

Петров Вячеслав Алексеевич

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА
ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Сазонов Алексей Эдуардович

Официальные оппоненты:

Припутневич Татьяна Валерьевна – доктор медицинских наук, ФГБУ НМИЦ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика Кулакова», отдел микробиологии и клинической фармакологии, заведующая отделом;

Яковлев Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедра госпитальной терапии №2, профессор кафедры.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Защита состоится «__» _____ 2019 г. в __ ч. на заседании Диссертационного Совета Д 208.040.08 в ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

д.м.н., профессор

Калюжин Олег Витальевич

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

На настоящий момент человеческий организм рассматривается в рамках симбиотических отношений с населяющими его сообществами микроорганизмов, называемыми микробиотой. Между организмом хозяина и населяющими его микробами имеются прочные физиологические связи, благодаря которым микробиом находится в состоянии динамического равновесия, реагируя на изменение состояния как макроорганизма, так и окружающей среды (*E.S.Charlson et al, 2011; S.M.Hird, 2017*). Важнейшим компонентом микробиотического сообщества организма человека является кишечная микробиота.

Известно, что микробиота способна вступать во взаимодействия с нервной системой организма-хозяина; данная кооперация рассматривается в рамках концепции «ось-мозг-кишечник» (*R.Diaz Heijtz et al, 2011*). Микроорганизмы, взаимодействуя как напрямую с *p.vagus*, так и посредством секреторных продуктов, могут оказывать влияние на работу нервной системы на местном и системном уровне (*D.Ríos-Covián et al, 2016; J.Breton et al, 2016; P.Forsythe and W.A.Kunze, 2013*). Тесная связь между работой нервной системы и жизнедеятельностью бактерий подтверждается результатами исследований состава микробиоты кишечника при различных заболеваниях центральной нервной системы (*X.Zhu et al, 2017*). Известно, что кишечная микробиота изменяется при психических заболеваниях, например при шизофрении и аутизме (*E.Schwarz et al, 2017; R.Krajmalnik-Brown et al, 2015*), а также при нервных болезнях (*E.R.Volkman et al, 2017*).

Одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний является болезнь Паркинсона. При данном заболевании происходит поражение дофаминергических нейронов *substantia nigra*, клинически и проявляющееся главным образом в виде моторных (ригидность, дрожание, скованность, постуральная нестабильность) и немоторных нарушений. Материальным субстратом нейродегенерации являются тельца Леви – включения белка α -синуклеина (*M.G.Heckman et al, 2017*). Нейродегенерация и накопление телец Леви при болезни Паркинсона происходит нелинейно: для здоровых характерна постепенная утрата нейронов, тогда как у пациентов с болезнью Паркинсона за тот же срок погибает до 45% нейронов, с наиболее выраженной динамикой за несколько лет до появления симптомов (*C.H.Hawkes et al, 2010*).

При этом, одним из наиболее ранних проявлений заболевания, возникающим еще до клинической манифестации, является поражение нейронов подслизистого слоя кишечника, клеток мейсснерова и ауэрбахова сплетений (*H.Braak et al, 2006; С.Н.Иллариошкин и О.С. Левин, 2011*). При поражении нервной системы кишечника происходит нарушение его работы, перистальтической функции, секреции, трофики (*G.Natale et al, 2008*). Это приводит, в том

числе, и к нарушению работы местного иммунитета (*R.A.Willemze et al, 2015*). Вкупе, все эти нарушения могут изменить таксономический состав кишечных сообществ микроорганизмов. Исследование особенностей микробиотического ландшафта, характерных для пациентов с болезнью Паркинсона позволит по-новому посмотреть, как на этиологию и патогенез данного заболевания, так и на подходы к ранней диагностике.

Цель исследования – изучить особенности состава микробиоты кишечника у пациентов с болезнью Паркинсона для разработки ранней доклинической диагностики.

Задачи исследования:

1) провести сравнительный анализ таксономического разнообразия микробиоты кишечника пациентов с болезнью Паркинсона, лиц с другими неврологическими заболеваниями и группы здорового контроля;

2) идентифицировать группы микроорганизмов кишечной микробиоты, ассоциированных с болезнью Паркинсона;

3) определить характерные функциональные особенности микробиоты кишечника при болезни Паркинсона по данным метаболической реконструкции путей синтеза витаминов и короткоцепочечных жирных кислот;

4) определить перечень микроорганизмов кишечной микробиоты, являющихся биомаркерами болезни Паркинсона.

Научная новизна работы

Впервые проведен анализ особенностей видового разнообразия, таксономического и функционального состава микробиоты кишечника в группах пациентов с болезнью Паркинсона и другими неврологическими заболеваниями (рассеянный склероз, эссенциальный тремор, идиопатическая семейная дистония, множественная системная атрофия, деменция с тельцами Леви и острый рассеянный энцефаломиелит) в сравнении с лицами без признаков нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваний.

На основе изученных особенностей таксономического состава кишечной микробиоты впервые определен перечень микроорганизмов-биомаркеров наличия болезни Паркинсона. В его состав вошли рода *Christensenella*, *Methanobrevibacter*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Catabacter*, *Desulfovibrio*, *Sphingomonas*, *Yokenella*, *Atopobium*, *Fusicatenibacter*, *Cloacibacillus*, *Bulleidia*, *Acetanaerobacterium* и *Staphylococcus*. Для расчета риска наличия болезни Паркинсона по данным биомаркерам предложен алгоритм, реализованный в виде программного обеспечения.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе исследования проведено сравнительное описание состава кишечной микробиоты у пациентов с болезнью Паркинсона, рассеянным склерозом, эссенциальным тремором,

идиопатической семейной дистонией, множественной системной атрофией, деменцией с тельцами Леви и острым рассеянным энцефаломиелитом, а также здоровых людей. Выявлены характерные паттерны таксономической композиции кишечной микробиоты и ее метаболический потенциал в отношении продукции витаминов и короткоцепочечных жирных кислот. На основе обнаруженных особенностей микробиологического ландшафта кишечной микробиоты предложена математическая модель для классификации пациентов с болезнью Паркинсона. В модели достигнуты показатели точности 91.49%, чувствительности 91.30% и специфичности 91.67%.

В рамках разработки алгоритма получены охранные документы на результаты интеллектуальной деятельности: свидетельство о регистрации базы данных «База данных значимости родов микроорганизмов микробиоты кишечника человека по отношению к дифференциальной диагностике болезни Паркинсона»; свидетельство о регистрации программы для ЭВМ «Паркинсон-диагностика».

Положения, выносимые на защиту

1) Микробиота кишечника пациентов с болезнью Паркинсона характеризуется изменениями в таксономическом и функциональном составе по сравнению с кишечной флорой здоровых людей и лиц с другими неврологическими заболеваниями;

2) Микроорганизмы кишечной микробиоты родов *Christensenella*, *Methanobrevibacter*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Catabacter*, *Desulfovibrio*, *Sphingomonas*, *Yokenella*, *Atopobium*, *Fusicatenibacter*, *Cloacibacillus*, *Bulleidia*, *Acetanaerobacterium* и *Staphylococcus* являются потенциальными биомаркерами болезни Паркинсона.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения соответствуют формуле специальности 03.02.03 – микробиология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, а именно – пунктам 3, 4, 6.

Степень достоверности и апробация результатов

Выводы и научные положения проведенного исследования основаны на изучении биологического материала с использованием современных молекулярно-биологических методов. Анализ полученных данных проведен с использованием адекватных статистических и биоинформатических инструментов, а так же методик машинного обучения. Основные положения диссертации представлены на международной мультikonференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (SbioMed-2016, Новосибирск, 2016 г.), российско-китайской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XIX Кашкинские чтения, Санкт-Петербург, 2016 г.), I междисциплинарной научной конференции «Аутоиммунные и

иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2016 г.), международной научно-практической конференции «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии» (Томск, 2017 г.).

Личный вклад автора

Автором составлен план и дизайн исследования, проведен аналитический обзор источников литературы, касающихся исследуемого вопроса, сформулированы цели и задачи исследования. Автором выполнена пробоподготовка биообразцов для секвенирования, биоинформатическая обработка результатов секвенирования, статистический анализ, подбор и обучение классифицирующих алгоритмов. Автором дано обобщение результатов и его научное обоснование, сформулированы выводы.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста, иллюстрирована 15 таблицами и 35 рисунками, состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, изложения собственных результатов, заключения, выводов, библиографического указателя, включающего 304 источника.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них в научных рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований – 5 (4 оригинальных исследования, 1 обзорная работа); 2 зарубежные публикации; статьи, входящие в базы данных Web of Science и/или Scopus – 6; 2 свидетельства о регистрации результатов интеллектуальной деятельности.

Основное содержание работы

Во введении приведено описание актуальности исследования и степени разработанности его темы; описаны цели и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость. Также указаны положения, выносимые на защиту, изложена краткая структура диссертации, описана степень достоверности и апробация результатов.

Первая глава представляет собой обзор источников литературы, посвященных особенностям состава микробиоты человека и методологическим подходам к ее исследованию; связи микробиоты с работой организма, в частности оси «мозг-кишечник-микробиота»; а так же информации об эпидемиологии и патогенезе болезни Паркинсона (далее БП).

Во второй главе приведено описание дизайна и объектов исследования, использованного материала и методов. Исследование проведено на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (г.Томск), набор биологического материала от участников исследования проводился на базе кафедры неврологии и нейрохирургии СибГМУ, секвенирование бактериальной ДНК осуществлялось в ФНКЦ ФХМ ФМБА России.

В исследование были включены 93 пациента с БП, 66 пациентов группы здорового контроля, а также 33 пациента с иными неврологическими заболеваниями в качестве группы сравнения. Медиана возраста пациентов в группе БП составила 69 [64; 76] лет. Критериями включения пациентов в группу БП послужили: возраст от 18 до 88 лет; документально подтверждённый диагноз БП, выставленный в соответствии с международными клинικο-диагностическими критериями Банка головного мозга общества болезни Паркинсона Великобритании; наличие подписанной формы информированного согласия на участие в данном исследовании.

Медиана возраста пациентов в контрольной группе составила 52 [40; 62] года. Критериями включения пациентов в контрольную группу послужили: возраст от 18 до 88 лет; отсутствие у пациентов любых нейродегенеративных и воспалительных заболеваний нервной системы; наличие подписанной формы информированного согласия на участие в данном исследовании.

В группу сравнения вошли пациенты со следующими заболеваниями: рассеянный склероз — 15 пациентов, эссенциальный тремор — 10 пациентов, идиопатическая семейная дистония — 5 пациентов, а также по одному пациенту с диагнозами множественная системная атрофия, деменция с тельцами Леви и острый рассеянный энцефаломиелит. Медиана возраста пациентов в группе сравнения составила 58 [38; 66] лет. Критериями включения пациентов в группу сравнения послужили: возраст от 18 до 88 лет; наличие любого идиопатического дегенеративного либо воспалительного заболевания нервной системы, за исключением болезни Паркинсона; наличие подписанной формы информированного согласия на участие в данном исследовании.

Всем пациентам проводилось клиническое обследование и неврологический осмотр. У каждого пациента был собран биоматериал — кал. Биоматериал замораживался до -20 С и в течение двух часов доставлялся в лабораторию, где хранился до востребования при температуре -80 С. Из биоматериала каждого участника эксперимента проводилось выделение тотальной бактериальной ДНК методом спиртового осаждения в присутствии космотропной соли с предварительным химическим, механическим и термическим лизисом бактериальных клеток.

Ампликонное секвенирование микробиоты по маркерному фрагменту V3-V4 гена бактериальной 16S рНК осуществляли согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part #15044223 Rev. B), рекомендованному Illumina для секвенатора MiSeq. Анализ прочтений секвенатора осуществлялся с использованием программного обеспечения QIIME 1.9.1 (*J.G.Caporaso et al, 2010*). Файлы прочтений фильтровались по качеству букв (балл по Phred не менее 19) и длине прочтения (не 120 пар оснований). В качестве референсной базы данных для определения таксономического положения прочтений использовались базы

GreenGenes версии 13.5 и HITdb и алгоритм RDP classifier (T.Z.DeSantis et al, 2006; Q.Wang et al, 2007; J.Ritari et al, 2015).

Расчет индексов разнообразия проводился с использованием программного обеспечения QIIME 1.9.1. Для оценки α -разнообразия рассчитывались индексы Шеннона, Chao1 и общего числа ОТЕ при прореживании данных до 1800 ОТЕ/образец. Сравнение проводили с использованием непараметрического t-теста Уэлча при 9999 перестановках.

Для расчета индекса β -разнообразия значения представленности операционных таксономических единиц нормализовали при помощи алгоритма CSS (J.N.Paulson et al, 2013). Затем применяли неметрическое многомерное шкалирование в трех измерениях в метрике weighted Unifrac (C.A.Loizupone et al, 2007). Для определения достоверности попарного различия сообществ по составу микробиоты и вклада исследуемых заболеваний в данное различие использовался метод ANOSIM и непараметрический дисперсионный анализ с оценкой значимости при 9999 перестановках. Для оценки корреляционных связей между микроорганизмами, входящими в состав микробиотического сообщества, строили корреляционные графы в пакете CoNet (K.Faust et al, 2012) программного обеспечения Cytoscape (P.Shannon et al, 2003).

Поиск различий в таксономическом составе микробиоты кишечника проводили при агрегации ОТЕ по отдельным таксономическим уровням. Для поиска дифференциально представленных таксонов применяли модель fitZig пакета metagenomeSeq языка R (J.N.Paulson et al, 2013) с добавлением ковариаты «возраст». Различия считали значимыми при значении $p < 0,05$ после применения поправки на множественные сравнения по методу Бенджамини-Хохберга. Метаболическая реконструкция функционального состава микробиоты относительно путей синтеза витаминов и короткоцепочечных жирных кислот проводилась с использованием сервиса knomics/biota.

Для микроорганизмов-биомаркеров использовались методы обучения по прецедентам. Обучение проходило в три этапа: отбор наиболее значимых признаков, обучение моделей, проверка моделей на валидационной выборке. Отбор наиболее значимых признаков и обучение проводились в пакете caret (M.Kuhn, 2008) языка программирования R с использованием алгоритма RFE. В качестве вариантов классифицирующих моделей рассматривали следующие алгоритмы: метод частичных наименьших квадратов (далее PLS), наивный байесовский классификатор (далее NB), обобщенную линейную модель (далее GLM), искусственную нейронную сеть с сигмоидной активационной функцией (далее NNET) и машину опорных векторов (далее SVM). После проведения обучения все модели проходили проверку на валидационной выборке.

Третья глава включает в себя описание результатов проведенного исследования с их

обсуждением. Важным интегральным параметром, характеризующим состав флоры, является ее видовое разнообразие. У пациентов с БП также, как и у больных с другими неврологическими заболеваниями, отмечалось достоверное снижение видового богатства в кишечной микробиоте по нескольким индексам α -разнообразия по сравнению с контрольной группой. В группе БП и при других неврологических заболеваниях наблюдалось снижение общего количества отдельных разновидностей ОТЕ, что описывается индексом observed OTUs ($p=0,003$ и $p=0,002$, соответственно), и уменьшение доли редких разновидностей ОТЕ, о чем свидетельствует низкий индекс Шеннона ($p=0,006$ и $p=0,008$ соответственно). Более «взвешенная» оценка разнообразия индексом Chao1 также свидетельствует о снижении богатства бактериальной флоры у больных ($p=0,003$ и $p=0,023$).

Низкий уровень α -разнообразия микробиоты зачастую свидетельствует о протекании патологических процессов в месте колонизации, в частности воспаления (*S.Lapthorne et al, 2013*). Кроме того, снижение таксономического разнообразия микробиоты кишечника наблюдается и в случае системных, но топически не связанных с желудочно-кишечным трактом заболеваниях — например при артериальной гипертонии (*J.Li et al, 2017*). Поскольку в группе пациентов с другими неврологическими заболеваниями видовое богатство микробиоты также снижалось, можно предположить, что снижение α -разнообразия является неспецифической реакцией на наличие заболевания.

При количественной оценке вклада состояния пациентов в β -разнообразии микробиоты установлено, что наличие того или иного заболевания имеет значимое влияние на состав кишечной микробиоты. Так, по результатам применения непараметрического дисперсионного анализа, диагноз объясняет порядка 10% вариативности микробиоты ($R^2=0,103$, $p=0,0001$). Использование имитационного анализа сходства также подтверждает вклад диагноза пациентов в состав флоры ($R^2=0,123$, $p=0,0001$). При оценке влияния других известных факторов на совокупный состав микробиома с использованием непараметрического дисперсионного анализа обнаружен небольшой, однако, достоверный вклад возраста ($R^2=0,019$, $p=0,0007$). Однако, по данным имитационного анализа сходства, обнаружено, что возраст достоверного влияния на состав микробиоты кишечника не имеет ($R^2=0,037$, $p=0,141$). Различия в β -разнообразии соотносятся с результатами, полученными другими коллективами при исследовании микробиоты пациентов с БП (*F.Hopfner et al, 2017; E.M.Hill-Burns et al, 2017; A.Keshavarzian et al, 2015*).

Анализ корреляционных сетей бактерий микробиоты кишечника, также подтверждает наблюдаемое снижение таксономического разнообразия у пациентов с БП. Так, было установлено, что в кишечной микробиоте при БП наблюдается снижение числа кооперирующихся таксонов, которое сопровождается уменьшением количества

корреляционных взаимодействий между отдельными бактериями (снижение числа ребер и узлов в сети с 194 и 52 в контрольной группе до 51 и 36 при БП) и снижением плотности сети с 0,146 до 0,081. Среднее число соседей в группе БП также снизилось с 7,462 до 2,833, что говорит о снижении числа связей между бактериями.

По сравнению с микробиотой здоровых, флора пациентов на уровне родов имеет более выраженную тенденцию к кластеризации — наличию отдельных групп бактерий с активным взаимодействием между собой и слабо связанных с другими участками сети (коэффициент кластеризации при БП 0,531, в контрольной группе 0,492). Все эти факторы могут свидетельствовать о нарушении кооперации в микробиоме при БП.

У пациентов с БП наблюдается своеобразие состава микробиоты кишечника на всех таксономических уровнях. С точки зрения особенностей взаимодействия конкретных микроорганизмов с организмом-хозяином, бактерии с измененной представленностью можно разделить на несколько групп: ассоциированные с продукцией короткоцепочечных жирных кислот, условно-патогенные бактерии, конкордантные микроорганизмы и микробы с возможными пробиотическими свойствами.

В микробиоте пациентов с БП отмечается повышение представленности бактерий потенциальных продуцентов короткоцепочечных жирных кислот — ацетата и бутирата. К таким микроорганизмам можно отнести *Succinivibrio* ($p=0,01$), *Acetanaerobacterium* ($p=0,003$), *Anaerococcus* ($p=0,023$), *Peptoniphilus* ($p=0,036$), *Eubacterium cylindroides* ($p=0,003$), *Bifidobacterium breve* ($p<0,0001$) и *Bifidobacterium bifidum* ($p=0,035$) (S.Fukuda et al, 2011; E.C.Murphy and I.M.Frick, 2013; V.Bunesova et al, 2018).

Увеличение содержания бифидобактерий у пациентов с БП, определяемое как 16S-секвенированием, так и ПЦР также отмечается в других исследованиях (M.M.Unger et al, 2016; E.M.Hill-Burns et al, 2017). Короткоцепочечные жирные кислоты являются продуктами бактериальной ферментации непереваряемых пищевых волокон растительного происхождения. Они являются важнейшими бактериальными метаболитами и обычно рассматриваются в ключе той пользы, которую приносят организму: противовоспалительный, антиканцерогенный и антиоксидантный эффект (H.M.Hamer et al, 2008; P.Rosignoli et al, 2001), участие в трофике колоноцитов (D.Rios-Covián et al, 2016) и защита от колонизации патогенами, ассоциированная с различными механизмами (G.T.Macfarlane and S.Macfarlane, 2012; H.M.Hamer et al, 2008).

Одной из особенностей действия короткоцепочечных жирных кислот является влияние на эпигенетическую регуляцию генетической экспрессии в клетках организма человека посредством ингибирования гистондеацетилазы (H.M.Hamer et al, 2008). Показано, что ингибирование гистондеацетилазы бутиратом натрия увеличивает экспрессию стресс-чувствительных протеинкиназ дельта на культуре нейрональных клеток и в тканях мозга

модельных животных (*H.Jin et al, 2014*). Это приводит к увеличению чувствительности нейронов к проапоптотическим импульсам, исходящим от нейротоксинов и ускорению процессов нейродегенерации (*H.Jin et al, 2014*). Кроме того, бутират способен увеличивать содержание α -синуклеина в нейронах коры головного мозга, что было показано на модельных животных (*Y.Leng and D.M.Chuang, 2006*).

Таким образом, можно предположить, что увеличение представленности продуцентов бутирата в составе микробиоты, характерной для пациентов с БП, способно приводить к изменению эпигенетической регуляции в клетках организма-хозяина на местном уровне, увеличивать экспрессию α -синуклеина и способствовать развитию дегенеративных процессов в нейронах кишечника.

Интересным фактом при БП является увеличение представленности в кишечной микробиоте ОТЕ бактерий, характеризующихся высокой степенью конкордантности. Бактерии семейства *Christensenellaceae* по данным близнецовых исследований являются одними из наиболее конкордантных таксонов микробиоты кишечника человека, т.е. их представленность у близнецов высоко коррелирует (*J.K.Goodrich et al, 2014*). В корреляционной сети микроорганизмов с данной бактерией были взаимосвязаны представители таких таксонов, как *Methanobacteriaceae*, SHA-98, RF39, RF32 и ML615J-28, для которых также характерна высокая степень наследуемости (*J.K.Goodrich et al, 2014*). По результатам нашего исследования, у пациентов с болезнью Паркинсона в кишечной микробиоте повышается содержание ОТЕ порядка SHA-98 ($p=0,022$), семейств *Christensenellaceae* и *Methanobacteriaceae* (рода *Christensenella* ($p=0,017$) и *Methanobrevibacter* ($p=0,013$), соответственно) по сравнению с контрольной группой, а также класса RF ($p=0,0004$) порядков RF32 ($p=0,022$) и ML615J-28 ($p=0,0002$) — по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями. Увеличение представленности *Christensenellaceae* и бактерий рода *Methanobrevibacter* в кишечной флоре у пациентов с БП отмечается также по результатам других работ по данной тематике (*E.M.Hill-Burns et al, 2017; M.M.Unger et al, 2016*).

Наследственный фон рассматривается как один из этиологических факторов, опосредующих развитие БП. У 15% пациентов в родословной имеются больные родственники и, по разным данным, в 5-10% случаев заболевание наследуется по моногенному типу (*H.Deng et al, 2018*). В этой связи повышение содержание бактерий с высокой наследуемостью при БП может быть связано с влиянием генетических факторов, опосредующих предрасположенность к заболеванию, на состав микробиоты.

Кроме того, известно, что наличие бактерий рода *Christensenella* и археев *Methanobrevibacter* в кишечной микробиоте ассоциировано с изменением веса (*J.K.Goodrich et al, 2014*). Известно, что при заболевании БП у пациентов наблюдается снижение веса, что

может быть вызвано, в том числе, и повышением представленности данных бактерий в кишечной микробиоте (U.Akbar et al, 2015).

Интересной особенностью кишечной микробиоты при БП является повышение представленности потенциально пробиотических бактерий родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. В результате нашего исследования у пациентов с БП показано повышение содержания микроорганизмов *Bifidobacterium breve* ($p<0,0001$), *Lactobacillus mucosae* ($p=0,027$), *Bifidobacterium bifidum* ($p=0,035$) по сравнению с контрольной группой и *Bifidobacterium breve* ($p=0,017$) по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями. Этот факт описывается и в рамках других метагеномных исследований, посвященных данному вопросу: на различных популяциях показано повышение содержания Lactobacillaceae (F.Scheperjans et al, 2015), Lactobacillaceae, *Bifidobacterium*, и Bifidobacteriaceae (E.M.Hill-Burns et al, 2017). Оценка содержания данных микроорганизмов с помощью ПЦР расходится: по результатам работы M.M.Unger et al у больных отмечается увеличение количества *Bifidobacterium* и снижение Lactobacillaceae по сравнению с контрольной группой (M.M.Unger et al, 2016), в работе S.Hasegawa et al напротив, представленность лактобактерий у пациентов выше, тогда как по содержанию бифидобактерий различия отсутствуют (S.Hasegawa et al, 2015).

Известно, что бактерии рода *Lactobacillus* способны взаимодействовать с *p.vagus* и нейронами кишечника, и посредством этого потенциально влиять на секрецию α -синуклеина (F.Scheperjans et al, 2015). Кроме того, увеличение содержания лактобактерий ассоциировано с низким уровнем кишечного гормона грелина. Данный гормон оказывает нейропротективное действие, и у пациентов с БП его сывороточный уровень снижается по сравнению с контролем (M.M.Unger et al, 2011).

Ранее было показано, что при БП в микробиоте кишечника увеличивается содержание муциндеградирующих бактерий, в частности рода *Akkermansia* и вида *A.muciniphila* (J.R.Bedarf et al, 2017; E.M.Hill-Burns et al, 2017; A.Heintz-Buschart, 20174; M.M.Unger et al, 2016). В результате нашего исследования было получено, что у пациентов в микробиоте кишечника повышается содержание бактерий *Bifidobacterium bifidum* ($p=0,035$), которые также способны к деградации муцина (K.Nishiyama et al, 2017). Хотя муциндеградирующие бактерии обычно относят к микроорганизмам с потенциальной пробиотической активностью, в данном случае увеличение темпов расщепления муцина микроорганизмами способно увеличивать проницаемость кишечной стенки, в том числе и для условно патогенных бактерий. Кроме того, повышенная кишечная проницаемость является одним из маркеров ранней стадии БП (C.B.Forsyth et al, 2011). В этой связи увеличение представленности муциндеградирующих бактерий может рассматриваться в качестве одного из факторов, приводящих к установлению более тесного контакта между флорой и тканями кишечника.

Также к потенциальным пробиотикам с повышенной представленностью при болезни Паркинсона можно отнести и бактерий рода *Oxalobacter* ($p=0,035$), повышенные в микробиоте пациентов с БП по сравнению с пациентами объединенной группы контроля и сравнения. Эти микроорганизмы участвуют в метаболизме оксалата и рассматриваются в качестве перспективного пробиотика для лечения почечно-каменной болезни (M.L.Ellis et al, 2016). Увеличение содержания Oxalobacteriaceae в микробиоте слизистой кишечника также отмечается у пациентов с БП американской популяции (A.Keshavarzian et al, 2015).

Среди причин возникновения нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Паркинсона, в настоящий момент все чаще рассматривается процесс нейровоспаления, в рамках которого обсуждается модулирующий эффект микробиоты (V.Calabrese et al, 2018). В результате нашего исследования установлен «провоспалительный» сдвиг в композиции кишечной флоры пациентов с БП за счет повышения содержания условно-патогенных бактерий в кишечной микробиоте.

Так, у пациентов группы БП отмечается увеличение содержания бактерий рода *Desulfovibrio* ($p=0,0129$). Данные микроорганизмы способны вызывать колит и потерю веса на модельных животных (V.R.Figliuolo et al, 2017), увеличение их представленности также наблюдается при аутизме (D.F.MacFabe, 2015). *Cloacibacillus* ($p=0,026$), также повышенные при БП рассматриваются в качестве потенциально патогенных микробов. Отмечается их способность вызывать бактериемию у пациентов со сниженным иммунитетом и на фоне онкологических заболеваний (M-C.Domingo et al, 2015). Содержание бактерий рода *Sphingomonas*, содержание которых было увеличено при БП, повышается при раке кишечника ($p=0,017$), ассоциированным с колитом (M.L.Richard et al, 2017); известны также случаи язв ротовой полости, бактериемии, сепсиса и госпитализма, вызванные данным микробом (A.Santarelli et al, 2016; Y.Yozgat et al, 2014; C.Del Borgo et al, 2015; M.Meric et al, 2009). *Staphylococcus epidermidis*, также повышенный БП ($p=0,0003$), способен активировать экспрессию TNFSF15 в антигенпрезентирующих клетках (D.Q.Shih et al, 2009). Данный белок является одним из центральных модуляторов воспалительного ответа слизистой кишечника, повышение его содержания ассоциировано с развитием колита и ВЗК (D.Q.Shih et al, 2009).

К условно-патогенным микроорганизмам, свойственным кишечной микробиоте пациентов с БП, также относятся энтерококки ($p=0,002$), представленность которых повышается и по результатам исследования германской когорты больных (F.Hopfner et al, 2017). Представители *Enterococcus* являются частой причиной госпитальных инфекций, ассоциированных с устойчивостью к широкому спектру антибиотиков (F.Lebreton et al, 2018). В работе R.Underly et al показано, что экспозиция первичной культуры нейронов головного мозга мыши с *Enterococcus faecalis* способствует появлению в клетках признаков нейродегенерации и

нейрофибрилл, подобных наблюдаемым при болезни Альцгеймера (*R.Underly et al, 2016*).

В результате нашего исследования было установлено повышение *Klebsiella* в группе БП по сравнению с контролем ($p=0,020$). Увеличение содержания оппортунистических патогенов *Klebsiella* в микробиоте кишечника наблюдается при гастроэнтеритах (*L.Ganji et al, 2016*). Увеличение представленности условно-патогенных бактерий может быть как одним из факторов, приводящих к запуску нейродегенеративных изменений в нейронах кишечника, так и результатом нарушений трофики и моторики кишечника, наблюдаемых при БП. В любом случае, подобный микробиотический ландшафт приводит к ухудшению состояния кишечника и повышенной секреции провоспалительных факторов, что является дополнительным фактором, нарушающим физиологический состав микробиоты.

В рамках исследования проводилась реконструкция метаболического потенциала микробиоты. По результатам нашего исследования, в ходе реконструкции синтеза бутирата было обнаружено, что микробиота пациентов с БП характеризуется функциональной избыточностью относительно генов, входящих в метаболический путь синтеза бутирата из предшественника ацетил-КоА по сравнению со здоровым контролем ($p<0,001$). При анализе синтеза витаминов было получено, что в метагеноме кишечника пациентов с БП снижается представленность метаболических путей, связанных с продукцией витаминов В12, В9, В2 и В3 ($p<0,05$), по сравнению с лицами группы здорового контроля и группой сравнения и увеличивается содержание генов, ассоциированных с синтезом В6 и К ($p<0,05$) по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями.

По данным метаанализа литературы было установлено, что недостаток витамина В12 ассоциирован с развитием периферической нейропатии при БП (*P.Zis et al, 2017*). Результаты другого метаанализа показывают, что недостаток фолиевой кислоты и В12 связан с нарушениями когнитивной функции у пациентов (*Y.Xie et al, 2017*). Витамин В2 оказывает нейропротекторный эффект при нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваниях (*A.Saedisomeolia and M.Ashoori, 2018*). Снижение продукции витаминов кишечной микробиотой при БП может выступать одним из механизмов, ухудшающих состояние нейронов периферической нервной системы кишечника, что, в итоге, может приводить к нарушению моторной функции кишечника.

Для идентификации микроорганизмов-биомаркеров осуществляли поиск различий на уровне бактериальных родов между группой пациентов с БП и объединенной группой здорового контроля и лиц с другими неврологическими заболеваниями при учете влияния возраста. В группе пациентов с БП отмечали повышение представленности микроорганизмов родов *Bulleidia*, *Staphylococcus*, *Succinivibrio*, *Yokenella*, *Cloacibacillus*, *Desulfovibrio*, *p-75-a5*, *Acetanaerobacterium*, *Enterococcus*, *Christensenella*, *Sphingomonas*, *Papillibacter*, *Oxalobacter*,

Anaerococcus, *Methanobrevibacter*, *Catabacter*, *Leuconostoc*, *Atopobium* и снижение *Fusicatenibacter* по сравнению с пациентами объединенной контрольной группы.

Далее из предложенного перечня с помощью рекурсивного исключения переменных отбирали рода, комбинация которых давала наиболее точное предсказание наличия БП. В результате применения алгоритма выбран перечень биомаркеров, состоящий из 14 родов, обладающих максимальными показателями точности классификации (0.77 ± 0.09). В перечень вошли следующие микроорганизмы: *Christensenella*, *Methanobrevibacter*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Catabacter*, *Desulfovibrio*, *Sphingomonas*, *Yokenella*, *Atopobium*, *Fusicatenibacter*, *Cloacibacillus*, *Bulleidia*, *Acetanaerobacterium* и *Staphylococcus*.

В результате подгонки моделей на обучающей выборке обнаружено, что наибольшей медианной точностью предсказания обладают алгоритмы, основанные на применении SVM и NB (таб. 1). После проведения обучения все классификаторы проверяли на валидационной выборке, оценивая точность классификации, чувствительность и специфичность (таб. 2).

Таблица 1. Результаты обучения моделей. Точность классификации.

Классификатор\точность	Минимум	Медиана	Среднее	Максимум
PLS	0,5000	0,7333	0,7602	0,9333
SVM	0,5714	0,7857	0,7732	0,9286
NB	0,5000	0,7857	0,7559	0,9333
NNET	0,5625	0,7333	0,7492	0,9286
GLM	0,3333	0,7417	0,7191	0,9333

Таблица 2. Результаты проверки классифицирующих моделей на валидационной выборке.

Модель	Точность, % (ДИ 95%)	Чувствительность, %	Специфичность, %
NB	91,49(79,62; 97,63)	91,30	91,67
SVM	82,98(69,19; 92,35)	100,00	66,67
PLS	76,6(61,97; 87,7)	65,22	87,50
NNET	76,6(61,97; 87,7)	69,57	83,33
GLM	63,83(48,52; 77,33)	65,22	62,50

В результате было обнаружено, что наиболее высокой точностью классификации при оптимальном балансе чувствительности и специфичности, обладал NB. Классификатор SVM, при наиболее высоком значении чувствительности на валидационной выборке обладал достаточно низкой специфичностью классификации и, соответственно, меньшей итоговой точностью классификации. Классификаторы PLS и ANN показали одинаковую точность классификации, при этом ANN характеризовалась более высокой чувствительностью, но меньшей специфичностью по сравнению с PLS. Модель GLM, оказалась наименее подходящей для классификации пациентов на основе состава кишечной микробиоты.

Таким образом, наиболее оптимальной моделью для классификации пациентов по признаку наличия БП на основе данных о составе кишечной микробиоты (родов микроорганизмов *Christensenella*, *Methanobrevibacter*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Catabacter*, *Desulfovibrio*,

Sphingomonas, *Yokenella*, *Atopobium*, *Fusicatenibacter*, *Cloacibacillus*, *Bulleidia*, *Acetanaerobacterium* и *Staphylococcus*) является наивный байесовский классификатор.

В ходе нашего исследования впервые проведена оценка точности классификации пациентов по составу кишечной микробиоты относительно БП на валидационной выборке. Достаточно интересен тот факт, то оптимальные параметры классификации были получены с использованием технически простого наивного байесовского классификатора с ядерной оценкой плотности распределения. В данном случае этот алгоритм оказался наиболее подходящим для диагностики поскольку: более стабильно работает на выборках относительно малого размера, к каким, ввиду сложности аппроксимируемой зависимости, можно отнести и выборку, использованную в нашем исследовании (*D.J.Hand and K.Yu, 2001*); характеризуется низкой дисперсией оценок вероятности принадлежности к классу, что дает возможность эффективно работать со сложными данными (*D.J.Hand and K.Yu, 2001*).

Заключение

В результате проведенного исследования отмечалось снижение таксономического разнообразия микробиоты кишечника у пациентов с БП и другими неврологическими заболеваниями по сравнению с микробиотой пациентов группы здорового контроля. Оценка β -разнообразия показала, что наличие того или иного неврологического заболевания у пациента оказывает значимое влияние на состав кишечной микробиоты. Анализ корреляционных сетей метабеномов также подтверждает наблюдаемое снижение таксономического разнообразия у пациентов с БП. По сравнению с микробиотой здоровых, во флоре пациентов наблюдается нарушение кооперации между бактериями, выраженное в снижении размеров корреляционной сети и уменьшении числа взаимодействующих микроорганизмов.

У пациентов с БП наблюдалось своеобразие состава микробиоты кишечника на всех таксономических уровнях, выраженное в изменении представленности нескольких групп микроорганизмов. С точки зрения особенностей взаимодействия конкретных микроорганизмов с организмом-хозяином, бактерии с измененной представленностью можно разделить на несколько групп: ассоциированные с продукцией короткоцепочечных жирных кислот (бактерии родов *Succinivibrio*, *Acetanaerobacterium*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, а также видов *Eubacterium cylindroides*, *Bifidobacterium breve* и *Bifidobacterium bifidum*), условно-патогенные бактерии (бактерии родов *Desulfovibrio*, *Cloacibacillus*, *Klebsiella*, *Sphingomonas*, *Enterococcus*, и вида *Staphylococcus epidermidis*), конкордантные микроорганизмы (класс RF, порядки RF32, SHA-98 и ML615J-28, род бактерий *Christensenella* и род археев *Methanobrevibacter*) и микробы с возможными пробиотическими свойствами (бактерии рода *Oxalobacter*, и видов *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus mucosae*, *Bifidobacterium bifidum*).

Наряду с изменением таксономического состава кишечной микробиоты, при БП также наблюдались сдвиги в ее функциональном потенциале по данным реконструкции. Было получено, что микробиота пациентов с БП характеризовалась функциональной избыточностью относительно генов, входящих в метаболический путь синтеза бутирата из предшественника ацетил-КоА по сравнению со здоровым контролем. Кроме того, в метагеноме кишечника пациентов с БП по данным реконструкции снижалась представленность генов, входящих в метаболические пути продукции витаминов В12, В2 и В3 по сравнению с лицами группы контроля и другими неврологическими заболеваниями; увеличивалось содержание генов, ассоциированных с синтезом В6 и К, по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями.

В рамках работы подобран оптимальный перечень биомаркеров и математическая модель, в которой классифицирующий алгоритм позволяет определять пациентов с болезнью Паркинсона по составу кишечной микробиоты с чувствительностью 91,30%, специфичностью 91,67% при точности в 91,49%. В результате проведенной работы было показано, что особенности таксономической композиции кишечной микробиоты потенциально пригодны для проведения диагностики БП.

Выводы

1) У пациентов с болезнью Паркинсона и лиц с другими неврологическими заболеваниями наблюдается снижение таксономического разнообразия кишечного сообщества микроорганизмов по сравнению со здоровым контролем.

2) Микробиота кишечника при болезни Паркинсона характеризуется изменением в представленности групп микроорганизмов, ассоциированных с продукцией короткоцепочечных жирных кислот (бактерий родов *Succinivibrio*, *Acetanaerobacterium*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, бактерий видов *Eubacterium cylindroides*, *Bifidobacterium breve* и *Bifidobacterium bifidum*), условно-патогенных бактерий (бактерий родов *Desulfovibrio*, *Cloacibacillus*, *Sphingomonas*, *Enterococcus*, *Klebsiella* и бактерий вида *Staphylococcus epidermidis*), микроорганизмов с высокой степенью конкордантности (бактерий порядков RF39, ML615J-28, SHA-98, бактерий рода *Christensenella* и археев рода *Methanobrevibacter*) и микробов с потенциальными пробиотическими свойствами (бактерий родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Oxalobacter*).

3) В микробиоте кишечника при болезни Паркинсона по данным реконструкции функционального потенциала отмечается увеличение представленности генов, связанных с синтезом бутирата из ацетил-КоА по сравнению со здоровым контролем; снижается представленность метаболических путей, связанных с продукцией витаминов В12, В9, В2 и В3, по сравнению с лицами группы здорового контроля и группой сравнения; а также

увеличивается содержание генов, ассоциированных с продукцией витаминов В6 и К, по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями.

4) Создана математическая модель для классификации пациентов с болезнью Паркинсона, основанная на применении байесовского классификатора и учете информации о представленности микроорганизмов родов *Christensenella*, *Methanobrevibacter*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Catabacter*, *Desulfovibrio*, *Sphingomonas*, *Yokenella*, *Atopobium*, *Fusicatenibacter*, *Cloacibacillus*, *Bulleidia*, *Acetanaerobacterium* и *Staphylococcus* в микробиоте кишечника. В модели достигнуты показатели точности 91.49%, чувствительности 91.30% и специфичности 91.67%.

Перечень работ, опубликованных по теме диссертации

- 1) **Петров, В.А.** Исследование микробиоты кишечника при болезни Паркинсона / **В.А. Петров** // Проблемы медицинской микологии. -2016. -Т 18, № 2. -с. 102
- 2) **Petrov, V.A.** Gut microbiota in case of Parkinson's disease and other neurological pathologies: comparative study / **V.A. Petrov**, V.M. Alifirova, I.V. Saltykova, Y.B. Dorofeyeva, A.V. Tyakht, E.S. Kostryukova, A.E. Sazonov // The International Symposium Systems Biology and Biomedicine. – 2016. – P. 236.
- 3) **Петров, В.А.** Сравнительный анализ кишечной микробиоты при болезни Паркинсона и других неврологических заболеваниях / **В.А. Петров**, В.М. Алифирова, И.В. Салтыкова, И.А. Жукова, Н.Г. Жукова, Ю.Б. Дорофеева, А.В. Тяхт, И.А. Алтухов, Е.С. Кострюкова, М.А. Титова, Ю.С. Миронова, О.П. Ижболдина, М.А. Никитина, Т.В. Перевозчикова, Е.А. Файт, А.Э. Сазонов // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2016. – Т. 15, №. 5. –С. 113–125.
- 4) Алифирова, В.М. Взаимосвязь эмоционально-аффективных нарушений и микробиоты у пациентов с болезнью Паркинсона / В.М. Алифирова, Н.Г. Жукова, И.А. Жукова, Ю.С. Миронова, **В.А. Петров**, О.П. Ижболдина, М.А. Титова, А.В. Латыпова, М.А. Никитина, Ю.Б. Дорофеева, И.В. Салтыкова, А.В. Тяхт, Е.С. Кострюкова, А.Э. Сазонов // **Вестник РАМН***. – 2016. – Т. 71, №. 6. –С. 427-435.
- 5) Алифирова, В.М. Возможная роль микробиоты желудочно-кишечного тракта в патогенезе болезни Паркинсона / В.М. Алифирова, Н.Г. Жукова, И.А. Жукова, А.В. Латыпова, М.А. Титова, Ю.С. Миронова, О.П. Ижболдина, М.А. Никитина, **В.А. Петров** // **Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова***. – 2016. – Т. 116, №. 11. – С. 174-179.
- 6) Тяхт, А.В. Связана ли микрофлора кишечника с болезнью Паркинсона? / А.В. Тяхт, В.М. Алифирова, Н.Г. Жукова, И.А. Жукова, А.В. Латыпова, Ю.С. Миронова, **В.А. Петров**, О.П. Ижболдина, М.А. Титова, М.А. Никитина, Е.С. Кострюкова, Ю.Б. Дорофеева, И.В. Салтыкова, А.Э. Сазонов // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2016. – Т. 15, №. 5. –С. 134–146.

7) Кострюкова, Е.С. Обонятельная дисфункция и изменение микробиоты как ранние немоторные проявления болезни Паркинсона / Е.С. Кострюкова, В.М. Алифирова, Н.Г. Жукова, И.А. Жукова, О.П. Ижболдина, **В.А. Петров**, Ю.С. Миронова, А.В. Латыпова, М.А. Никитина, М.А. Титова, А.В. Тяхт, Ю.Б. Дорофеева, И.В. Салтыкова, А.Э. Сазонов // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2016. – Т. 15, №. 5. –С. 66-74.

8) **Petrov, V.A.** Analysis of Gut Microbiota in Patients with Parkinson's Disease / **V.A. Petrov**, I.V. Saltykova, I.A. Zhukova, V.M. Alifirova, N.G. Zhukova , Yu.B. Dorofeeva, A.V. Tyakht, B.A. Kovarsky, D.G. Alekseev, E.S. Kostryukova, Yu.S. Mironova, O.P. Izhhboldina, M.A. Nikitina, T.V. Perevozchikova, E.A. Fait, V.V. Babenko, M.T. Vakhitova, V.M. Govorun, A.E. Sazonov // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2017. – Vol. 162, №. 6. – P. 734-737.

9) Свидетельство о гос. регистрации программы ЭВМ № 2017611956. «Паркинсон-диагностика» / В.М. Алифирова, Ю.Б. Дорофеева, И.В. Салтыкова, А.Э. Сазонов, А.В. Тяхт, И.А. Алтухов, **В.А. Петров**, Н.Г. Жукова, И.А. Жукова. - № 2017611956, заявл. 7 декабря 2016, опубл. 14 февраля 2017.

10) Свидетельство о гос. регистрации БД № 2018620323. База данных значимости родов микроорганизмов микробиоты кишечника человека по отношению к дифференциальной диагностике болезни Паркинсона / **В.А. Петров**, В.М. Алифирова, Н.Г. Жукова, И.А. Жукова, Ю.Б. Дорофеева. - № 2018620323, заявл. 16 ноября 2017, опубл. 21 февраля 2018.

*-в списке ВАК на момент выхода статьи

Список условных сокращений

Ацетил-КоА – ацетил-коэнзим А

БП – болезнь Паркинсона

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ОТЕ – операционная таксономическая единица

ПЦР – полимеразная цепная реакция

GLM – обобщенная линейная модель

NB – наивный байесовский классификатор

NNET – искусственная нейронная сеть

PLS – регрессия методом частичных наименьших квадратов

SVM – машина опорных векторов

16S рРНК – 16S рибосомальная рибонуклеиновая кислота