование

Копрологическое исследование, представлявшее собой развёрнутый анализ кала, выполняли для всесторонней характеристики работы пищеварительного тракта, оценки ферментативной обеспеченности процессов переваривания и состояния микробного баланса в кишечнике. Диагностический алгоритм охватывал три последовательных этапа – макроскопический, микроскопический и химический, каждый из которых позволял получить отдельные, но взаимодополняющие данные о функциональном статусе желудочно-кишечного тракта.

На этапе макроскопической оценки фиксировали ключевые физические характеристики образца: форму и консистенцию каловых масс, их окраску и особенности запаха, а также отмечали присутствие посторонних включений – фрагментов непереваренных пищевых компонентов, слизистых выделений, кровянистых примесей либо гноя. В физиологических условиях кал имеет оформленную структуру и цилиндрическую конфигурацию, отличается мягкой текстурой и окрашен в оттенки коричневого – от светлых до тёмных, что обусловлено индивидуальными особенностями рациона. Характерный каловый запах при этом остаётся в пределах типичного спектра. Патологическими находками считают обнаружение слизи, крови, гноя или значительного объёма непереваренных остатков пищи.

Микроскопический анализ осуществляли путём приготовления и изучения трёх типов препаратов из каловой эмульсии: нативного, с добавлением раствора Люголя и с метиленовой синью. Такой подход позволял дифференцировать широкий спектр элементов – от фрагментов пищевых субстратов до клеточных и микробиологических компонентов. В поле зрения оценивали наличие и степень выраженности остатков непереваренной пищи, мышечных волокон и включений соединительной ткани, переваримой и непереваримой растительной клетчатки, крахмальных зёрен и йодофильной микрофлоры. Кроме того, фиксировали кристаллы различных солей (оксалатов, трипельфосфатов), кристаллы Шарко-Лейдена, а также компоненты жирового обмена – нейтральный жир, жирные кислоты и их соли. Параллельно учитывали клеточные элементы (лейкоциты, плоский эпителий) и возможные паразитарные агенты – яйца гельминтов, простейших, а также дрожжевые грибы. Нормальная микроскопическая картина характеризуется присутствием лишь единичных фрагментов непереваримой клетчатки; мышечные волокна и соединительная ткань либо полностью отсутствуют, либо выявляются в минимальных количествах при смешанном рационе. Крахмал и йодофильная флора в норме не определяются, кристаллы солей и жировые компоненты не обнаруживаются. Лейкоциты и эпителиальные клетки могут встречаться единично, а яйца гельминтов, простейшие и дрожжевые грибы – отсутствуют.

Химический этап копрологического анализа был направлен на определение ряда биохимических показателей: уровня рН, присутствия стеркобилина и билирубина, выявления скрытой крови и белка, а также количественной оценки монокарбоновых летучих жирных кислот в гомологическом ряду от уксусной до капроновой, включая их изомерные формы. Для экспресс-оценки большинства параметров применяли диагностические тест-полоски, обеспечивающие стандартизацию и воспроизводимость результатов. Физиологические значения предполагают диапазон рН кала 6,0–8,0, наличие стеркобилина, отсутствие билирубина (у взрослых пациентов), а также отрицательные реакции на скрытую кровь и белок [20, 35, 70, 74].

2.7. Метод определения концентрации летучих жирных кислот в биологических субстратах газожидкостной хроматографией

Содержание короткоцепочечных жирных кислот в фекалиях устанавливали методом газожидкостной хроматографии с анализом подкислённого супернатанта. Разделение компонентов выполняли на газовом хроматографе «Кристалл 5000.2» с применением техники прямого ввода пробы в испаритель. В качестве разделительной колонки использовали кварцевую капиллярную металлизированную колонку длиной тридцать метров и внутренним диаметром 0,3 мм с неподвижной фазой FFPA. Газом-носителем служил азот, регистрация компонентов осуществлялась пламенно-ионизационным детектором. Анализ проводили в изотермическом режиме при температуре 150 градусов Цельсия. Количественное определение выполняли методом внутреннего стандарта с использованием 2,2-диметилмасляной кислоты, а идентификацию отдельных кислот – по времени удерживания соответствующих пиков [73].

Применение прямого ввода пробы в испаритель хроматографа даёт возможность определить полный спектр короткоцепочечных жирных кислот, включающий уксусную, пропионовую, масляную, валериановую и капроновую кислоты, а также их изомерные формы. Из всего перечисленного набора на долю уксусной, пропионовой и масляной кислот приходится около девяноста процентов суммарной массы. Соотношение концентраций этих трёх кислот в их общей сумме служит важным показателем, отражающим степень целостности микробного сообщества желудочно-кишечного тракта [36]. Для характеристики функциональной активности симбионтной микробиоты применяли расчёт структурного индекса, который вычисляли как отношение суммы концентраций пропионовой, масляной, валериановой и капроновой кислот с учётом их изомеров к концентрации уксусной кислоты [42]. Протеолитическую активность микробиоценоза оценивали посредством индекса изокилот, представляющего собой отношение суммы концентраций изомасляной, изовалериановой и

изокапроновой кислот к суммарному содержанию масляной, валериановой и капроновой кислот в копрофильtrate [16, 46].

2.8. Хромато-масс-спектрометрический анализ

Для хромато-масс-спектрометрического исследования крови на содержание микробных маркеров применяли следующий набор реактивов: н-гексан квалификации х.ч., метанол квалификации х.ч., соляную кислоту квалификации х.ч., тридекановую кислоту квалификации ч., дейтерометанол квалификации ч.д.а., смесь BSTFA с TMCS в соотношении 99:1 и этоксиэтан квалификации ч.д.а. – все указанные реагенты производства ЗАО «Вектон» (Санкт-Петербург, Россия). В качестве газа-носителя использовали очищенный сжатый гелий марки А (ООО «Технологии Технических Газов», Москва, Россия).

Материалом для исследования служила венозная кровь, которую отбирали в пробирку типа эпиндорф, замораживали при температуре минус восемнадцать градусов Цельсия и доставляли в лабораторию в течение тридцати-шестидесяти минут. Пробоподготовку проводили в соответствии с методическими рекомендациями, изложенными в учебно-методическом пособии «Методика масс-спектрометрии микробных маркеров как способ оценки пристеночной кишечной микробиоты при заболеваниях органов пищеварения» [4, 48].

Аликвоту биоматериала объёмом сорок микролитров пипеткой переносили в вialу вместимостью полтора миллилитра, снабжённую заворачивающейся крышкой с тефлонированной прокладкой. После снятия крышки пробу подсушивали в термостате при восьмидесяти градусах Цельсия, добавляя равный по объёму биоматериала метанол для ускорения процесса сушки. К загустевшему образцу приливали четыреста микролитров одномолярного раствора соляной кислоты в метаноле, плотно закрывали вialу крышкой и проводили реакцию кислого метанолиза при восьмидесяти градусах в течение одного часа. В результате этого этапа происходило высвобождение жирных кислот из состава сложных

липидов пробы в виде метиловых эфиров. К охлаждённой реакционной смеси добавляли триста нанограммов внутреннего стандарта – дейтерометилового эфира тридекановой кислоты, растворённого в гексане. Затем проводили экстракцию четырьмястами микролитрами гексана: смесь встряхивали на вортексе и оставляли для расслоения на пять минут при комнатной температуре. Верхний экстракт (декантат) переносили в чистую виалу, высушивали в течение семи минут при восьмидесяти градусах, после чего сухой остаток обрабатывали двадцатью микролитрами N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида (BSTFA) для формирования триметилсилильных эфиров оксикислот, альдегидов и стеролов при той же температуре и закрытой крышке в течение десяти минут. К полученной реакционной смеси добавляли восемьдесят микролитров гексана, и при работе с автосэмплером переносили раствор в коническую вставку, которую помещали в исходную виалу. После плотного закрывания виалу устанавливали в автосэмплер для автоматического ввода одного-двух микролитров в инжектор газового хроматографа «Маэстро 7820А» с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 [4, 59].

Разделение компонентов осуществляли на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой «Ультра-1» (Hewlett-Packard) длиной двадцать пять метров и внутренним диаметром ноль целых двадцать сотых миллиметра. Анализ проводили в режиме программирования температуры термостата колонки со скоростью нагрева пять градусов в минуту в диапазоне от ста тридцати до трёхсот двадцати градусов Цельсия. Квадрупольный масс-спектрометр с ионизацией электронами при энергии семьдесят электронвольт функционировал в режиме масс-фрагментографии селективных ионов (multiple ions monitoring – MIM), обеспечивая периодическое детектирование до тридцати ионов в пяти временных интервалах. Газом-носителем служил гелий [59].

Временные интервалы и набор отслеживаемых ионов подбирали таким образом, чтобы обеспечить селективное измерение концентраций маркерных жирных кислот, характерных для определяемых видов микроорганизмов. В частности, для детектирования малых количеств микробных кислот с длиной

углеродной цепи от двенадцати до пятнадцати атомов, а также семнадцати и девятнадцати атомов использовали интенсивный ион с массовым числом $m/z = 87$ в спектрах жирных кислот. Ион с массовым числом 175, являющийся специфичным и высокоинтенсивным для бета-оксикислот, регистрировали постоянно в каждом режиме анализа. Ионы 301 и 315 с последующим шагом через четырнадцать единиц массы (соответствующие структурам M-15) были выбраны в качестве свидетелей молекулярного иона оксикислот тридекановой, тетрадекановой и последующих членов гомологического ряда. Интерпретация масс-фрагментограмм заключалась в соотнесении регистрируемых пиков с конкретными веществами на основании их массы, соотношения интенсивностей (площадей) и времени хроматографического удерживания. Значения времён удерживания определяли заранее по хроматограммам, полученным в режиме полного сканирования, что позволяло с высокой степенью достоверности идентифицировать химическую природу компонентов клетки по их полному масс-спектру. Описанный алгоритм детектирования масс-спектральных параметров биологической пробы обеспечивает возможность определения около двухсот известных жирных кислот, спиртов и стеролов [59].

Площади пиков маркерных соединений интегрировали в автоматическом режиме по заданной программе. Полученные данные затем вводили в расчётную программу, реализованную в электронных таблицах Microsoft Excel. Количественное определение проводили с использованием калибровочных данных по дейтерированной тридекановой кислоте в качестве внутреннего стандарта [59].

2.9. Определение некоторых типов клеточных жирных кислот и альдегидов микроорганизмов

На сегодняшний день в значительной степени расшифрован химический состав большинства микроорганизмов, однако установление строго специфичного маркера, однозначно указывающего на единственный вид, остаётся непростой

задачей. Причина заключается в том, что по мере накопления данных нередко выявляется не один, а сразу несколько различных микроорганизмов, в метаболизме или структуре клеточных компонентов которых присутствует одно и то же химическое соединение.

В таблице 1 систематизирован перечень 72 маркеров клинически значимых микроорганизмов – в их число входят жирные кислоты, альдегиды, спирты и иные соединения. Они выделены методом мультиионной масс-фрагментографии из общего пула, насчитывающего порядка 170 маркерных веществ [4, 58].

Поскольку получаемые данные нередко характеризуются высокой степенью «зашумлённости» из-за перекрёстных сигналов и перекрывающихся профилей, для их адекватной интерпретации применяют методы многомерной статистики и математического моделирования. Такой подход позволяет выделить устойчивые паттерны и оценить вклад отдельных химических групп в общую картину микробного сообщества.

Особую ценность при интерпретации результатов несёт анализ факторной нагрузки отдельных классов соединений. Так, дефицит оксикислот может служить косвенным признаком снижения концентрации микроорганизмов граммотрицательной группы – именно они выступают основным источником данных соединений. Отсутствие альдегидов сигнализирует о сокращении доли обширной группы плазмалогенсодержащих организмов. Низкий уровень альфа-оксикислот отражает уменьшение численности определённых таксонов, для которых характерно присутствие сфинголипидов с этими кислотами в составе; при этом важно учитывать их принципиальное отличие от бета-оксикислот липополисахаридов (ЛПС), имеющих иную биохимическую природу и диагностическую значимость [4].

Таблица 1 – Малые молекулы, определяемые масс-спектрометрическим анализом биоматериала [4]

№	Обозначение химического соединения*	Название химического соединения
Жирные кислоты		
1	C10	Декановая
2	iC12	Изолауриновая
3	a13	Антеизотридекановая
4	i14	Изомиристиновая
5	14:1□9	9,10 - тетрадеценовая
6	14:1□11	11,12-тетрадеценовая
7	C14:0	Миристиновая
8	15:1□9	9,10-пентадеценовая
9	i15	Изопентадекановая
10	a15	Антеизопентадекановая
11	16:1□7	7,8-гексадеценовая
12	16:1□9t	Транс-9,10-гексадеценовая
12	16:1□11	11,12-гексадеценовая
13	i16:0	Изопальмитиновая
14	10Me16	10-метилгексадекановая
15	i17:1	Изопентадеценовая
16	C17:0	Гептадеценовая
17	i17:0	Изогептадекановая
18	a17:0	Антеизогептадекановая
19	17сус	Циклогептадекановая
20	18:1□11	Цис-вакценовая
21	i18	Изооктадекановая
22	10Me18	10-метил-октадекановая
23	19сус	Циклононадекановая
24	i19	Изононадекановая
25	a19	Антеизононадекановая
26	20:1□11	11-эйкозеновая
Гидроксикислоты		
27	3h12	3-гидроксилауриновая
28	2h12	2-гидроксилауриновая
29	3hi13	3-гидроксиизо-тридекановая
30	3h13	3-гидрокситридекановая
31	3h14	3-гидроксимиристиновая
32	2h14	2-гидроксимиристиновая
33	3h15	3-гидрокси-пентадекановая
34	3hi15	3-гидроксиизо-пентаде-кановая
35	2hi15	2-гидроксиизо-пентадекановая

Продолжение Таблицы 1

№	Обозначение химического соединения*	Название химического соединения
36	3ha15	3-гидроксиантеизо-пентадекановая
37	3hi17	Гидроксиизо-гептадекановая
38	2hi17	2-гидроксиизо-гептаде-кановая
39	3h17	3-гидрокси-гептадекановая
40	3ha17	3-гидроксиантеизо-гептадекановая
41	10h18:1	10-гидрокси-октадеценная
42	3h18	3-гидроксистеариновая
43	10h18	10-гидроксистеариновая
44	3h20	3-гидроксиэйкозановая
45	3hi20	3-гидроксиизо-эйкозановая
Альдегиды:		
49	12a	Лауриновый
50	13a	Тридекановый
51	i14a	Изомиристиновый
52	i15a	Изопентадекановый
53	a15a	Антеизопентадекановый
54	15a	Пентадекановый
55	16:1 □ 9a	9,10-гексадеценная
56	16a	Пальмитиновый
57	i17a	Изогептадекановый
58	a17a	Антеизогептадекановый
59	17суса	Циклогептадекановый
60	17a	Гептадекановый
61	18:1a	Октадеценный
62	18a	Стеариновый
63	a16a	Антеизопальмитиновый
64	19суса	Циклононадекановый
65	19a	Нонадекановый
Стерины		
66	Copr-Chol	Копростанол - холестерол
67	Chol-en-2-OH	Холестендиол
68	Chol-dien	Холестадиенон
69	Pneumocis	Пневмоцистерол
70	Camp	Кампестерол
71	Ergo	Эргостерол
72	Sito, β-sito	Ситостерол, β-ситостерол
Примечание: * – Обозначения веществ: цифра означает число атомов углерода, цифра после двоеточия – число двойных связей (например, 17:1); h – оксикислота; a,i – в начале означает разветвление; сус – циклопропановая кислота. Например, ha17 – 3-окси-антеизогептадекановая кислота.		

2.10. Статистические методы исследования

В рамках проведённого исследования применяли комплекс статистических и математико-моделирующих методов, позволяющих всесторонне оценить полученные данные, выявить устойчивые закономерности и построить прогностические модели.

На начальном этапе выполняли описательную статистику. Для количественных и порядковых показателей рассчитывали среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (SD), 95 % доверительный интервал (ДИ) для среднего, медиану (Me) и интерквартильный размах (IQR) по каждой экспериментальной группе. Качественные переменные представляли через выборочную долю (W), её стандартную ошибку (SE) и 95 % ДИ для доли. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка – на основании его результатов определяли, какие методы сравнения средних следует использовать: параметрические либо непараметрические [4, 259].

Для оценки достоверности различий между группами применяли многоступенчатый алгоритм. Сначала проверяли предпосылки для использования многофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями (GLM). Статистическую значимость модели оценивали по критериям След Пиллая и Лямбда Уилкса. Далее, с учётом характера распределения и равенства дисперсий, выбирали подходящий метод: при соблюдении условий нормальности и гомогенности дисперсий использовали двухфакторный одномерный параметрический анализ (ANOVA) и t -критерии для связанных и несвязанных выборок; при отклонении от этих условий – непараметрические методы (критерии Манна-Уитни и Вилкоксона). Во всех случаях порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$ [4].

При анализе номинативных переменных для проверки гипотез о случайном распределении категорий между группами использовали критерий хи-квадрат. Если достигался уровень значимости $p < 0,05$, выполняли попарный анализ

различий генеральных долей по каждой категории с применением z-критерия для качественных данных (при условии соблюдения необходимых допущений) [4]. При множественных сравнениях вносили поправку на увеличение вероятности ошибки первого рода.

Для выявления взаимосвязей между параметрами применяли корреляционный анализ с расчётом коэффициентов корреляции Пирсона; статистически значимыми считали связи при $p < 0,05$ [16, 45].

В части математического моделирования использовали ROC-анализ (с построением бинарного классификатора) и линейный дискриминантный анализ. С помощью линейного дискриминантного анализа формировали решающие правила классификации объектов на базе концентраций короткоцепочечных жирных кислот в слюне. Применяли метод пошагового исключения переменных и анализ сопряжённости. В ходе этого этапа рассчитывали классификационные уравнения, оценивали качественные характеристики моделей (чувствительность, специфичность, прогностическую точность), определяли статистическую значимость разделения групп, строили дискриминантную функцию и вычисляли координаты центроидов [3, 16].

Количественную оценку уникальных соотношений компонентов КЖК проводили через расчёт коэффициента уникальности – он базировался на соотношении расстояний от центроидов.

Все расчёты выполняли в программных средах Statistica 10.0 и Microsoft Excel 2010 [69].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Качественные, количественные и функциональные изменения кишечной микробиоты и копрологические сдвиги у пациентов с колоректальным раком

Микроорганизмы, колонизирующие ЖКТ, представляют собой самую большую часть микробиоты человека как по видовому разнообразию, так и по количеству микробных клеток. Функциональная активность микробиоценоза кишечника и видовой состав зависит от большого числа факторов, а именно от субстрата, от условий обитания микроорганизмов и многих других факторов.

3.1.1. Родовой и видовой состав микрофлоры кишечника у пациентов с аденокарциномой кишечника

Родовой состав микрофлоры кишечника исследовали культуральным методом с последующей видовой идентификацией изолятов и определением доли штаммов условно-патогенных бактерий, резистентных к антибактериальным препаратам.

Данные о частотах встречаемости ключевых культивируемых родов кишечных микроорганизмов в образцах кала и интенсивности обсемененности у пациентов с КРР (основная группа) и клинически здоровых добровольцев (контрольная группа) представлены в таблице 2.

Частоты встречаемости микроорганизмов в группах статистически значимо не отличались, за исключением представителей рода *Corynebacterium*, которые выявлялись в образцах кала у 25% пациентов основной группы.

Таким образом, можно отметить, что обнаружение нетипичного для кишечника рода *Corynebacterium* может служить элементом онконастороженности.

Таблица 2 – Частоты встречаемости микроорганизмов в образцах кала и интенсивность обсемененности у пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых добровольцев по результатам культурального исследования

Микроорганизмы	Основная группа (пациенты с колоректальным раком) (n=60)			Контрольная группа (клинически здоровые добровольцы) (n=68)			Значимость различий между группами, p
	Частота встречаемости, абс.	Частота встречаемости, %	Интенсивность обсемененности, Lg КОЕ/г	Частота встречаемости, абс.	Частота встречаемости, %	Интенсивность обсемененности, Lg КОЕ/г	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	60	100	9 [9 - 9]	68	100	9 [9 - 9]	1
<i>Lactobacillus spp.</i>	60	100	7 [6,9 - 7]	68	100	7 [5 - 7]	1
<i>Eshirihia.spp.</i>	60	100	8,4 [8,2 - 8,5]	68	100	7,8 [6,9 - 8,3]	1
<i>Enterococcus spp.</i>	60	100	4 [4 - 4,8]	68	100	4 [4 - 7,2]	1
<i>Klebsiella spp.</i>	10	16,7	8,2 [8 - 8,4]	12	17,6	6,7 [5,5 - 7,2]	0,944
<i>Enterobacter spp.</i>	0	0	[-]	14	20,6	7 [6 - 7,3]	0,116
<i>Pseudomonas spp.</i>	5	8,3	8,3 [8,3 - 8,3]	8	11,8	5 [4,9 - 5]	0,757
<i>Candida spp.</i>	15	25	5 [4,7 - 5,2]	4	5,9	4,4 [4,1 - 4,6]	0,084
<i>Staphylococcus spp.</i>	30	50	4 [4 - 4]	28	41,2	4 [4 - 4]	0,690
<i>Corynebacterium spp.</i>	15	25	7,7 [7,4 - 7,9]	0	0	[-]	0,004*
<i>Oceanobacillus spp.</i>	5	8,3	4 [4 - 4]	0	0	[-]	0,092
<i>Raoultella spp.</i>	5	8,3	7 [7 - 7]	4	5,9	7,7 [7,4 - 7,9]	0,775
<i>Bacillus spp.</i>	10	16,7	4 [4 - 4]	16	23,5	4 [4 - 4]	0,661
<i>Lysinibacillus spp.</i>	5	8,3	6 [6 - 6]	0	0	[-]	0,092

Примечание: * - обозначены показатели, имеющие статистическую значимость от контрольной группы, рассчитанные по критерию χ^2 при n>10 или по точному критерию Фишера при n<10.

В таблице 3 представлены частоты выявления основных видов и родов представителей микробиоты в титре выше 4 Lg КОЕ/г по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии у пациентов на разных стадиях КРР (I–IV стадии), а также в контрольной группе.

Таблица 3 – Изменения частоты встречаемости родов и видов представителей кишечной микробиоты в титре выше 4 Lg КОЕ/г на различных стадиях колоректального рака (КРР) по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии [12]

Микроорганизмы	Группа контроля (клинически здоровые добровольцы) (n=68)		Стадии колоректального рака							
			I (n=13)		II (n=14)		III (n=17)		IV (n=16)	
	Абс.	Отн, %	Абс.	Отн, %	Абс.	Отн, %	Абс.	Отн, %	Абс.	Отн, %
<i>Bifidobacterium spp.</i>	68	100	12	92,3	7	50*	7	41,2*	3	18,8*
<i>B. longum</i>	64	94,1	12	92,3	7	50*	7	41,2*	3	18,8*
<i>B. adolescentis</i>	22	32,4	3	23,1	2	14,3	1	5,9	0	0*
<i>B. bifidum</i>	19	27,9	3	23,1	2	14,3	2	11,8	0	0*
<i>B. breve</i>	13	19,1	2	15,4	2	14,3	1	5,9	0	0
<i>B. dentium</i>	9	13,2	1	7,7	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus spp.</i>	68	100	11	84,6	10	71,4	10	58,8	5	31,3*
<i>L. plantarum</i>	65	95,6	11	84,6	9	64,3	6	35,3	5	31,3*
<i>L. rhamnosus</i>	22	32,4	3	23,1	3	21,4	1	5,9	0	0*
<i>L. casei</i>	21	30,9	3	23,1	2	14,3	3	17,6	0	0*
<i>L. acidophilus</i>	13	19,1	2	15,4	1	7,1	1	5,9	0	0
<i>L. reuteri</i>	7	10,3	1	7,7	1	7,1	0	0	0	0
<i>L. salivarius</i>	5	7,4	3	23,1	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	65	95,6	12	92,3	12	85,7	13	76,5	12	75
<i>E. coli (L-)</i>	0	0	1	7,7*	1	7,1	2	11,8*	3	18,8*
<i>E. coli (hem+)</i>	0	0	2	15,4*	1	7,1	2	11,8*	4	25*
<i>Enterococcus spp.</i>	28	41,2	5	38,5	5	35,7	7	41,2	3	18,8
<i>E. spp. a hem+</i>	0	0	0	0	1	7,1	0	0*	0	0
<i>E. faecium</i>	0	0	3	23,1*	0	0	0	0	7	43,8*
<i>E. faecalis</i>	0	0	2	15,4*	0	0	5	29,4	1	6,3*
<i>K. pneumoniae</i>	12	17,6	1	7,7	0	0	5	29,4	8	50*
<i>Enterobacter spp.</i>	14	20,6	0	0	0	0	0	0	4	25
<i>P. aeruginosa</i>	8	11,8	2	15,4	0	0	3	17,6	0	0
<i>Candida albicans</i>	4	5,9	3	23,1	0	0	2	11,8	1	6,3
<i>C. tropicalis</i>	0	0	1	7,7*	0	0	3	17,6	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	2	15,4*	3	21,4	0	0*	0	0

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой контроля, рассчитанные по критерию χ^2 при $n > 10$, а при $n < 10$ – по точному критерию Фишера.

При прогрессировании КРР наблюдалось отчетливое снижение численности представителей нормобиоты, в первую очередь родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. Так, общее присутствие *Bifidobacterium spp.* в титре выше 4 Lg КОЕ/г снижалось с 92,3% на I стадии заболевания до 18,8% на IV стадии, тогда как в группе контроля у 100% клинически здоровых добровольцев выявляли представителей этого рода в указанном количестве. Наиболее выраженное снижение частоты встречаемости *Bifidobacterium spp.* у больных КРР наблюдалось для *B. longum* и *B. adolescentis*. Аналогичная закономерность была характерна и для *Lactobacillus spp.*, частота встречаемости которых в титре выше 4 Lg КОЕ/г уменьшалась с 84,6% на I стадии заболевания до 31,3% на IV стадии (в группе контроля – 100%). При этом полностью исчезали такие виды, как *L. rhamnosus*, *L. casei* и *L. reuteri* (Таблица 3).

Наряду с этим, по мере прогрессии КРР отмечали нарастание числа потенциально патогенных и оппортунистических микроорганизмов. Особенно значимым был рост частоты выделения *Clostridioides difficile* (с 26,5% в контрольной группе до 100% на IV стадии рака), *Fusobacterium nucleatum* (с 27,9% до 93,8%) и *Parvimonas micra* (с 39,7% до 93,8%). Эти микроорганизмы активно участвуют в воспалительных процессах и, вероятно, способствуют канцерогенезу. Также возрастала частота обнаружения условно-патогенных энтеробактерий, таких как *Klebsiella pneumoniae* (до 50% на IV стадии), *Enterobacter spp.*, а также некоторых представителей семейства *Clostridiaceae* (*C. difficile*, *C. butyricum*). Появлялись виды, отсутствовавшие у клинически здоровых лиц: *Morganella morganii*, *Kosakonia radicincitans*, *Oceanobacillus spp.* Увеличение частоты выявления гемолизирующих и лактозонегативных штаммов *E. coli*, а также энтерококков (*E. faecium*, *E. faecalis*) подчеркивает нарушение барьерной функции кишечника и нарастающий дисбаланс микробиоты (Таблица 3).

Отдельного внимания заслуживает рост доли анаэробных видов, ассоциированных с опухолевыми процессами, таких как *F. nucleatum*, *P. micra*, *Ruminococcus gnavus*, *Peptostreptococcus asaccharolytica*, *Bacteroides ovatus*, *B.*

vulgatus и др., что, вероятно, отражает смещение экосистемы в сторону воспалительного и опухолеассоциированного профиля.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о глубоких нарушениях микробного гомеостаза кишечника при КРР, выражающихся в истощении нормофлоры и обогащении микробиома оппортунистическими и потенциально патогенными микроорганизмами. Динамика этих изменений может быть использована для микробиологического мониторинга и прогнозирования течения заболевания.

Выявление микроорганизмов в титре выше 4 Lg КОЕ/г предполагало постановку теста на антибиотикорезистентность. Установлены статистически значимые различия между клинически здоровыми лицами и больным КРР в частоте встречаемости представителей кишечной микробиоты, обладающих резистентностью (R) и мультирезистентностью (MDR) к антибактериальным препаратам (Таблица 4). Вместе с тем межгрупповых различий по выявляемости штаммов с экстремальной антибиотикорезистентностью (XDR) не обнаружили. Экстремальной антибиотикорезистентностью обладали только штаммы *Pseudomonas aeruginosa*: 100% изолятов у больных КРР и 75% – у клинически здоровых лиц. Штаммы *Corynebacterium spp.*, которые обнаруживались только у больных КРР, имели резистентность более чем к 3 антибактериальным препаратам, что характеризовало их как мультирезистентные. В основной группе чаще встречались мультирезистентные штаммы *Klebsiella pneumoniae*, а количество мультирезистентных штаммов *Escherichia coli* было снижено. Штаммы *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Raoultella spp.*, титр которых был выше 4 Lg КОЕ/г, с множественной резистентностью к антибактериальным препаратам определялись только в группе контроля.

Таким образом, изменения антибиотикорезистентности кишечных микроорганизмов в объединенной выборке больных КРР в сравнении с показателями клинически здоровых лиц не имели однонаправленного вектора, который можно было бы связать с патогенезом опухолевого заболевания.

Таблица 4 – Частоты встречаемости штаммов микроорганизмов, резистентных к антибактериальным препаратам, в образцах кала пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых лиц

Микро- организмы	Основная группа (пациенты с колоректальным раком) (n=60)						Группа контроля (клинически здоровые лица) (n=68)					
	R		MDR		XDR		R		MDR		XDR	
	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %
<i>Eshirihia coli</i>	5	25	15	75*	0	0	2	16,7	10	83,3	0	0
<i>Enterococcus spp.</i>	0	0*	15	100*	0	0	14	77,8	4	22,2	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	100*	0	0	0	0	2	20	8	80	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	5	100	0	0	2	25	6	75
<i>Corynebacterium spp.</i>	0	0	13	100*	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter spp.</i>	0	0*	0	0*	0	0	2	14,3	12	85,7	0	0
<i>Bacillus spp.</i>	0	0	0	0*	0	0	0	0	2	100	0	0
<i>Raoultella spp.</i>	0	0	0	0*	0	0	0	0	4	100	0	0
Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой контроля, рассчитанные по критерию χ^2 при $n > 10$, а при $n < 10$ – по точному критерию Фишера. R – резистентность; MDR – мультирезистентность; XDR – экстремальная антибиотикорезистентность; Абс. – абсолютное число; Отн. – относительное количество.												

Весьма информативными оказались данные оценки динамики резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам на различных стадиях КРР. Прогрессирование заболевания сопровождалось значительными изменениями микробиоты кишечника, включая увеличение численности условно-патогенных микроорганизмов и доли их антибиотикорезистентных штаммов, что связано с прогрессирующим дисбиозом, воспалением и большей потребностью в антимикробных препаратах.

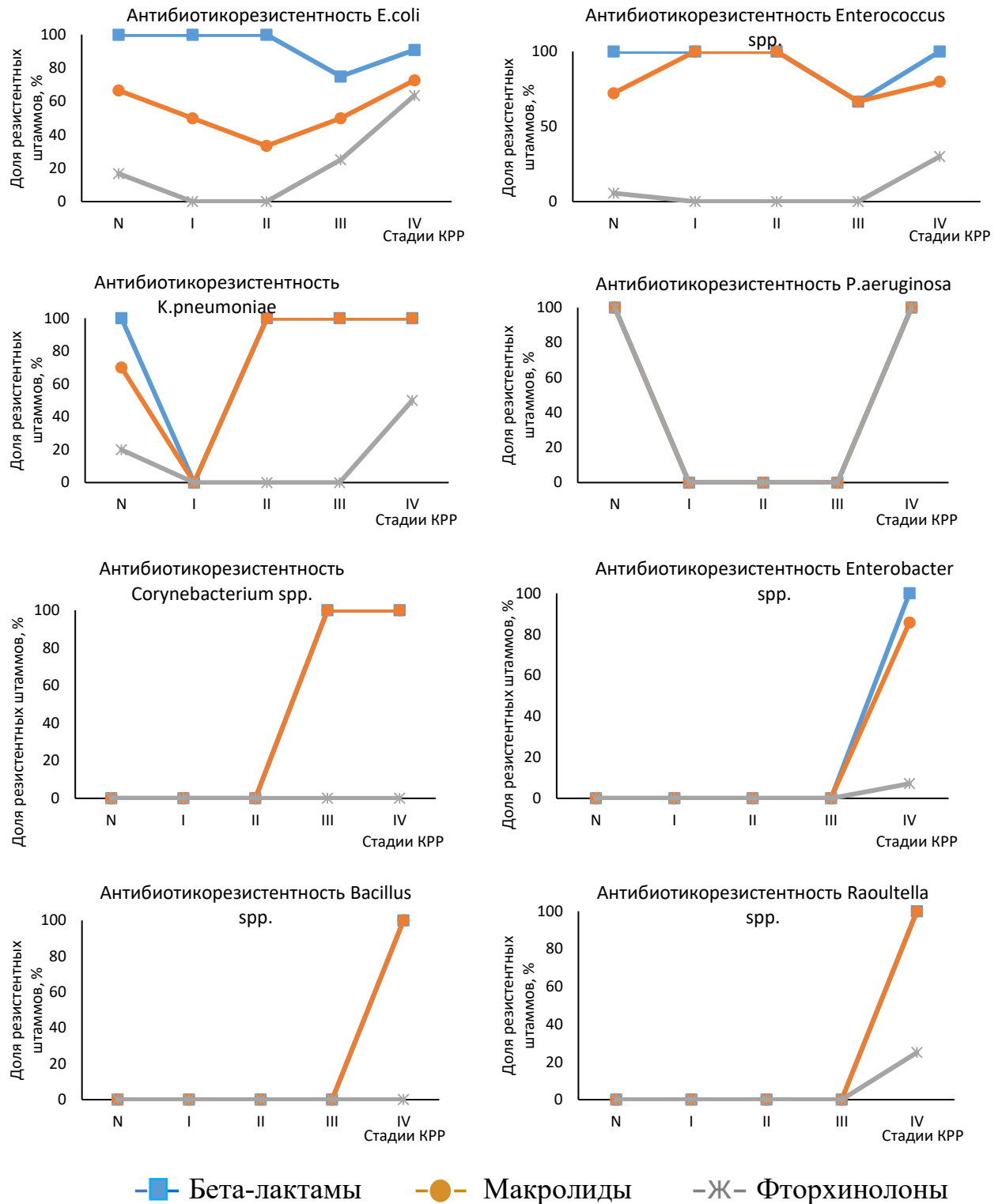
Определены доли резистентных штаммов к трём классам антибактериальных препаратов – бета-лактамам, макролидам и фторхинолонам – для восьми таксонов микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*,

Pseudomonas aeruginosa, *Corynebacterium spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.* и *Raoultella spp.* (Рисунок 1).

Анализ данных позволил выявить тенденции антибиотикорезистентности, связанные с прогрессированием КРР, что важно в контексте выбора антибактериальной терапии в случае развития инфекционных осложнений на разных стадиях опухолевого процесса.

У клинически здоровых лиц наибольшая доля антибиотикорезистентных штаммов выявлена в следующих таксонах: *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Показатели антибиотикорезистентности *E.coli* у здоровых добровольцев были высокими: 100% резистентность к бета-лактамам, 66,7% – к макролидам, 16,7% – к фторхинолонам. Представители рода *Enterococcus* были в 100% случаев резистентны к бета-лактамам, в 72,2% – к макролидам, в 5,6% – к фторхинолонам; *K. pneumoniae* – 100% к бета-лактамам, 70% – к макролидам, 20% – к фторхинолонам; *P. aeruginosa* – 100% ко всем трём классам антибиотиков, что характерно для множественной резистентности. Высокая резистентность к бета-лактамам и макролидам у клинически здоровых добровольцев может быть связана с распространением генов резистентности (например, бета-лактамаз) в популяции, а низкая резистентность к фторхинолонам (кроме *P. aeruginosa*) указывает на низкую селективную нагрузку этими препаратами на микробиоту здоровых лиц (Рисунок 1).

У пациентов с ранней (I) стадией КРР установлены некоторые отличия долей антибиотикорезистентных штаммов условно-патогенных бактерий в сравнении с таковыми у клинически здоровых лиц (Рисунок 1). Штаммы *E. coli* в 100% случаев обладали резистентностью к бета-лактамам, 50% – к макролидам, 0% – к фторхинолонам; *Enterococcus spp.* – 100% к бета-лактамам и макролидам, 0% – к фторхинолонам.



Примечание: N – «норма» (клинически здоровые лица).

Рисунок 1 – Динамика резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам по стадиям колоректального рака

Резистентных к 3 группам антибактериальных препаратов штаммов среди других 6 из 8 изученных таксонов условно-патогенных бактерий не выявили. Относительно невысокие показатели резистентности к макролидам *E. coli* и

отсутствие резистентности к фторхинолонам представителей всех восьми изученных таксонов условно-патогенных микроорганизмов указывают на невысокую селективную нагрузку антибиотиками на ранней стадии опухолевого заболевания.

На II стадии КРР обнаружили следующие доли резистентных к антибактериальным препаратам штаммов условно-патогенных микроорганизмов: *E. coli* – 100% к бета-лактамам, 33,3% – к макролидам, 0% – к фторхинолонам; *Enterococcus spp.* – 100% к бета-лактамам и макролидам, 0% – к фторхинолонам; *K. pneumoniae* – 100% к бета-лактамам и макролидам, 0% – к фторхинолонам (Рисунок 1) Тенденция к снижению доли резистентных к макролидам штаммов *E. coli* (с 50% на I стадии до 33,3%) и отсутствие резистентности к фторхинолонам могут быть связаны с минимальным применением этих антибактериальных препаратов на II стадии опухолевого заболевания. Отсутствие резистентных штаммов *P. aeruginosa*, *Corynebacterium spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.* и *Raoultella spp.*, как и на начальной стадии КРР, можно связать с невысокой потребностью в антимикробных препаратах и низкой частотой их использования у пациентов.

На стадии III число таксонов, в которых выявляли антибиотикорезистентные штаммы, увеличилось до 4: *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *Corynebacterium spp.* Доля резистентных штаммов составляла для *E. coli* – 75% к бета-лактамам, 50% – к макролидам, 25% – к фторхинолонам; *Enterococcus spp.* – 66,7% к бета-лактамам и макролидам, 0% – к фторхинолонам; *K. pneumoniae* – 100% к бета-лактамам и макролидам, 0% – к фторхинолонам; *Corynebacterium spp.* – 100% к бета-лактамам и макролидам, 0% – к фторхинолонам (Рисунок 1). Появление *Corynebacterium spp.* с полной резистентностью к бета-лактамам и макролидам отражает усиление патогенной нагрузки и связанное с ней повышение частоты применения антибактериальных препаратов. Тенденция к снижению доли резистентных к бета-лактамам штаммов *E. coli* (с 100% на I-II стадиях до 75%) и *Enterococcus spp.* (с 100% на I-II стадиях до 66,7%) может быть связана с гетерогенностью штаммов в условиях малого размера выборок. Появление

резистентности *E. coli* к фторхинолонам (25%) указывает на начало отбора резистентных штаммов.

На стадии IV наблюдали максимальное разнообразие таксонов, в которых были антибиотикорезистентные штаммы: *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Corynebacterium spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Raoultella spp.* (Рисунок 1). Доли антибиотикорезистентных штаммов достигали пиковых значений:

- *E. coli*: 90,9% – к бета-лактамам, 72,7% – к макролидам, 63,6% – к фторхинолонам.
- *Enterococcus spp.*: 100% – к бета-лактамам, 80% – к макролидам, 30% – к фторхинолонам.
- *K. pneumoniae*: 100% – к бета-лактамам и макролидам, 50% – к фторхинолонам.
- *P. aeruginosa*: 100% – ко всем классам антимикробных препаратов.
- *Corynebacterium spp.*: 100% – к бета-лактамам и макролидам, 0% – к фторхинолонам.
- *Enterobacter spp.*: 100% – к бета-лактамам, 85,7% – к макролидам, 7,1% – к фторхинолонам.
- *Bacillus spp.*: 100% – к бета-лактамам и макролидам, 0% – к фторхинолонам.
- *Raoultella spp.*: 100% – к бета-лактамам и макролидам, 25% – к фторхинолонам.

Рост числа штаммов, резистентных к антимикробным препаратам, особенно к фторхинолонам, указывает на сильный селективный прессинг в результате большей потребности в этих препаратах на поздней стадии КРР.

3.1.2. Оценка функциональной активности микробиоты кишечника у пациентов с аденокарциномой кишечника

Оценка функциональной активности микробиоты кишечника определяется по ее метаболической активности, которую можно оценить по концентрациям короткоцепочечных жирных (КЖК) кислот в копрофильtrate. Пул КЖК является продуктом суммарного метаболизма высокоинтегрированной системы микробиоты, которая находится в сложных, при этом не всегда симбиотических отношениях с макроорганизмом. Концентрации КЖК несут в себе информацию обо всех изменениях, происходящих в микробно-тканевом комплексе, который является многофакторной системой. Для выявления наиболее информативного биомаркера, описывающего изменения связанные с колоректальным раком, необходимо исследовать метаболиты кишечной микробиоты методами многомерной статистики и математического моделирования.

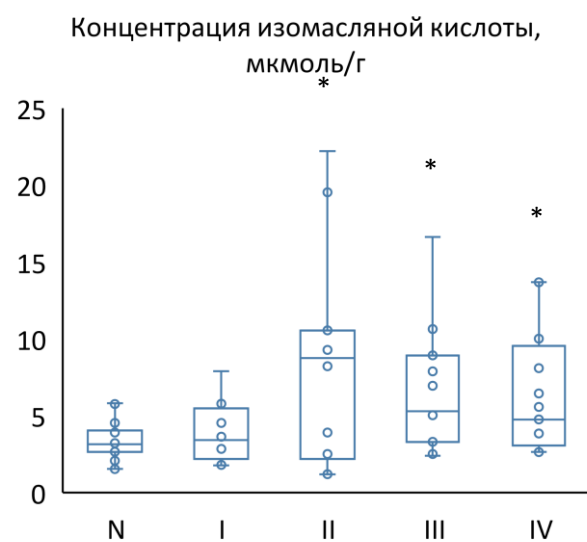
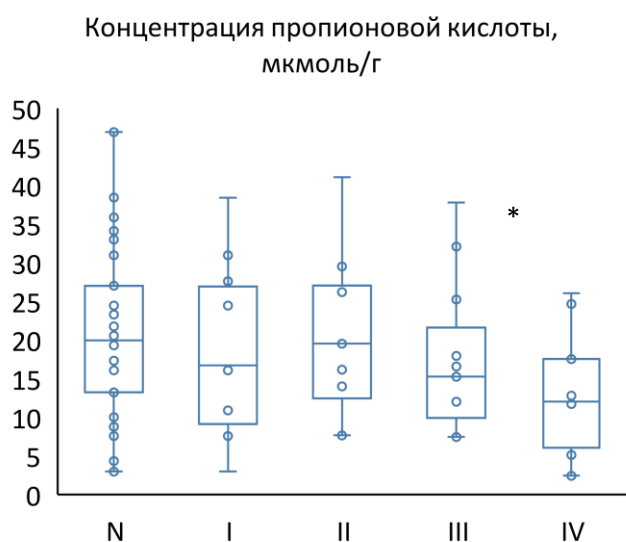
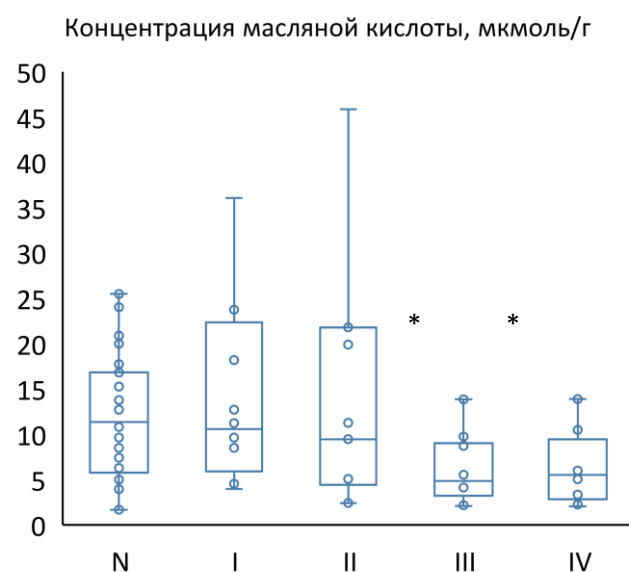
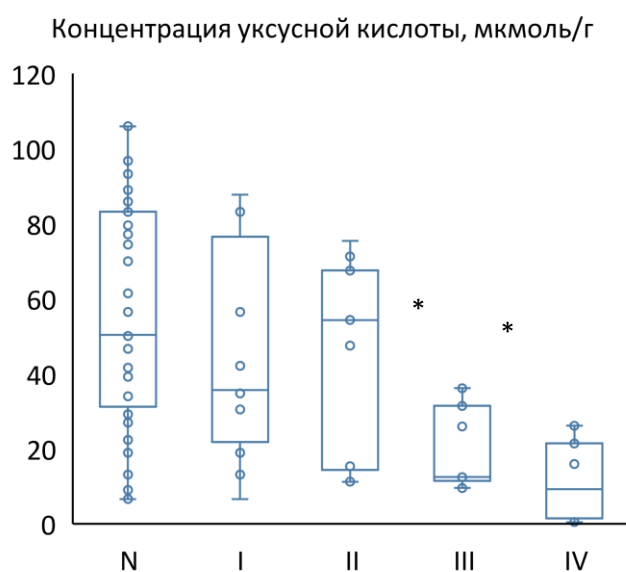
На рисунке 2 представлена динамика концентраций КЖК кислот в копрофильtrate. Выявлена устойчивая тенденция к снижению содержания уксусной и масляной кислот по мере прогрессирования заболевания. Концентрация уксусной и масляной кислот статистически значимо снижались на III и IV стадии КРР. Содержание пропионовой кислоты снижалась на IV стадии. Концентрации изомасляной и изовалериановой кислот, наоборот, увеличивались на III и IV стадиях колоректального рака.

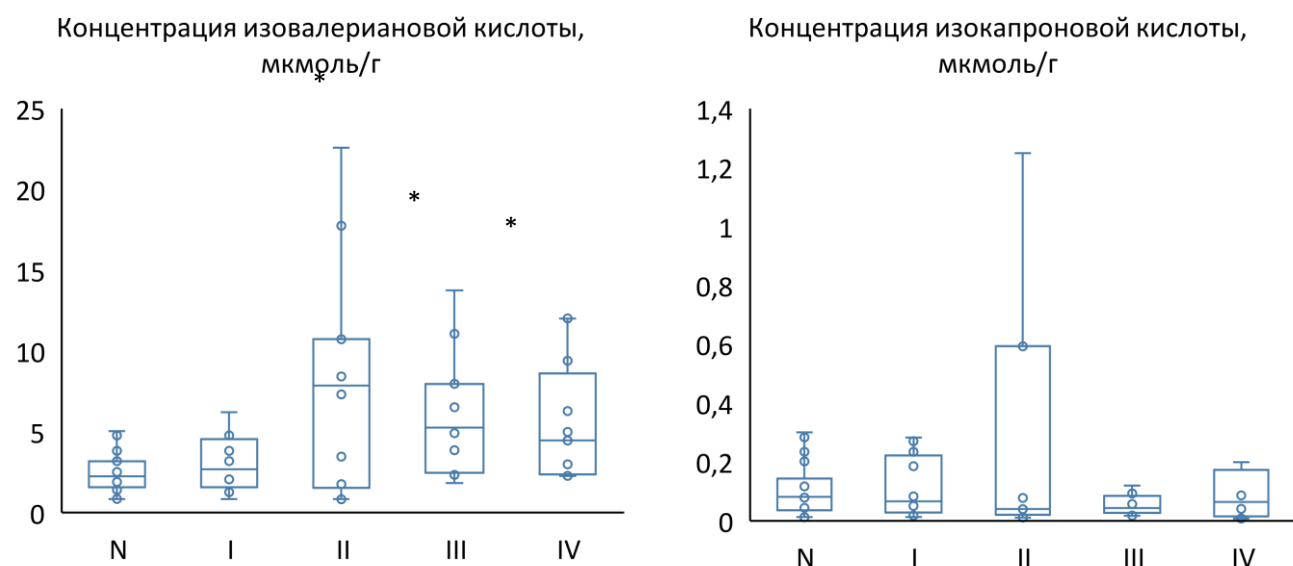
Отмечалась отчетливая тенденция к снижению концентрации уксусной и масляной кислот, которые являются ключевыми метаболитами облигатных анаэробных симбионтов и важными медиаторами защитных, в том числе противовоспалительных, эффектов.

Особенно выраженное снижение наблюдается на III и IV стадиях КРР, где различия этих показателей с таковыми у клинически здоровых лиц (группой контроля) достигали статистической значимости ($p < 0,05$). Это указывает на угнетение ферментативной активности здоровой микрофлоры, в первую очередь

Bifidobacterium spp., *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium spp.*, *Roseburia spp.* и других продуцентов бутирата.

Концентрация пропионовой кислоты также снижалась у больных КРР, однако статистически значимое уменьшение выявлено только на IV стадии заболевания. Учитывая, что пропионат частично продуцируется условно-патогенными бактериями, его снижение на ранних стадиях может быть менее выраженным, чем ацетата и бутирата.





Примечание: по оси абсцисс римскими цифрами обозначены стадии колоректального рака, N – контрольная группа; * - статистически значимые отличия от контрольной группы, рассчитанные по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$.

Рисунок 2 – Концентрации короткоцепочечных жирных кислот в кале у пациентов на разных стадиях колоректального рака

На фоне снижения концентраций основных КЖК, на III и IV стадиях заболевания наблюдали достоверное увеличение концентраций разветвлённых жирных кислот: изомасляной и изовалериановой. Эти соединения образуются в результате протеолитической ферментации аминокислот (в частности, лейцина и валина), что свидетельствует о сдвиге метаболизма кишечной микробиоты в сторону протеолитического типа брожения. Такой тип метаболизма часто ассоциируется с дисбиотическим состоянием и может способствовать формированию токсической среды в просвете кишечника.

Таким образом, на фоне прогрессирования КРР происходила качественная перестройка метаболического профиля кишечного микробиоценоза: снижалась продукция защитных метаболитов, таких как масляная и уксусная кислоты, и одновременно усиливалась продукция протеолитических продуктов, что могло способствовать дальнейшему нарушению барьерных функций кишечника, хронизации воспаления и прогрессии неопластического процесса.

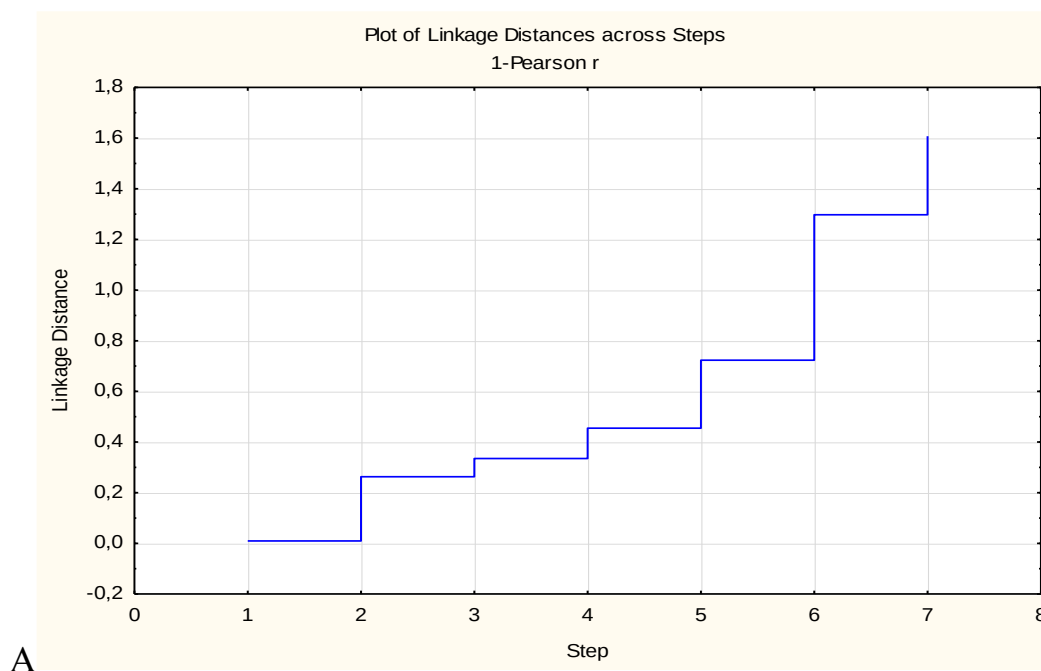
Концентрации КЖК в кале зависят от плотности фекалий, поэтому для дальнейшей оценки диагностической/прогностической значимости изменения

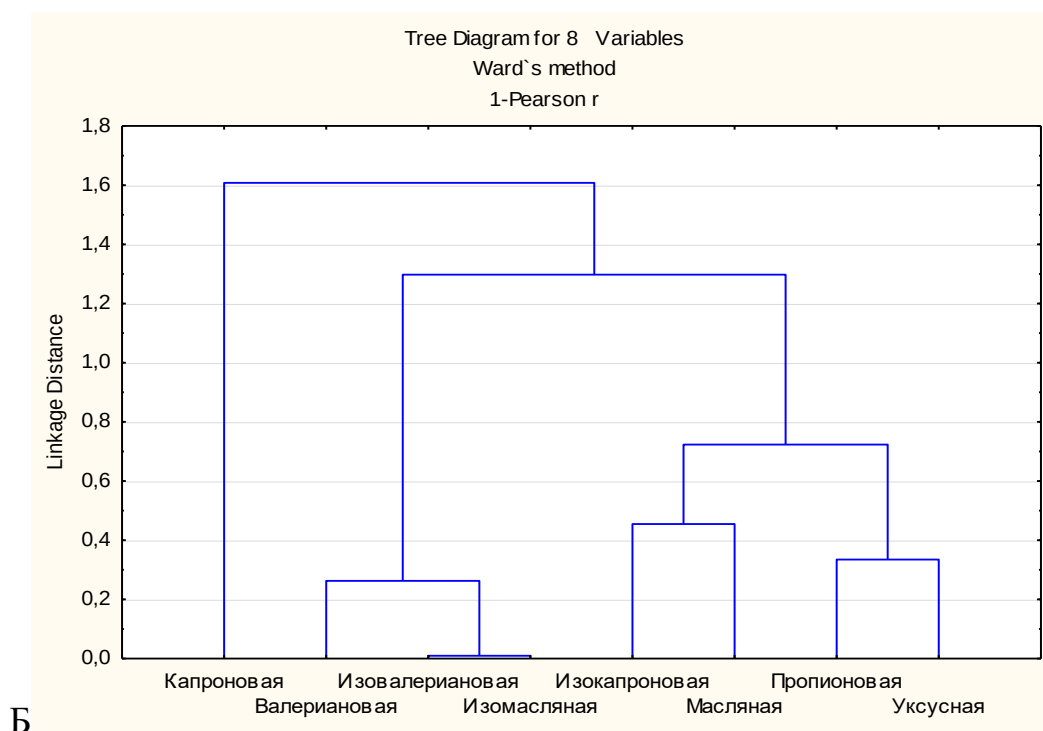
содержания этих молекул в копрофильtrate использовали их относительные концентрации, приведенные к суммарной концентрации всего пула КЖК.

Поиск биомаркера КРР проводили в несколько стадий:

1. Выделяли компоненты имеющие схожие изменения по кластерному анализу коэффициентов корреляции по методу Варда.
2. Проводили линейный дискриминантный анализ и определяли сигнатуры КРР в метаболомных профилях. Определяли вектор сигнатуры с помощью коэффициента уникальности.
3. Корреляционным анализом концентраций КЖК в кале и коэффициента уникальности выбирали кластер, наилучшим образом, совпадающий с сигнатурой КРР.
4. Из концентраций КЖК целевого кластера с помощью ROC-анализа определяли наилучший биомаркер, рассчитывали его пороговые значения, прогностическую точность, специфичности и чувствительность.

Результаты проведенного кластерного анализа корреляций Спирмена по методу Варда представлены на рисунке 3.





Примечание: А – динамика расстояний между кластерами в зависимости от шага модели; Б – кластеризация корреляций между концентрациями короткоцепочечных жирных кислот в копрофильtrate.

Рисунок 3 – Результаты кластерного анализа массива данных определения концентраций короткоцепочечных жирных кислот в фекалиях

Характер кривой, отражающей динамику расстояний между кластерами в зависимости от шага модели, менялся на 6 шаге при расстоянии 0,8–1,2 ед. (Рисунок 3А). Учитывая данное расстояние, выделили 3 кластера корреляционных связей концентраций КЖК в фекалиях. В первый кластер (кластер А) включены концентрации уксусной, пропионовой, масляной и изокапроновой кислот; во второй кластер (кластер В) – изомасляной, изовалериановой и валериановой кислот; в третий кластер (кластер С) – капроновой кислоты [16].

Для оценки направленности изменений по кластерам концентраций КЖК в фекалиях с помощью линейного дискриминантного анализа определяли коэффициент уникальности (четкость метаболомного отпечатка КРР). Корреляции с коэффициентом уникальности, кратность разницы средних между опытной и контрольной группами позволили определить кластер с биомаркером-кандидатом [80]. По результатам математического моделирования получена дискриминантная функция ($p=3,2 \times 10^{-8}$), которая с точностью 87% выявляет состояние метаболома

кишечной микрофлоры, характерное для КРР. Результаты корреляции коэффициента уникальности и относительных концентраций КЖК в фекалиях представлены в таблице 5.

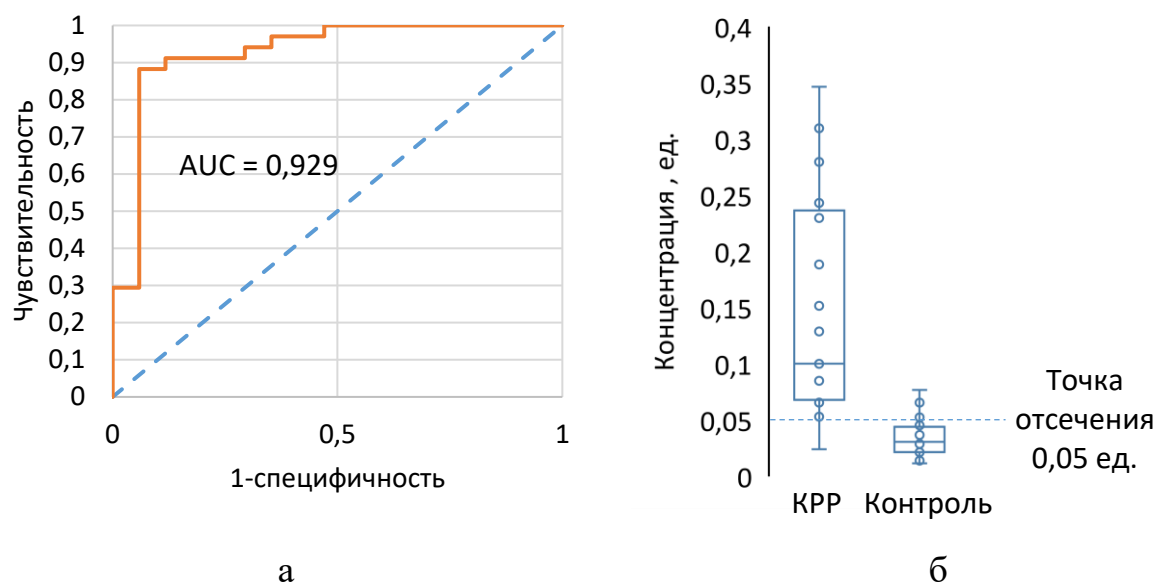
Таблица 5 – Корреляции концентраций короткоцепочечных жирных кислот и коэффициента уникальности линейной дискриминантной функции [16]

Кластер	Наименование короткоцепочечных жирных кислот	Коэффициент корреляции с коэффициентом уникальности	Кратность*
А	Уксусная	0,18	-
	Пропионовая	0,32	-
	Масляная	0,33	-
	Изокапроновая	0,26	-
В	Изомасляная	0,80	3
	Изовалериановая	0,81	4,1
	Валериановая	0,65	2
С	Капроновая	-0,17	-
Примечание: * – обозначена кратность разницы между средними значениями концентраций короткоцепочечных жирных кислот в группах пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых лиц при условии статистической значимости этой разницы.			

Концентрации КЖК, объединенных в кластер В, имеют высокие, однонаправленные коэффициенты корреляции с коэффициентом уникальности. Высокие коэффициенты корреляции дают основание рассматривать КЖК кластера В в качестве кандидатов-биомаркеров КРР.

Из кандидатов-биомаркеров наибольший коэффициент корреляции и наибольшая кратность разницы между средними значениями в группах отмечались для относительной концентрации изовалериановой кислоты ($r=0,81$, $k=4,1$).

С помощью ROC-анализа рассчитали пороговые значения и прогностическую точность относительной концентрации валериановой кислоты в кале (Рисунок 4).



Примечание: KPP – группа пациентов с колоректальным раком; Контроль – группа клинически здоровых лиц; AUC – площадь под ROC-кривой.

Рисунок 4 – Качество классификации групп, рассчитанное с помощью модели логистической регрессии массива данных концентраций компонентов короткоцепочечных жирных кислот в фекалиях пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых лиц: а – ROC-кривая для концентрации изовалериановой кислоты в фекалиях; б – концентрации изовалериановой кислоты в фекалиях

Относительная концентрация изовалериановой кислоты с высокой точностью делила группу пациентов с KPP и группу клинически здоровых лиц ($AUC=0,929$). При концентрации выше 0,05 ед с точностью 86,3% при чувствительности 64,7% и специфичности 97% можно предполагать KPP.

Таким образом, функциональная активность микробиоценоза кишечника обладает чувствительностью по отношению к проявлениям KPP. Найденный биомаркер – относительная концентрация изовалериановой кислоты – связан с развитием KPP и может использоваться для скрининговой диагностики этого заболевания. При превышении относительной концентрации изовалериановой кислоты выше 0,05 ед. с вероятностью 86,3% можно диагностировать KPP.

3.1.3. Копрологические показатели пациентов с аденокарциномой кишечника

Видовой состав микробиоты кишечника связан с особенностями ферментативного и микробного пищеварения, которые определяются макро- и микроскопией кала, а также биохимическими тестами. Для сравнения условий, характеризующих питание микроорганизмов, изучили копрологические показатели у пациентов с КРР и клинически здоровых лиц (Таблица 6).

Оценивали форму, консистенцию, цвет, запах, наличие остатков непереваренной пищи, слизи, крови, гноя.

Показатели макроскопии кала в основной группе и группе сравнения существенно не отличались, за исключением остатков непереваренной пищи, которые чаще обнаруживались в контрольной группе, что, вероятно, носило случайный характер.

Микроскопическое исследование копрофильтрата выявило нарушения ферментативного и микробного пищеварения, а также избыток белков, углеводов или жиров, которые влияют на видовой состав микрофлоры кишечника и его функциональную активность.

Таблица 6 – Частоты выявляемости отклонений от нормы показателей микроскопии кала у пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых лиц

Параметры	Число результатов вне нормы в основной группе (пациенты с колоректальным раком) (n=60)		Число результатов вне нормы в контрольной группе (клинически здоровые лица) (n=68)		Статистическая значимость межгрупповых различий (p)
	Абс.	Отн. %	Абс.	Отн. %	
Консистенция	18	70,6	12	82,4	0,317
Форма	21	64,7	22	67,6	0,835
Цвет	32	47,1	48	29,4	0,355
Запах	60	100	68	100	1
Слизь	35	58,8	56	82,4	0,248

Продолжение Таблицы 6

Параметры	Число результатов вне нормы в основной группе (пациенты с колоректальным раком) (n=60)		Число результатов вне нормы в контрольной группе (клинически здоровые лица) (n=68)		Статистическая значимость межгрупповых различий (p)
	Абс.	Отн. %	Абс.	Отн. %	
Жир	0	0	0	0	1
Кровь	0	0	0	0	1
Остатки непереваренной пищи	11	17,6	46	67,6	0,002*
Примечание: * – обозначены показатели, статистически значимо отличающиеся от таковых в контрольной группе (клинически здоровых лиц) по критерию χ^2 при $n > 10$, а при $n < 10$ – по точному критерию Фишера.					

Данные о частотах встречаемости отклонений показателей микроскопии кала от нормы у пациентов с КРР и клинически здоровых лиц представлены в таблице 7.

Микроскопические показатели кала в основной и контрольной группах статистически значимо не различались, за исключением переваренных мышечных волокон и соединительной ткани, которые чаще выявляли в контрольной группе, что, очевидно, носило случайный характер.

При исследовании копрофильтрата не установлено существенных различий между группами больных КРР и клинически здоровых лиц по биохимическим показателям: наличие/отсутствие опухолевого заболевания не влияло на частоту отклонений этих показателей от нормы (Таблица 8).

Таблица 7 – Частоты встречаемости отклонений от нормы показателей микроскопии кала у пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых лиц [20]

Параметры	Число результатов вне нормы у пациентов с КРР (n=60)		Число результатов вне нормы у клинически здоровых лиц (n=68)		Значимость различий между группами, <i>p</i>
	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %	
Мышечные волокна непереваренные	0	0	0	0	1
Мышечные волокна полупереваренные	4	5,9	16	23,5	0,058
Мышечные волокна переваренные	14	23,5	48	70,6	0,005*
Соединительная ткань	0	0	16	23,5	0,005*
Растительная клетчатка непереваримая	60	100	68	100	1
Растительная клетчатка переваримая	60	100	68	100	1
Крахмал внеклеточный	60	100	68	100	1
Крахмал внутриклеточный	49	82,4	66	97,1	0,522
Иодофильная флора нормальная	18	29,4	40	58,8	0,068
Иодофильная флора патогенная	0	0	0	0	1
Дрожжевые грибы	11	17,6	6	8,8	0,317
Слизь	35	58,8	58	85,3	0,199
Лейкоциты	56	94,1	50	73,5	0,354
Эритроциты	0	0	0	0	1
Жир нейтральный	0	0	0	0	1
Жирные кислоты	49	82,4	46	67,6	0,484
Соли жирных кислот	25	41,2	40	58,8	0,303
Кристаллы Шарко-Лейдена	0	0	0	0	1
Кристаллы оксалаты	28	47,1	22	32,4	0,336
Кристаллы фосфаты	32	52,9	40	58,8	0,746
Эпителий	56	94,1	66	97,1	0,901
Яйца глист	0	0	0	0	1
Цисты простейших	0	0	0	0	1
Примечание: * – обозначены показатели, статистически значимо отличающиеся от таковых в контрольной группе (клинически здоровых лиц) по критерию χ^2 при $p > 10$, а при $p < 10$ – по точному критерию Фишера.					

Таблица 8 – Частоты встречаемости отклонений от нормы показателей биохимического исследования копрофильтрата у пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых лиц

Параметры	Число результатов вне нормы у пациентов с КРР (n=60)		Число результатов вне нормы у клинически здоровых лиц (n=68)		Статистическая значимость различий между группами, <i>p</i>
	Абс.	Отн. %	Абс.	Отн. %	
Стеркобилин	60	100	66	97,1	0,903
Билирубин	4	5,9	0	0	0,157
Скрытая кровь, реакция	0	0	0	0	1
Воспалительный белок	35	58,8	28	41,2	0,303
Реакция (pH)	21	35,3	20	29,4	0,67

Таким образом, по результатам макроскопического, микроскопического и биохимического исследования кала пациентов основной и контрольной групп можно констатировать, что межгрупповой разницы в частотах встречаемости нарушений ферментативного и микробного пищеварения не отмечено.

3.2. Изменения гематологических и биохимических показателей, а также концентраций минорных липидных компонентов в крови пациентов с колоректальным раком

С позиций системной медицины представлялось целесообразным оценить влияние КРР, равно как и связанных с ним расстройств микробиоты ЖКТ, на ключевые показатели метаболизма и гомеостаза человека по общему и биохимическому анализу крови, а также по реакции липидома.

3.2.1. Изменения показателей общего и биохимического анализа крови пациентов с колоректальным раком и их диагностическая значимость

Общий анализ крови выявил ряд существенных сдвигов гематологических показателей у больных КРР (Таблица 9).

Таблица 9 – Изменения показателей общего анализа крови у пациентов с колоректальным раком

Обозначение показателя	Наименование показателя	Значения		Статистическая значимость различий между группами, <i>p</i>
		Основная группа (больные колоректальным раком)	Контрольная группа (клинически здоровые лица)	
HGB	Гемоглобин, г/л	111 [93 - 137]	147 [132,25 - 154]	0,0001*
RBC	Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,25 [3,57 - 4,43]	4,685 [4,35 - 5,01]	0,0047*
HTC	Гематокрит, %	33,3 [29,5 - 40]	43 [38,8 - 44,9]	0,0004*
MCH	Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	28 [25,1 - 30]	31,05 [29,5 - 32,4]	0,0012*
MCV	Средний объем эритроцита, фл.	83,9 [81,3 - 89,2]	90,8 [86,9 - 93,6]	0,0027*
MCHC	Средняя концентрация гемоглобина, г/л	333 [326 - 339]	343 [337 - 347]	0,0009*
PLT	Тромбоциты, $\times 10^9/л$	250 [238 - 315]	213 [183 - 242]	0,0040*
WBC	Лейкоциты, $\times 10^9/л$	6,4 [5,3 - 7,4]	5,45 [4,8 - 6,8]	0,1159
AKH%	Нейтрофилы, %	66,6 [62,9 - 67,6]	54,4 [48,7 - 59,8]	0,0001*
AKH	Нейт абс, $\times 10^9/л$	4,2 [3,36 - 4,96]	2,865 [2,45 - 4,11]	0,0051*
EO%	Эозин, %	2,9 [0,8 - 3,5]	2,3 [1,5 - 3,8]	0,9255
EO	Эозин абс., $\times 10^9/л$	0,17 [0,11 - 0,31]	0,125 [0,08 - 0,22]	0,2618
BASO%	Базофилы, %	0,6 [0,3 - 0,7]	0,65 [0,5 - 0,9]	0,2669
BASO	Базоф абс., $\times 10^9/л$	0,04 [0,02 - 0,06]	0,04 [0,03 - 0,05]	0,9586
MONO%	Моноцит, %	8,1 [7,1 - 11]	9,1 [7,9 - 10,5]	0,7662

Продолжение Таблицы 9

Обозначение показателя	Наименование показателя		Значения		Статистическая значимость различий между группами, <i>p</i>
			Основная группа (больные колоректальным раком)	Контрольная группа (клинически здоровые лица)	
MONO	Моноцит абс., $\times 10^9/\text{л}$		0,55 [0,43 - 0,79]	0,485 [0,4 - 0,65]	0,2584
LYMPH%	Лимфоциты, %		24,7 [16,3 - 26]	32,8 [28,6 - 38,1]	0,0001*
LYMPH	Лимфоциты абс., $\times 10^9/\text{л}$		1,49 [1,13 - 1,72]	1,82 [1,45 - 2,23]	0,0488*
Примечание: * – обозначены показатели, статистически значимо отличающиеся от таковых в контрольной группе по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$.					

У пациентов основной группы было повышено количество тромбоцитов и нейтрофилов; содержание гемоглобина, гематокрит, число и средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина эритроците и количество лимфоцитов были снижены.

При анализе результатов общего анализа крови методом линейного дискриминантного анализа определили сложный биомаркер КРР. По результатам математического моделирования получена дискриминантная функция:

$$ROOT = 1,297 \cdot RBC + 0,297 \cdot MCH - 0,340 \cdot AKN - 13,666,$$

где:

- RBC – Число эритроцитов в крови, $\times 10^{12}/\text{л}$;
- MCH – Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг;
- AKN – Число нейтрофилов в крови, $\times 10^9/\text{л}$.

Значения дискриминантной функции, рассчитанные для пациентов, распределились вокруг центроидов групп в соответствии с частотами, представленными на гистограмме (Рисунок 5).

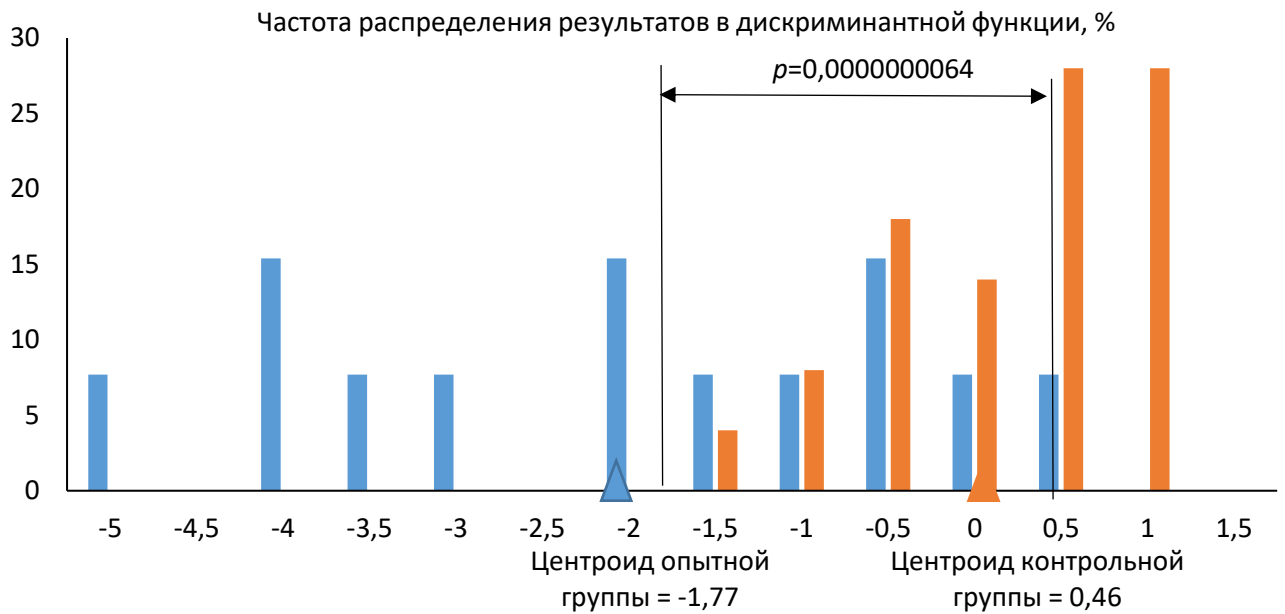


Рисунок 5 – Распределение значений дискриминантной функции в опытной (пациенты с колоректальным раком) и контрольной (клинически здоровые лица) группах

Несмотря на статистическую значимость расстояния Махалонобиса между центроидами групп ($p=6,4 \times 10^{-8}$), распределение результатов дискриминантной функции имело высокую дисперсию значений.

Рассчитанный по алгоритму линейного дискриминантного анализа диагностический коэффициент имеет вид:

$$D_{\text{KPP}} = -2,893 \cdot \text{RBC} - 0,662 \cdot \text{MCH} + 0,757 \cdot \text{AKH} + 27,685,$$

где:

- RBC – Число эритроцитов в крови, $\times 10^{12}/\text{л}$;
- MCH – Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг;
- AKH – Число нейтрофилов в крови, $\times 10^9/\text{л}$.

При значении диагностического коэффициента больше 0 результаты моделирования указывают на вероятность KPP.

Классифицированные с помощью диагностического коэффициента результаты общего анализа крови показатели распределились на истинные и ложные положительные/отрицательные варианты в следующем порядке (Таблица 10).

Таблица 10 – Классификационная матрица результатов общего анализа крови в опытной (пациенты с колоректальным раком) и контрольной (клинически здоровые лица) группах [36]

Число образцов, заданных, пользователем, группы	Число образцов, классифицированных корректно, %	Число образцов, определенных диагностическим коэффициентом модели		Всего, чел.
		Основная группа	Контрольная группа	
Основная группа	66,7	40	20	60
Контрольная группа	100	0	68	68
Всего	84,4	40	88	128

40 из 60 результатов основной группы классифицированы математической моделью корректно, что составляет 66,7% и отражает чувствительность модели. В контрольной группе 68 из 68 результатов были классифицированы верно, что составляет 100% и отражает специфичность модели. Математическая модель с точностью 84,4% выявляет соотношение содержание структурных элементов крови, характерное для КРР.

Настоящая модель прошла кросс-валидацию, где случайным образом формировалась обучающая и тестовая выборки по результатам которой была отобрана модель с наилучшими показателями $R^2=0,844$, а среднее значение остальных моделей, участвующих в кросс-валидации составило $Q^2=0,71$. Разница $R^2 - Q^2 < 0,2$, что указывает на отсутствие переобучения модели, а результаты моделирования могут быть использованы для скрининговой диагностики КРР.

Таким образом, диагностический коэффициент является валидным для классификации КРР ($R^2 - Q^2 < 0,2$). Модель дискриминантного анализа позволяет разделить гематологические профили КРР и здоровых волонтеров с порогом статистической значимости ($p=6,4 \times 10^{-8}$).

Для оценки влияния КРР и связанных с ним расстройств кишечной микробиоты на функционирование печени, почек и поджелудочной железы изучили показатели биохимического анализа крови в опытной и контрольной группах (Таблица 11).

В таблице 11 показано, что у пациентов основной группы повышены уровень глюкозы и щелочной фосфатазы, а уровень холестерина снижен. По другим параметрам биохимического анализа крови не установлено статистически значимых межгрупповых отличий. Изменения биохимических показателей крови были характерными для колоректального рака.

По результатам математического моделирования получена дискриминантная функция:

$$ROOT = 1,227 \cdot BILD - 0,273 \cdot IDBIL + 0,923 \cdot GLUC - 0,02 \cdot ALT + 0,041 \cdot ALP - 7,857,$$

где:

- BILD – Билирубин прямой, мкмоль/л;
- IDBIL – Билирубин непрямой, мкмоль/л;
- GLUC – Глюкоза в сыворотке, ммоль/л;
- ALT – Аланинаминотрансфераза, Ед/л;
- ALP – Щелочная фосфатаза, Ед/л.

Таблица 11 – Результаты биохимического анализа крови пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых лиц

Обозначение показателя	Наименование показателя	Значения		Статистическая значимость различий между группами, <i>p</i>
		Основная группа (больные колоректальным раком)	Контрольная группа (клинически здоровые лица)	
TP	Общий белок, г/л	70 [66 - 74]	71,5 [70 - 75]	0,1751
CREA	Креатинин, мкмоль/л	91 [77 - 98]	87 [78 - 96]	0,7212
UREA	Мочевина, мкмоль/л	6 [4,9 - 7,3]	5,1 [4,3 - 6,475]	0,2549
GLUC	Глюкоза в сыворотке, мкмоль/л	5,98 [5,37 - 7,4]	5,275 [5,0025 - 5,7925]	0,0038*
BILT	Билирубин общий, мкмоль/л	12,2 [10,6 - 15,1]	11,95 [8,4 - 14,375]	0,4197
BILD	Билирубин прямой, мкмоль/л	2,7 [2,2 - 3,5]	2,1 [1,525 - 2,775]	0,1008

Продолжение Таблицы 11

Обозначение показателя	Наименование показателя	Значения		Статистическая значимость различий между группами, <i>p</i>
		Основная группа (больные колоректальным раком)	Контрольная группа (клинически здоровые лица)	
IDBIL	Билирубин не прямой, мкмоль/л	9,9 [8,2 - 11,7]	10,05 [6,725 - 12,125]	0,6526
CHOL	Холестерин, ммоль/л	4,5 [4 - 4,9]	5,35 [4,625 - 6,075]	0,0026*
ALT	АЛТ, Ед/л	11 [9 - 19,4]	19,75 [14,425 - 32,7]	0,0239*
AST	АСТ, Ед/л	18,7 [14,1 - 23]	22,6 [19,3 - 26,45]	0,0878
ALP	Щелочная фосфатаза, Ед/л	88,2 [77,3 - 98,3]	67,85 [57,9 - 78,15]	0,0020*
Примечание: * – обозначены показатели, статистически значимо отличающиеся от таковых в контрольной группе по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$.				

Значения дискриминантной функции, рассчитанные для пациентов, распределились вокруг центроидов групп в соответствии с частотами, представленными на гистограмме (Рисунок 6).

Между опытной и контрольной группами обнаружена статистическая значимость расстояния Махаланобиса ($p = 3,2 \times 10^{-11}$). Рассчитанный по алгоритму линейного дискриминантного анализа диагностический коэффициент имеет вид:

$$D_{KPP} = 3,019 \cdot BILD - 0,672 \cdot IDBIL + 2,272 \cdot GLUC - 0,048 \cdot ALT + 0,102 \cdot ALP - 22,47,$$

где:

- BILD – Билирубин прямой, мкмоль/л;
- IDBIL – Билирубин не прямой, мкмоль/л;
- GLUC – Глюкоза в сыворотке, ммоль/л;
- ALT – Аланинаминотрансфераза, Ед/л;
- ALP – Щелочная фосфатаза, Ед/л.

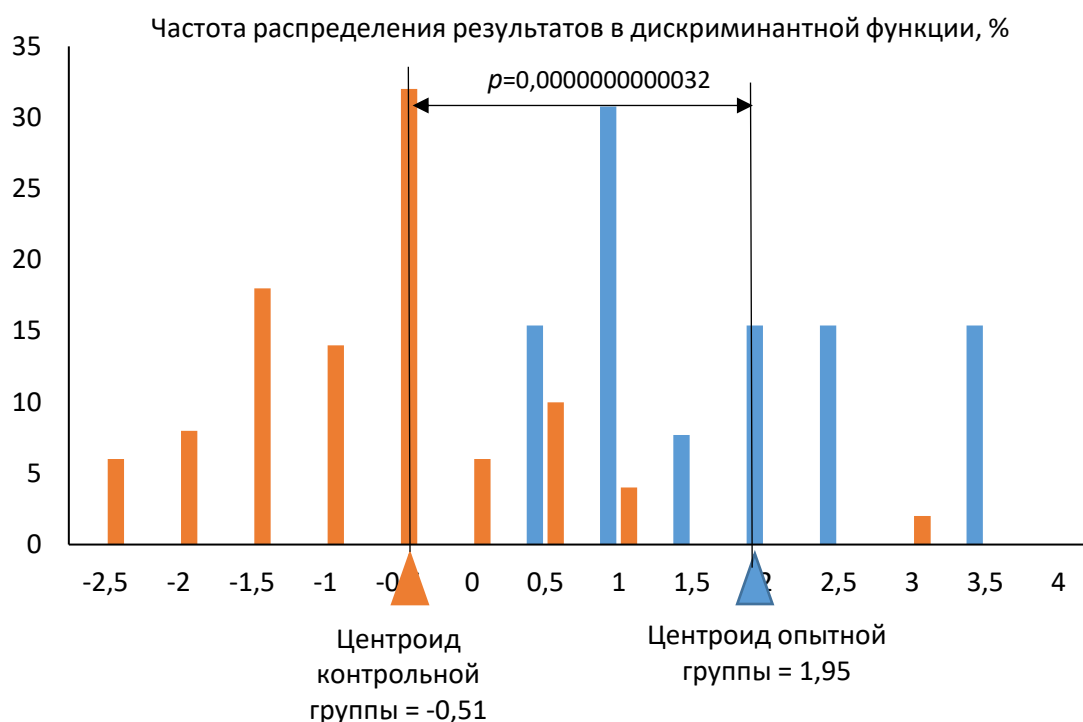


Рисунок 6 – Распределение значений дискриминантной функции в опытной (пациенты с колоректальным раком) и контрольной (клинически здоровые лица) группах

При значении диагностического коэффициента больше 0 результаты моделирования указывают на вероятность КРР.

Классифицированные с помощью диагностического коэффициента результаты биохимического анализа крови позволили рассчитать прогностические свойства модели (Таблица 12).

Чувствительность математической модели составила 75%, специфичность – 97,1%, а диагностическая точность – 86,7%. Данные кросс-валидации ($R^2=0,867$, $Q^2=0,73$ - $R^2 - Q^2 < 0,2$) указывают на возможность использования диагностического коэффициента для скрининговой диагностики КРР.

Вместе с тем не стоит преувеличивать диагностическую ценность математических моделей, основанных на показателях общего и биохимического анализов крови, которые характеризуются недостаточно высокой чувствительностью или специфичностью.

Таблица 12 – Классификационная матрица результатов биохимического анализа крови пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых лиц

Заданные, пользователем, группы	Классифицированные корректно, %	Определены диагностическим коэффициентом модели, чел.		Всего
		Основная группа (больные колоректальным раком)	Контрольная группа (клинически здоровые лица)	
Основная группа	75	45	15	60
Контрольная группа	97,1	2	66	68
Всего	86,7	47	81	128

3.2.2. Изменения концентраций минорных липидных компонентов в крови пациентов с колоректальным раком и их диагностическая значимость

Исследование метаболома с фокусом на концентрации минорных липидных компонентов (МЛК) может существенно повысить качество диагностики КРР за счет учета реакции липидома на опухолевый процесс и связанные с ним микробиологические расстройства. Такие МЛК, как жирные кислоты с длиной углеродной цепи от 10 до 26 ед., гидроксикислоты, альдегиды и стеролы, продуцируются клетками человека, а также микробными клетками и входят в структуру клеточной стенки микроорганизмов и их биопленок. При КРР изменения в микробно-тканевом комплексе происходят как в соотношении видов представителей микробиоты, так и в нарушении проницаемости слизистых оболочек и снижении иммунной защиты [4]. Результатом является увеличение концентрации одних МЛК и снижении уровня других.

Результаты сравнения концентраций МЛК в крови пациентов с КРР и клинически здоровых лиц представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Концентрации минорных липидных компонентов в крови пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых лиц

Обозначение показателя	Наименование показателя	Значения, нмоль/г		Значи-мость различий между группами, <i>p</i>
		Основная группа (больные колоректальным раком)	Контрольная группа (клинически здоровые лица)	
Жирные кислоты				
10:0	Декановая	2,209 [1,674-3,341]	0,718 [0,401-1,054]	0,0001*
a13	Антеизотридекановая	0,091 [0,056-0,131]	0,031 [0,017-0,059]	0,001*
14:1d9	9,10-тетрадеценовая	0,018 [0,013-0,031]	0,049 [0,028-0,093]	0,147
14:1d11	11,12-тетрадеценовая	0,39 [0,152-0,587]	0,549 [0,358-0,976]	0,008*
i12	Изолауриновая	0,007 [0,005-0,012]	0,013 [0,009-0,016]	0,299
i15	Изопентадекановая	0,595 [0,332-1,336]	1,12 [0,83-1,61]	0,001*
a15	Антеизопентадекановая	0,928 [0,419-1,509]	1,325 [0,996-2,065]	0,005*
15:1d9	9,10-пентадеценовая	0,028 [0,02-0,05]	0,05 [0,036-0,073]	0,564
10Me15	10-метилпентагексановая	0,043 [0,037-0,066]	0,105 [0,083-0,13]	0,621
i16:1d9	Изогексадеценовая	0,029 [0,017-0,037]	0,065 [0,044-0,093]	0,005*
i16	Изостеариновая	2,486 [1,713-3,962]	3,782 [2,805-5,287]	0,004*
16:1d7	7,8-гексадеценовая	2,004 [1,518-3,703]	3,2 [2,425-4,426]	0,090
10Me16	10-метилгексадекановая	0,298 [0,247-0,338]	0,299 [0,242-0,431]	0,403
a17	Антеизогептадекановая	3,194 [2,311-5,714]	5,146 [3,42-7,216]	0,009*
18:1d11	Цис-вакценовая	21,938 [16,765-30,775]	31,381 [28,641-38,299]	0,001*
i17:1d9	Изопентадеценовая	0,182 [0,13-0,323]	0,019 [0,013-0,026]	0,048*
17:1d9	Гептадеценовая	0,247 [0,216-0,482]	0,4 [0,233-0,541]	0,807
17сус	Циклогептадекановая	0,02 [0,015-0,024]	0,028 [0,019-0,036]	0,008*
12:0	Лауриновая	2,884 [1,296-5,524]	4,266 [2,554-11,65]	0,038*
i18	Изооктадекановая	0,061 [0,048-0,072]	0,088 [0,051-0,136]	0,00042*
a19	Антеизонанодекановая	0,626 [0,498-0,774]	0,731 [0,568-0,974]	0,261
19сус	Циклононадекановая	0,021 [0,018-0,027]	0,041 [0,027-0,057]	0,00002*
20:1d11	11-эйкозановая	0,293 [0,239-0,315]	0,499 [0,173-0,721]	0,0001*
16:1d9t	9,10-гексадеценовая	0,509 [0,374-0,715]	0,684 [0,496-0,931]	0,117
16:1d11	11,12-гексадеценовая	0,333 [0,242-0,645]	0,578 [0,391-0,835]	0,014
14:1d7	7,8-тетрадеценовая	0,05 [0,021-0,085]	0,037 [0,025-0,06]	0,314
20:1	Арахиновая	3,06 [2,228-3,353]	2,847 [0,297-4,206]	0,950
Гидроксикислоты				
3h12	3-гидроксилауриновая	0,005 [0,002-0,007]	0,012 [0,006-0,018]	0,0001*
2h12	2-гидроксилауриновая	0,01 [0,008-0,013]	0,008 [0,005-0,015]	0,915
3h14	3-гидроксимиристиновая	0,039 [0,026-0,049]	0,031 [0,019-0,042]	0,741
2h14	2-гидроксимиристиновая	0,034 [0,027-0,051]	0,049 [0,034-0,066]	0,951
3h16	3-гидроксигексадекановая	0,186 [0,173-0,21]	0,302 [0,212-0,341]	0,00008*
3h18	3-гидроксиоктадекановая	0,064 [0,051-0,095]	0,059 [0,043-0,081]	0,152
10h18	10-гидроксистеариновая	0,274 [0,194-0,383]	0,138 [0,084-0,206]	0,223

Продолжение Таблицы 13

Обозначение показателя	Наименование показателя	Значения, нмоль/г		Значимость различий между группами, <i>p</i>
		Основная группа (больные колоректальным раком)	Контрольная группа (клинически здоровые лица)	
2h24	2-гидроксигиноцериновая кислота	0,871 [0,667-1,184]	1,093 [0,769-1,709]	0,392
2h26	2-гидроксистеротиновая кислота	0,032 [0,023-0,046]	0,066 [0,043-0,094]	0,336
Альдегиды				
i17a	Изогептадекановый	2,786 [2,139-3,552]	2,707 [1,421-4,289]	0,230
i15a	Изопентадекановый	0,194 [0,134-0,3]	0,324 [0,147-0,566]	0,020*
14a	Тетрадекановый	0,217 [0,1-0,38]	0,607 [0,197-0,983]	0,0001*
a15a	Антеизопентадекановая	0,434 [0,283-0,544]	0,519 [0,209-1,061]	0,734
i16a	Изо-пальмитиновый	1,563 [1,189-1,976]	1,785 [1,212-2,475]	0,059
18:1d9a	9,10-Октадекановый	31,282 [22,535-40,046]	43,914 [13,937-56,146]	0,056
Стерины				
Coprostanol	Копростанол	0,178 [0,071-0,215]	0,037 [0,021-0,062]	0,019*
Campesterol	Кампестерол	0,261 [0,189-0,372]	0,435 [0,318-0,669]	0,0001*
Cholestadion	Холистадион	0,535 [0,343-0,829]	0,092 [0,063-0,166]	0,000029*
b-Sitosterol	β-ситостерол	0,154 [0,098-0,222]	0,339 [0,245-0,491]	0,000003*
Примечание: * – обозначены показатели, статистически значимо отличающиеся от таковых в контрольной группе по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$.				

Установлены статистически значимые различия между группами по концентрациям большинства МЛК в крови. В группе больных КРР были повышены уровни декановой, антиизотридекановой, изопентацисдеценной жирных кислот, а также копростанола и холистадиона; снижены концентрации большинства других жирных кислот, гидроксикислот, альдегидов и стерина. Очевидно, что липидом, характеризующийся уровнем МЛК, в том числе микробного происхождения, является сложной многофакторной системой с большим числом разнонаправленных процессов. Реакция липидома на КРР может быть исследована методами системной медицины.

Для того, чтобы выделить значимые факторы изменения системы липидома, базы данных МЛК нормализовали и провели факторный анализ и анализ главных компонент (Рисунок 7) [80].

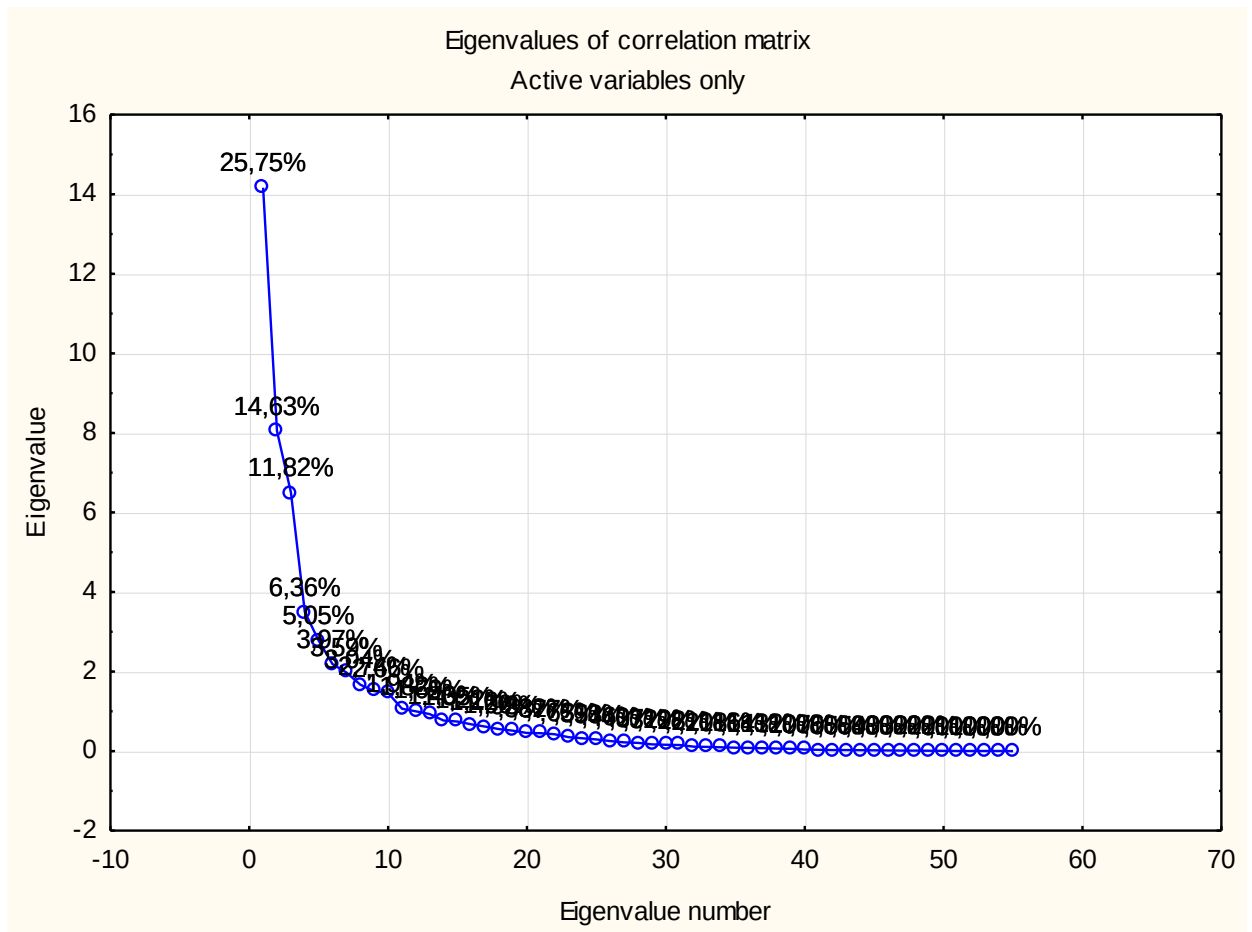


Рисунок 7 – Факторная нагрузка концентраций минорных липидных компонентов в крови по группам: распределение факторной нагрузки

Характер кривой, описывающей распределение факторной нагрузки концентраций МЛК в крови, менялся после 3 фактора с вертикального на горизонтальный, что указывало на 3 значимых фактора, описывающих 52,2% корреляционных связей между 55 концентрациями МЛК в крови [80].

Распределение корреляций (Рисунок 8) показывало увеличение фактора в изменение системы, так как распределение в группе пациентов с КРР (овал синего цвета) имело более вытянутую форму по вертикальной оси (фактор 2) [80].

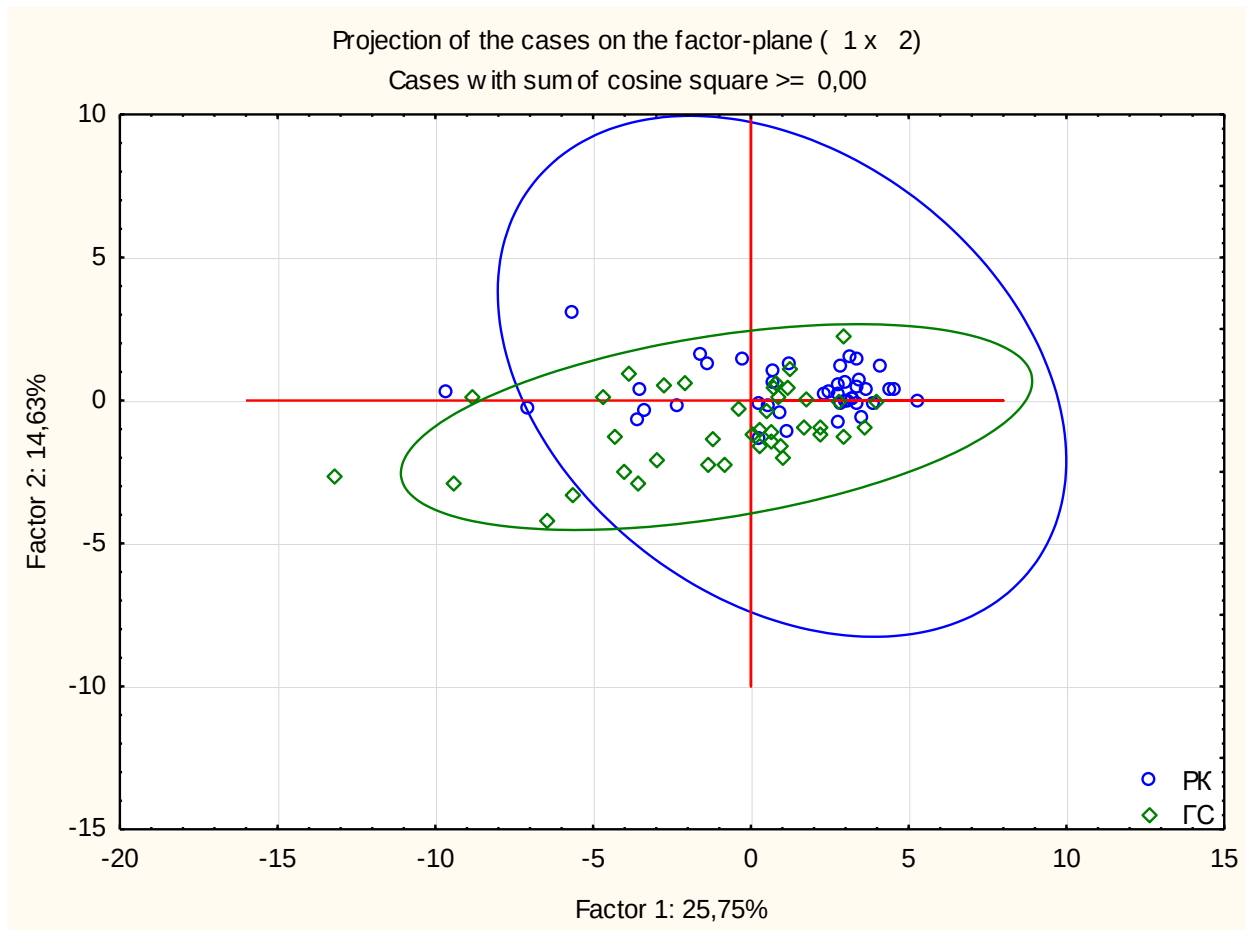


Рисунок 8 – Факторная нагрузка концентраций минорных липидных компонентов в крови по группам: распределение корреляций в координатах F1 – F2

Так как некоторые изменения системы могут быть однонаправленными, но различными по своей природе, то они могут не различаться факторным анализом. Для более детальной дифференциации факторный анализ дополнили кластерным анализом корреляций Спирмена по методу Варда (Рисунки 9 и 10) [80].

На рисунке 9 видно, что характер кривой менялся на 53 шаге при расстоянии 2,2–3,6 ед. [80].

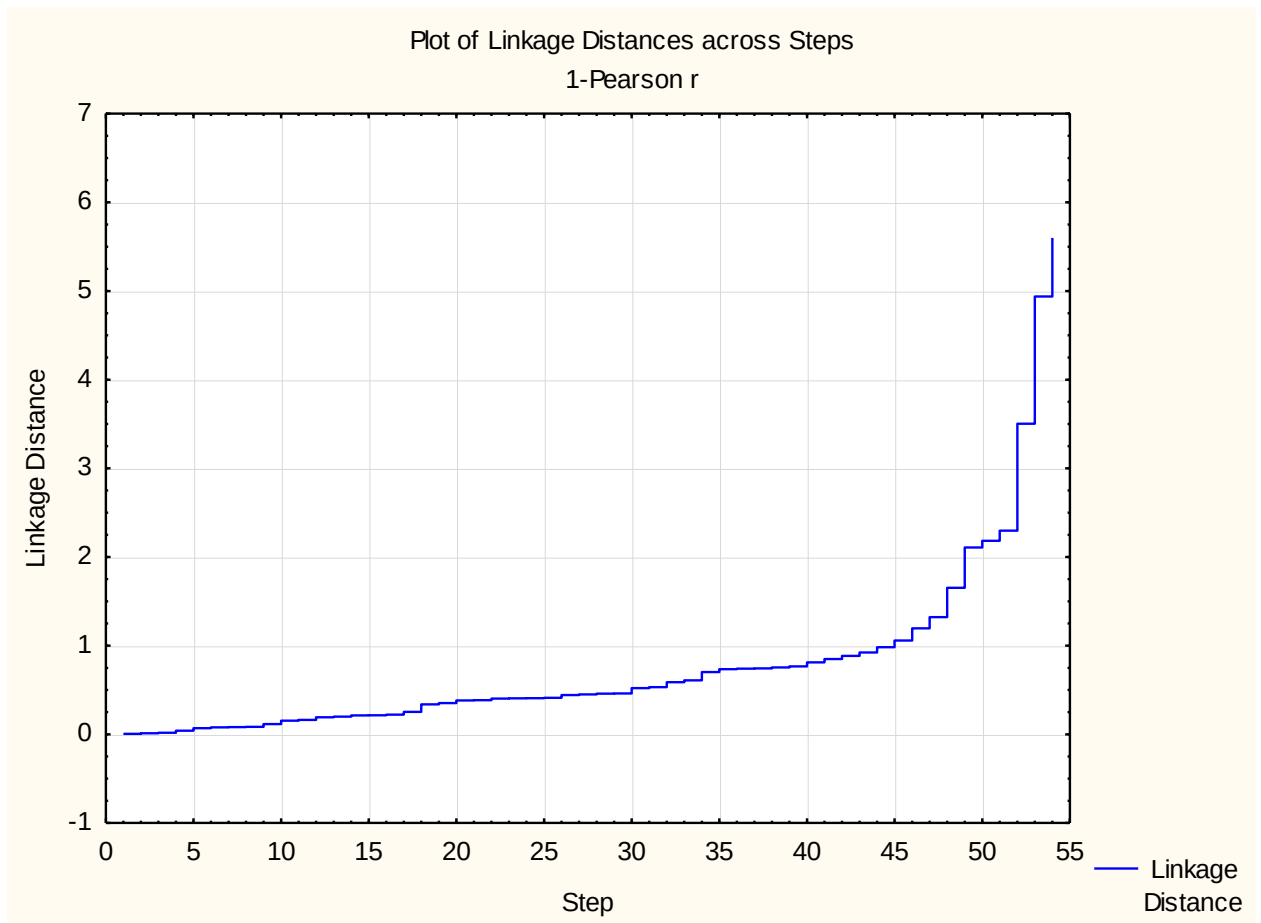


Рисунок 9 – Результаты кластерного анализа массива данных концентраций минорных липидных компонентов в крови: динамика расстояний между кластерами в зависимости от шага модели

Учитывая данное расстояние, выделили 4 кластера корреляционных связей концентраций МЛК в крови (Рисунок 10).

Для оценки направленности изменений по кластерам концентраций МЛК в крови с помощью линейного дискриминантного анализа определили коэффициент уникальности (четкость липидного отпечатка KPP) [80].

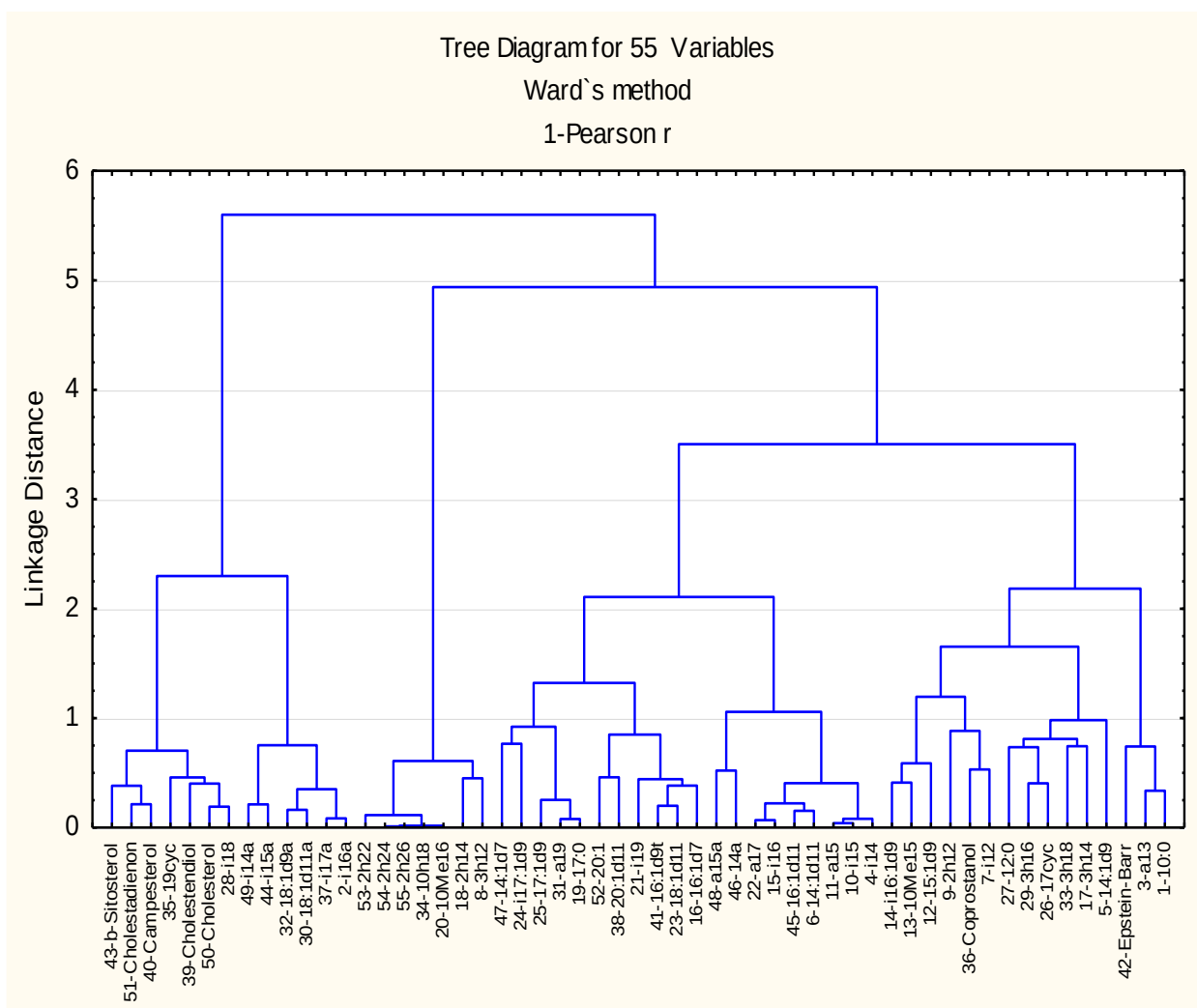


Рисунок 10 – Результаты кластерного анализа массива данных концентраций минорных липидных компонентов в крови: кластеризация корреляций между концентрациями МЛК в крови

По результатам математического моделирования получена дискриминантная функция:

$$\begin{aligned}
 ROOT = & 0,967 \cdot 10:0 - 1,729 \cdot 14:1d9 - 81,676 \cdot 3h12 + 1,373 \cdot i15 - 17,311 \cdot i16:1d9 - 0,698 \cdot i16 \\
 & - 0,383 \cdot a17 - 0,088 \cdot 18:1d11 - 8,368 \cdot 3h16 + 7,176 \cdot a19 + 20,187 \cdot 3h18 + 6,924 \\
 & \cdot Coprostanol + 1,743 \cdot 20:1d11 + 1,710 \cdot Campesterol - 2,928 \cdot b - sitosterol - 0,853 \\
 & \cdot 14a - 14,145 \cdot 14:1d7 + 1,731,
 \end{aligned}$$

где обозначения соответствуют концентрациям (наномоль/г) в крови следующих компонентов:

- 10:0 – Декановая кислота;
- 14:1d9 – 9,10-тетрадеценовая кислота;

- 3h12 – 3-гидроксилауриновая кислота;
- i15 – Изопентадекановая кислота;
- i16:1d9 – Изогексадеценновая кислота;
- i16 – Изостеариновая кислота;
- a17 – Антеизогептадекановая кислота;
- 18:1d11 – 11,12-цис-вакценовая кислота;
- 3h16 – 3-гидроксигексадекановая кислота;
- a19 – Антеизонанодекановая кислота;
- 3h18 – 3-гидроксиоктадекановая кислота;
- Coprostanol – Копростанол;
- 20:1d11 – 11-эйкозановая кислота;
- Campesterol – Кампестерол;
- b-sitosterol – β -ситостерол;
- 14a – тетрадекановый альдегид;
- 14:1d7 – 7,8-тетрадеценновая кислота.

Значения дискриминантной функции, рассчитанные для пациентов, распределились вокруг центроидов групп в соответствии с частотами, представленными на гистограмме (Рисунок 11).

Между опытной группой (больными КРР) и контрольной группой (клинически здоровыми лицами) отмечалась высокая статистическая значимость расстояния Махаланобиса ($p=2,68 \cdot 10^{-17}$).

Рассчитанный по алгоритму линейного дискриминантного анализа диагностический коэффициент имеет вид:

$$D_{\text{КРР}} = 5,720 \cdot 10:0 - 10,231 \cdot 14:1d9 - 483,367 \cdot 3h12 + 8,125 \cdot i15 - 102,451 \cdot i16:1d9 - 4,133 \cdot i16 - 2,269 \cdot a17 - 0,522 \cdot 18:1d11 - 49,526 \cdot 3h16 + 42,467 \cdot a19 + 119,470 \cdot 3h18 + 40,975 \cdot \text{Coprostanol} + 10,317 \cdot 20:1d11 + 10,122 \cdot \text{Campesterol} - 17,326 \cdot b - \text{sitosterol} - 5,050 \cdot 14a - 83,711 \cdot 14:1d7 + 3,711,$$

где обозначения компонентов аналогичны таковым в вышеуказанной дискриминантной функции.

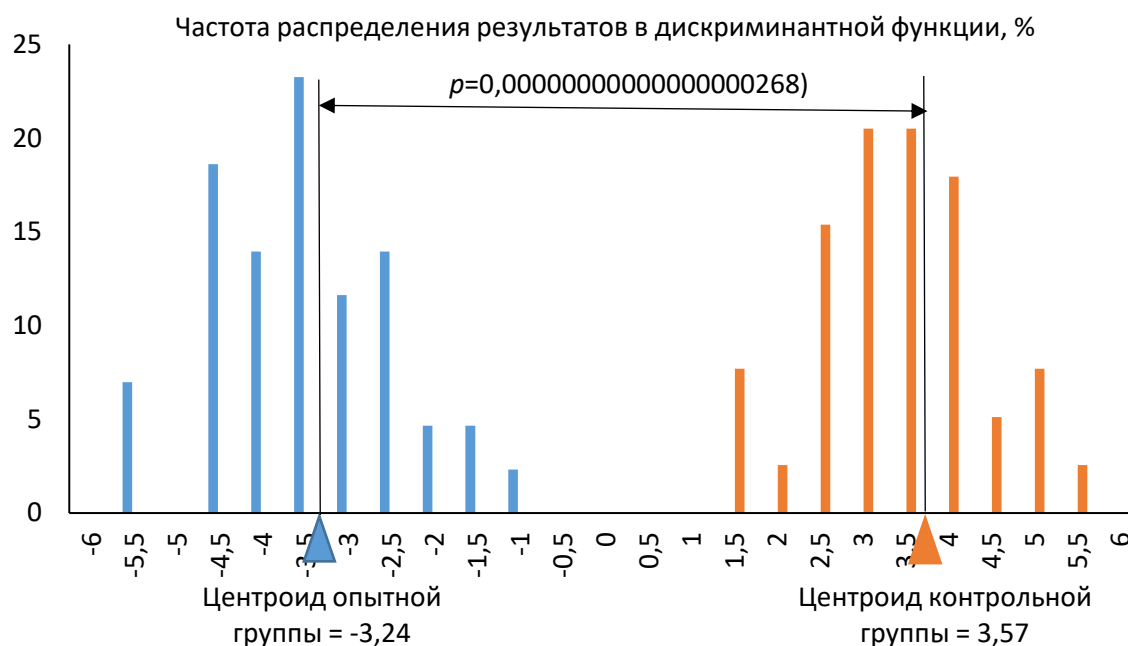


Рисунок 11 – Распределение значений дискриминантной функции в опытной (пациенты с колоректальным раком) и контрольной (клинически здоровые лица) группах

При значении диагностического коэффициента больше 0 результаты моделирования указывают на вероятность КРР.

Результаты определения концентраций МЛК в крови, классифицированные с помощью диагностического коэффициента KPP, позволили рассчитать диагностические/прогностические свойства модели (Таблица 14).

Чувствительность математической модели составила 100%, специфичность – 100%, и диагностическая точность – 100%. Данные кросс-валидации ($R^2=1$, $Q^2=1$ - $R^2 - Q^2 < 0,2$) указывают на возможность использования диагностического коэффициента для скрининговой диагностики КРР.

Корреляции с коэффициентом уникальности, кратность разницы средних между опытной и контрольной группами позволили определить кластер с кандидатом-биомаркером [80].

Таблица 14 – Классификационная матрица результатов определения концентраций минорных липидных компонентов в крови пациентов с колоректальным раком и клинически здоровых лиц [80]

Число образцов, заданные, пользователем, по группам	Число образцов, классифицированных корректно, %	Число образцов, определенных диагностическим коэффициентом модели		Всего
		Основная группа (больные колоректальным раком)	Контрольная группа (клинически здоровые лица)	
Основная группа	100	60	0	60
Контрольная группа	100	0	68	68
Всего	100	60	68	128

Распределение корреляций между факторами приведено в таблице 15.

Самая большая факторная нагрузка в системе приходилась на насыщенные и ненасыщенные карбоновые кислоты, объединенные в кластер А, с высокими коэффициентами корреляции с фактором 1: для этого кластера средний коэффициент корреляции (r) составлял $-0,64$. Самый большой коэффициент корреляции отмечался для концентрации антеизононадекановой кислоты (a19): $r = -0,91$. Изменения концентраций МЛК кластера А не были связаны с онкологическим процессом, так как имели разнонаправленные коэффициенты корреляции с коэффициентом уникальности KPP: средний коэффициент корреляции (r) был равен $0,02$ [80].

Таблица 15 – Средние факторные нагрузки по кластерам между концентрациями минорных липидных компонентов в крови [80]

Кластер	Минорный липидный компонент	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Кратность	Корреляция с коэффициентом уникальности КРР, r
А	Изотетрадекановая кислота (i14)	-0,62	-0,15	-0,47	-	0,04
	11,12-тетрадеценовая кислота (14:1d11)	-0,72*	-0,17	-0,43	-	0,10
	Изопентадекановая кислота (i15)	-0,82*	-0,15	-0,43	0,7	0,08
	Антеизопентадекановая кислота (a15)	-0,75*	-0,11	-0,42	-	0,04
	Изогексадекановая кислота (i16)	-0,89*	-0,24	-0,24	-	0,09
	7,8 гексадеценовая кислота (16:1d7)	-0,56	-0,02	-0,46	-	0,02
	Гептадекановая кислота (17:0)	-0,86*	0,32	-0,13	-	-0,05
	Изононандекановая кислота (i19)	-0,67	-0,12	-0,12	0,7	0,23*
	Антеизогептадекановая кислота (a17)	-0,88*	-0,10	-0,33	-	0,05
	Цисвакценовая кислота (18:1d11)	-0,72*	0,06	-0,25	-	0,08
	9,10-изогептадеценовая кислота (i17:1d9)	-0,09	0,57	-0,28	19,2	-0,42*
	9,10-гептадеценовая кислота (17:1d9)	-0,70*	0,61	0,03	-	-0,04
	Антеизононадекановая кислота (a19)	-0,91*	0,21	-0,04	-	0,02
	Эйкозеновая кислота (20:1d11)	-0,41	-0,02	-0,15	-	0,20
	9,10 гексадеценовая кислота (16:1d9t)	-0,67	0,00	-0,41	-	0,00
	10,11-гексадеценовая кислота (16:1d11)	-0,79*	-0,18	-0,37	-	0,08
	Тетрадекановый альдегид (14a)	-0,57	-0,29	0,20	0,3	0,32*
	7,8 тетрадеценовая кислота (14:1d7)	-0,35	0,33	-0,20	-	-0,26*
	Антеизопентадекановый альдегид (a15a)	-0,50	0,00	-0,12	-	-0,01
	Арахидовая кислота (20:1)	-0,26	0,11	-0,54	1,4	-0,22*
	Среднее значение по кластеру А	-0,64	0,03	-0,26		0,02

Продолжение Таблицы 15

Кластер	Минорный липидный компонент	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Кратность	Корреляция с коэффициентом уникальности КРР, r
В	3-гидроксилауриновая кислота (3h12)	-0,29	0,59	0,31	0,6	0,13
	2-гидрокситетрадекановая кислота (2h14)	-0,39	0,60	0,47	-	-0,05
	10-метилгесадекановая кислота (10Me16)	-0,27	0,90*	0,25	-	-0,15
	10-гидроксиоктадекановая кислота (10h18)	-0,20	0,90*	0,25	2,2	-0,16
	2-гидроксибегеновая кислота (2h22)	-0,26	0,89*	0,14	-	-0,31*
	2-гидроксилигноцериновая кислота (2h24)	-0,24	0,89*	0,29	-	-0,13
	2-гидроксицератиновая кислота (2h26)	-0,18	0,89*	0,29	0,6	-0,12
	Среднее значение по кластеру В	-0,26	0,81	0,28		-0,11
С	Изопальмитовый альдегид (i16a)	-0,53	-0,43	0,42	-	0,21
	Изооктадекановая кислота (i18)	-0,72*	-0,33	0,38	0,7	0,32*
	Цис-11-октадеценовый альдегид (18:1d11a)	-0,37	-0,46	0,57	0,3	0,53*
	Цис-9-октадеценовый альдегид (18:1d9a)	-0,27	-0,46	0,41	-	0,17
	Циклононадекановая кислота (19cyc)	-0,53	0,11	0,38	0,6	0,37*
	Изогептадекановый альдегид (i17a)	-0,40	-0,46	0,38	-	0,10
	Холистердиол (cholestendiol)	-0,30	-0,34	0,65	0	0,53*
	Кампестерол (campesterol)	-0,42	-0,29	0,50	0,6	0,29*
	β -ситостерол (b-sitosterol)	-0,41	-0,16	0,62	0,4	0,41*
	Изопентадекановый альдегид (i15a)	-0,49	-0,33	0,37	0,4	0,32*
	Изотетрадекановый альдегид (i14a)	-0,49	-0,22	0,24	-	-0,01
	Холестерол (cholesterol)	-0,59	-0,37	0,48	0,7	0,43*
	Холестандиенон (cholestadienon)	-0,54	-0,13	0,30	0	0,25*
	Среднее значение по кластеру С	-0,47	-0,30	0,44		0,30

Продолжение Таблицы 15

Кластер	Минорный липидный компонент	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Кратность	Корреляция с коэффициентом уникальности KPP, r
D	Декановая кислота (10:0)	-0,20	0,03	-0,65	3,7	-0,56*
	Антеизотридекановая кислота (a13)	-0,11	0,10	-0,52	3,5	-0,55*
	9,10-тетрадеценовая кислота (14:1d9)	-0,35	-0,14	0,07	0,5	0,18
	Изододекановая кислота (i12)	-0,16	0,00	-0,23	-	-0,07
	2-гидроксидодекановая кислота (2h12)	-0,05	0,11	0,09	-	-0,16
	9,10-пентадеценовая кислота (15:1d9)	-0,31	0,29	0,03	0,7	0,14
	10-метилпентадекановая кислота (10 Me 15)	-0,20	0,41	0,29	0,6	0,04
	9,10-изогексадеценовая кислота (i16:1d9)	-0,33	0,03	0,11	0,5	0,24*
	3-гидрокситетрадекановая кислота (3h14)	-0,05	0,22	-0,18	1,6	-0,18
	Циклогептадекановая кислота (17сус)	-0,69	-0,06	0,07	0,7	0,34*
	Додекановая кислота (12:0)	-0,33	0,08	-0,30	-	-0,07
	3-гидроксигексадекановая кислота (3h16)	-0,69	0,19	0,20	0,6	0,29*
	3-гидроксиоктадекановая кислота (3h18)	-0,11	0,46	0,29	-	-0,10
	Копростанол (coprostanol)	0,08	0,14	-0,04	2,3	-0,30*
	Холестандион (Cholestadion)	0,31	0,04	-0,28	5,8	-0,52*
	Среднее значение по кластеру D	-0,21	0,13	-0,07		-0,09

Примечание: * – обозначены статистически значимые коэффициенты корреляций, $p < 0,05$.

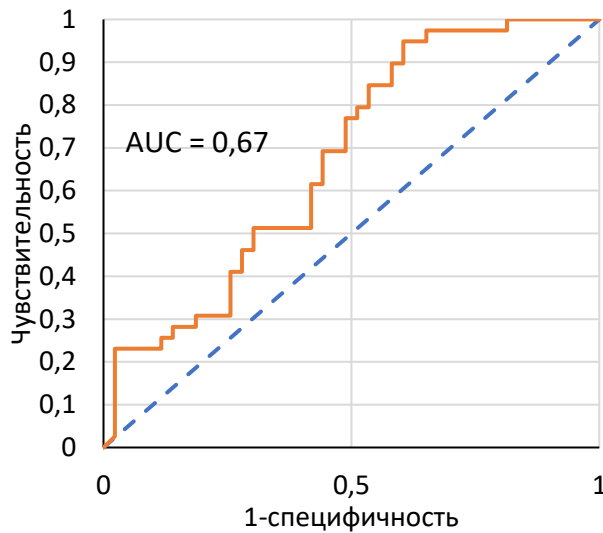
Кластер В объединил 2-, 3-, 10-гидроксикислоты, многие из которых являются структурными компонентами липида А эндотоксина грамотрицательных бактерий. Фактор 2 был связан с 2-, 3-, 10-гидроксикислотами высокими значениями коэффициентов корреляции. Средний коэффициент корреляции с коэффициентом уникальности KPP составил -0,11 [80].

Кластер С, объединивший альдегиды, стеролы и насыщенные жирные кислоты, не отличался значимыми корреляционными связями с рассматриваемыми факторами, имел однонаправленные корреляционные связи с коэффициентом уникальности KPP. Таким образом, соединения кластера С необходимо рассматривать как кандидаты-биомаркеры для оценки динамики заболевания [80].

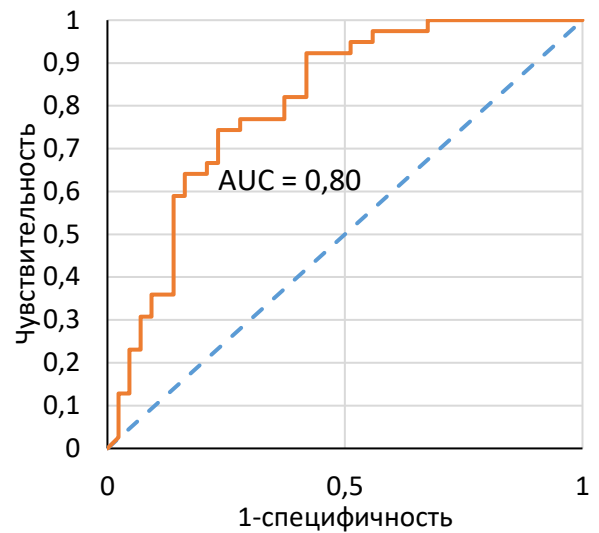
Концентрации МЛК, объединенных в кластер D, не были связаны корреляционными связями с рассматриваемыми факторами, а корреляционные связи с коэффициентом уникальности KPP были разнонаправленными [80].

Третий по значимости кластер С, имевший наибольшую однонаправленную корреляцию, объединил 13 кандидатов-биомаркеров. Для поиска кандидатов-биомаркеров принимали во внимание кратность средних значений между основной и контрольными группами, а также величину коэффициента корреляции с коэффициентом уникальности KPP. Учитывая вышеописанные параметры, для последующего ROC-анализа отобраны изооктадекановая кислота (i18) и холестерол (cholesterol) как потенциально наиболее информативные биомаркеры, пороговые концентрации которых могли бы использоваться как дополнительные лабораторные критерии для выявления KPP [80].

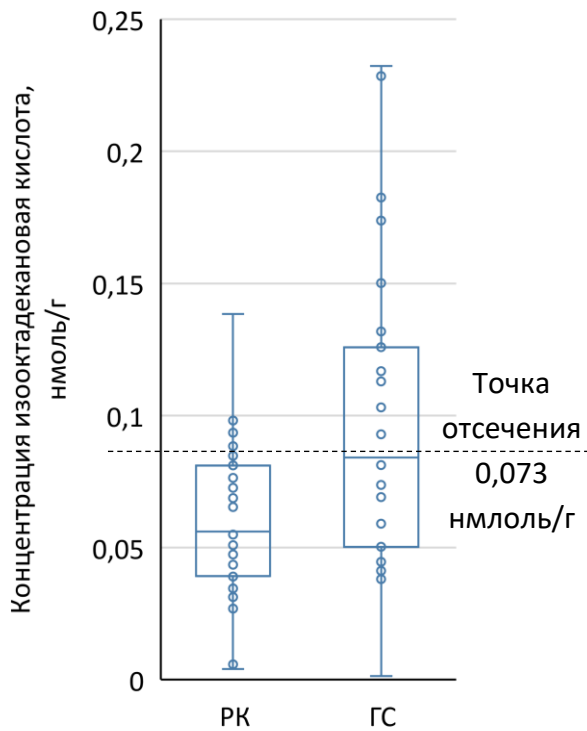
На рисунке 12 (а, б) видны существенные отличия ROC-кривых для концентраций изооктадекановой кислоты (i18) и холестерола (cholesterol) при разделении пациентов с KPP и клинически здоровых лиц [80].



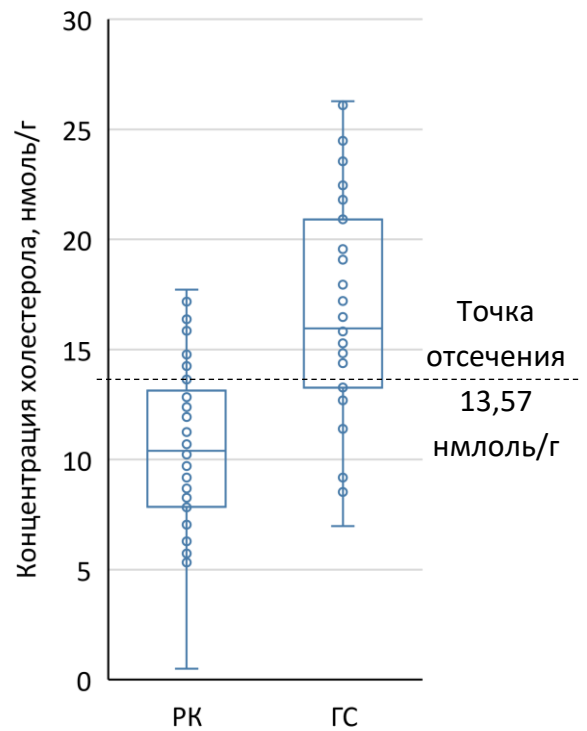
а



б



в



г

Примечание: РК – группа пациентов с колоректальным раком; ГС – группа клинически здоровых лиц; AUC – площадь под ROC-кривой.

Рисунок 12 – Качество классификации групп больных колоректальным раком и клинически здоровых лиц, рассчитанное с помощью модели логистической регрессии: а – ROC-кривая для концентрации изооктадекановой кислоты в крови; б – ROC-кривая для концентрации холестерина в крови; в – концентрации изооктадекановой кислоты в крови; г – концентрации холестерина в крови

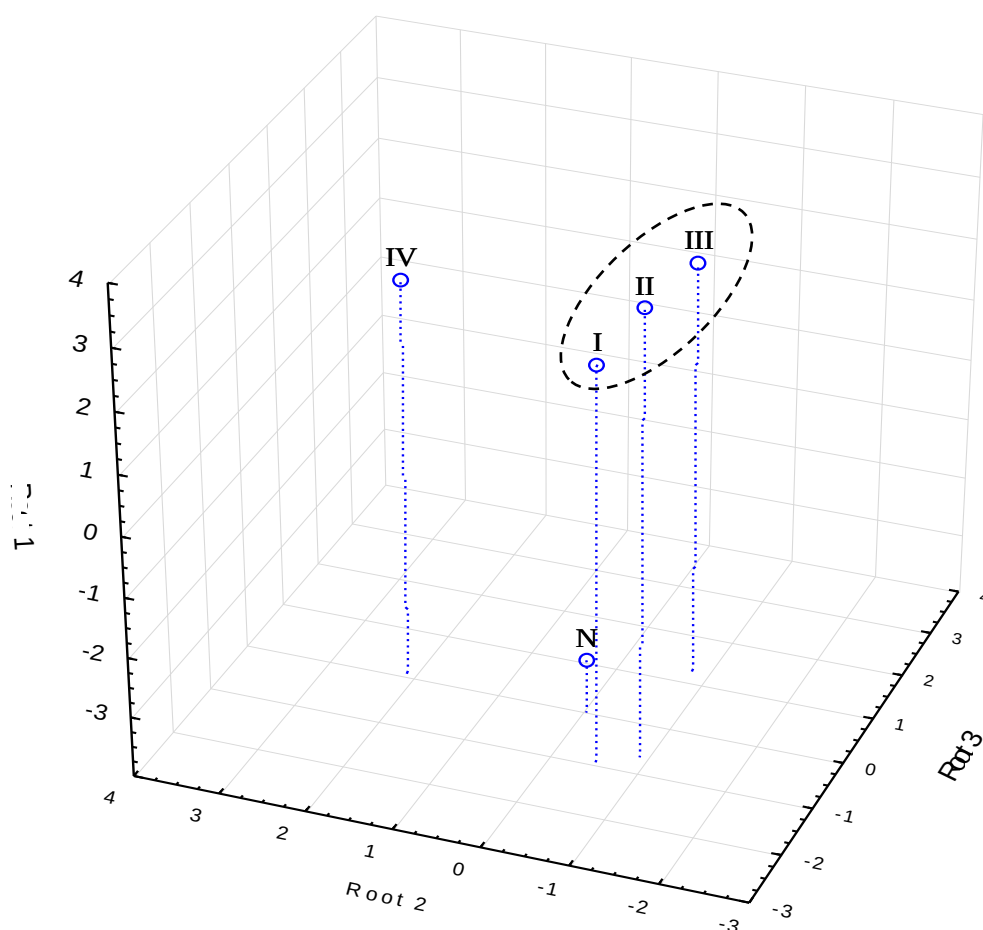
При сравнении вида ROC-кривых и площадей под ними (AUC) установлена большая в этом контексте информативность определения концентрации холестерина (AUC=0,80).

На графиках, представленных на рисунке 12 (в, г), хорошо видно более четкое разделение групп по точке отсечения концентрации холестерина, рассчитанной по результатам ROC-анализа, в сравнении с таковой изооктадекановой кислоты [80].

Величина концентрации холестерина в крови, равная 13,57 наномоль/г, явилась пороговым значением для разделения группы больных КРР и группы здоровых волонтеров. Снижение концентрации ниже этого значения наблюдалось у пациентов с КРР. Точность, чувствительность и специфичность данного биомаркера составили 70%, 62,8% и 79,5% соответственно [80].

Для исследования эффективности пробиотических препаратов в коррекции микробиоценоза кишечника, запланированного на следующем этапе работы, было необходимо определить однородность/гетерогенность исследуемой выборки пациентов с КРР по особенностям липидома. Так как концентрации липидов представляют из себя результат взаимодействия большого количества разнонаправленных процессов, необходим системный подход в дифференцировке липидома в зависимости от стадии КРР. Линейным дискриминантным анализом провели сравнение групп, сформированных в зависимости от стадии рака кишечника. Результаты расположения центроидов групп в трехмерной проекции дискриминантного пространства и статистическая значимость отличий между группами представлены на рисунке 13 [80].

Установлено, что I, II и III стадии рака не различались между собой по своему липидомному (МЛК) отпечатку, так как между ними не было статистически значимых отличий. В тоже время липидомные характеристики пациентов с IV стадией КРР статистически значимо отличались и от таковых клинически здоровых лиц (N), и от показателей объединенной выборки пациентов с I, II и III стадиями рака [80].



Примечание: римскими цифрами обозначены стадии колоректального рака, N – контрольная группа; штриховой линией обведены центроиды групп, для которых нет статистически значимых различий расстояния Махаланобиса ($p > 0,05$).

Рисунок 13 – Распределение центроидов групп, сформированных в соответствии со стадией колоректального рака, в 3D-проекции дискриминантного пространства концентраций минорных липидных компонентов в крови

Исходя из этого в дальнейших исследованиях эффективность пробиотика оценивалась отдельно для группы пациентов с IV стадией КРР и объединенной группы больных с I, II и III стадиями заболевания.

Таким образом, исследование микробиома у пациентов с КРР показали отсутствие отличий, характеризующих ферментативное и микробное пищеварение. В бактериологическом анализе кала не выявлено закономерных особенностей, за исключением появления в посеве микроорганизмов рода *Corynebacterium*. В литературе присутствуют подтверждения культивирования нетипичной для кишечника микрофлоры, но указаний на микроорганизмы рода *Corynebacterium* не встречаются. Исследования антибиотикорезистентности не показало четко

направленного вектора, который можно было бы связать с наличием/отсутствием опухолевого заболевания. Таким образом, подтвердился тезис о том, что КРР практически никак себя не обнаруживает, а клинические симптомы появляются на поздних стадиях заболевания при распространении метастазов.

Исследование функциональной активности микробиоценоза кишечника методами системной медицины показало наличие биомаркера КРР – относительной концентрации изовалериановой кислоты, которая является продуктом жизнедеятельности целого ряда представителей микробиоты кишечника. Ряд авторов связывает повышение концентрации изовалериановой кислоты с воспалительными заболеваниями кишечника, что согласуется с данными, полученными в настоящей работе. С помощью кластерного и линейного дискриминантного анализа доказана ведущая роль изовалериановой кислоты в изменениях метаболома, связанных с развитием КРР, а также определена концентрация относительной концентрации изовалериановой кислоты (0,05 ед.), превышение которой с вероятностью 86,3% указывает на развитие этого заболевания. Исследование состава крови показало, что точность реакции биохимических процессов на КРР по простым биомаркерам – содержанию гемоглобина и глюкозы в крови – составляет 90,5% и 85,7% соответственно. Использование диагностических коэффициентов, рассчитанных линейным дискриминантным анализом по результатам общего и биохимического анализа крови, составляет 84,4% и 86,7% соответственно. Оценка реакции липидома, рассчитанного на основании концентрации МЛК, многие из которых имеют микробное происхождение, существенно увеличивает точность диагностики при использовании диагностического коэффициента до 100%, а при использовании холестерина как биомаркера составляет 70%.

Использование дифференциального линейного дискриминантного анализа показало, что реакция липидома для I, II, III стадии не отличается между собой, а для IV стадии колоректального рака изменения статистически значимы.

Учитывая полученные результаты, на завершающем этапе исследования для мониторинга эффективности пробиотической интервенций в периоперационном

периоде у больных КРР использовали не только оценку видового состава микробиоты в образцах кала и ее функциональной активности по содержанию КЖК в копрофильtrate, но и липидомный биомаркер – концентрацию холестерина в крови.

3.3. Мониторинг системы макроорганизм-микробиота у пациентов с колоректальным раком на фоне микрoэкологической коррекции

Известно, что пробиотические препараты и продукты могут повышать/восстанавливать защитную функцию микробиоты кишечника в контексте как противоинфекционного ответа, так и противоопухолевого потенциала. Подтверждены положительные эффекты на здоровье человека *L. rhamnosus GG*, связанные с поддержанием целостности слизистой оболочки кишечника, её барьерных свойств, кислотно-щелочного баланса, необходимого для нормального функционирования пищеварительных ферментов, регуляцией перистальтики кишечника, стимуляцией работы иммунной системы, а также предотвращением избыточного роста патогенов и патобионтов [80, 293].

В настоящей работе как средство микрoэкологической коррекции использовали БАД Комплинекс, содержащую лиофилизированные бактерии *L. rhamnosus GG* в титре 10 Lg КОЕ, витамины B1, B2, B6 и микроэлемент цинк.

Учет результатов исследования проводили отдельно для объединённой выборки больных с I–III стадиями КРР и для выборки пациентов с IV стадией заболевания.

3.3.1. Влияние курсового приема комбинации *L. rhamnosus* GG, витаминов В1, В2, В6 и цинка на микробный пейзаж кишечника у пациентов с колоректальным раком

Анализируя изменения микробного пейзажа кишечника под влиянием курсового приема комбинации *L. rhamnosus* GG, витаминов В1, В2, В6 и цинка, определяли частоты выявления ключевых родов и видов кишечных микроорганизмов в титре выше 4 Lg КОЕ/г в кале.

В основной группе пациентов с КРР I–III стадий, получавших пробиотико-витаминно-минеральный комплекс, до начала лечения частота выявления представителей рода *Bifidobacterium* (38,1%) в указанном титре была существенно ниже, чем в контрольной группе клинически здоровых лиц (100%) (Таблица 16). Это касалось и некоторых видов этого рода, в частности *B. longum* (38,1%), *B. adolescentis* (0%), *B. breve* (0%). В результате приема пробиотико-витаминно-минерального комплекса частота выявления представителей рода *Bifidobacterium* постепенно увеличивалась и к 9-12-му дню после операции достигала 85,7%, что было близко к показателям клинически здоровых лиц. Особенно ярко это проявлялось по росту частоты выявления *B. longum* и *B. breve*.

В группе сравнения исходно сниженная доля больных, в кале которых выявляли представителей рода *Bifidobacterium*, в частности *B. longum* и *B. breve*, в титре выше 4 Lg КОЕ/г, в ходе исследования существенно не менялась, а на 9-12-е сутки после операции была статистически значимо меньше, чем таковая в основной группе (Таблица 16).

Таблица 16 – Влияние периоперационного приема комбинации *L. rhamnosus* GG, витаминов B1, B2, B6 и цинка на частоту выявления микроорганизмов в титре выше 4 Lg КОЕ/г в кале пациентов с колоректальным раком I-III стадий [12]

Роды и виды микроорганизмов	Контроль (клинически здоровые лица), (n=68)		Основная группа (n=21)						Группа сравнения (n=23)					
			До начала лечения		5-8-е сутки после операции (день завершения приема пробиотика)		9-12-е сутки после операции (через 3-5 дней после завершения приема пробиотика)		До начала лечения		5-8-е сутки после операции		9-12-е сутки после операции	
	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %	Абс.	Отн., %
<i>Bifidobacterium spp.</i>	68	100	8	38,1*	13	61,9*	18	85,7*#	12	52,2*	10	43,5*	12	52,2*
<i>B. longum</i>	64	94,1	8	38,1*	13	61,9*	18	85,7#	12	52,2*	10	43,5*	12	52,2*
<i>B. adolescentis</i>	22	32,4	0	0*	3	14,3	6	28,6	3	13	3	13	2	8,7*
<i>B. bifidum</i>	19	27,9	4	19	5	23,8	7	33,3	0	0*	3	13	3	13
<i>B. breve</i>	13	19,1	0	0*	4	19	9	42,9*#	2	8,7	2	8,7	1	4,3
<i>B. dentium</i>	9	13,2	1	4,8	1	4,8	3	14,3	0	0	1	4,3	0	0
<i>Lactobacillus spp.</i>	68	100	13	61,9*	16	76,2*#	13	61,9*	13	56,5*	10	43,5*	13	56,5*
<i>L. plantarum</i>	65	95,6	13	61,9*	15	71,4*	13	61,9*	12	52,2*	10	43,5*	12	52,2*
<i>L. rhamnosus</i>	22	32,4	4	19	7	33,3	3	14,3	3	13	3	13	4	17,4
<i>L. casei</i>	21	30,9	2	9,5	5	23,8	5	23,8	4	17,4	1	4,3*	3	13
<i>L. acidophilus</i>	13	19,1	1	4,8	3	14,3	1	4,8	3	13	3	13	2	8,7
<i>L. reuteri</i>	7	10,3	2	9,5	2	9,5	0	0	0	0	1	4,3	1	4,3
<i>L. salivarius</i>	5	7,4	0	0	1	4,8	0	0	3	13	1	4,3	2	8,7
<i>E. coli</i>	65	95,6	15	71,4	13	61,9*	16	76,2*	13	56,5*	15	65,2*	12	52,2*
<i>E. coli (L-)</i>	0	0	1	4,8	0	0	0	0	1	4,3	1	4,3	3	13*
<i>E. coli (hem+)</i>	0	0	1	4,8	0	0	0	0	2	8,7*	1	4,3	3	13*
<i>Enterococcus spp.</i>	28	41,2	7	33,3	4	19	3	14,3*	5	21,7	8	34,8	7	30,4
<i>E. spp. a hem+</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4,3	2	8,7*	1	4,3
<i>E. faecium</i>	0	0	1	4,8	3	14,3*	3	14,3 *	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	0	0	2	9,5	1	4,8	0	0	1	4,3	3	13*	3	13*
<i>K. pneumoniae</i>	12	17,6	0	0*	0	0*	0	0*	2	8,7	3	13	1	4,3
<i>Enterobacter spp.</i>	14	20,6	0	0*	0	0*	0	0 *	0	0*	0	0*	0	0*
<i>P. aeruginosa</i>	8	11,8	2	9,5	0	0	0	0	2	8,7	3	13	2	8,7

Продолжение Таблицы 16

[illegible]

Продолжение Таблицы 16

Роды и виды микроорганизмов	Контроль (клинически здоровые лица), (n=68)		Основная группа (n=21)						Группа сравнения (n=23)					
			До начала лечения		5-8-е сутки после операции (день завершения приема пробиотика)		9-12-е сутки после операции (через 3-5 дней после завершения приема пробиотика)		До начала лечения		5-8-е сутки после операции		9-12-е сутки после операции	
	Абс.	Отн., %												
<i>C. butyricum</i>	7	10,3	0	0	0	0	0	0	3	13	2	8,7	2	8,7
<i>C. difficile</i>	18	26,5	9	42,9	3	14,3#	1	4,8*#	7	30,4	12	52,2	13	56,5*
<i>C. septicum</i>	3	4,4	0	0	0	0	0	0	2	8,7	3	13	2	8,7
<i>F. nucleatum</i>	19	27,9	6	28,6#	7	33,3#	6	28,6	15	65,2*	17	73,9*	13	56,5*
<i>F. necrophorum</i>	4	5,9	0	0	0	0	0	0	3	13	3	13	3	13
<i>P. micra</i>	27	39,7	8	38,1	3	14,3*	4	19	9	39,1	7	30,4	10	43,5
<i>E. rectale</i>	3	4,4	0	0	0	0	0	0	1	4,3	0	0	2	8,7
<i>E. hallii</i>	2	2,9	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8,7	0	0
<i>R. bromii</i>	3	4,4	2	9,5	0	0	0	0	1	4,3	1	4,3	2	8,7
<i>R. gnavus</i>	2	2,9	3	14,3	2	9,5	0	0#	0	0	2	8,7	5	21,7*
<i>P. gingivalis</i>	2	2,9	0	0	0	0	0	0	2	8,7	3	13	3	13
<i>P. asaccharolytica</i>	2	2,9	2	9,5	0	0	0	0	1	4,3	0	0	0	0
Примечание: * – p<0,05 в сравнении с контрольной группой, # – p<0,05 в сравнении с группой сравнения по критерию χ^2 при n>10, а при n<10 – по точному критерию Фишера.														

Доля пациентов с КРР I–III стадий, в кале которых выявляли *Lactobacillus spp.* в титре выше 4 Lg КОЕ/г, до лечения была ниже в обеих группах, чем в контроле (Таблица 16). Через 5-8 суток после операции обнаружены разнонаправленные тенденции изменения частоты выявления представителей этого рода: в основной группе – к повышению, а в группе сравнения – к снижению. В результате в этот срок частота выявления *Lactobacillus spp.* была в математически подтверждённой степени выше у пациентов, получавших пробиотико-витаминно-минеральный комплекс. К 9-12-му дню после операции (т.е. через 3-5 суток после завершения приема пробиотика) эти тенденции, как и различие между группами по указанному критерию, исчезали. Динамика частоты выявления *L. plantarum* в целом отражала закономерности, характерные для всего рода *Lactobacillus*, но без статистически значимых межгрупповых различий. Отдельно следует отметить выраженную тенденцию к повышению частоты выявления *L. rhamnosus* на 5-8-е сутки после операции в основной группе, но не у пациентов группы сравнения [4].

Исходно в обеих группах больных КРР на фоне общего снижения частоты выявления *E. coli* были единичные пациенты, в кале которых обнаруживали гемолитические и лактозонегативные штаммы *E. coli*. в титре выше 4 Lg КОЕ/г. [16]. И если в основной группе после курсового приема пробиотика таких пациентов уже не выявляли, то в группе сравнения они сохранялись.

Среди других важных в клиническом плане микробиологических сдвигов, можно выделить снижение частоты выявления *C. difficile* у пациентов основной группы и тенденцию к повышению этого показателя в группе сравнения. Сходные различия были выявлены и по динамике доли пациентов, в кале которых выявляли *B. fragilis*.

В основной группе в течение всего исследования частота выявления *F. nucleatum* была заметно ниже, чем в группе сравнения, в которой этот показатель существенно превышал таковой у клинически здоровых лиц контрольной группы. Кроме того, в основной группе через 3-5 дней после завершения приема пробиотика не наблюдали ни одного случая выявления *R. gnavus*, что в математически подтверждённой степени отличало эту группу от группы сравнения.

У пациентов с IV стадией КРР исходно отмечали выраженное снижение частоты выявления *Bifidobacterium spp.* в титре выше 4 Lg КОЕ/г, при этом *B. longum* был единственным представленным видом (Таблица 17). В основной группе, но не в группе сравнения, наблюдали кратковременную тенденцию к повешению этого показателя на 5-8-е сутки после операции.

Аналогичные исходные сдвиги и закономерности динамики были выявлены и для частоты выявления *Lactobacillus spp.*, включая *L. plantarum* как единственного представленного вида этого таксона. Обращает на себя внимание, что у больных КРР IV стадии курсовой прием комбинации *L. rhamnosus GG* с витаминами и цинком так и не привел к появлению лиц, у которых в кале смогли бы выявить *L. rhamnosus* в титре выше 4 Lg КОЕ/г (Таблица 17).

Частота выявления *E. coli* была ниже, чем в контроле, без существенных различий между основной группой и группой сравнения во сроки взятия образцов кала. Гемолитические штаммы *E. coli* исходно выявлялись в титре выше указанного порога только у единичных больных КРР IV стадии обеих групп. В группе пациентов, которые получали пробиотико-витаминно-минеральный комплекс, на 5-8-й день после операции гемолитические штаммы *E. coli* не выявлялись, тогда как в группе сравнения обнаружен один пациент, в кале которого нашли такие штаммы в титре выше 4 Lg КОЕ/г. Сходные закономерности выявлены и для частоты выявления лактозонегативных штаммов *E. coli*, которые отсутствовали в образцах кала всех больных основной группы как на 5-8-е, так и на 9-12-е сутки после операции.

Частоты выявления *Enterococcus spp.* между группами и между каждой из них и контролем в течение всего исследования не различались. Вместе с тем обращает на себя внимание достаточно высокая исходная частота выявления *E. faecium* в обеих группах больных КРР и последующее исчезновение этого вида у всех пациентов на 5-8-е сутки после операции, после чего в основной группе выявляемость *E. faecium* вновь возрастала (Таблица 17).

Таблица 17 – Влияние периоперационного приема композиции *L. rhamnosus* GG, витаминов B1, B2, B6 и цинка на частоту выявляемости микроорганизмов в титре выше 4 Lg КОЕ/г в кале пациентов с колоректальным раком IV стадии [12]

[illegible]

Продолжение Таблицы 17

Роды и виды микроорганизмов	Контроль (клинически здоровые лица), (n=68)		Основная группа (n=7)						Группа сравнения (n=9)					
			До начала лечения		5-8-е сутки после операции (день завершения приема пробиотика)		9-12-е сутки после операции (через 3-5 дней после завершения приема пробиотика)		До начала лечения		5-8-е сутки после операции		9-12-е сутки после операции	
	Абс.	Отн., %												
<i>Candida albicans</i>	4	5,9	0	0	1	14,3	0	0	1	11,1	1	11,1	1	11,1
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus spp.</i>	28	41,2	1	14,3	1	14,3	2	28,6	1	11,1	2	22,2	0	0*
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	0	0	2	28,6*	1	14,3	1	14,3	2	22,2*	1	11,1	2	22,2*
<i>Morganella morganii</i>	0	0	1	14,3	0	0	0	0	2	22,2*	0	0	0	0
<i>Kosakonia radicincitans</i>	0	0	1	14,3	0	0	0	0	2	22,2*	2	22,2*	2	22,2*
<i>Oceanobacillus spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	4	5,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus spp.</i>	16	23,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. prausnitzii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. fragilis</i>	64	94,1	7	100	6	85,7	6	85,7	9	100	8	88,9	9	100
<i>B. thetaiotaomicron</i>	2	2,9	2	28,6	0	0	2	28,6	2	22,2	2	22,2	3	33,3*
<i>B. vulgatus</i>	1	1,5	1	14,3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	22,2*
<i>B. ovatus</i>	1	1,5	0	0	0	0	0	0	2	22,2*	1	11,1	2	22,2*
<i>C. perfringens</i>	9	13,2	1	14,3	0	0	1	14,3	1	11,1	2	22,2	1	11,1
<i>C. ramosum</i>	2	2,9	0	0	0	0	0	0	2	22,2*	1	11,1	1	11,1

Продолжение Таблицы 17

Роды и виды микроорганизмов	Контроль (клинически здоровые лица), (n=68)		Основная группа (n=7)						Группа сравнения (n=9)					
			До начала лечения		5-8-е сутки после операции (день завершения приема пробиотика)		9-12-е сутки после операции (через 3-5 дней после завершения приема пробиотика)		До начала лечения		5-8-е сутки после операции		9-12-е сутки после операции	
	Абс.	Отн., %												
<i>C. butyricum</i>	7	10,3	0	0	0	0	0	0	2	22,2	1	11,1	2	22,2
<i>C. difficile</i>	18	26,5	7	100*	7	100*	7	100*	8	88,9*	9	100*	9	100*
<i>C. septicum</i>	3	4,4	1	14,3	0	0	0	0	0	0	1	11,1	1	11,1
<i>F. nucleatum</i>	19	27,9	7	100*	4	57,1	4	57,1	7	77,8*	8	88,9*	7	77,8*
<i>F. necrophorum</i>	4	5,9	1	14,3	0	0	0	0	2	22,2	1	11,1	1	11,1
<i>P. micra</i>	27	39,7	6	85,7*	5	71,4	4	57,1	9	100*	7	77,8*	9	100*
<i>E. rectale</i>	3	4,4	1	14,3	0	0	1	14,3	1	11,1	0	0	2	22,2
<i>E. hallii</i>	2	2,9	0	0	0	0	0	0	1	11,1	2	22,2	2	22,2
<i>R. bromii</i>	3	4,4	1	14,3	0	0	0	0	0	0	2	22,2	1	11,1
<i>R. gnnavus</i>	2	2,9	1	14,3	0	0	1	14,3	1	11,1	2	22,2	3	33,3
<i>P. gingivalis</i>	2	2,9	0	0	0	0	0	0	1	11,1	2	22,2	1	11,1
<i>P. asaccharolytica</i>	2	2,9	2	28,6	0	0	0	0	1	11,1	1	11,1	1	11,1

Примечание: * – p<0,05 в сравнении с контрольной группой, # – p<0,05 в сравнении с группой сравнения по критерию χ^2 при n>10, а при n<10 – по точному критерию Фишера.

Достаточно высокой была частота выявления *K. pneumoniae* в обеих группах больных КРР IV стадии в течение всего исследования. Однако в основной группе к последнему дню приема пробиотика проявлялась кратковременная тенденция к снижению этого показателя (Таблица 17).

Доля пациентов, в кале которых исходно выявляли *Enterobacter spp.* выше 4 Lg КОЕ/г, в обеих группах не отличалась от таковой в контроле. К 9-12-му дню после операции в основной группе таких пациентов уже не было, тогда как в группе сравнения у 2 больных выявляли *Enterobacter spp.* в указанном титре.

Частота выявления *C. amycolatum* у пациентов с КРР IV стадии варьировала в пределах 11,1-28,6% без межгрупповых различий. При этом в группе клинически здоровых лиц этот микроорганизм не выявлялся.

В образцах кала практически всех пациентов обеих групп в течение всего исследования обнаруживали *C. difficile* при 26,5%-й выявляемости этой бактерии в контроле (Таблица 17).

Очень высокой была исходная частота выявления *F. nucleatum* у онкологических больных. В основной группе на фоне приема комбинации *L. rhamnosus* GG, витаминов B1, B2, B6 и цинка этот показатель снижался почти вдвое, тогда как в группе сравнения – варьировал на близком к исходному уровне. Сходные групповые особенности динамики частоты выявления была обнаружена и для *P. micra*.

Таким образом, применение пробиотико-витаминно-минерального комплекса в периоперационном периоде у пациентов с КРР на стадиях I–III способствовало значительному восстановлению численности представителей нормобиоты, особенно *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.*, с одновременным снижением частоты выявления патогенов и патобионтов, таких как *C. difficile*. Курсовой прием пробиотика с витаминами группы B и цинком, предотвращал экспансию *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *Enterococcus spp.*, что свидетельствует о его эффективности в коррекции дисбиоза [12].

На IV стадии КРР эффект БАД Комплинекс был менее выражен: наблюдалась лишь кратковременная тенденция к восстановлению численности и видового

разнообразия *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* на 5-8-й день после операции без существенного влияния на выявляемость патобионтов [12].

В группе сравнения на всех стадиях установлен более выраженный дисбаланс микробиоты с ростом патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, что подчеркивает положительное влияние изучаемого средства микрoэкологической коррекции на микробный пейзаж, особенно на ранних стадиях заболевания [12].

3.3.2. Влияние пробиотико-витаминно-минерального комплекса на динамику функциональной активности микробиоты кишечника у пациентов с колоректальным раком

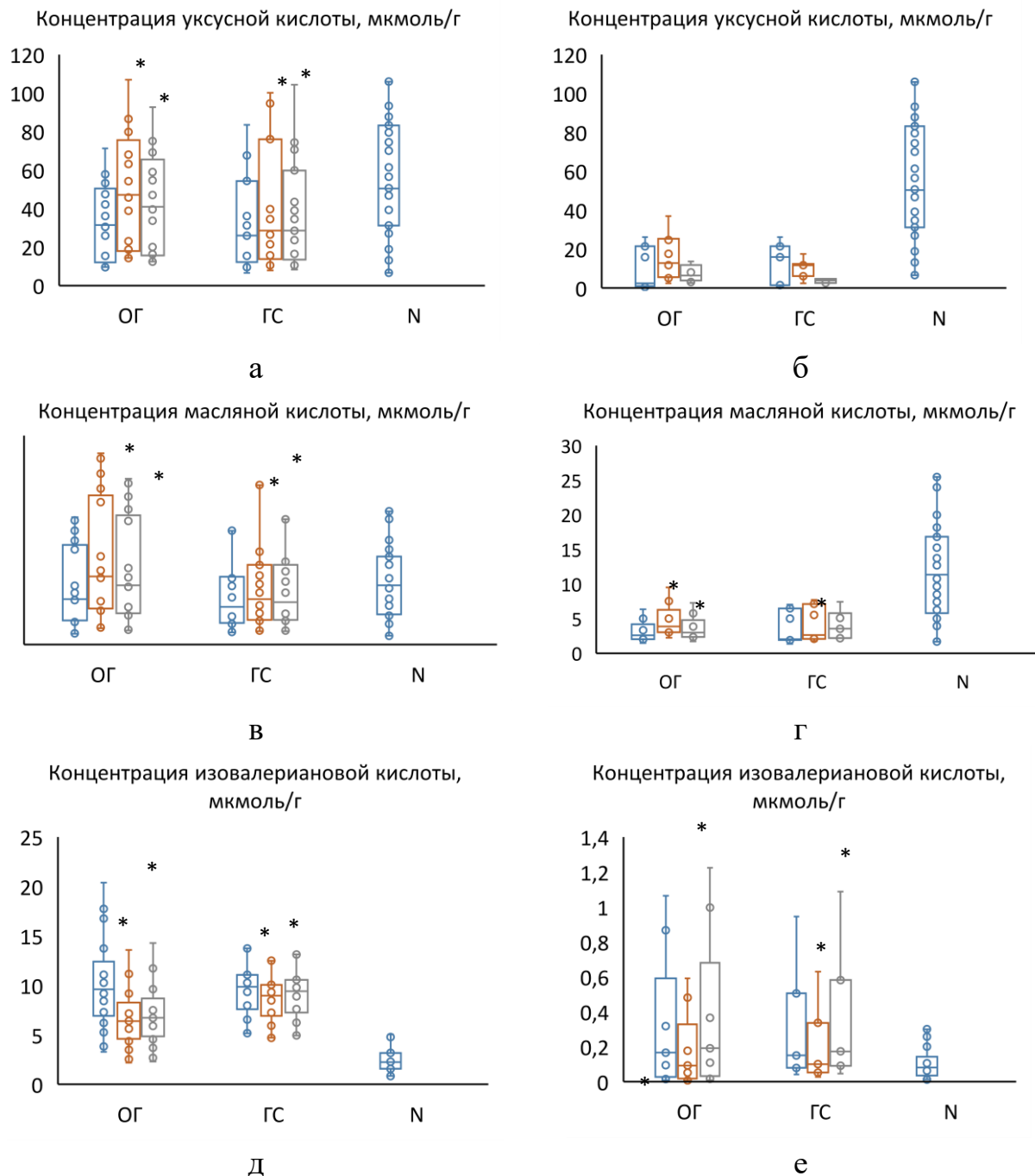
Изменения функциональной активности микробиоты кишечника на фоне периоперационного приема БАД Комплинекс исследовали по динамике концентраций уксусной, масляной и изовалериановой кислот в кале пациентов с КРР на стадиях I-III и IV. Концентрации измерялись до начала лечения, на 5-8-й и 9-12-й день после операции.

Концентрация уксусной кислоты у пациентов с КРР I-III стадий в основной группе выросла с 31,4 мкмоль/г до 47,1 мкмоль/г на 5-8-й день после операции (последний день приема пробиотика) и снизилась до 40,9 мкмоль/г к 9-12-му дню, оставаясь значимо выше исходного уровня; в группе сравнения рост был менее выражен: с 25,9 мкмоль/г до 28,5 мкмоль/г на 5-8-е и 9-12-е сутки (Рисунок 14а) [12].

На IV стадии КРР в основной группе концентрация уксусной кислоты увеличилась с 2,5 мкмоль/г до 12,8 мкмоль/г на 5-8-й день после операции и упала до 6,5 мкмоль/г к 9-12-му дню, но изменения не были статистически значимыми; в группе сравнения наблюдали снижение с 15,9 мкмоль/г до 11,7 мкмоль/г и 3,8 мкмоль/г без статистической значимости этих сдвигов (Рисунок 14б).

Уровень масляной кислоты у пациентов с КРР I-III стадий в основной группе вырос с 8,7 мкмоль/г до 13 мкмоль/г на 5-8-й день после операции и до 11,3

мкмоль/г к 9-12-му дню; в группе сравнения отмечен рост этого показателя с 7,2 мкмоль/г до 8,7 мкмоль/г на 5-8-й день и 8,1 мкмоль/г к 9-12-му дню (Рисунок 14в).



Примечание: □ – до лечения, □ – 5-8-й день после операции, □ – 9-12-й день после операции. * – показатели, статистически значимо отличающиеся от таковых до лечения по W-критерию Вилкоксона (p < 0,05). ОГ – основная группа, GS – группа сравнения, N – клинически здоровые лица.

Рисунок 14 – Динамика концентраций короткоцепочечных жирных кислот в кале пациентов с колоректальным раком на фоне приема пробиотика: а, в, д – I–III стадии КРР; б, г, е – IV стадии КРР

На IV стадии КРР в основной группе содержание масляной кислоты увеличилось с 2,6 мкмоль/г до 3,9 мкмоль/г на 5-8-й день и снизилась до 3 мкмоль/г к 9-12-му дню; в группе сравнения наблюдали рост концентрации этой КЖК с 2 мкмоль/г до 2,6 мкмоль/г на 6-й день и до 3,5 мкмоль/г к 10-му дню, но статистически значимым этот рост был только на 5-8-й день.

Для изовалериановой кислоты у пациентов I-II-III стадий в ОГ уровень снизился с 9,6 мкмоль/г до 6,4 мкмоль/г на 6-й день ($p < 0,05$) и до 6,7 мкмоль/г к 10-му дню ($p < 0,05$); в ГС снижение с 9,9 мкмоль/г до 9 мкмоль/г на 6-й день ($p < 0,05$) и 9,4 мкмоль/г к 10-му дню ($p < 0,05$).

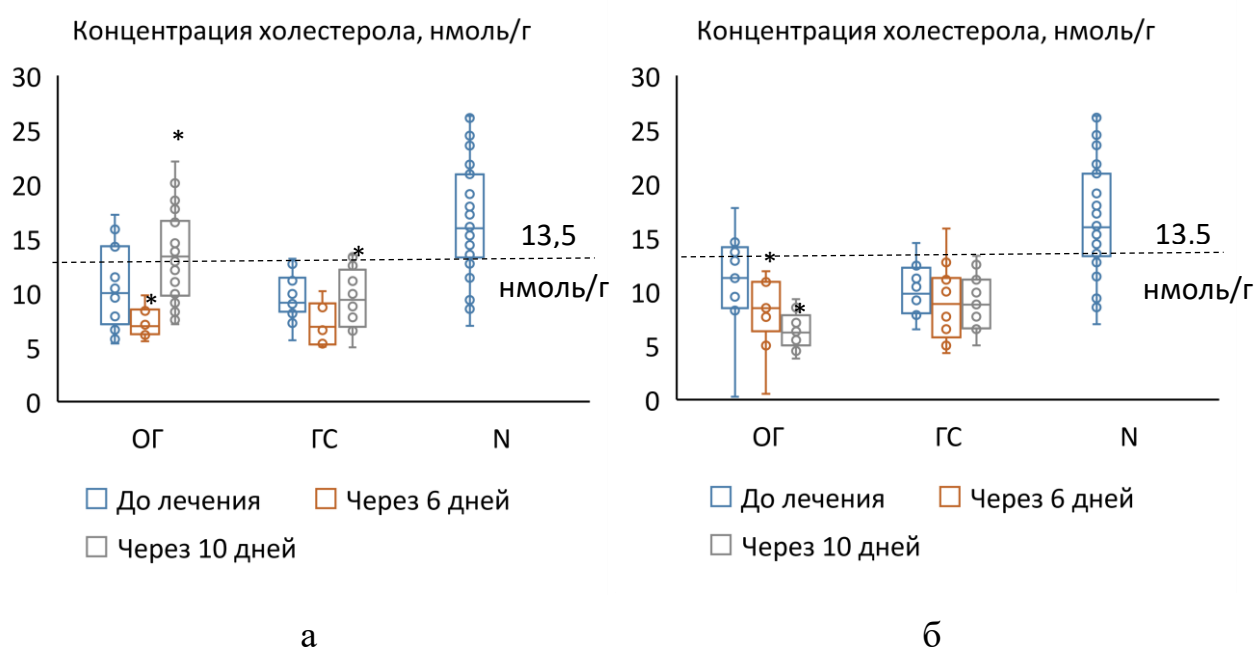
На IV стадии в обеих группах исходные уровни были низкими (0,2 мкмоль/г); в ОГ концентрация снизилась до 0,1 мкмоль/г на 6-й день ($p < 0,05$) и вернулась к 0,2 мкмоль/г к 10-му дню ($p < 0,05$); в ГС уровень составил 0,1 мкмоль/г на 6-й день ($p < 0,05$) и 0,2 мкмоль/г к 10-му дню ($p < 0,05$).

Результаты показывают, что Комплинекс эффективнее увеличивает уровни уксусной и масляной кислот у пациентов на стадиях I-II-III, что может быть связано с модуляцией микробиоты кишечника, способствующей противовоспалительным эффектам и поддержанию здоровья кишечника.

На IV стадии изменения менее выражены, вероятно, из-за тяжелой дисбиотической среды, ограничивающей реакцию микробиоты. Снижение изовалериановой кислоты во всех группах может указывать на перестройку метаболизма микробиоты в сторону ферментации углеводов, что, вероятно, связано с пребиотическим эффектом Комплинекса. Различия между ОГ и ГС подчеркивают потенциал синбиотика, особенно на ранних стадиях КРР, но ограниченный эффект на IV стадии требует дальнейшего изучения. Необходимы исследования с большим числом участников, более длительным периодом наблюдения и анализом микробиома для понимания механизмов и связи с клиническими исходами.

3.3.3. Оценка эффективности влияния пробиотика на систему макроорганизм-микробиота у пациентов с аденокарциномой в периоперационном периоде

Исследование концентрации холестерина в крови пациентов для группы 123 – N и 4 -N включало 3 этапа относительно сроков приема Комплинекса – до начала приема, после курса приема и через 10 дней после начала приема (то есть 4 дня после окончания приема). В аналогичные сроки брали кровь у пациентов группы сравнения, которые Комплинекс не принимали. Результаты представлены на рисунке 15 [80].



Примечание: * – обозначены значения имеющие статистическую значимость относительно этапа «до лечения» в своей группе, рассчитанные по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Рисунок 15 – Концентрации холестерина в крови пациентов с: а – I, II, III стадией рака кишечника; б – IV стадией рака кишечника, принимавших пробиотик (ОГ), и не принимавших пробиотик (ГС) по сравнению со значениями здоровых волонтеров (N)

На рисунке 15 показано, что прием Комплинекса снижает концентрацию холестерина в крови пациентов, что соответствует отрицательной динамике

течения заболевания. Для группы 123 через 10 дней после начала приема Комплинекса или через 4 дня после окончания курса приема Комплинекса происходит статистически значимое увеличение концентрации холестерина в крови (рисунок 15а), тогда как у пациентов группы 4 (IV стадия рака кишечника) снижение концентрации холестерина продолжается [80].

Системный анализ липидома по концентрациям ключевых МЛК, имеющих в том числе микробное происхождение, показал, что система липидного обмена реагирует на такой эндогенный фактор как колоректальный рак снижением концентрации холестерина в крови. Использование концентрации холестерина в крови для оценки эффективности применения пробиотиков с целью поддержания колонизационной резистентности нормальной микрофлоры кишечника оправдано для пациентов с I, II, III стадией колоректального рака, так как через 10 дней после приема препарата намечается увеличение концентрации холестерина в крови до значений, регистрируемых у здоровых волонтеров. Для пациентов с IV стадией заболевания отмечается отрицательная динамика, что может быть связано со снижением общей антиинфекционной резистентностью организма [80].

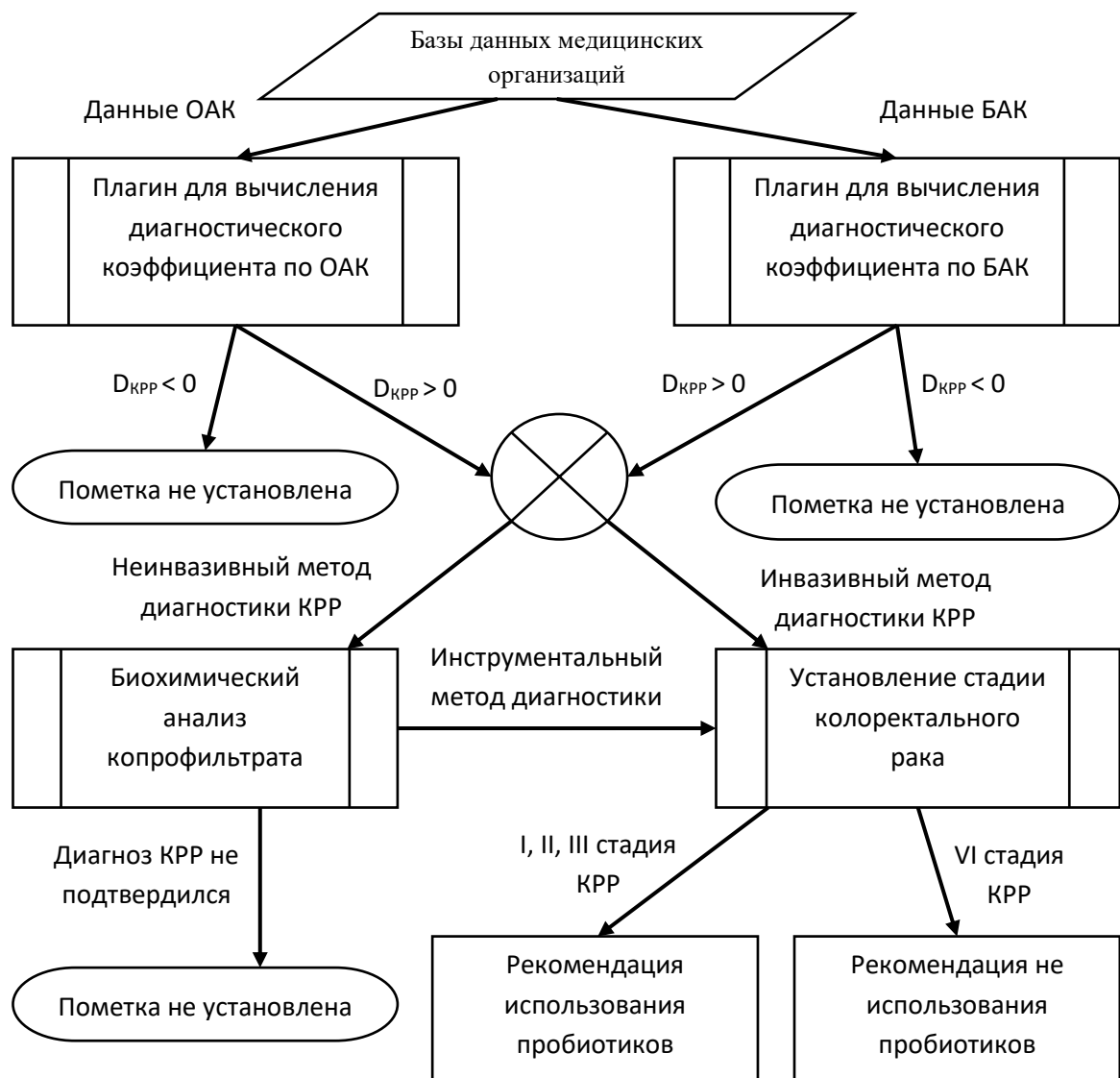
Известно, что колоректальный рак влияет на многие бактериальные метаболические пути. Активируются пути, связанные с жирными кислотами, аминокислотами, нуклеиновыми кислотами. Снижаются интенсивность пути углеводного и энергетического метаболизма. В областях сильно пораженных опухолью снижается экспрессия генов выработки слизи – муцинов, что приводит к нарушению барьерной функции слизистой оболочки кишечника [124]. Дисфункция кишечника, связанная с увеличением кишечной проницаемости приводит к бактериальной транслокации и увеличением концентрации липополисахарида в portalном и системном кровотоке [80, 281].

Изменения видового состава микробиоценоза на поздних стадиях рака кишечника, изучены на модели лабораторных генетически модифицированных мышей [124]. Отмечено увеличение количества *Megasphaera elsdenii*, что может быть связано особенностями злокачественных клеток на поздней стадии рака, выделяющих во внешнюю среду лактат, потребляемый этой бактерией. Введение

Lactobacillus rhamnosus, потребляющей лактат в качестве субстрата, в кишечник увеличивает количество продуктов молочнокислого брожения, что в условиях повышенной проницаемости кишечника может усиливать воспалительный процесс и эндотоксемическую нагрузку [80].

3.4. Схема использования пробиотических препаратов при лечении аденокарциномы кишечника

Эффективность применения пробиотических препаратов на ранних стадиях колоректального рака и неэффективность на поздних стадиях, характеризующихся распространением метастазов предполагает корректировку применения пробиотиков для поддержания защитной функции микробиоценоза кишечника. Известно, что эффективность лечения значимо возрастает если колоректальный рак обнаруживается на ранних стадиях. Поэтому в схему лечения должна входить многоступенчатая система раннего обнаружения колоректального рака. Полученные выше соотношения параметров общего и/или биохимического анализа крови можно использовать для выявления людей с высокой вероятностью бессимптомного течения заболевания. При использовании данных, которые вносятся в систему ЕМИАС и другие базы данных можно автоматически отфильтровывать онкоподозрительных пациентов. Диагностические коэффициенты, можно встроить в качестве плагина в систему и ставить пометку для лечащего врача. Если пациент согласиться на целенаправленное обследование и диагноз подтвердиться, то он будет направлен на лечение. Уточнение диагноза можно проводить неинвазивным способом – по анализу кала на содержание изовалериановой кислоты в пуле короткоцепочечных жирных кислот. Если обнаружение произойдет на ранней стадии, то прием пробиотиков будет эффективен, а если на поздней, то в качестве рекомендации можно отметить нежелательность приема пробиотических препаратов. Графически схема может выглядеть так:



Примечание: БАК – биохимический анализ крови; ОАК – общий анализ крови.

Рисунок 16 – Схема ранней диагностики колоректального рака и рекомендаций по лечению

На рисунке 16 показана схема ранней скрининговой диагностики колоректального рака и рекомендации по лечению. Благодаря обработке данных, которые аккумулируются в единой медицинской информационной системе реализуется способ повышения эффективности лечения колоректального рака за счет переноса начала диагностики с момента инициативного обращения пациента на момент обнаружения системой онкоподозрительных данных. В настоящей диссертационной работе разработаны диагностические коэффициенты, позволяющие проводить скрининговую диагностику ретроспективно, а также в

режиме реального времени по данным общего или биохимического анализа крови. Установление пометки позволяет доктору предложить пациенту уточнить диагноз стандартной методикой, включающей колоноскопию или неинвазивной методикой определения концентраций КЖК в копрофильtrate. При подтверждении диагноза неинвазивной методикой, можно повторно рекомендовать инвазивную методику, по результатам которой будет определена стадия заболевания. При установлении IV стадии, предполагающей распространение метастазов, рекомендуется не использовать пробиотические препараты для усиления защитной функции микрофлоры кишечника. Если обнаружена ранняя стадия заболевания, то пробиотические препараты могут быть полезны для усиления защитной функции микрофлоры кишечника и укрепления иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность раннего обнаружения колоректального рака трудно переоценить, так как разница 5-летней выживаемости при лечении ранних стадий составляет 90%, а поздних 10%. Для выбора диагностического критерия провели исследование микробиоты кишечника и метаболома человека.

По результатам макроскопического, микроскопического и биохимического исследования кала пациентов с колоректальным раком и здоровых волонтеров показано, что разницы в частотах встречаемости нарушений ферментативного и микробного пищеварения не отмечено. Видовой состав микрофлоры кишечника исследовали культуральным методом с оценкой мультирезистентности изолированных штаммов. Частоты встречаемости микроорганизмов в группах статистически значимо не отличаются, за исключением микроорганизмов рода *Corynebacterium*, которые встречаются у 25% пациентов с колоректальным раком. Можно отметить, что обнаружение нетипичного для кишечника рода *Corynebacterium* может служить элементом онконастороженности. Изменения антибиотикорезистентности не имеет направленного вектора, который можно было бы связать с принадлежностью данного свойства микроорганизма к определенной группе.

Оценка функциональной активности микрофлоры кишечника определяется по метаболической активности микрофлоры, которую можно оценить по концентрациям короткоцепочечных жирных кислот в копрофильtrate. Пул концентраций короткоцепочечных жирных кислот является продуктом суммарного метаболизма высокоинтегрированной системы микробиоты, которая находится в симбиотических отношениях с макроорганизмом. Концентрации короткоцепочечных жирных кислот несут в себе информацию обо всех изменениях, происходящих в микробно-тканевом комплексе, который является многофакторной системой [16]. Таким образом, для выявления наиболее информативного биомаркера, описывающего изменения связанные с колоректальным раком необходимо исследовать метаболом кишечной микробиоты

методами многомерной статистики и математического моделирования. Концентрации короткоцепочечных жирных кислот в кале зависят от плотности фекалий, поэтому для оценки используются относительные концентрации – приведенные к сумме концентраций всего пула. Функциональная активность микробиоценоза кишечника обладает чувствительностью по отношению к проявлениям колоректального рака. Найденный биомаркер – относительная концентрация изовалериановой кислоты, связан с развитием колоректального рака и может использоваться для скрининговой диагностики колоректального рака. При превышении относительной концентрации изовалериановой кислоты выше 0,05 ед. с вероятностью 86,3% можно диагностировать колоректальный рак.

Влияние колоректального рака на метаболит человека можно оценить с помощью системной медицины по общему и биохимическому анализу крови, а также по реакции липидома.

Для оценки влияния колоректального рака на формулу крови исследуем показатели общего анализа крови в опытной группе и группе сравнения. Математическая модель с точностью 84,4% выявляет соотношение содержания структурных элементов крови, характерное для колоректального рака.

Настоящая модель прошла кросс-валидацию, где случайным образом формировалась обучающая и тестовая выборки по результатам которой была отобрана модель с наилучшими показателями $R^2=0,844$, а среднее значение остальных моделей, участвующих в кросс-валидации составило $Q^2=0,71$. Разница $R^2 - Q^2 < 0,2$, что указывает на отсутствие переобучения модели, а результаты моделирования могут быть использованы для скрининговой диагностики колоректального рака.

Таким образом, по результатам общего анализа крови при использовании диагностического коэффициента и по уровню гемоглобина в крови можно с вероятностью 84,4% и 90,5% соответственно диагностировать колоректальный рак. Использование найденных критериев для скрининговой диагностики позволит врачу проявить онконастороженность и рекомендовать пациенту, при прочих сопутствующих показаниях, более направленное обследование.

Чувствительность математической модели скрининговой диагностики колоректального рака составляет 75% специфичность – 97,1%, а диагностическая точность 86,7%. Данные кроссвалидации ($R^2=0,867$, $Q^2=0,73$ - R^2 - $Q^2 < 0,2$) указывают на возможность использования диагностического коэффициента для скрининговой диагностики колоректального рака.

При уровне гемоглобина ниже 154 г/л с точностью 90,5% при чувствительности 53,8% и специфичности 100% можно предполагать колоректальный рак.

Таким образом, по результатам биохимического анализа крови при использовании диагностического коэффициента и по уровню глюкозы в сыворотке крови можно с вероятностью 86,7% и 85,7% соответственно диагностировать колоректальный рак. Использование найденных критериев для скрининговой диагностики позволит врачу проявить онконастороженность и рекомендовать пациенту, при прочих сопутствующих показаниях, более направленное обследование.

Исследование метаболома человека по показателям общего и биохимического анализа крови показывает не высокую точность, которая сопровождается или низкой чувствительностью, или низкой специфичностью. Исследование метаболома с помощью концентраций МЛК может существенно повысить качество диагностики за счет учета реакции липида на колоректальный рак.

Чувствительность математической модели по результатам биохимического анализа крови составляет 100% специфичность – 100% и диагностическая точность 100%. Данные кросс-валидации ($R^2=1$, $Q^2=1$ - R^2 - $Q^2 < 0,2$) указывают на возможность использования диагностического коэффициента для скрининговой диагностики колоректального рака.

Величина концентрации холестерина в крови равное 13,57 нмоль/г является референсным значением, для группы рак кишечника относительно группы здоровых волонтеров. Снижение концентрации ниже этого значения наблюдалось у пациентов с колоректальным раком. Точность, чувствительность и

специфичность концентрации данного биомаркера составила 70%, 62,8%, 79,5% соответственно [80].

Для исследования эффективности пробиотических препаратов в коррекции микробиоценоза кишечника необходимо определить однородность исследуемой группы по отношению к изменениям липидома. Так как концентрации липидов представляют из себя результат взаимодействия большого количества разнонаправленных процессов необходим системный подход в дифференцированности липидома в зависимости от тяжести заболеваний, то есть от стадии рака кишечника. Линейным дискриминантным анализом провели сравнение групп, сформированных в зависимости от стадии рака кишечника [80].

Исследование микробиома у пациентов с колоректальным раком показали отсутствие отличий, характеризующих ферментативное и микробное пищеварение. В бактериологическом анализе кала не выявлено закономерных особенностей, за исключением появления в посеве микроорганизмов рода *Corynebacterium*. В литературе присутствуют подтверждения культивирования нетипичной для кишечника микрофлоры, но указаний на микроорганизмы рода *Corynebacterium* не встречаются. Исследования антибиотикорезистентности не показало направленного вектора, который можно было бы связать с принадлежностью данного свойства микроорганизма к определенной группе. Таким образом подтверждается тезис о том, что колоректальный рак практически никак себя не обнаруживает, а клинические симптомы появляются на поздних стадиях заболевания при распространении метастазов.

Исследование функциональной активности микробиоценоза кишечника методами системной медицины показало наличие биомаркера колоректального рака – относительной концентрации изовалериановой кислоты. Ряд авторов связывает повышение концентрации изовалериановой кислоты с воспалительными заболеваниями кишечника, что согласуется с данными, полученными в настоящей работе. С помощью кластерного и линейного дискриминантного анализа доказана ведущая роль изовалериановой кислоты в изменениях метаболома, связанных с развитием колоректального рака, а также определена концентрация относительной

концентрации изовалериановой кислоты – 0,05 ед. превышение которой с вероятностью 86,3% указывает на развитие колоректального рака. Исследование состава крови показало, что точность реакции биохимических процессов на колоректальный рак по простым биомаркерам содержанию гемоглобина и уровню глюкозы в крови составляет 90,5% и 85,7% соответственно. Использование диагностических коэффициентов, рассчитанных линейным дискриминантным анализом, по результатам общего и биохимического анализа крови составляет 84,4% и 86,7% соответственно. Оценка реакции липидома, рассчитанного на основании концентрации МЛК существенно увеличивает точность диагностики при использовании диагностического коэффициента до 100%, а при использовании биомаркера холестерина составляет 70%.

Использование дифференциального линейного дискриминантного анализа показало, что реакция липидома для I, II, III стадии не отличается между собой, а для IV стадии колоректального рака изменения статистически значимы. Таким образом, целесообразно использовать липидомный биомаркер – концентрацию холестерина в крови для мониторинга пробиотикотерапии в периоперационном периоде.

Системный анализ показателей липидома МЛК, имеющих в том числе микробное происхождение, показал, что система липидного обмена реагирует на такой эндогенный фактор как колоректальный рак снижением концентрации холестерина в крови. Использование концентрации холестерина в крови для оценки эффективности применения пробиотиков с целью поддержания колонизационной резистентности нормальной микрофлоры кишечника оправдано для пациентов с I, II, III стадией колоректального рака, так как через 10 дней после приема препарата намечается увеличение концентрации холестерина в крови до значений, регистрируемых у здоровых волонтеров. Для пациентов с IV стадией заболевания отмечается отрицательная динамика, что может быть связано со снижением общей антиинфекционной резистентностью организма [80].

Известно, что колоректальный рак влияет на многие бактериальные метаболические пути. Активируются пути, связанные с жирными кислотами,

аминокислотами, нуклеиновыми кислотами. Снижаются интенсивность пути углеводного и энергетического метаболизма. В областях, сильно пораженных опухолью, снижается экспрессия генов выработки слизи – муцинов, что приводит к нарушению барьерной функции слизистой оболочки кишечника [124]. Дисфункция кишечника, связанная с увеличением кишечной проницаемости, приводит к бактериальной транслокации и увеличением концентрации липополисахарида в портальном и системном кровотоке [80, 281].

Изменения видового состава микробиоценоза на поздних стадиях рака кишечника, изучены на модели лабораторных генетически модифицированных мышей [124]. Отмечено увеличение количества *Megasphaera elsdenii*, что может быть связано особенностями злокачественных клеток на поздней стадии рака, выделяющих во внешнюю среду лактат, потребляемый этой бактерией. Введение *Lactobacillus rhamnosus*, потребляющей лактат в качестве субстрата, в кишечник увеличивает количество продуктов молочнокислого брожения, что в условиях повышенной проницаемости кишечника может усиливать воспалительный процесс и эндотоксемическую нагрузку [80].

Эффективность применения пробиотических препаратов на ранних стадиях колоректального рака и неэффективность на поздних стадиях, характеризующихся распространением метастазов предполагает корректировку применения пробиотиков для поддержания защитной функции микробиоценоза кишечника. Известно, что эффективность лечения значимо возрастает если колоректальный рак обнаруживается на ранних стадиях. Поэтому в схему лечения должна входить многоступенчатая система раннего обнаружения колоректального рака. Полученные выше соотношения параметров общего и/или биохимического анализа крови можно использовать для выявления людей с высокой вероятностью бессимптомного течения заболевания. При использовании данных, которые вносятся в систему базы данных медицинской организации можно автоматически отфильтровывать онкоподозрительных пациентов. Диагностические коэффициенты, можно встроить в качестве плагина в систему и ставить пометку для лечащего врача. Если пациент согласиться на целенаправленное обследование

и диагноз подтвердиться, то он будет направлен на лечение. Уточнение диагноза можно проводить неинвазивным способом – по анализу кала на содержание изовалериановой кислоты в пуле короткоцепочечных жирных кислот. Если обнаружение произойдет на ранней стадии, то прием пробиотиков будет эффективен, а если на поздней, то в качестве рекомендации можно отметить нежелательность приема пробиотических препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Определены особенности видового состава микрофлоры кишечника у пациентов с колоректальным раком, характеризующиеся присутствием в кале пациентов *Corynebacter amol* с частотой встречаемости 20%.

2. Определены интегральные критерии оценки микробиоценоза кишечника по относительной концентрации изовалериановой кислоты в кале. При концентрации более 0,05 ед. вероятность диагностирования колоректального рака составляет 70%.

3. Определена эффективность использования синбиотика Комплинекс для усиления защитной функции микрофлоры кишечника у пациентов на ранних стадиях колоректального рака и неэффективность на поздних стадиях, характеризующихся распространением метастазов.

4. Предложена схема использования синбиотика Комплинекс для пациентов на ранних стадиях колоректального рака для защиты кишечной микрофлоры при терапевтических воздействиях, связанных с лечением.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Внедрение в повседневную работу звеньев практического здравоохранения схемы ранней диагностики колоректального рака позволит значительно увеличить показатели 5-летней выживаемости пациентов с колоректальным раком за счет переноса точки выявления колоректального рака с момента инициативного обращения пациента при клинических проявлениях на момент проведения скрининговой диагностики по распространенным общему и биохимическому анализу крови.

Использование пробиотических препаратов на ранних стадиях заболевания сможет способствовать быстрейшему восстановлению микробиоценоза кишечника, что позволит снизить побочные явления от лечения основного заболевания и улучшить качество жизни пациентов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Развитие персонификации лечения и скрининговой диагностики колоректального рака может быть в увеличении объема базы данных пациентов с колоректальным раком, а также валидация математических моделей.

На основании полученных критериев есть необходимость исследования не только пробиотических препаратов, но и других средств и способов микрoэкологической коррекции микробиоценозов различных полостей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БАК – биохимический анализ крови

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КЖК – короткоцепочечные жирные кислоты

КРР – колоректальный рак

ЛДА – линейный дискриминантный анализ

МЛК – минорные липидные компоненты

ОАК – общий анализ крови

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФНО – фактор некроза опухоли

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амфифильный дериват мурамилдипептида в терапии мышинной лимфомы EL-4 / О.В. Калюжин, М.В. Нелюбов, Ф.Н. Кузовлев [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2001. – № 1. – С. 45-46.
2. Ананьев, Д. П. Пробиотически-мультивитаминный комплекс корригирует расстройства кишечной микробиоты и клеточного иммунитета у оперированных больных колоректальным раком : специальности 03.02.03. «Микробиология», 14.03.09. «Клиническая иммунология, аллергология» : диссертация ... кандидата медицинских наук / Ананьев Дмитрий Павлович; Первый московский государственный медицинский университет. им. И.М. Сеченова. – Москва, 2016. – 99 с.
3. Батура, Т. В. Методы автоматической классификации текстов / Т. В. Батура // Системы управления и информационные технологии. – 2017. – № 1. – С. 85-99.
4. Безродный, С. Л. Разработка метода микробиом-ассоциированной экспосомики для интегральной оценки нарушений липидного и углеводного обмена у лиц пожилого возраста : специальность 1.5.11. «Микробиология» : диссертация ... кандидата биологических наук / Безродный Святослав Леонидович; ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». – Электрогорск, 2022. – 150 с.
5. Белобородова, Н.В. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином / Н.В. Белобородова, Г.А. Осипов // Вестник РАМН. – 1999. – Т. 16. – № 7. – С. 25-31.
6. Биологическая химия / Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов, С.А. Силаева. – Москва : ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 364 с.

7. Бондаренко, В. М. Оценка микробиоты и пробиотических штаммов с позиций новых научных технологий / В. М. Бондаренко, О. В. Рыбальченко // Фарматека. – 2016. – № 11(324). – С. 21-33.
8. Боровиков, В. П. STATISTICA: Статистический анализ и обработка данных в среде Windows / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. – Москва: Филинь, 1997. – 608 с. – ISBN 589568033-X.
9. Варианты микрофлоры ротовой жидкости у практически здоровых детей и подростков / Б.Н. Давыдов, А.М. Самоукина, Е.С. Михайлова [и др.] // Стоматология. – 2017. – Т. 96. – № 1. – С. 56-59.
10. Влияние глимурида на продукцию цитокинов спленocyтaми мышей C57BL/6 и BALB/c / Л.П. Михайлова, О.В. Макарова, О.В. Калюжин [и др.] // Иммунология. – 2004. – Т. 25. – № 3. – С. 152-154.
11. Влияние конфигурации гликозидной связи и структуры агликона гликозидов мурамилдипептида на их способность стимулировать продукцию интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли макрофагами / О.В. Калюжин, М.В. Нелюбов, Е.В. Калюжина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134. – № 9. – С. 326-328.
12. Влияние синбиотика Комплинекс на микробный пейзаж кишечника у пациентов с колоректальным раком в преоперационный период / Н. В. Гудова, О. Г. Жиленкова, Д. С. Федоров [и др.] // Биотехнология в медицине и фармации. – 2025. – Т. 2. – № 3. – С. 102-108. – DOI: 10.51620/3034-7211-2025-2-3-102-108.
13. Возрастная динамика продукции короткоцепочечных жирных кислот микробиотой ротоглотки у пациентов, не имеющих заболеваний респираторного тракта и ротовой полости / А.М. Затевалов, Е.П. Селькова, Н.В. Гудова, А.С. Оганесян // Альманах клинической медицины. – 2018. – Т. 46. – № 8. – С. 784-791.
14. Гаус, О. В. Факторы риска развития СРК: что необходимо учитывать? / О. В. Гаус, М.А. Ливзан, Д.А. Гавриленко // Терапевтический архив. – 2024. – № 2. – С. 159-167.
15. Гликозиды N-ацетилмурамоил-L-аланил-Дизоглутaмина. Влияние конфигурации гликозидного центра и природы агликона на биологическую

активность / А.Е. Земляков, В.В. Цикалов, О.В. Калюжин [и др.] // Биоорганическая химия. – 2003. – Т. 29. – № 3. – С. 316-322.

16. Гудова, Н. В. Изучение микробиоценоза ротоглотки у детей методом микробиом-ассоциированной метаболомики : специальность 1.5.11. «Микробиология» : диссертация ... кандидата биологических наук / Гудова Наталия Владимировна; ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва, 2022. – 147 с.

17. Действие гликозидов мурамилдипептида на пролиферацию лимфоцитов и выработку ими интерлейкина-2 / О.В. Калюжин, А.Е. Земляков, Е.В. Калюжина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134. – № 8. – С. 186-190.

18. Дискриминантный анализ в установлении взаимозависимости патогенетических механизмов развития гестационных осложнений при урогенитальной инфекции беременных / А.В. Караулов, С.С. Афанасьев, А.М. Затевалов [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65. – № 7. – С. 443-453.

19. Егоренков, В.В. Профилактика рака желудка и толстой кишки / В.В. Егоренков // Практическая онкология. – 2011. – Т. 12. – № 2. – С. 70-75.

20. Затевалов, А. М. Интегральная оценка состояния микробиоценозов биотопов желудочно-кишечного тракта и методы коррекции их нарушений : специальности 03.01.06 «Биотехнология», 03.02.03 «Микробиология» : диссертация ... доктора биологических наук / Затевалов Александр Михайлович; ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва, 2016. – 217 с.

21. Исследование кала на скрытую кровь в программах скрининга колоректального рака / Н.В. Северская, А.А. Невольских, В.А. Авдеенко [и др.] // Research'n Practical Medicine Journal. – 2022. – № 3. – С. 145-195.

22. Кайдарова, Д. Р. Анализ степени распространенности, локализации и глубины поражения колоректального рака / Д. Р. Кайдарова, Э. К. Макимбетов, К. К. Смагулова // Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – № 8. – С. 61-65.
23. Калюжин, О.В. Безопасность и физиологичность действия пробиотиков как средств иммунокоррекции / О.В. Калюжин // Российский аллергологический журнал. – 2013. – № 3. – С. 45-56.
24. Калюжин, О.В. Возможности использования пробиотиков для укрепления противoinфекционной защиты в свете иммуногомеостатической роли микробиоты / О.В. Калюжин // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – № 27-2. – С. 12-25.
25. Калюжин, О.В. Пробиотики как современные средства укрепления противoinфекционной иммунной защиты: миф или реальность? / О.В. Калюжин // Русский Медицинский Журнал. – 2012. – Т. 20. – № 28. – С. 1395-1401.
26. Калюжин, О.В. Производные мурамилдипептида в эксперименте и клинике / О.В. Калюжин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1998. – № 1. – С. 104-108.
27. Караулов, А.В. Иммунотерапия инфекционных болезней: проблемы и перспективы / А.В. Караулов, О.В. Калюжин // Терапевтический архив. – 2013. – Т. 85. – № 11. – С. 100-108.
28. Кириченко, А. А. Дисбактериозы в клинике внутренних болезней : учебное пособие / А. А. Кириченко. – Москва, 1993. – 61 с.
29. Кишечная микробиота: современные представления о видовом составе, функциях и методах исследования / А.А. Кожевников, К.В. Раскина, Е.Ю. Мартынова [и др.] // РМЖ. – 2017. – № 17. – С. 1244-1247.
30. Кляритская, И. Л. Колоректальный рак / И. Л. Кляритская, М. Г. Курченко // Крымский терапевтический журнал. – 2005. – № 2. – С. 15-19.
31. Козлов, И.Г. Лекарственные воздействия через рецепторы врожденного иммунитета / И.Г. Козлов, Т.М. Андропова // Аллергология и иммунология. – 2013. – Т. 14. – № 4. – С. 254-259.

32. Критерии метаэкспосомной оценки бактериального вагиноза у пациенток амбулаторного приёма / Э.Р. Мехтиев, Н.В. Радугина, А.М. Затевалов, Д.С. Федоров [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2024. – Т. 69. – № 11. – С. 627-636.
33. Максимова, О.В. Микробиота кишечника и аллергические заболевания / О.В. Максимова, В.Б. Гервазиева, В.В. Зверев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 3. – С. 49-60.
34. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / под редакцией Н.В. Трухачевой. – Москва : ГЭОТАР- Медиа, 2013. – 384 с.
35. Методические указания по паразитологическим методам лабораторной диагностики (МУК 4.2.735–99). – Москва : Роспотребнадзор, 1999. – 72 с.
36. Микробиом-ассоциированная метаболомика в клинической лабораторной диагностике тонзиллита / Е.Б. Мануйлова, Т.Ш. Садеков, Э.Р.О. Мехтиев [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2023. – Т. 68. – № 9. – С. 553-558.
37. Микробиота пищеварительного тракта как системный фактор оценки здоровья человека и проведения превентивной коррекции / А.М. Самоукина, Е.С. Михайлова, В.В. Чернин, Ю.А. Алексеева // Лечение и профилактика. – 2015. – Т. 3. – № 15. – С. 23-28.
38. Микробиоценозы и здоровье человека / В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев, А. В. Караулов [и др.]. – Москва : ООО «Издательство «Династия», 2015. – 548 с. – ISBN 978-5-98125-099-6.
39. Микроэкология и гуморальный иммунитет слизистых открытых полостей человека в норме и при патологических состояниях: учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / В.В. Зверев, Ю.В. Несвижский, Е.А. Воропаева [и др.]. – Астрахань-Москва, 2011. – 80 с.
40. Министерство здравоохранения СССР. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в

клинических лабораториях лечебно-профилактических учреждений : приказ № 535 от 22 апреля 1985 г. – Москва: Министерство здравоохранения СССР, 1985. – 25 с.

41. Митрохин, С.Д. Инфекции в онкологической клинике: актуальность, диагностика, профилактика и лечение / С.Д. Митрохин // Фарматека. – 2003. – № 13. – С. 26-33.

42. Митрохин, С.Д. Метоболиты нормальной микрофлоры человека в экспресс-диагностике и контроле лечения дисбактериоза толстой кишки : специальность 03.02.03. «Микробиология» : автореферат диссертации... доктора медицинских наук / Митрохин Сергей Дмитриевич ; Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова – Москва, 1998. – 37 с.

43. Назаренко, Ю.Л. Обзор технологии «большие данные» (Big Data) и программно-аппаратных средств, применяемых для их анализа и обработки / Ю.Л. Назаренко // European science. – 2017. – Т. 9. – № 31. – С. 25-30.

44. Новая медицинская технология. МЗ РФ № НЮ-40006, 17.08.2009. Оценка микроэкологического статуса человека методом хроматомасс-спектрометрии / В.М. Баранов, Г.А. Осипов, Л.Н. Мухамедиева [и др.].

45. Новиков, Д.А. Статистические методы : учебное пособие / Д.А. Новиков, В.В. Новочадов. – Москва : Олимп-Бизнес, 2005. – 544 с. – ISBN 5-9707-0151-6.

46. Определение критической для функциональной активности нормальной микрофлоры кишечника и ротоглотки величины концентрации масляной кислоты в кале пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, находящихся на зондовом питании / А.М. Затевалов, В.А. Алёшкин, Е.П. Селькова, Т.А. Гренкова // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2017. – Т. 2. – № 1. – С. 14-22.

47. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. / Пер. с англ.; под ред. Дж. Холта. – 9-е изд., испр. – Москва : Мир, 1997. – Т. 1-2. – ISBN 5-03-002382-5.

48. Оценка состояния микробиома у лиц пожилого возраста с нарушениями углеводного и липидного обмена методом микробиом-ассоциированной экспосомики / С.Л. Безродный, С.Г. Марданлы, А.М. Затевалов

[и др.] // Независимые микробиологические исследования. – 2022. – Т. 9. – № 1. – С. 9-17.

49. Оценка степени микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки и кишечника с помощью методов математического моделирования / А.М. Затевалов, Е.П. Селькова, С.С. Афанасьев [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61. – № 2. – С. 117-121.

50. Пальцев, М.А. 4П-медицина как новая модель здравоохранения в Российской Федерации / М.А. Пальцев, Н.Н. Белушкина, Е.А. Чабан // ОРГЗДРАВ: Новости. Мнения. Обучение. Вестник ВШОУЗ. – 2015. – Т.2. – № 2. – С. 48-54.

51. Патент на изобретение № 2608548 С1 Российская Федерация. Способ дифференциальной диагностики острого бронхита и острой пневмонии: № 2015149003 заявл. 16.11.2015 : опубл. 19.01.2017 / Затевалов А.М., Селькова Е.П., Мескина Е.Р. [и др.].

52. Патент на изобретение № 2741508 С1 Российская Федерация. Способ диагностики респираторной вирусной инфекции у детей : № 2020120459 : заявл. 19.06.2020 : опубл. 26.01.2021 / Н.В. Гудова, Е.П. Селькова, А.М. Затевалов [и др.].

53. Патент на изобретение № 2741709 С1 Российская Федерация. Способ оценки состояния дисбиоза ротоглотки у детей : № 2020120457 : заявл. 19.06.2020 : опубл. 28.01.2021 / Н.В. Гудова, Е.П. Селькова, А.М. Затевалов [и др.].

54. Патент на изобретение № 2742756 С1 Российская Федерация. Способ прогнозирования повторных респираторных инфекций у детей : № 2020120455 : заявл. 19.06.2020 : опубл. 10.02.2021 / Н.В. Гудова, Е.П. Селькова, А.М. Затевалов [и др.].

55. Полипы толстой кишки: эпидемиология, факторы риска, критерии диагностики, тактики ведения / Е. А. Лаптева, И. В. Козлова, Ю. Н. Мялина, А. Л. Пахомова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 252-259.

56. Полный клинический ответ рака прямой кишки на химиолучевое лечение: тактика / О. И. Кит, Ю. А. Геворкян, Н. В. Солдаткина [и др.] // Вопросы онкологии. – 2017. – № 6. – С. 838-842.

57. Помазанов, В.В. Микроэкологический статус человека и его определение / В.В. Помазанов // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации : сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Орехово-Зуево : Государственный гуманитарно-технологический университет, 2019. – С. 167-184.

58. Предиктивная диагностика сахарного диабета 2 типа и сочетанной дислипидемии по анализу экспосом человека : учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / С.Л. Безродный, С.Г. Марданлы, А.М. Затевалов [и др.]. – Орехово-Зуево : ГГТУ, 2021. – 40 с.

59. Предиктивная диагностика сахарного диабета 2 типа и сочетанной дислипидемии по анализу экспосом человека : учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей (2-е издание, переработанное и дополненное) / С.Л. Безродный, С.Г. Марданлы, А.М. Затевалов [и др.]. – Орехово-Зуево, 2022. – 38с.

60. Применение β -гептилгликозидмурамилдипептида в экспериментальной терапии генерализованных бактериальных инфекций / О.В. Калюжин, Е.Л. Мулик, В.В. Сергеев [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2000. – № 4. – С. 73-77.

61. Результаты хирургического лечения колоректального рака / Ш.О. Дарбишгаджиев, А.А. Баулин, Ю.И. Зимин [и др.] // Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – № 4. – С. 42-46.

62. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023663960. Скрининг респираторных инфекций: № 2023662554: заявл. 15.06.2023: опубл. 28.06.2023 / Мануйлова Е.Б., Затевалов А.М., Самойлова М.В., Миронов А.Ю., Гудова Н.В.

63. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2024617289 Российская Федерация. Метаэкспосом «Онко-скрин» : № 2024616014 : заявл. 25.03.2024 : опубл. 01.04.2024 / Федоров Д.С., Затевалов А.М., Митрохин С.Д. [и др.].

64. Скрининговая диагностика заболеваний желудочно-кишечного тракта методом метаэкспозиции / А.М. Затевалов, О.Г. Жиленкова, Н.И. Леонтьева, Д.С. Федоров // Вопросы питания. – 2024. – Т. 93. – № 3(553). – С. 77.
65. Скрининговая диагностика рака кишечника по результатам метаэкспозиционного исследования / Д.С. Федоров, О.В. Калюжин, С.С. Афанасьев [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2024. – Т. 29. – № 1. – С. 58-64.
66. Смирнова, Г.И. Эффективное лечение атопического дерматита у детей / Г.И. Смирнова // Российский педиатрический журнал. – 2012. – № 5. – С. 27-34.
67. Стимуляция резистентности мышей к бактериальной инфекции гликозидами мурамилдипептида / О.В. Калюжин, Н.Г. Калина, А.Ф. Баштаненко [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135. – № 5. – С. 531-535.
68. Структура микробиом-ассоциированного экспозома при рассеянном склерозе, раке кишечника, сахарном диабете 2 типа и дислипидемиях / Т.Ш. Садеков, А.М. Затевалов, О.Г. Жиленкова, Д.С. Фёдоров [и др.] // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. – 2022. – № 3. – С. 20-28.
69. Теория и практика машинного обучения : учебное пособие / В. В. Воронина, А. В. Михеев, Н. Г. Ярушкина, К. В. Святков. – Ульяновск : УлГТУ, 2017. – 290 с. – ISBN 978-5-9795-1712-4.
70. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор): Лабораторная диагностика гельминтозов и протозоозов: Методические указания (МУК 4.2.3145–13). – Москва: Роспотребнадзор, 2013. – 72 с.
71. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор): Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания (МУК 4.2.2316-08 утверждены 18.01.2008). – Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.
72. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор): Методы санитарно-

бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях: Методические указания (МУК 4.2.2942-11 утверждены 15.07.2011). – Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 12 с. – ISBN 978-5-7508-1028-4.

73. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор): Определение массовых концентраций летучих жирных кислот (уксусная, пропионовая, изо-масляная, масляная, валериановая, изо-капроновая, капроновая) в биосредах (кровь) газохроматографическим методом : Методические указания (МУК 4.1.2773-10 утверждены 22 ноября 2010). – Москва: ФГУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора, 2010. – 36 с. – ISBN 978-5-7508-0893-9.

74. Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53079.4-2008: Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа. – Москва, 2008. – 69 с.

75. Цивенко, А.И. Современное лечение колоректального рака / А.И. Цивенко, М.С. Томин // Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия Медицина. – 2004. – №7 (614). – С. 103-106.

76. Чикилева, И.О. Современные подходы и направления в иммунотерапии и иммунопрофилактике злокачественных новообразований / И.О. Чикилева, Е.О. Халтурина, М.В. Киселевский // Молекулярная медицина. – 2003. – № 2. – С. 40-47.

77. Шендеров, Б.А. Микробная экология человека и ее роль в поддержании здоровья / Б.А. Шендеров // Метаморфозы. – 2014. – № 5. – С. 72-80.

78. Шендеров, Б.А. ОМИК-технологии и их значение в современной профилактической и восстановительной медицине / Б.А. Шендеров // Вестник восстановительной медицины. – 2012. – № 3 (49). – С. 70-78.

79. Шиловский, Г.А. Оценка метаболома человека как метод молекулярной диагностики колоректального рака. Профилактика и терапия. / Г.А.

Шиловский, Е.В. Сорокина, Т.С. Пуяткина // Успехи современной биологии. – 2022. – Т. 142. – № 2. – С. 199-205.

80. Эффективность применения пробиотиков у пациентов с колоректальным раком на разных стадиях заболевания / Д. С. Федоров, С. Д. Митрохин, Н. В. Радугина [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2024. – Т. 29. – № 4. – С. 228-235. – DOI: 10.51620/3034-1981-2024-29-4-228-235.

81. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin, R. Li, J. Raes [et al.] // Nature. – 2010. – Vol. 4. – № 464 (7285). – P. 59-65.

82. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis / T. Sawicki, M. Ruszkowska, A. Danielewicz [et al.] // Cancers (Basel). – 2021. – Vol. 13(9). – P. 2025.

83. A Review on Emerging Techniques for Diagnosis of Colorectal Cancer. / S. Nagainallur Ravichandran, D. Das, E.K. Dayananda [et al.] // Cancer Invest. – 2024. – Vol. 42(2). – P. 119-140.

84. A large candidate-gene association study suggests genetic variants at IRF5 and PRDM1 to be associated with aggressive periodontitis / A.S. Schaefer, A. Jochens, H. Dommisch [et al.] // J Clin Periodontol. – 2014. – Vol. 41. – P. 1122-1131.

85. Activation of Gpr109a, Receptor for Niacin and the Commensal Metabolite Butyrate, Suppresses Colonic Inflammation and Carcinogenesis / N. Singh, A. Gurav, S. Sivaprakasam [et al.] // Immunity. – 2014. – Vol. 40. – P. 128-139. – DOI: 10.1016/j.immuni.2013.12.007.

86. Aebersold, R. Quantitative Proteome Analysis: Methods and Applications / R. Aebersold, B. Rist, S. P. Gygi // The Journal of Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 187, Suppl. 2. – P. S315-S320. – DOI: 10.1086/374756.

87. Altered oral viral ecology in association with periodontal disease / M. Ly, S.R. Abeles, T.K. Boehm [et al.] // MBio. – 2014. – Vol. 5. – № 3. – P. 1133-1114. – DOI: 10.1128/mBio.01133-14.

88. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system / S.K. Mazmanian, C. Lui, A.O. Tzianaboz, D.L. Kasper // *Cell*. – 2005. – Vol. 122. – P. 107-118.
89. An Obesity-Associated Gut Microbiome Reprograms the Intestinal Epigenome and Leads to Altered Colonic Gene Expression / Y. Qin, J.D. Roberts, S.A. Grimm [et al.] // *Genome Biol.* – 2018. – Vol. 19. – P. 7. – DOI: 10.1186/s13059-018-1389-1.
90. Arikan, M. Integrated multi-omics analyses of microbial communities: a review of the current state and future directions / M. Arikan, T. Muth // *Mol. Omics*. – 2023. – Vol. 19. – № 8. – P. 607-623.
91. Assessment of prognostic factors after primary tumor resection in metastatic colon cancer patients: a Veteran's Affairs Central Cancer Registry (VACCR) analysis, 1995-2008 / W.I. Gonsalves, J. Wolpert, T. Tashi [et al.] // *J Surg Oncol.* – 2012. – Vol. 106. – № 4. – P. 486-490.
92. Association of glycemic index and glycemic load with risk of incident coronary heart disease among Whites and African Americans with and without type 2 diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities Study / D.S. Hardy, D.M. Hoelscher, C. Aragaki [et al.] // *Annals of Epidemiology*. – 2010. – Vol. 20. – № 8. – P. 610-616.
93. Association of Omics Features with Histopathology Patterns in Lung Adenocarcinoma / K. Yu, G. Berry, D. Rubin [et al.] // *Cell Systems*. – 2017. – Vol. 5. – P. 620-627.
94. B Cell-Intrinsic Epigenetic Modulation of Antibody Responses by Dietary Fiber-Derived Short-Chain Fatty Acids / H.N. Sanchez, J.B. Moroney, H. Gan [et al.] // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – P. 60. – DOI: 10.1038/s41467-019-13603-6.
95. Bacterial translocation may influence the long-term survival in colorectal cancer patients / K.F. Chin, R. Kallam, C. O'Boyle, J. MacFie // *Dis. Colon Rectum*. – 2007. – Vol. 50. – № 3. – P. 323-330.
96. Bady, P. Sensitivity Analysis of the MGMT-STP27 Model and Impact of Genetic and Epigenetic Context to Predict the MGMT Methylation Status in Gliomas and

Other Tumors / P. Bady, M. Delorenzi, M. Hegi // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2016. – Vol. 18. – № 3. – P. 350-361.

97. Beier, B.D. Raman microspectroscopy for species identification and mapping within bacterial biofilms / B.D. Beier, R.G. Quivey, A.J. Berger // *AMB Express*. – 2012. – Vol. 2. – P. 35.

98. Beld, J. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering / J. Beld, D.J. Lee, M.D. Burkart // *Molecular BioSystems*. – 2015. – Vol. 11. – № 1. – P. 38-59.

99. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens / P. Micke, M. Ohshima, S. Tahmasebpour [et al.] // *Lab Invest*. – 2006. – Vol. 86. – № 2. – P. 202-211. – DOI: 10.1038/labinvest.3700372.

100. Bioinformatics for precision medicine in oncology: principles and application to the SHIVA clinical trial / N. Servant, J. Roméjon, P. Gestraud [et al.] // *Front Genet*. – 2014. – Vol. 5. – P. 152. – DOI: 10.3389/fgene.2014.00152.

101. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria / I.F. Nes, D.B. Diep, L.S. Håvarstein [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 1996. – Vol. 70 (2-4). – P. 113-128.

102. Blakeley-Ruiz, J.A. Considerations for constructing a protein sequence database for metaproteomics / J.A. Blakeley-Ruiz, M. Kleiner // *Comput Struct Biotechnol J*. – 2022. – Vol. 21. – № 20. – P. 937-952. – DOI: 10.1016/j.csbj.2022.01.018.

103. Bultman, S.J. Emerging roles of the microbiome in cancer / S.J. Bultman // *Carcinogenesis* – 2014. – Vol. 35 – P. 249-255.

104. Butyrate Conditions Human Dendritic Cells to Prime Type 1 Regulatory T Cells via Both Histone Deacetylase Inhibition and G Protein-Coupled Receptor 109A Signaling / M.M.M. Kaisar, L.R. Pelgrom, A.J. van der Ham [et al.] // *Front. Immunol*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1429. – DOI: 10.3389/fimmu.2017.01429.

105. Cancer statistics, 2014 / R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, A. Jemal // *CA Cancer J Clin*. – 2014. – Vol. 64(1). – P. 9-29.

106. Casadesús, J. Epigenetic gene regulation in the bacterial world / J. Casadesús, D. Low // *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. – 2006. – Vol. 70. – № 3. – P. 830-856.

107. Clinical and Molecular Characteristics of Rare Malignant Tumors of Colon and Rectum / A. Ottaiano, M. Santorsola, F. Perri [et al.] // *Biology (Basel)*. – 2022. – Vol. 11(2). – P. 267.
108. Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects / A. Tanner, R. Kent, M.F.J. Maiden, M.A. Taubman // *J Periodontal Res.* – 1996. – Vol. 31. – P. 195-204.
109. Colonic Microbiota Is Associated with Inflammation and Host Epigenomic Alterations in Inflammatory Bowel Disease / F.J. Ryan, A.M. Ahern, R.S. Fitzgerald [et al.] // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1512. – DOI: 10.1038/s41467-020-15342-5.
110. Colorectal Cancer-Associated Microbiota Contributes to Oncogenic Epigenetic Signatures / I. Sobhani, E. Bergsten, S. Couffin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2019. – Vol. 116. – P. 24285-24295. – DOI: 10.1073/pnas.1912129116.
111. Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress / M. Zavoral, S. Suchanek, O. Majek [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 14. – P. 3825-3834.
112. Commensal Microbe-Derived Butyrate Induces the Differentiation of Colonic Regulatory T Cells / Y. Furusawa, Y. Obata, S. Fukuda [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 504. – P. 446-450. – DOI: 10.1038/nature12721.
113. Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues / Y.H. Lee, H.S. Na, S.Y. Jeong [et al.] // *Biocell*. – 2011. – Vol. 35. – P. 43-49.
114. Confocal Raman microscopy to identify bacteria in oral subgingival biofilm models / L.S. Kriem, K. Wright, R.A. Ccahuana-Vasquez, S. Rupp // *PLoS ONE*. – 2020. – Vol. 15. – № 5. – P. e0232912. – DOI: 10.1371/journal.pone.0232912.
115. Correction of disturbances of the microbiocenosis of the gastrointestinal tract in children with acute lymphoblastic leukemia during the period of dispensary observation / A.V. Aleshkin, G.YA. Cejtlin, A.M. Zatevalov [et al.] // *Astraxanskij medicinskij zhurnal*. – 2010. – Vol. 5. – № 4. – P. 79-83. (in Russian)

116. Database resources of the National Center for Biotechnology Information / A. Acland, R. Agarwala, T. Barrett [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. – P. 7-17.
117. Defining the healthy «core microbiome» of oral microbial communities / E. Zaura, B.J.F. Keijser, S.M. Huse, W. Crielaard // *BMC Microbiol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 259. – DOI: 10.1186/1471-2180-9-259.
118. Definition of large bowel obstruction by primary colorectal cancer: A systematic review / J.V. Veld, K.J. Beek, E.C.J. Consten [et al.] // *Colorectal Dis.* – 2021. – Vol. 23(4). – P. 787-804.
119. Did omics change periodontal therapy? / M. Feres, B. Retamal-Valdes, C. Goncalves [et al.] // *Periodontol 2000.* – 2021. – Vol. 85. – P. 182-209. – DOI: 10.1111/prd.12358.
120. Diet-Microbiota Interactions Mediate Global Epigenetic Programming in Multiple Host Tissues / K.A. Krautkramer, J.H. Kreznar, K.A. Romano [et al.] // *Mol. Cell.* – 2016. – Vol. 64. – P. 982-992. – DOI: 10.1016/j.molcel.2016.10.025.
121. Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c- Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8+ T Cell Metabolism / A. Trompette, E.S. Gollwitzer, C. Pattaroni [et al.] // *Immunity.* – 2018. – Vol. 48. – P. 992-1005.e8. – DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.022.
122. Differences in microbial signatures between rectal mucosal biopsies and rectal swabs / F. Araújo-Pérez, A.N. McCoy, C. Okechukwu [et al.] // *Gut Microbes.* – 2012. – Vol. 3. – № 6. – P. 530-535.
123. Disruption of Epithelial HDAC3 in Intestine Prevents Diet-Induced Obesity in Mice / J. Whitt, V. Woo, P. Lee [et al.] // *Gastroenterology.* – 2018. – Vol. 155. – P. 501-513. – DOI: 10.1053/j.gastro.2018.04.017.
124. Disruption of the intestinal clock drives dysbiosis and impaired barrier function in colorectal cancer / R.C. Fellows, S.K. Chun, N. Larson [et al.] // *Sci Adv.* – 2024. – Vol. 10. – № 39. – P. eado1458.

125. Distinct Roles for Intestinal Epithelial Cell-Specific Hdac1 and Hdac2 in the Regulation of Murine Intestinal Homeostasis / A. Gonneaud, N. Turgeon, F. Boudreau [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2016. – Vol. 231. – P. 436-448. – DOI: 10.1002/jcp.25090.
126. Doroshov, D.B. BET inhibitors: a novel epigenetic approach / D.B. Doroshov, J.P. Eder, P.M. LoRusso // *Annals of Oncology.* – 2017. – Vol. 28. – № 8. – P. 1776-1787. – DOI: 10.1093/annonc/mdx157.
127. Drug rechallenge and treatment beyond progression—implications for drug resistance / E.A. Kuczynski, D.J. Sargent, A. Grothey, R.S. Kerbel // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2013. – Vol. 10. – P. 571-587. – DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.158.
128. Eaden, Ja. A. The Risk of Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis: A Meta-Analysis / Ja.A. Eaden, K. R. Abrams, J. F. Mayberry // *Gut.* – 2001. – Vol. 48. – № 4. – P. 526-535. – DOI: 10.1136/gut.48.4.526.
129. Early Microbial Colonization Affects DNA Methylation of Genes Related to Intestinal Immunity and Metabolism in Preterm Pigs / X. Pan, D. Gong, D.N. Nguyen [et al.] // *DNA Res.* – 2018. – Vol. 25. – P. 287-296. – DOI: 10.1093/dnares/dsy001.
130. Eckburg, P.B. Diversity of the human intestinal microbial flora / P.B. Eckburg // *Science.* – 2005. – Vol. 30(8). – P. 1635-1638.
131. Effects of prebiotic-containing infant formula on gastrointestinal tolerance and fecal microbiota in a randomized controlled trial / H.D. Holscher, K.L. Faust, L.A. Czerkies [et al.] // *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* – 2012. – Vol. 36. – P. 95S-105S.
132. Epigenetic change in E-cadherin and COX-2 to predict chronic periodontitis / W.T. Loo, L. Jin, M.N. Cheung [et al.] // *J Transl Med.* – 2010. – Vol. 8. – P. 110.
133. Epigenetic Metabolite Acetate Inhibits Class I/II Histone Deacetylases, Promotes Histone Acetylation, and Increases HIV-1 Integration in CD4⁺ T Cells / J.-F. Bolduc, L. Hany, C. Barat [et al.] // *J. Virol.* – 2017. – Vol. 91. – P. e01943-16. – DOI: 10.1128/JVI.01943-16.
134. Epigenetic Regulation of TLR4 Gene Expression in Intestinal Epithelial Cells for the Maintenance of Intestinal Homeostasis / K. Takahashi, Y. Sugi, A. Hosono, S. Kaminogawa // *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* – 2009. – Vol. 183. – P. 6522-6529. – DOI: 10.4049/jimmunol.0901271.

135. Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease / S. Zhang, S.P. Barros, A.J. Moretti [et al.] // *J Periodontol.* – 2013. – Vol. 84. – P. 1606-1616.
136. Epigenome-Microbiome Crosstalk: A Potential New Paradigm Influencing Neonatal Susceptibility to Disease / R. Cortese, L. Lu, Y. Yu [et al.] // *Epigenetics.* – 2016. – Vol. 11. – P. 205-215. – DOI: 10.1080/15592294.2016.1155011.
137. Epithelial Histone Deacetylase 3 Instructs Intestinal Immunity by Coordinating Local Lymphocyte Activation / N. Navabi, J. Whitt, S.-E. Wu [et al.] // *Cell Rep.* – 2017. – Vol. 19. – P. 1165-1175. – DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.046.
138. Etchegaray, J.-P. Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes / J.-P. Etchegaray, R. Mostoslavsk // *Mol. Cell.* – 2016. – Vol. 62. – P. 695-711. – DOI: 10.1016/j.molcel.2016.05.029.
139. Evaluation of bacterial presence in the root canal by Raman spectroscopy: a preliminary study / E. Cepeda-Pérez, C. Moreno-Hernández, T. López-Luke [et al.] // *Biomed Phys Eng Express.* – 2016. – Vol. 2. – P. 065006.
140. Exposure to the Gut Microbiota Drives Distinct Methylome and Transcriptome Changes in Intestinal Epithelial Cells during Postnatal Development / W.-H. Pan, F. Sommer, M. Falk-Paulsen [et al.] // *Genome Med.* – 2018. – Vol. 10. – P. 27. – DOI: 10.1186/s13073-018-0534-5.
141. Factors associated with septic shock and mortality in generalized peritonitis : compaarison between community-acquired and posoperative peritonitis / F.C. Riche, X. Dray, M.-J. Laisne [et al.] // *Critical Care.* – 2009. – Vol. 13. – P. 99.
142. Faecalibacterium Prausnitzii Produces Butyrate to Decrease C-Myc-Related Metabolism and Th17 Differentiation by Inhibiting Histone Deacetylase 3 / M. Zhang, L. Zhou, Y. Wang [et al.] // *Int. Immunol.* – 2019. – Vol. 31. – P. 499-514. – DOI: 10.1093/intimm/dxz022.
143. Faecalibacterium Prausnitzii Produces Butyrate to Maintain Th17/Treg Balance and to Ameliorate Colorectal Colitis by Inhibiting Histone Deacetylase 1 / L. Zhou, M. Zhang, Y. Wang [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2018. – Vol. 24. – P. 1926-1940. – DOI:10.1093/ibd/izy182.

144. Fitzgerald, K.A. NLR-containing inflammasomes: Central mediators of host defense and inflammation / K.A. Fitzgerald // *European Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 40. – № 3. – P. 595-598.
145. Flavin containing monooxygenase 3 exerts broad effects on glucose and lipid metabolism and atherosclerosis / D.M. Shih, Z. Wang, R. Lee [et al.] // *Journal of Lipid Research*. – 2015. – Vol. 56. – P. 22-37.
146. FOXP3⁺ Regulatory T Cell Development and Function Require Histone/Protein Deacetylase 3 / L. Wang, Y. Liu, R. Han [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2015. – Vol. 125. – P. 1111-1123. – DOI: 10.1172/JCI77088.
147. Functions and Mechanisms of Lysine Crotonylation / J. Wan, H. Liu, J. Chu, H. Zhang // *J. Cell. Mol. Med.* – 2019. – Vol. 23. – P. 7163-7169. – DOI: 10.1111/jcmm.14650.
148. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma / M. Castellarin, R. L. Warren, J. D. Freeman [et al.] // *Genome Res.* – 2012. – Vol. 22. – № 2. – P. 299-306.
149. Gawad, C. Single-cell genome sequencing: current state of the science / C. Gawad, W. Koh, S.R. Quake // *Nature reviews. Genetics*. – 2016. – Vol. 17. – № 3. – P. 175-188. – DOI: 10.1038/nrg.2015.16.
150. Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions / M.J. Belmar, C. Pabst, B. Martínez, M. Hernández // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* – 2008. – Vol. 105. – P. 801-806.
151. Genes Controlling the Activation of Natural Killer Lymphocytes Are Epigenetically Remodeled in Intestinal Cells from Germ-Free Mice / A. Poupeau, C. Garde, K. Sulek [et al.] // *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* – 2019. – Vol. 33. – P. 2719-2731. – DOI: 10.1096/fj.201800787R.
152. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma / A.D. Kostic, D. Gevers, C. S. Pédamallu [et al.] // *Genome Res.* – 2012. – Vol. 22. – № 2. – P. 292-298.

153. Giraudeau, P. Challenges and perspectives in quantitative NMR / P. Giraudeau // *Magn Reson Chem.* – 2017. – Vol. 55. – № 1. – P. 61-69. – DOI: 10.1002/mrc.4475.
154. Glucocorticoids promote breast cancer metastasis / M.M.S. Obradovic, B. Hamelin, N. Manevski [et al.] // *Nature.* – 2019. – Vol. 567. – P. 540-544. – DOI: 10.1038/s41586-019-1019-4.
155. Gollwitzer, E.S. Impact of Early-Life Exposures on Immune Maturation and Susceptibility to Disease / E.S. Gollwitzer, B.J. Marsland // *Trends Immunol.* – 2015. – Vol. 36. – P. 684-696. – DOI:10.1016/j.it.2015.09.009.
156. Griffin, J.L. Metabolomics as a functional genomic tool for understanding lipid dysfunction in diabetes, obesity and related disorders / J.L. Griffin, A.W. Nicholls // *Pharmacogenomics.* – 2006. – Vol. 7. – № 7. – P. 1095-1107.
157. Grim, C.M. Staring into the void: demystifying microbial metabolomics / C.M. Grim, G.T. Luu, L.M. Sanchez // *FEMS Microbiol Lett.* – 2019. – Vol. 366(11). – P. fnz135. – DOI: 10.1093/femsle/fnz135.
158. Guiot, H.F. Role of competition for substrate in bacterial antagonism in the gut / H.F. Guiot // *Infect. Immun.* – 1982. – Vol. 38 (3). – P. 887-892.
159. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses / M. Kim, Y. Qie, J. Park, C.H. Kim // *Cell Host Microbe.* – 2016. – Vol. 20. – P. 202-214. – DOI: 10.1016/j.chom.2016.07.001.
160. Gut Microbiome Communication with Bone Marrow Regulates Susceptibility to Amebiasis / S.L. Burgess, J.L. Leslie, J. Uddin Sasso [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2020. – Vol. 130. – P. 4019-4024. – DOI: 10.1172/JCI133605.
161. Gut Microbiota Composition Is Associated With the Global DNA Methylation Pattern in Obesity / B. Ramos-Molina, L. Sánchez-Alcoholado, A. Cabrera-Mulero [et al.] // *Front. Genet.* – 2019. – Vol. 10. – P. 613. – DOI: 10.3389/fgene.2019.00613.
162. Gut microbiota interactions with antitumor immunity in colorectal cancer: From understanding to application / Y.P. Zhuang, H.L. Zhou, H.B. Chen [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2023. – Vol. 165. – P. 115040.

163. Gut microbiota, probiotics and diabetes / A.C. Gomes, A.A. Bueno, R.G. Machado de Souza, J.F. Mota // *Nutr. J.* – 2014. – Vol. 13. – P. 60.
164. HDAC1 and HDAC2 Collectively Regulate Intestinal Stem Cell Homeostasis. FASEB / C.D. Zimmerlin, C. Lancini, R. Sno [et al.] // *J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* – 2015. – Vol. 29. – P. 2070-2080. – DOI: 10.1096/fj.14-257931.
165. Histone Deacetylase 3 Coordinates Commensal-Bacteria-Dependent Intestinal Homeostasis / T. Alenghat, L.C. Osborne, S.A. Saenz [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 504. – P. 153-157. – DOI: 10.1038/nature12687.
166. Histone Deacetylases 6 and 9 and Sirtuin-1 Control Foxp3+ Regulatory T Cell Function through Shared and Isoform-Specific Mechanisms / U.H. Beier, L. Wang, R. Han [et al.] // *Sci. Signal.* – 2012. – Vol. 5. – P. 45. – DOI: 10.1126/scisignal.2002873.
167. Hospital volume and surgical outcomes for elderly patients with colorectal cancer in the United States / J.B. Dimick, J.A. Cowan Jr., G.R. Upchurch Jr., L.M. Colletti // *J. Surg. Res.* – 2003. – Vol. 114. – № 1. – P. 50-56.
168. How Colonization by Microbiota in Early Life Shapes the Immune System / T. Gensollen, S.S. Iyer, D.L. Kasper, R.S. Blumberg // *Science*. – 2016. – Vol. 352. – P. 539-544. – DOI: 10.1126/science.aad9378.
169. Hunter, M.C. Microbial Signatures of Oral Dysbiosis, Periodontitis and Edentulism Revealed by Gene Meter Methodology / M.C. Hunter, A.E. Pozhitkov, P.A. Noble // *Journal of Microbiological Methods*. – 2016. – Vol. 131. – P. 85-101. – DOI: 10.1101/070367.
170. Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification / M. Tan, H. Luo, S. Lee [et al.] // *Cell*. – 2011. – Vol. 146. – P. 1016-1028. – DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.008.
171. Identification of tissue-specific and common methylation quantitative trait loci in healthy individuals using MAGAR / M. Scherer, G. Gasparoni, S. Rahmouni [et al.] // *Epigenetics & Chromatin*. – 2021. – Vol. 14. – P. 44. – DOI: 10.1186/s13072-021-00415-6.
172. IL-10 Regulates Il12b Expression via Histone Deacetylation: Implications for Intestinal Macrophage Homeostasis / T. Kobayashi, K. Matsuoka, S.Z. Sheikh [et al.]

// J. Immunol. Baltim. Md 1950. – 2012. – Vol. 189. – P. 1792-1799. – DOI: 10.4049/jimmunol.1200042.

173. In vitro modeling of host-parasite interactions: the «subgingival» biofilm challenge of primary human epithelial cells / B. Guggenheim, R. Gmür, J.C. Galicia [et al.] // BMC Microbiol. – 2009. – Vol. 9. – P. 280.

174. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses / Y.M. Sjögren, S. Tomicic, A. Lundberg [et al.] // Clin. Exp. Allergy. – 2009. – Vol. 39 (12). – P. 1842-1851.

175. Infusion of calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis / Z. Wu, J. Ouyang, Z. He, S. Zhang // Eur J Cancer. – 2012. – Vol. 48. – № 12. – P. 1791-1798.

176. Inhibition of Histone-Deacetylase Activity by Short-Chain Fatty Acids and Some Polyphenol Metabolites Formed in the Colon / M. Waldecker, T. Kautenburger, H. Daumann [et al.] // J. Nutr. Biochem. – 2008. – Vol. 19. – P. 587-593. – DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.08.002.

177. Integrated proteogenomic characterization of HBV-related hepatocellular carcinoma / Q. Gao, H. Zhu, L. Dong [et al.] // Cell. – 2019. – Vol. 179. – P. 1240. – DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.038.

178. Integration and analysis of CPTAC proteomics data in the context of cancer genomics in the cBioPortal / P. Wu, Z.J. Heins, J.T. Muller [et al.] // Mol Cell Proteomics. – 2019. – Vol. 18. – P. 1893-1898. – DOI: 10.1074/mcp.TIR119.001673.

179. Integration of clinical phenoms and metabolomics facilitates precision medicine for lung cancer / F. Yan, C. Liu, D. Song [et al.] // Cell Biol Toxicol. – 2024. – Vol. 40. – № 1. – P. 25.

180. Interaction of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production / M. Candela, F. Perna, P. Carnevali [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2008. – Vol. 125. – P. 286-292.

181. Intestinal Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Regulation of Immune Cell IL-22 Production and Gut Immunity / W. Yang, T. Yu, X. Huang [et al.] // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – P. 4457. – DOI:10.1038/s41467-020-18262-6.
182. Jannes, G. A review of current and future molecular diagnostic tests for use in the microbiology laboratory / G. Jannes, D. De Vos // *Methods Mol Biol.* – 2006. – Vol. 345. – P. 1-21.
183. Jugder, B.-E. Microbiota-Derived Acetate Activates Intestinal Innate Immunity via the Tip60 Histone Acetyltransferase Complex / B.-E. Jugder, L. Kamareddine, P.I. Watnick // *Immunity.* – 2021. – Vol. 54. – P. 1683-1697.e3. – DOI: 10.1016/j.immuni.2021.05.017.
184. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions / R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson // *Biotechnology (N Y).* – 1993. – Vol. 11. – № 9. – P. 1026-1030. – DOI: 10.1038/nbt0993-1026.
185. Kleiner, M. Metaproteomics: Much More than Measuring Gene Expression in Microbial Communities / M. Kleiner // *mSystems.* – 2019. – Vol. 4. – № 3. – P. e00115-19. – DOI: 10.1128/mSystems.00115-19.
186. Koren, S. Breast tumor heterogeneity: source of fitness, hurdle for therapy / S. Koren, M. Bentires-Alj // *Mol Cell.* – 2015. – Vol. 60. – P. 537-546. – DOI: 10.1016/j.molcel.2015.10.031.
187. Kumar, P.S. Probing periodontal microbial dark matter using metataxonomics and metagenomics / P.S. Kumar, S.M. Dabdoub, S.M. Ganesan // *Periodontol 2000.* – 2021. – Vol. 85. – P. 12-27. – DOI: 10.1111/prd.12349.
188. *Lactobacillus Plantarum* Strain Maintains Growth of Infant Mice during Chronic Undernutrition / M. Schwarzer, K. Makki, G. Storelli [et al.] // *Science.* – 2016. – Vol. 351. – P. 854-857. – DOI: 10.1126/science.aad8588.
189. Lin, L. Aberrant DNA Methylation in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Biological and Clinical Implications / L. Lin, X. Cheng, D. Yin // *Frontiers in Oncology.* – 2020. – Vol. 10. – P. 2234-943X. – DOI: 10.3389/fonc.2020.549850.

190. Linson, E.A. Epidemiology of Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease - the Evolving Landscape / E.A. Linson, S.B. Hanauer // *Curr. Gastroenterol. Rep.* – 2021. – Vol. 23. – P. 16. – DOI: 10.1007/s11894-021-00816-3.
191. Lymph node dissection: what for? From esophagus to rectum: surgical and lymph node related prognostic factors. / M. Alline, M.M. Bertrand, P.E. Colombo, A. Mourregot, P. Rouanet // *Bull Cancer.* – 2014. – Vol. 101. – № 4. – P. 368-372.
192. Maccaferri, S. Metagenomics: key to human gut microbiota / S. Maccaferri, E. Biagi, P. Brigidi // *Dig. Dis.* – 2011. – Vol. 29. – № 6. – P. 525-530.
193. Mandal, R.S. Metagenomic surveys of gut microbiota / R.S. Mandal, S. Saha, S. Das // *Genomics Proteomics Bioinformat.* – 2015. – Vol. 13(3). – P. 148-158.
194. Märkl, B. Lymph node staging in gastrointestinal cancer. Combination of methylene blue-assisted lymph node dissection and ex vivo sentinel lymph node mapping / B. Märkl, H. Arnholdt // *Pathologe.* – 2012. – Vol. 33. – Suppl. 2. – P. 325-330.
195. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations / A. Bauermeister, H. Mannocho-Russo, L.V. Costa-Lotufo [et al.] // *Nat Rev Microbiol.* – 2022. – Vol. 20. – №3. – P. 143-160. – DOI: 10.1038/s41579-021-00621-9.
196. Maternal Cecal Microbiota Transfer Rescues Early-Life Antibiotic-Induced Enhancement of Type 1 Diabetes in Mice / X.-S. Zhang, Y.S. Yin, J. Wang [et al.] // *Cell Host Microbe.* – 2021. – Vol. 29. – P. 1249-1265.e9. – DOI: 10.1016/j.chom.2021.06.014.
197. Mechanical bowel preparation for colorectal surgery: a meta-analysis on abdominal and systemic complications on almost 5,000 patients / G. Gravante, R. Caruso, S.M. Andreani, P. Giordano // *Int. J. Colorectal Dis.* – 2008. – Vol. 23. – № 12. – P. 1145-1150.
198. Metabiotics: present state, challenges and perspectives / B.A. Shenderov, A.V. Sinitsa, M.M. Zakharchenko, C. Lang. – Springer International Publishing, 2020. – 123 p.
199. Metabolite-Sensing Receptors GPR43 and GPR109A Facilitate Dietary Fibre-Induced Gut Homeostasis through Regulation of the Inflammasome / L. Macia, J.

Tan, A.T. Vieira [et al.] // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6. – P. 6734. – DOI: 10.1038/ncomms7734.

200. Metabolites Produced by Commensal Bacteria Promote Peripheral Regulatory T-Cell Generation / N. Arpaia, C. Campbell, X. Fan [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 504. – P. 451-455. – DOI: 10.1038/nature12726.

201. Metabolomics and transcriptomics identify pathway differences between visceral and subcutaneous adipose tissue in colorectal cancer patients: the ColoCare study / D.B. Liesenfeld, D. Grapov, J.F. Fahrman [et al.] // *Am J Clin Nutr.* – 2015. – Vol. 102(2). – P. 433-443.

202. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota / M.J. Gosalbes, A. Durbán, M. Pignatelli [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – № 3. – P. e17447. – DOI: 10.1371/journal.pone.0017447.

203. Metatranscriptomics for the Human Microbiome and Microbial Community Functional Profiling / Y. Zhang, K.N. Thompson, T. Branck [et al.] // *Annu Rev Biomed Data Sci.* – 2021. – Vol. 4. – P. 279-311. – DOI: 10.1146/annurev-biodatasci-031121-103035.

204. Methylation analysis in urine fractions for optimal CIN3 and cervical cancer detection / R. Helder, N. Trommel, A. Splunter [et al.] // *Papillomavirus Research*. – 2020. – Vol. 9. – P. 100193.

205. Meyer, J.G. Deep learning neural network tools for proteomics / J.G. Meyer // *Cell Rep Methods*. – 2021. – Vol. 1. – № 2. – P. 100003. – DOI: 10.1016/j.crmeth.2021.100003.

206. Microbial contamination and composition of oral samples subjected to clinical whole genome sequencing / A. Kumar, V. Skrahina, J. Atta [et al.] // *Front. Genet.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1081424. – DOI: 10.3389/fgene.2023.1081424.

207. Microbial Exposure during Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function / T. Olszak, D. An, S. Zeissig [et al.] // *Science*. – 2012. – Vol. 336. – P. 489-493. – DOI: 10.1126/science.1219328.

208. Microbial Metabolite Butyrate Facilitates M2 Macrophage Polarization and Function / J. Ji, D. Shu, M. Zheng [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 24838. – DOI: 10.1038/srep24838.

209. Microbial metabolomics: From novel technologies to diversified applications / D. Ye, X. Li, J. Shen, X. Xia // *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* – 2022. – Vol. 148. – P. 116540. – DOI: 10.1016/j.trac.2022.116540.

210. Microbial Short-Chain Fatty Acids Modulate CD8⁺ T Cell Responses and Improve Adoptive Immunotherapy for Cancer / M. Luu, Z. Riester, A. Baldrich [et al.] // *Nat. Commun.* – 2021. – Vol. 12. – P. 4077. – DOI: 10.1038/s41467-021-24331-1.

211. Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis / L. Abusleme, A. Hoare, B.Y. Hong, P.I. Diaz // *Periodontol 2000.* – 2021. – Vol. 86. – P. 57-78. – DOI: 10.1111/prd.12362.

212. Microbiome-associated exposomics is a new promising direction in predictive diagnostics / A.M. Zatevalov, S.L. Bezrodnyj, S.G. Mardanly, V.V. Pomazanov // *Perspektivy' vnedreniya innovacionny'x texnologij v medicine i farmacii. Sbornik materialov VIII Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodny'm uchastiem, posvyashhennoj Godu nauki i texnologij. Pod obshhej redakciej S.G. Mardanly, V.V. Pomazanova, V.A. Kiselevoj.* – Orexovo-Zuevo, 2021. – P. 106-109. (in Russian)

213. Microbiota-Derived Metabolite Promotes HDAC3 Activity in the Gut / S.-E. Wu, S. Hashimoto-Hill, V. Woo [et al.] // *Nature.* – 2020. – Vol. 586. – P. 108-112. – DOI:10.1038/s41586-020-2604-2.

214. Microbiota Derived Short Chain Fatty Acids Promote Histone Crotonylation in the Colon through Histone Deacetylases / R. Fellows, J. Denizot, C. Stellato [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9. – P. 105. – DOI: 10.1038/s41467-017-02651-5.

215. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote the Memory Potential of Antigen-Activated CD8⁺ T Cells / A. Bachem, C. Makhoul, K.J. Binger [et al.] // *Immunity.* – 2019. – Vol. 51. – P. 285-297.e5. – DOI: 10.1016/j.immuni.2019.06.002.

216. Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations / C.A. Thaiss, M. Levy, T. Korem [et al.] // *Cell*. – 2016. – Vol. 167. – P. 1495-1510.e12. – DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.003.
217. Microbiota-Induced Type I Interferons Instruct a Poised Basal State of Dendritic Cells / L. Schaupp, S. Muth, L. Rogell [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 181. – P. 1080-1096.e19. – DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.022.
218. Microbiota Inhibit Epithelial Pathogen Adherence by Epigenetically Regulating C-Type Lectin Expression / V. Woo, E.M. Eshleman, T. Rice [et al.] // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 928. – DOI: 10.3389/fimmu.2019.00928.
219. Microbiota Metabolite Butyrate Differentially Regulates Th1 and Th17 Cells' Differentiation and Function in Induction of Colitis / L. Chen, M. Sun, W. Wu [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2019. – Vol. 25. – P. 1450-1461. – DOI: 10.1093/ibd/izz046.
220. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection / T. Ichinohe, I.K. Pang, Y. Kumamoto [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2011. – Vol. 108 (13). – P. 5354-5359.
221. Microbiota-Sensitive Epigenetic Signature Predicts Inflammation in Crohn's Disease / D. Kelly, M. Kotliar, V. Woo [et al.] // *JCI Insight*. – 2018. – Vol. 3. – № 18. – P. e122104. – DOI: 10.1172/jci.insight.122104.
222. Mironov, A.Yu. Use of gas-liquid chromatography in anaerobic bacteriology (literature review) / A.Yu. Mironov, Ye.P. Pashkov // *Laboratornoye delo*. – 1988. – Vol. 3. – P. 3-9. (in Russian)
223. Molecular ecology of anaerobic reactor systems / J. Hofman-Bang, D. Zheng, P. Westermann [et al.] // *Adv Biochem Eng Biotechnol.* – 2003. – Vol. 81. – P. 151-203. – DOI: 10.1007/3-540-45839-5_5.
224. Montravers, P. Emergence of Antibiotic-Resistant Bacteria in Cases of Peritonitis After Intraabdominal Surgery Affects the Efficacy of Empirical Antimicrobial Therapy / P. Montravers, R. Gauzit, C. Muller // *Clinical Infectious Diseases*. – 1996 – Vol. 23. – P. 486-494.

225. Morgan, X.C. Meta'omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome / X.C. Morgan, C. Huttenhower // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 146. – № 6. – P. 1437-1448.e1. – DOI: 10.1053/j.gastro.2014.01.049.
226. Morinobu, A. Discrete Roles for Histone Acetylation in Human T Helper 1 Cell-Specific Gene Expression / A. Morinobu, Y. Kanno, J.J. O'Shea // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 40640-40646. – DOI: 10.1074/jbc.M407576200.
227. Moss, C.W. Cellular fatty acids of *Peptococcus variabilis* and *Peptostreptococcus anaerobius* / C.W. Moss, M.A. Lambert, G.L. Lombard // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1977. – Vol. 5. – № 6. – P. 665-667.
228. Moss, C. W. Identification of microorganisms by gas chromatographic – mass spectrometric analysis of cellular fatty acids / C.W. Moss, S.R. Dees // *Journal of Chromatography A*. – 1985. – Vol. 12. – P. 595-604.
229. Multi-omic data integration enables discovery of hidden biological regularities / A. Ebrahim, E. Brunk, J. Tan [et al.] // *Nat Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 13091. – DOI: 10.1038/ncomms13091.
230. Muramyl dipeptide induces NOD2-dependent Ly6C(high) monocyte recruitment to the lungs and protects against influenza virus infection / F. Coulombe, S. Fiola, S. Akira [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 5. – P. E 36734.
231. Nagalakshmi, U. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis / U. Nagalakshmi, K. Waern, M. Snyder // *Curr Protoc Mol Biol*. – 2010. – Vol. 89. – № 1. – P. 4.11.1-4.11.13. – DOI: 10.1002/0471142727.mb0411s89.
232. Naser, Z.J. Sarcomatoid Carcinoma of the Ascending Colon: A Case Report and Literature Review / Z.J. Naser, S. Morrissey // *Am J Case Rep*. – 2022. – Vol. 30. – № 23. – P. e937548.
233. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System / D. Cardo, T. Horan, M. Andrus [et al.] // *Am. J. Infect. Control*. – 2004. – Vol. 32. – P. 470-485.
234. Nicholson, J.K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology / J.K. Nicholson // *Mol Syst Biol*. – 2006. – Vol. 2. – P. 52.

235. Niedzielin, K. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome / K. Niedzielin, H. Kordecki // *Eur J Gastroenterol Hepatol.* – 2001. – № 13(10). – P. 1143-1147.
236. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research / A.H. Emwas, R. Roy, R.T. McKay [et al.] // *Metabolites.* – 2019. – Vol. 9. – № 7. – P. 123. – DOI: 10.3390/metabo9070123.
237. O’Flaherty, S. The impact of Omic technologies on the study of food microbes / S. O’Flaherty, T.R. Klaenhammer // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 353-371.
238. Ong, S.E. Properties of ¹³C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) / S.E. Ong, I. Kratchmarova, M. Mann // *J Proteome Res.* – 2003. – Vol. 2. – P. 173-181. – DOI: 10.1021/pr0255708.
239. Optimization of metabolomics of defined in vitro gut microbial ecosystems / D.K. Wissenbach, K. Oliphant, U. Rolle-Kampczyk [et al.] // *Int J Med Microbiol.* – 2016. – Vol. 306. – № 5. – P. 280-289. – DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.03.007.
240. Paez-Escamilla, M. Retinoblastoma With Endophytic and Exophytic Features / M. Paez-Escamilla, N. Bagheri, J.W. Harbour // *JAMA Ophthalmol.* – 2018. – Vol. 136(1). – P. e175064.
241. Paschos, K. Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis / K. Paschos, M.J. Allday // *Trends Microbiol.* – 2010. – Vol. 18. – № 10. – P. 439-447.
242. Pennisi, E. Human genome 10th anniversary. Digging deep into the microbiome / E. Pennisi // *Science.* – 2011. – Vol. 331(6020). – P. 1008-1009.
243. Pennisi, E. Microbiome. The Right Gut Microbes Help Infants Grow / E. Pennisi // *Science.* – 2016. – Vol. 351. – P. 802. – DOI: 10.1126/science.351.6275.802.
244. Plasma Metabolome Normalization in Rheumatoid Arthritis Following Initiation of Methotrexate and the Identification of Metabolic Biomarkers of Efficacy / M.R. Medcalf, P. Bhadbhade, T.R. Mikuls [et al.] // *Metabolites.* – 2021. – Vol. 11. – P. 824. – DOI: 10.3390/metabo11120824.

245. Polymicrobial infection with periodontal pathogens specifically enhances microRNA miR-146a in ApoE^{-/-} mice during experimental periodontal disease / M.A. Nahid, M. Rivera, A. Lucas [et al.] // *Infect Immun.* – 2011. – Vol. 79. – P. 1597-1605.
246. Postnatal Epigenetic Regulation of Intestinal Stem Cells Requires DNA Methylation and Is Guided by the Microbiome / D.-H. Yu, M. Gadkari, Q. Zhou [et al.] // *Genome Biol.* – 2015. – Vol. 16. – P. 211. – DOI:10.1186/s13059-015-0763-5.
247. Potential Link between Fusobacterium Enrichment and DNA Methylation Accumulation in the Inflammatory Colonic Mucosa in Ulcerative Colitis / T. Tahara, I. Hirata, N. Nakano [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – P. 61917-61926. – DOI: 10.18632/oncotarget.18716.
248. Preidis, G.A. Targeting the human microbiome with antibiotic, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomic era / G.A. Preidis, J. Versalovic // *Gastroenterology.* – 2009. – Vol. 136. – P. 2015-2031.
249. Preoperative oral antibiotics reduce surgical site infection following elective colorectal resections / J.A. Cannon, L.K. Altom, R.J. Deierhoi [et al.] // *Dis Colon Rectum.* – 2012. – Vol. 55. – № 11. – P. 1160-1166.
250. Priming of Natural Killer Cells by Nonmucosal Mononuclear Phagocytes Requires Instructive Signals from Commensal Microbiota / S.C. Ganai, S.L. Sanos, C. Kallfass [et al.] // *Immunity.* – 2012. – Vol. 37. – P. 171-186. – DOI: 10.1016/j.immuni.2012.05.020.
251. Progress and opportunities in microbial community metabolomics / A. Bhosle, Y. Wang, E.A. Franzosa, C. Huttenhower // *Curr Opin Microbiol.* – 2022. – Vol. 70. – P. 102195. – DOI: 10.1016/j.mib.2022.102195.
252. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer / P. Mertins, D.R. Mani, K.V. Ruggles [et al.] // *Nature.* – 2016. – Vol. 534. – P. 55-62. – DOI: 10.1038/nature18003.
253. Proteome and Microbiome Mapping of Human Gingival Tissue in Health and Disease / K. Bao, X. Li, L. Poveda [et al.] // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 588155. – DOI: 10.3389/fcimb.2020.588155.

254. Proteomics and Lipidomics in Inflammatory Bowel Disease Research: From Mechanistic Insights to Biomarker Identification / B. Titz, R. Gadaleta, G. Lo Sasso [et al.] // *IJMS*. – 2018. – Vol. 19. – P. 2775.
255. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags / S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber [et al.] // *Nat Biotechnol*. – 1999. – Vol. 17. – P. 994-999. – DOI: 10.1038/13690.
256. Quantitative proteomics reveals specific metabolic features of acute myeloid leukemia stem cells / S. Raffel, D. Klimmeck, M. Falcone [et al.] // *Blood*. – 2020. – Vol. 136. – P. 1507-1519. – DOI: 10.1182/blood.2019003654.
257. Rapid identification of staphylococci by Raman spectroscopy / K. Rebrošová, M. Šiler, O. Samek [et al.] // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – P. 14846.
258. Rayes, N. Early enteral supply of *Lactobacillus* and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients / N. Rayes, D. Seehofer, S. Hansen // *Transplantacion*. – 2002. – Vol. 74. – P. 123-127.
259. Razali, N. M. Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians / N. M. Razali, Y. B. Wah // *Singapore Med. J*. – 2011. – Vol. 52(3). – P. 317-321.
260. Regulation of Inflammatory Responses by Gut Microbiota and Chemoattractant Receptor GPR43 / K.M. Maslowski, A.T. Vieira, A. Ng [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – P. 1282-1286. – DOI: 10.1038/nature08530.
261. Regulation of the Effector Function of CD8⁺ T Cells by Gut Microbiota-Derived Metabolite Butyrate / M. Luu, K. Weigand, F. Wedi [et al.] // *Sci. Rep*. – 2018. – Vol. 8. – P. 14430. – DOI: 10.1038/s41598-018-32860-x.
262. Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota / M. Sun, C. He, Y. Cong, Z. Liu // *Mucosal Immunol*. – 2015. – Vol. 8. – № 5. – P. 969-978.
263. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt) / The UniProt Consortium // *Nucleic Acids Res*. – 2012. – Vol. 40. – P. D71-D75.
264. Risk of Metachronous Colorectal Advanced Neoplasia and Cancer in Patients With 3-4 Nonadvanced Adenomas at Index Colonoscopy: A Systematic Review

and Meta-Analysis / S. Park, S.R. Jeon, H.G. Kim [et al.] // *Am J Gastroenterol.* – 2022. – Vol. 117. – № 4. – P. 588-602.

265. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification / I. Gallego Romero, A.A. Pai, J. Tung, Y. Gilad // *BMC Biol.* – 2014. – Vol. 12. – P. 42. – DOI: 10.1186/1741-7007-12-42.

266. Role of Serum Amyloid A, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Bone Marrow Granulocyte-Monocyte Precursor Expansion in Segmented Filamentous Bacterium-Mediated Protection from *Entamoeba Histolytica* / S.L. Burgess, M. Saleh, C.A. Cowardin [et al.] // *Infect. Immun.* – 2016. – Vol. 84. – P. 2824-2832. – DOI: 10.1128/IAI.00316-16.

267. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s / R. Ross // *Nature.* – 1993. – Vol. 362. – № 6423. – P. 801-809.

268. Sadzikowski, M. R. Cholesterol-reducing bacterium from human feces / M.R. Sadzikowski, J.F. Sperry, T.D. Wilkins // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1977. – Vol. 34. – № 4. – P. 355-362.

269. Santiago-Rodriguez, T. M. Multi 'omic data integration: A review of concepts, considerations, and approaches / T. M. Santiago-Rodriguez, E. B. Hollister // *Seminars in Perinatology.* – 2021. – Vol. 45. – P. 151456.

270. Schmitt, M. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer / M. Schmitt, F.R. Greten // *Nat Rev Immunol.* – 2021. – Vol. 21(10). – P. 653-667.

271. Schnackenberg, L.K. Monitoring the health to disease continuum with global metabolic profiling and systems biology / L.K. Schnackenberg, R.D. Beger // *Pharmacogenomics.* – 2006. – Vol. 7 (7). – P. 1077-1086.

272. SEOM clinical guidelines for the advant treatment of colorectal cancer 2013 / J. Maurel, C. Grávalos, F. Rivera [et al.] // *SEOM. Clin Transl Oncol.* – 2013. – P. 5-13.

273. Servin, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens / A.L. Servin // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2004. – Vol. 28 (4). – P. 405-440.

274. Shah, S.C. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. / S.C. Shah, S.H. Itzkowitz // *Gastroenterology*. – 2022. – Vol. 162(3). – P. 715-730.e3.
275. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood / J.H. Cummings, E.W. Pomare, W.J. Branch [et al.] // *Gut*. – 1987. – Vol. 28. – P. 1221-1227. – DOI: 10.1136/gut.28.10.1221.
276. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat / C. Cherbut, L. Ferrier, C. Roze [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 1998. – № 275(6). – P. 1415-1422.
277. Shussman, N. Colorectal polyps and polyposis syndromes / N. Shussman, S.D. Wexner // *Gastroenterol Rep (Oxf)*. – 2014. – Vol. 2(1). – P. 1-15.
278. Siegel, R. Cancer statistics, 2013 / R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal // *CA Cancer J Clin*. – 2013. – Vol. 63(1). – P. 11-30.
279. Simon, C. Metagenomic analyses: past and future trends / C. Simon, R. Daniel // *Appl Environ Microbiol*. – 2011. – Vol. 77. – № 4. – 1153-1161. – DOI: 10.1128/AEM.02345-10.
280. Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications / L. Huang, F. Ma, A. Chapman [et al.] // *Annual review of genomics and human genetics*. – 2015. – Vol. 16. – P. 79-102. – DOI: 10.1146/annurev-genom-090413-025352.
281. Small intestinal bacterial overgrowth in human cirrhosis is associated with systemic endotoxemia / T.M. Bauer, H. Schwacha, B. Steinbrückner [et al.] // *Am. J. Gastroenterol*. – 2002. – Vol. 97. – P. 2364-2370.
282. Snoeck, V. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake / V. Snoeck, B. Goddeeris, E. Cox // *Microbes Infect*. – 2005. – Vol. 7. – P. 997-1004.
283. Specific and non-specific symptoms of colorectal cancer and contact to general practice / S. Rasmussen, P.V. Larsen, J. Søndergaard [et al.] // *Fam Pract*. – 2015. – Vol. 32(4). – P. 387-394.

284. Sun, Y. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal short chain fatty acids / Y. Sun, M.X.D. O'Riordan // *Advances in Applied Microbiology*. – 2013. – Vol. 85. – P. 93-118.
285. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes / M. Li, B. Wang, M. Zhang [et al.] // *PNAS*. – 2008. – Vol. 105. – № 6. – P. 2117-2122.
286. The Acetylome Regulators Hdac1 and Hdac2 Differently Modulate Intestinal Epithelial Cell Dependent Homeostatic Responses in Experimental Colitis / N. Turgeon, J.M. Gagné, M. Blais [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2014. – Vol. 306. – P. G594-605. – DOI: 10.1152/ajpgi.00393.2013.
287. The application of genomic and proteomic technologies in predictive, preventive and personalized medicine / C.D. Collins, S. Purohit, R.H. Podolsky [et al.] // *Vascul Pharmacol.* – 2006. – Vol. 45. – № 5. – P. 258-267.
288. The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites / G.E. Kaiko, S.H. Ryu, O.I. Koues [et al.] // *Cell*. – 2016. – Vol. 165. – P. 1708-1720. – DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.018.
289. The effect of selected synbiotics on microbial composition and short-chain fatty acid production in model system of the human colon / G.C. Van Zanten, A. Knudsen, H. Röytiö [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – P. 47212.
290. The Epigenetic Regulator Uhrf1 Facilitates the Proliferation and Maturation of Colonic Regulatory T Cells / Y. Obata, Y. Furusawa, T.A. Endo [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2014. – Vol. 15. – P. 571-579. – DOI: 10.1038/ni.2886.
291. The exposome and health: Where chemistry meets biology / R. Vermeulen, E.L. Schymanski, A.L. Barabási, G.W. Miller // *Science*. – 2020. – Vol. 367. – № 6476. – P. 392-396.
292. The Gut Microbiome Switches Mutant P53 from Tumour-Suppressive to Oncogenic / E. Kadosh, I. Snir-Alkalay, A. Venkatachalam [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 586. – P. 133-138. – DOI: 10.1038/s41586-020-2541-0.
293. The Impact of Gut Microbiome on the Efficacy of Antitumor Immunotherapy / E. I. Olexnovich, A. I. Manolov, A. V. Pavlenko, D. E. Fedorov [et al.] // *Biomedicinskaya ximiya*. – 2020. – Vol. 66(1). – P. 54-63. (in Russian)

294. The Intestinal Microbiota Programs Diurnal Rhythms in Host Metabolism through Histone Deacetylase 3 / Z. Kuang, Y. Wang, Y. Li [et al.] // *Science*. – 2019. – Vol. 365. – P. 1428-1434. – DOI: 10.1126/science.aaw3134.
295. The Microbial Metabolite Butyrate Induces Expression of Th1-Associated Factors in CD4⁺ T Cells / M. Kespohl, N. Vachharajani, M. Luu [et al.] // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1036. – DOI: 10.3389/fimmu.2017.01036.
296. The Microbial Metabolite Butyrate Regulates Intestinal Macrophage Function via Histone Deacetylase Inhibition / P.V. Chang, L. Hao, S. Offermanns, R. Medzhitov // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2014. – Vol. 111. – P. 2247-2252. – DOI: 10.1073/pnas.1322269111.
297. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis / P.M. Smith, M.R. Howitt, N. Panikov [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 341. – P. 569-573. – DOI: 10.1126/science.1241165.
298. The Microbiota Programs DNA Methylation to Control Intestinal Homeostasis and Inflammation / I. Ansari, G. Raddatz, J. Gutekunst [et al.] // *Nat. Microbiol.* – 2020. – Vol. 5. – P. 610-619. – DOI: 10.1038/s41564-019-0659-3.
299. The oral microbiome, pancreatic cancer and human diversity in the age of precision medicine / K.M. Herremans, A.N. Riner, M.E. Cameron [et al.] // *Microbiome*. – 2022. – Vol. 10. – P. 93. – DOI: 10.1186/s40168-022-01262-7.
300. The prognostic significance of peripheral T-lymphocyte subsets and natural killer cells in patients with colorectal cancer / H. Qiu, W. Xiao-Jun, Z. Zhi-Wei [et al.] // *Hepatogastroenterology*. – 2009. – Vol. 56 (94-95). – P. 1310-1315.
301. The role of the gut microbiome in the pathogenesis of autism spectrum disorders in children / A.M. Zatevalov, A.A. Garbuzov, T.A. Ruzhenczova [et al.] // *Arxiv pediatrii i detskoj xirurgii*. – 2024. – Vol. 2. – № 1. – P. 170-181. (in Russian)
302. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages / J. Schulthess, S. Pandey, M. Capitani [et al.] // *Immunity*. – 2019. – Vol. 50. – P. 432-445.e7. – DOI: 10.1016/j.immuni.2018.12.018.
303. The Short-Chain Fatty Acid Pentanoate Suppresses Autoimmunity by Modulating the Metabolic-Epigenetic Crosstalk in Lymphocytes / M. Luu, S. Pautz, V.

Kohl [et al.] // Nat. Commun. – 2019. – Vol. 10. – P. 760. – DOI: 10.1038/s41467-019-08711-2.

304. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation / L. Abusleme, A.K. Dupuy, N. Dutzan [et al.] // ISME J. – 2013. – Vol. 7. – P. 1016-1025.

305. The use of high-dimensional biology (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) to understand the preterm parturition syndrome / R. Romero, J. Espinoza, F. Gotsch [et al.] // BJOG. – 2006. – Vol. 113 (3). – P. 118-135.

306. Tuck, M.T. Ethionine Inhibits in Vivo Methylation of Nuclear Proteins / M.T. Tuck, R. Cox // Carcinogenesis. – 1982. – Vol. 3. – P. 431-434. – DOI: 10.1093/carcin/3.4.431.

307. Turner, J.R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease / J.R. Turner // Nat. Rev. Immunol. – 2009. – Vol. 9. – P. 799-809.

308. Tweeddale, H. Effect of slow growth on metabolism of Escherichia coli, as revealed by global metabolite pool («metabolome») analysis / H. Tweeddale, L. Notley-McRobb, T. Ferenci // J Bacteriol. – 1998. – Vol. 180. – № 19. – P. 5109-5116. – DOI: 10.1128/JB.180.19.5109-5116.1998.

309. Two-Carbon Folate Cycle of Commensal Lactobacillus Reuteri 6475 Gives Rise to Immunomodulatory Ethionine, a Source for Histone Ethylation / D. Röth, A.J. Chiang, W. Hu [et al.] // FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. – 2019. – Vol. 33. – P. 3536-3548. – DOI: 10.1096/fj.201801848R.

310. Ushkalova, E.A. Modern concepts of the role of probiotics in the prevention and treatment of various diseases: focus on Linex / E.A. Ushkalova // Terapevticheskij arxiv. – 2014. – Vol. 86. – № 4. – P. 117-124. (in Russian)

311. Wang, Y. Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 / Y. Wang // Benef Microbes. – 2014. – Vol. 5. – № 2. – P. 161-168.

312. Whelan, R.L. Postoperative cell mediated immune response is better preserved after laparoscopic vs open colorectal resection in humans / R.L. Whelan M. Franklin, S.D. Holubar // Surg. Endosc. – 2003. – Vol. 17. – № 6. – P. 972-978.

313. Whitman, W.B. Prokaryotes: The unseen majority / W.B. Whitman, D.C. Coleman, W.J. Wiebe // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 6578-6583.
314. Wild, C. P. The exposome: from concept to utility / C. P. Wild // *International journal of epidemiology.* – 2012. – Vol. 41. – № 1. – P. 24-32. – DOI: 10.1093/ije/dyr236.
315. Wilmes, P. A decade of metaproteomics: Where we stand and what the future holds / P. Wilmes, A. Heintz-Buschart, P.L. Bond // *Proteomics.* – 2015. – Vol. 15. – № 20. – P. 3409-3417.
316. Wöhlbrand, L. Proteomic tools for environmental microbiology – a roadmap from sample preparation to protein identification and quantification / L. Wöhlbrand, K. Trautwein, R. Rabus // *Proteomics.* – 2013. – Vol. 13. – № 18-19. – P. 2700-2730. – DOI: 10.1002/pmic.201300175.
317. Wolters, D.A. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics / D.A. Wolters, M.P. Washburn, J.R. Yates 3rd // *Anal. Chem.* – 2001. – Vol. 73. – № 23. – P. 5683-5690. – DOI: 10.1021/ac010617e.
318. World Health Organization. Global Health Observatory. – Geneva: World Health Organization, 2018. – P. 45-48.
319. Yan, F. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells / F. Yan, D.B. Polk // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 50959-50965.
320. Zhang, W. Integrating multiple «omics» analysis for microbial biology: application and methodologies / W. Zhang, F. Li, L. Nie // *Microbiology.* – 2010. – Vol. 156. – № 2. – P. 287-301.
321. Zhao, Y. Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications / Y. Zhao, B.A. Garcia // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2015. – Vol. 7. – P. a025064. – DOI: 10.1101/cshperspect.a025064.
322. Zoetendal, E.G. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces / E.G. Zoetendal // *Appl. Environ. Microbiol.* – Vol. 68. – P. 3401-3407.