

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

на правах рукописи

Кашух Екатерина Андреевна

Влияние регуляции метаболической активности кишечного микробиома с помощью антибиотиков и пробиотиков на показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ишемической болезнью сердца

14.01.04 – внутренние болезни

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

академик РАН, д.м.н., профессор

Ивашкин Владимир Трофимович

Москва – 2019 г

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования	6
Цель настоящей работы	8
Задачи исследования	8
Научная новизна	9
Научно - практическая значимость работы	10
Методология и методы исследования	10
Основные положения, выносимые на защиту	10
Степень достоверности и апробация результатов	12
Личный вклад автора в получении результатов	12
Внедрение результатов в практику	12
Соответствие диссертации паспорту научной специальности	13
Публикации в рецензируемых журналах, определенных ВАК	13
Объем и структура диссертации	13
1. Обзор литературы	14
1.1 Микробиота - фундаментальный фактор, определяющий здоровье человека	14
1.2 Структура и функция микробиома человека: из глубины истории к медицине, основанной на доказательствах	15
1.3 Диета - важный фактор изменения микробиома человека	20

1.4 Вклад микробиома человека в развитие сердечно-сосудистых заболеваний	22
1.5 Физиологическая роль ТМАО	26
1.6 Место фосфатидилхолина в метаболических процессах организма человека и животных и его роль в увеличении риска сердечно-сосудистых заболеваний	29
1.7 L-карнитин: изменение сердечно-сосудистого риска у животных и людей	37
1.8 Значение спектра и свойств микрофлоры в формировании ТМАО	43
1.9 ТМАО как фактор, повышающий защитный потенциал при различных заболеваниях, и его терапевтическое применение	45
1.10 Роль пробиотиков в коррекции метаболизма микрофлоры кишечника	47
1.11 ТМАО как потенциальная мишень для лечения атеросклероза	48
1.12 ТМАО - молекула больших противоречий и больших ожиданий	50
2 Материалы и методы	52
2.1. Предварительное обследование и набор пациентов	52
2.2 Методы исследования	58
2.2.1 Лабораторное исследование	58
2.2.2 Определение концентрации триметиламин-N-оксида в плазме крови	59
2.2.3 Определение микробиологического состава кала	60
2.2.4 Инструментальное исследование	61
2.2.5. Измерение артериального давления	62
2.2.6 Дыхательный водородный тест с использованием лактулозы	62
2.3 Статистическая обработка полученных результатов	64
3. Результаты проведенного исследования	65
3.1. Общая клиническая характеристика участников исследования	65

3.2. Характеристика диеты пациентов и ее влияния на метаболизм кишечной микрофлоры	68
3.3. Оценка вклада синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке на в сердечно-сосудистый риск пациентов с ИБС и возможность его коррекции	71
3.4 Анализ изменений фекальной микробиоты участников	73
3.5. Оценка изменений концентрации ТМАО участников	83
3.6 Оценка артериального давления участников	88
3.7 Оценка изменений показателей липидного профиля участников	90
3.8 Оценка изменений скорости агрегации тромбоцитов участников	94
3.9 Оценка влияния метаболизма кишечной микрофлоры на показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ИБС	96
4. Обсуждение результатов	102
4.1 Особенности состава и метаболической активности кишечной микрофлоры у пациентов с ишемической болезнью сердца	102
4.2 Влияние рациона участников исследования на метаболизм кишечной микрофлоры	103
4.3 Вклад избыточного бактериального роста в тонкой кишке в изменение метаболизма кишечного микробиома у пациентов с ИБС	104
4.4 Оценка сердечно-сосудистого риска участников исследования и его взаимосвязь с метаболической активностью кишечного микробиома	106
4.5 Влияние рифаксими́на на изменения кишечной микрофлоры и показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ИБС	111

4.6 Влияние мультиштаммового пробиотика Флорасан Д на метаболизм кишечной микрофлоры и показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ИБС	115
4.7 Ограничения исследования	117
Выводы	119
Практические рекомендации	121
Список сокращений	122
Список литературы	123

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Сердечно-сосудистые заболевания лидируют в структуре причин смерти у людей различных возрастных категорий [1]. Причиной развития многих сердечно-сосудистых заболеваний служит атеросклероз - хроническое заболевание артерий эластического и мышечного типа, сопровождающееся отложением холестерина и липопротеидов в интима сосудов и перекрытием просвета сосуда. При выраженном сужении просвета коронарных артерий атеросклеротической бляшкой может возникать ишемическая болезнь сердца (ИБС).

В настоящее время, несмотря на применение комплекса лекарственных средств для терапии ИБС, смертность от данного заболевания остается значительной. Ввиду этого ученые уделяют много внимания изучению сложных процессов возникновения и прогрессирования атеросклероза, наравне с другими процессами, приводящими к атеротромбозу, такими, как ускорение агрегации тромбоцитов [2].

С развитием новых методов лабораторной диагностики появилась возможность изучения состава микробиома кишечника и его метаболической активности при различных заболеваниях. При анализе метаболического профиля пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями Tang et al было обнаружено соединение - триметиламин-N-оксид (ТМАО), продукт метаболизма фосфатидилхолина и L-карнитина, концентрация которого оказались выше у людей с более высоким сердечно-сосудистым риском [3]. Эксперименты на моделях мышей не позволяют полностью подтвердить или опровергнуть гипотезу относительно атерогенного и тромбогенного потенциала ТМАО [4]. В исследованиях с участием людей также получены противоречивые данные

относительно влияния данного вещества на сердечно-сосудистую систему [5]. Ученые сходятся во мнении относительно важного влияния микрофлоры в процессах образования и утилизации ТМАО, в связи с чем во многих исследованиях микробиом упомянут как потенциальная мишень для лечения атеросклероза и связанных с ним заболеваний [6].

Известно, что ТМАО продуцируется микрофлорой дистальных отделов тонкой кишки и на протяжении толстой кишки [7]. Тем не менее, в норме общее количество бактерий в тонкой кишке значительно меньше, чем в толстой. При многих заболеваниях желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся нарушением моторики кишечника, размножение бактерий в тонкой кишке и их метаболическая активность приводит к развитию синдрома избыточного бактериального роста (СИБР). Немногочисленные исследования продемонстрировали взаимосвязь СИБР с развитием сердечно-сосудистых заболеваний [8]. Однако до настоящего момента не были изучены изменения метаболизма метиламинов у пациентов с СИБР и их взаимосвязь у пациентов с ИБС.

Среди средств воздействия на композицию и метаболизм микрофлоры предложены пробиотики и антибиотики. Применение антибиотиков служит стандартом лечения СИБР [9]. Исследования с участием здоровых добровольцев продемонстрировали выраженное снижение концентрации ТМАО в крови на фоне приема антибиотиков широкого спектра действия (фторхинолонов) с последующим ее восстановлением [10]. Относительно пробиотиков выполнены лишь отдельные исследования с небольшой выборкой, не позволяющие сделать вывод о рациональности их применения для воздействия на концентрацию ТМАО [11,12].

В связи с вышеперечисленными аспектами, представляется актуальным изучение влияния мультиштаммового пробиотика Флорасан Д (*Bifidobacterium bifidum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium longum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium infantis* не менее 1×10^9 КОЕ; *Lactobacillus rhamnosus* не менее 1×10^9 КОЕ) и антибиотика рифаксимин на метаболическую активность кишечного микробиома и, посредством этого, на липидный профиль и скорость агрегации тромбоцитов как важные факторы развития сердечно-сосудистых заболеваний, продемонстрировавшие связь с метаболизмом микробиоты кишечника в предыдущих исследованиях.

Цель настоящей работы

Коррекция показателей сердечно-сосудистого риска за счет изменения состава и метаболической активности у пациентов с ишемической болезнью сердца

Задачи исследования

1. Проанализировать различия структуре фекальной микрофлоры между пациентами с ИБС и относительно здоровыми людьми аналогичного возраста и пола

2. Оценить изменения в концентрации ТМАО у пациентов с ИБС в сравнении с относительно здоровыми людьми аналогичного возраста и пола

3. Определить вклад сопутствующих факторов (возраст, пол, неблагоприятный семейный анамнез в отношении сердечно-сосудистых заболеваний, индекс массы тела, курение, рацион, наличие или отсутствие синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке) на продукцию ТМАО у пациентов с ИБС

4. Оценить изменение концентрации ТМАО у пациентов с ИБС, получавших в дополнение к основной терапии только пробиотик или антибиотик, затем пробиотик, в сравнении с контрольной группой

5. Изучить структуру фекальной микрофлоры у пациентов с ИБС, получавших в дополнение к основной терапии только пробиотик или антибиотик, затем пробиотик, в сравнении с контрольной группой

6. Проанализировать влияние дополнительной терапии антибиотиком и пробиотиком на показатели липидного спектра, агрегацию тромбоцитов, уровень систолического артериального давления у пациентов с ИБС

Научная новизна

В рамках настоящего исследования впервые разработан метод определения ТМАО на территории Российской Федерации. Выполнена оценка рациона людей с ИБС в отношении частоты употребления продуктов-предшественников триметиламина и оценена связь с изменением ТМАО в этой группе пациентов. Установлена корреляция между повышением концентрации ТМАО и наличием избыточного бактериального роста у пациентов с ИБС.

Проведена сравнительная оценка эффективности применения в комплексной терапии ИБС антибактериального и пробиотического препарата, их влияния на кишечный микробиом и показатели сердечно-сосудистого риска. Выявлено положительное воздействие на липидный спектр антибиотика рифаксимин у пациентов с ИБС.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическая значимость работы состоит в том, что результаты исследования позволяют расширить подход к лечению ИБС и профилактике сердечно-сосудистых осложнений. Выявленная взаимосвязь между увеличением в рационе продуктов, содержащих фосфатидилхолин и L-карнитин (красное мясо, молочные продукты, яйца) и повышением концентрации ТМАО служит основанием для внесения дополнений в диетические рекомендации пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Продемонстрирована целесообразность использования водородного дыхательного теста для обследования пациентов с ИБС с целью верификации СИБР и лечения данного синдрома для снижения сердечно-сосудистого риска. Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых методов снижения сердечно-сосудистого риска у пациентов с ИБС, основанных на коррекции состава и метаболизма кишечной микрофлоры с помощью пробиотиков и антибиотиков.

Методология и методы исследования

Методологической основой исследования послужила совокупность клинических, лабораторно-инструментальных и статистических методов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с ишемической болезнью сердца имеются изменения в составе фекальной микрофлоры в сторону увеличения численности бактерий, продуцирующих триметиламин (*Verrucomicrobiaceae*, *Enterobacteriaceae*)

2. Метаболическая активность кишечного микробиома в отношении продукции ТМАО более высокая у пациентов с ишемической болезнью сердца в сравнении со здоровыми добровольцами

3. Пациенты с ишемической болезнью сердца употребляют больше продуктов, ассоциированных с повышением уровня ТМАО (говядина, свинина, молоко) в сравнении со здоровыми добровольцами, что может служить одним из механизмов увеличения сердечно-сосудистого риска

4. Наличие синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке коррелирует с увеличением концентрации ТМАО, при этом у пациентов с ишемической болезнью сердца частота выявления указанного синдрома достоверно выше

5. Увеличение массы тела имеет прямую связь с повышением концентрации ТМАО, тогда как другие факторы (возраст, пол, неблагоприятный семейный анамнез в отношении сердечно-сосудистых заболеваний, курение) не продемонстрировали такой зависимости

6. Добавление к стандартной терапии ишемической болезни сердца антибиотика рифаксимин позволяет вылечить синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке и уменьшает количество триметиламин-продуцирующих бактерий в фекальной микрофлоре, однако не влияет на продукцию ТМАО

7. Последовательное применение антибиотика рифаксимин и мультиштаммового пробиотика Флорасан Д способствует снижению уровня липопротеидов низкой плотности, липопротеидов очень низкой плотности и триглицеридов, и не влияет на систолическое артериальное давление и скорость агрегации тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца

8. Применение мультиштаммового пробиотика Флорасан Д без предварительной антибактериальной терапии не влияет на состав и метаболизм

кишечной микрофлоры, а также на показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ишемической болезнью сердца

Степень достоверности и апробация результатов

Оценка достоверности результатов научной работы осуществлялась с помощью современных методов статистического анализа данных. Полученные выводы соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Апробация диссертационной работы состоялась на заседании кафедры пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 15 ноября 2019 г.

Личный вклад автора в получении результатов

Автором лично выполнен обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, подготовлены публикации по теме исследования. Самостоятельно произведена подготовка образцов для анализов крови, водородный дыхательный тест с лактулозой для определения синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке. По завершению научной работы лично автором выполнен статистический анализ полученных результатов.

Внедрение результатов в практику

Основные положения диссертационной работы нашли практическое применение в отделении кардиологии Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В. Х. Василенко Сеченовского университета, используются для оптимизации лечения и используются в педагогическом и научно-исследовательском процессе кафедры пропедевтики

внутренних болезней Института клинической медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) .

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на XVII Всероссийской научно-практической конференции "Intestinum 2015. Воспаление, моторика, микробиом" (декабрь 2015 г); конференции «Патофизиология, клиника и последствия нарушений микробиоты (май 2018 г, Москва).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.01.04 - Внутренние болезни; формуле специальности: внутренние болезни - область медицинской науки, изучающая этиологию, патогенез, семиотику, диагностику, прогноз и профилактику заболеваний внутренних органов; области исследований согласно пунктам 1, 2, 4, 5.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, входящие в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 1 из которых также индексируется в SCOPUS.

Объём и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 132 страницах машинописного текста. Работа включает: введение, 4 главы, выводы, практические рекомендации и список сокращений. Библиографический указатель содержит 78 источников литературы . Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 32 рисунками.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Микробиота - фундаментальный фактор, определяющий здоровье человека

В настоящее время во всем научном мире отмечается повышенный интерес к изучению микробиоты человека и ее влиянию на здоровье. Микрофлора, или микробиота, представляет собой совокупность микроорганизмов, колонизирующих органы и ткани человека, таких как кожа, полость рта, влагалище, протоки молочных желез. Наибольшая концентрация микроорганизмов в организме человека обнаруживается в толстой кишке (около 100 триллионов, состоящих из более 1000 видов).

Микроорганизмы, населяющие организм человека, в большинстве своем относятся к домену «Bacteria» — прокариотов, представленных эубактериями, чуть меньше среди них прокариот из домена «Archaea», представленного архебактериями. Каждый домен, согласно принятой классификации, включает в себя царства, типы, классы, порядки, семейства, роды, виды. Одной из основных таксономических категорий служит вид — совокупность особей, объединенных по близким свойствам, но отличающихся от других представителей рода [13].

Отношения между организмом человека и населяющей его микрофлорой длительное время рассматривались как комменсальные, в которых выгоду от взаимодействия получает лишь один участник, а именно микроорганизм. В настоящее время, с расширением знаний о функциях микрофлоры эта гипотеза пересмотрена в пользу симбиотических отношений, построенных за взаимной выгоде для всех участников процесса.

Заселение кишечника микроорганизмами начинается уже во время прохождения ребенка по родовым путям матери. Таким образом, первыми для

человека становятся бактерии из влагалища, представленные в норме преимущественно лакто- и бифидобактериями, и кишечная флора матери из находящегося рядом анального отверстия, далее разнообразие видов увеличивается за счет анаэробных микроорганизмов, поступающая из протоков молочной железы вместе с молозивом, а также находящаяся на коже соска [13,14].

Существенные изменения в составе микробиоты кишечника происходят далее при отмене грудного вскармливания, а также при прорезывании зубов ребенка. При этом интенсивное выделение соляной кислоты начинается в возрасте около трех месяцев, и лишь через несколько лет ее концентрация достигнет уровня взрослого человека, что способствует интенсивному бактериальному заселению желудочно-кишечного тракта в первые годы жизни человека. К первому году жизни у ребенка формируется собственный уникальный микробный профиль, который в норме характеризуется преобладанием бактерий типа *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. К 2,5 годам он становится близок к взрослому профилю, с преобладанием *Firmicutes* и *Bacteroides* [13].

1.2 Структура и функция микробиома человека: из глубины истории к медицине, основанной на доказательствах

История изучения взаимодействия человека с его микробиомом насчитывает несколько веков. В 1681 г. А. Левенгуком в человеческих фекалиях были обнаружены микроорганизмы и выдвинута гипотеза о совместном существовании различных видов бактерий в желудочно–кишечном тракте.

Одним из основоположников учения о симбионтной микрофлоре и ее влиянии на организм человека явился великий русский ученый, лауреат Нобелевской премии И.И. Мечников. Еще в 1888 г. он высказал предположение, что причиной возникновения многих болезней является совокупное действие на

клетки и ткани макроорганизма разнообразных токсинов и других метаболитов, продуцируемых бактериями, во множестве обитающих в пищеварительном тракте. В своих работах «Этюды оптимизма» и «Этюды о природе человека» И.И. Мечников писал о том, что многочисленные ассоциации микробов, населяющих кишечник человека, в значительной мере определяют его духовное и физическое здоровье. Ученым было выдвинуто предположение о связи ряда соматических заболеваний с деятельностью микроорганизмов. Он писал, что "со временем, вероятно, удастся открыть паразитов не только при болезнях типично инфекционного характера, но и при болезнях совершенно другого рода" [15].

"Второе дыхание" учение о кишечной микрофлоре получило уже в 70–е годы, во многом благодаря работам А.М. Уголева (1926–1991), обосновавшего концепцию нарушения качественного и количественного состава микрофлоры и ее связи со здоровьем человека [15].

Появление новых методов диагностики позволило совершенно по–новому взглянуть на кишечную микробиоту. В 1999 г. был внедрен метод секвенирования (определение нуклеотидной последовательности) гена 16S РНК. Указанный ген существует в геноме бактерий, но отсутствует у эукариот и вирусов, что позволяет его использовать для видовой идентификации бактерий [16].

Многие проекты сегодня посвящены изучению состава нормального микробиома и его изменений при различных заболеваниях. Самый масштабный среди них, "Микробиом человека" (Human Microbiome Project), был инициирован в 2008 году в США. В исследовании участвовали 200 ученых почти из 80 научно-исследовательских институтов США. Результаты были опубликованы в июне 2012 г. в журналах Nature и Public Library of Science. Исследователями были собраны образцы тканей из полости рта, носа и носоглотки, гортани, различных мест на коже, желудочно-кишечного тракта, влагалища. При помощи секвенирования произведено отделение бактериальной ДНК от человеческой, что позволило

установить состав нормальной флоры. По результатам генетического анализа собранного материала было выявлено, что в организме человека обитает более 10 тысяч видов различных микробов. Количество бактериальных генов в человеке в 360 раз превосходит число его собственных [17].

На основании полученных данных были сделаны заключения, что основными функциями кишечной микробиоты на сегодня являются следующие:

1. Защитная функция - предотвращение избыточной колонизации условно-патогенными и патогенными микроорганизмами.
2. Метаболическая функция - участие в обмене углеводов, липидов, белков и других веществ макроорганизма с образованием метаболитов, выполняющих определенную роль, в том числе энергообеспечение эпителия
3. Детоксикационная функция - способность нейтрализации и утилизации экзогенных и эндогенных токсических веществ, регуляция цитохромов P450 в печени и продукция P450-схожих цитохромов
4. Синтетическая функция - синтез витаминов В, К, никотиновой кислоты
5. Иммунная функция - взаимодействие кишечной микрофлоры с лимфоидной тканью кишки в качестве антигена
6. Газообразовательная функция - регуляция газового состава различных отделов ЖКТ
7. Генетическая функция - влияние на репликацию и экспрессию генов прокариотических и эукариотических клеток.
8. Гомеостатическая функция - влияние на водно-солевой обмен и ионный гомеостаз макроорганизма
9. Нейротропная функция - влияние на регуляцию энтеральной и центральной нервной системы

Исследование MetaHIT позволило выделить 3 основных энтеротипа, а именно:

- Энтеротип 1 (преобладание *Bacteroides*)
- Энтеротип 2 (преобладание *Prevotella*)
- Энтеротип 3 (преобладание *Ruminococcus*)

Бактерии энтеротипа 1 содержат гены протеаз, гексоаминидаз и способствуют получению энергии для колоноцитов из углеводов и белков. Метаболическая активность энтеротипа 2 направлена на расщепление гликопротеидов муцина. Энтеротип 3, наравне с муцин-лизирующей функцией, влияет и на мембранный транспорт сахаров. К примеру, синтез биотина, рибофлавина, аскорбата протекает при участии энтеротипа 1, в то время как за синтез тиамина и фолатов ответственен энтеротип 2.

Тем не менее, концепция разделения микробиоты на энтеротипы не позволяет объяснить относительное распределение различных классов микроорганизмов у индивидов. Ввиду того, что *Bacteroides* и *Prevotella* существуют в разных пропорциях в кишечнике, была предложена гипотеза энтероградиента, основанная на преобладании одного из двух указанных организмов в том или ином отделе. В целом, согласно MetaHIT, доминирование родов *Bacteroides*, *Prevotella* и *Ruminococcus*, наряду с незначительной фракцией типа *Proteobacteria* служит признаком здорового микробиома [17].

Понятие "нормальный микробиом" и правомочность существования такого термина остается предметом дискуссии.

Согласно современным представлениям, кишечная микробиота здоровых людей представлена преимущественно типами *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, чуть менее распространены типы *Actinobacteria* и *Verrucomicrobia*. Несмотря на то, что общий микробный профиль относительно постоянен для индивидов, возможны его временные изменения на уровне рода и за его пределами.

В разных отделах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) преобладают различные виды бактерий и в разном количестве. В пищеводе это *Streptococcus*, *Prevotella* и *Velionella*, в желудке - *Proteobacteria*, *Streptococcus* и *Prevotella*, в начальных отделах кишечника, в двенадцатиперстной кишке, в большом количестве обнаруживаются *Lactobacillus*, *Velionella* и *Clostridium spp.*, в дистальных отделах тонкой кишки - *Enterobacteria*, *Bifidobacteria*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* и *Clostridium spp.*

Толстая кишка заселена наибольшим количеством бактерий. В целом, в результате проведенных исследований, было выявлено доминирование двух типов бактерий, *Bacteroidetes* и *Firmicutes* (~95%). Такие типы как *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia* обнаруживаются в составе нормальной микрофлоры, но в гораздо меньших количествах. Кроме того среди здоровой микробиоты могут встречаться метанопродуцирующие археобактерии, которые не содержат пептидогликан в клеточной стенке и имеют особые рибосомы и рибосомные РНК (обычно *Methanobrevibacter smithii*), а также эукариоты (дрожжи) и вирусы (фаги) [17, 18].

Следует отметить, что состав пристеночной микробиоты кишки и внутрипросветной микрофлоры может также не совпадать. Роды *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* и *Ruminococcus* доминируют в просвете кишки и могут быть обнаружены в образцах кала, в то время как *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *Akkermansia* являются основными обитателями пристеночной слизи и слизистой оболочки кишки и в основном обнаруживаются лишь при взятии биопсии [17].

Различия наблюдаются и в количестве бактерий в разных отделах ЖКТ, увеличиваясь от проксимальных отделов кишки к дистальным: в

двенадцатиперстной кишке их в норме $0 - 10^3/\text{г}$ содержимого, в тощей и слепой - $10^6 - 10^8/\text{г}$ содержимого, в толстой - 10^9 до $10^{11}/\text{г}$ содержимого [18, 19].

Таким образом, состав микробиома может значительно различаться у каждого человека в зависимости от многих факторов, в том числе под воздействием окружающей среды и питания.

1.3 Диета - важный фактор изменения микробиома человека

В одном из выдающихся исследований по проблеме влияния питания на состав кишечного микробиома человека, Lawrence A. et al. продемонстрировали, что даже кратковременные изменения в диете приводят к изменению состава микробного сообщества человека. Задача ученых состояла в определении, насколько быстро происходят качественные и количественные изменения в составе микробиома кишечника при переходе на диету, состоящую исключительно из продуктов растительного или животного происхождения. В исследовании приняли участие волонтеры, в возрасте от 21 до 33 лет с индексом массы тела от 19 до 32 кг/м². Диета, основанная на продуктах животного происхождения включала мясо, сыры, яйца, в то время как растительная диета - злаки, бобовые, овощи и фрукты. Таким образом, первая группа получала в рационе больше белков, вторая - углеводов. Однако было предусмотрено одинаковое количество калорий. Изначально и в каждый день во время соблюдения диеты у участников забирались образцы кала, в которых по данным анализа микробных 16 S рибосомных РНК идентифицирован состав микрофлоры. Результаты продемонстрировали способность микробного сообщества к изменению в течение даже одного дня после изменения пищевых привычек. В большей степени это касалось перехода на диету, основанную на пище животного происхождения. При этом происходит повышение количества

микроорганизмов, толерантных к желчи, таких как *Alistipes*, *Bilophila* и *Bacteroides*, и снижению уровней *Firmicutes*, ферментирующих полисахариды из растительной клетчатки (*Roseburia*, *Eubacterium rectale* и *Ruminococcus bromii*). Указанное исследование, таким образом, продемонстрировало способность микробного сообщества быстро реагировать на изменения и адаптироваться к ним соответственно нуждам макроорганизма [20].

et al. была изучена связь не только с пищевыми стереотипами и изменениями микробиома, но и с географическим фактором. Сравнению подверглись составы фекальной микрофлоры европейских детей и их ровесников из сельской местности Африки. Основу рациона детей из Европы составила так называемая "западная диета", с высоким содержанием жиров и сахара, в то время как пища детей из Африки преимущественно состояла из растительных компонентов, с наличием большого количества клетчатки. После секвенирования геномов микроорганизмов в образцах кала, ученые обнаружили существенную разницу между двумя группами детей: у африканцев обнаруживались преимущественно типы бактерий, гидролизующие целлюлозу (*Prevotella* и *Xylanibacter*), а также большее, чем у европейцев количество короткоцепочечных жирных кислоты, которые продуцируются микрофлорой кишечника. В то же время условно-патогенные бактерии, такие как *Enterobacteriaceae* (*Shigella* и *Escherichia*) у африканских детей определялись в значительно меньшем количестве, чем у европейских. На основании полученных данных учеными сделан вывод о влиянии диеты и географических различий на состав микробиома [21].

Дальнейшие исследования были посвящены изучению влияния тех или иных нутриентов на состояние микробиома и здоровье его хозяина.

1.4 Вклад микробиома человека в развитие сердечно-сосудистых заболеваний

Сердечно-сосудистые заболевания служат одной из основных причин смерти во всем мире. Ввиду этого многие исследования посвящены выявлению и минимизации факторов сердечно-сосудистого риска, то есть вероятности развития того или иного неблагоприятного события со стороны сердечно-сосудистой системы в течение определённого периода времени. Существует много способов оценки сердечно-сосудистого риска, среди них шкалы оценки риска, такие как FRAMINGEM (США), PROCAM (Германия), Q-RICK (Великобритания), ASSIGN (Швеция), QUORE (Италия). Однако самой популярной служит шкала SCORE, которая базируется на таких показателях, как возраст, пол, курение, уровень систолического артериального давления и общего холестерина [22].

В значительной степени сердечно-сосудистая смертность обусловлена осложнениями ишемической болезни сердца (ИБС). ИБС представляет собой хроническое заболевание, характеризующейся эпизодами обратимого несоответствия между потребностями миокарда в кислороде и их обеспечением, в связи с ишемией и гипоксией, которые обычно провоцируются физической и эмоциональной нагрузкой.

В основе традиционных представлений о патогенезе ИБС лежит концепция длительного прогрессирующего поражения коронарных артерий атеросклерозом, а также функциональных нарушений в микрососудистом русле [23]. Указанные факторы служат препятствием для достаточного снабжения сердечной мышцы кислородом, что приводит к гипоксии и развитию характерной клинической картины. Стабильная ИБС, или стенокардия, клинически проявляется чувством дискомфорта или болью в грудной клетке сжимающего, давящего характера, которая локализуется чаще всего за грудиной и может иррадиировать в левую

руку, шею, нижнюю челюсть, эпигастральную область. Боль проходит в покое через 3-5 мин или в течение нескольких минут после сублингвального приема нитроглицерина. Выделяют 4 функциональных класса стабильной стенокардии.

Функциональный класс I: обычный уровень физической нагрузки не вызывает приступа стенокардии, она возникает развивается при значительном или длительном напряжении (усилии).

Функциональный класс II: небольшое ограничение обычной активности. Приступы боли отмечаются при ходьбе на расстояние > 2 кварталов (> 500 м) по ровной местности, при подъеме на > 1 пролет обычных ступенек, в нормальном темпе.

Функциональный класс III: значительное ограничение обычной физической активности. Стенокардия возникает при ходьбе на 1-2 квартала (< 500 м) по ровной местности, при подъеме на 1 пролет обычных ступенек, в нормальном темпе.

Функциональный класс IV: неспособность переносить любую физическую нагрузку без появления симптомов стенокардии. Приступы боли могут присутствовать в покое.

Современная терапия ИБС, а именно назначение нитроглицерина, бета-блокаторов, статинов, антиагрегантов, направлена на улучшение кровоснабжения сердечной мышцы, предотвращения тромбообразования, замедления прогрессирования атеросклеротического поражения коронарных сосудов [24].

Атеросклероз представляет собой хроническое заболевание артерий эластического и мышечного типа, сопровождающееся отложением холестерина и липопротеидов в интима сосудов [25]. Длительное время доминирующей в развитии атеросклероза была так называемая липидная теория, объясняющая развитие данного заболевания нарушением равновесия между прямым и обратным

транспортом холестерина ввиду его избыточного поступления с пищей и гиперпродукцией в организме.

Тем не менее, несмотря на убедительные данные относительно роли липидов в развитии атеросклероза, очевидно, что этот фактор отнюдь не является единственным важным. Наряду с липидной теорией были также высказаны многие другие гипотезы, например, такие как аутоиммунная, воспалительная, вирусная, генетическая, теория дисфункции эндотелия [6].

В настоящее время ученые не пришли к единой концепции формирования атеросклероза, и данное заболевание рассматривается как полиэтиологическое. Доступность новых методов исследования позволяет выделить неизвестные ранее факторы, способствующие атерогенезу. Согласно полученным данным, состав и метаболизм кишечного микробиома может влиять на прогрессирование атеросклероза у животных и человека. Указанное влияние осуществляется посредством множества взаимосвязанных факторов.

В современной медицине традиционно рассматривается концепция, согласно которой несбалансированное питание с избытком углеводов и жиров ведет к развитию атеросклероза сосудов, ожирения и некоторых других процессов, результирующих увеличением сердечно-сосудистого риска для индивида.

Диета служит одним из способов модификации факторов риска у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, и находится в тесной связи с микробиомом человека [26].

В результате изучения метаболизма микрофлоры кишечника и ее тесной ассоциации с метаболическими процессами организма-хозяина в исследованиях было доказано активное участие микробиоты в развитии таких симптомов, как инсулинорезистентность и ожирение, которые в свою очередь неотделимы от патогенеза заболеваний сердца и сосудов. [27, 28]

Микробиом пациентов, страдающих ожирением, метаболическим синдромом, сахарным диабетом, существенно отличается от микробиома здоровых лиц в сторону преобладания бактерий типа *Firmicutes* и уменьшения бактерий типа *Bacteroidetes*, что предположительно способствует усиленному отложению липидов в тканях [28].

Полученные данные свидетельствуют об изменениях структуры микробиоты при атеросклерозе. Так, при клинически значимом стенозе сонной артерии определялось преобладание в кишечнике бактерий *Collinsella* в сравнении с доминированием в контрольной группе *Roseburia* and *Eubacterium* [29].

При изучении изменений микробиома кишечника у пациентов с ишемической болезнью сердца было обнаружено повышение количества микроорганизмов родов *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, и значительно снижено количество представителей типа *Bacteroidetes*, который, предположительно, обладает атеропротективным эффектом [30].

Развитие лабораторных методов, позволяющих определить количество низкомолекулярных метаболитов в той или иной среде, открыло новую главу в изучении функций микробиома человека. Появилась возможность не только узнать состав микрофлоры, но и обнаружить вещества, продуцируемые бактериями, с отслеживанием дальнейшего пути их превращения.

При изучении метаболического профиля плазмы крови у пациентов, впоследствии перенесших инфаркт миокарда или инсульт, были выделены молекулы триметиламина (ТМА) и его продукта триметиламин-N-оксида (ТМАО). Концентрация ТМАО при этом имела прямую достоверную корреляцию с возрастанием сердечно-сосудистого риска и развитием ИБС. Так получила свое начало еще одна гипотеза развития атеросклероза [10].

1.5 Физиологическая роль ТМАО

ТМАО представляет собой органическое соединение, относящееся к классу оксидов азота с формулой $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$. (Рисунок 1)

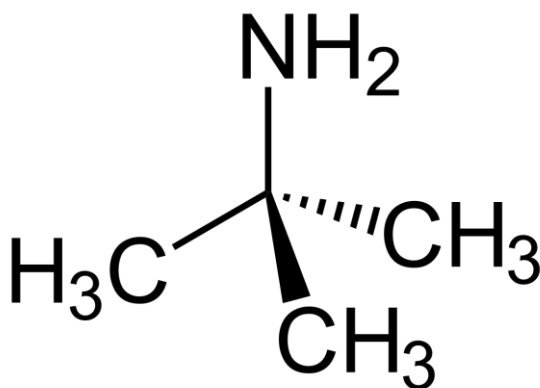


Рисунок 1. Структура триметиламин-N-оксида

В исследованиях получены убедительные данные о вовлечении ТМАО в важные биологические функции у многих живых организмов, от бактерий до млекопитающих [4].

Являясь биологически активной молекулой, ТМАО способен влиять на структуру и функцию других химических образований. Известна его роль в стабилизации молекул белков и противодействии белковой денатурации под воздействием температуры и давления [4, 5].

Функция контроля объема клетки - одна из важнейших для любого организма, как одноклеточного, так и многоклеточного. Способность к поддержанию объема осуществляется благодаря осмолитам, которые помогают адаптации клетки к осмотическому и гидростатическому воздействию. В исследованиях продемонстрирована роль ТМАО в качестве осмолита за счет способности формировать прочные связи его гидрофильной части с водой, что

также косвенно влияет на полярность белковых молекул. Почки млекопитающих способны к накоплению ТМАО, что предположительно имеет протективный эффект и защищает белки почечных клеток от вредного воздействия мочевины. Предположительно, ТМАО способен уменьшать негативное влияние колебания осмолярности, при ее выраженных изменениях в органах и тканях, в том числе в кровеносной системе. Клетки ЖКТ также могут подвергаться осмотическому стрессу, ввиду того, что осмолярность диеты меняется в широких пределах [4].

ТМАО обнаруживается в организме большинства животных, а также присутствует в растениях и грибах. Его источником у разных живых существ может быть как экзогенный, так и эндогенный пути доставки. Так, у человека выработка ТМАО осуществляется в печени путем окисления молекулы-предшественника ТМА, образующейся в результате метаболизма кишечной микрофлоры. (Рисунок 2)

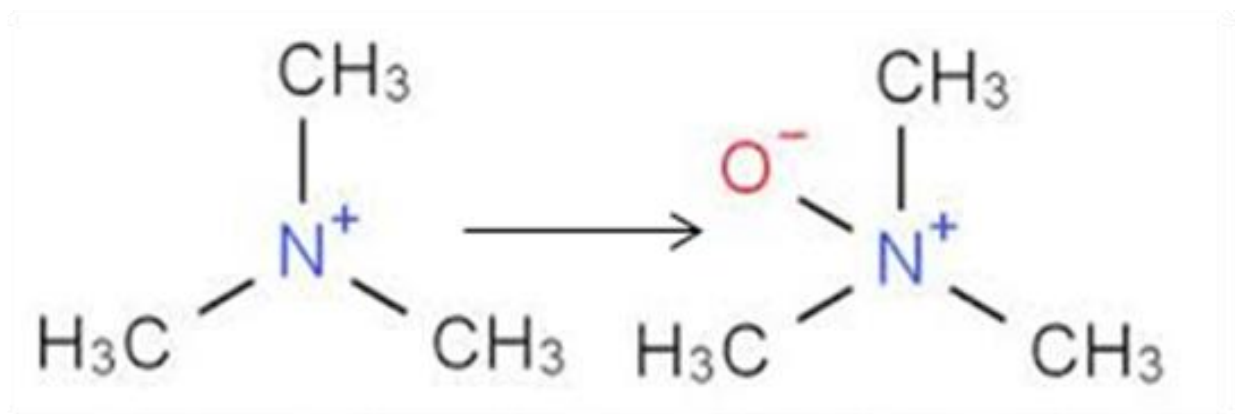


Рисунок 2. Окисление молекулы ТМА до ТМАО

В противоположность этому, морские обитатели сами синтезируют ТМАО, при этом у них наблюдаются наибольшие концентрации указанного метаболита среди всех животных. При длительном хранении морепродуктов бактерии,

восстанавливающие ТМАО до ТМА, способствуют выработке характерного запаха разложения морских обитателей [4].

Бактерии используют ТМАО в качестве акцептора электронов. Можно выделить три основные среды обитания этих микроорганизмов: морская (*Alteromonas* и *Vibrio*), водоемы с невысокой соленостью (фосфорилирующие бактерии) и кишечник животных (*Enterobacteriaceae*). Для морских бактерий ТМАО служит крайне важным нутриентом и участвует в глобальной циркуляции водорода и азота [4].

Микрофлора кишечника млекопитающих катализирует продукцию множества метиламинов, не только триметиламина, но ди- и моноаминов [31].

У *Enterobacteriaceae*, обычных обитателей микрофлоры кишечника человека, анаэробное дыхание с участием ТМАО способствует процессам окислительного фосфорилирования. Существуют данные о способности указанного метаболита подавлять рост *Staphylococcus aureus* в кишечнике, служащего важным патогеном для человека и животных [5].

Концентрация ТМАО в крови человека у здоровых лиц остается спорным вопросом. По данным Bain et al она определяется на уровне $37,8 \pm 20,4$ мкмоль/л (2110 ± 1139 нг/мл), согласно исследованию Duranton et al нормальное значение ТМАО составило $38,81 \pm 20,37$ мкмоль/л (2167 ± 1139 нг/мл) [32, 33]. Группой авторов из Кливленда (Wang et al), посвятивших много работ влиянию ТМАО на сердечно-сосудистую систему, среднее значение данного метаболита в крови у здоровых добровольцев составило $3,5$ мкмоль/л (195 нг/мл) [33].

1.6 Место фосфатидилхолина в метаболических процессах организма человека и животных и его роль в увеличении риска сердечно-сосудистых заболеваний

Фосфатидилхолин (лецитин) служит важным источником экзогенного холина, нутриента из семейства витаминов группы В. Холин участвует во множестве метаболических процессов в организме, играет значительную роль в липидном обмене и строительстве мембран клеток, а также является предшественником в синтезе нейротрансмиттера ацетилхолина. Холин и некоторые из его метаболитов, такие как бетаин, могут также служить донорами метильных групп в обмене аминокислот. Также фосфатидилхолин обнаруживается во многих пищевых продуктах. В большом количестве его выявляют в яичном желтке, рыбе, брокколи, бобовых [3, 35].

Фосфатидилхолин и холин служат субстратом для образования ТМАО. С помощью меченого дейтерием-9 фосфатидилхолина (d-9 ФХ), был прослежен путь превращения его в ТМА, а затем в ТМАО. Эксперимент проводился на мышах, получающих корм, содержащий d-9 ФХ. В результате обнаруживалось зависимое от времени превращение d-9 ФХ - d-9 -холин- d-9 ТМА- d-9 ТМАО. Однако при подавлении роста микрофлоры антибиотиками широкого спектра действия в течение трех недель происходило одновременное подавление выделения указанных метаболитов. Таким образом, исследователи представили неоспоримое доказательство роли кишечной микрофлоры в образовании веществ, способствующих развитию сердечно-сосудистых заболеваний [35].

Для подтверждения гипотезы об участии ТМА и ТМАО в увеличении степени сердечно-сосудистого риска ученые исследовали уровни ТМАО, холина и бетаина у стабильных пациентов с ишемической болезнью сердца, периферическим атеросклерозом, инфарктом миокарда в анамнезе (N=1862).

После устранения сопутствующих факторов, отмечалась зависимость от дозы ассоциация указанных метаболитов и наличия сердечно-сосудистых заболеваний.

Следующей частью эксперимента данной группы ученых было выявление причин влияния продуктов ФХ на поражение сердца и сосудов. Для этого группа специально выведенных склонных к развитию атеросклероза мышей получала корм с добавлением холина или ТМАО, контрольная группа -обычный корм. В возрасте 20 недель у первой группы животных отмечено ускоренное образование атеросклероза аорты, как при получении холина, так и ТМАО, в сравнении с контролем. При этом уровни в крови холестерина, триглицеридов, липопротеидов, глюкозы, а также содержание триглицеридов в печени не продемонстрировали значимого увеличения, то есть не могли считаться основной причиной развития атеросклеротического поражения. Интересно также, что в обеих группах мышей определялась выраженная положительная корреляция между плазменными уровнями ТМАО и размером атеросклеротической бляшки. У мышей женского пола, изначально более предрасположенных к развитию атеросклероза уровни ТМАО были выше, чем у мышей мужского пола, даже при обычном питании. В продолжение эксперимента были оценены гендерные различия в содержании ТМАО у людей, их, в отличие от животных, достоверно выявлено не было. Несмотря на это, у субъектов, подвергшихся коронарной ангиографии, выявлена явная зависимость от дозы взаимосвязь уровней ТМАО и размера атеросклеротических бляшек.

Отдельное внимание исследователи уделили ферментам - печеночные флавиновые монооксигеназы (ФМО), повышение экспрессии которых определяется как у мышей, так и у людей при употреблении в пищу ФХ. Их биохимическая роль в изучаемом процессе, как выяснили исследователи, состоит в непосредственном превращении ТМА в ТМАО. Для проверки гипотезы были подвергнуты анализу образцы ткани печени после биопсии и плазма крови. В

результате было обнаружено, что концентрация многих ФМО, главная из которых ФМО-3, существенно коррелирует с атеросклеротическим поражением аорты, уровнем липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и ТМАО. Тем самым подтвердилось участие данных ферментов в развитии сердечно-сосудистых заболеваний.

Однако важно было не только найти взаимосвязь между двумя явлениями, такими как увеличение концентрации ТМАО в крови и развитием сердечно-сосудистой патологии, но и выяснить ее причины и механизмы.

Для этого у мышей, получавших в дополнение к стандартному корму пищевую добавку в виде холина, ТМАО или бетаина более 3 недель, уровни поверхностных рецепторов CD36 и SR-A1 были определены в перитонеальных макрофагах. В сравнении с контролем, внесение в диету любой из указанных добавок приводило к увеличению экспрессии CD36 и SR-A1, проатерогенных рецепторов, участвующих в захвате ЛПНП в крови и их окислении.

Также была изучена скорость накопления липидов в периферических макрофагах, или формирование так называемых "пенистых макрофагов" у мышей, получавших холин, ТМАО или бетаин и контрольной группы (без добавок). Согласно полученным данным, в контрольной группе наблюдалось медленное накопление липидов в макрофагах, в то время как на диете с добавками к корму ученые отметили выраженное ускорение этого процесса. Подавление кишечной микрофлоры антибиотиками широкого спектра действия значительно ингибировало формирование "пенистых макрофагов". Изучение корня аорты до и после применения антибиотиков продемонстрировало аналогичные результаты. Ученые сделали вывод о том, что механизм влияния ТМАО на развитие атеросклероза заключается в нарушении равновесия в системе прямого и обратного транспорта холестерина в тканях со сдвигом его в сторону ускорения

накопления липопротеидов и замедления их высвобождения, что приводит к накоплению холестерина в стенках артерий [35]. (Рисунок 3)

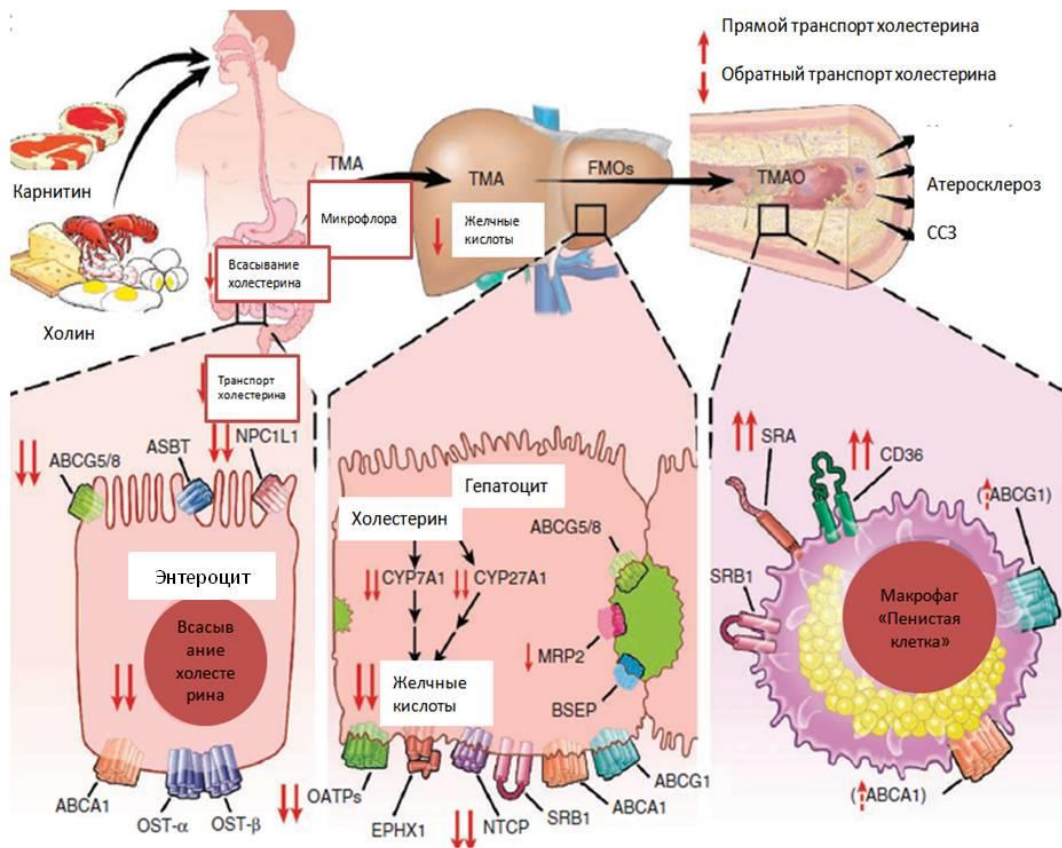


Рисунок 3. Предполагаемый механизм влияния ТМАО на ускорение развития атеросклероза.

Однако следует отметить, что холин является необходимым питательным веществом, недостаток в организме холина и бетаина в результате эпигенетических изменений (повышения экспрессии проатеросклеротических генов и уменьшения экспрессии протективных противоатеросклеротических генов) способен также привести к ускорению развития атеросклероза [36]. Также получены данные о связи недостаточности холина и метионина у мышей с развитием стеатогепатита [37].

Ученые продолжили изучение роли микрофлоры и продуцируемого ей ТМАО в следующем исследовании, участниками которого были только люди. Для оценки связи между метаболизмом микробиоты кишечника и сердечно-сосудистыми заболеваниями у группы здоровых волонтеров после приема фосфатидилхолина оценивались уровни ТМАО в крови и моче, а также бетаина и холина в крови до и после подавления кишечной микробиоты с помощью антибиотиков широкого спектра действия. Результаты эксперимента на здоровых добровольцах продемонстрировали подавление выработки ТМАО после назначения антибиотиков и возобновление его продукции после отмены терапии. (Рисунок 4)

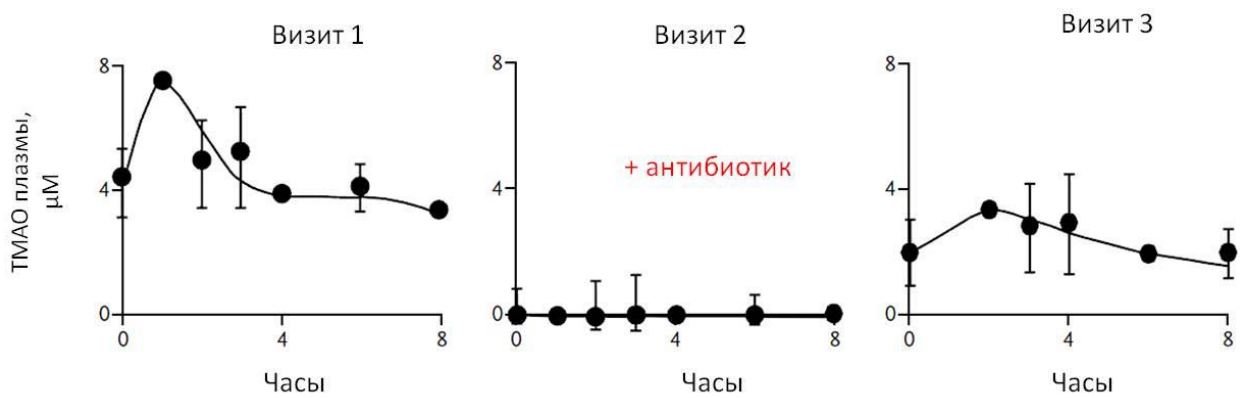


Рисунок 4. Влияние подавления кишечной микрофлоры с помощью антибиотика широкого спектра действия на концентрацию ТМАО у здоровых добровольцев.

Вторая часть исследования была посвящена оценке отношения уровней ТМАО и развитием сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркт миокарда, инсульт, включая смертельные исходы) в течение 3 лет. Участниками стало более 4 тысяч больных, у которых проводилась коронарная ангиография. В группе страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями отмечалась статистически достоверная ассоциация ($P < 0.001$) между повышенным уровнем ТМАО и возрастанием сердечно-сосудистого риска. (3) (Рисунок 5)

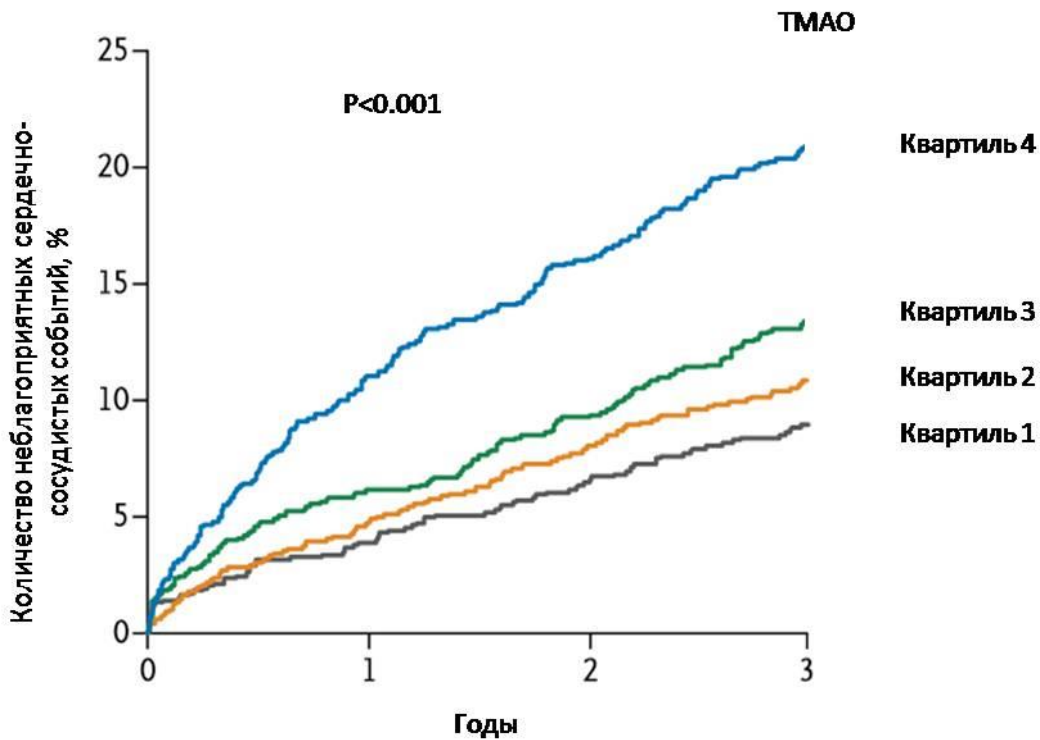


Рисунок 5. Связь между уровнем ТМАО и количеством неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

С учетом важной роли изменений агрегации тромбоцитов в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, Zhu et al. провели эксперимент с участием двух генетически разных видов мышей NZW/LacJ (низкий уровень ТМАО) и C57BL/6J (высокий уровень ТМАО), получавших в составе корма холин или ТМАО. При

трансплантации микрофлоры из слепой кишки стерильным мышам их предрасположенность к тромбозам изменялась в зависимости от вида мышей-доноров, также как и уровень ТМАО. Ученые сделали вывод относительно передачи предрасположенности к нарушению агрегации тромбоцитов вместе с трансплантацией микрофлоры из слепой кишки. Влияние ТМАО в данной работе объясняется его способностью к стимуляции тромбоцитов путем ускорения высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточного депо. Авторами также предположено наличие особых рецепторов к ТМАО на поверхности тромбоцитов [38]. (Рисунок 6)

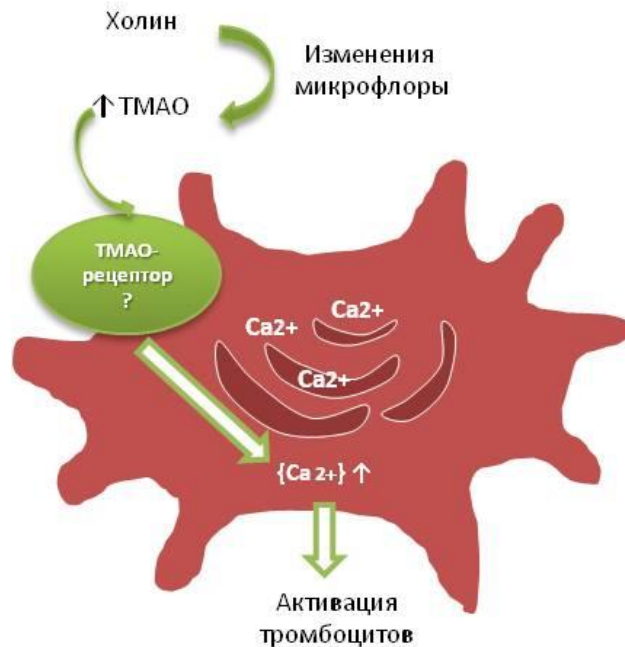


Рисунок 6. Предполагаемый механизм влияния ТМАО на активацию тромбоцитов

При уточнении взаимосвязи между тромбозами, их последствиями (острое нарушение мозгового кровообращения, инфаркт миокарда) у людей ($n > 4,000$) и уровнем ТМАО было выявлено, что последний может служить независимым предиктором указанных сердечно-сосудистых катастроф [38].

Далее Zhu et al. провели исследование в отношении влияния холина на скорость агрегации тромбоцитов у здоровых добровольцев, которых разделили на вегетарианцев (n=8) и так называемых всеядных, то есть людей употребляющих пищу растительного и животного происхождения (n=10). Участники получали 1000 мг холина в день в виде биологической добавки в течение двух месяцев. В результате в обеих группах отмечено более чем 10-кратное увеличение концентрации ТМАО ($p < 0.05$), а также ассоциация между повышением ТМАО и скорости агрегации тромбоцитов ($p < 0.05$) [39]. (Рисунок 7)

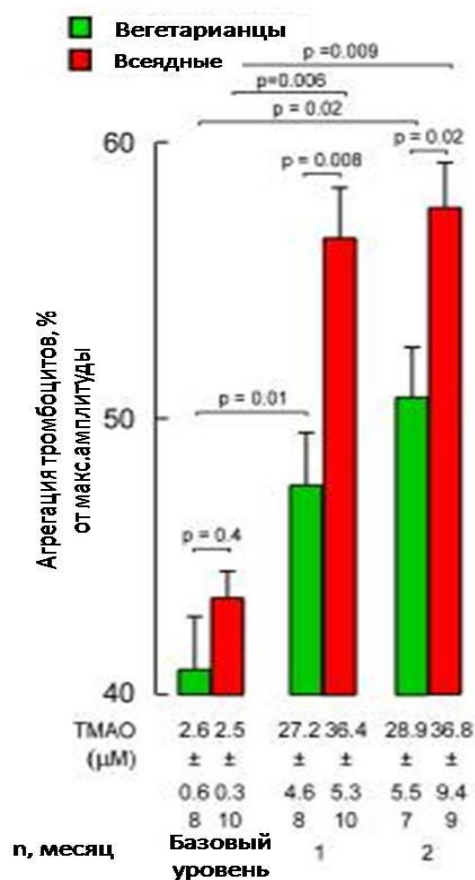


Рисунок 7. Влияние уровня ТМАО на скорость агрегации тромбоцитов у всеядных людей и вегетарианцев.

Авторы заключили, что в перспективе возможна разработка первичной профилактики тромбообразования с помощью низких доз аспирина на основании уровня ТМАО.

Гипертоническая болезнь и ее осложнения также служат одной из важных причин смерти от ССЗ. Проведенные исследования в отношении связи между употреблением холина, повышением концентрации ТМАО и увеличением артериального давления не продемонстрировали значимой корреляции между данными показателями. В экспериментах на животных получены данные о возможном потенцирующем действии ТМАО в отношении ангиотензина II [40]. Также зафиксировано достоверное увеличение частоты инсультов у пациентов с гипертонической болезнью при повышении концентрации ТМАО [41]. Тем не менее, при оценке взаимосвязи между повышением артериального давления и содержанием холина в рационе взрослых людей ($n = 9227$) ученые таковой не выявили. Ввиду этого, влияние ТМАО на показатели артериального давления требует дальнейшего изучения.

1.7 L-карнитин: изменение сердечно-сосудистого риска у животных и людей

Одним из продуктов, подвергнутых изучению во многих исследованиях в связи с увеличением сердечно-сосудистого риска, является красное мясо (говядина, телятина, свинина, баранина, утка). Существует много гипотез относительно причин роста риска развития сердечно-сосудистых заболеваний при частом употреблении красного мяса, в качестве "виновников" в исследованиях представлены высокое содержание соли и гетероциклических молекул, образующихся при термической обработке мяса, насыщенные жирные кислоты, нитрозамины [42, 43].

Анализ проспективных когортных исследований не продемонстрировал существенной связи между непосредственным употреблением насыщенных жирных кислот и развитием сердечно-сосудистых заболеваний, что позволяет предположить вклад других факторов в увеличение сердечно-сосудистого риска при избыточном употреблении красного мяса [44].

К таким факторам, согласно некоторым работам, можно отнести L-карнитин. Схожий по химической структуре с холином, он был впервые выделен из красного мяса, вследствие чего имеет название, восходящее к латинскому *carnis*. Являясь одним из главных компонентов красного мяса, L-карнитин поступает в организм вместе с пищей, а также продуцируется эндогенно у большинства млекопитающих из лизина.

Функцией L-карнитина является транспорт жирных кислот в митохондрии, участие в процессах окисления и образования антиоксидантов в организме. Употребление данного нутриента в индустриальных обществах с каждым годом увеличивается, в том числе благодаря широкому применению биологических добавок на его основе. В течение последних 30 лет L-карнитин добавляется в детские смеси по причине несовершенства механизмов его эндогенного биосинтеза у новорожденных [43]. Положительные аспекты и побочное воздействие L-карнитина в отношении здоровья людей продолжают изучаться.

В 2013 г R. Koeth et al. представили данные, согласно которым указанный нутриент, при избытке его в организме, способен ускорять развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Изначально была представлена гипотеза о том, что ввиду схожести структур холина и L-карнитина, они могут обладать и похожими метаболическими путями, связанными с жизнедеятельностью кишечной микрофлоры, а значит и подобными механизмами развития атеросклероза.

Масштабное исследование включало эксперимент как с участием животных, так и людей. Первая его часть посвящена изучению различий в продукции ТМАО у следующих групп здоровых добровольцев: всеядные (употребляющие пищу как животного, так и растительного происхождения), вегетарианцы (не употребляют мясо, рыбу) и веганы (отказ от употребления любой пищи животного происхождения, включая яйца, молоко и т.д.). У всех участников изучались базовый и постпрандиальный уровни ТМАО. У всеядной группы, участники которой обязательно употребляли красное мясо и d-3 меченый L-карнитин, определялась изначально высокая концентрация ТМАО в крови и моче, с значительным ее ростом после приема указанных компонентов. У вегетарианцев и веганов уровни ТМАО были ниже, существенного увеличения их после приема L-карнитина не отмечено. Так ученые продемонстрировали, что продукция ТМАО тесно связана с употреблением красного мяса.

Следующим шагом стало подтверждение влияния кишечной микрофлоры на формирование проатерогенного метаболита из L-карнитина. Как и в экспериментах на животных в прошлом, участники получали антибиотики широкого спектра действия (фторихнолоны) в течение недели, концентрация ТМАО оценивалась изначально и после курса препаратов соответственно. В результате было установлено, что антибиотики приводят к подавлению продукции ТМАО, с последующим медленным ее восстановлением через несколько недель, совместно с восстановлением микробиоты. Изучение состава микробных ДНК в образцах кала показало, что за производство ТМАО отвечают в основном бактерии рода *Prevotella*.

Еще одним этапом в исследовании стало подтверждение связи наличия карнитина в плазме крови с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, атеросклероз периферических артерий. В итоге после обработки результатов всех участников (n=2,595) такая взаимосвязь была

доказана ($p < 0.05$), в том числе и для таких патологических состояний, как инфаркт миокарда, инсульт.

Также как и в аналогичном исследовании ранее, проводившимся с фосфатидилхолином, ученые исследовали механизмы формирования атеросклероза при употреблении L-карнитина. Для этого одна группа мышей получала обычный корм, другая - корм с добавлением указанного вещества. У животных определяли уровни проатерогенных липопротеидов, глюкозы и инсулина; по завершению эксперимента произведено вскрытие с изучением корня аорты и печени. В итоге в группе, получавшей L-карнитин, в сравнении с контрольной, выявлялось существенное ускорение развития атеросклеротического поражения аорты, уровни липидов, глюкозы и инсулина при этом оставались невысокими, стеатоз печени не наблюдался. Следовательно развитие атеросклероза протекало согласно иным механизмам, связанным с карнитином и его метаболитами, а именно, с замедлением обратного транспорта холестерина из периферических тканей и пенистых макрофагов в кровь [44].

В доказательство этого исследованы мышинные перитонеальные макрофаги, на поверхности которых определялось увеличение числа захватывающих холестерин рецепторов *Abca1* и *Abcg1*. Также, при изучении состава м-РНК, выявлено снижение экспрессии генов белков-транспортеров желчных кислот (*Sur7a1* - главный белок синтеза желчных кислот, лимитирующий катаболизм холестерина; *Oatp1*, *Oatp4*, *Mrp2* и *Ntcp*) в печени, но не в кишечнике. Однако это привело к снижению концентрации желчных кислот в организме мышей в целом.

Прием корма с ТМАО привел к значительному снижению экспрессии обоих типов кишечных транспортеров холестерина - *Ncp1L1*, функция которого заключается в транспорте холестерина внутрь энтероцита из просвета кишечника, и *Abcg5- Abcg8*, который, напротив выводит его из энтероцита в просвет [44].

Таким образом, в совокупности, полученные данные продемонстрировали, что продуцируемый из карнитина кишечной микрофлорой метаболит ТМАО воздействовал на обмен холестерина и желчных кислот в организме мышей на разных уровнях, однако механизмы его влияния требуют дальнейшего изучения.

Collins Н. L. et al. в 2016 г для лучшего понимания всех этапов прогрессирования атеросклероза и влияния на этот процесс ТМАО провели эксперименты с ApoE^{-/-} мышами, которым с помощью генной инженерии был встроен ген белка-переносчика эфиров холестерина (СЕТР). Животных, разделенных на 5 групп (n=15 в каждой) кормили L-карнитином и/или метимазолом, ингибитором ФМО-3, предотвращающим образование ТМАО. Доза карнитина, в зависимости от группы, варьировала от 87 мг/кг до 352 мг/кг, что соответствовало эквивалентному суточному потреблению человеком (от 500 мг до 2000 мг в день). По истечении 12 недель были измерены концентрация ТМАО, липидов крови, изучены изменения аорты. В результате, более высокие дозы L-карнитина демонстрировали связь с повышением концентрации ТМАО. Тем не менее, вопреки полученным ранее данным, уровень ТМАО проявлял достоверную обратную связь с площадью атеросклеротического поражения аорты. В отношении липидного профиля не было отмечено существенных изменений, также как и его корреляции с ТМАО, что предполагает развитие атеросклероза вне зависимости от обмена холестерина. При изучении процессов захвата макрофагами холестерина, с образованием пенистых клеток, и его обратного транспорта также не выявлено статистически значимой разницы с ростом концентрации ТМАО в крови.

Исследователи пришли к заключению, что повышение концентрации ТМАО более, чем в 10 раз, в аналогии с организмом человека, согласно проведенному эксперименту, не влияет на изменения равновесия транспорта

холестерина в макрофагах. Более того, вопреки полученным ранее данным, ТМАО может иметь защитный эффект в отношении развития атеросклероза.

Различия между полученными данными в приведенных исследованиях могут быть объяснены следующими факторами. В первую очередь, имеет значение состав корма животных. Так, в экспериментах Koeth R et al. доза L-карнитина была существенно выше (1700 мг/кг), что нельзя назвать стандартной в переносе указанного количества в диету человека.

Также у мышей отсутствовал ген CETP, который позволяет приблизить последнюю модель (Collins H. L. et al.) к человеческой. Экспрессия CETP играет значительную роль в обратном транспорте холестерина, переносе его эфиров из липопротеидов высокой плотности в липопротеиды низкой плотности, и, соответственно, прогрессировании атеросклероза [45].

В отношении поражения аорты, выраженные изменения выявлялись в исследовании Koeth R et al. лишь у 4 животных из 11, не было определено влияния дозы ТМАО на сосудистые изменения (животные получали одинаковую дозу), что не способствовало пониманию взаимоотношений между концентрацией ТМАО и прогрессированием атеросклероза. Важную роль играет пол животных, в первых экспериментах мыши были самками, у Collins H. L. et al. - самцами, так как у самок больше вариантов экспрессии ФМО и более чем в 10 раз выше уровень ТМАО в среднем [45].

Таким образом, с учетом коррекции дозы L-карнитина, метаболизма холестерина и других факторов в экспериментальной модели Collins H. L. et al. продемонстрировали противоположные результаты в отношении влияния метаболита кишечной микрофлоры ТМАО, в сравнении с предыдущими исследованиями. Более того, они высказали сомнение в интерпретации связи между приемом антибиотиков на сокращение площади атеросклеротического поражения аорты и уменьшением концентрации ТМАО, ввиду способности

антибиотиков к снижению концентрации многих противовоспалительных маркеров у ApoE^{-/-} мышей [33]. Стоит отметить, что несмотря на заявленное отсутствие конфликта интересов, спонсором исследования Collins H. L. et al служит производитель биологических добавок, в том числе, с включением в них холина, фирма Lonza Inc.

1.8 Значение спектра и свойств микрофлоры в формировании ТМАО

Противоречивые данные относительно влияния предшественников ТМАО, холина и L-карнитина, на сердечно-сосудистый риск могли бы быть объяснены изменением состава кишечной микрофлоры и ее метаболической активности.

В 2015 г. Romano KA et. al. в эксперименте на стерильных мышах (гнотобионтах) продемонстрировали важную роль бактерий, относящихся к типам Firmicutes и Proteobacteria: *Anaerococcus hydrogenalis*, *Clostridium asparagiforme*, *Clostridium hathewayi*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia fergusonii*, *Proteus penneri*, *Providencia rettgeri* и *Clostridium sporogenes*, при этом *Clostridium sporogenes* ATCC 15579 в формировании ТМА из поступившего с пищей холина [46].

Превращение холина в ТМА происходит путем разрыва C-N связи в молекуле холина. Разрыв C-N связи осуществляется при помощи радикала аминокислоты глицин (так называемого глицилового радикального комплекса), имеющегося у бактерий в составе их осмопротектора глицин-бетаина. Данный комплекс состоит из каталитической и связывающей субъединиц, закодированных в расположенных на соседних локусах бактериальной ДНК генах CutC и CutD. Указанные свойства определяют ключевую роль бактерий в метаболизме ТМАО. (Рисунок 8. А, В)

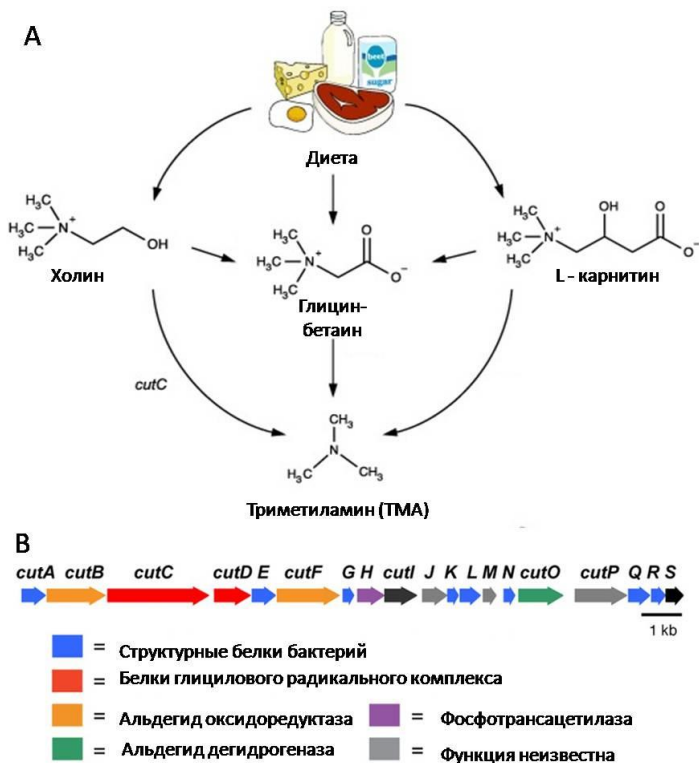


Рисунок 8. А. Пути образования триметиламина из пищевого холина и карнитина с участием глицин-бетаина бактерий.

В. Организация кластера генов Cut бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774.

Среди наиболее изученных микроорганизмов в отношении действия глицилового радикального комплекса - *Proteus mirabilis*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Acinetobacter baumannii*. С учетом того, что способность к разрыву C-N связи генетически обусловлена, ученые сделали вывод о возможности передачи ее вместе с ДНК между разными бактериями.

Внедрение генов CutC/CutD в микробную клетку *E.coli* (штамм BL21) приводило к появлению способности указанного микроорганизма метаболизировать холин и L-карнитин в ТМА [47].

Наравне с этим выделены микроорганизмы, редуцирующие ТМАО. В экспериментах относительно метаболизма археев *M. stadtmanae* и *M. smithii*

обнаружены способности к утилизации ТМА с помощью превращения его в метан, что в итоге снижает ТМАО крови [48].

Таким образом, большинство представителей бактерий, продуцирующих ТМАО, являются условно-патогенными или патогенными для человека. Однако, исследований, позволяющих оценить изменения микробиома человека в связи с концентрацией ТМАО, также как и оценивающих схожесть по составу и метаболическому профилю с микроорганизмами, в доминирующем количестве обнаруженных при атеросклерозе и сердечно-сосудистых заболеваниях, недостаточно [49].

1.9 ТМАО как фактор, повышающий защитный потенциал при различных заболеваниях, и его терапевтическое применение

В противоположность приведенным ранее, существуют данные, свидетельствующие о нейтральном или положительном действии ТМАО и его предшественников в отношении заболеваний сердца и сосудов.

Исследования Velasquez et al., посвященные изучению прогрессирования хронической сердечной недостаточности (n=14,430) не продемонстрировали влияния на данный процесс приема холина и L-карнитина в больших дозах, также как и обратное - протективного эффекта от увеличения их концентрации в организме не отмечалось. Не наблюдалось негативных последствий и среди женщин (n=717) в менопаузе, у которых были выявлены сердечно-сосудистые заболевания [50].

Более того, некоторые ученые предполагают, что ТМАО может играть защитную функцию в сердечно-сосудистой системе путем снижения уровня оксидативного стресса. Fukami K. et al обнаружили связь между повышением концентрации ТМАО и снижением уровня маркеров сосудистого воспаления,

таких как растворимые молекулы внутриклеточной адгезии (sICAM-1), молекулы адгезии клеток сосудов sVCAM-1) [51].

Несмотря на то, что в экспериментах с участием мышей уровень ТМАО проявлял корреляцию с прогрессированием атеросклероза, Yin J. et al в 2015 г не обнаружили достоверных изменений в уровне ТМАО и кишечной микрофлоры у людей с бессимптомным атеросклерозом, в то время как у пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения или транзиторную ишемическую атаку определялось снижение концентрации ТМАО в крови, в противоположность ранее полученным данным о повышении ее у пациентов с ССЗ.

Также у указанной группы больных выявлено изменение состава микрофлоры кишечника с повышением количества так называемых оппортунистических родов бактерий - *Enterobacter*, *Megasphaera*, *Oscillibacter*, и *Desulfovibrio*, а также уменьшение микроорганизмов-комменсалов и представителей нормальной микрофлоры, включающих *Bacteroides*, *Prevotella*, и *Faecalibacterium* [52].

Терапевтический потенциал ТМАО был продемонстрирован при болезни Альцгеймера, при которой воздействие данного метаболита на снижение концентрации тубулина мешало присоединению к нему РКА-фосфорилированного тау-белка. Кроме того, протективный эффект ТМАО обнаружен в отношении защиты кератиноцитов при буллезном эпидермолизе. Существуют исследования, позволяющие предположить положительное влияние ТМАО на течение дистрофии роговицы, катаракты, глаукомы [5].

1.10 Роль пробиотиков в коррекции метаболизма микрофлоры кишечника

Пробиотики, согласно определению Всемирной организации здравоохранения, представляют собой живые бактерии, которые, при употреблении в достаточных количествах, способны обеспечить пользу для здоровья организма-хозяина. Данное определение представляется, на первый взгляд, неясным и поверхностным, тем не менее, оно достаточно точно отражает тот факт, что на сегодня вопрос о механизме действия пробиотиков и их терапевтическая доза для того или иного заболевания остается предметом дальнейших исследований.

Высказываются предположения относительно конкуренции пробиотических штаммов с патогенными бактериями за среду обитания и питательные вещества, их роли в местной иммунной регуляции и выработке веществ, защищающих слизистую оболочку кишечника, поддержании функций здоровой микробиоты [53].

Традиционно к пробиотикам относят микроорганизмы из рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также *Saccharomyces boulardii* — вид одноклеточных микроскопических дрожжевых грибов из рода сахаромикетов. Эффект пробиотиков, по-видимому, зависит от вида и штамма бактерии [53].

Последнее десятилетие ознаменовалось большим количеством разнообразных исследований относительно влияния тех или иных пробиотических штаммов на состав микрофлоры человека при заболеваниях ЖКТ и другой локализации, а также для предотвращения их развития и прогрессирования.

Наибольшее количество экспериментов посвящено применению пробиотиков в терапии синдрома раздраженной кишки, диареи, в том числе антибиотик-ассоциированной [54]. Тем не менее, врачебные ассоциации не

торопятся вносить их в официальные руководства по лечению указанных заболеваний ввиду противоречивой и неполноценной доказательной базы.

Так, в крупном исследовании пациентов с антибиотик-ассоциированной диареей, вызванной *Clostridium difficile* (n= 17,000), получавших наравне с метронидазолом мультиштаммовый пробиотик с включением лакто-и бифидобактерий, не было получено достоверных различий с группой контроля. Кроме того, пациенты, принимавшие пробиотик, в 3 раза чаще отмечали вздутие и повышенное газообразование [55].

Saccharomyces boulardii, также успешно применяемые для лечения и профилактики антибиотик-ассоциированной диареи, в некоторых случаях могут нести риск развития фунгемии и грибкового сепсиса [56]. Многие мета-анализы относительно сахаромицет рекомендуют информировать пациентов о побочных эффектах приема пробиотиков и учитывать возможные последствия их назначения, особенно у пожилых пациентов [57].

С учетом роли кишечного микробиома в обмене липидов многими исследователями высказывалась гипотеза относительно применения пробиотиков для коррекции липидного спектра. Такие виды бактерий, как *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilis*, *Lactobacillus casei* а также *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* показали в исследованиях положительное влияние на метаболизм липидов [58, 59].

1.11 ТМАО как потенциальная мишень для лечения атеросклероза

Таким образом, полученные данные относительно метаболической роли микробиома кишечника позволили предположить возможность терапевтического

воздействия на прогрессирование заболеваний сердечно-сосудистой системы и атеросклероза изменением концентрации ТМАО.

Boutagy et al. провели исследование среди здоровых лиц (n=19), которым , наравне с диетой с высоким содержанием жира ,был предложен прием мультиштаммового пробиотика VSL#3 (*Streptococcus thermophiles* DSM24731, *Lactobacillus acidophilus* DSM24735, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM24734, *Lactobacillus paracasei* DSM24733, *Lactobacillus plantarum* DSM24730, *Bifidobacterium longum* DSM24736, *Bifidobacterium infantis* DSM24737, *Bifidobacterium breve* DSM24732). Результаты не продемонстрировали статистически значимых различий между участниками, принимавшими пробиотик и контрольной группой [11].

Другими учеными было исследовано влияние *Lactobacillus casei* Shirota на изменение концентрации ТМАО у пациентов с метаболическим синдромом (n=30), которое также не показало преимуществ в группе, принимавшей пробиотик, не только в отношении воздействия на уровень ТМАО, но и показателей липидного спектра и маркеров воспаления [12].

Таким образом, при приеме пробиотических бактерий указанных видов не было отмечено влияния на уровень ТМАО, что однако не позволяет исключить потенциальное действие на этот показатель других пробиотиков.

Авторами многих исследований также предположено положительное влияние приема антибиотиков широкого спектра на подавление ТМА-продуцирующих видов бактерий. Убедительные данные в отношении выраженного снижения уровня ТМАО были получены не только в экспериментах на животных, но и в исследовании с участием здоровых добровольцев [10]. Тем не менее, имеется много ограничений и потенциальных побочных эффектов, связанных с применением антибиотиков широкого спектра действия. Кроме того, после подавления продукции ТМАО в указанном исследовании через некоторое

время после завершения антибиотикотерапии отмечается некоторое восстановление уровня ТМАО, что требует отдельного изучения.

В целом, ученые не пришли к единому выводу о возможности снижения концентрации ТМАО с помощью антибиотиков и пробиотиков, данный вопрос требует дальнейшего изучения.

1.12 ТМАО - молекула больших противоречий и больших ожиданий

Появившийся эволюционно еще на этапе зарождения жизни на Земле, ТМАО играет важнейшую роль в поддержании осмолярности клетки, стабильности белковых структур в клетке, защите ее от повреждения [6].

Возможно, обладая более важным значением для живых существ, стоящих ниже в эволюционной лестнице, у млекопитающих, включая человека, со сложной системой регуляции осмотических и гидростатических процессов он служит своеобразным метаболическим "рудиментом". Однако, нельзя исключить, что повышение концентрации ТМАО в крови и моче человека отражает приспособление клеток к изменению водно-электролитного баланса, повышению артериального давления и другим регуляторными факторам [6, 10].

Проведенные на сегодняшний день эксперименты имеют некоторые ограничения, необходимые для устранения в будущем. Многие из исследований, продемонстрировавших проатерогенный и протективный потенциал ТМАО, выполнены на модели животных (мышей) и, соответственно, имеют ограничения, связанные с переносом полученных результатов на человека. Кроме прочих различий, следует обратить внимание на тот факт, что мыши эволюционно преимущественно травоядные животные, в то время как человек - всеядное. Ввиду тесной ассоциации продукции ТМАО и состава микрофлоры, представляется

сложным соотношением экспериментов с различными млекопитающими и человеком, так как микробиом различен даже внутри популяции людей.

Обобщая полученные данные, можно утверждать о несомненной взаимосвязи повышения концентрации ТМАО и роста сердечно-сосудистого риска у пациентов с ССЗ. В то же время динамика изменений данного метаболита на фоне диеты и лечения в ранее проведенных исследованиях противоречива, большинство из них выполнено с участием здоровых добровольцев.

Однако ни в одном из приведенных исследований не было изучено влияние антибиотиков и пробиотиков на метаболизм ТМАО у пациентов с уже имеющимися сердечно-сосудистыми заболеваниями, в частности с ИБС, с целью коррекции сердечно-сосудистого риска.

Вышеперечисленные аспекты явились побуждающим мотивом к выполнению данного исследования, предопределив его цель и задачи.

Глава 2 Материалы и методы

2.1 Предварительное обследование и набор пациентов

Клиническая часть работы была выполнена на базе Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии имени В.Х. Василенко ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Протокол исследования был одобрен Локальным Комитетом по этике (№ 9 от 25.11.2013).

В исследование были включены пациенты старше 50 лет с доказанной по данным клинической картины и лабораторно-инструментальных методов исследования ишемической болезнью сердца (ИБС) 2 и 3 функционального класса.

Критерии включения в исследование: возраст старше 50 лет, наличие ИБС 2 или 3 функционального класса по данным клинической картины и лабораторно-инструментальных методов исследования (суточное мониторирование ЭКГ, коронароангиография по показаниям), получавшие терапию статинами, бета-блокаторами, антиагрегантами (аспирин), антигипертензивными препаратами, нитратами длительного действия.

В исследование также была включена группа сравнения - лица старше 50 лет с отсутствием ИБС согласно клиническим и лабораторно-инструментальным данным.

Критерии исключения из исследования: возраст менее 50 лет, отсутствие ишемической болезни сердца согласно клиническим и лабораторно-инструментальным данным; наличие острых или обострения хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, онкологических заболеваний, прием пробиотиков или антибиотиков любой группы в течение 1 месяца перед

исследованием; прием других антиагрегантов, кроме аспирина, отсутствие приверженности к лечению, сахарный диабет в стадии суб- и декомпенсации; хроническая сердечная недостаточность с фракцией выброса левого желудочка менее 50%, хроническая почечная недостаточность при СКФ < 60 мл/мин/1.73м², наличие электрокардиостимулятора и хирургических вмешательств на сердце в анамнезе, психиатрические заболевания в стадии обострения.

Для выявления особенностей метаболизма и композиции кишечной микрофлоры, характерных для пациентов с ИБС, в исследования введена группа сравнения, в которую были включены лица старше 50 лет без сердечно-сосудистых заболеваний, с отсутствием острых или обострения хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, онкологических заболеваний, отрицающих прием пробиотиков или антибиотиков в течение 1 месяца перед исследованием; с отсутствием сахарного диабета в стадии суб- и декомпенсации; хронической сердечной и почечной недостаточности, с отрицательным результатом дыхательного водородного теста на СИБР.

Первый этап исследования (0-й день) включал сбор жалоб и анамнеза пациентов, с учетом курения, неблагоприятной наследственности в отношении сердечно-сосудистых заболеваний. Далее проводился физический осмотр с определением роста и массы тела для последующего расчета индекса массы тела. Измерение роста производилось при помощи ростомера; масса тела измерялась с использованием медицинских весов. Расчет индекса массы тела (ИМТ) осуществлялся согласно формуле Кеттле: $ИМТ = \text{масса тела(кг)} / \text{рост(м}^2\text{)}$

Измерение артериального давления осуществлялось с помощью механического тонометра "Адьютор" ИАД-01-2А.

Для подтверждения наличия ИБС выполнялась электрокардиография (ЭКГ) в 12 отведениях, суточный мониторинг ЭКГ по Холтеру и трансторакальная эхокардиография (ЭХО-КГ).

После предварительной подготовки, выполнялся дыхательный водородный тест с использованием лактулозы для диагностики синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке. Набор пациентов с ИБС осуществлялся таким образом, чтобы в каждой группе было равное количество участников с отсутствием и наличием СИБР.

Пациентам, данные которых соответствовали критериям включения в исследование, предлагалось участие в исследовании с предоставлением исчерпывающей информации в отношении проводимых диагностических методов и лечебных назначений. Учитывалась совместимость получаемой участниками, на момент включения в исследование терапии с назначаемым дополнительным лечением. Конфиденциальность персональных данных участников обеспечивалась использованием индивидуальных номеров для идентификации пациентов в базе данных.

Далее участникам было предложено заполнение анкеты для уточнения частоты употребления продуктов-предшественников триметиламин-N-оксида. (Таблица 1)

Таблица 1 - Анкета для уточнения частоты употребления продуктов-предшественников триметиламин-N-оксида

Продукт	Частота употребления в неделю			
	0-1 раз	2-3 раз	3-5 раз	6 и более раз
Яйца				
Говядина				
Свинина				
Рыба				
Молоко				
Морепродукты				
Сыр				
Цветная капуста				
Брокколи				

После выполнения указанных процедур все включенные в исследование пациенты были разделены на 4 группы.

В **группу 1** (контрольную) были включены 29 пациентов с ИБС 2 или 3 функционального класса, получавшие стандартную терапию (нитраты длительного действия, бета-блокаторы, аспирин, статины)

Группа 2 (30 пациентов) получала в дополнение к стандартной терапии пробиотик Флорасан Д 1 капсулу 3 раза в день (*Bifidobacterium bifidum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium longum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium infantis* не менее 1×10^9 КОЕ; *Lactobacillus rhamnosus* не менее 1×10^9 КОЕ) в течение 28 дней (4 недель).

Группа 3(30 пациентов) получала в дополнение к стандартной терапии в течение первых 7 дней антибиотик рифаксимин 200 мг 2 таблетки 3 раза в день, затем пробиотик Флорасан Д 1 капсулу 3 раза в день 21 день.

Группа 4 (30 пациентов) - группа сравнения не получала терапии какими-либо препаратами в исследовании

Второй этап (1-й день исследования) начинался после подписания лицами из всех групп информированного согласия на участие в исследовании и заполнения анкеты. Далее на данном этапе осуществлялся забор образцов крови для оценки показателей липидного спектра (общий холестерин, липопротеиды низкой плотности, липопротеиды очень низкой плотности, липопротеиды высокой плотности, триглицериды), скорости агрегации тромбоцитов, концентрации ТМАО, забор образцов кала для последующего анализа микробиоты.

Для стандартизации результатов в отношении уровня ТМАО за день до забора образцов крови пациенты исключали из рациона продукты, содержащие большое количество предшественников триметиламина - холина и L- карнитина, а именно красное мясо (говядина, свинина, баранина, утка), молочные продукты, сыр, бобовые, шпинат, рыбу, яйца. Список продуктов для исключения был выдан каждому пациенту за сутки до забора крови. За 12 ч до взятия образцов крови пациенты принимали 800 мг холина альфосцерата. Указанные меры позволили исключить вклад различий рациона участников в изменение концентрации ТМАО.

На **третьем** (7-й день исследования) и **четвертом** (28-й день исследования), **этапах** после аналогичной подготовки производили забор образцов крови для оценки показателей липидного спектра (общий холестерин, липопротеиды низкой плотности, липопротеиды очень низкой плотности, липопротеиды высокой плотности, триглицериды), скорости агрегации тромбоцитов, концентрации ТМАО. Аналогично предыдущему этапу также выполнялся забор образцов кала

для анализа микробиоты. Измерение артериального давления и выполнение дыхательного водородного теста с лактулозой для определения наличия избыточного бактериального роста выполнялось также на 7-й и 28-й день исследования.

Исключением служит группа 4 (сравнения), в которой измерение артериального давления, дыхательный водородный тест с лактулозой и забор образцов осуществлялись в 1-й день, для сравнения, главным образом, с группой

1.

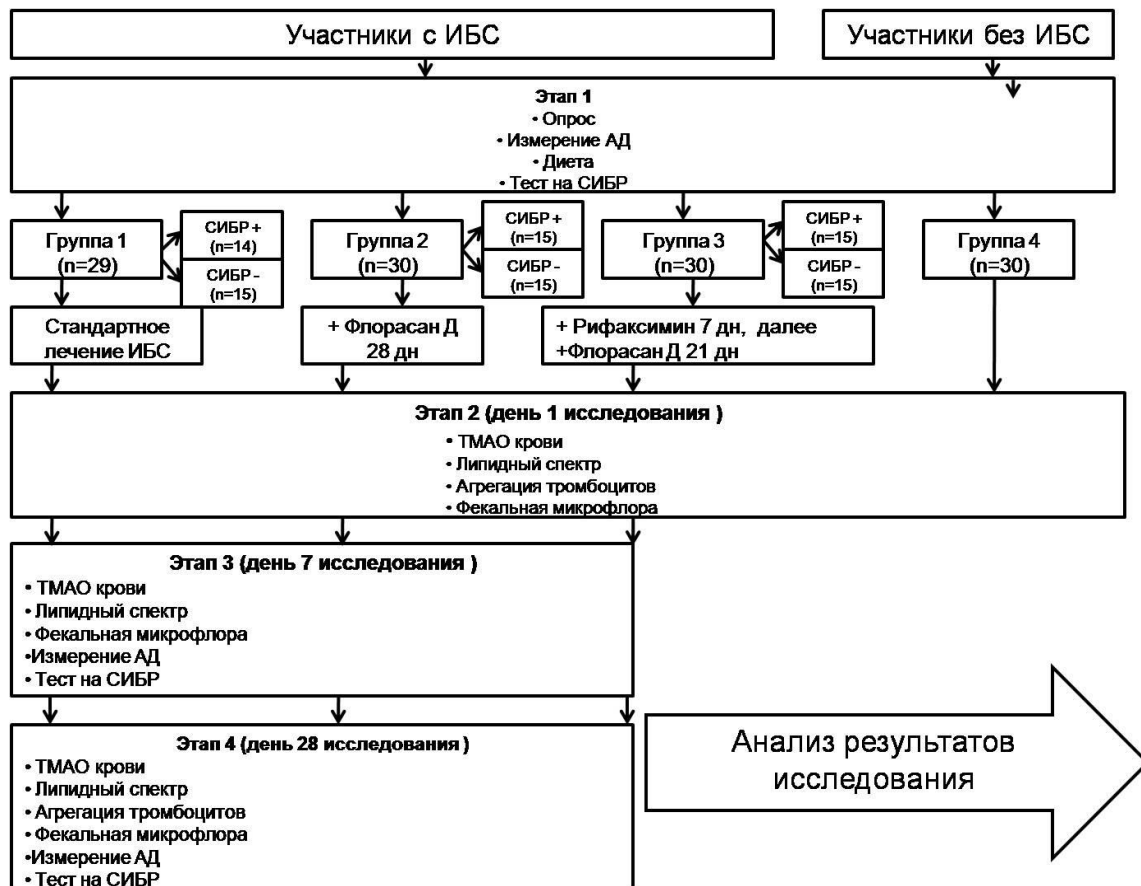


Рисунок 9. Дизайн исследования

2.2 Методы исследования

2.2.1 Лабораторное исследование

Изучение липидного профиля крови, агрегации тромбоцитов выполнялось на базе лаборатории ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Определение липидного профиля сыворотки крови (общий холестерин, липопротеиды низкой плотности, липопротеиды очень низкой плотности, липопротеиды высокой плотности, триглицериды) выполнялось с помощью биохимического анализатора Beckman Coulter (AU 480). Расчет ЛПОНП проводился в соответствии с формулой Фридевальда: $\text{ЛПОНП} = \text{ОХ} - \text{ЛПВП} - \text{ЛПНП}$.

Определение агрегации тромбоцитов производилось с использованием специального индуктора агрегации - аденозиндифосфата (АДФ).

2.2.2 Определение концентрации триметиламин-N-оксида в плазме крови

Определение концентрации ТМАО в образцах плазмы крови выполнено на базе биоаналитической лаборатории "Экзактэ Лабс".

Забор крови у участников исследования осуществлялся в пробирки с ЭДТА К2 после 12-часового периода голодания, обязательного соблюдения диеты и приема 800 мг холина альфосцерата за 12 ч до исследования. После центрифугирования цельной крови аликвоты плазмы крови были помещены в морозильную камеру, где хранились при температуре -80°C до осуществления подготовки образцов для исследования.

При подготовке пробы в качестве внутреннего стандарта использовался d9-меченый триметиламин N-оксид. Извлечение исследуемого соединения из плазмы осуществлялось путём осаждения белков плазмы крови охлаждённым метанолом. После центрифугирования образцов происходило отделение супернатанта и разбавление его в 100 раз смесью ACN/H₂O 9/1 + 0.1 об. % муравьиной кислоты. Далее был выполнен анализ с использованием жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

Анализ образцов выполнялся в лаборатории "Экзактэ лабс" на жидкостном хромато-масс-спектрометре Shimadzu 8050 (Япония) с электрораспылительной ионизацией. Хроматографическое разделение компонентов проводилось методом гидрофильной хроматографии. Калибровочная кривая представляла собой линейную зависимость в диапазоне концентраций 50 – 10000 нг/мл, нижний предел количественного определения составил 50 нг/мл.

2.2.3 Определение микробиологического состава кала

Сбор и подготовка образцов кала

Участникам исследования были выданы полимерные стерильные контейнеры 60 мл для биоматериала (кала), проводилось инструктирование по правильному сбору образцов. Далее осуществлялось замораживание полученных образцов при температуре -80 С в морозильной камере.

Выделение ДНК и 16S-секвенирование

На базе лаборатории Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН было выполнено выделение микробной ДНК с последующим 16S-секвенированием.

Замороженные образцы помещали в контейнер со льдом для разморозки в течение 30 минут. Шпателем отбирали навеску образца массой 10 мкг и помещали в пробирки для гомогенизации. Пробирки с образцами инкубировали в течение 10 минут при 65 °С, затем еще 10 минут при 95 °С. Далее образцы гомогенизировали с помощью автоматического гомогенизатора MagNA Lyser (Roche) согласно инструкции производителя, после чего центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 минут. Полученный супернатант (400 мкл) использовался для дальнейшего выделения нуклеиновых кислот. Тотальную ДНК выделяли с использованием реагентов MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche) в системе для автоматического выделения нуклеиновых кислот MagNA Pure LC. Выделенную ДНК хранили при -20С. Для качественной и количественной оценки ДНК использовали NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Подготовка 16S метагеномных библиотек проводилась в соответствии с протоколом 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США), рекомендованному Illumina для секвенатора MiSeq. Концентрацию полученных библиотек 16S определяли с помощью флуориметра Qubit® 2.0 («Invitrogen», США) и набора QuantiT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit.

Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina) в режиме парно-концевых прочтений (2x150 нукл.), с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2.

Первый раунд амплификации переменных участков V3-V4 гена 16S рРНК произведен с применением прямого и обратного праймеров (амплификатор Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, «Thermo Fisher Scientific», США). Далее выполнялась очистка ПЦР-продуктов. Второй раунд амплификации осуществляли с использованием комбинации специфических праймеров Agencourt AMPure XP («Beckman Coulter», США). Очищенные ампликоны смешивали эквимолярно в соответствии с полученными концентрациями. Изучение состава бактериального сообщества на уровне родов и семейств производилось с применением прямой таксономической аннотации полученных ампликонов в базе данных RDP (Ribosomal Database Project).

2.2.4 Инструментальное исследование

Инструментальное исследование производилось на базе Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В. Х. Василенко Сеченовского Университета и предполагало проведение следующих процедур:

- электрокардиография (ЭКГ) для уточнения наличия изменений миокарда, нарушений ритма и проводимости сердечной мышцы
- суточного мониторирования ЭКГ для подтверждения наличия у пациента ишемической болезни сердца
- ЭХО-кардиографии для уточнения анатомического и функционального состояния сердечной мышцы и клапанного аппарата
- измерение артериального давления для оценки значений систолического артериального давления как одного из показателей сердечно-сосудистого риска

-дыхательного водородного теста с лактулозой для выявления синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке

2.2.5. Измерение артериального давления

Оценка уровня артериального давления была выполнена у всех участников в начальной точке исследования, у групп 1,2,3 в динамике в промежуточной и завершающей точке исследования. Измерение осуществлялось с помощью механического тонометра "Аджютор" ИАД-01-2А косвенным методом Короткова, согласно инструкции.

Накануне измерения артериального давления пациенты около 15 минут находились в состоянии физического и эмоционального покоя, исключалось курение, прием пищи и тонизирующих напитков за 30 минут до проведения процедуры.

Для измерения артериального давления использована плечевая манжета с кольцом, обхват 36-54 см, которую накладывали на плечо таким образом, что нижний край ее находился на 2 см выше локтевого сгиба. Измерение осуществлялось на обеих руках во время первого визита, далее, в случае отсутствия значимой разницы, на одной руке. Пациенты с разницей артериального давления более 20 мм рт.ст. на руках исключались из исследования.

2.2.6 Дыхательный водородный тест с использованием лактулозы

Дыхательный водородный тест с использованием лактулозы выполнялся для выявления синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке у

участников исследования с помощью прибора "Gastro⁺ Gastrolyzer" (Великобритания).

Принцип действия теста основан на утилизации глюкозы (продукт разрушения дисахарида лактулозы) бактериями тонкой кишки при СИБР, с образованием водорода и метана. В избытке выделяющийся водород подлежит всасыванию в кровь и выведению с выдыхаемым воздухом. В отсутствие СИБР основную роль в ферментации лактулозы играют бактерии толстой кишки, при этом пик концентрации водорода в выдыхаемом воздухе наблюдается существенно позже (не ранее 2-3 часов).

Согласно методике, за 4 недели до проведения теста исключалось выполнение эндоскопических и рентгенологических исследований желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), прием антибактериальных препаратов. За 3 дня до проведения теста следовало исключить приём слабительных средств или любых других средств, воздействующих на моторику ЖКТ. За день до проведения теста исключалось употребление лука, чеснока, капусты, бобовых. За 12 часов до проведения теста запрещался прием пищи, курение и использование жевательной резинки. В день проведения теста необходимо было почистить зубы, а пациентам, носящим зубные протезы, исключить использование клейких веществ для зубных протезов.

Оценка результатов дыхательного теста производилась по разнице между базовой пробой и пробой с нагрузкой лактулозой (10 г в 250 мл воды). Измерение концентрации водорода осуществлялась каждые 15 мин в течение 3 часов. Повышение концентрации водорода в выдыхаемом воздухе более 20 ppm свидетельствовало о положительном результате. (Рисунок 10)

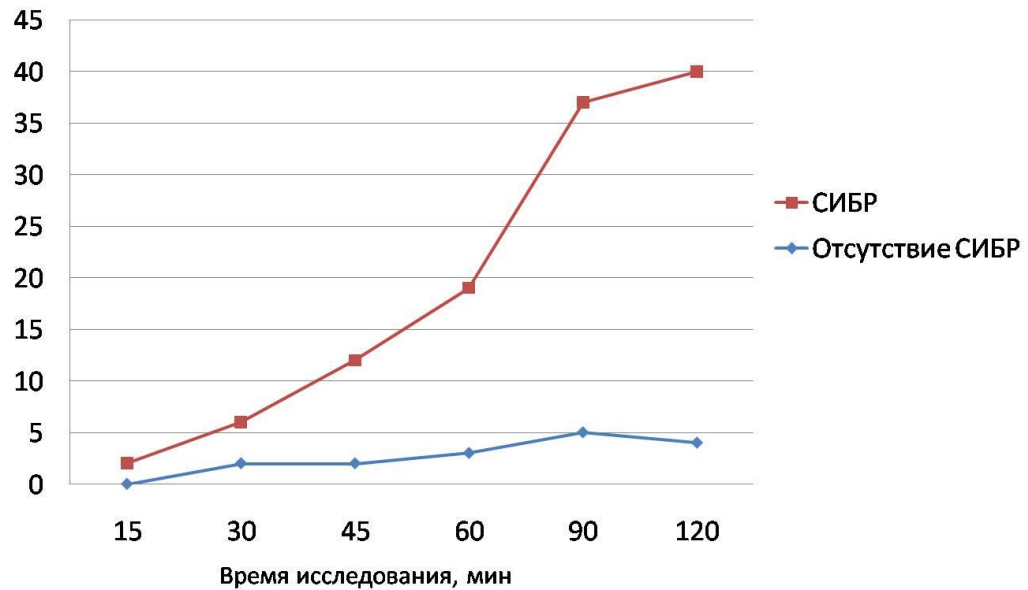


Рисунок 10. Изменение концентрации водорода в выдыхаемом воздухе (ppm) в течение 2 часов после приема 10 г лактулозы у здорового человека и при СИБР

2.3 Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка полученных результатов проводилась автором диссертации при помощи пакета программ статистической обработки данных IBM SPSS 22.0. Оценка различий количественных признаков между группами участников выполнена с использованием критерия Манна — Уитни, позволяющего выявить различия в малых выборках. Для сопоставления показателей в одной и той же выборке испытуемых был рассчитан непараметрический критерий Вилкоксона. Для статистической обработки полученных данных о составе фекальной микрофлоры использована программная среда R, с последующим графическим отображением результатов в виде диаграмм размаха (boxplot). Анализ отличий в представленности различных родов, семейств бактерий, осуществлялся с применением критерия Вилкоксона, t-теста Стьюдента. Значимость оценивалась как вероятность совершить ошибку первого рода (p): $p \leq 0,05$ считалось значимым.

Глава 3 Результаты проведенного исследования

3.1. Общая клиническая характеристика участников исследования

В исследование было включено 119 человек, среди них 58 женщин (48.7 %) и 61 мужчина (51.3 %). (Таблица 2)

Таблица 2 - Распределение участников по полу в группах

			Группа				Итого
			1	2	3	4	
Пол	Мужчины	Количество человек	14	15	16	16	61
		% в группе	48.3%	50.0%	53.3%	53.3%	51.3%
	Женщины	Количество человек	15	15	14	14	58
		% в группе	51.7%	50.0%	46.7%	46.7%	48.7%
Итого		Количество человек	29	30	30	30	119
		% в группе	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Среди пациентов с наличием ИБС 2-3 функционального класса, средний возраст составил 65 ± 3.7 лет. Средний возраст участников без сердечно-сосудистых заболеваний составлял $59,83 \pm 3,15$ лет.

В отношении веса среди участников исследования с ИБС не было выявлено ни одного человека с нормальной массой тела (ИМТ=18.5-24.9 кг/кв.м), при этом у 39 (44%) человек определялся избыточный вес (ИМТ =25-29.9 кг/кв.м), у 48 (54%) выявлено ожирение I степени (ИМТ =30-34.9 кг/кв.м), у 2 (2%) - ожирение II степени (ИМТ=35-40 кг/кв.м); средний для пациентов с ИБС ИМТ= 29.99 ± 2.1 кг/кв.м.

Средний ИМТ участников из группы сравнения составил 25.30 ± 1.9 кг/кв.м, у 7 (23%) из них массой тела была нормальной (ИМТ=18.5-24.9 кг/кв.м), у 23 (77%) человек определялся избыточный вес (ИМТ =25-29.9 кг/кв.м). Сравнение между пациентами с ИБС (группы 1,2,3) и людьми без сердечно-сосудистых заболеваний (группа 4) ожидаемо выявило достоверные различия в показателях веса и ИМТ ($p < 0.05$), в то же время возраст и рост участников были одинаковы для всех групп ($p > 0.05$) (Таблица 3)

Таблица 3 - Возраст и антропометрические показатели участников исследования

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	p
Возраст	65.90 ± 4.00	64.90 ± 3.54	64.53 ± 3.84	59.83 ± 3.15	$p_{1-2} > 0,05$; $p_{1-3} > 0,05$; $p_{1-4} > 0,05$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{2-4} > 0,05$; $p_{3-4} > 0,05$
Рост	167.03 ± 4.83	168.20 ± 6.26	169.40 ± 6.77	170.70 ± 6.31	$p_{1-2} > 0,05$; $p_{1-3} > 0,05$; $p_{1-4} > 0,05$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{2-4} > 0,05$; $p_{3-4} > 0,05$
Вес	84.31 ± 6.93	84.33 ± 6.94	87.40 ± 7.07	73.83 ± 8.67	$p_{1-2} > 0,05$; $p_{1-3} > 0,05$; $p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{2-4} < 0,05$; $p_{3-4} < 0,001$
ИМТ	29.97 ± 1.90	29.93 ± 1.91	30.07 ± 2.75	25.30 ± 1.47	$p_{1-2} > 0,05$; $p_{1-3} > 0,05$; $p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{2-4} < 0,05$; $p_{3-4} < 0,001$

В исследовании проводилась оценка факторов сердечно-сосудистого риска, не подлежащего модификации, среди всех участников. В группах пациентов с ИБС (группы 1,2,3) у 86 человек (96,6%) выявлено наличие сердечно-сосудистых заболеваний у родственников первой степени родства, в сравнение с 28 (93.3%) участниками из группы 4. (Таблица 4)

Таблица 4 - Частота выявления неблагоприятного семейного анамнеза в отношении сердечно-сосудистых заболеваний среди участников исследования

			Группа				Итого
			1	2	3	4	
Неблагоприятный семейный анамнез в отношении ССЗ	отсутствует	Количество человек	1	0	2	2	5
		% в группе	2.9%	0.0%	6.7%	6.7%	16.3%
	присутствует	Количество человек	28	30	28	28	116
		% в группе	97.1%	100.0%	93.3%	93.3%	83.7%
Итого		Количество человек	29	30	30	30	119
		% в группе	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

21 пациент с ИБС (23.6%) указал при анкетировании о курении табака, из них 17 (81%) мужчин и 4 (19%) женщины. В группе участников без сердечно-сосудистых заболеваний 5 (17%) человек отметили, что являются курильщиками, среди них 4 (80%) мужчин и 1 (20%) женщина. (Таблица 5)

Таблица 5 - Частота курения среди участников исследования

			Группа				Итого
			1	2	3	4	
Курение	нет	Количество человек	22	23	23	25	93
		% в группе	75.9%	76.7%	76.7%	83.3%	78.2%
	да	Количество человек	7	7	7	5	26
		% в группе	24.1%	23.3%	23.3%	16.7%	21.8%
Итого		Количество человек	29	30	30	30	119
		% в группе	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Тем не менее, статистических различий между группами в отношении частоты встречаемости неблагоприятного семейного анамнеза ($p_{1-2} > 0.05$, $p_{1-3} > 0.05$, $p_{2-3} > 0.05$, $p_{1-4} > 0.05$, $p_{2-4} > 0.05$) и курения ($p_{1-2} > 0.05$, $p_{1-3} > 0.05$, $p_{2-3} > 0.05$, $p_{1-4} > 0.05$, $p_{2-4} > 0.05$) среди участников исследования получено не было.

3.2 Характеристика диеты пациентов и ее влияния на метаболизм кишечной микрофлоры

Оценка рациона производилась на основании данных анкетирования пациентов. В сравнении с пациентами, страдающими ИБС, участники из группы сравнения реже употребляли красное мясо (говядину, свинину), молочные продукты, чаще – яйца и рыбу. В отношении цветной капусты, брокколи и морепродуктов результаты для всех участников исследования были схожими. (Таблица 6)

Таблица 6 - Характеристика рациона пациентов (р - критерий Манна-Уитни)

Продукт	Частота употребления	Группа				
		1	2	3	4	p
Яйца	0-1 шт в неделю	37.9%	26.7%	13.3%	6.7%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4<0,05 ;p2-3>0,05; p2-4<0,05; p3-4<0,05
	2-3 шт в неделю	51.7%	43.3%	40.0%	40.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4>0,05;p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05
	3-5 шт в неделю	10.3%	30.0%	46.7%	53.3%	p1-2>0,05; p1-3<0,05 ; p1-4<0,05 ;p2-3>0,05; p2-4<0,05; p3-4>0,05
Говядина	0-1 раза в неделю	86.2%	86.7%	90.0%	100.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4<0,05 ;p2-3>0,05; p2-4<0,05; p3-4<0,05
	2-3 раз в неделю	13.8%	13.3%	10.0%	0.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4<0,05 ;p2-3>0,05; p2-4<0,05; p3-4<0,05
	3-5 раз в неделю	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-
Свинина	0-1 раза в неделю	55.2%	53.3%	50.0%	83.3%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4<0,05 ;p2-3>0,05; p2-4<0,05; p3-4<0,05
	2-3 раз в неделю	41.4%	33.3%	33.3%	16.7%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4<0,05 ;p2-3>0,05; p2-4<0,05; p3-4<0,05
	3-5 раз в неделю	3.4%	13.3%	16.7%	0.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4<0,05 ;p2-3>0,05;

						p2-4<0,05; p3-4<0,05
Рыба	0-1 раза в неделю	82.8%	80.0%	83.3%	56.7%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4<0,05;p2-3>0,05; p2-4<0,05; p3-4<0,05
	2-3 раз в неделю	17.2%	20.0%	16.7%	43.3%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4<0,05;p2-3>0,05; p2-4<0,05; p3-4<0,05
	3-5 раз в неделю	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-
Молоко	0-1 раза в неделю	17.2%	16.7%	13.3%	20.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4>0,05;p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05
	2-3 раз в неделю	34.5%	43.3%	43.3%	56.7%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4>0,05;p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05
	3-5 раз в неделю	37.9%	40.0%	43.3%	23.3%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4>0,05;p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05
	6 и более раз в неделю	10.3%	0.0%	0.0%	0.0%	p1-2<0,05; p1-3<0,05; p1-4<0,05;p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05
Сыр	0-1 раза в неделю	34.5%	16.7%	16.7%	40.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4>0,05;p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05
	2-3 раз в неделю	58.6%	66.7%	73.3%	60.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4>0,05;p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05
	3-5 раз в неделю	6.9%	16.7%	10.0%	0.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4>0,05;p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05
Морепродукты	0-1 раза в неделю	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4>0,05;p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05

Таблица 6 - продолжение

	2-3 раз в неделю	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-
	3-5 раз в неделю	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-
Цветная капуста, брокколи	0-1 раза в неделю	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4>0,05; p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05
	2-3 раз в неделю	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-
	3-5 раз в неделю	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-
Бобовые	0-1 раза в неделю	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	p1-2>0,05; p1-3>0,05; p1-4>0,05; p2-3>0,05; p2-4>0,05; p3-4>0,05
	2-3 раз в неделю	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-
	3-5 раз в неделю	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	-

В целом рацион пациентов с ИБС предположительно состоял в большей степени из продуктов-источников фосфатидилхолина и L-карнитина, в сравнение с участниками без сердечно-сосудистых заболеваний. Тем не менее учет количества продуктов и ведение пищевого дневника не проводились в настоящем исследовании ввиду низкой приверженности пациентов.

3.3 Оценка вклада синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке на в сердечно-сосудистый риск пациентов с ИБС и возможность его коррекции

Согласно полученным данным, при оценке уровня ТМАО у пациентов с ИБС, у которых был обнаружен СИБР (n=44) и с отсутствием СИБР (n=45),

отмечалось достоверная двусторонняя прямая корреляция ($p < 0.05$) между положительными результатами дыхательного водородного теста и увеличением концентрации ТМАО. (Таблица 7, рисунок 11)

Таблица 7 - Корреляция между уровнем ТМАО и наличием СИБР у пациентов с ИБС, ВДТ - водородный дыхательный тест, r - коэффициент корреляции Пирсона

		ТМАО
Наличие СИБР по результатам ВДТ	r	0,821**
	p	0.000
** Корреляция значима на уровне 0.01 (2-сторонняя).		

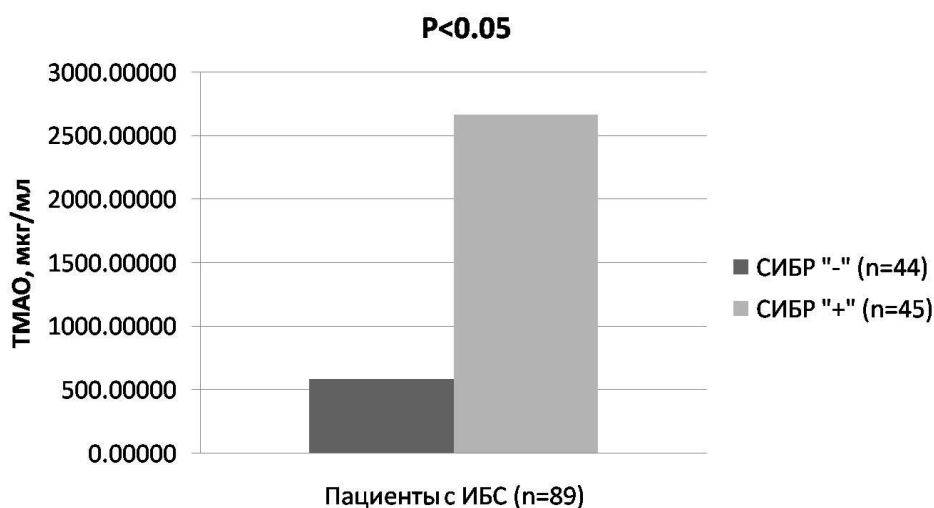


Рисунок 11. Сравнение концентрации ТМАО у пациентов с ИБС в зависимости от результатов дыхательного водородного теста на СИБР

У пациентов из группы 4 (n=30) показатели дыхательного водородного теста были отрицательными и измерялись один раз в начале исследования, что служило одним из критериев включения.

Оценка показателей теста в динамике производилась пациентам с ИБС.

При дополнительном лечении пробиотиком Флорасан Д (n=30) через 7 и 28 дней результаты дыхательного водородного теста не изменились в сравнении с начальной точкой исследования.

У пациентов, получавших дополнительную терапию рифаксимином, затем Флорасаном Д (n=30), дыхательный водородный тест демонстрировал отрицательные результаты на 7-й день исследования у всех участников, сохранявшиеся и на 28-й день исследования также у всех участников.

3.4 Анализ изменений фекальной микробиоты участников

Сравнение качественного и количественного состава фекальной микрофлоры проводилось как в отношении пациентов с ИБС и относительно здоровых лиц аналогичного возраста и пола, так и внутри групп с ИБС, для оценки влияния на ТМА-продуцирующие бактерии посредством добавления к терапии антибиотика и пробиотика. Анализ был выполнен на уровне таких таксономических единиц, как семейство, род. При этом осуществлялась оценка содержания в образцах бактерий-продуцентов ТМА (семейства *Lachnospiraceae*, *Peptococcaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Moraxellaceae*, *Clostridiaceae*; роды *Clostridium*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Desulfovibrio*), а также микроорганизмов, составляющих основу эубиотической микрофлоры, препятствующей колонизации условно-патогенных штаммов

(семейства *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae*, роды *Lactobacterium* и *Bifidobacterium*).

При сопоставлении образцов микрофлоры участников с ИБС с участниками без ИБС на уровне семейств определялось преобладание ДНК *Verrucomicrobiaceae* ($p < 0.05$) и *Enterobacteriaceae* ($p < 0.05$),). На уровне родов выявлено увеличение числа копий бактерий *Escherichia/Shigella* ($p < 0,05$), которые рассматриваются как потенциальные продуценты ТМАО.

В связи с тем, что при 16S-секвенировании маркерные последовательности имеют сходство для *Escherichia spp.* и *Shigella spp.*, данные приводятся совместно. Кроме того, была отмечена тенденция к увеличению доли бактерий *Clostridium XIV (b)* ($p = 0,10$), *Ruminococcus* ($p = 0,065$) в образцах пациентов с ИБС. В отношении бактерий семейств *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae* не обнаружено значительных изменений ($p = 0.18$ и $p = 0.28$, соответственно) (Рисунок 12, 13).

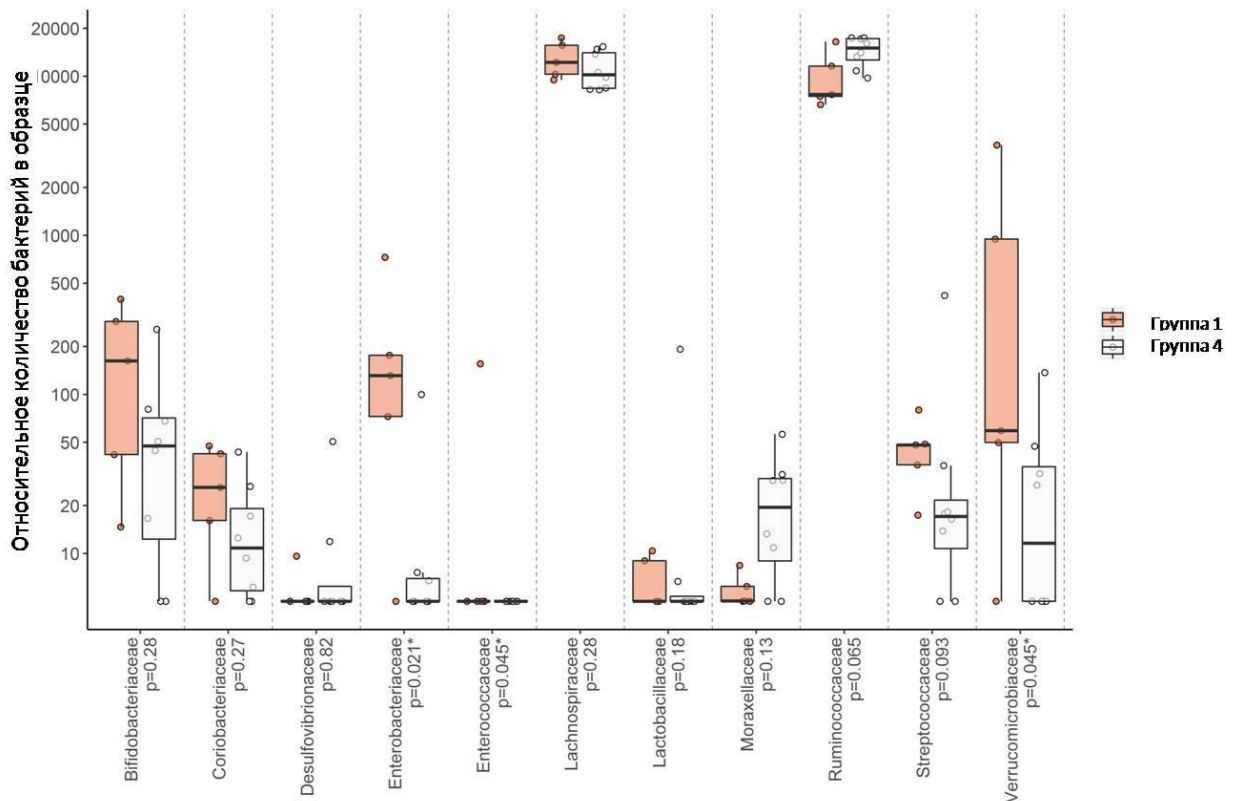


Рисунок 12. Изменения состава фекальной микрофлоры в группе 1 (пациенты с ИБС) в сравнении с группой 4 (участники без ИБС) на уровне семейств, boxplot - анализ.

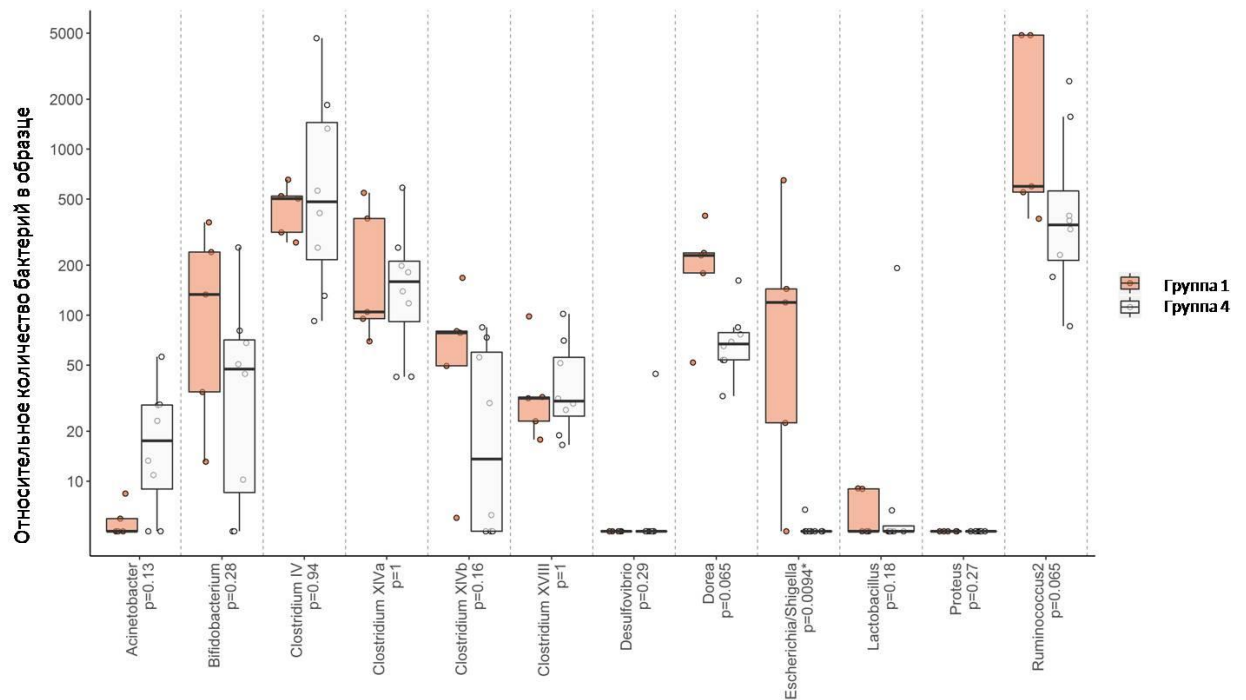


Рисунок 13. Изменения состава фекальной микрофлоры в группе 1 (пациенты с ИБС) в сравнении с группой 4 (участники без ИБС) на уровне родов, boxplot - анализ

При изучении изменений фекальной микрофлоры у пациентов с ИБС, получавших стандартную терапию, в динамике не отмечено статистически значимых отличий в структуре бактерий на уровне семейств. (Рисунок 14)

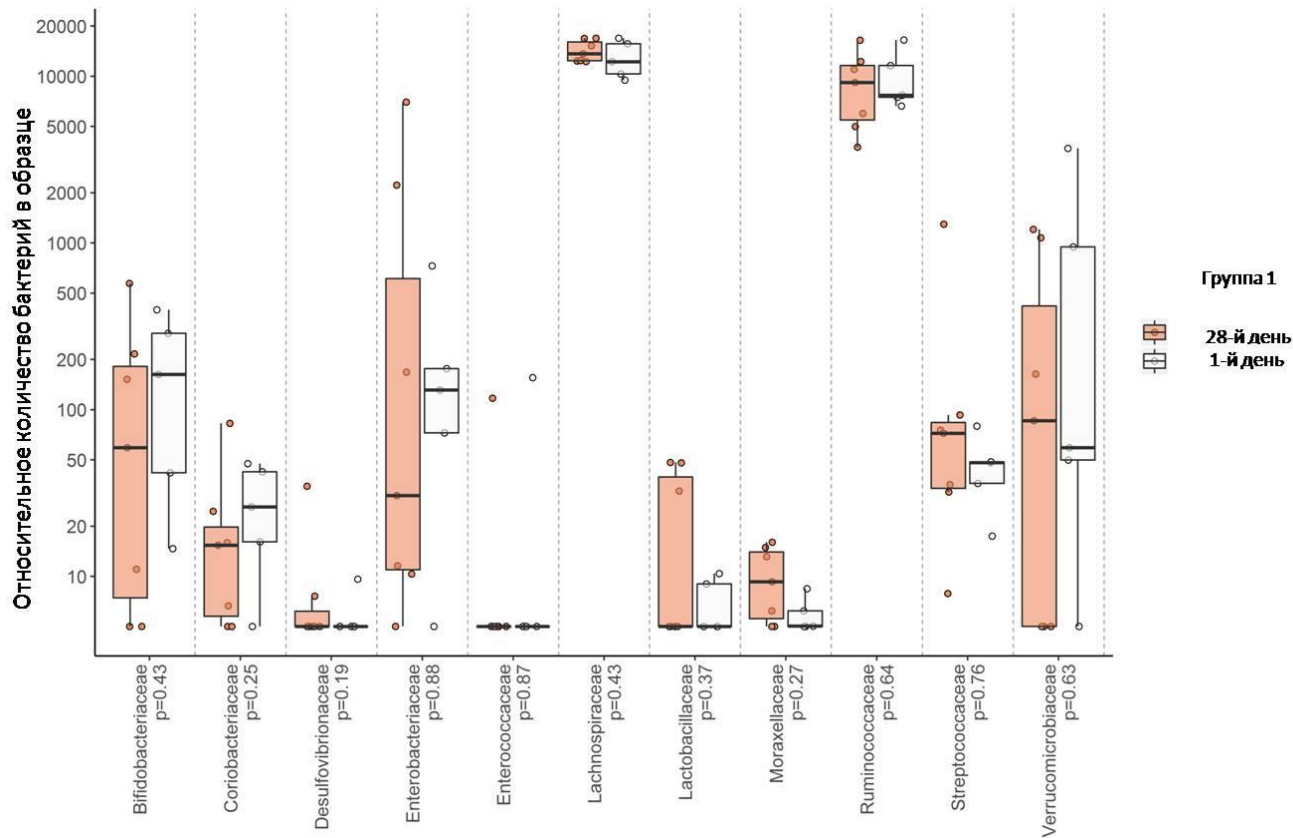


Рисунок 14. Изменения состава фекальной микрофлоры в группе 1 в динамике на уровне семейств, boxplot - анализ

На уровне рода имелось повышение относительного количества *Streptococcus* ($p=0.5$), *Escherichia/Shigella* ($p=0.76$), снижению *Bifidobacterium* ($p=0.53$), однако статистически не значимое. (Рисунок 15)

Таким образом, в целом динамических изменений состава микрофлоры у данной группы участников не определялось.

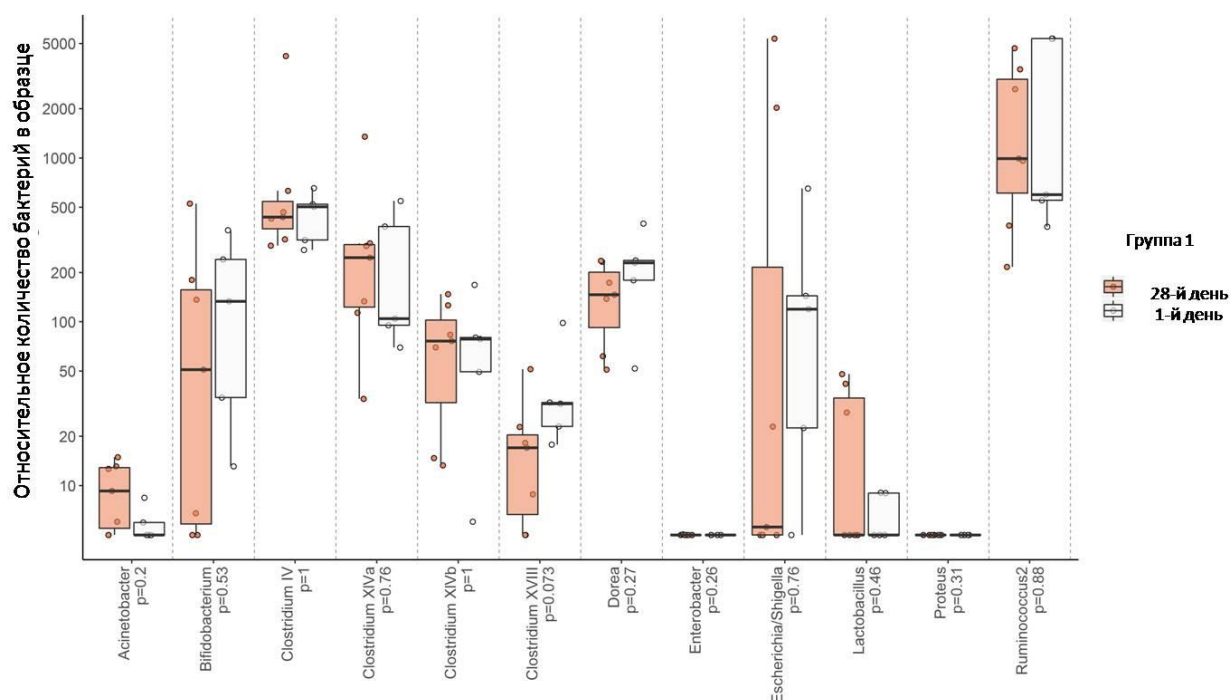


Рисунок 15. Изменения состава фекальной микрофлоры в группе 1 в динамике на уровне родов, boxplot - анализ.

Среди участников с ИБС, принимавших дополнительно к основному лечению пробиотик Флорасан Д в течение 28 дней, также не обнаружено статистически значимых изменений на уровне семейств бактерий, в сравнении с пациентами, получавшими стандартную терапию ($p > 0.05$), однако, имелась определенная тенденция к увеличению доли *Lactobacillaceae* ($p = 0.19$), *Streptococcaceae* ($p = 0.083$), *Enterobacteriaceae*, снижению *Ruminococcaceae* ($p = 0.23$). (Рисунок 16)

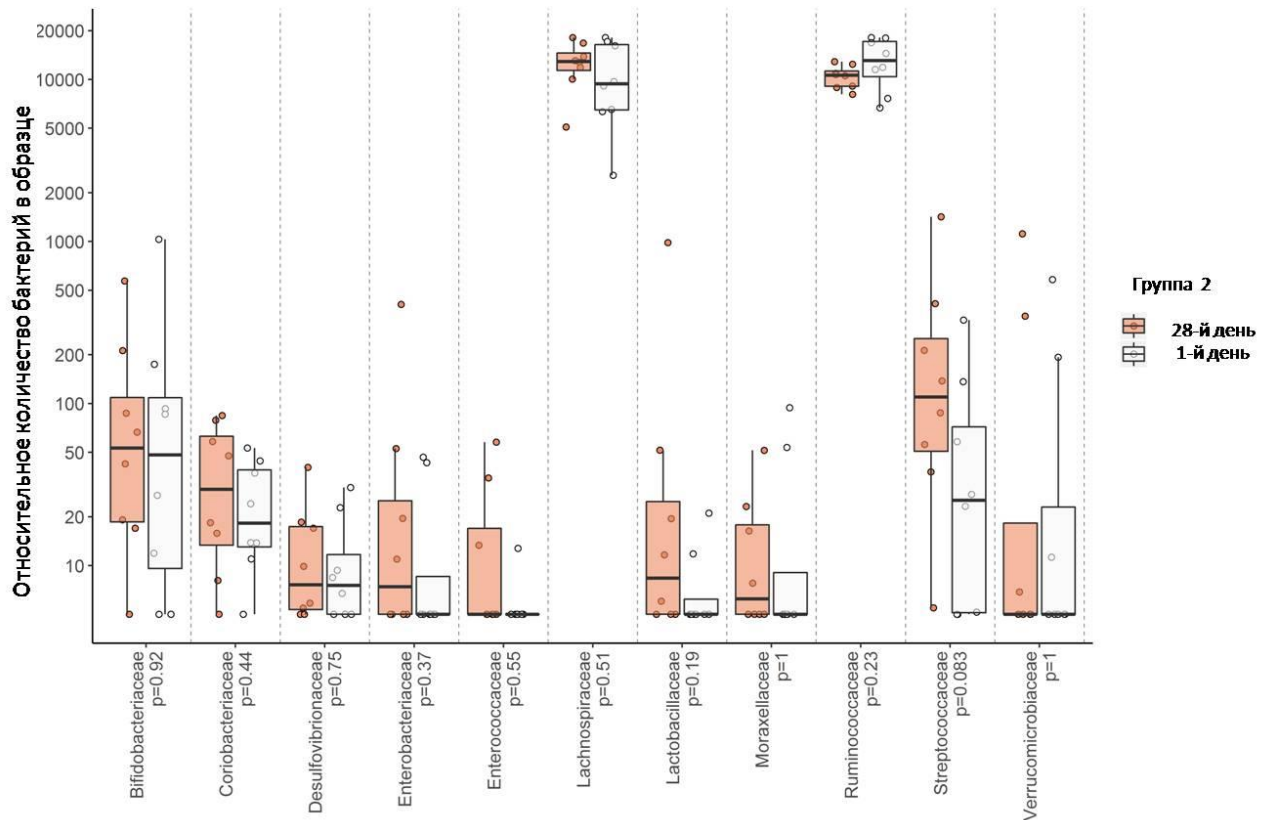


Рисунок 16. Изменения состава фекальной микрофлоры в группе 2 в динамике на фоне применения Флорасана Д, уровень семейств, boxplot - анализ.

При изучении динамики изменений микрофлоры пациентов из группы 2 на уровне рода выявлено статистически не значимое увеличение относительного количества *Lactobacillus* ($p=0.2$), *Streptococcus* в ($p=0.06$), *Clostridium XVIII* ($p=0.7$). (Рисунок 17)

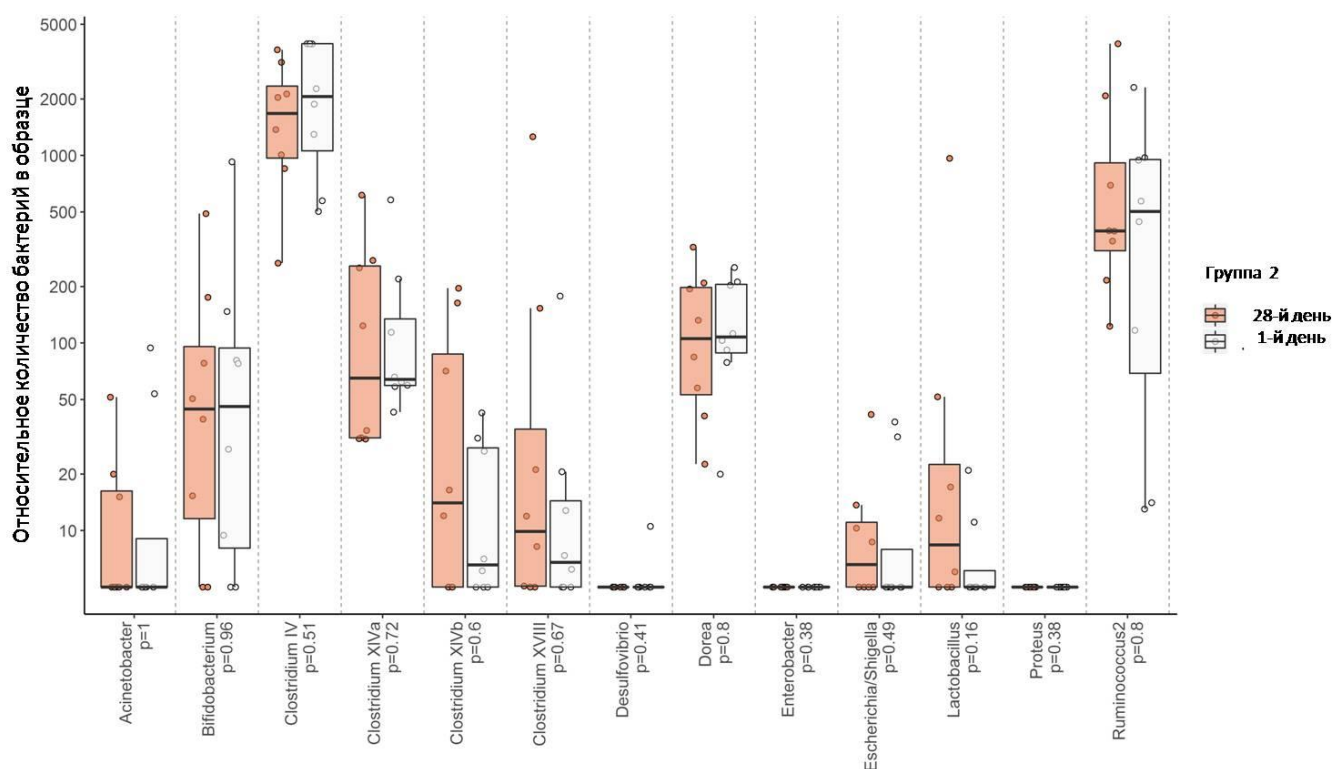


Рисунок 17. Изменения состава фекальной микрофлоры в группе 2 в динамике на фоне применения Флорасана Д, уровень родов, boxplot - анализ.

Таким образом, применение пробиотика Флорасан Д в течение 28 дней не оказало значительного влияния на состав фекальной микрофлоры у пациентов с ИБС.

Добавление к стандартной терапии ИБС рифаксимины через 7 дней лечения привело к 2-х кратному снижению доли потенциально проатерогенных бактерий семейств *Peptostreptococcaceae* ($p<0.05$), *Clostridiaceae* 1 ($p<0.05$), Общая численность микроорганизмов в образцах фекальной микрофлоры также продемонстрировала тенденцию к снижению после приема антибиотика. Отмечено уменьшение количества в образцах продуцирующих ТМАО бактерий из

семейств *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, наряду с этим снижение количества *Lactobaccilliaceae* и *Bifidobacteriaceae* ($p > 0,05$). (Рисунок 18)

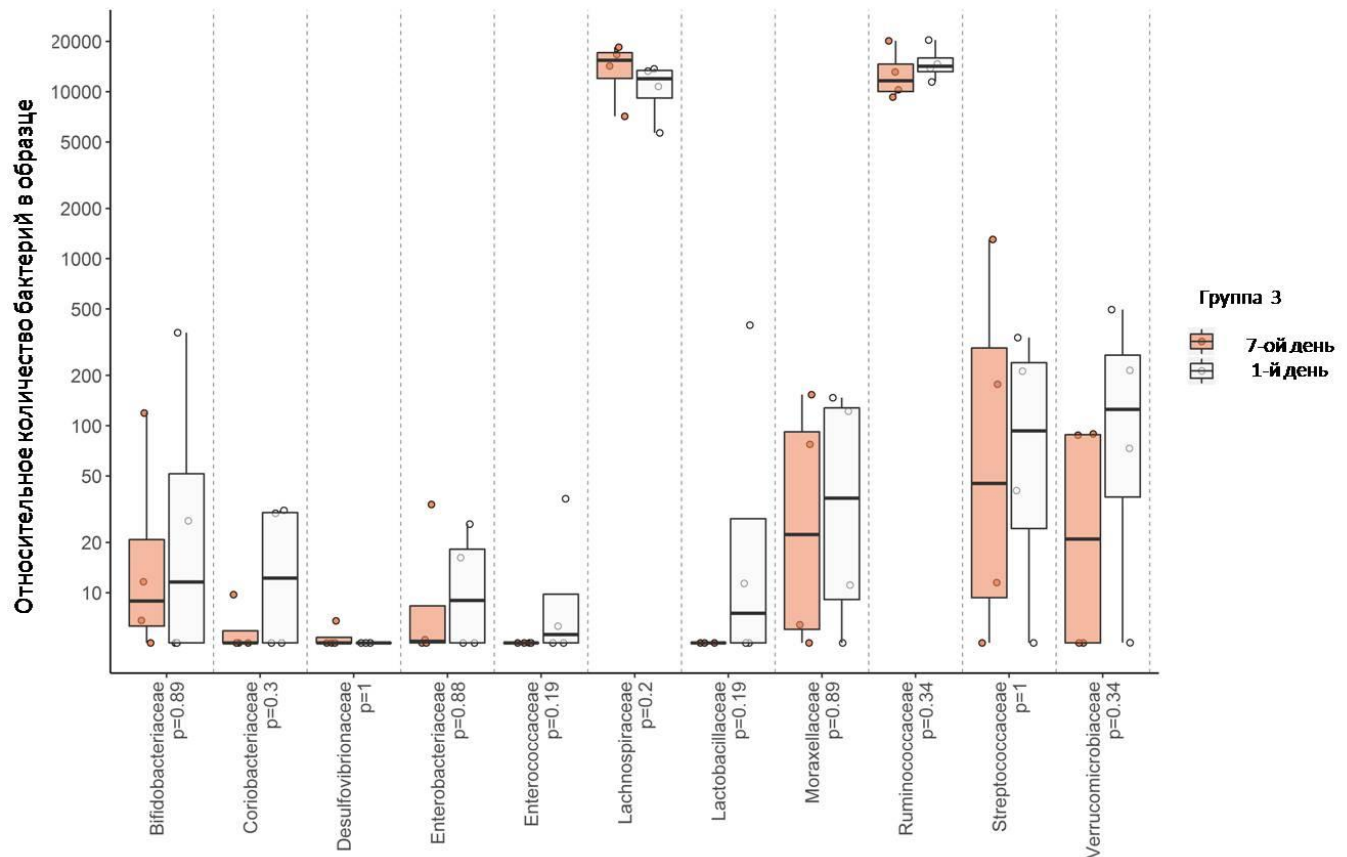


Рисунок 18. Изменения состава фекальной микрофлоры в группе 3 в динамике на фоне применения рифаксимилина, уровень семейств, boxplot - анализ.

На уровне рода основным изменением также служило снижение доли бактерий-анаэробов *Clostridium sensu stricto* ($p < 0.05$), *Clostridium XI* ($p = 0.05$), в отношении эубиотической микрофлоры отмечалась тенденция к уменьшению количества *Lactobacillus* ($p = 0.2$) и *Bifidobacterium* ($p = 0.49$). (Рисунок 19)

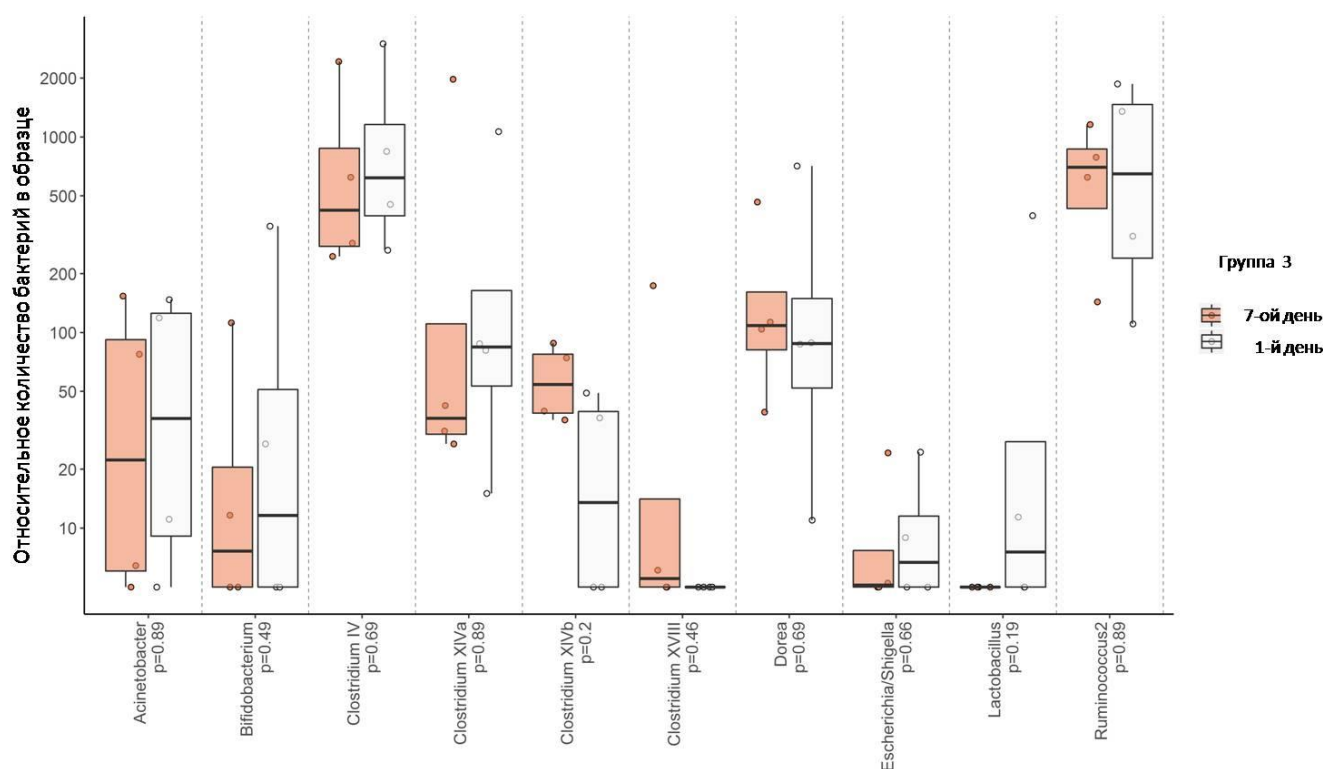


Рисунок 19. Изменения состава фекальной микрофлоры в группе 3 в динамике на фоне применения рифаксимина, уровень родов, boxplot - анализ.

Дальнейшее применение мультиштаммового Флорасан Д пробиотика с 7 по 28-ой дни исследования продемонстрировало уменьшение относительного количества в образцах продуцирующих ТМАО бактерий из семейств *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Coriobacteriaceae*, одновременно со снижением численности *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae*, однако указанные изменения не достигли статистической значимости ($p > 0,05$). (Рисунок 20)

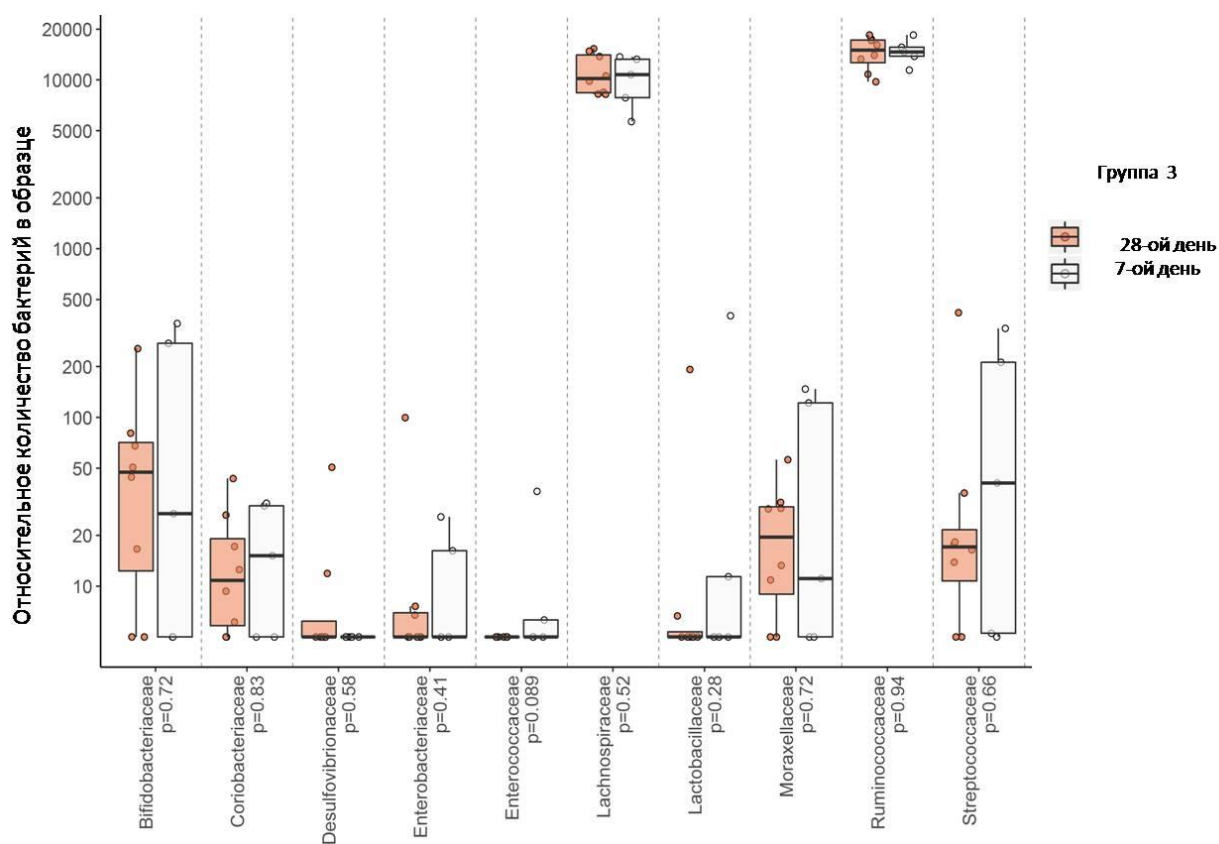


Рисунок 20. Изменения состава фекальной микрофлоры в группе 3 в динамике на фоне применения Флорасана Д после рифаксимины, уровень семейств, boxplot - анализ.

Схожие тенденции наблюдались и при рассмотрении изменений на уровне родов, но статистически также не значимые. (Рисунок 21).

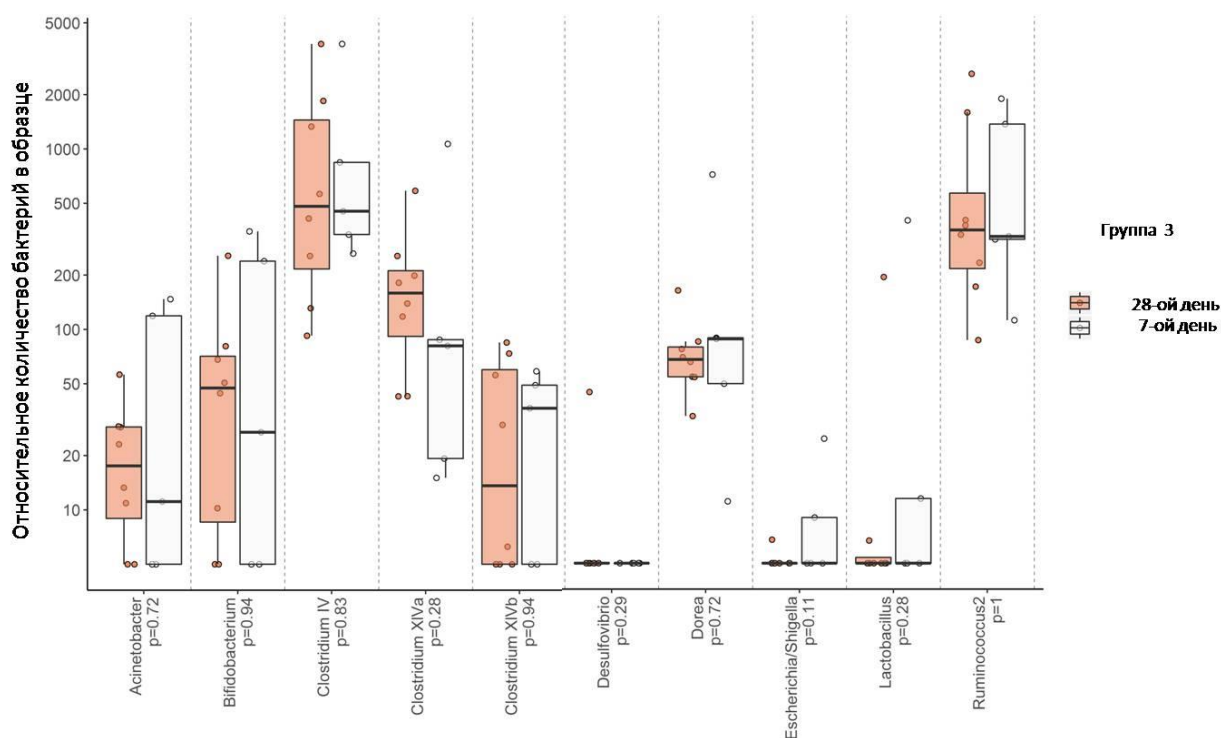


Рисунок 21. Изменения состава фекальной микрофлоры в группе 3 в динамике на фоне применения Флорасана Д после рифаксимины, уровень родов, boxplot - анализ.

Следовательно, применение пробиотика после антибиотика не оказало значительного влияния на изменение состава фекальной микрофлоры у пациентов с ИБС. Наиболее значительные различия в составе фекальной микрофлоры выявлены при сравнении образцов пациентов с ИБС с относительно здоровыми участниками исследования; в группах пациентов с ИБС наибольшие изменения достигнуты при применении рифаксимины.

3.5 Оценка изменений концентрации ТМАО участников

Оценка метаболизма кишечной микрофлоры, а именно уровня ТМАО, и его изменение при лечении антибиотиком и пробиотиком у пациентов с ИБС служила одним из ключевых задач исследования. Анализ изменений концентрации ТМАО выполнен у пациентов с ИБС в сравнении с здоровыми участниками, а также в динамике среди пациентов с ИБС.

При сравнении концентраций ТМАО пациентов с ИБС и участников без ИБС (группа 1 и 4, соответственно) выявлено 3-х кратное повышение этого показателя, в среднем, в группе 1. Так, средняя концентрация ТМАО ($M \pm \sigma$) участников с ИБС составила 1036.39 ± 748.22 нг/мл, в то время как в группе сравнения 376.53 ± 147.95 нг/мл ($p=0.0001$). При изучении изменения концентрации ТМАО в динамике выявлена тенденция к снижению уровня данного метаболита во всех группах в завершающей точке исследования, однако статистических различий между группами пациентов с ИБС не получено (p -критерий Манна-Уитни >0.05) (Таблица 8, рисунок 22,23,24)

Таблица 8 - Изменение концентрации ТМАО у пациентов с ИБС (p - критерий Манна-Уитни) ТМАО в 1 день vs. ТМАО 28 день

	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p
ТМАО, нг/мл, день 1	1036.39 ± 748.22	1901.04 ± 1576.17	1945.98 ± 1786.13	$p1-2>0,05$; $p1-3>0,05$; $p2-3>0,05$;
ТМАО, нг/мл, день 7	1133.45 ± 1011.22	1959.03 ± 1247.77	1795.08 ± 1529.74	$p1-2>0,05$; $p1-3>0,05$; $p2-3>0,05$
ТМАО, нг/мл, день 28	968.74 ± 606.09	1079.87 ± 1258.03	1354.10 ± 1194.79	$p1-2>0,05$; $p1-3>0,05$; $p2-3>0,05$

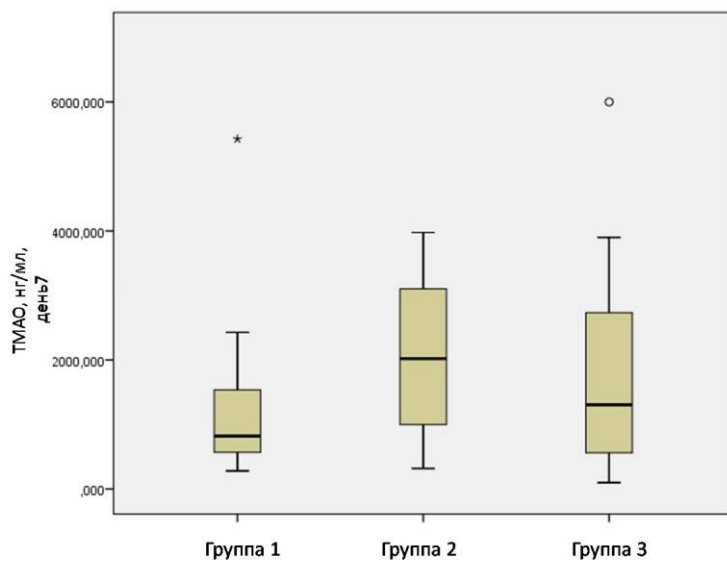


Рисунок 22. Уровень ТМАО у пациентов с ИБС, день 1
(начальная точка исследования)

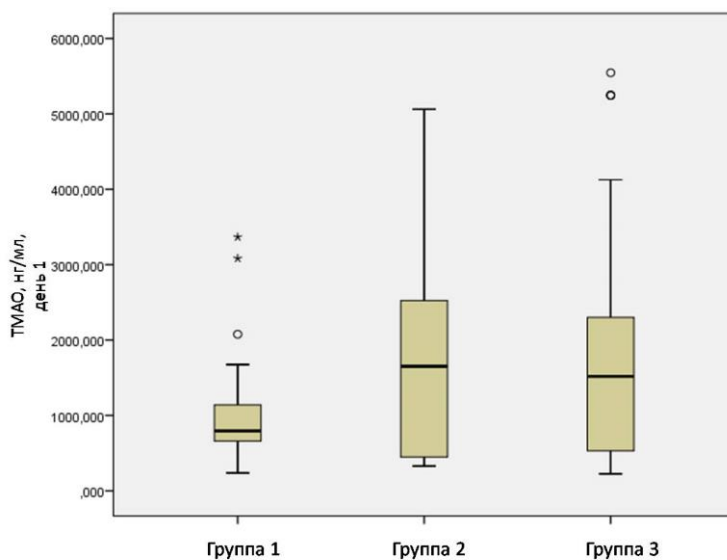


Рисунок 23. Уровень ТМАО у пациентов с ИБС, день 7
(промежуточная точка исследования)

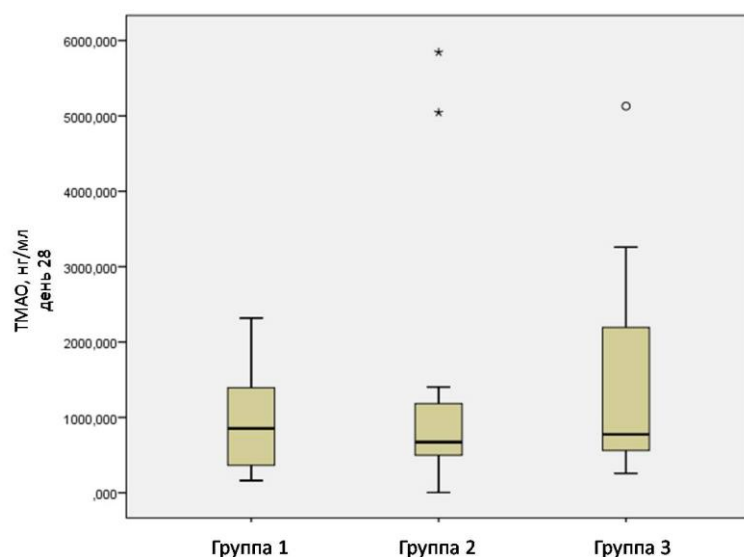


Рисунок 24. Уровень ТМАО у пациентов с ИБС, день 28

(заключительная точка исследования)

При сравнительном анализе изменений концентрации ТМАО у пациентов с ИБС в динамике внутри каждой группы (p-критерий Вилкоксона) получены следующие данные.

У пациентов, получавших Флорасан Д (группа 2), в динамике отмечено снижение уровня ТМАО, стремящееся к статистической достоверности, однако ее не достигающее ($p=0.066$) в завершении исследования.

Среди пациентов, дополнительно получавших рифаксимин, затем Флорасан Д, выявлено статистически не значимое снижение концентрации ТМАО, как на 7-ой ($p=0.262$), так и 28-й день исследования ($p=0.558$).

Таким образом, ни один из терапевтических агентов, добавленных к основному лечению ИБС для воздействия на метаболизм кишечной микрофлоры, не оказал достоверного влияния на концентрацию ТМАО.

3.6 Оценка артериального давления участников исследования

Одним из показателей сердечно-сосудистого риска служит уровень систолического артериального давления (САД). В настоящем исследовании производилось измерение артериального давления с фиксацией цифр САД для сравнения между группами 1 и 4, а также в динамике среди групп 1,2,3.

В результате по завершении исследования все пациенты с ИБС продемонстрировали статистически достоверное снижение САД (p-критерий Вилкоксона) (Таблица 9)

Таблица 9 - Изменение уровня САД у пациентов с ИБС в течение исследования, p-критерий Вилкоксона

Показатели САД	Группа		
	1	2	3
САД, мм рт.ст. 1-й день	138 ± 14	137 ± 13	139 ± 12
САД, мм рт.ст., 7-й день	130 ± 12	128 ± 11	130 ± 10
САД, мм рт.ст., 28-й день	129 ± 9	128 ± 10	127 ± 8
	p1-2<0,05; p1-3<0,05; p2-3<0,05	p1-2<0,05; p1-3<0,05; p2-3<0,05	p1-2<0,05; p1-3<0,05; p2-3<0,05

При сравнении между группами по данному показателю различия имелись лишь между пациентами с ИБС и лицами без сердечно-сосудистых заболеваний (1 и 4 группа) (p-критерий Манна - Уитни<0.05) (Рисунок 23)

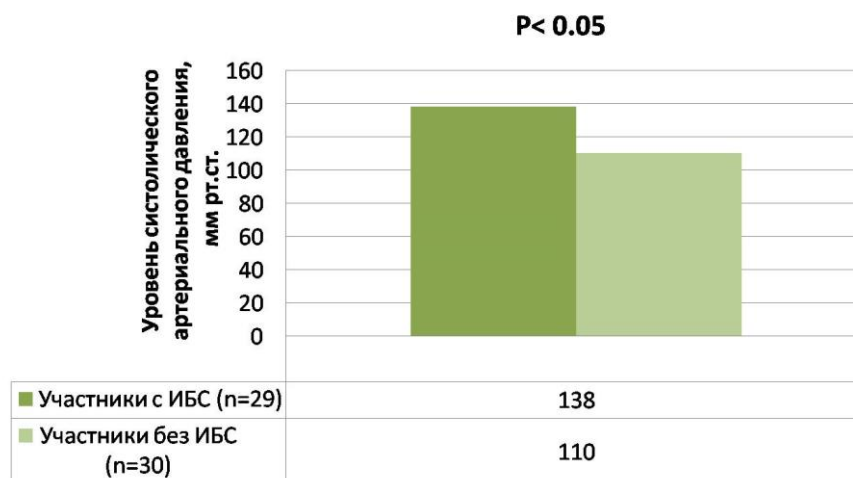


Рисунок 23. Сравнение уровня САД участников исследования из 1 и 4 групп

В отношении участников с ИБС, получавших дополнительно к основному лечению пробиотик и антибиотик, при сравнении между группами 1,2 и 3 достоверных различий в уровне САД не обнаружено ($p_{1-2} > 0.05$, $p_{1-3} > 0.05$, $p_{2-3} > 0.05$) (Рисунок 24).

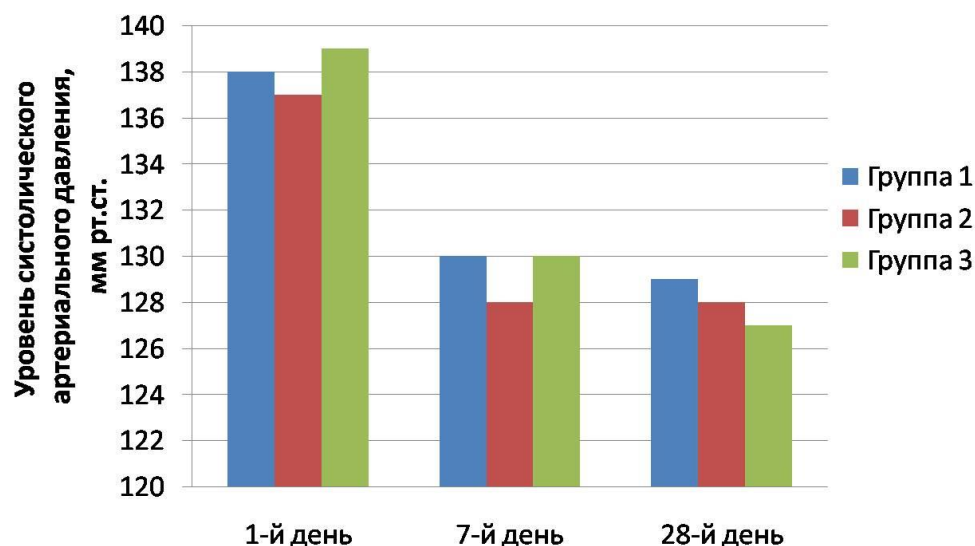


Рисунок 24. Сравнение уровня систолического артериального давления участников с ИБС

3.7 Оценка изменений показателей липидного профиля участников

Оценка изменений липидного профиля производилась во всех группах, с последующим сравнением пациентов с ИБС (группа 1, контрольная) и участников без ИБС (группа 4, сравнения), так и среди пациентов с ИБС (группы 1,2,3) в начальной, промежуточной и конечной точке исследования, на фоне дополнительного приема пробиотика и антибиотика.

В отношении концентрации общего холестерина различий между пациентами с ИБС и участниками без ИБС не выявлено ($p=0.110$), тем не менее определялись достоверные различия относительно концентрации ЛПОНП ($p=0.0001$), ЛПНП ($p=0.003$), ЛПВП ($p=0.001$), триглицеридов ($p=0.0001$). (Рисунок 25)

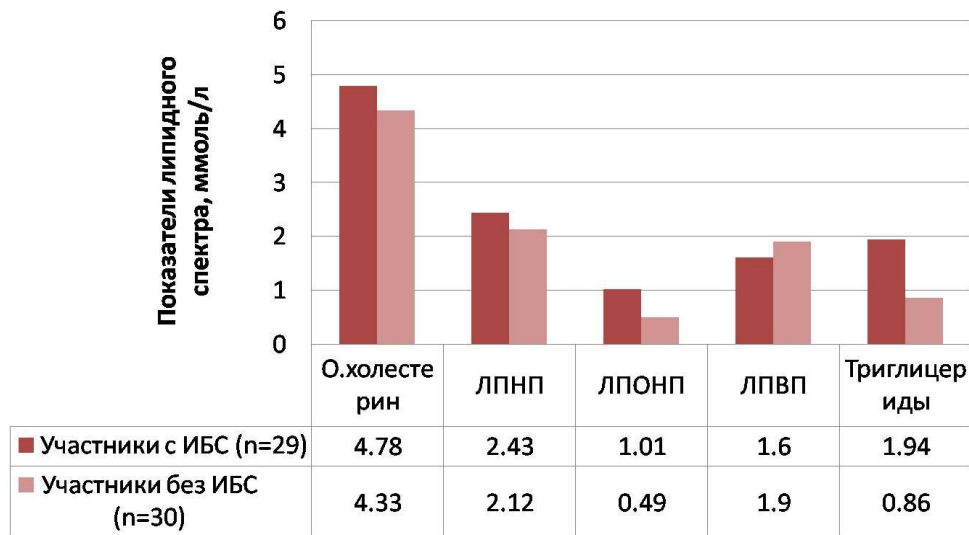


Рисунок 25. Сравнение показателей липидного спектра между пациентами с ИБС и без ИБС. * - $p < 0.05$ (критерий Манна-Уитни)

Прием Флорасана Д через 7 дней не привел к изменению концентрации холестерина ($p=0.943$), ЛПОНП ($p=0.453$), ЛПВП ($p=0.05$), триглицеридов

($p=0.191$), наблюдалось статистически значимое снижение ЛПНП ($p=0.001$). Однако, в заключительной точке исследования данные изменения не зафиксированы ($p=0.080$). Достоверных изменений концентрации общего холестерина ($p=0.079$), ЛПОНП ($p=0.504$), ЛПВП ($p=0.202$), триглицеридов ($p=0.141$) на 28-й день исследования не наблюдалось. При сравнении с контрольной группой также не отмечалось различий в промежуточной и конечной точке исследования (p -критерий Манна-Уитни >0.05).

В группе 3, последовательно получавшей в дополнение к основному лечению рифаксимин и Флорасан Д, уровень общего холестерина при применении рифаксимины продемонстрировал статистически значимое снижение на 7-й день исследования ($p=0.0001$), после завершения курса лечения рифаксимином, тем не менее тенденция не подтвердилась на 28-й день ($p=0.981$). (Рисунок 26)

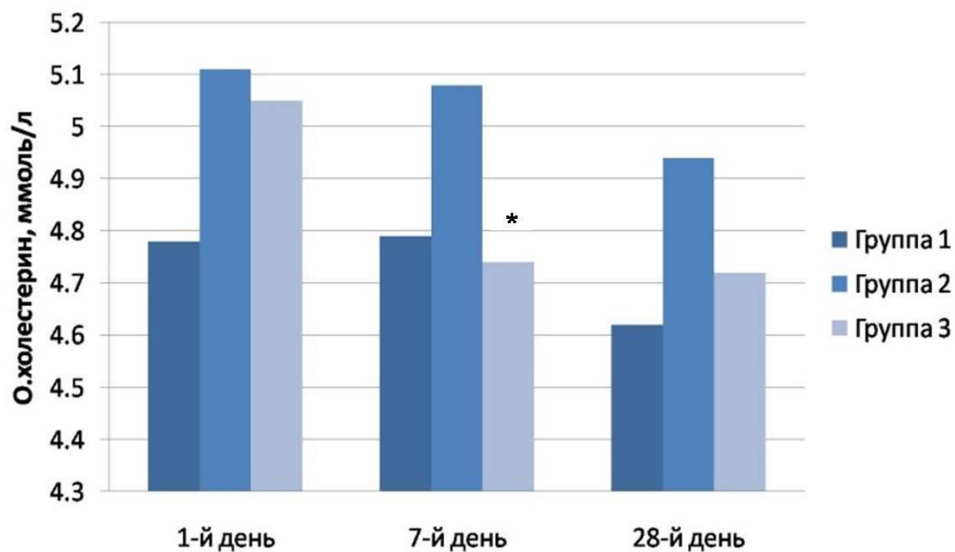


Рисунок 26. Изменение концентрации общего холестерина участников исследования в динамике. °, * - $p < 0.05$ для разных групп (критерий Вилкоксона)

При межгрупповом сравнении изменения концентрации общего холестерина также не продемонстрировали статистической значимости в итоге исследования (р-критерий Манна-Уитни >0.05).

Выявлено снижение концентрации ЛПОНП с 1.62 ± 0.67 ммоль/л до 1.45 ± 0.64 ммоль/л на 7-й день исследования, после завершения курса лечения рифаксимином ($p=0.032$), что сохранялось после завершения приема Флорасана Д на 28-й день исследования - до 1.38 ± 0.63 ммоль/л ($p=0.027$). (Рисунок 27)

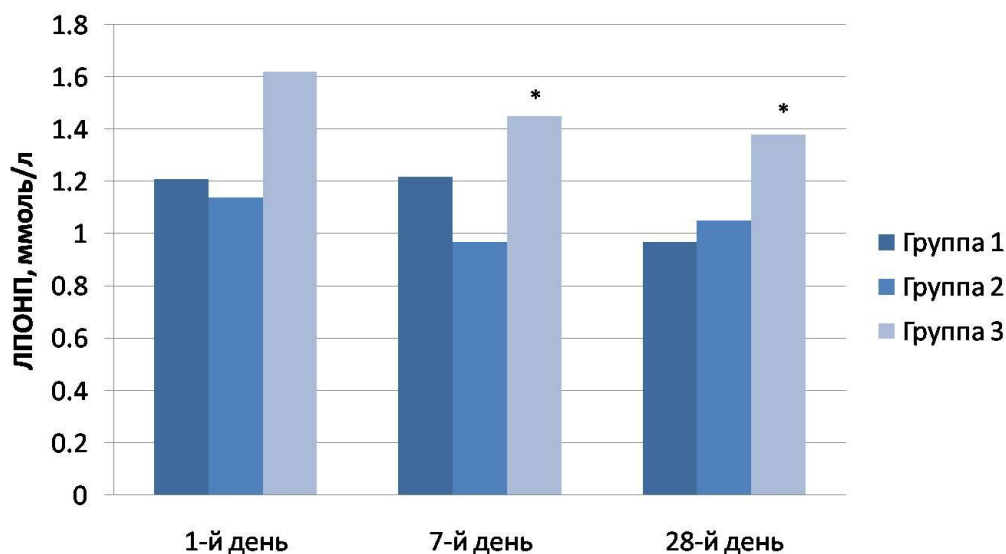


Рисунок 27. Изменение концентрации ЛПОНП участников исследования в динамике. * - $p < 0.05$ (критерий Вилкоксона)

Результат оказался статистически значимым при сравнении с контрольной группой (р-критерий Манна-Уитни <0.05).

В отношении ЛПНП последовательный прием рифаксимины и Флорасана Д продемонстрировал влияние на снижение их концентрации (2.12 ± 0.82 ммоль/л vs. 1.86 ± 0.88 ммоль/л, $p_{1-7} = 0.016$ и $p_{7-28} = 0.014$). (Рисунок 28)

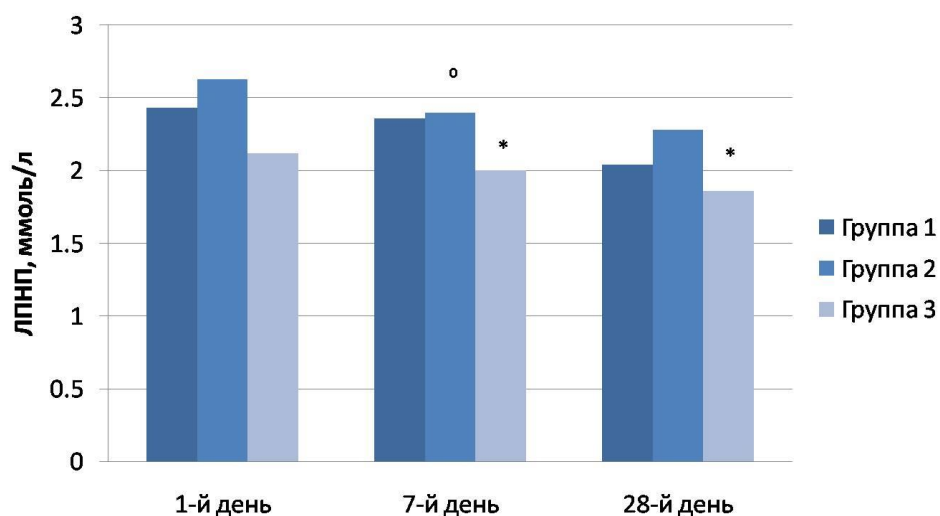


Рисунок 28. Изменение концентрации ЛПНП участников исследования в динамике. °, * - $p < 0.05$ для разных групп (критерий Вилкоксона)

В отношении уровня триглицеридов при последовательной терапии рифаксимином и Флорасаном Д отмечено достоверное снижение их уровня (2.11 ± 1.07 ммоль/л vs 1.60 ± 0.68 ммоль/л, $p_{1-7} = 0.039$, $p_{7-28} = 0.001$). (Рисунок 29)

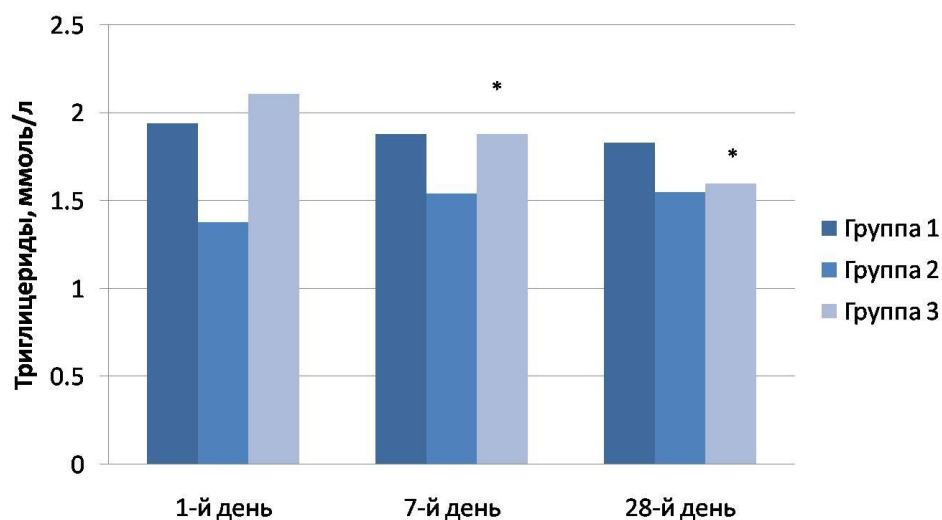


Рисунок 29. Изменение концентрации триглицеридов участников исследования в динамике. * - $p < 0.05$ (критерий Вилкоксона)

При оценке уровня ЛПВП при последовательном приеме рифаксимины и Флорасана Д достоверных различий не получено ($p_{1-7} = 0.982$ и $p_{7-28} = 0.867$) не получено. (Рисунок 30)

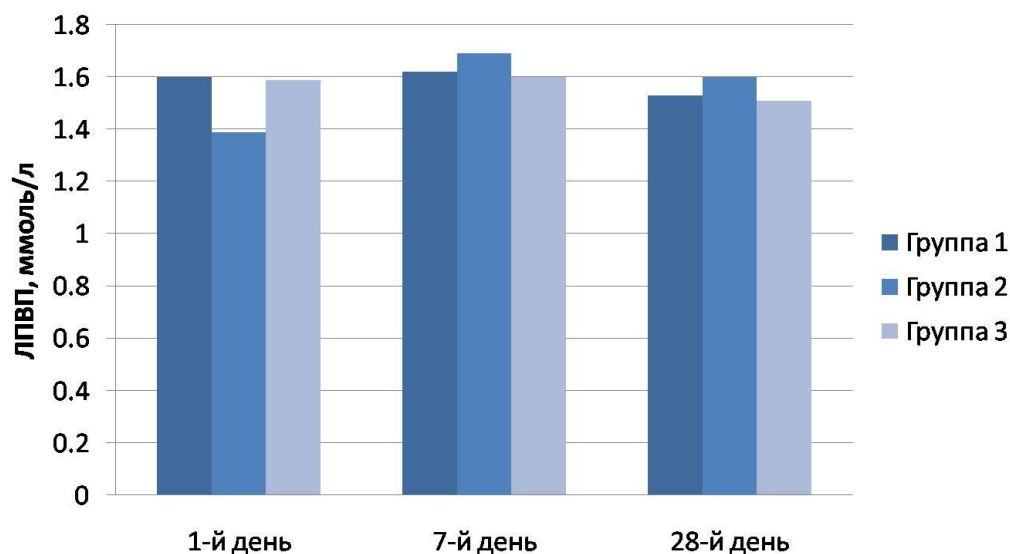


Рисунок 30. Изменение концентрации ЛПВП участников исследования

3.8 Оценка изменений скорости агрегации тромбоцитов участников

Еще одним изучаемым показателем в настоящем исследовании, продемонстрировавшим в экспериментах на животных связь с уровнем ТМАО, служила скорость агрегации тромбоцитов. Сравнение по данному показателю производилось как между группами пациентов с ИБС, так и между участниками с ИБС и без указанного заболевания.

Согласно полученным данным, не наблюдалось различий в скорости агрегации тромбоцитов между группой 1 (пациенты с ИБС) и группой 4 (участники без ИБС) ($p=0.184$). (Рисунок 31)

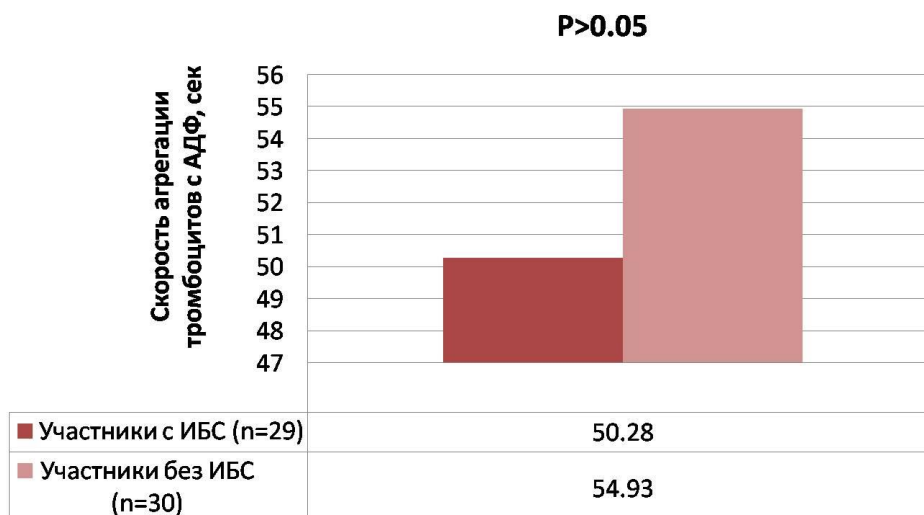


Рисунок 31. Сравнение скорости агрегации тромбоцитов у пациентов с ИБС (группа 1) и участников без ИБС (группа 4)

Добавление к терапии Флорасаном Д или последовательного лечения рифаксимином и Флорасаном Д не повлияло на скорость агрегации тромбоцитов в динамике ($p_{1-28} = 0.813$ и $p_{1-28} = 0.992$, соответственно) . (Рисунок 32)

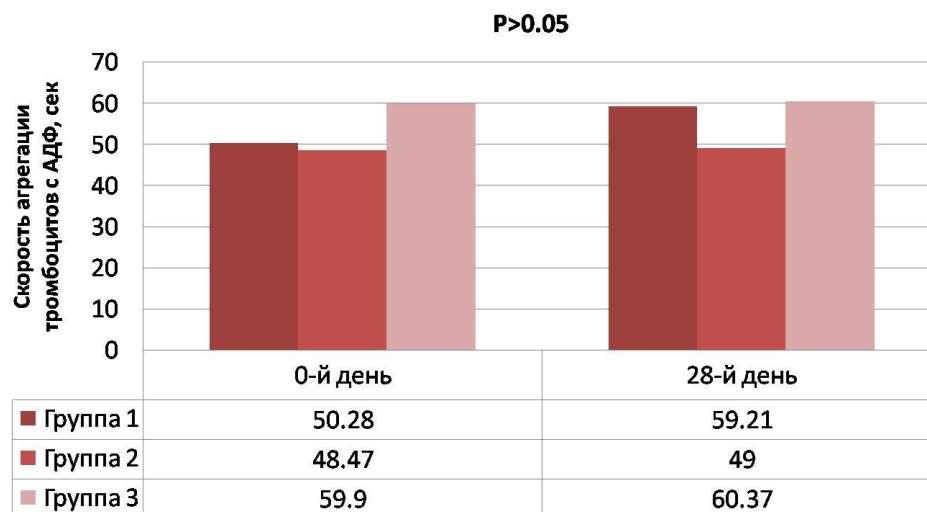


Рисунок 32. Изменение скорости агрегации тромбоцитов у пациентов с ИБС при добавлении к терапии Флорасана Д (группа 2), рифаксимины и Флорасана Д (группа 3) в сравнении с контрольной группой (группа 1)

3.9 Оценка влияния метаболизма кишечной микрофлоры на показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ИБС

Эксперименты на животных продемонстрировали взаимосвязь между концентрацией ТМАО и некоторыми показателями сердечно-сосудистого риска. Ввиду этого одной из основных задач данного исследования служило изучение возможности влияния на микробиом кишечника пациентов с ИБС, и посредством этого, на снижение сердечно-сосудистого риска.

Оценка корреляции между уровнем ТМАО и показателями сердечно-сосудистого риска осуществлялась в динамике на протяжении исследования. В результате в группе контроля (группа 1), а также среди пациентов, получавших дополнительно Флорасан Д (группа 2), изменений со стороны липидного профиля, агрегации тромбоцитов не наблюдалось, не отмечено также влияния на концентрацию ТМАО.

Корреляция между концентрацией ТМАО и показателями липидного профиля, а также ТМАО и скоростью агрегации тромбоцитов в указанных группах не обнаружено. Не выявлено влияния терапии пробиотиком и на уровень САД (Таблица 10, 11)

Таблица 10 - Корреляция между уровнем ТМАО, показателями липидного профиля и скоростью агрегации тромбоцитов в группе 1. Тргл - триглицериды, АгрТ - скорость агрегации тромбоцитов, САД - систолическое артериальное давление, r - коэффициент корреляции Пирсона

Группа 1 (n=29)		О.холестерин	ЛПНП	ЛПОНП	ЛПВП	Тргл	АгрТ	САД
ТМАО в 1-й день исследования	r	-0.0175	-0.0038	-0.005	0.194	0.301	0.113	-0,435
	p	0.364	0.0844	0.979	0.313	0.112	0.561	0.018
ТМАО на 7-й день исследования	r	-0.087	-0.0061	-0.165	0.086	0.080	-0.087	0.071
	p	0.652	0.0754	0.391	0.658	0.682	0.652	0.714
ТМАО на 28-й день исследования	r	0.213	0.0016	-0.141	0.045	-0.155	0.213	-0.236
	p	0.266	0.0933	0.466	0.818	0.423	0.266	0.217

Таблица 11 - Корреляция между уровнем ТМАО, показателями липидного профиля и скоростью агрегации тромбоцитов в группе 2. Тргл - триглицериды, АгрТ - скорость агрегации тромбоцитов, САД - систолическое артериальное давление, r - коэффициент корреляции Пирсона

Группа 2 (n=30)		О.холестерин	ЛПНП	ЛПОНП	ЛПВП	Тргл	АгрТ	САД
ТМАО в 1-й день исследования	r	0.110	0.136	-0.031	0.278	-0.122	0.070	0.040
	p	0.561	0.474	0.870	0.136	0.522	0.712	0.836
ТМАО на 7-й день исследования	r	0.253	0.211	0.177	0.118	0.087	0.253	-0.015
	p	0.177	0.262	0.348	0.534	0.649	0.177	0.938
ТМАО на 28-й день исследования	r	0.122	0.134	0.052	0.071	0.013	0.122	-0.166
	p	0.522	0.482	0.786	0.708	0.947	0.522	0.056

При применении рифаксимины отмечалось снижение уровня ЛПНП ($p < 0.05$), ЛПОНП ($p < 0.05$), триглицеридов ($p < 0.05$) на 7-й и 28-й день исследования, однако корреляции с уровнем ТМАО не обнаружено ($p > 0.05$). В отношении скорости агрегации тромбоцитов также не выявлено взаимосвязи между данным показателем и ТМАО ($p > 0.05$). (Таблица 12)

Таблица 12 - Корреляция между уровнем ТМАО, показателями липидного профиля и скоростью агрегации тромбоцитов в группе 3. Тргл - триглицериды, АгрТ - скорость агрегации тромбоцитов, САД - систолическое артериальное давление, r - коэффициент корреляции Пирсона

Группа 3 (n=30)		О.холестерин	ЛПНП	ЛПОНП	ЛПВП	Тргл	АгрТ	САД
ТМАО в 1-й день исследования	r	-0.364	0.209	0.078	0.534	-0.142	0.084	0.188
	p	0.148	0.268	0.682	0.102	0.455	0.657	0.320
ТМАО на 7-й день исследования	r	-0.235	-0.143	0.210	0.701	-0.244	-0.235	-0.211
	p	0.211	0.452	0.265	0.100	0.194	0.211	0.263
ТМАО на 28-й день исследования	r	-0.236	0.112	0.454	0.068	0.153	-0.236	-0.323
	p	0.210	0.557	0.212	0.722	0.418	0.210	0.081

Таким образом, ни применение антибиотика, ни применение пробиотика отдельно или после антибактериальной терапии значительно не повлияло на уровень метаболита кишечной микрофлоры ТМАО у пациентов с ИБС ($p>0.05$). Концентрация ТМАО при этом не имела связи с изменением показателей липидного профиля ($p>0.05$), скорости агрегации тромбоцитов ($p>0.05$), уровнем САД ($p>0.05$) среди участников исследования.

При анализе факторов, вносящих дополнительный вклад как в сердечно-сосудистый риск, так и в изменение микробиоты кишечника выявлена убедительная корреляция между ИМТ и концентрацией ТМАО ($p>0.05$) (Таблица 13)

Таблица 13 - Анализ взаимосвязи концентрации ТМАО с факторами сердечно-сосудистого риска (пол, возраст, неблагоприятный семейный анамнез в отношении сердечно-сосудистых заболеваний, ИМТ, курение), r - коэффициент корреляции Пирсона

Участники исследования (n=119)		ТМАО
Возраст	r	0.102
	p	0.342
Пол	r	0.02
	p	0.987
Неблагоприятный анамнез в отношении ССЗ	r	0.116
	p	0.209
ИМТ	r	0,438**
	p	0.000
Курение	r	0.026
	p	0.781
**. Корреляция значима на уровне 0.05 (2-сторонняя) *. Корреляция значима на уровне 0.01 (2-сторонняя)		

Другие изученные факторы (пол, возраст, неблагоприятный семейный анамнез в отношении сердечно-сосудистых заболеваний, курение) не продемонстрировали корреляции с изменением ТМАО ($p > 0.05$).

Диета служит важным фактором сердечно-сосудистого риска и влияет на изменение состава и функции кишечного микробиома. Ввиду этого, среди участников исследования производилась оценка взаимосвязи рациона и концентрации ТМАО. Согласно полученным данным, наблюдалась убедительная

прямая корреляция между ростом концентрации ТМАО и частотой употребления таких продуктов, как молоко ($p < 0.01$) и сыр ($p < 0.01$), яйца ($p < 0.01$), говядина ($p < 0.01$), свинина ($p < 0.01$), бобовые ($p < 0.05$). Употребление рыбы не было ассоциировано с увеличением ТМАО в крови. (Таблица 14)

Таблица 14 - Корреляция между продуктами и повышением концентрации ТМАО. r - коэффициент корреляции Пирсона

	Говядина	Свинина	Рыба	Молоко	Сыр	Яйца	Бобовые
r	0,407**	0,706**	0.005	0,586**	0,579**	0,525**	0,238*
p		0.000	0.966	0.000	0.000	0.000	0.025
**. Корреляция значима на уровне 0.01 (2-сторонняя)							
*. Корреляция значима на уровне 0.05 (2-сторонняя)							

По причине отсутствия статистически значимых значений для оценки коэффициента корреляции, цветная капуста, морепродукты, бобовые в таблицу не включены

Не менее важной представляется выявленная в исследовании ассоциация между увеличением концентрации ТМАО и положительными значениями дыхательного теста на избыточный бактериальный рост у пациентов с ИБС ($r = 0,821$; $p = 0,001$). Ввиду указанной связи определение наличия СИБР и его лечение может вносить вклад в коррекцию сердечно-сосудистого риска у данной группы пациентов.

Глава 4 Обсуждение результатов

4.1 Особенности состава и метаболической активности кишечной микрофлоры у пациентов с ишемической болезнью сердца

Изменения микрофлоры, характерные для пациентов с ИБС до настоящего времени изучены недостаточно. По данным проведенных ранее исследований, проводившихся только в сравнении со здоровыми людьми, в структуре микроорганизмов у указанной группы людей преобладают *Streptococcus*, *Enterococcus*, наравне со снижением количества *Bacteroides* [60].

Настоящее исследование впервые позволило оценить изменения одновременно состава и метаболической активности кишечной микрофлоры у пациентов с ИБС как в сравнении с здоровыми людьми, так и в динамике при дополнительной терапии антибиотиком и пробиотиком. Сравнение с здоровыми добровольцами представляется важным ввиду необходимости выявления особенностей состава и функций микробиома, характерных для данного заболевания.

Согласно полученным результатам, у пациентов с ИБС отмечалось достоверное, в среднем, трехкратное увеличение концентрации ТМАО, в сравнении со здоровыми добровольцами (1036.39 ± 748.22 нг/мл vs. 376.53 ± 147.95 нг/мл, $p=0.0001$). Значения данного метаболита в группе без сердечно-сосудистых заболеваний в целом схожи с показателями нормы, определенной для здоровых индивидов в предыдущих исследованиях.

В структуре фекальной микрофлоры у пациентов с ИБС отмечено относительное увеличение количества бактерий-продуцентов триметиламина, предшественника ТМАО, из семейств *Enterobacteriaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, родов *Escherichia/Shigella*. Количество ДНК бактерий в образцах пациентов с

ИБС было большим, чем среди участников без ИБС, что позволяет косвенно предположить связь с избыточным бактериальным ростом.

4.2 Влияние рациона участников исследования на метаболизм кишечной микрофлоры

Диетические предпочтения людей тесно связаны с изменением состава их кишечного микробиома. Рациональное питание служит одним из немедикаментозных методов профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Всемирная организация здравоохранения рекомендует снижение количества соли, насыщенных и транс-жиров в диете, увеличение количества овощей и фруктов [61].

Появление данных о ТМАО как о потенциально атерогенном метаболите позволило предположить, что уменьшение в рационе продуктов-предшественников ТМАО также может способствовать снижению сердечно-сосудистого риска.

Предыдущие исследования с участием в основном здоровых людей выявили корреляцию между повышением концентрации ТМАО и употреблением красного мяса, яиц, молочных продуктов, продуктов с повышенным количеством насыщенных жиров [62, 63].

В настоящем исследовании данные о рационе участников были собраны методом анкетирования, без учета продуктов в граммах и калориях. Согласно данным анкетирования, пациенты с ИБС чаще, чем участники без ИБС, включали в рацион красное мясо($p<0.05$), молоко($p<0.05$) и реже яйца($p<0.05$), рыбу ($p<0.05$). Обращает внимание одинаково редкое употребление морепродуктов, бобовых, цветной капусты и брокколи среди всех участников исследования, что,

вероятно, связано с национальными особенностями рациона и социальными условиями.

Данные, полученные при обработке результатов, согласуются с полученными в предыдущих исследованиях. Так, достоверная ассоциация с повышением уровня ТМАО выявлена для красного мяса, яиц, молочных продуктов, бобовых ($p < 0.05$). Однако в отношении употребления рыбы значимой корреляции с ТМАО не получено, несмотря на то, что рыба служит источником образования указанного метаболита. Полученные результаты также схожи с предшествовавшими исследованиями, где не выявлено связи между употреблением рыбы и ростом концентрации ТМАО, объяснение данному факту в настоящий момент не найдено.

Следует отметить, что участники следовали своему обычному рациону в течение всего времени проведения исследования, диета не была стандартизована в отношении продуктов-предшественников ТМАО, ввиду предполагаемой низкой приверженности к ее соблюдению. Выявленная корреляция роста уровня ТМАО и употребления определенных продуктов может быть предпосылкой для создания новых диетических рекомендаций для пациентов с ИБС.

4.3 Вклад избыточного бактериального роста в тонкой кишке в изменение метаболизма кишечного микробиома у пациентов с ИБС

Пациенты с ИБС имеют множество предпосылок для развития СИБР, таких как ожирение, нерациональное питание, связанные с этим нарушения стула, дисфункция сфинктера Одди и другие заболевания органов пищеварения. В 2017 г Fialho A et al в исследовании с участием более 1000 пациентов продемонстрировали, что СИБР может быть независимым фактором развития ИБС [8].

В настоящем исследовании была впервые проведена оценка взаимосвязи между наличием СИБР и концентрацией ТМАО. Проанализировано также и влияние применявшихся средств для коррекции микрофлоры, рифаксимины и Флорасана Д, на показатели дыхательного водородного теста у пациентов с ИБС.

В результате обнаружена статистически достоверная корреляция между повышением уровня ТМАО и наличием СИБР у пациентов с ИБС.

Причина данной корреляции представляется неясной, ввиду различных метаболических путей образования избытка водорода и ТМАО. Так, в основе образования водорода лежит углеводный обмен, что при СИБР опосредовано избытком микроорганизмов в тонкой кишке, его осуществляющих. В то же время, триметиламин по своей структуре является простым амином, и в его синтезе задействованы иные метаболические пути. Тем не менее, схожесть профилей микроорганизмов, определяемых при СИБР (*Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Bacteroides*, *Clostridium*), и ТМА-продуцентов (*Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Shigella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Enterococcus*), а также вероятность передачи между бактериями генов CutC/CutD, способствующих превращению холина и L-карнитина в ТМА, позволяет предположить, что указанные процессы осуществляются одними и теми же микроорганизмами.

При добавлении к основному лечению у пациентов с ИБС Флорасана Д в настоящем исследовании не обнаружено его влияния на результаты дыхательного водородного теста на СИБР. Прием рифаксимины ожидаемо привел к излечению пациентов от СИБР, при этом результаты дыхательного водородного теста всех участников оставались отрицательными на протяжении исследования.

Таким образом, выявление и лечение СИБР с помощью рифаксимины может быть одной из потенциальных терапевтических стратегий в снижении сердечно-сосудистого риска у пациентов с ИБС.

4.4 Оценка сердечно-сосудистого риска участников исследования и его взаимосвязь с метаболической активностью кишечного микробиома

Основой для настоящего исследования служили полученные ранее данные о возможности влияния на такие показатели сердечно-сосудистого риска, как дислипидемия, повышение систолического артериального давления и ускорение агрегации тромбоцитов, посредством модификации метаболизма кишечной микрофлоры.

Изучение липидного профиля животных, а затем и людей в большинстве работ по оценке влияния микробиома на обмен холестерина выявило достоверную корреляцию между уровнем ТМАО и концентрацией общего холестерина, триглицеридов, ЛПНП [64]. Учеными предположено влияние ТМАО на ускорение прямого транспорта холестерина в периферические ткани, его всасывания в кишечнике посредством воздействия на определенные рецепторы [6].

Результаты настоящего исследования частично согласуются с полученными ранее данными. У пациентов с ИБС отмечено повышение уровня ЛПНП ($p < 0.05$), ЛПОНП ($p < 0.05$), триглицеридов ($p < 0.05$), несмотря на терапию статинами, в сравнении с участниками без сердечно-сосудистых заболеваний. Уровень ТМАО у пациентов с ИБС также оказался достоверно выше ($p < 0.05$), в сравнении со здоровыми участниками. Тем не менее, статистически значимой корреляции между показателями липидного спектра и концентрацией ТМАО в крови участников в настоящем исследовании не получено ($p > 0.05$ для всех групп). Развитие дислипидемии имеет множество причин и патогенетических механизмов. [44] Вероятно, генетические и другие факторы могут также вносить вклад в указанные особенности пациентов с ИБС, вне связи с концентрацией ТМАО.

Уровень систолического артериального давления (САД) служит еще одним показателем сердечно - сосудистого риска. Предыдущие исследования не выявили взаимосвязи между увеличением концентрации ТМАО и повышением артериального давления у животных, однако была предположено его потенцирующее влияние в отношении действия ангиотензина II [40]. Не было доказано повышение артериального давления среди людей, употребляющих больше продуктов-предшественников триметиламина [41]. Тем не менее, Nie J et al продемонстрировали достоверное увеличение частоты инсультов у пациентов с гипертонической болезнью при повышении концентрации ТМАО [41].

В настоящем исследовании связь между уровнем ТМАО и изменением САД не подтвердилась ($p > 0.05$ для всех групп), что в целом согласуется с полученными ранее данными по этой проблеме. Несмотря на то, что ТМАО служит осмолитом, регуляция артериального давления представляет собой сложный процесс, с множеством патогенетических механизмов. Пациенты в исследовании получали различные группы антигипертензивных препаратов, стандартизация по этому показателю в исследовании была невозможна по причине потенциального вреда для здоровья участников.

Нарушение функциональной активности тромбоцитов традиционно не входит в стандартный список факторов сердечно-сосудистого риска, тем не менее повышение агрегации тромбоцитов является важным элементом патогенеза ССЗ [65]. Особенно важно это в отношении пациентов с ИБС, вследствие чего большинство из них стандартно получает антиагрегантную терапию. Ввиду этого скорость агрегации тромбоцитов вынесена в настоящем исследовании в качестве самостоятельного показателя сердечно-сосудистого риска.

Потенциальная роль кишечной микробиоты в регуляции скорости агрегации тромбоцитов посредством продукции ТМАО изначально была продемонстрирована на животных. В отношении людей, а именно здоровых

добровольцев, той же группой авторов выявлена ассоциация повышения указанного метаболита с возрастанием скорости агрегации тромбоцитов. Ученые сделали вывод о вероятной пользе профилактического назначения антиагрегантов у лиц с высокой концентрацией ТМАО [51]. Моделирование изменений агрегации тромбоцитов происходило в большинстве научных работ на животных, данных о связи между ТМАО и агрегацией тромбоцитов недостаточно для однозначных выводов. В настоящем исследовании указанная ассоциация не подтвердилась ($p > 0.05$ для всех групп), тем не менее, в рамках настоящего исследования все пациенты с ИБС получали аспирин, стандартизация по этому показателю служила одним из критериев включения. По результатам скорость агрегации тромбоцитов не отличалась среди участников вне зависимости от наличия ССЗ (группа 1 vs. группа 4 50.28 сек. vs 54.93 сек., $p > 0.05$), что может свидетельствовать об успешной терапии аспирином для снижения сердечно-сосудистого риска в группе пациентов с ИБС.

Кроме того, в исследовании оценивалось влияние на уровень ТМАО таких факторов, как курение, ИМТ, особенности рациона участников, ввиду их связи с повышением сердечно-сосудистого риска и нарушением микробиома кишечника по данным предыдущих исследований [66].

Курение служит не только фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, но также оказывает неблагоприятное влияние на кишечный микробиом. Известно, что кишечная микробиота играет роль в метаболизме нутриентов, лекарств и потенциально токсичных соединений[15]. Поглощение токсичных химических соединений при курении сигарет изменяет обмен веществ и состав кишечной микрофлоры. В экспериментах на животных продемонстрировано снижение продукции муцина и простагландина E2,

увеличение активности синтазы оксида азота у мышей под воздействием никотина [67].

На сегодня нет исследований, отдельно посвященных оценке уровня ТМАО у курильщиков, тем не менее курение сигарет учитывается во многих научных работах в качестве фактора сердечно-сосудистого риска, обнаруживая при этом достоверную связь с концентрацией ТМАО [64]. Во всех изученных работах нет учета количества выкуриваемых сигарет и стажа курильщика. Настоящее исследование также учитывало лишь сам факт курения. В результате, не было обнаружено различий в количестве курильщиков среди участников с ИБС и здоровых добровольцев ($p > 0.05$). Ассоциация между уровнем ТМАО и курением не подтвердилась ($r = 0,026$; $p = 0.781$), что может объясняться большим вкладом других факторов в изменение метаболизма микробиоты - питанием, наличием или отсутствием ожирения, приемом медикаментов и другими. В целом, влияние данного фактора на уровень ТМАО остается не до конца изученной проблемой.

В отношении ИМТ также имеются ранее полученные сведения о более высоких значениях ТМАО у лиц с избыточной массой тела и ожирением. Причиной тому может служить нарушение состава и функций микробиоты при ожирении, что приводит к негативному воздействию как на кишечник и процессы пищеварения в нем, так и на другие органы посредством изменения продукции метаболитических сигнальных молекул [68]. Ввиду этого можно предположить общность патогенетических путей развития ожирения с изменением продукции ТМАО.

Участники с ИБС в настоящем исследовании ожидаемо имели больший вес и ИМТ ($p < 0.05$), у 56% из них отмечалось ожирение I-II степени. При этом установлена достоверная взаимосвязь между повышением ИМТ и концентрации ТМАО ($r = 0.438$; $p = 0.001$), что согласуется с результатами более ранних работ по данной проблеме.

Исследование также учитывало влияние немодифицируемых факторов риска на увеличение продукции ТМАО у пациентов с ИБС, а именно пола, возраста, неблагоприятного семейного анамнеза в отношении ССЗ.

Предыдущие эксперименты с участием животных и людей, посвященные оценке корреляции между концентрацией ТМАО и полом, не позволили сделать однозначные выводы. Так, Mueller et al., Stubbs et al., определили более высокий уровень данного метаболита в мужской популяции, в то время как Bennett et al., Obeid et al. - в женской [69, 70, 71, 72]. Согласно предположениям ученых, влияние пола в данной ситуации может быть опосредовано воздействием половых гормонов на экспрессию гена фермента ФМО-3, превращающего ТМА в ТМАО [71, 72]. Результаты настоящего исследования не выявили различий в продукции ТМАО у пациентов с ИБС мужского и женского пола ($r = 0.02$; $p=0.987$). Предположительно, это связано в отсутствии существенного влияния эстрогенов на популяцию старше 50 лет.

Влияние возраста на концентрацию ТМАО также служит предметом дискуссий. При изучении метаболизма кишечной микрофлоры у пациентов с атеросклерозом периферических артерий Roncal C et al обнаружили достоверную прямую корреляцию возраста и уровня ТМАО участников исследования, в то же время Barrea L et al не подтвердили указанную взаимосвязь среди пациентов с метаболическим синдромом [64, 73]. В рамках настоящего исследования этот вопрос был также изучен. Среди пациентов с ИБС не было подтверждено достоверной ассоциации концентрации ТМАО и возраста участников ($r = 0.102$; $p=0.342$).

Ввиду этого, вопрос влияния пола и возраста на уровень метаболита кишечной микрофлоры ТМАО и причины наличия или отсутствия взаимосвязи между этими показателями остается предметом дальнейшего изучения. Вероятно,

данные факторы могут вносить дополнительный вклад в изменение продукции ТМАО, тем не менее они не являются единственными важными.

Вклад неблагоприятного семейного анамнеза в отношении сердечно-сосудистых заболеваний в продукцию ТМАО практически не изучен. Отдельные научные работы отмечают связь ТМАО с экспрессией генов, ответственных за ускорение атеросклероза, однако эксперименты выполнены на животных [36]. Настоящее исследование не выявило различий среди пациентов с ИБС и здоровых добровольцев при оценке семейного анамнеза: большинство родителей и ближайших родственников у всех участников имели сердечно-сосудистые заболевания. При этом уровни ТМАО в группах с ИБС и группе сравнения достоверно отличались ($p < 0.05$), а корреляция между наличием неблагоприятного семейного анамнеза в отношении сердечно-сосудистых заболеваний и повышением уровня ТМАО не обнаружена ($r = 0.116$; $p = 0.209$). Вероятно, такие факторы, как рацион, масса тела, состав микробиоты кишечника вносят больший вклад в регуляцию продукции данного метаболита, чем генетические особенности человека.

4.5 Влияние рифаксими́на на изменения кишечной микрофлоры и показатели сердечно сосудистого риска у пациентов с ИБС

В качестве гипотезы в настоящем исследовании было высказано предположение о возможности влияния на определенные факторы сердечно-сосудистого риска посредством изменения кишечной микрофлоры у пациентов с ИБС.

Выбор терапевтических агентов для воздействия на микробиом кишечника осуществлялся с учетом их эффективности и безопасности для участников. Рифаксимин представляет собой антибиотик широкого спектра действия, активен

в отношении большинства бактерий, продуцирующих ТМАО, таких как *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Shigella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Enterococcus*.

Особенно важным представляется, что, в отличие от других антибиотиков широкого спектра действия, его всасывание в кишечнике составляет менее 1%. Благодаря указанным свойствам, рифаксимин в высокой концентрации способен накапливаться в просвете кишечника. При этом он не демонстрирует системных побочных эффектов, что важно для пациентов с ИБС, получающих множественную лекарственную терапию.

Согласно многим исследованиям, рифаксимин служит одним из самых эффективных и безопасных антибиотиков в терапии СИБР [74]. В данном исследовании у всех пациентов наблюдалось излечение от СИБР по завершении приема курса рифаксимины.

Патогенная и условно-патогенная микрофлора кишечника способствует поддержанию воспаления на уровне слизистой оболочки, увеличенной проницаемости эпителиального барьера за счет нарушения плотности межэпителиальных контактов. Терапия рифаксимином приводит к снижению численности указанных микроорганизмов, восстановлению плотности межэпителиальных контактов [75].

Кроме того, в 2017 г Ponziani et al продемонстрировали эффект рифаксимины, как эубиотика. При стандартном курсе лечения рифаксимином в дозе 1200 мг в день повышалось количество лакто-и бифидобактерий в просвете кишечника у участников исследования [52].

Ввиду указанных свойств рифаксимин был выбран для воздействия на микрофлору у пациентов с ИБС. Применение его в настоящем исследовании осуществлялось в течение 7 дней в дозе 1200 мг в день, рекомендуемой для лечения синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке.

На фоне применения указанного антибиотика уровень ТМАО в крови имел тенденцию к снижению, однако статистически не достоверную ($p > 0.05$).

Несмотря на отсутствие данных о значимом влиянии рифаксими́на на изменение метаболизма кишечного микробиома, при анализе состава фекальной микрофлоры участников в завершение приема препарата выявлено уменьшение относительного количества бактерий-продуцентов триметиламина семейства *Clostridiaceae 1* ($p < 0.05$), *Peptostreptococcaceae* ($p < 0.05$), тенденция к снижению *Enterobacteriaceae* ($p > 0.05$), с сохранением ее на уровне рода (уменьшение количества бактерий *Clostridium sensu stricto* ($p < 0.05$), *Clostridium XI* ($p = 0.05$), *Clostridium*, ($p > 0.05$)). Указанные бактерии служат представителями условно-патогенной микрофлоры, способствующей при определенных условиях возникновению избыточного бактериального роста в тонкой кишке и, наравне с этим, играют роль в образовании ТМАО.

Среди задач исследования было оценить влияние терапии антибиотиком на липидный профиль участников, изменение САД и скорость агрегации тромбоцитов.

В результате после 7-дневного приема рифаксими́на уровень общего холестерина продемонстрировал снижение, также отмечено небольшое, но статистически значимое снижение концентрации общего холестерина ($p < 0.05$), ЛПОНП ($p < 0.05$), ЛПНП ($p < 0.05$), триглицеридов ($p < 0.05$); уровень ЛПВП не изменился ($p > 0.05$). Учитывая уменьшение доли условно-патогенных бактерий в кишечнике, можно предположить положительное влияние данного антибиотика на липидный обмен посредством коррекции состава и, соответственно, метаболической активности микробиома кишечника у пациентов с ИБС. Тем не менее, влияние рифаксими́на на концентрацию ТМАО не подтвердилось (1945.98 ± 1786 нг/мл в 1-й день исследования vs. 1795.08 ± 1529.74 нг/мл на 7-й день исследования, $p > 0.05$), что может быть обусловлено недостаточной для этого

длительностью терапии рифаксимином и другими ограничивающими факторами в исследовании. Вероятно, улучшение показателей липидного профиля посредством коррекции микробиоты кишечника связаны с изменением продукции других ее метаболитов, например, цитокинов, воздействующих на инсулинорезистентность, липополисахаридов.

Изменения САД в динамике при дополнительной терапии рифаксимином у пациентов с ИБС служили еще одним предметом изучения. В завершении настоящего исследования у всех пациентов показатели САД продемонстрировали достоверное снижение (р-критерий Вилкоксона < 0.05 для всех групп), тем не менее различий между группами не выявлено (р-критерий Манна - Уитни > 0.05), что свидетельствует об отсутствии влияния дополнительной терапии антибиотиком на данный показатель сердечно-сосудистого риска. Прием антигипертензивных препаратов и сопутствующие факторы могли оказать влияние на полученные результаты.

В отношении скорости агрегации тромбоцитов влияния рифаксимины также не отмечено (50.28 сек. в 1-й день исследования vs. 59.21 сек. на 7-й день исследования, $p=0.992$). Отсутствие влияния на данный показатель может объясняться приемом антиагрегантной терапии пациентами с ИБС.

Таким образом, применение рифаксимины у пациентов с ИБС позволило уменьшить концентрацию условно-патогенной микрофлоры в кишечнике, устранить СИБР, оказало положительное влияние на липидный профиль в виде снижения концентрации общего холестерина, ЛПНП, ЛПОНП, триглицеридов. Не обнаружено значимого влияния на концентрацию потенциально проатерогенного метаболита ТМАО, скорость агрегации тромбоцитов и уровень САД.

4.6 Влияние мультиштаммового пробиотика Флорасан Д на метаболизм кишечной микрофлоры и показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ИБС

Среди требований, предъявляемых к пробиотиками как лекарственным средствам, важными служат безопасность и эффективность [60]. В качестве пробиотика в настоящем исследовании был выбран Флорасан Д (*Bifidobacterium bifidum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium longum* не менее 1×10^9 КОЕ; *Bifidobacterium infantis* не менее 1×10^9 КОЕ; *Lactobacillus rhamnosus* не менее 1×10^9 КОЕ), ввиду положительного влияния бактерий, входящих в его состав, на метаболизм липидов и высокого профиля безопасности, согласно результатам предыдущих исследований [59,77].

Часть пациентов получала Флорасан Д в течение 28 дней для оценки возможности модуляции состава и метаболизма кишечной микрофлоры с помощью пробиотических штаммов бактерий. Другая часть пациентов принимала Флорасан Д после предварительной санации кишечника от условно-патогенной микрофлоры, что гипотетически могло дать преимущество в колонизации тех или иных отделов кишечника. Курс приема пробиотика в данной группе составил 21 день. Общий временной промежуток дополнительной терапии (4 недели) был выбран с учетом необходимой приверженности пациентов к лечению с одной стороны, и наличия времени для композиционных и метаболических изменений микробиома с другой.

В отношении продукции ТМАО имелась некоторая тенденция к снижению его уровня, статистически не значимая, как при применении пробиотика в течение 28 дней (в группе $2\ 1945.98 \pm 1786$ нг/мл в 1-й день исследования vs. 1354.10 ± 1194.79 нг/мл на 28-й день исследования, $p > 0.05$), так и в течение 21 дня, после

рифаксимины (в группе 3 1795.08 ± 1529.74 нг/мл на 7-й день исследования vs. 1354.10 ± 1194.79 на 28-й день исследования, $p > 0.05$).

Теоретически, конкурентная по отношению к условно-патогенным микроорганизмам колонизация кишечника лакто- и бифидобактериями может играть благоприятную роль в уменьшении выделения триметиламина, а также в поддержании барьерной функции кишечного эпителия.

Тем не менее, в отношении состава образцов фекальной микрофлоры после применения Флорасана Д в течение 28 дней существенных изменений в структуре фекальной микробиоты не выявлено. Не отмечено влияния Флорасана Д на липидный профиль участников и агрегацию тромбоцитов в группе 2 в завершении исследования.

Среди участников с ИБС, получавших изначально рифаксимин в течение 7 дней, затем Флорасан Д в течение 21 дня (группа 3), по завершении исследования сохранялось снижение уровня ЛПНП ($p < 0.05$), ЛПОНП ($p < 0.05$), триглицеридов ($p < 0.05$), таким образом можно предположить положительное влияние на липидный обмен указанных терапевтических агентов у пациентов с ИБС.

При изучении изменений фекальной микрофлоры при терапии Флорасаном Д после рифаксимины значительных отличий в динамике, а также в сравнении с группой, не получавшей пробиотик, не обнаружено. Определялась противоречивая тенденция к увеличению количества некоторых семейств ТМА-продуцирующих бактерий *Peptostreptococcaceae* при снижении относительном снижении доли других (*Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae*) ($p > 0.05$). При оценке общей численности копий ДНК микроорганизмов, отмечено ее относительное восстановление в образцах, как среди ТМА-продуцирующих (*Streptococcus*, *Clostridia spp*), так и эубиотических (*Lactobacillus*) бактерий, после редукции их количества на фоне лечения антибиотиком. Вероятно, добавление пробиотика к основной терапии в данном случае способствует ускорению метаболических

процессов бактерий, таких, как образование короткоцепочечных жирных кислот, но не затрагивает обмен метиламинов. Настоящий факт служит предметом дальнейшего изучения.

Таким образом, прием пробиотика Флорасан Д в целом не повлиял на состав и метаболическую активность кишечного микробиома, что может быть связано с выбранным сроком приема пробиотика, устойчивостью кишечника к колонизации пробиотическими штаммами бактерий, особенно без предварительного коррекции состава микрофлоры с помощью антибиотика. Кроме того, несмотря на отсутствие влияния на уровень ТМАО, прием Флорасана Д после рифаксимины обнаружил дальнейшее снижение проатерогенных липидов, что может объясняться участием пробиотических бактерий в регуляции обмена липидов на уровне энтероцитов, участие в метаболизме желчи, ингибировании печеночного синтеза холестерина посредством продукции определенных короткоцепочечных жирных кислот [78].

4.7 Ограничения исследования

Ограничениями в настоящем исследовании, в первую очередь, служили небольшая выборка участников и отсутствие стандартизации диеты. Стандартизация диеты представлялась невозможной ввиду многих факторов, в том числе невысокой приверженности пациентов к диетическим рекомендациям и сложностью контроля рациона участников вне лечебного учреждения, что являлось бы необходимым, с учетом длительности исследования.

Важным ограничением служит невозможность анализа микрофлоры путем аспирации из проксимальных отделов толстой кишки (локализация ТМА-продуцирующих бактерий) вследствие риска для здоровья участников исследования. Микроорганизмы, определяемые в образцах фекальной микрофлоры могут не отражать изменения в составе и функциях пристеночной

микробиоты, скорее представлять собой совокупность бактерий, находящихся в просвете кишечника из различных отделов. Кроме того, в исследовании не было возможности оценить наличие у выделенных бактерий генов CutC/CutD, способствующих превращению холина и L-карнитина в триметиламин.

Определенную роль играет прием множества препаратов для терапии ИБС. Несмотря на включение в исследование пациентов, получающих аналогичные препараты, лекарственная терапия в отношении дозы и кратности приема подлежала коррекции в течение периода наблюдения, кроме того, стоит учитывать также фактор неодинаковой приверженности к лечению у различных пациентов.

Следует выделить ограничения и в отношении оценки влияния дополнительной терапии пробиотиком и антибиотиков на показатели систолического артериального давления. Среди пациентов с ИБС отмечались различия в стадии гипертонической болезни и степени поражения органов-мишеней, в составе и дозах принимаемых антигипертензивных средств. Объем лечения гипертонической болезни менялся в течение госпитализации, в отличие от терапии ИБС (в случае значительного изменения схемы лечения ИБС пациент исключался из исследования). Ввиду этого, не представлялось возможным полностью стандартизовать условия для оценки влияния дополнительного лечения пробиотиком и антибиотиком на данный показатель сердечно-сосудистого риска.

Отсутствие плацебо также может быть выделено как ограничение настоящего исследования.

Дополнительным ограничением также служило исследование образцов группы сравнения только в одной точке исследования ввиду отсутствия мотивации к продолжению исследования у относительно здоровых лиц.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с ИБС выявлено повышение доли условно-патогенных бактерий семейств *Verrucomicrobiaceae* ($p < 0.05$) и *Enterobacteriaceae* ($p < 0.05$), родов *Escherichia/Shigella* ($p < 0.05$) при сравнении с здоровыми добровольцами аналогичного возраста и пола, в образцах кишечной микрофлоры при 16-S секвенировании

2. Пациенты с ИБС имеют более высокий уровень продукции ТМАО в сравнении с здоровыми добровольцами аналогичного возраста и пола (1036.39 ± 748.22 нг/мл vs. 376.53 ± 147.95 нг/мл, $p = 0.0001$)

3. Рацион пациентов с ИБС в большей степени состоит из продуктов-источников фосфатидилхолина и L-карнитина - свинины ($p < 0,05$), говядины ($p < 0,05$), молока ($p < 0,05$), - в сравнении с здоровыми добровольцами аналогичного возраста и пола. Указанные продукты продемонстрировали достоверную корреляцию с повышением уровня ТМАО среди участников исследования ($r = 0.407$, $p = 0.001$; $r = 0,706$, $p = 0.001$; $r = 0.586$, $p = 0.001$, соответственно)

4. Увеличение массы тела у пациентов с ИБС положительно коррелирует с концентрацией ТМАО ($r = 0.438$; $p = 0.001$), тогда как другие факторы сердечно-сосудистого риска, вклад которых оценивался в исследовании (возраст ($r = 0.102$; $p = 0.342$), пол ($r = 0.02$; $p = 0.987$), неблагоприятный семейный анамнез в отношении сердечно-сосудистых заболеваний ($r = 0.116$; $p = 0.209$), курение ($r = 0,026$; $p = 0.781$)), не продемонстрировали такую зависимость. Избыточная продукция ТМАО может служить одним из механизмов повышения сердечно-сосудистого риска у пациентов с ожирением

5. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке служит потенциальным независимым фактором сердечно-сосудистого риска у пациентов с ишемической болезнью сердца, что подтверждается наличием достоверной связи данного синдрома с повышением концентрации ТМАО ($r = 0,821$; $p = 0,001$).

6. Антибиотик рифаксимин, при добавлении его к стандартной терапии ИБС в течение 7 дней, позволяет уменьшить количество триметиламин-продуцирующих бактерий семейств *Peptostreptococcaceae* ($p < 0.05$), *Clostridiaceae 1* ($p < 0.05$), родов *Clostridium sensu stricto* ($p < 0.05$), *Clostridium XI* ($p = 0.05$), в исследуемой группе пациентов, однако не влияет на уровень ТМАО (1945.98 ± 1786 нг/мл vs. 1795.08 ± 1529.74 нг/мл, $p > 0.05$)

7. Последовательное применение антибиотика рифаксимин в течение 7 дней и пробиотика Флорасан Д в течение 21 дня у пациентов с ИБС способствует снижению концентрации ЛПНП (2.12 ± 0.82 ммоль/л vs. 1.86 ± 0.88 ммоль/л, $p = 0.014$), ЛПОНП (1.62 ± 0.67 ммоль/л vs. 1.38 ± 0.63 ммоль/л, $p = 0.027$) и триглицеридов (2.11 ± 1.07 ммоль/л vs. 1.60 ± 0.68 ммоль/л, $p = 0.001$), не влияет на уровень систолического артериального давления (138 ± 1.4 мм рт.ст vs. 130 ± 12 мм рт.ст., $p = 0.339$) и скорость агрегации тромбоцитов (50.28 сек. vs. 59.21 сек., $p = 0.992$)

8. Исследуемые показатели сердечно-сосудистого риска (липидный профиль, скорость агрегации тромбоцитов, уровень систолического артериального давления) не продемонстрировали прямой зависимости от концентрации ТМАО на протяжении исследования ($p > 0.05$ для всех данных показателей среди пациентов с ИБС), что может быть связано с многообразием путей развития сердечно - сосудистых заболеваний, не включающих метаболизм кишечного микробиома

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рацион питания пациентов с ишемической болезнью сердца должен быть скорректирован, с учетом снижения употребления продуктов, повышающих уровень ТМАО в крови (красного мяса, яиц, молочных продуктов) для снижения сердечно-сосудистого риска

2. Пациентам с ишемической болезнью сердца целесообразно проводить тестирование на наличие синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке с использованием водородного дыхательного теста

3. При выявлении у пациентов ишемической болезнью сердца избыточного бактериального роста в тонкой кишке необходимо его лечение с целью коррекции состава и метаболизма кишечной микрофлоры и, таким образом, уменьшения сердечно-сосудистого риска

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АгрТ - агрегация тромбоцитов

ВДТ - водородный дыхательный тест

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ЛПНП - липопротеиды низкой плотности

ЛПОНП - липопротеиды очень низкой плотности

ЛПВП - липопротеиды высокой плотности

САД - систолическое артериальное давление

СИБР - синдром избыточного бактериального роста

ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания

ТМА - триметиламин

ТМАО -триметиламин -N- оксид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Исаков Е.Б. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний // Медицина и экология. - 2017. - № 2. - С. 19-28.
2. Е.А. Кашух, В.Т. Ивашкин. Пробиотики, метаболизм и функциональное состояние сердечно-сосудистой системы // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. - 2016. - Том 26, №1. - С.8-14
3. Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. N.Engl. J. Med. - 2013. - 368: 1575-1584.
4. Nowiński A, Ufnal M, Trimethylamine N-oxide: a harmful, protective or diagnostic marker in lifestyle diseases?, Nutrition (2017), doi: 10.1016/j.nut.2017.08.001.
5. Ufnal M, Zadło A, Ostaszewski R. TMAO: A small molecule of great expectations. Nutrition. 2015;31:1317-23.
6. Кашух Е.А., Ивашкин В.Т. Влияние микробиома человека на состояние сердечно-сосудистой системы. Молекулярная медицина. 2017. Т. 15. № 4. С. 3-7.
7. Falony G, Vieira-Silva S, Raes J. Microbiology Meets Big Data: The Case of Gut Microbiota-Derived Trimethylamine. Annu Rev Microbiol. 2015;69:305-321)
8. Fialho A, Kochhar G, Schenone AL, Thota P, McCullough AJ, Shen B. Association Between Small Intestinal Bacterial Overgrowth by Glucose Breath Test and Coronary Artery Disease. Dig Dis Sci. 2018 Feb;63(2):412-421. doi: 10.1007/s10620-017-4828-z.)

9. Rao SSC, Bhagatwala J. Small Intestinal Bacterial Overgrowth: Clinical Features and Therapeutic Management // Clin. Transl. Gastroenterol. - 2019. - Vol.10. - Ee00078.
10. Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk // The New England journal of medicine. - 2013. - Vol.368. - P1575-84.
11. Boutagy NE, Neilson AP, Osterberg KL, Smithson AT, Englund TR, Davy BM, Hulver MW, Davy KP. Probiotic supplementation and trimethylamine-N-oxide production following a high-fat diet. Obesity. Silver Spring. 2015 Dec;23(12):2357-63.
12. Tripolt NJ, Leber B, Triebl A, Köfeler H, Stadlbauer V, Sourij H. Effect of Lactobacillus casei Shirota supplementation on trimethylamine-N-oxide levels in patients with metabolic syndrome: An open-label, randomized study // Atherosclerosis. - 2015. - Vol.242. - P.141-144.
13. Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life // Microb. Ecol. Health Dis. - 2015. - Vol.26. - P.26050.
14. Zhang X, Li L, Butcher J, Stintzi A, Figeys D. Advancing functional and translational microbiome research using meta-omics approaches // Microbiome. - 2019. - Vol.7. - P.154
15. Ивашкин В.Т., Ивашкин К.В. Микробиом человека в приложении к клинической практике. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2017. - Том 27, №6. - С.4-13.
16. Allaband C, McDonald D, Vázquez-Baeza Y, Minich JJ, Tripathi A, Brenner DA, Loomba R, Smarr L7, Sandborn WJ, Schnabl B, Dorrestein P, Zarrinpar A, Knight R. Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians // Clin. Gastroenterol. Hepatol. - 2019. - Vol.17(2). - P.218-230.

17. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome // *Nature*. - 2012. - Vol. 486 (7402). - P.207-214.
18. Blanco-Míguez A, Gutiérrez-Jácome A, Fdez-Riverola F, Lourenço A, Sánchez B. MAHMI database: a comprehensive MetaHit-based resource for the study of the mechanism of action of the human microbiota // *Database Oxford*. - 2017. - pii: baw157.
19. Floch M, Ringel Y, Walker W. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. Implications for Human Health, Prebiotics // Probiotics, and Dysbiosis. - 2017. - Vol.1. - P.3-28.
20. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. - 2014. - Vol.505 - P.559-563.
21. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Pouillet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. - 2010. - Vol.107(33). - P.14691-14696.
22. Romanens M, Szucs T, Sudano I, Adams A. Agreement of PROCAM and SCORE to assess cardiovascular risk in two different low risk European populations // *Prev. Med Rep*. - 2018. - Vol.13. - P.113-117.
23. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology // *Eur. Heart J*. 2013. - Vol.34(38). - P.2949-3003.
24. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, Prescott E, Storey RF, Deaton C, Cuisset T, Agewall S, Dickstein K, Edvardsen T, Escaned J, Gersh BJ, Svitil P, Gilard M, Hasdai D, Hatala R, Mahfoud F, Masip J,

Muneretto C, Valgimigli M, Achenbach S, Bax JJ. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes // *Eur. Heart J.* - 2019. - pii: ehz425. 25. Ettinger G, MacDonald K, Reid G, Burton JP. The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health // *Gut Microbes.* - 2014. - Vol.5(6). - P.719-28.

26. Yancey PH, Siebenaller JF. Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective micromolecules and their roles in marine organisms. *The Journal of experimental biology*// - 2015. - Vol.218. - P.1880-1896.

27. Kirwan AM, Lenighan YM, O'Reilly ME, McGillicuddy FC, Roche HM. Nutritional modulation of metabolic inflammation // *Biochem. Soc. Trans.* - 2017. - Vol.45(4). - P.979-985.

28. Moreno-Navarrete JM, Serino M, Blasco-Baque V, Azalbert V, Barton RH, Cardellini M, Latorre J, Ortega F, Sabater-Masdeu M, Burcelin R, Dumas ME, Ricart W, Federici M, Fernández-Real JM. Gut Microbiota Interacts with Markers of Adipose Tissue Browning, Insulin Action and Plasma Acetate in Morbid Obesity. *Mol. Nutr. Food Res.* - 2018. - Vol.62, №3.

29. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K, Gao Z, Mahana D, Raju K, Teitler I, Li H, Alekseyenko AV, Blaser MJ. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity // *Nature.* - 2012. - Vol.488, № 7413. - P.621-626.

30. Karlsson FH, Fak F, Nookaew I, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome // *Nat. Commun.* - 2012. - Vol.3 - P.1245.

31. Yamashita T. Intestinal Immunity and Gut Microbiota in Atherogenesis // *J Atheroscler Thromb.* - 2017. - Vol.24, №2. - P.110-119.

32. Bain, R. Faull, G. Fornasini. Accumulation of trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis // *Nephrol. Dial. Transplant.* - 2016. - V. 21, №5. - P. 1300-1304.

33. F. Duranton, G. Cohen, R. De Smet. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins // J. Am. Soc. Nephrol. - 2012. - V. 23, №7. - P.1258-1270.
34. Tang WH, Wang Z, Fan Y, Levison B, Hazen JE, Donahue LM, Wu Y, Hazen SL. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis // J. Am. Coll. Cardiol. - 2014. - Vol.64. - P.1908-1914.
35. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease // Nature. - 2011. - Vol.472. - P.57-63.
36. Dong C, Yoon W, Goldschmidt-Clermont PJ. DNA methylation and atherosclerosis. J Nutr. 2002; 132:2406S–2409S.
37. Zaina S, Lindholm MW, Lund G. Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia? // J. Nutr. - 2015. - Vol.135. - P.5–8.
38. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, Li L, Fu X, Wu Y, Mehrabian M, Sartor RB, McIntyre TM, Silverstein RL, Tang WH, DiDonato JA, Brown JM, Lusis AJ, Hazen SL. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk // Cell. - 2016. - Vol.165. - P.111-124.
39. Zhu W, Wang Z, Tang W, Hazen SL. Gut Microbe-Generated Trimethylamine N-Oxide From Dietary Choline Is Prothrombotic in Subjects // Circulation. - 2017. - Vol.135. - P.1671-1673.
40. Ufnal M, Jazwiec R, Dadlez M, Drapala A, Sikora M, Skrzypecki J. Trimethylamine-N-oxide: a carnitine-derived metabolite that prolongs the hypertensive effect of angiotensin II in rats // Can. J. Cardiol. - 2014. - Vol.30. - P. 1700-1705.
41. Nie J, Xie L, Zhao BX, Li Y, Qiu B, Zhu F, Li GF, He M, Wang Y, Wang B, Liu S, Zhang H, Guo H, Cai Y, Huo Y, Hou FF, Xu X, Qin X. Serum Trimethylamine N-

Oxide Concentration Is Positively Associated With First Stroke in Hypertensive Patients // Stroke. - 2018. - Vol.49. - P.2021-2028.

42. Taesuwan S, Vermeylen F, Caudill MA, Cassano PA. Relation of choline intake with blood pressure in the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2010 // Am. J. Clin. Nutr. - 2019. - Vol. 109. - P.648-655.

43. Bronzato S, Durante A. A Contemporary Review of the Relationship between Red Meat Consumption and Cardiovascular Risk // Int. J. Prev. Med. - 2017 - Vol.8. - P.40.

44. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis // Nature medicine. - 2013. - Vol.19. - P.576-85

45. Collins HL, Drazul-Schrader D, Sulpizio AC, Koster PD, Williamson Y, Adelman SJ, Owen K, Sanli T, Bellamine A. L-Carnitine intake and high trimethylamine N-oxide plasma levels correlate with low aortic lesions in ApoE(-/-) transgenic mice expressing CETP // Atherosclerosis. - 2014. - Vol.244. - P.29-37

46. Romano KA, Vivas EI, Amador-Noguez D et al. Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide // MBio. - 2015. - Vol.6. - E.02481.

47. Wang Z, Roberts A, Buffa J, DiDonato J, Lysis A, Hazen S. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis // Cell. - 2015. - Vol.163. - P.1585–1595.

48. Gaci N, Borrel G, Tottey W. Archaea and the human gut: New beginning of an old story // World J. Gastroenterol. - 2014. - Vol. 20. - P.16062–16078.

49. Griffin JL, Wang Xi, Stanley E. Does Our Gut Microbiome Predict Cardiovascular Risk? A Review of the Evidence from Metabolomics // Circ. Cardiovasc. Genet. - 2015. - Vol.8. - P.187–191

50. Velasquez MT, Ramezani A, Manal A, Raj DS. Trimethylamine N-Oxide: The Good, the Bad and the Unknown. *Toxins* // Basel. - 2016. - Vol.8. - P.8-11.
51. Fukami K, Yamagishi S, Sakai K, Kaida Y, Yokoro M, Ueda S, et al. Oral L-Carnitine Supplementation Increases Trimethylamine-N-oxide but Reduces Markers of Vascular Injury in Hemodialysis Patients. *Journal of cardiovascular pharmacology*. - 2015. - Vol.65. - P.289-95.
52. Yin J., Liao S.X., He Y., Wang S., Xia G.H., Liu F.T., Zhu J.J., You C., Chen Q., Zhou L., et al. Dysbiosis of gut microbiota with reduced trimethylamine-N-oxide level in patients with large-artery atherosclerotic stroke or transient ischemic attack // *J. Am. Heart Assoc.* - 2015 - Vol.4. - e002699.
53. Ивашкин В.Т., Ивашкин К.В. Микробиом человека в приложении к клинической практике. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии*. - 2017 - Том.27, №6. - С.4-13
54. Rondanelli M, Faliva MA, Perna S, Giacosa A, Peroni G, Castellazzi AM. Using probiotics in clinical practice: Where are we now? A review of existing meta-analyses // *Gut Microbes*. - 2017. - Vol.8. - P.521- 543.
55. Allen SJ, Wareham K, Wang D, et al. Lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in older inpatients (PLACIDE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial // *Lancet*. - 2013. - Vol.382. - P.1249-1257
56. Appel-da-Silva MC, Narvaez GA, Perez LRR, Drehmer L, Lewgoy J. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fungemia following probiotic treatment // *Med. Mycol. Case Rep.* - 2017. - Vol.25. - P.15-17.
57. Hempel S, Newberry SJ, Maher AR. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis // *JAMA*. - 2012. - Vol.307. - P.1959-1969

58. Lee SJ, Bose S, Seo JG, Chung WS, Lim CY, Kim H. The effects of co-administration of probiotics with herbal medicine on obesity, metabolic endotoxemia and dysbiosis: a randomized double-blind controlled clinical trial // Clin. Nutr. - 2014. - Vol.33. - P.973-981.

59. Sabico S, Al-Mashharawi A, Al-Daghri NM, Yakout S, Alnaami AM, Alokail MS, McTernan PG. Effects of a multi-strain probiotic supplement for 12 weeks in circulating endotoxin levels and cardiometabolic profiles of medication naïve T2DM patients: a randomized clinical trial // J. Transl. Med. - 2017. - Vol.15. - P.249.

60. Дроздов В.Н., Воробьева О.А., Астаповский А.А., Ших Е.В. Пробиотики в педиатрии: как подойти к выбору эффективного и безопасного препарата для детей // Вопросы современной педиатрии. - 2019 - Том 18, №4ю - С.277-284.

61. Anand SS, Hawkes C, de Souza RJ, Mente A, Dehghan M, Nugent R, Zulyniak MA, Weis T, Bernstein AM, Krauss RM, Kromhout D, Jenkins DJA, Malik V, Martinez-Gonzalez MA, Mozaffarian D, Yusuf S, Willett WC, Popkin BM. Food Consumption and its Impact on Cardiovascular Disease: Importance of Solutions Focused on the Globalized Food System: A Report From the Workshop Convened by the World Heart Federation // J. Am. Coll. Cardiol. - 2015. - Vol.66(14). - P.1590-1614.

62. Rohrmann S, Linseisen J, Allenspach M, von Eckardstein A, Müller D. Plasma Concentrations of Trimethylamine-N-oxide Are Directly Associated with Dairy Food Consumption and Low-Grade Inflammation in a German Adult Population. // J. Nutr. 2016. - Vol.146(2). - P.283-289.

63. Malinowska AM, Szwengiel A, Chmurzynska A. Dietary, anthropometric, and biochemical factors influencing plasma choline, carnitine, trimethylamine, and trimethylamine-N-oxide concentrations // Int. J. Food Sci. Nutr. 2017. - Vol.68. - P.488-495.

64. Barrea L, Annunziata G, Muscogiuri G, Di Somma C, Laudisio D, Maisto M, de Alteriis G, Tenore GC, Colao A, Savastano S. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) as

Novel Potential Biomarker of Early Predictors of Metabolic Syndrome // *Nutrients*. - 2018. - Vol.10. - P.1971.

65. Dannenberg L, Metzen D, Zako S, Pöhl M, Mourikis P, Helten C, Trojovsky K, Naguib D, Konsek D, Knoop B, Ayhan A, Hohlfeld T, Petzold T, Levkau B, Veulemans V, Zeus T, Kelm M, Polzin A. Enhanced Platelet Reactivity under Aspirin Medication and Major Adverse Cardiac and Cerebrovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *Pharmacology*. - 2019. - Vol.22 - P.1-5.

66. Capurso G, Lahner E. The interaction between smoking, alcohol and the gut microbiome // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* - 2017. - Vol.31. - P.579-588.

67. Su HL, Yun Y, Kim S, Lee E, Chang Y, Ryu S, Shin H, Kim H, Lee JH. Association between Cigarette Smoking Status and Composition of Gut Microbiota: Population-Based Cross-Sectional Study // *J. Clin. Med.* - 2018. - Vol.7(9). - P.282.

68. Manor O, Zubair N, Conomos MP, Xu X, Rohwer JE, Krafft CE, Lovejoy JC, Magis AT. A Multi-omic Association Study of Trimethylamine N-Oxide // *Cell Rep.* - 2018. - Vol.24. - P.935-946.

69. Bennett, B.J., de Aguiar Vallim, T.Q., Wang, Z., Shih, D.M., Meng, Y., Gregory, J., Allayee, H., Lee, R., Graham, M., Crooke, R., et al. Trimethylamine N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation // *Cell Metab.* - 2013. - Vol.17. - P. 49–60.

70. Mueller, D.M., Allenspach, M., Othman, A., Saely, C.H., Muendlein, A., Vonbank, A., Drexel, H., and von Eckardstein, A. Plasma levels of trimethylamine-N-oxide are confounded by impaired kidney function and poor metabolic control // *Atherosclerosis*. - 2015 - Vol.243. - P.638–644.

71. Stubbs, J.R., House, J.A., Ocque, A.J., Zhang, S., Johnson, C., Kimber, C., Schmidt, K., Gupta, A., Wetmore, J.B., Nolin, T.D. Serum trimethylamine-N-oxide is elevated in CKD and correlates with coronary atherosclerosis burden // *J. Am. Soc. Nephrol.* - 2016. - Vol.27. - P.305–313.

72. Obeid, R., Awwad, H.M., Kirsch, S.H., Waldura, C., Herrmann, W., Graeber, S., and Geisel, J. Plasma trimethylamine-N-oxide following supplementation with vitamin D or D plus B vitamins// *Mol. Nutr. Food Res.* - 2017. - Vol.61. - P. 1600358–1600359.

73. Roncal C, Martínez-Aguilar E, Orbe J, Ravassa S, Fernandez-Montero A, Saenz-Pipaon G, Ugarte A, Estella-Hermoso de Mendoza A, Rodriguez JA, Fernández-Alonso S, Fernández-Alonso L, Oyarzabal J, Paramo JA.Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) Predicts Cardiovascular Mortality in Peripheral Artery Disease // *Sci. Rep.* - 2019. - Vol.30. - P.15580.

74. Gatta L, Scarpignato C. Systematic review with meta-analysis: rifaximin is effective and safe for the treatment of small intestine bacterial overgrowth // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2017. - Vol 45. - P.604–616.

75. Gao J, Gilliland MG, Owyang Ch. Rifaximin, gut microbes and mucosal inflammation: unraveling a complex relationship // *Gut Microbes.* - 2014. - Vol.5. - P.571–575.

76. Ponziani FR, Zocco MA, D'Aversa F, Pompili M, Gasbarrini A.Eubiotic properties of rifaximin: Disruption of the traditional concepts in gut microbiota modulation // *World J. Gastroenterol.* - 2017. - Vol.7.- P.4491-4499.

77. Rerksupphol S, Rerksupphol L. A Randomized Double-blind Controlled Trial of *Lactobacillus acidophilus* Plus *Bifidobacterium bifidum* versus Placebo in Patients with Hypercholesterolemia // *J. Clin. Diagn. Res.* - 2015. - Vol. 9 - P.11-14.

78. Gadelha CJMU, Bezerra AN. Effects of probiotics on the lipid profile: systematic review // *J. Vasc. Bras.* - 2019. - Vol.18. - e20180124.