

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Петров Вячеслав Алексеевич

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ПРИ БОЛЕЗНИ
ПАРКИНСОНА

03.02.03 – Микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель
доктор медицинских наук
А.Э. Сазонов

Томск, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Понятие о микробиоте. Современные методы изучения микробных сообществ	9
1.2 Микробиота человека	17
1.3 Ось мозг-кишечник. Роль микробиоты	25
1.4 Микробиота кишечника и болезнь Паркинсона	30
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 Материал исследования	36
2.2 Методы исследования.	38
2.2.1 Молекулярно-биологические методы	38
2.2.1.1 Выделение тотальной бактериальной ДНК	38
2.2.1.2 Ампликонное секвенирование микробиоты	40
2.2.2 Биоинформатические методы: Таксономический анализ микробиоты	41
2.2.3 Статистические методы.	42
2.2.3.1 Расчет индексов таксономического разнообразия	42
2.2.3.2 Корреляционный анализ.	43
2.2.3.3 Сравнительный анализ представленности операционных таксономических единиц бактерий и реконструкция метаболических путей	44
2.2.4 Методы машинного обучения	45
2.2.4.1 Отбор наиболее значимых признаков	45
2.2.4.2 Обучение классифицирующих моделей	46
2.2.4.3 Валидация моделей	47
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
3.1 Таксономическая композиция кишечной микробиоты у пациентов разных групп	48
3.1.1 Обобщенные результаты секвенирования	48

3.1.2 Состав микробиоты кишечника на разных таксономических уровнях	48
3.1.3 Оценка таксономического разнообразия микробиоты кишечника.	61
3.1.3.1 Расчет и оценка α -разнообразия.	61
3.1.3.2 Расчет и оценка β -разнообразия.	68
3.1.4 Анализ корреляционных сетей в микробиоте кишечника	73
3.1.5 Особенности состава кишечной микробиоты на различных таксономических уровнях	81
3.1.6 Реконструкция метаболического потенциала микробиоты	105
3.2 Микробиота кишечника как источник биомаркеров болезни Паркинсона	110
3.2.1 Перечень бактериальных родов, выбранных для обучения классификаторов	110
3.2.2 Обучение классифицирующих моделей	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
ВЫВОДЫ	125
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	126
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	127

ВВЕДЕНИЕ

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 как на изменение состояния 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 Heijtj et al, 2011*). Микроорганизмы, взаимодействуя как напрямую с *n.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 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 мейсснера 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 – Выяснение характерных особенностей 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 относительно 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 относительно 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 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 модели 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» (№2018620323, дата приоритета 16 ноября 2017, в реестре с 21 февраля 2018); свидетельство о регистрации программы для ЭВМ «Паркинсон-диагностика» (№2017611956, дата приоритета 7 декабря 2016, в реестре с 14 февраля 2018).

Положения, выносимые на защиту

1) Микробиота кишечника пациентов с болезнью Паркинсона характеризуется изменениями в таксономическом и функциональном составе по сравнению с кишечной микробиотой 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 конференция «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии» (Томск, 2017 г.).

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, входящих в базы данных Web of Science и/или Scopus – 6; 2 свидетельства о регистрации результатов интеллектуальной деятельности.

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 результата 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 материалов и методов исследования, изложения собственных результатов, заключения, выводов, библиографического указателя, включающего 304 источника.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Понятие о микробиоте. Современные методы изучения микробных сообществ

Микроорганизмы являются древнейшей и важнейшей частью биосферы нашей планеты. Традиционно, к микроорганизмам относят представителей бактерий, вирусов, археев, простейших, а также некоторые виды грибов, характеризующихся малыми размерами. Микробы крайне широко распространены на Земле и населяют все биотопы планеты: атмосферу (*A.M.Klein et al, 2016*), поднимаясь вплоть до слоя стратосферы (*M.Wainwright et al, 2003*); гидросферу, включая глубины Марианской впадины (*J.Tarn et al, 2016*) и агрессивную среду углекислотных озер гидротермальных источников (*F.Inagaki et al, 2016*); литосферу (*J.Wierzchos et al, 2011*), а также биосферу — организмы живых существ. Совокупная биомасса всех микроорганизмов составляет до 90% от общего количество живого на планете, превышая биомассу остальных живых существ в 9 раз (*Jawetz, Melnick and Adelberg, 2013*). Наибольший интерес в данном случае представляют бактерии и археи.

Бактерии не существуют отдельно друг от друга, напротив, они образуют сложную метаболическую кооперацию, совместно поглощая и обрабатывая питательные вещества из окружающей среды (*J.Rousk et al, 2014; J.M.Chaparro et al, 2011*). Такие кооперации также позволяют бактериям выживать в сложных экологических условиях и защищать свою экологическую нишу от вторжения нежелательных микроорганизмов за счет системы межбактериального «общения» — quorum sensing (дистанционные микроб-микробные взаимодействия) (*W.L.Ng and B.L.Bassler, 2009; S.T.Rutherford and B.L.Bassler, 2012*). Для данных устойчивых межмикробных коопераций Джошуа Ледербергом был предложен термин микробиота (микробиом) — совокупность микроорганизмов (бактерий, археев, вирусов, простейших и микроскопических грибов), проживающих совместно в одинаковых условиях (*J.Lederberg and A.T.McCray, 2001*).

Некоторые исследователи разделяют термины микробиота и микробиом, определяя микробиом как совокупность всех генов микробиотического

сообщества (*R.E.Ley et al, 2006*). Однако, такое определение не совсем корректно, поскольку существует отдельный термин описывающий совокупность генов всего сложного бактериального сообщества — метагеном. Термины метагеном и метагеномика были предложены Хандельсманом с соавторами в 1998 году (*J.Handelsman et al, 1998*). По аналогии с геномикой — наукой и группой методических подходов, посвященных изучению геномов отдельных организмов, метагеном представляет собой, исходя из этого определения, совокупный геном всех организмов, составляющих данную микробиоту, тогда как метагеномика — наука об исследовании совокупного генетического материала, полученного напрямую из окружающей среды.

Исторически, наиболее ранним методом исследования микроорганизмов является описательный метод — бактериоскопия. Этот метод, не утративший своего значения и сейчас, заключается в визуальном изучении формы, строения и характера окраски микроба при помощи микроскопа, как с использованием дифференциальной окраски, так и без нее. Данный метод заложил необходимую базу для таксономической классификации и идентификации микроорганизмов. Однако он имеет достаточно серьезные ограничения — при бактериоскопии невозможно идентифицировать многие морфологически схожие виды бактерий, а также сделать заключение о характере метаболической активности. Ввиду этого, до появления культуральных методик и подходов по определению метаболической активности микробов в науке присутствовала гипотеза о микробном плеоморфизме — отсутствии в систематике бактерий четко очерченного понятия «вид». Развитие культуральных методов, появление селективных сред и биологических моделей для выделения и выращивания микроорганизмов позволило более подробно изучить физиологические и биохимические аспекты их жизнедеятельности, в том числе и определить возбудителей многих инфекционных заболеваний, таких как чума, туберкулез, сибирская язва.

Однако, при всей эффективности бактериоскопических и бактериологических методик, полноценное исследование бактериальных

сообществ оказалось весьма затрудненным, поскольку до 90% микроорганизмов крайне тяжело поддаются культивированию в лабораторных условиях (*A.Suaui et al, 1999; A.B.Олескин и др., 2016*). Поэтому для изучения сложных и многокомпонентных микробных сообществ во всей совокупности наибольшее распространение получили молекулярно-биологические методы, основанные на прочтении бактериального генома – всей последовательности либо определенного гена (*M.Hamady and R.Knight, 2009*).

Самым распространенным и эффективным методом исследования структуры генетического кода микробиома является секвенирование нового поколения (с англ. next-generation sequencing, NGS) – группа различных подходов к прочтению понуклеотидных последовательностей нуклеиновых кислот (*А.А.Кожевников и др., 2017*). Основным отличием NGS от классического секвенирования по Сэнгеру служит то, что при секвенировании нового поколения происходит одновременное «прочитывание» сразу большого количества молекул нуклеиновых кислот, что позволяет крайне быстро и достаточно дешево получить подробную информацию о геноме исследуемого организма и/или сообщества (*J.P.de Magalhães et al, 2010*). В дальнейшем эта информация может быть использована для установления таксономической композиции исследуемого микробного сообщества и/или его функциональной активности (*N.Hall, 2007*). В метагеномных исследованиях используется два основных подхода к проведению секвенирования, различающиеся количеством и характером получаемой информации.

Первый подход, называемый ампликонным секвенированием, заключается в амплификации и секвенировании определенного фрагмента генома исследуемых организмов. Выбор фрагмента зависит от цели исследования. В случае оценки таксономического состава микробных сообществ и отдельных микроорганизмов исторически наиболее ранним являлось исследование структуры бактериального гена 16S рибосомальной РНК (*C.R.Woese and G.E.Fox, 1997; A.Suaui et al, 1999*). Такой выбор обусловлен некоторыми особенностями данного гена:

1. Во-первых, этот ген имеют все бактерии и он критически важен для их

жизнедеятельности – при его потере невозможно образование рибосом, а как следствие и синтез белка, что приведет к гибели бактериальной клетки. Ввиду того, что 16S рРНК напрямую участвует в синтезе белка, ее нуклеотидная структура достаточно стабильна, и многие случайные мутации выдавливаются отбором (*S.C.Abeysirigunawardena et al, 2017*).

2. Во-вторых, в последовательности гена содержатся как высококонсервативные участки, которые кодируют важные компоненты рРНК, участвующие в белковом синтезе, так и вариабельные регионы. Структура высококонсервативных регионов отличается высокой степенью сходства между всеми бактериями (*T.Coenye and P.Vandamme, 2003*). Между ними расположены девять вариабельных регионов (V1-V9). В свою очередь вариабельные регионы отличаются большим разнообразием в нуклеотидном составе, что позволяет использовать их для идентификации таксономического положения бактерии вплоть до вида (*K.Fukuda et al, 2016*).

3. Тот факт, что вариабельные регионы фланкируются консервативными, позволяет создавать универсальные праймеры на фланкирующие консервативные области гена, подходящие для подавляющего большинства бактерий. С их помощью можно получать ампликоны вариабельных областей гена 16S рРНК, расположенных между консервативными участками, сразу для многих видов бактерий и археев (*Z.J.Jay and W.P.Inskeep, 2015*).

Идентификация таксономического состава осуществляется на основе сравнения полученных прочтений с имеющимися базами данных о структуре генов 16S рРНК у различных видов бактерий. Условной единицей подобной классификации служит операционная таксономическая единица (ОТЕ), которая описывает таксономическое положение микроорганизма исходя из нуклеотидной последовательности генов, в данном случае бактериальных генов 16S рРНК, без проведения бактериоскопических и бактериологических исследований (*T.S.Schmidt et al, 2014*). Существует несколько подходов к филогенетической классификации прочтений: прямое сравнение с референсной базой ОТЕ, определение прочтений *de novo* и смешанный подход (*J.G.Caporaso et al., 2010*).

При использовании референсного подхода к идентификации проводится прямое сравнение прочтений, полученных в ходе секвенирования, с эталонными прочтениями, содержащимися в одной из нескольких референсных баз данных. Все эталонные прочтения сопоставлены с ОТЕ бактерий, при этом различные ОТЕ дают неодинаковую глубину классификации: от уровня царства и типа, до уровня рода и вида. Наиболее распространёнными базами прочтений генов 16S рРНК являются SILVA (*C.Quast et al, 2013*), GreenGenes (*T.Z.DeSantis et al, 2006*), RDP (*J.R.Cole et al, 2014*) и HITdb (*J.Ritari et al, 2015*). Последовательность каждого экспериментального прочтения сравнивается с набором эталонных; сохраняются и объединяются в ОТЕ лишь те прочтения, для которых процент совпадения по нуклеотидному составу с одним из эталонов составляет не менее 97. Данный порог обусловлен степенью сходства бактериальных генов 16S рРНК внутри одного бактериального вида (*D.A.Peterson et al, 2008*). К преимуществам этого подхода относится быстрота выполнения, в частности обусловленная вычислительной гибкостью: существует возможность эффективного распараллеливания процесса вычислений. Кроме того, значимым преимуществом является стандартизация результата, которая дает возможность сравнения результатов исследований, выполненных различными коллективами при условии использования одинаковой референсной базы и сходного протокола эксперимента. При этом, данный метод плохо применим для исследования малоизученных бактериальных сообществ.

При использовании подхода *de novo* прочтения агрегируют в кластеры на основании сходства по нуклеотидной структуре между собой (*J.Guo et al, 2016*). Порог сходства прочтений, как и в случае референсного подхода, составляет 97 процентов. Затем для каждого кластера определяется последовательность-представитель, которая используется для определения таксономического положения данной ОТЕ. Классификация *de novo* позволяет использовать различные базы данных, не только генов 16S рРНК, а также находить новые, потенциально неизученные виды микроорганизмов. При этом классификация *de novo* намного более требовательна к вычислительным ресурсам и плохо подходит

для получения стандартизированного результата.

Смешанный подход заключается в поочередном применении двух предыдущих методик (*J.G.Caporaso et al, 2010*). На начальном этапе производится определение таксономического положения всех прочтений с использованием референсного подхода. Затем, для прочтений, не обнаруживших необходимой степени сходства с референсной базой, проводится поиск *de novo*. Таким образом, затраты на вычисления несколько снижаются, однако сохраняются трудности связанные с сопоставлением результатов различных исследований.

Ампликонное секвенирование микробиоты дает информацию преимущественно о таксономическом составе микробиоты в изучаемом образце. К его достоинствам относят дешевизну проведения, производительность, сравнительную простоту обработки и анализа результата. Однако, данный подход не дает прямой информации о функциональном составе изучаемого сообщества, хотя при помощи некоторых методов на основе такого рода данных можно проводить реконструкцию метаболического потенциала микробиоты *in silico* (*M.G.I.Langille et al, 2013*).

Наряду с ампликонным секвенированием для изучения состава микробиоты применяется и «полногеномное» секвенирование, называемое также *shot-gun* секвенированием (с англ., секвенирование методом «дробовика»). В ходе него проводится химическое либо физическое разделение тотальной ДНК сообщества на перекрывающиеся фрагменты небольшой длины, которые затем секвенируют (*T.G.Sharpton, 2014*). Просеквенированные фрагменты бактериальной ДНК затем подвергают сборке — процессу восстановления последовательности из пула перекрывающихся прочтений (*Afiabayati et al, 2015*). Полногеномное секвенирование — дорогостоящая и технически сложная методика, высокие требования предъявляются как к сбору материала, так и к проведению секвенирования и обсчету. Однако, только данный подход позволяет оценить не только таксономический, но и функциональный состав метагеномного сообщества, включая его метаболическую активность, антибиотикерозистентность, синтез факторов патогенности и т. п. (*K.Yarygin et al,*

2017). Другими вариантами оценки функциональной активности микробиоты культурнезависимыми методиками являются масс-спектрометрический поиск метаболитов, исследование метапротеома и метатранскриптома. Масс-спектрометрия метагеномных сообществ чаще всего используется в качестве дополнительного метода исследования, позволяющего оценить активность метаболизма сообщества (О.Г.Жиленкова и др., 2016; F.Fouhy et al, 2017). Метапротеомика и метатранскриптомика также дает информацию о реализации генетической информации микробиома, но отличаются еще более высокой сложностью выполнения эксперимента и анализа данных (M.Reck et al, 2015; X.Zhang et al, 2017). По этим причинам для оценки таксономического состава микробиоты рациональнее всего применять ампликонное секвенирование.

Кроме оценки таксономического состава того или иного микробиома в ходе исследования оценивается и его разнообразие. Мерой таксономического богатства изучаемого сообщества является индекс α -разнообразия — количество различных видов в одном образце стандартизированного размера (R.H.Whittaker, 1972). Высокое таксономическое богатство сообщества говорит о его стабильности — отсутствии конкуренции организмов за экологические ниши, поскольку в таком случае эволюционный успех достигается не за счёт «борьбы» с другими организмами населяющими сообщество, а при помощи поиска новых экологических ниш в среде обитания, что в свою очередь, и ведет к увеличению видового богатства биоты до определенного предела, задаваемого условиями среды обитания (J.Wang et al, 2017). С ухудшением внешних условий, важных для микроорганизмов, разнообразие также снижается (J.Wang et al, 2017).

Аналогом внешней среды для микробиоты человека является организм, тогда как внешними условиями его состояние: активность иммунной системы, характер питания, прием лекарственных средств, наличие заболеваний и т. д. При этом отмечается, что при наличии заболеваний, в частности связанных с протеканием воспалительных процессов, разнообразие микробиоты пораженного органа снижается (M.Craven et al, 2012). При неблагоприятных условиях обитания в организме хозяина выживают наиболее универсальные виды микробов,

способные, в том числе, и к активному противодействию иммунной агрессии организма — зачастую условно-патогенные патогенные бактерии или штаммы с повышенной резистентностью к антибиотикам (*C.Alauzet et al, 2010; W.van Schaik, 2015*). По этой причине α -разнообразие микробиоты является важной характеристикой, как ее состояния, так и состояния организма хозяина. Перед расчётом α -разнообразия данные о составе микробиоты прореживаются: из каждого образца отбирается одинаковое число случайных ОТЕ, что дает стандартизацию размера образца. Для расчёта α -разнообразия используют набор индексов, среди которых наиболее часто используются следующие: индекс Шеннона (*C.E.Shannon, 1948*), индекс Симпсона (*E.H.Simpson, 1949*), индекс Чао (*A.Chao, 1984*) и Фэйта (*D.P.Faith, 1992a; D.P.Faith, 1992b*).

Кроме расчёта таксономического богатства в одном взятом образце (или группе образцов, объединенных по какому-либо признаку) также вычисляется и β -разнообразие — мера попарного различия между двумя микробиомами (*R.H.Whittaker, 1972*). В-разнообразие показывает, насколько сильно один микробиом отличается от другого (или одна группа микробиомов от другой) по совокупному видовому составу. На настоящий момент для расчёта такой меры разнообразия образцы «размещают» в многомерное пространство, где оси координат представляют собой ту или иную ОТЕ, а координаты на осях — количества ОТЕ в данном образце (*C.Ricotta and S.Burrascano, 2008*). Полученную матрицу затем обрабатывают различными способами для снижения размерности. Среди них: анализ главных компонент (*K.Pearson, 1901; H.Hotelling, 1933*), анализ главных координат или классическое многомерное шкалирование, а также неметрическое многомерное шкалирование (*I.Borg and P.Groenen, 2005*). Для определения расстояний между образцами в пространстве необходимо определиться с его метрикой: она должна отражать реальную взаимосвязь между объектами. В случае метагеномных исследований, оптимальной метрикой является UniFrac (от англ. unique fraction - уникальная доля) (*C.A.Loizipone et al, 2007*). При определении расстояний в этой метрике для пары сообществ строятся филогенетические деревья. Затем они соединяются, после чего находят

отношение суммарной длины веток, принадлежащих ровно одному сообществу, к общей длине веток объединенного дерева. Это позволяет учитывать не только количественные различия в представленности таксонов, но и филогенетическую дистанцию между сообществами (*C.A.Lozupone and R.Knight, 2005*).

1.2 Микробиота человека

Эволюция многоклеточной жизни на Земле проходила в постоянном присутствии микроорганизмов: бактерий, археев, вирусов, простейших и грибов. За миллионы лет между многоклеточными организмами и микробами установились тесные и взаимовыгодные симбиотические взаимоотношения (*F.Backhed, 2005*). При этом каждая смена поколений характеризовалась ростом взаимного приспособления организма-хозяина и микроорганизмов (*R.M.Brucker and S.R.Bordenstein, 2012*). В процессе эволюции отмечается параллельность изменений в составе микробиоты изменениям в геноме макроорганизма (*R.M.Brucker and S.R.Bordenstein, 2012*). Данное явление получило название филосимбиоз (*A.W.Brooks et al, 2016*). Природа филосимбиоза вероятно заключается в отборе «выгодных» для метаболизма организма микробов, а также элиминации патогенных и условно патогенных бактерий посредством синтеза специфических антимикробных пептидов и иммунологической агрессии (*R.M.Stilling et al, 2014*). Для микроорганизмов многоклеточные являются хоть и специфической, но все же привычной экологической нишей; вероятно, все известные многоклеточные населены микробами, как растения (*B.D.Müller et al, 2016*), так и животные: от губок (*L.Moitinho-Silva et al, 2017*), кишечнополостных (*A.E.Murray et al, 2016*) и насекомых (*A.C.Wong et al, 2016*), до рыб (*T.Pérez et al, 2010*) птиц (*S.M.Hird, 2017*), рептилий (*K.D.Kohl et al, 2017*), и млекопитающих (*R.E.Ley et al, 2008*).

Таксономический состав микробиоты зависит от видовой принадлежности хозяина, у родственных видов, даже придерживающихся разной диеты, он коррелирует. Например, отмечается сходство микробиоты у шимпанзе (*Pan troglodytes schweinfurthii*) и человека (*A.H.Moeller et al., 2012*). Между организмом

хозяина и населяющими его микробами имеются прочные физиологические связи (*J.M.M.Natividad and E.F.Verdu, 2013; S.M.Hird, 2017*), благодаря которым микробное население организма находится в состоянии динамического равновесия: имеются закономерности в количественном, таксономическом и функциональном составе микробиоты отдельных участков человеческого тела (*E.S.Charlson et al, 2011*). Человек здесь не является исключением и, по разным данным, от 10 до 100 триллионов микробов заселяют многие биотопы организма (*P.J.Turnbaugh et al, 2007; R.Sender et al, 2016*).

Кожа является естественным барьером, отделяющим внутреннюю среду организма от внешних условий. Соприкасаясь с внешней средой напрямую, кожные покровы уже при рождении обильно обсеменяются микроорганизмами, преимущественно лактобактериями и стрептококками (*D.M.Chu et al, 2017*). Микробиом кожи отличается большой внутривидовой вариабельностью и во многом зависит как от условий внешней среды (*V.K.Gupta et al, 2017*), так и от места забора образца (*E.K.Costello et al, 2009*), однако его основу у взрослого человека составляют стрептококки, стафилококки, коринобактерии и пропионобактерии (*Y.E.Chen and H.Tsao, 2013*). Микробиотический ландшафт кожи зависит не только от внешних условий, но и от состояния здоровья человека: известно, что при многих кожных заболеваниях, включая акне (*B.Dreno et al, 2017*), псориаз (*A.V.Alekseyenko et al, 2013*), атопический дерматит (*H.Brüssow, 2016*) и др. состав микробиоты изменяется. Кроме того, микробиота кожи также участвует в поддержании адекватного состояния и развитии иммунной системы посредством стимуляции кератиноцитов и лимфоцитов Трег звена, помогая в защите организма от колонизации патогенными бактериями (*T.C.Scharschmidt et al, 2017.; Z.Wang et al, 2017; A.R.Hoffmann, 2017*).

Микробиоту влагалища в норме составляют в основном различные виды лактобактерий, а также бифидобактерии, коринобактерии и гарденеллы. Ее состав варьирует в зависимости от национальности, особенностей полового поведения, изменяясь при дисбиозе и приеме гормональной контрацепции (*H.Borgdorff et al, 2017*). Касательно микробиома матки и плаценты существуют различные точки

зрения, хотя исключать внутриутробное обсеменение плода непатогенными бактериями и нельзя (*M.E.Perez-Muñoz et al, 2017*), четких доказательств данного факта пока нет: проведенные по данной тематике работы имеют некоторые методические недостатки, которые не позволяют с уверенностью судить об этом.

Долгое время считалось что легкие, начиная с седьмого ветвления бронхов, стерильны. Однако, благодаря метагеномным исследованиям, на настоящий момент известно, что бактерии заселяют всю дыхательную систему: от полости носа и рта, до альвеол (*M.Hilty et al, 2010*). Состав микробиоты легких варьирует в зависимости от места забора материала: так, орофарингеальная микробиота зачастую содержит примеси оральной (*Л.М.Огородова и др., 2015*), назальная микробиота имеет некоторое сходство по составу с микробомом кожи (*D.N.Frank et al, 2010*). Микробиота непосредственно легких также варьирует: ее разнообразие снижается пропорционально росту номера ветвления бронхов, пристеночная и просветная микробиота различается по таксономическому составу (*R.P.Dickson et al, 2017*). При заболеваниях представленность бактерий в микробиоте легких изменяется: показано, что ХОБЛ и бронхиальная астма вызывают изменение таксономической композиции микробиоты дыхательных путей и снижение ее разнообразия (*Y.J.Huang et al, 2017; A.Sullivan et al, 2016*), однако при тяжелом течении этих заболеваний микробиота приобретает достаточно сходный видовой состав, что, по всей видимости, объясняется сопоставимым характером влияния тяжелых патологических процессов на состояние дыхательной и иммунной системы (*Л.М.Огородова и др., 2015*).

Однако наиболее богатой по количественному, видовому и функциональному составу является микробиота желудочно-кишечного тракта. Микробы населяют все его отделы и таксономическая композиция микробиоты пищеварительной системы, при имеющихся закономерностях в составе, динамично реагирует на состояние здоровья человека.

Ротовая полость заселяется бактериями сразу после рождения (*V.K.Gupta et al, 2017*). Микробиота полости рта содержит порядка 600 различных видов бактерий (*F.E.Dewhirst et al, 2010*), ее состав и разнообразие варьирует у разных

этнических групп и зависит от особенностей питания и морфологии зубов и десен (M.R.Mason et al, 2013). Состояние здоровья также влияет на микробный ландшафт полости рта: кариес, курение, периодонтит вызывают изменение в представленности бактерий (V.Meuric et al, 2017; P.Le Bars et al, 2017). Пищевод также характеризуется собственной структурой микробной популяции с преобладанием стрептококков и рода *Prevotella* (V.Di Pilato et al, 2016). При заболеваниях пищевода, в частности при рефлюксе и пищеводе Баретта отмечается рост представленности родов *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Bacteroides*, *Proteobacteria* и *Veilonella* (E.J.Snider et al, 2016).

Нормальную микробиоту желудка составляют бактерии типов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Fusobacteria* (E.M.Bik et al, 2006). Роль микробиоты, в частности *Helicobacter pylori*, в развитии язвенной болезни желудка, известна уже достаточно давно, еще до проведения культурнезависимых исследований. На настоящий момент изменения в микробиоме желудка все чаще рассматриваются в контексте развития рака (G.Yu et al, 2017; E.Dias-Jácome et al, 2016) и предраковых состояний, таких как атрофический гастрит (T.Dong et al, 2017). Бактерии также населяют и желчный пузырь. Микробиота желчного пузыря отличается низким таксономическим разнообразием, с преобладанием типов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria* (I.V.Saltykova et al, 2016). На таксономический состав и разнообразие микробиоты желчи влияют такие факторы, как пол, гельминтная инвазия (I.V.Saltykova et al, 2016), и общее состояние желчевыводящей системы, включая болезни печени (P.Pereira et al, 2017).

Кишечная микробиота является, возможно, важнейшим компонентом микробиотического сообщества организма человека (М.Д.Ардатская и др., 2015). Согласно последним подсчетам, число микробов, составляющих микробиоту кишечника, приблизительно равно числу клеток организма человека, общая масса составляет 0.2 килограмма (R.Sender et al, 2016). В состав прокариотического компонента кишечной микробиоты входят бактерии двенадцати различных типов, а также археи типа *Euryarchaeota*.

Наиболее распространенными типами бактерий являются Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria и Bacteroidetes, представители которых составляют более 90% от состава микробиоты (*E.Thursby and N.Juge, 2017*). При этом, типы Firmicutes и Bacteroidetes доминируют в таксономическом составе кишечной микробиоты, их соотношение меняется с возрастом – от 0,4 в младенчестве, 10,9 во взрослом возрасте и до 0,6 – в пожилом (*Шендеров Б. А. и др, 2016*). Наиболее представленными классами фирмикутов в кишечной микробиоте являются Bacilli и Clostridia, среди представителей Bacteroidetes доминируют Bacteroidia (*P.Hugon et al, 2015*).

На уровне семейств, ключевыми представителями здоровой микробиоты кишечника являются Bacteroidaceae, Clostridiaceae, Prevotellaceae, Eubacteriaceae, Ruminococcaceae, Bifidobacteriaceae, Lactobacillaceae, Enterobacteriaceae, а также археи Methanobacteriaceae (*J.Lloyd-Price et al, 2016*). На родовом уровне микробиота кишечника представлена 709 родами прокариот (*E.Thursby and N.Juge, 2017*). Наиболее распространенными родами кишечных бактерий являются *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia*, *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* (*J.Lloyd-Price et al, 2016*). На видовом уровне состав микробиоты представлен 2172 таксономическими единицами (*E.Thursby and N.Juge, 2017*).

Ранее по таксономической структуре микробиоту было принято разделять на энтеротипы: устойчивые композиции микробиоты с определенным составом. По преобладающему роду бактерий выделяют три энтеротипа: в микробиоте первого энтеротипа отмечается высокая представленность *Bacteroides*, микробиота второго характеризуется повышением содержания *Prevotella*, тогда как третий энтеротип связан с преобладанием бактерий рода *Ruminococcus* (*M.Arumugam et al, 2011*). На настоящий момент концепция энтеротипов подвергается пересмотру: более важным классификационным признаком, объединяющим микробиоты людей, является функциональный состав, то есть представленность генов различных метаболических путей в микробиоте, тогда как таксономический состав микробиоты правильнее рассматривать в качестве

градиентов представленности бактерий, а не устоявшихся энтеротипов (*I.B.Jeffery et al, 2012; P.J.Turnbaugh et al, 2009*).

Функциональные возможности микробиоты огромны. Совокупный геном сообщества кишечника — метагеном, содержит порядка 10 миллионов различных генов, превосходя человеческий геном по объему более чем в 300 раз (*S.R.Gill et al, 2006; J.Li et al, 2014*). Однако, микробиоте свойственна функциональная избыточность — многие из генов в ее составе являются функциональными аналогами, представленными в геномах различных бактерий, поэтому реальное метаболическое превосходство несколько ниже (*A.Moya and M.Ferrer, 2014*). Кишечная микробиота в организме человека выполняет ряд важных функций.

Во многих исследованиях показано участие микробиоты в процессах пищеварения и синтеза витаминов. В первую очередь бактерии, населяющие тонкий и толстый кишечник, активно перерабатывают растительную клетчатку, нерасщепляемую организмом человека (*Patrascu et al, 2017*). Наиболее активно гидролиз углеводов осуществляют бактерии родов *Bacteroides*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* и *Enterobacteria*. Продуктом микробного метаболизма клетчатки являются короткоцепочечные жирные кислоты: бутират, пропионат и ацетат (*T.Chen et al, 2017*). Для всех этих метаболитов, в особенности для бутирата, показано положительное влияние на функционирование и состояние кишечника.

Во-первых, бутират оказывает противовоспалительный эффект на слизистую кишечника за счёт супрессии активации NF-κB, что позволяет поддерживать физиологический уровень воспаления (*H.M.Hamer et al, 2008*). Во-вторых, отмечается способность бутирата влиять на генетическую экспрессию в клетках организма-хозяина; он выступает в качестве регулятора апоптоза посредством взаимодействия с гистондеацетилазой, модулирования киназной сигнальной системы, селективного ингибирования фосфорилирования гистонов, оказывая антиканцерогенное действие (*H.M.Hamer et al, 2008*). Пропионат также способен оказывать сходные эффекты на гистондеацетилазу (*S.Sivaprakasam et al, 2017*). К другим положительным эффектам, оказываемым бутиратом относят

снижение оксидативного стресса (*P.Rosignoli et al, 2001*), улучшение всасывания питательных веществ (*G.T.Macfarlane and S.Macfarlane, 2012*), кроме того он, наряду с другими короткоцепочечными жирными кислотами, является важным источником энергии для энтероцитов (*O.C.Velázquez et al, 1997; D.Ríos-Covián et al, 2016*).

Помимо этого, микробиота кишечника участвует в метаболизме липидов и белков. Так, *Bacteroides thetaiotaomicron* способствует гидролизу липидов, увеличивая экспрессию колипазы, входящей в состав гидролизующего жиры комплекса (*L.V.Hooper et al, 2001*). Многие резиденты микробиома кишечника, включая бактерий видов *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Megasphaera elsdenii*, *Mitsuokella multacidus*, *Selenomonas ruminantium* и *Streptococcus bovis* несут в геноме множество дипептидилпептидаз и дипептидаз, осуществляя катаболизм белков и свободных аминокислот (*A.M.Davila-Gay et al, 2013*). Потенциально микробиота способна гидролизовать все аминокислоты, но, по-видимому, предпочтительными субстратами являются глутамат, аспарат, лизин, аргинин, глицин, лейцин, валин и изолейцин (*Z.L.Dai et al, 2011*). Продукты их катаболизма, в частности H_2 , CO_2 , CH_4 и H_2S выступают в качестве медиаторных молекул, а также могут включаться в дальнейшие синтетические процессы: синтез бутирата, пропионата и ацетата, жирных кислот, органических кислот (*A.M.Davila-Gay et al, 2013*). Также кишечные микроорганизмы участвуют в трансформации первичных желчных кислот во вторичные, опосредуя тем самым процесс формирования мицелл необходимых для переваривания жиров в кишечнике.

Кишечная микробиота способна синтезировать ряд витаминов и витаминоподобных веществ, которые затем используются как организмом хозяина, так и другими бактериями в составе микробиоты, в том числе и в качестве сигнальных молекул (*M.A.Fischbach and J.A.Segre, 2016*). Витамин К, потребляемый человеком, производится за счет симбиотических бактерий. Наибольший вклад в синтез несут бактерии родов *Bacteroides* и *Prevotella* (*J.P.Karl et al, 2017*). Кроме того, установлено, что микробиота как человека, так и

других млекопитающих, способна синтезировать ряд витаминов группы В, однако напрямую из кишечника они не усваиваются, по этой причине человек, которому не свойственна копрофагия как, например, грызунам, вынужден потреблять эти витамины с пищей (*J.C.LeBlanc et al, 2017*).

Защитная функция микробиоты также крайне важна для организма человека. Она складывается из двух основных компонентов: участие в поддержании нормальной работы иммунной системы, ее «обучении» у детей и не иммунные защитные механизмы, снижающие вероятность заселения микробиома патогенами.

Не иммунные защитные механизмы опосредуются различными факторами, секретируемыми бактериями в процессе жизнедеятельности. Один из важнейших таких факторов уже упоминавшийся ранее бутират. Показано, что бутират способен увеличивать секрецию муцина, упрочнять межклеточные соединения в эпителиальных тканях и благодаря этому снижать проницаемость кишечной стенки для бактерий и нарушать бактериальную адгезию к ней (*H.M.Hamer et al, 2008; T.H.Jung et al, 2015; L.Peng et al, 2009*). Кроме того, он снижает люминальный рН кишечника, тем самым ингибируя рост бактерий (*G.T.Macfarlane and S.Macfarlane, 2012*). Продукция бифидобактериями другой короткоцепочечной жирной кислоты, ацетата, также рассматривается как один из механизмов угнетения роста патогенов (*S.Fukuda et al, 2011*). Бактерии, входящие в состав микробиоты человека, также способны к синтезу бактериоцинов — бактериальных антибиотиков, с помощью которых они защищают свои экологические ниши от колонизации другими видами бактерий, в том числе патогенными (*L.G.Cohen et al, 2017*).

Иммунная система человека эволюционировала при постоянном присутствии симбиотических микроорганизмов. В результате этого, присутствие микробиоты является одним из ключевых факторов для полноценного и адекватного становления иммунитета: микроорганизмы, наряду с гельминтами, участвуют в обучении и «тонкой настройке» иммунитета организма, снижая вероятность развития аутоиммунных состояний (*L.T.Stiemsma et al, 2015*). Часть

иммуномодулирующего эффекта микробиота оказывает за счет все тех же короткоцепочечных жирных кислот. Как отмечалось выше, бутират оказывает местное противовоспалительное действие, при этом увеличивая антимикробную активность путем усиления опосредованного макрофагами фагоцитоза (*M.R.Fernando et al, 2016*).

Короткоцепочечные жирные кислоты, в частности пропионат и ацетат, являются единственными известными лигандами G-белок сопряженного рецептора GPR43, который участвует в регуляции воспаления посредством ингибирования аденилатциклазы и активации фосфолипазы C (*K.M.Maslowski and C.R.Mackay, 2011; L.V.Bindels et al, 2013*). Передача сигнала через этот рецептор рассматривается как один из возможных механизмов взаимодействия макроорганизма и микробиоты, нарушение работы которого приводит к дисбалансу иммунитета и провоспалительному фенотипу (*Z.Ang and J.L.Ding, 2016*). Так, на животных моделях у мышей с нокаутом по гену, кодирующему GPR43, отмечается более тяжелое протекание экспериментальных артритов, овалбуминовой астмы и колитов в сравнении с диким типом (*K.M.Maslowski et al, 2009*).

Принимая во внимание участие микробов в жизнедеятельности организма, их широкие функциональные возможности и облигатность колонизирования, человек часто рассматривается как «суперорганизм», а микробиота как квазиорган и неотъемлемая его часть (*Б.А.Шендеров, 2015; P.Kramer, P.Bressan, 2015; D.Festi et al, 2014*).

1.3 Ось мозг-кишечник. Роль микробиоты

Одним из интересных аспектов взаимодействия организма человека и его микробного населения являются взаимоотношения бактерий с нервной системой человека, о которых предполагал еще И.И. Мечников. С начала 80-х годов двадцатого века была установлена взаимная связь между функционированием центральной нервной системой и пищеварительным трактом (*W.A.Banks, 1980; N.S.Track, 1983*). Новые данные о взаимоотношениях человека с симбиотическими

бактериями кишечника дополняют концепцию оси «мозг-кишечник».

Эволюция морфологического строения неокортекса у приматов сопровождалась и эволюцией их генома. Одним из интересных фактов касательно нее являются изменения в белок-некодирующих последовательностях, большая часть которых ответственна за синтез регуляторных РНК, используемых также и бактериями (*H.Liu et al, 2012; F.Mika and R.Hengge, 2013*). Одна из разновидностей этих молекул, длинные некодирующие РНК, по-видимому, присутствуют в основном у приматов и крайне важна для развития интеллекта и социального поведения (*G.Barry, 2014; G.Barry and J.S.Mattick, 2012; I.A.Qureshi and M.F.Mehler, 2012*). При нейродегенеративных и психических заболеваниях наряду с нарушением когнитивных, эмоциональных функций и снижением социализации происходит и изменения состава микробиоты, что может выступать диагностическим фактором, и, вероятно, одним из патогенетических (*R.Villanueva, 2013; D.K.Goyal and J.A.Miyan, 2014*). Потенциально, микробиота может оказывать влияния не только на развитие интеллекта у отдельной особи, но и возможно, сыграла свою роль в развитии социального поведения у животных (*A.J.Montiel-Castro et al, 2013; L.Desbonnet et al, 2014*).

Первое косвенное «знакомство» центральной нервной системы с микробиотой начинается еще во внутриутробном периоде. Присутствие микробиоты в организме матери является одним из факторов, способствующих формированию гематоэнцефалического барьера у плода (*N.Bien-Ly and R.J.Watts, 2014*). В эксперименте на животной модели было установлено, что при введении в плод гнотобионтной мыши антител происходило иммунное поражение его мозга, тогда как введение антител в плод мыши развивавшейся не у гнотобионтного родителя на той же неделе гестации не вызывало иммунологической агрессии (*V.Braniste et al, 2014*).

Раннее постнатальное развитие в гнотобионтных условиях также вызывало изменения в функционировании мозга у экспериментальных животных. Среди прочего, у гнотобионтов наблюдаются нарушения нейрональной пластичности (*R.Diaz Heijtz et al, 2011*), нарушения в развитии болевой чувствительности

(*F.A.Amaral et al, 2008*) и изменения в составе нейромедиаторов. Нейромедиаторный дисбаланс в виде дисфункции серотонинэргической системы гиппокампа, в свою очередь, вызывал поведенческие изменения (*G.Clarke et al, 2014*). Медиаторные изменения обнаруживаются не только в серотонинэргической системе гиппокампа, но и в гипоталамической системе – у гнотобионтных мышей повышалась концентрация адренкортикотропного гормона, снижалась экспрессия NR1, NR2A и NR2B субъединиц NMDA-рецептора, что сопровождалось чрезмерно увеличенной реакцией на стресс (*N.Sudo et al, 2004*). Следует отметить, что в обоих случаях медиаторные изменения компенсировались засеванием кишечника нормофлорой либо ее пробиотическими компонентами, тогда как введение энтеропатогенов усугубляло дефект (*N.Sudo et al, 2004; G.Clarke et al, 2014*).

Результаты других исследований также показывают возможную связь стресса и тревожности у мышей и обсеменении их бактериями: так, при колонизации кишечника показано изменение экспрессии miRNA в миндалине и префронтальной коре, участках, которые связаны с развитием стресса и тревожностью (*A.E.Hoban et al, 2017*). Однако бактериальное воздействие не ограничивается влиянием на эмоциональную сферу экспериментальных животных. Было показано, что долговременный прием препаратов лактобактерий может снижать астроцитарную реакцию, изменяя двигательную активность крыс (*G.Ushakova et al, 2008*). Казеинолитическая протеаза В *E.coli* способна вызывать эффекты сходные с меланоцитостимулирующим гормоном и влиять на пищевое поведение лабораторных животных (*J.Breton et al, 2016*).

Из всего спектра молекул, продуцируемых бактериями, достаточно много веществ обладает активностью по отношению к нервной системе. Например, отмечается способность бактерий образовывать такие низкомолекулярные соединения как NO и H₂S, участвующие в регуляции кишечной моторики, а также иммунной системы (*T.Sobko et al, 2006; R.Schicho et al, 2006*). Секретируемые бактериями короткоцепочечные жирные кислоты, в частности бутират и ацетат, способны управлять моторикой кишечника, воздействуя на нейроны и изменяя

представленность серотониновых рецепторов в кишечнике (*R.Soret, et al 2010; Y.Bhattarai et al, 2017*).

Метаболиты, используемые бактериями в процессе quorum sensing, также могут оказывать влияние на работу организм человека (*P.Boontham et al, 2008; G.Telford et al, 1998*). Кроме того, микробиота кишечника способна к продукции широкого спектра нейромедиаторов, активно используемых организмом человека. Грибы рода *Candida*, а также бактерии *Streptococcus*, *Escherichia* и *Enterococcus* способны синтезировать серотонин, *Escherichia*, *Bacillus* и дрожжи *Saccharomyces* продуцируют дофамин и норадреналин, лактобактерии способны к синтезу ацетилхолина, бифидобактерии, а также лактобактерии, выделяют гамма-аминомасляную кислоту (*М.Х.Кожиева и др., 2017; P.Holzer and A.Farzi, 2014*). При этом следует учесть, что те же нейромедиаторы, но выделяемые организмом человека, также оказывают влияние на жизнедеятельность бактерий, участвуя, наряду с иммунной системой, в контроле состава микробиоты (*А.В.Олескин и др., 2016*).

Так, катехоламины (норадреналин, адреналин, дофамин) оказывают стимулирующее влияние на рост микроорганизмов, процесс формирования биопленок, жгутиковую подвижность, адгезивность и вирулентность (*А.В.Олескин и др., 2016*). Эти эффекты отмечаются для микроорганизмов многих родов, как комменсальных бактерий родов *Escherichia*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, а также дрожжевых грибов *Saccharomyces*, так и для патогенных и условно-патогенных микробов родов *Shigella*, *Salmonella*, *Bordetella*, *Helicobacter* и *Haemophilus* (*Шпаков, 2009; Маликина и др., 2010; Анучин и др., 2008; А.В.Олескин и др., 2016*). Серотонин и гистамин вызывают стимуляцию клеточного роста и агрегации бактерий родов *Enterococcus*, *Escherichia* и *Polyangium*, а также снижают вирулентность грибов *Candida* (*Анучин и др., 2008; А.В.Олескин и др., 2016; Страховская и др., 1993*). Нейропептиды (субстанция Р, энкефалины) и аминокислота аспартат ингибируют рост кишечной палочки (*А.В.Олескин и др., 2016*).

Помимо секреции биологически активных веществ, симбиотические

микроорганизмы кишечника, по-видимому, могут воздействовать на работу нервной системы посредством стимуляции *n.vagus*; при этом эффект от воздействия исчезает после пересечения блуждающего нерва (*P.Forsythe and W.A.Kunze, 2013*). Такой эффект могут оказывать как пробиотические лактобактерии, так и патогены, например *S.typhimurium* (*P.Forsythe and W.A.Kunze, 2013*).

Столь тесная связь между работой нервной системы и жизнедеятельностью бактерий подтверждается также результатами многочисленных исследований состава микробиоты кишечника при различных заболеваниях центральной нервной системы (*X.Zhu et al, 2017*). Известно, что кишечная микробиота изменяется при психических заболеваниях, например шизофрении и аутизме (*E.Schwarz et al, 2017; R.Krajmalnik-Brown et al, 2015*), нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваниях (*Б.А.Шендеров и др., 2016; M.R.Minter et al, 2016; E.R.Volkman et al, 2017*), выше уже обсуждалась ее возможная роль в нарушении настроения. Для болезни Паркинсона наиболее очевидным сходным состоянием является болезнь Альцгеймера. Рассеянный склероз можно рассматривать наоборот, в качестве противоположного состояния

Так, при болезни Альцгеймера – наиболее распространенном нейродегенеративном заболевании, по данным *Vogt et al, 2017* наблюдается повышение содержания *Blautia, Bacteroides, Alistipes, Phascolarctobacterium, Bilophila, Gemella* в микробиоте кишечника; тогда как у пациентов контрольной группы повышалось содержание *Bifidobacterium, SMB53, Dialister, Clostridium, Turicibacter, Adlercreutzia, cc115*

При рассеянном склерозе – нейровоспалительном заболевании, по данным *Miyake et al, 2015* в микробиоте кишечника отмечается увеличение представленности бактерий родов *Faecalibacterium, Prevotella, Anaerostipes* и *Clostridium*. По данным *Jangi et al, 2016* на уровне родов у пациентов с рассеянным склерозом в кишечной микробиоте повышалось содержание *Methanobrevibacter, Akkermansia*; в группе контроля повышается представленность *Butyricimonas, Paraprevotella, Haemophilus, Slackia*. В

результате исследования Chen et al, 2016 было получено, что у пациентов с рассеянным склерозом в кишечной микробиоте увеличивалось содержание бактерий родов *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Blautia*, *Dorea*, *Mycoplana*, *Pseudomonas*; в группе контроля повышается представленность *Adlercreutzia*, *Parabacteroides*, *Coprobacillus*, *Lactobacillus*, *Haemophilus*.

Наиболее очевидной моделью взаимодействия кишечной микробиоты и организма при нервных болезнях могут послужить иммунозависимые заболевания ЦНС, такие как рассеянный склероз. По аналогии с известными заболеваниями, например ревматизмом, роль микробиоты здесь заключается в активации воспаления при наличии антигенной мимикрии с белками организма человека с имеющейся наследственной предрасположенностью.

Например, известно, что трансплантация кишечной микробиоты от пациентов с рассеянным склерозом лабораторным мышам способна вызывать у последних спонтанный аутоиммунный энцефаломиелит (*K.Berer et al, 2017*). У людей же, страдающих от рассеянного склероза, состав микробиоты меняется в сторону повышения присутствия более «провоспалительных» родов, таких как *Fusobacterium*, и снижения представленности «противовоспалительных» *Bacteroides*, *Clostridium* и *Faecalibacterium* (*E.R.Volkman et al, 2017*). Однако, для нейродегенеративных заболеваний, протекающих без выраженного воспаления, таких как болезнь Паркинсона, данная модель не является оптимальной.

1.4 Микробиота кишечника и болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона — это хроническое нейродегенеративное заболевание, поражающее дофаминергические нейроны *substantia nigra* и проявляющееся главным образом в виде моторных нарушений — ригидности, дрожания, скованности, постуральной нестабильности. Также при данном заболевании наблюдаются и немоторные проявления в виде снижения обоняния, расстройств настроения, и нарушения функционирования вегетативной нервной системы. Болезнь Паркинсона чаще всего поражает людей старшего возраста (от 50 лет) и ее распространенность достигает одного процента на популяции

шестидесятилетних. Заболеваемость составляет от 4.5 до 40 случаев на 100 000 человек в год (*K.Wirdefeldt et al, 2011*). Распространенность заболевания неоднородна и зависит от многих факторов, среди которых продолжительность жизни и наследственность, однако в среднем по планете она составляет порядка 120 случаев на 100 000 человек в год (*P.Zis et al, 2015; H.Kaufmann et al, 2004*).

В России распространенность колеблется от региона к региону и составляет 40-140 человек на 100 000 населения, что соответствует мировой распространенности недуга. Ввиду роста продолжительности жизни в развитых странах при учете того, что поражаются в основном лица старшего возраста, со временем распространенность болезни Паркинсона будет только расти и к 2030 году она может увеличиться в два раза (*O.Goetze et al, 2005*). Этиология заболевания не до конца понятна, его связывают с комплексом причин, среди которых токсические поражения нейронов, дисфункция митохондрий, микротравмы головного мозга, активация перекисного окисления липидов и окислительный стресс, также имеется наследственная предрасположенность, и существуют семейные формы болезни, в том числе и менделирующие (*R.Cacabelos, 2017*).

Материальным субстратом нейродегенерации и характерной гистологической находкой при болезни Паркинсона являются тельца Леви. Они представляют собой включения в дофаминергических нейронах, основной объем которых составляет β -складчатые структуры белка α -синуклеина (*M.G.Heckman et al, 2017*). Альфа-синуклеин это белок, кодируемый геном SNCA, и экспрессирующийся преимущественно в нервной ткани (*M.M.Pimentel et al, 2015*). В нейронах он локализуется в основном в пресинаптической зоне и составляет до одного процента от всех белков в цитозоле (*B.Butler et al, 2017*). Его функциональное назначение остается до конца не известным, однако отмечается его роль в онтогенезе и развитии нервной системы, участие в формировании нейрональной пластичности и дофамин-опосредованной нейротрансмиссии (*T.V.Tarasova et al, 2016; F.Bono et al, 2017; B.Butler et al, 2017*). Кроме дикого типа белка, имеющего размер в 140 аминокислот, существуют его сплайсинговые

варианты, отличающиеся количеством включенных экзонов (*V.La Cognata et al, 2015*). Все варианты α -синуклеина имеют различную склонность к образованию малорастворимых агрегатов, составляющих тельца Леви (*V.La Cognata et al, 2015*). Благодаря некоторому сходству механизмов возникновения заболевания и долгому продромальному периоду предполагается, что болезнь Паркинсона является прионоподобной патологией, тогда как α -синуклеин — прионовым белком (*C.M.Lema Tomé et al, 2012; N.P.Visanji et al, 2013*).

Нейродегенерация и накопление телец Леви при болезни Паркинсона происходит нелинейно: для здоровых характерна постепенная утрата нейронов черной субстанции, до пяти процентов за десятилетие, 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 или за первые три года болезни (*J.M.Fearnley and A.J.Lees, 1991; C.Gaig and E.Tolosa, 2009; C.H.Hawkes et al, 2010*). Устоявшаяся концепция об эксклюзивном поражении substantia nigra на настоящий момент претерпела серьезные изменения. Имеются данные о появлении телец Леви на ранней стадии болезни в обонятельных луковицах, ретикулярной формации и ядрах шва (*H.Braak et al, 2003*). Более того, было показано поражение периферических отделов нервной системы: нейронов сердца, слюнных желез, метасимпатической нервной системы пищеварительной системы, надпочечников и других органов (*H.Braak et al, 2006; D.S.Goldstein et al, 2000; K.Hague et al, 1997*). Однако, одним из наиболее ранних проявлений заболевания является поражение нейронов подслизистого слоя кишечника, клеток мейсснера и ауэрбахова сплетений (*H.Braak et al, 2006; С.Н.Иллариошкин и О.С. Левин, 2011*).

Агрегаты α -синуклеина зачастую выявляются у 9-17% здоровых лиц в периферической нервной системе, при этом у большей части таких людей определяются доторморные симптомы или слабовыраженные проявления паркинсонизма спустя месяцы после проведенной биопсии (*A.Minguez-Castellanos et al., 2007*). Например, распространенность запоров у пациентов с болезнью Паркинсона превышает таковую у здоровых, их тяжесть коррелирует с тяжестью

и длительностью заболевания и их относят к возможным факторам риска заболевания (*R.D.Abbott et al, 2001; A.J.Noyce et al, 2012*).

Вполне вероятно, что распространение агрегатов α -синуклеина происходит от периферии к центру и заболевание начинается с поражения нейронов желудочно-кишечного тракта, ввиду раннего характера поражения периферических отделов нервной системы (*H.Braak et al, 2003; H.Braak et al, 2004*). Более того, показана способность α -синуклеина к перемещению по нервной системе от периферических частей к головному мозгу ретроградным аксональным транспортом, в том числе по блуждающему нерву (*A.Ulusoy et al, 2013; S.Holmqvist et al, 2014; N.J.Rutherford et al, 2017*). В этой связи интересен тот факт, что чаще всего болезнь Паркинсона начинается как односторонняя патология — если источник «измененного» α -синуклеина находится в кишечнике, то более вероятно, что он первым дойдет до мозга по одному из *n.vagus*, чем одновременно сразу по двум. При этом неселективная ваготомия является фактором, снижающим риск развития болезни Паркинсона у человека (*B.Liu et al, 2017*).

Вовлечение кишечника в заболевание было отмечено еще Джеймсом Паркинсоном, первооткрывателем заболевания (*J.Parkinson, 1817*). В этой связи крайне интересна возможная роль кишечной микробиоты в формировании болезни Паркинсона. В данном случае можно предположить две различные модели взаимодействий симбиотических бактерий и организма человека. В первом случае, при поражении нервной системы кишечника происходит нарушение его работы, а именно 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, что может быть использовано в качестве возможного маркера заболевания, особенно на его ранней стадии.

С другой стороны, само изменение состава микробиоты потенциально способно запускать специфическую нейродегенерацию, характерную для болезни Паркинсона (*Б.А.Шендеров и др., 2016*). Хроническое персистирующее воспаление, которое может наблюдаться при изменении таксономического

состава микробиоты, способно запускать мисфолдинг α -синуклеина и является одним из факторов, вызывающих повышение его экспрессии (*J.A.Vizcarra et al, 2015*). Более того, сам α -синуклеин обладает антибактериальной активностью и его экспрессия растет в ответ на бактериальную нагрузку (*S.C.Park et al, 2016*). Также известно, что бактериальные инфекции способны влиять на работу митохондрий, с поражением которых также связывают развитие болезни Паркинсона (*S.Gupta et al, 2015; Y.Saint-Georges-Chaumet et al, 2015; Б.А.Шендеров, 2018*).

В рамках токсической гипотезы развития болезни Паркинсона можно также рассмотреть и роль цианобактерий, обитающих в кишечнике человека. Известно, что некоторые виды цианобактерий способны к синтезу бета-N-метиламино-L-аланина — небелковой аминокислоты, оказывающей токсическое воздействие на центральную нервную систему. Известно, что экспозиция цианотоксином потенциально способна приводить к развитию бокового амиотрофического склероза, а также болезни Паркинсона и деменции с тельцами Леви (*P.A.Cox et al, 2017*). Возможно, что обсеменение человека такими патогенными формами цианобактерий также играет роль в развитии болезни.

Вполне вероятно также смешанная модель участия микробиоты в патогенезе болезни Паркинсона — начальные изменения микробиоты в кишечнике активизируют воспаление, которое, в свою очередь приводит к росту экспрессии и мисфолдингу α -синуклеина. Агрегаты белка накапливаются в нейронах кишечника, вызывая их поражение вследствие нейродегенерации. А нейродегенерация приводит к нарушению физиологии кишки: снижению моторики, трофики, дисбалансу местного иммунитета, что еще больше усиливает сдвиг в таксономической композиции микробных сообществ. Более сложные условия обитания для бактерий, как уже отмечалось ранее, могут способствовать появлению экологического преимущества у условно-патогенных и провоспалительных микроорганизмов, что еще больше усиливает воспаление и процессы нейродегенерации. Данный процесс в итоге приводит к формированию патогенетического круга, в котором каждый предыдущий этап усиливает

проявления последующего, а они, в свою очередь, утяжеляют ранние этапы.

Разрушенные при болезни Паркинсона нервные клетки восстановить невозможно; введение стволовых клеток в зону поражения дает лишь временный эффект, по этой причине основная тактика лечения больных заключается в ранней диагностике заболевания (особенно на тех этапах, когда большая часть дофаминпродцирующих нейронов еще цела), торможении нейродегенерации и замещении имеющегося неврологического и медиаторного дефекта. Таким образом, исследование микробиоты кишечника у пациентов с болезнью Паркинсона является актуальной задачей, решение которой позволит получить новую информации об этиологии данного заболевания, его патогенезе, а также предложить более рациональную тактику по ранней диагностике, лечению и прогнозированию состояния пациентов, улучшив, тем самым, их качество жизни и снизив общие экономические потери общества.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

В исследование были включены 93 пациента с болезнью Паркинсона (экспериментальная группа), 66 пациентов группы здорового контроля (контрольная группа), а также 33 пациента с иными неврологическими заболеваниями (группа сравнения).

Медиана возраста пациентов в экспериментальной группе составила 69 [64; 76] лет. Критериями включения пациентов в экспериментальную группу послужили:

- 1) Возраст от 18 до 88 лет;
- 2) Документально подтверждённый диагноз болезнь Паркинсона, выставленный в соответствие с международными клинико-диагностическими критериями Банка головного мозга общества болезни Паркинсона Великобритании;
- 3) Наличие подписанной формы информированного согласия на участие в данном исследовании.

Критерии исключения из исследования:

- 1) Отсутствие информированного согласия;
- 2) Женщины в состоянии беременности и лактации;
- 3) Наличие любого онкологического заболевания;
- 4) Больные с тяжелой сопутствующей патологией в стадии декомпенсации, которая, по мнению исследователя, может повлиять на результаты исследования;
- 5) Неспособность пациента следовать устным и письменным инструкциям;
- 6) Наличие симптомов острого кишечного расстройства на момент визита;
- 7) Курсы антибактериальной терапии любой длительности в течение последних 4 недель до момента включения;
- 9) Отказ пациента от участия в исследовании;
- 10) Наличие любого иного дегенеративного либо воспалительного заболевания нервной системы.

Медиана возраста пациентов в контрольной группе составила 52 [40; 62]

года.

Критериями включения пациентов в контрольную группу послужили:

- 1) Возраст от 18 до 88 лет;
- 2) Отсутствие у пациентов любых нейродегенеративных и воспалительных заболеваний нервной системы;
- 3) Наличие подписанной формы информированного согласия на участие в данном исследовании.

Критерии исключения из исследования:

- 1) Отсутствие информированного согласия;
- 2) Женщины в состоянии беременности и лактации;
- 3) Наличие любого онкологического заболевания;
- 4) Больные с тяжелой сопутствующей патологией в стадии декомпенсации, которая, по мнению исследователя, может повлиять на результаты исследования;
- 5) Неспособность пациента следовать устным и письменным инструкциям;
- 6) Наличие симптомов острого кишечного расстройства на момент визита;
- 7) Курсы антибактериальной терапии любой длительности в течение последних 4 недель до момента включения;
- 9) Отказ пациента от участия в 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:

- 1) Возраст от 18 до 88 лет;
- 2) Наличие любого дегенеративного либо воспалительного заболевания нервной системы, за исключением болезни Паркинсона;
- 3) Наличие подписанной формы информированного согласия на участие в данном исследовании.

Критерии исключения из исследования:

- 1) Отсутствие информированного согласия;
- 2) Женщины в состоянии беременности и лактации;
- 3) Наличие любого онкологического заболевания;
- 4) Больные с тяжелой сопутствующей патологией в стадии декомпенсации, которая, по мнению исследователя, может повлиять на результаты исследования;
- 5) Неспособность пациента следовать устным и письменным инструкциям;
- 6) Наличие симптомов острого кишечного расстройства на момент визита;
- 7) Курсы антибактериальной терапии любой длительности в течение последних 4 недель до момента включения;
- 9) Отказ пациента от участия в исследовании.

Всем пациентам проводилось клиническое обследование и неврологический осмотр. У каждого пациента был собран биоматериал — кал. Биоматериал замораживался до -20 C и в течение двух часов доставлялся в лабораторию, где хранился до востребования при температуре -80 C .

Ввиду наличия различий между группами пациентов по возрасту, проводилась оценка общего вклада возраста в вариабельность состава микробиома кишечника при помощи непараметрического дисперсионного анализа. Отмечено, что возраст вносит вклад в вариабельность состава кишечной микробиоты ($R^2 = 0,02$; $p = 0,01$), поэтому при проведении статистических тестов возраст включался в качестве ковариаты.

2.2 Методы исследования.

2.2.1 Молекулярно-биологические методы.

В данной работе использовались такие молекулярно-генетические методы как выделение тотальной бактериальной ДНК и ампликонное секвенирование по маркерному фрагменту V3-V4 бактериального гена 16S рРНК.

2.2.1.1 Выделение тотальной бактериальной ДНК.

Основной трудностью при выделении метагеномной ДНК является

обеспечение полноценного разрушения бактериальных клеток, содержащихся в субстрате. Для успешного лизирования бактерий была использована методика, заключающаяся в температурной и механической обработке проб в многокомпонентном лизирующем буфере, разрушающим клеточные мембраны и комплексы нуклеиновых кислот с белками, с последующим спиртовым осаждением ДНК в присутствии хаотропных солей.

Для этого к каждому образцу фекалий добавляли два типа бусин silica-zir (BioSpec Products, США) диаметром 0,1 мм и 0,5 мм, а также лизирующий буфер (500 mM NaCl, 500 mM TrisHCl pH=8, 50 mM EDTA, 4% SDS). Полученную смесь вортиксировали до однородного состояния, а затем гомогенизировали в течение 3х минут с помощью бисерной мельницы miniBeadBeater (BioSpec Products, США). Затем гомогенат инкубировали при 70 градусах в течение 15 минут, а затем центрифугировали при 14000 rpm 20 минут. После центрифугирования супернатант отбирали в новую пробирку. К полученному осадку добавляли лизирующий буфер и вортиксировали осадок до однородного состояния, после чего его повторно гомогенизировали с помощью бисерной мельницы в течение 3х минут. Гомогенат также инкубировали при 70 градусах в течение 15 минут, а затем центрифугировали при 14000 rpm 15 минут. После центрифугирования супернатант отбирали в новую пробирку. К двум полученным фракциям отобранного супернатанта добавляли 2 объема 96%-ого этанола и 1/10 объема ацетата натрия 3М, после чего полученную смесь инкубировали при -20 градусах не менее 1 часа. Затем проводили двойную отмывку осадка 80%-ым этанолом. Осадок высушивали при комнатной температуре в течение 40 минут. Осадок, полученный из каждого образца ресуспендировали в 400 мкл TE-буфера, после чего образцы инкубировали при 37 градусах в течение 30 минут. Далее проводили центрифугирование образцов при 14 000 rpm 15 минут, супернатант отбирали в новую пробирку. К каждому образцу добавляли 1 мкл РНКазы (5 мг/мкл) и инкубировали с ней при 37 градусах в течение 1 часа. Далее образцы ДНК направляли на секвенирование.

2.2.1.2 Ампликонное секвенирование микробиоты.

Ампликонное секвенирование микробиоты по маркерному фрагменту V3-V4 гена бактериальной 16S рРНК осуществляли согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part #15044223 Rev. B), рекомендованному Illumina для секвенатора MiSeq.

Образцы тотальной бактериальной ДНК, ранее выделенной из биоматериала пациентов, разводили в 500 раз. Первый раунд амплификации переменных участков V3-V4 гена 16S рРНК осуществляли с использованием специфических праймеров:

1)TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

2)GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

на амплификаторе DNA Engine Tetrad® 2, Bio Rad по следующей программе:

95°C 3 минуты

25 циклов: 95°C 30 секунд

55°C 30 секунд

72°C 30 секунд

72°C 5 минут

Охлаждение 4°C

Очистка полученных ПЦР-продуктов проводилась с использованием бусин Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем.

Второй раунд амплификации для двойного индексирования образцов осуществляли с использованием двух комбинаций специфических праймеров, по следующей программе:

95°C 3 минуты

8 циклов: 95°C 30 секунд

55°C 30 секунд

72°C 30 секунд

72°C 5 минут

Охлаждение 4°C

Очистка полученных ПЦР-продуктов также проводилась с использованием бусин Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем.

Концентрацию полученных библиотек ампликонов фрагмента V3-V4 гена бактериальной 16S рНК определяли при помощи набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit на флуориметре Qubit® (Invitrogen, США) Очищенные ампликоны смешивали эквимолярно в соответствии с полученными концентрациями. Качество приготовленной для секвенса библиотеки оценивали на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent) с использованием набора Agilent DNA 1000 Kit.

Дальнейшая подготовка образца к секвенированию и секвенирование образца осуществляли с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов) и прибора MiSeq (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя.

2.2.2 Биоинформатические методы: Таксономический анализ микробиоты

Таксономический анализ прочтений секвенатора осуществлялся с использованием программного обеспечения QIIME 1.9.1 (*J.G. Caporaso et al, 2010*). В анализ брались прямые прочтения с прибора. На первом этапе прочтения в формате .fastq перекодировались в отдельные файлы в формате .fna, содержащие информацию о понуклеотидной последовательности прочтения, и .qual, содержащие информацию о качестве каждой буквы в прочтении в виде баллов Phred (*P.Richterich, 1998*). Далее полученные файлы прочтений фильтровались по качеству: удалялись буквы с баллом Phred менее 19 (точность определения нуклеотида 99% и более). Все прочтения с итоговой длиной менее 120 пар оснований в анализ не включали.

Для определения таксономического положения прочтений была использована стратегия, заключающаяся в сравнении прочтений с набором референсных (шаблонных) последовательностей. В качестве референсной базы данных использовалась база GreenGenes версии 13.5 (*T.Z. DeSantis et al, 2006*).

Непосредственно подбор прочтений осуществлялся с использованием алгоритма *uclust_ref* (*R.C.Edgar, 2010*). Принцип действия данного алгоритма заключается в создании кластеров из прочтений на основе структурного сходства (сходства понуклеотидного состава) с последовательностями, приведенными в базе данных GreenGenes. Затем из всех прочтений выбирается одна последовательность — представитель класса. В данном случае в качестве представителя класса выбирали наиболее частое прочтение из кластера. Из представителей класса составляли перечень прочтений, при этом, в перечне за количество прочтений данного представителя принималось число прочтений, входящих в данный кластер.

На следующем этапе осуществляли определение таксономического положения для выбранного перечня прочтений, то есть определяли каждому из прочтений соответствующую операционную таксономическую единицу, описывающую его принадлежность на максимально возможную глубину, от царства вплоть до вида. Для этого использовался алгоритм *RDP classifier*, в основе которого лежит использование наивного байесовского классификатора и две базы данных GreenGenes и *HiTdb* (*Q.Wang et al, 2007; J.Ritari et al, 2015*). Результат, полученный с использованием GreenGenes, использовался для статистической обработки и при поиске таксономических различий, поскольку данная база является стандартной и позволяет проводить сравнение результатов между различными исследованиями. База данных *HiTdb* применялась с целью получения метагеномных профилей микробиоты для машинного обучения, так как давала лучшее качество предсказательных моделей. После определения таксономического положения прочтений метагеномные профили перекодировались в формат *.biom* для дальнейшей работы (*D.McDonald et al, 2012*).

2.2.3 Статистические методы.

2.2.3.1 Расчет индексов таксономического разнообразия.

Расчет индексов разнообразия проводился с использованием программного обеспечения *QIIME 1.9.1*.

Для расчета α -разнообразия на первом этапе устраняли погрешность, связанную с неравномерностью глубины секвенирования при помощи прореживания образцов до уровня образца с наименьшим допустимым количеством операционных таксономических единиц. Прореживание заключается в случайном отборе операционных таксономических единиц бактерий из данного образца до того момента, пока их количество не достигнет выбранного порога.

После прореживания рассчитывались кривые α -разнообразия. Для расчёта кривых из каждого образца брались десять случайных подвыборок с возрастающим количеством операционных таксономических единиц. Для каждой подвыборки рассчитывали индексы α -разнообразия Шеннона, observed otus и PD whole tree, средние значения индексов отмечали на графике и соединяли прямыми линиями. Итоговые значения α -разнообразия оценивали по финальной точке, сравнение проводили с использованием непараметрического t-теста при 9999 перестановках. Различия считали значимыми при значении $p < 0.05$.

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 с использованием специализированной метрики weighted Unifrac, учитывающей при расчете дистанции между образцами таксономическое положение операционных таксономических единиц (*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 (ANalysis Of SIMilarity, рус. анализ общности) и непараметрический дисперсионный анализ (алгоритм Adonis) с оценкой значимости при 9999 перестановках. Различия считали значимыми при значении $p < 0.05$.

2.2.3.2 Корреляционный анализ.

Для оценки корреляционных связей между микроорганизмами, входящими в состав микробиотического сообщества, применялся пакет CoNet (*K.Faust et al,*

2012) программного обеспечения CytoScape (*P.Shannon et al, 2003*). Для всех возможных пар микроорганизмов в каждой группе (экспериментальной и контрольной) отдельно и для всех групп в совокупности рассчитывали корреляцию по методу Спирмена. Затем для всех пар микроорганизмов, соответствующих условиям: ρ Спирмена > 0.5 (по модулю) и $p < 0.05$, составляли граф, вершинами которого являлись микроорганизмы, а ребрами корреляционные связи. Для каждого графа, рассчитывали значения коэффициента кластеризации, диаметр и радиус сети, среднее количество соседей, центральность по посредничеству и плотность с использованием встроенных алгоритмов программного обеспечения CytoScape.

2.2.3.3 Сравнительный анализ представленности операционных таксономических единиц бактерий и реконструкция метаболических путей.

Статистический анализ проводился с использованием языка программирования R (*R Core Team, 2016*). С учетом имеющихся различий по возрасту между группами пациентов, статистический анализ проводили с учетом влияния возраста на состав микробиоты.

Значения представленности операционных таксономических единиц нормализовали по алгоритму CSS, затем агрегировали по таксономическим уровням (семейство, род, вид). Для поиска различий использовалась модель *fitZig* пакета *metagenomeSeq* (*J.N.Paulson et al, 2013*) с добавлением ковариаты «возраст». Принцип действия алгоритма *fitZig* основан на применении линейного регрессионного анализа; алгоритм скорректирован для работы с метагеномными данными. При проверке статистических гипотез уровень альфа составил 0,05. Различия считали значимыми при значении $p < 0,05$ после применения поправки на множественные сравнения по методу Бенджамини-Хохберга. Из-за особенностей метагеномных данных — большого количества нулевых значений, медиану применять нерационально (для большинства наблюдений значение медианы составит нуль), поэтому для представления данных использовалось среднее \pm стандартное отклонение.

Метаболическая реконструкция функционального состава микробиоты относительно путей синтеза витаминов и короткоцепочечных жирных кислот проводилась с использованием сервиса [knomics/biota](https://biota.knomics.ru/) (электронный доступ: <https://biota.knomics.ru/>).

Визуализация, в том числе создание графиков и тепловых карт, выполнялась с использованием пакета *ggplot2* (H. Wickham, 2010) языка R, визуализация корреляционных сетей выполнялась с использованием CytoScape, кривые α -разнообразия были построены с использованием встроенных средств программного обеспечения QIIME.

2.2.4 Методы машинного обучения.

Для разработки прогностической модели, позволяющей проводить предсказание о наличии болезни Паркинсона на основе таксономического состава микробиоты кишечника, использовались методы обучения по прецедентам. Обучение проходило в три этапа: отбор наиболее значимых признаков, обучение моделей, проверка моделей на валидационной выборке. Для более успешного создания прогностической модели образцы контрольной группы и группы сравнения объединяли в одну группу, таким образом, полученный алгоритм должен успешно определять имеется ли у человека болезнь Паркинсона либо нет.

2.2.4.1 Отбор наиболее значимых признаков

Для успешного создания прогностической модели необходимо отобрать наиболее дискриминирующие признаки, то есть те признаки, по которым различия между группами максимальны.

Отбор наиболее значимых признаков проводился в пакете *caret* (M. Kuhn, 2008) языка программирования R с использованием алгоритма RFE (Recursive Feature Elimination рус., рекурсивное исключение переменных). Значимые признаки использовались в обучении классифицирующих моделей.

2.2.4.2 Обучение классифицирующих моделей

Обучение моделей проводилось с использованием пакета caret языка R. В качестве вариантов классифицирующих моделей рассматривали следующие варианты:

- 1) Обобщенная линейная модель;
- 2) Метод частичных наименьших квадратов;
- 3) Наивный байесовский классификатор;
- 4) Искусственная нейронная сеть с сигмоидной активационной функцией;
- 5) Машина опорных векторов с применением радиальной базисной функции.

Перед обучением данные центрировали и шкалировали. Центрирование заключается в вычитании среднего арифметического из значения представленности бактерии у каждого пациента, а шкалирование состоит в делении полученного результата на стандартное отклонение. Для контроля качества обучения использовались параметры точность (число верных предсказаний, деленное на общее число предсказаний) и каппа Коэна (оценка согласованности классификации).

Для создания качественных предсказательных моделей необходимо исключить контроль переобучения алгоритмов классификации на данных, не используемых в процессе обучения. С этой целью всю выборку разбили на две части: 147 образцов, составивших обучающую выборку, использовали для обучения моделей, а 47 образцов (25% от общей выборки) составили валидационную выборку, использовавшуюся для проверки качества получаемых моделей. Образцы, входящие в состав той или иной выборки отбирались случайно, пациенты экспериментальной и объединенной контрольной группы присутствовали в обучающей и валидационной выборке в одинаковых пропорциях. При проведении обучения использовалась 10-кратная кросс-валидация — обучающая выборка также разбивалась на две части: промежуточную обучающую и промежуточную валидационную, обучение моделей с оценкой точности и каппы Коэна проводилось на каждом этапе.

2.2.4.3 Валидация моделей

После проведения обучения все модели проходили валидацию на валидационной выборке, которая заключалась в прогоне моделей на данных, не использованных при их обучении. При валидации рассчитывали точность классификации, чувствительность (частное от истинно положительных результатов и общего числа предсказаний), специфичность (частное от истинно отрицательных результатов и общего числа предсказаний) и каппу Коэна. Оптимальной признавали модель с наиболее высокими измеренными показателями.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Таксономическая композиция кишечной микробиоты у пациентов разных групп

3.1.1 Обобщенные результаты секвенирования

В рамках исследования были просеквенированы 192 образца микробиоты кишечника от 192 человек. В результате секвенирования было получено всего 8107881 операционных таксономических единиц (далее ОТЕ) бактерий и археев, принадлежащих к 13102 разновидностям. Минимальное содержание ОТЕ в образце составило 1815 штук на образец, максимальное содержание — 162099 штук на образец. Медиана представленности ОТЕ в образце составила 39728.5 штук на образец, среднее количество ОТЕ в образце 41793.201 ± 30367.207 . Фракция ненулевых значений ОТЕ составила 0.09.

3.1.2 Состав микробиоты кишечника на разных таксономических уровнях

На уровне типов (рис. 1) наиболее представленными таксонами в микробиоте кишечника у пациентов контрольной группы оказались Firmicutes ($80.2 \pm 5.9\%$ от состава метагенома), Bacteroides ($12.4 \pm 5.8\%$ от состава метагенома), Actinobacteria ($3.7 \pm 1.6\%$ от состава метагенома) и Proteobacteria ($2.6 \pm 1.9\%$ от состава метагенома). У пациентов, как с болезнью Паркинсона, так и с другими неврологическими заболеваниями на уровне типов таксономический состав микробиоты оказался схожим с лицами контрольной группы. Так, в микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона наиболее представлены типы Firmicutes ($80.9 \pm 5.8\%$ от метагенома), Bacteroides ($10.1 \pm 4.1\%$ от состава метагенома), Actinobacteria ($3.9 \pm 1.5\%$ от состава метагенома) и Proteobacteria ($3.6 \pm 2.5\%$ от состава метагенома). В микробиоте пациентов с идиопатической семейной дистонией наиболее представлены типы Firmicutes ($85.5 \pm 3.3\%$ от состава метагенома), Bacteroides ($6.7 \pm 1.8\%$ от состава метагенома), Actinobacteria ($3.8 \pm 0.9\%$ от состава метагенома) и Proteobacteria ($2.5 \pm 1.4\%$ от состава метагенома). В микробиоте пациентов с эссенциальным тремором наиболее

представлены типы Firmicutes ($80.6 \pm 5.8\%$ от состава метагенома), Bacteroides ($11.4 \pm 4.2\%$ от состава метагенома), Actinobacteria ($3.7 \pm 1.1\%$ от состава метагенома) и Proteobacteria ($3.1 \pm 2.8\%$ от состава метагенома). В микробиоте пациентов с рассеянным склерозом наиболее представлены типы Firmicutes ($80.4 \pm 3.6\%$ от состава метагенома), Bacteroides ($10.3 \pm 4.1\%$ от состава метагенома), Actinobacteria ($4.4 \pm 1.6\%$ от состава метагенома) и Proteobacteria ($3.6 \pm 2.3\%$ от состава метагенома).

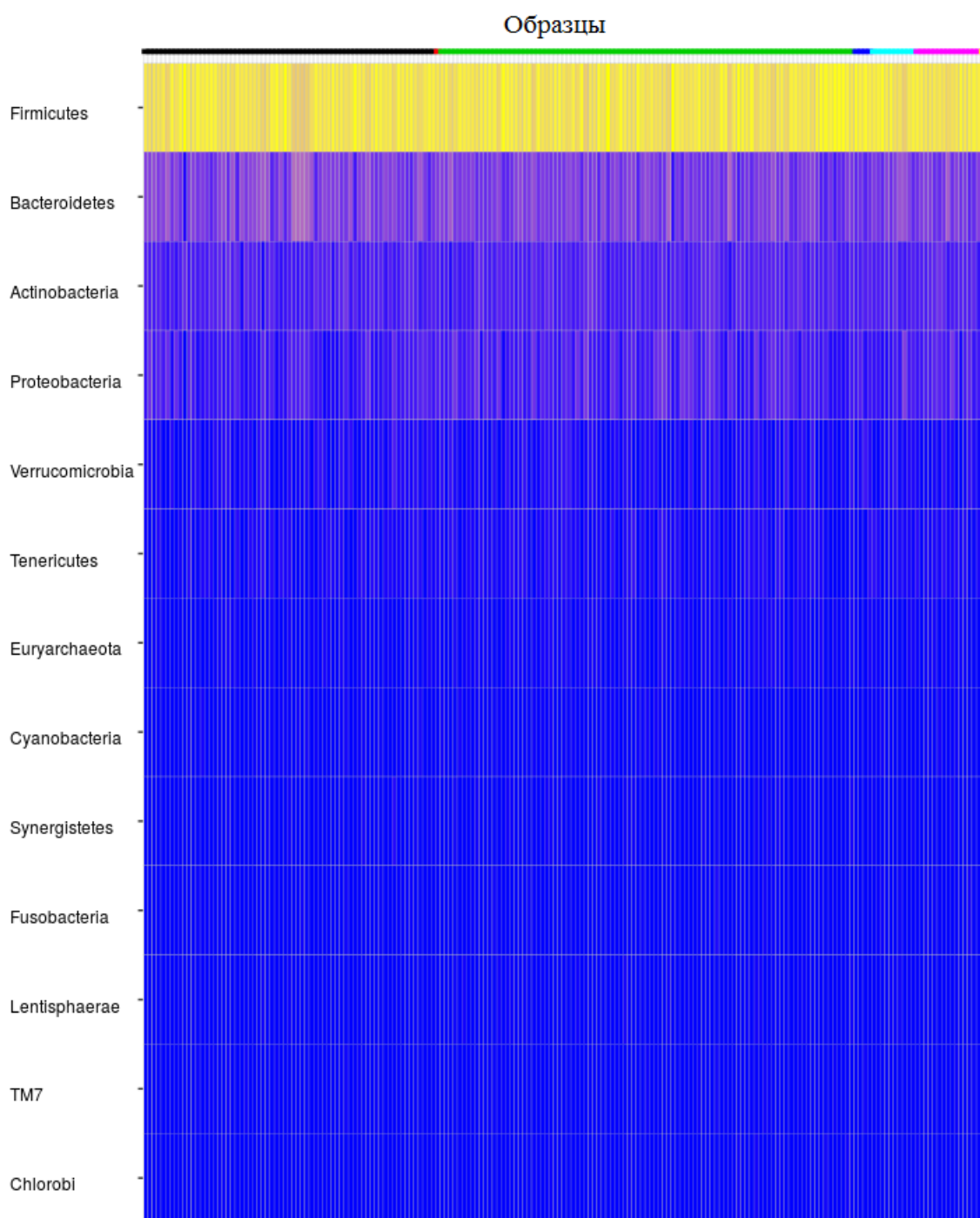


Рисунок 1 – тепловая карта представленности типов микроорганизмов в составе микробиоты кишечника.

Синий цвет соответствует более низкой представленности типа, желтый цвет – более высокой. Черной полосой обозначены лица группы контроля, красной полосой – пациент с деменцией с тельцами Леви, зеленой полосой – лица с болезнью Паркинсона, синей полосой – лица с идиопатической семейной дистонией, голубой полосой – пациенты с диагнозом эссенциальный тремор, малиновой полосой – лица с диагнозом рассеянный склероз, желтой полосой – пациент с диагнозом множественная системная атрофия, серой полосой – пациент с диагнозом острый рассеянный энцефаломиелит. Данные логарифмированы по основанию 2.

На уровне классов (рис. 2) у лиц контрольной группы в микробиоте преобладали Clostridia (75.1±6.7% от состава метагенома), Bacteroidia (12.4±5.8% от состава метагенома), Bacilli (2.9±3.2% от состава метагенома), Erysipelotrichi (2.2±1% от состава метагенома), Coriobacteriia (2.2±0.9% от состава метагенома) и Gammaproteobacteria (1.8±1.7% от состава метагенома). У пациентов с болезнью Паркинсона наиболее распространенными в микробиоте были Clostridia (75.9±6.3% от состава метагенома), Bacteroidia (10.2±4.1% от состава метагенома), Bacilli (2.9±1.6% от состава метагенома), Gammaproteobacteria (2.8±2.4% от состава метагенома), Coriobacteriia (2.3±1.0% от состава метагенома) и Erysipelotrichi (2.0±0.8% от состава метагенома). В микробиоте пациентов с идиопатической семейной дистонией наиболее распространенными классами были Clostridia (77.6±3.7% от состава метагенома), Bacteroidia (6.7±1.8% от состава метагенома), Bacilli (6.2±4.4% от состава метагенома), Coriobacteriia (2.2±0.6% от состава метагенома), Gammaproteobacteria (2.1±1.4% от состава метагенома) и Erysipelotrichi (1.7±0.3% от состава метагенома). В микробиоте пациентов с эссенциальным тремором преобладали Clostridia (75.8±5.9% от состава метагенома), Bacteroidia (17.4±4.2% от состава метагенома), Bacilli (2.9±2.9% от состава метагенома), Gammaproteobacteria (2.2±2.9% от состава метагенома), Coriobacteriia (2.0±0.8% от состава метагенома) и Erysipelotrichi (1.9±0.7% от состава метагенома). У пациентов с рассеянным склерозом в составе кишечной микробиоты наиболее представлены классы Clostridia (73.8±3.5% от состава метагенома), Bacteroidia (10.3±4.1% от состава метагенома), Bacilli (4.1±2.1% от состава метагенома), Gammaproteobacteria (2.7±2.2% от состава метагенома), Erysipelotrichi (2.5±1.3% от состава метагенома) и Coriobacteriia (2.4±0.9% от состава метагенома).

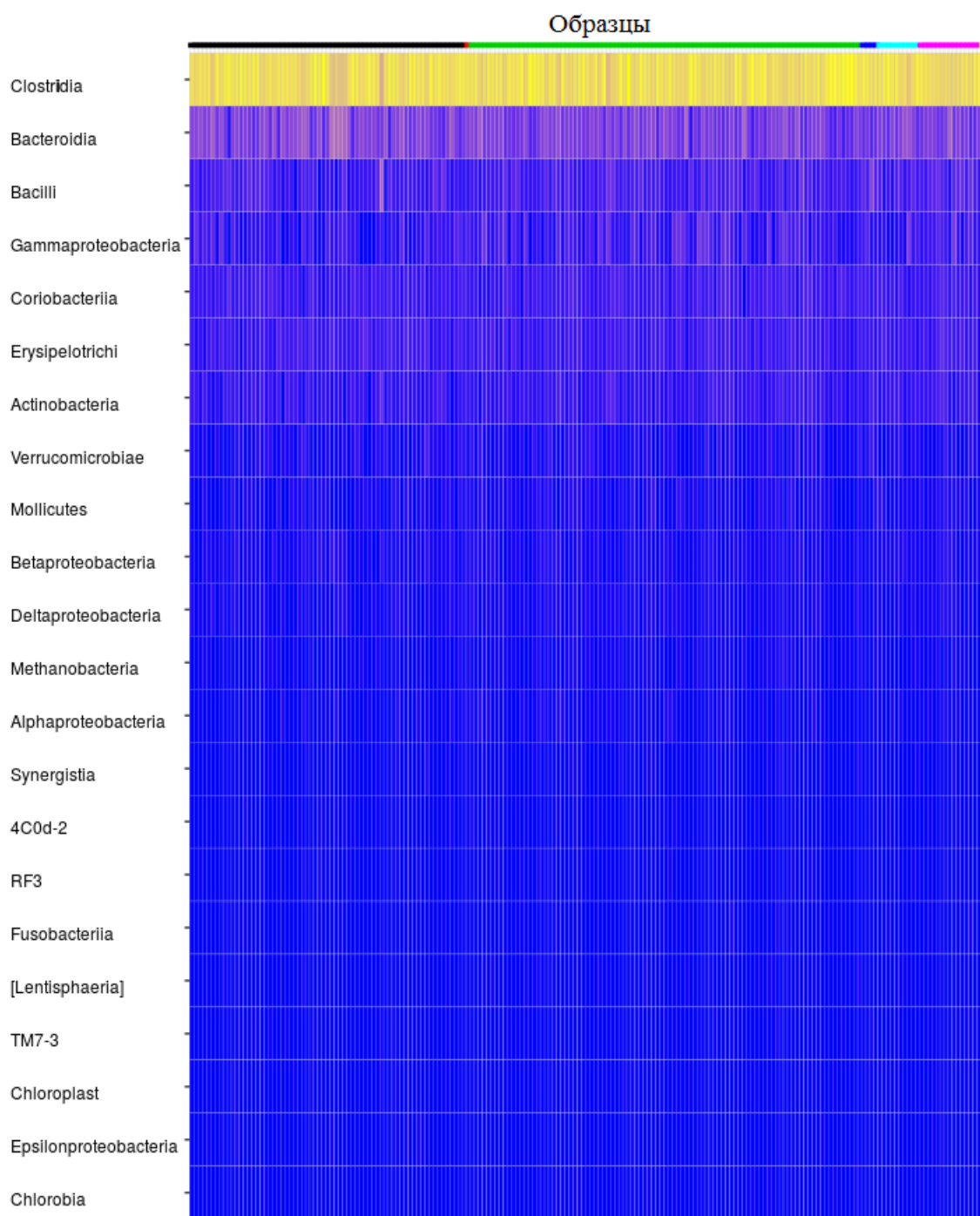


Рисунок 2 – тепловая карта представленности классов микроорганизмов в составе микробиоты кишечника.

Синий цвет соответствует более низкой представленности типа, желтый цвет – более высокой. Черной полосой обозначены лица группы контроля, красной полосой – пациент с деменцией с тельцами Леви, зеленой полосой – лица с болезнью Паркинсона, синей полосой – лица с идиопатической семейной дистонией, голубой полосой – пациенты с диагнозом эссенциальный тремор, малиновой полосой – лица с диагнозом рассеянный склероз, желтой полосой – пациент с диагнозом множественная системная атрофия, серой полосой – пациент с диагнозом острый рассеянный энцефаломиелит. Данные логарифмированы по основанию 2.

На уровне отрядов (рис. 3) у лиц контрольной группы в составе кишечной микробиоты были наиболее распространены Clostridiales (75.1±6.7% от состава метагенома), Bacteroidales (12.4±5.8% от состава метагенома), Lactobacillales (2.7±3.0% от состава метагенома), Erysipelotrichales (2.2±1.0% от состава метагенома), Coriobacteriales (2.2±0.9% от состава метагенома) и Enterobacteriales (1.6±1.7% от состава метагенома). У пациентов с болезнью Паркинсона в микробиоте кишечника наиболее представлены отряды Clostridiales (75.9±6.3% от состава метагенома), Bacteroidales (10.2±4.1% от состава метагенома), Lactobacillales (2.6±1.6% от состава метагенома), Enterobacteriales (2.5±2.4% от состава метагенома), Coriobacteriales (2.3±1.0% от состава метагенома) и Erysipelotrichales (2.0±0.8% от состава метагенома). В микробиоте пациентов с идиопатической семейной дистонией отмечалось высокое содержание отрядов Clostridiales (77.7±3.6% от состава метагенома), Bacteroidales (6.7±1.8% от состава метагенома), Lactobacillales (5.8±4.5% от состава метагенома), Coriobacteriales (2.2±0.6% от состава метагенома), Enterobacteriales (1.9±1.5% от состава метагенома) и Erysipelotrichales (1.7±0.3% от состава метагенома). У пациентов с диагнозом эссенциальный тремор в составе кишечной микробиоты наблюдалось высокое содержание бактерий отрядов Clostridiales (75.8±5.9% от состава метагенома), Bacteroidales (11.4±4.1% от состава метагенома), Lactobacillales (2.6±2.9% от состава метагенома), Coriobacteriales (2.0±0.8% от состава метагенома), Erysipelotrichales (1.9±0.7% от состава метагенома) и Enterobacteriales (1.9±2.9% от состава метагенома). Микробиота пациентов с рассеянным склерозом на уровне отрядов характеризовалась высокой представленностью Clostridiales (73.8±3.5% от состава метагенома), Bacteroidales (10.3±4.1% от состава метагенома), Lactobacillales (3.8±2.2% от состава метагенома), Erysipelotrichales (2.5±1.3% от состава метагенома), Coriobacteriales (2.4±0.9% от состава метагенома) и Enterobacteriales (2.3±2.1% от состава метагенома).

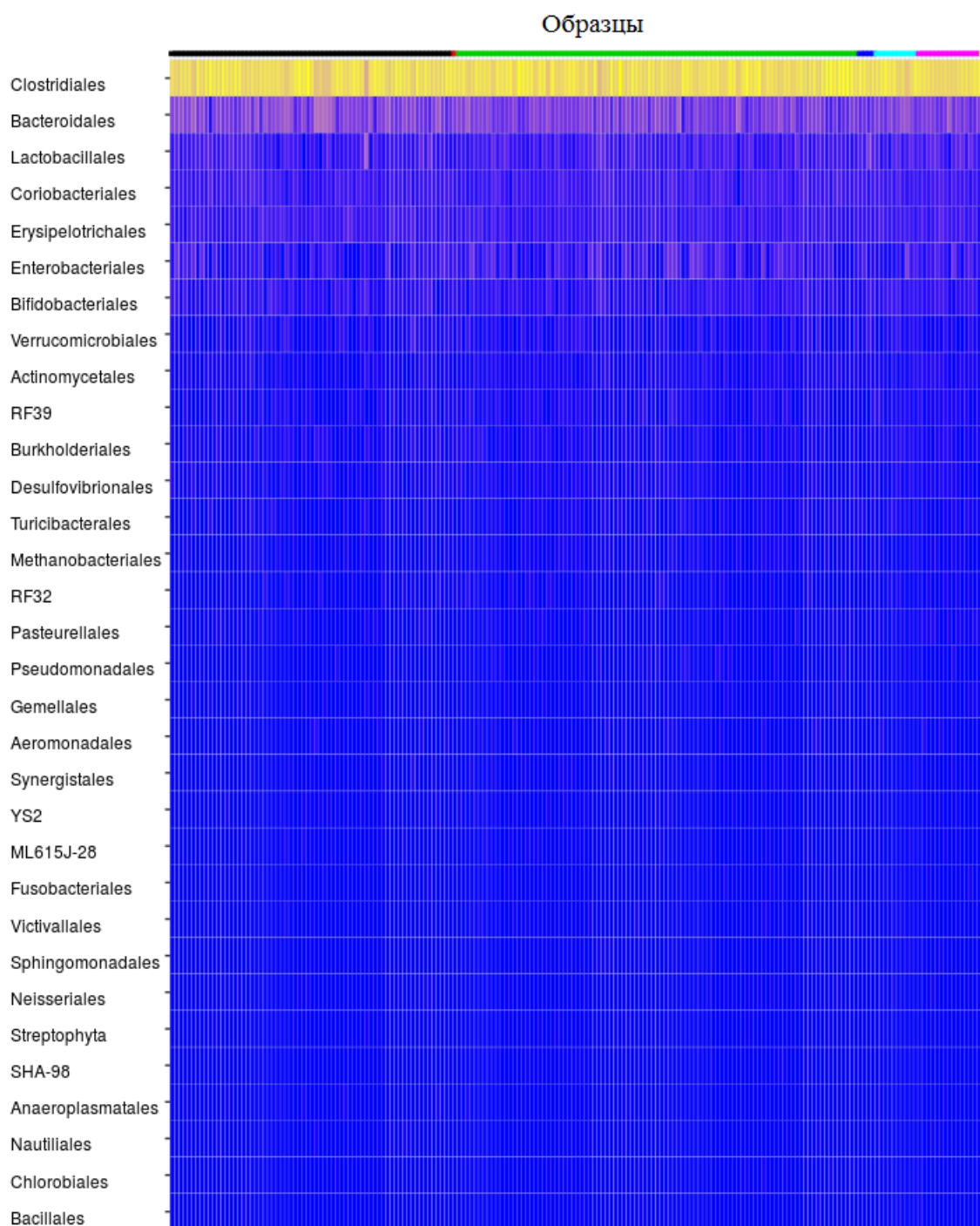


Рисунок 3 – тепловая карта представленности отрядов микроорганизмов в составе микробиоты кишечника.

Синий цвет соответствует более низкой представленности типа, желтый цвет – более высокой. Черной полосой обозначены лица группы контроля, красной полосой – пациент с деменцией с тельцами Леви, зеленой полосой – лица с болезнью Паркинсона, синей полосой – лица с идиопатической семейной дистонией, голубой полосой – пациенты с диагнозом эссенциальный тремор, малиновой полосой – лица с диагнозом рассеянный склероз, желтой полосой – пациент с диагнозом множественная системная атрофия, серой полосой – пациент с диагнозом острый рассеянный энцефаломиелит. Данные логарифмированы по основанию 2.

На уровне семейств (рис. 4) наибольшей представленностью характеризовались бактерии Lachnospiraceae ($37.8 \pm 8.7\%$ от состава метагенома), Ruminocossaceae ($25.7 \pm 5.5\%$ от состава метагенома), Bacteroidaceae ($6.3 \pm 3.7\%$ от состава метагенома), Clostridiaceae ($3.1 \pm 2.9\%$ от состава метагенома), Christensenellaceae ($2.9 \pm 2.0\%$ от состава метагенома) и Coriobacteriaceae ($2.3 \pm 0.9\%$ от состава метагенома). В микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона также преобладали бактерии семейств Lachnospiraceae ($36.8 \pm 10.4\%$ от состава метагенома), Ruminocossaceae ($27.9 \pm 5.4\%$ от состава метагенома), Bacteroidaceae ($5.5 \pm 2.7\%$ от состава метагенома), Clostridiaceae ($3.6 \pm 2.5\%$ от состава метагенома), Christensenellaceae ($3.6 \pm 2.5\%$ от состава метагенома) и Coriobacteriaceae ($2.4 \pm 1.1\%$ от состава метагенома). У пациентов с идиопатической семейной дистонией были наиболее распространены бактерии семейств Lachnospiraceae ($42.2 \pm 13.4\%$ от состава метагенома), Ruminocossaceae ($24.5 \pm 13.8\%$ от состава метагенома), Clostridiaceae ($4.6 \pm 2.0\%$ от состава метагенома), Bacteroidaceae ($4.1 \pm 1.7\%$ от состава метагенома), Christensenellaceae ($2.7 \pm 2.3\%$ от состава метагенома) и Coriobacteriaceae ($2.3 \pm 0.7\%$ от состава метагенома). В микробиоте пациентов с эссенциальным тремором были наиболее представлены семейства Lachnospiraceae ($36.4 \pm 7.9\%$ от состава метагенома), Ruminocossaceae ($28.3 \pm 7.5\%$ от состава метагенома), Bacteroidaceae ($5.5 \pm 2.9\%$ от состава метагенома), Clostridiaceae ($3.6 \pm 1.6\%$ от состава метагенома), Christensenellaceae ($3.3 \pm 2.0\%$ от состава метагенома) и Coriobacteriaceae ($2.2 \pm 0.9\%$ от состава метагенома). В микробиоте пациентов с рассеянным склерозом содержание бактерий семейств Lachnospiraceae ($34.9 \pm 7.5\%$ от состава метагенома), Ruminocossaceae ($27.5 \pm 5.8\%$ от состава метагенома), Bacteroidaceae ($5.3 \pm 3.9\%$ от состава метагенома), Clostridiaceae ($3.4 \pm 2.3\%$ от состава метагенома), Christensenellaceae ($2.9 \pm 2.3\%$ от состава метагенома) и Coriobacteriaceae ($2.5 \pm 0.9\%$ от состава метагенома) было наиболее высоким.

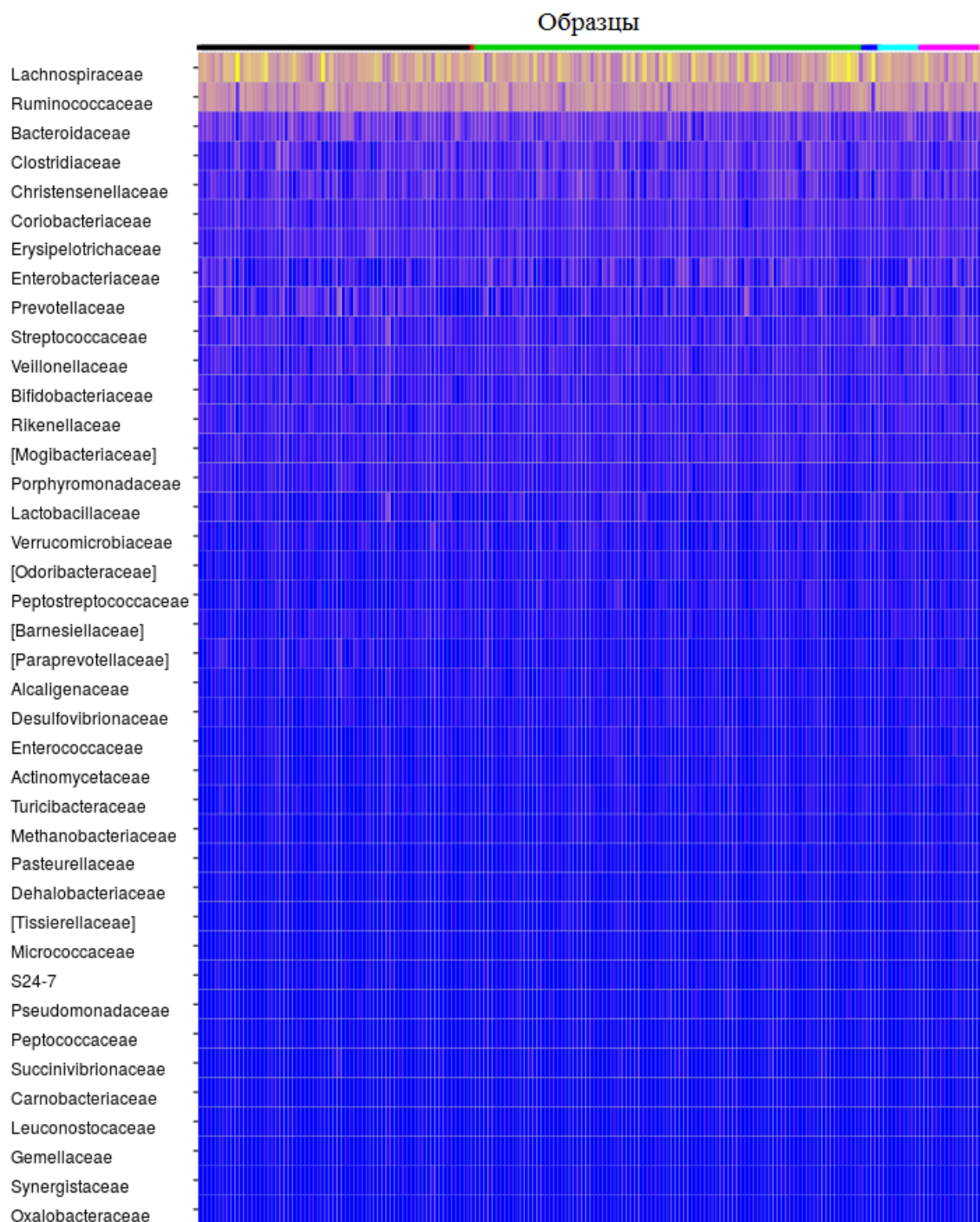


Рисунок 4 – тепловая карта представленности семейств микроорганизмов в составе микробиоты кишечника.

Синий цвет соответствует более низкой представленности типа, желтый цвет – более высокой. Черной полосой обозначены лица группы контроля, красной полосой – пациент с деменцией с тельцами Леви, зеленой полосой – лица с болезнью Паркинсона, синей полосой – лица с идиопатической семейной дистонией, голубой полосой – пациенты с диагнозом эссенциальный тремор, малиновой полосой – лица с диагнозом рассеянный склероз, желтой полосой – пациент с диагнозом множественная системная атрофия, серой полосой – пациент с диагнозом острый рассеянный энцефаломиелит. Данные логарифмированы по основанию 2.

На уровне родов (рис. 5) в составе микробиоты контрольной группы преобладали бактерии *Blautia* ($11.6 \pm 6.2\%$ от состава метагенома), *Oscillospira* ($10.3 \pm 5.0\%$ от состава метагенома), *Faecalibacterium* ($9.9 \pm 4.2\%$ от состава метагенома), *Bacteroides* ($9.0 \pm 5.1\%$ от состава метагенома), *Coprococcus* ($8.8 \pm 3.5\%$ от состава метагенома) и *Ruminococcus* ($4.9 \pm 1.8\%$ от состава метагенома). В микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона были наиболее представлены бактерии родов *Blautia* ($11.5 \pm 7.2\%$ от состава метагенома), *Oscillospira* ($10.8 \pm 5.6\%$ от состава метагенома), *Faecalibacterium* ($9.4 \pm 5.5\%$ от состава метагенома), *Coprococcus* ($8.6 \pm 3.9\%$ от состава метагенома), *Bacteroides* ($7.9 \pm 3.9\%$ от состава метагенома) и *Ruminococcus* ($5.1 \pm 1.8\%$ от состава метагенома). У пациентов с диагнозом идиопатическая семейная дистония в составе микробиоты превалировали рода *Blautia* ($14.9 \pm 9.2\%$ от состава метагенома), *Coprococcus* ($10.8 \pm 0.9\%$ от состава метагенома), *Faecalibacterium* ($8.6 \pm 7.8\%$ от состава метагенома), *Oscillospira* ($7.9 \pm 5.8\%$ от состава метагенома), *Ruminococcus* ($5.5 \pm 3.7\%$ от состава метагенома) и *Bacteroides* ($5.4 \pm 2.3\%$ от состава метагенома). В микробиоте пациентов с эссенциальным тремором на уровне родов превалировали бактерии *Blautia* ($11.7 \pm 6.1\%$ от состава метагенома), *Faecalibacterium* ($10.3 \pm 5.8\%$ от состава метагенома), *Oscillospira* ($9.7 \pm 3.8\%$ от состава метагенома), *Coprococcus* ($9.1 \pm 2.5\%$ от состава метагенома), *Bacteroides* ($7.8 \pm 3.9\%$ от состава метагенома) и *Ruminococcus* ($4.8 \pm 2.2\%$ от состава метагенома). Микробиота пациентов с рассеянным склерозом на уровне родов характеризовалась высокой представленностью *Blautia* ($10.6 \pm 4.9\%$ от состава метагенома), *Faecalibacterium* ($10.5 \pm 4.2\%$ от состава метагенома), *Oscillospira* ($8.5 \pm 5.1\%$ от состава метагенома), *Bacteroides* ($7.5 \pm 5.7\%$ от состава метагенома), *Coprococcus* ($7.2 \pm 2.2\%$ от состава метагенома) и *Ruminococcus* ($4.8 \pm 1.8\%$ от состава метагенома).

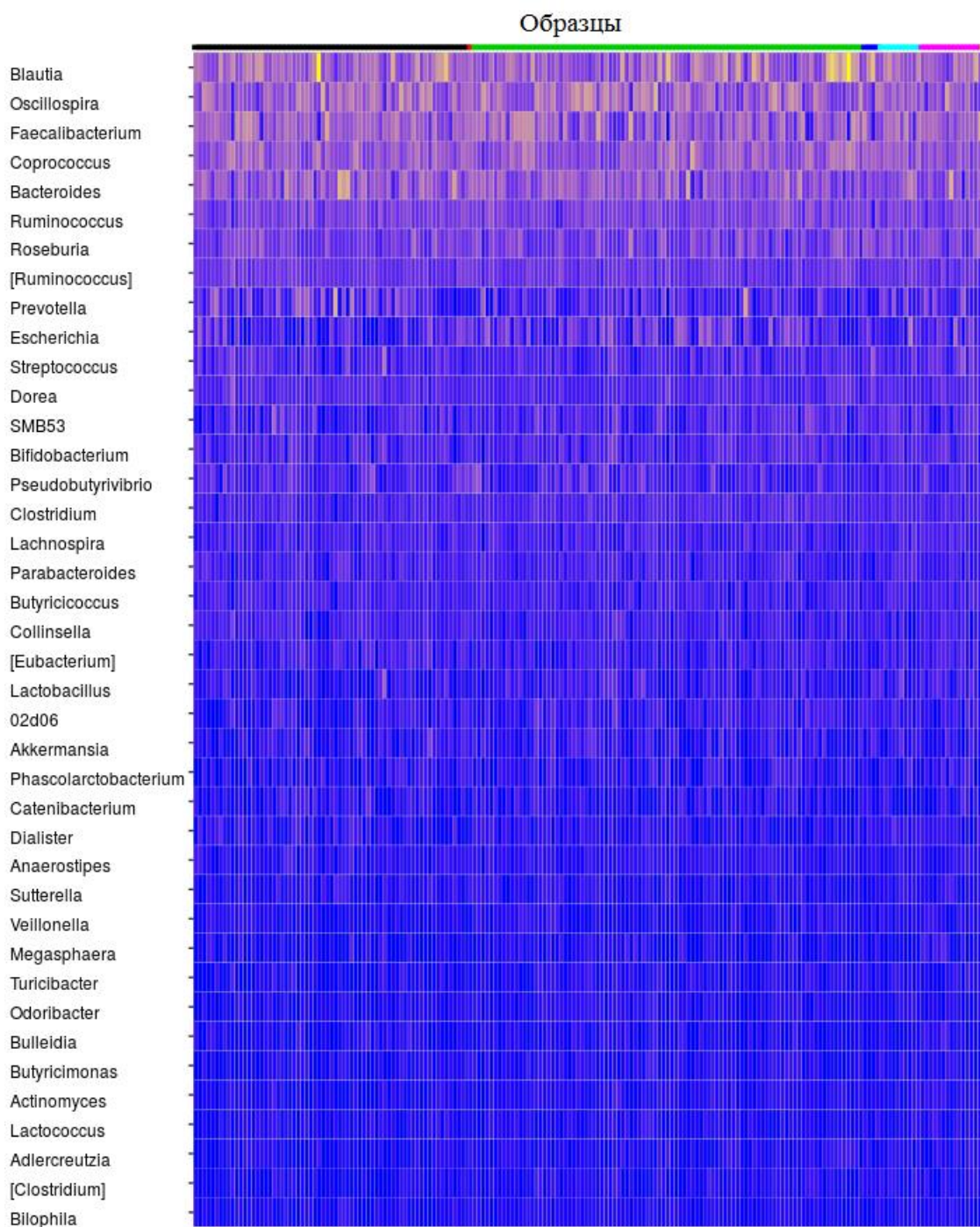


Рисунок 5 – тепловая карта представленности родов микроорганизмов в составе микробиоты кишечника.

Синий цвет соответствует более низкой представленности типа, желтый цвет – более высокой. Черной полосой обозначены лица группы контроля, красной полосой – пациент с деменцией с тельцами Леви, зеленой полосой – лица с болезнью Паркинсона, синей полосой – лица с идиопатической семейной дистонией, голубой полосой – пациенты с диагнозом эссенциальный тремор, малиновой полосой – лица с диагнозом рассеянный склероз, желтой полосой – пациент с диагнозом множественная системная атрофия, серой полосой – пациент с диагнозом острый рассеянный энцефаломиелит. Данные логарифмированы по основанию 2.

На уровне видов (рис. 6) у лиц контрольной группы в микробиоте преобладали *Faecalibacterium prausnitzii* ($22.6 \pm 8.3\%$ от состава метагенома), *Prevotella copri* ($7.3 \pm 8.7\%$ от состава метагенома), *Coprococcus eutactus* ($7.1 \pm 4.1\%$ от состава метагенома), *Ruminococcus bromii* ($5.1 \pm 3.5\%$ от состава метагенома), *Escherichia coli* ($4.9 \pm 5.2\%$ от состава метагенома) и *Roseburia faecis* ($4.6 \pm 4.3\%$ от состава метагенома). У пациентов с болезнью Паркинсона наиболее распространенными в микробиоте были *Faecalibacterium prausnitzii* ($21.7 \pm 11.2\%$ от состава метагенома), *Escherichia coli* ($8.3 \pm 7.6\%$ от состава метагенома), *Coprococcus eutactus* ($5.7 \pm 3.0\%$ от состава метагенома), *Ruminococcus bromii* ($5.4 \pm 3.9\%$ от состава метагенома), *Roseburia faecis* ($4.6 \pm 4.8\%$ от состава метагенома) и *Prevotella copri* ($4.3 \pm 6.1\%$ от состава метагенома). В микробиоте пациентов с идиопатической семейной дистонией отмечалось высокое содержание видов *Faecalibacterium prausnitzii* ($18.7 \pm 14.4\%$ от состава метагенома), *Roseburia faecis* ($10.4 \pm 6.7\%$ от состава метагенома), *Coprococcus eutactus* ($7.9 \pm 5.9\%$ от состава метагенома), *Escherichia coli* ($6.8 \pm 5.9\%$ от состава метагенома), *Ruminococcus bromii* ($5.8 \pm 3.8\%$ от состава метагенома) и *Prevotella copri* ($2.4 \pm 2.8\%$ от состава метагенома). У пациентов с диагнозом эссенциальный тремор в составе кишечной микробиоты наблюдалось высокое содержание бактерий видов *Faecalibacterium prausnitzii* ($23.1 \pm 11.5\%$ от состава метагенома), *Prevotella copri* ($6.2 \pm 6.4\%$ от состава метагенома), *Coprococcus eutactus* ($5.9 \pm 3.6\%$ от состава метагенома), *Escherichia coli* ($5.8 \pm 8.7\%$ от состава метагенома), *Ruminococcus bromii* ($5.4 \pm 3.8\%$ от состава метагенома) и *Roseburia faecis* ($5.1 \pm 5.3\%$ от состава метагенома). Микробиота пациентов с рассеянным склерозом на уровне видов характеризовалась высокой представленностью *Faecalibacterium prausnitzii* ($24.1 \pm 8.2\%$ от состава метагенома), *Escherichia coli* ($6.8 \pm 7.0\%$ от состава метагенома), *Roseburia faecis* ($5.9 \pm 4.9\%$ от состава метагенома), *Prevotella copri* ($5.3 \pm 6.9\%$ от состава метагенома), *Coprococcus eutactus* ($4.8 \pm 2.5\%$ от состава метагенома) и *Ruminococcus bromii* ($4.5 \pm 3.5\%$ от состава метагенома).

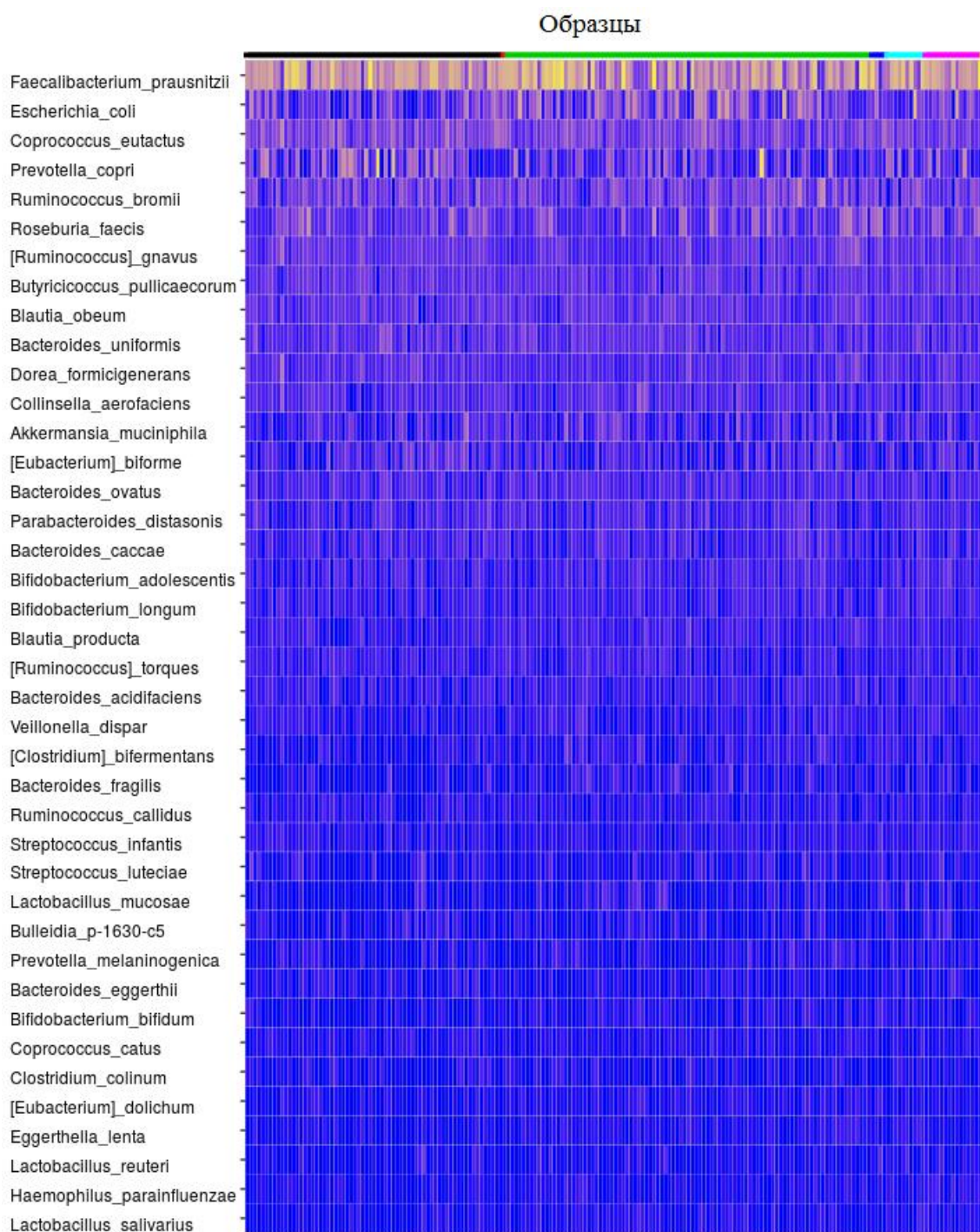


Рисунок 6 — тепловая карта представленности видов родов микроорганизмов в составе микробиоты кишечника.

Синий цвет соответствует более низкой представленности типа, желтый цвет – более высокой. Черной полосой обозначены лица группы контроля, красной полосой – пациент с деменцией с тельцами Леви, зеленой полосой – лица с болезнью Паркинсона, синей полосой – лица с идиопатической семейной дистонией, голубой полосой – пациенты с диагнозом эссенциальный тремор, малиновой полосой – лица с диагнозом рассеянный склероз, желтой полосой – пациент с диагнозом множественная системная атрофия, серой полосой – пациент с диагнозом острый рассеянный энцефаломиелит. Данные логарифмированы по основанию 2.

3.1.3 Оценка таксономического разнообразия микробиоты кишечника.

3.1.3.1 Расчет и оценка α -разнообразия.

В таблице 1 представлены результаты оценки α -разнообразия микробиоты кишечника пациентов по трем индексам таксономического разнообразия: $chaol$, observed OTUs и Шеннона на всех подвыборках.

Таблица 1. α -разнообразие микробиоты кишечника, рассчитанное по индексам Шеннона, observed OTUs и $chaol$.

Группа	Прочтений на образец	Индекс $chaol$	Индекс observed_otus	Индекс Шеннона
Болезнь Паркинсона	10	29.098±7.196	8.695±0.659	3.035±0.171
	189	169.864±26.616	76.065±10.206	5.483±0.432
	368	245.101±36.152	113.088±15.424	5.766±0.46
	547	311.044±50.724	141.831±19.652	5.894±0.486
	726	365.939±55.284	166.304±22.781	5.977±0.49
	905	411.094±65.087	188.313±26	6.037±0.497
	1084	451.289±69.431	207.26±28.443	6.072±0.505
	1263	490.895±80.262	225.668±31.589	6.104±0.505
	1442	528.279±86.982	242.927±34.57	6.13±0.515
	1621	560.569±90.173	258.802±36.175	6.154±0.511
1800	592.069±94.991	273.408±38.227	6.172±0.514	
Контроль	10	31.422±9.095	8.851±0.638	3.074±0.147
	189	201.687±44.376	84.161±14.592	5.668±0.472
	368	297.597±57.057	127.622±23.135	5.98±0.522
	547	367.596±68.578	162.115±29.903	6.133±0.554
	726	426.887±77.468	191.04±36.078	6.22±0.571
	905	479.764±84.299	217.593±40.765	6.288±0.581
	1084	527.18±87.549	241.466±44.763	6.343±0.588
	1263	564.399±97.599	263±49.291	6.377±0.596
	1442	603.845±97.315	283.364±52.099	6.408±0.598
	1621	637.516±100.905	303.166±55.857	6.439±0.604
1800	669.49±112.347	320.716±59.348	6.457±0.606	
Другие неврологические заболевания	10	29.057±6.115	8.769±0.435	3.054±0.108
	189	170.265±25.587	73.766±8.647	5.428±0.332
	368	248.665±30.52	109.256±11.444	5.693±0.332
	547	316.124±36.114	137.297±15.143	5.821±0.349
	726	370.86±46.854	160.794±17.418	5.89±0.358
	905	417.456±42.432	182.541±19.414	5.947±0.358
	1084	472.817±50.626	202.781±20.859	5.995±0.361
	1263	500.46±44.807	221.431±23.567	6.022±0.368
	1442	542.839±60.882	238.184±25.553	6.047±0.37
	1621	586.6±59.676	254.984±25.319	6.07±0.367
1800	615.312±62.095	269.678±27.558	6.081±0.373	

Значения индексов рассчитывались на всех подвыборках и приведены в таблице в виде среднего±стандартное отклонение.

В результате оценки всех индексов α -разнообразия найдены значимые различия в таксономическом богатстве метагеномных сообществ кишечника. В частности, установлено снижение таксономического богатства микробиоты кишечника у пациентов с болезнью Паркинсона и сборной группы пациентов с другими неврологическими заболеваниями по сравнению с пациентами контрольной группы по всем исследованным индексам разнообразия (индекс Шеннона: $p=0.006$ и $p=0.008$ соответственно, рис. 7-8; индекс observed OTUs: $p=0.003$ и $p=0.002$ соответственно, рис. 9-10; индекс chaol1: $p=0.003$ и $p=0.023$ соответственно, рис. 11-12). Статистически значимых различий по индексам таксономического разнообразия между пациентами с болезнью Паркинсона и другими неврологическими заболеваниями не установлено.

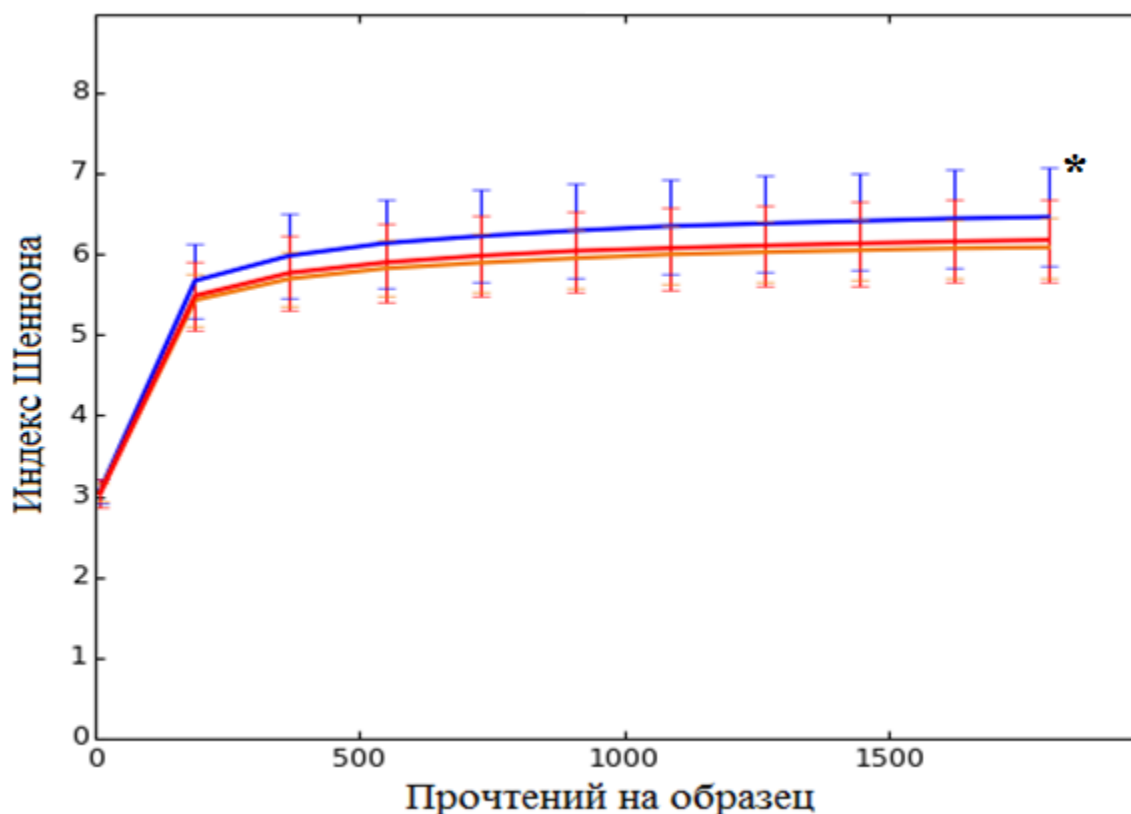


Рисунок 7 – кривые α -разнообразия, рассчитанного по индексу Шеннона для микробиоты кишечника лиц контрольной группы (синий цвет), пациентов с болезнью Паркинсона (красный цвет) и другими неврологическими заболеваниями (оранжевый цвет).

Разброс обозначает величину стандартного отклонения. Значения α -разнообразия рассчитаны на 11 точках при различной глубине прореживания. *- по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона и лицами с другими неврологическими заболеваниями, $p<0,05$.

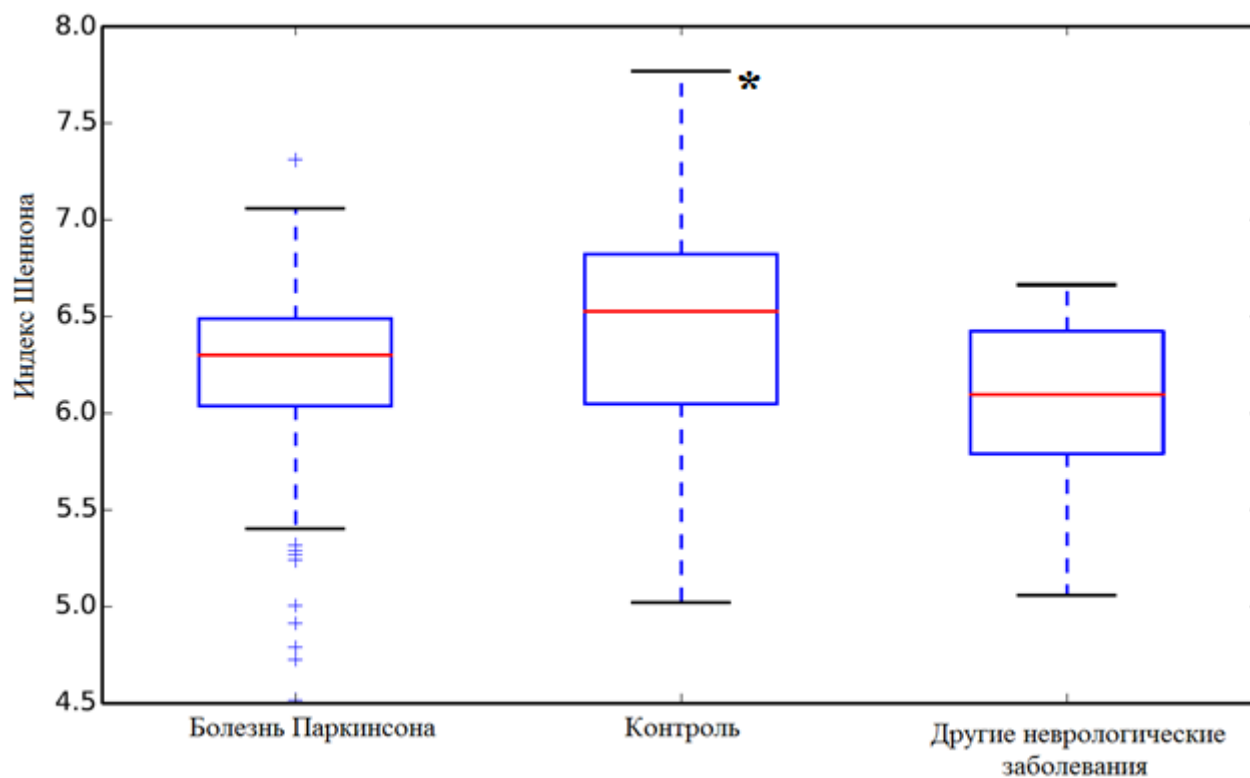


Рисунок 8 – Различия в таксономическом разнообразии микробиоты кишечника.

Красной чертой на графике обозначены медианы значений индекса Шеннона, границы ящиков обозначают первый и третий квартили, усы равны длине полутора интерквартильных размахов, крестиками обозначены выбросы. Графики построены на данных финальной подвыборки. *- по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона и лицами с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

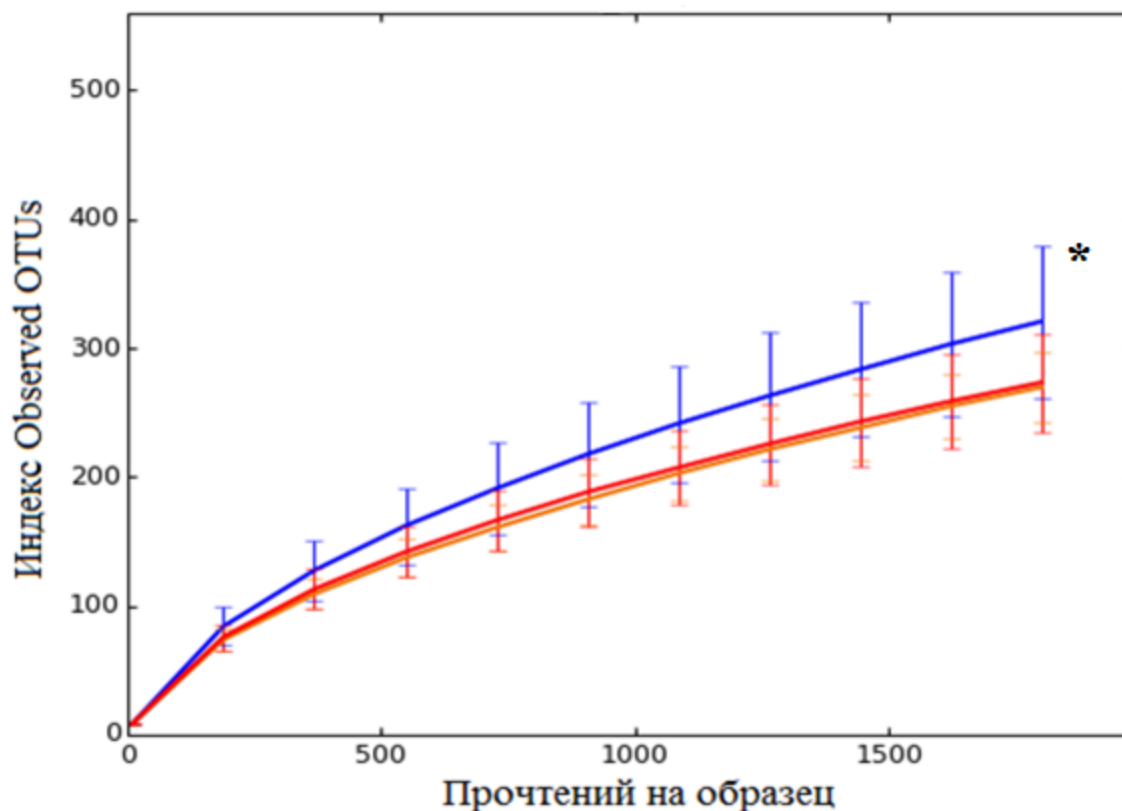


Рисунок 9 – кривые α -разнообразия, рассчитанного по индексу observed OTUs для микробиоты кишечника лиц контрольной группы (синий цвет), пациентов с болезнью Паркинсона (красный цвет) и другими неврологическими заболеваниями (оранжевый цвет).

Разброс обозначает величину стандартного отклонения. Значения α -разнообразия рассчитаны на 11 точках при различной глубине прореживания. *- по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона и лицами с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

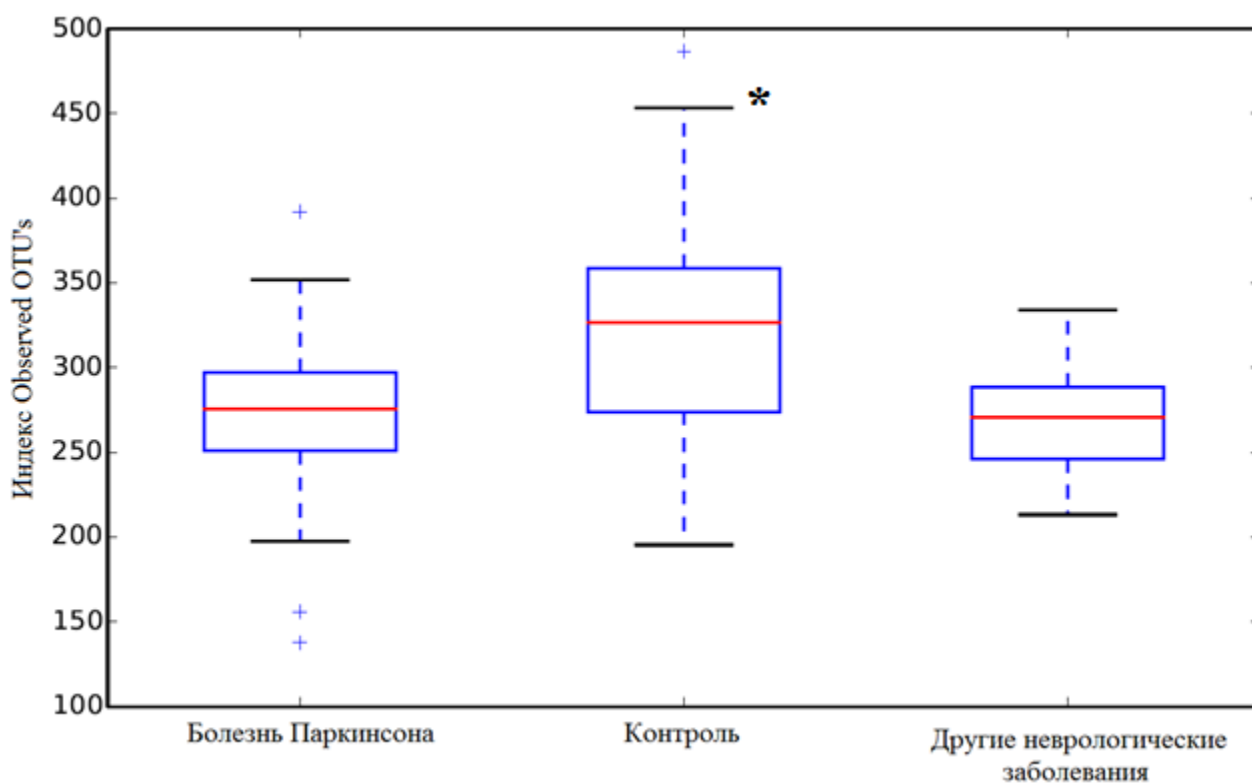


Рисунок 10 – Различия в таксономическом разнообразии микробиоты кишечника.

Красной чертой на графике обозначены медианы значений индекса observed OTUs, границы ящиков обозначают первый и третий квартили, усы равны длине полутора интерквартильных размахов, крестиками обозначены выбросы. Графики построены на данных финальной подвыборки. *- по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона и лицами с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

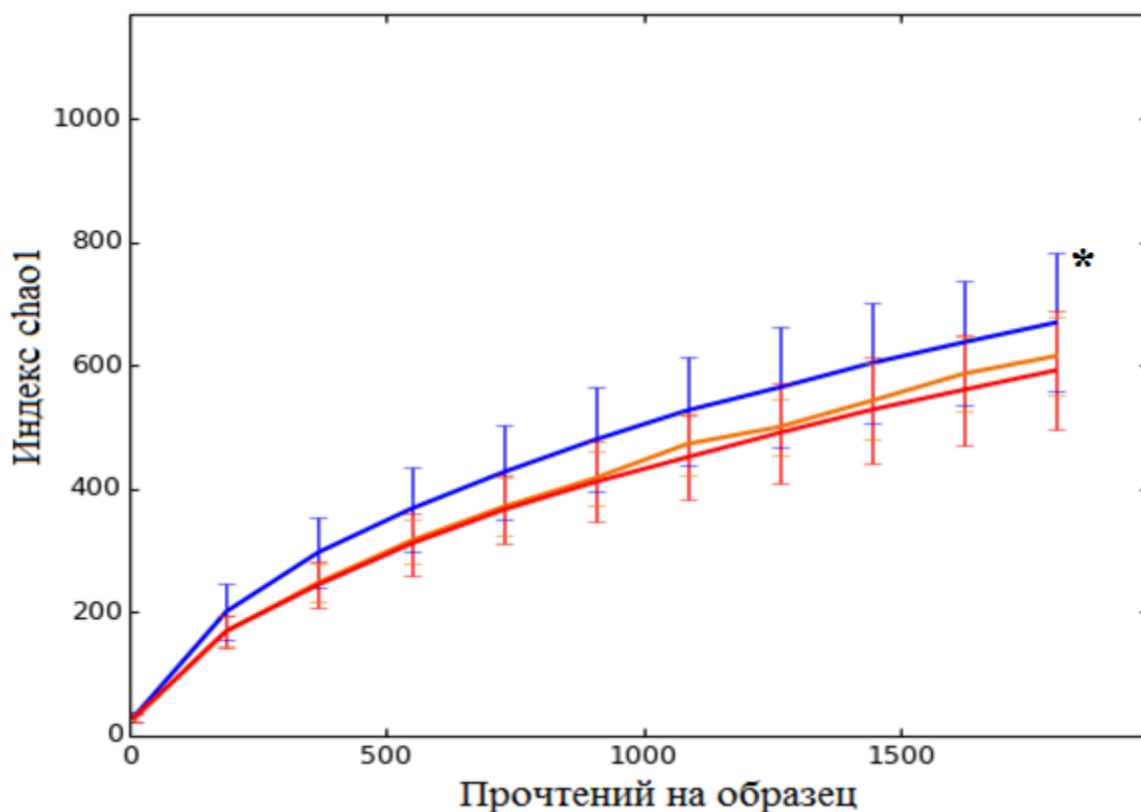


Рисунок 11 – кривые α -разнообразия, рассчитанного по индексу chaol для микробиоты кишечника лиц контрольной группы (синий цвет), пациентов с болезнью Паркинсона (красный цвет) и другими неврологическими заболеваниями (оранжевый цвет).

Разброс обозначает величину стандартного отклонения. Значения α -разнообразия рассчитаны на 11 точках при различной глубине прореживания. *- по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона и лицами с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

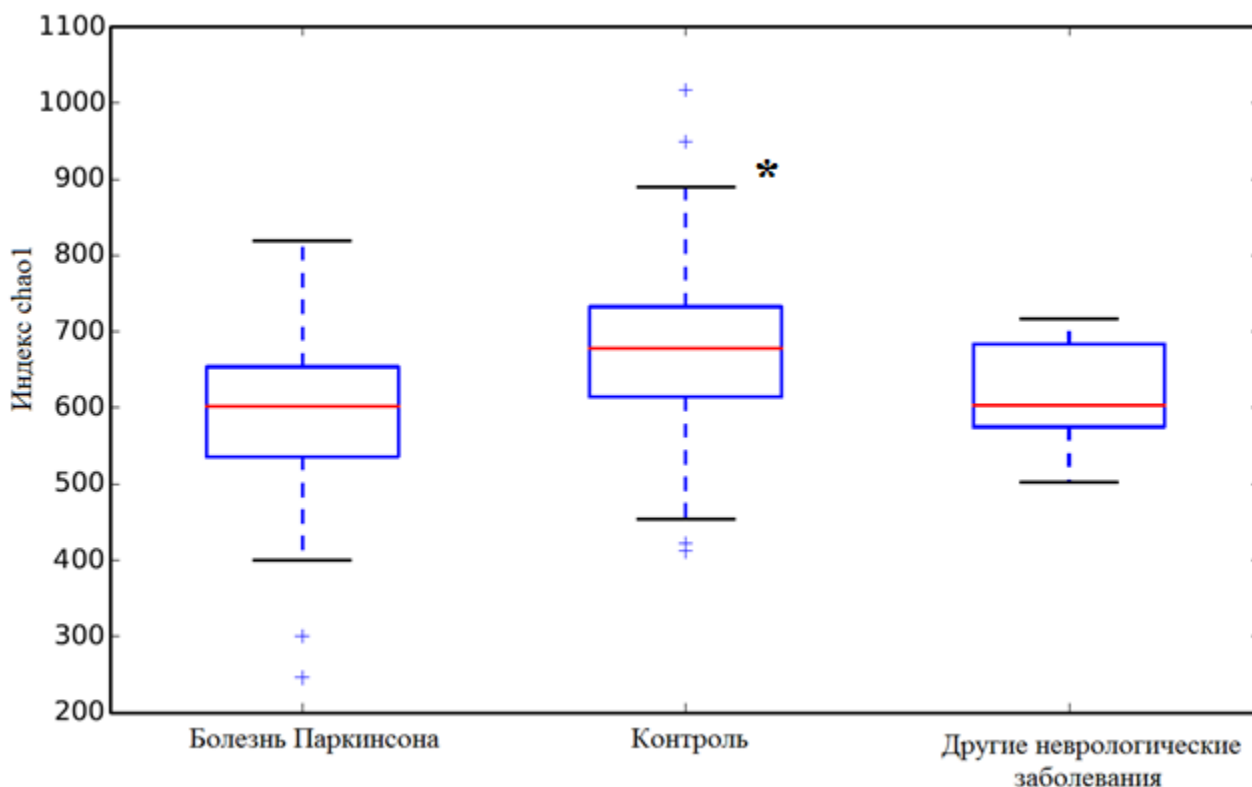


Рисунок 12 – Различия в таксономическом разнообразии микробиоты кишечника.

Красной чертой на графике обозначены медианы значений индекса $chaol$, рассчитанного для групп, крестиками обозначены выбросы. Графики построены на данных финальной подвыборки. *- по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона и лицами с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

Важным интегральным параметром, характеризующим состав микробиоты, является ее видовое разнообразие. У пациентов с болезнью Паркинсона также как и у больных с другими неврологическими заболеваниями отмечалось снижение видового богатства микробиома кишечника по нескольким индексам. У больных наблюдалось снижение общего количества отдельных разновидностей ОТЕ, что описывается индексом $observed\ OTUs$, и уменьшение доли редких разновидностей ОТЕ, о чем свидетельствует низкий индекс Шеннона. Более «взвешенная» оценка разнообразия индексом $chaol$ также свидетельствует о снижении богатства микробиоты у больных.

Низкий уровень α -разнообразия микробиоты зачастую свидетельствует о протекании патологических процессов в месте колонизации. В частности для микробиоты кишечника показана связь снижения таксономического разнообразия

с воспалением (*S.Lapthorne et al, 2013*) и наличием воспалительных заболеваний кишечника (*F.Imhann et al, 2018*). Кроме того, снижение таксономического разнообразия микробиоты кишечника наблюдается и в случае системных, но топически не связанных с желудочно-кишечным трактом заболеваниях — например при артериальной гипертензии (*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.

В других работах, посвященных исследованию микробиоты при болезни Паркинсона, данной закономерности не отмечено: различий в таксономическом богатстве либо не наблюдается (*F.Scheperjans et al, 2015; F.Hopfner et al, 2017; J.R.Bedarf et al, 2017*), либо отмечается некоторое повышение α -разнообразия у пациентов на уровне семейств (*A.Keshavarzian et al, 2015*), либо данный показатель не измеряли вовсе (*T.H.Mertsalmi et al, 2017; A.Heintz-Buschart, 2017; E.M.Hill-Burns et al, 2017*). Таким образом, подобный ответ микробиоты на наличие заболевания может быть более свойственен русской популяции пациентов с болезнью Паркинсона.

3.1.3.2 Расчет и оценка β -разнообразия.

На рисунках 13-15 представлено β -разнообразие микробиоты кишечника пациентов в виде проекций графика неметрического многомерного шкалирования на двумерное пространство. Как видно из представленных графиков, лица контрольной группы и пациенты с болезнью Паркинсона образуют два облака с частичным перекрытием в центре графика. Большая часть пациентов с другими неврологическими заболеваниями располагалась в зоне пересечения облаков. При количественной оценке вклада состояния пациентов в β -разнообразии микробиоты установлено, что наличие того или иного заболевания у пациента оказывает значимое влияние на состав кишечной микробиоты. Так, по результатам применения непараметрического дисперсионного анализа, переменная «диагноз» объясняет порядка 10% варибельности микробиоты

($R^2=0.103$, $p=0.0001$). Использование имитационного анализа сходства также подтверждает вклад состояния пациентов в состав микробиоты ($R^2=0.123$, $p=0.0001$).

При оценке влияния других известных факторов на совокупный состав микробиома пациентов с использованием непараметрического дисперсионного анализа обнаружен небольшой, однако значимый вклад возраста ($R^2=0.019$, $p=0.0007$), пол больных же значимого вклада в вариабельность состава микробиоты в данном случае не имеет ($R^2=0.007$, $p=0.1678$). Однако, по данным имитационного анализа сходства, обнаружено, что ни возраст, ни пол влияния состав микробиоты кишечника не имеют (возраст: $R^2=0.037$, $p=0.141$; пол: $R^2=0.023$, $p=0.767$)

Непараметрический дисперсионный анализ является более точной методикой оценки вклада фактора в вариабельность, по этой причине дальнейший статистический анализ для поиска различий в представленности бактерий кишечника между группами пациентов проводился с учетом влияния возраста.

Различия в β -разнообразии соотносятся с результатами, полученными другими коллективами при исследовании микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона. Так, измеренный вклад в таксономическую композицию микробиоты составлял от 2% объясненной дисперсии, на малой группе пациентов из северной Германии (*F.Hopfner et al, 2017*), вплоть до 11% и 13% на более обширных группах по данным разных исследований (*E.M.Hill-Burns et al, 2017*; *A.Keshavarzian et al, 2015*).

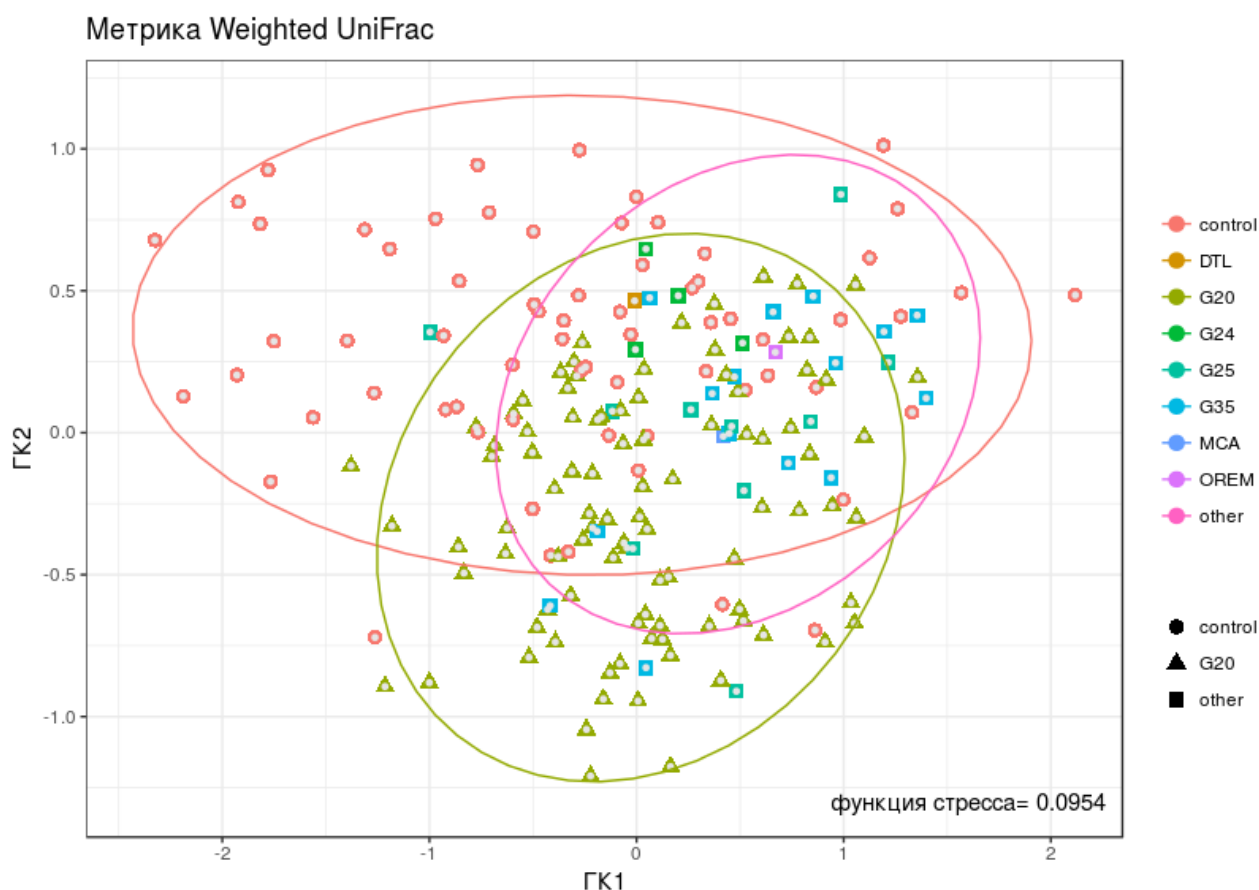


Рисунок 13 — графики многомерного неметрического шкалирования микробиоты кишечника в пространстве первой и второй главных координат.

Красными кружками обозначены пациенты контрольной группы, оранжевым квадратом обозначен пациент с деменцией с тельцами Леви, болотно-зелеными треугольниками обозначены пациенты с болезнью Паркинсона, ярко-зелеными квадратами обозначены пациенты с идиопатической семейной дистонией, бирюзовыми квадратами обозначены пациенты с эссенциальным тремором, голубыми квадратами обозначены пациенты с рассеянным склерозом, синим квадратом обозначен пациент с диагнозом множественная системная атрофия, фиолетовым квадратом обозначен пациент с диагнозом острый рассеянный энцефаломиелит. Красной линией (совпадающей по цвету с контрольной группой) обозначены границы контрольной группы (95% ДИ), болотно-зеленой линией (совпадающей по цвету с группой пациентов с болезнью Паркинсона) обозначены границы группы пациентов с болезнью Паркинсона (95% ДИ), розовой линией обозначены границы группы пациентов с другими неврологическими заболеваниями (95% ДИ).

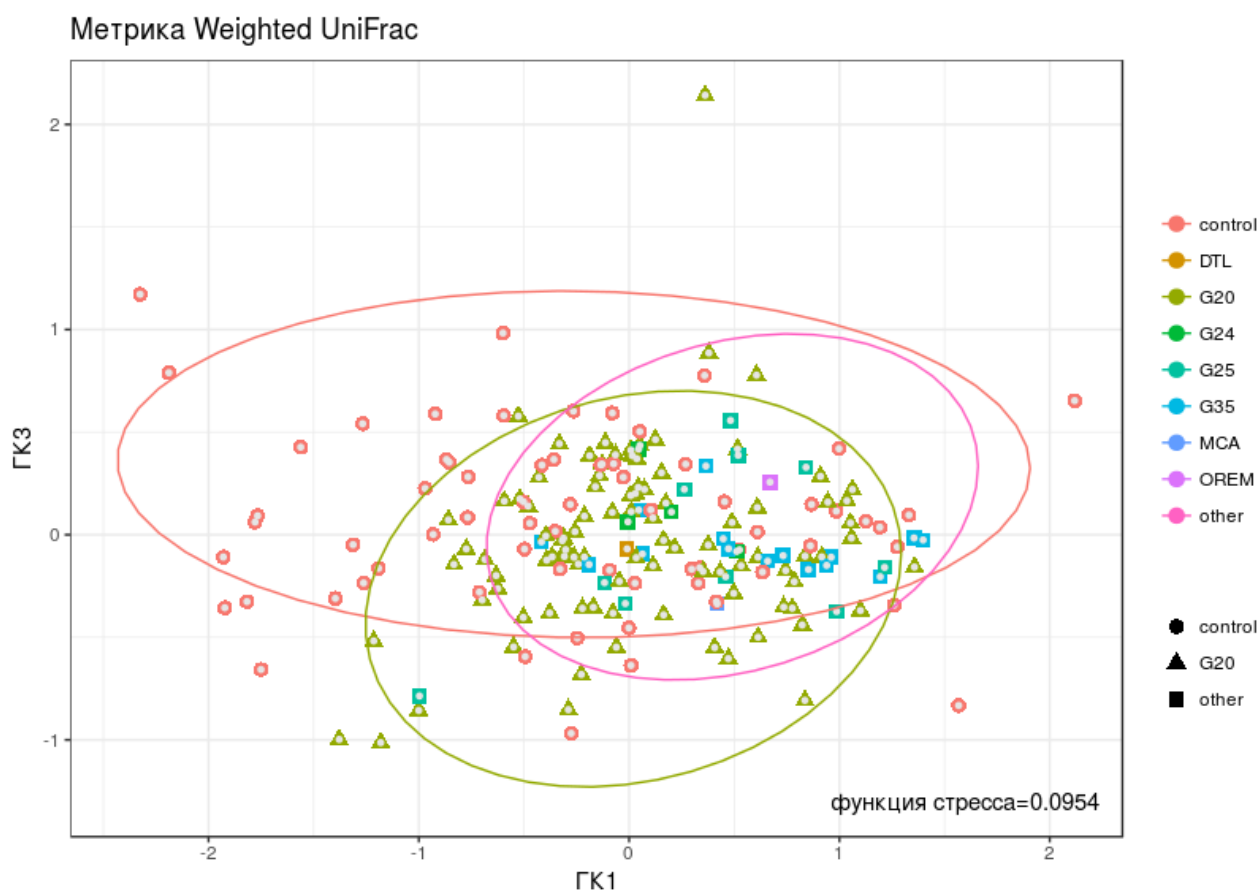


Рисунок 14 — графики многомерного неметрического шкалирования микробиоты кишечника в пространстве первой и третьей главных координат.

Красными кружками обозначены пациенты контрольной группы, оранжевым квадратом обозначен пациент с деменцией с тельцами Леви, болотно-зелеными треугольниками обозначены пациенты с болезнью Паркинсона, ярко-зелеными квадратами обозначены пациенты с идиопатической семейной дистонией, бирюзовыми квадратами обозначены пациенты с эссенциальным тремором, голубыми квадратами обозначены пациенты с рассеянным склерозом, синим квадратом обозначен пациент с диагнозом множественная системная атрофия, фиолетовым квадратом обозначен пациент с диагнозом острый рассеянный энцефаломиелит. Красной линией (совпадающей по цвету с контрольной группой) обозначены границы контрольной группы (95% ДИ), болотно-зеленой линией (совпадающей по цвету с группой пациентов с болезнью Паркинсона) обозначены границы группы пациентов с болезнью Паркинсона (95% ДИ), розовой линией обозначены границы группы пациентов с другими неврологическими заболеваниями (95% ДИ).

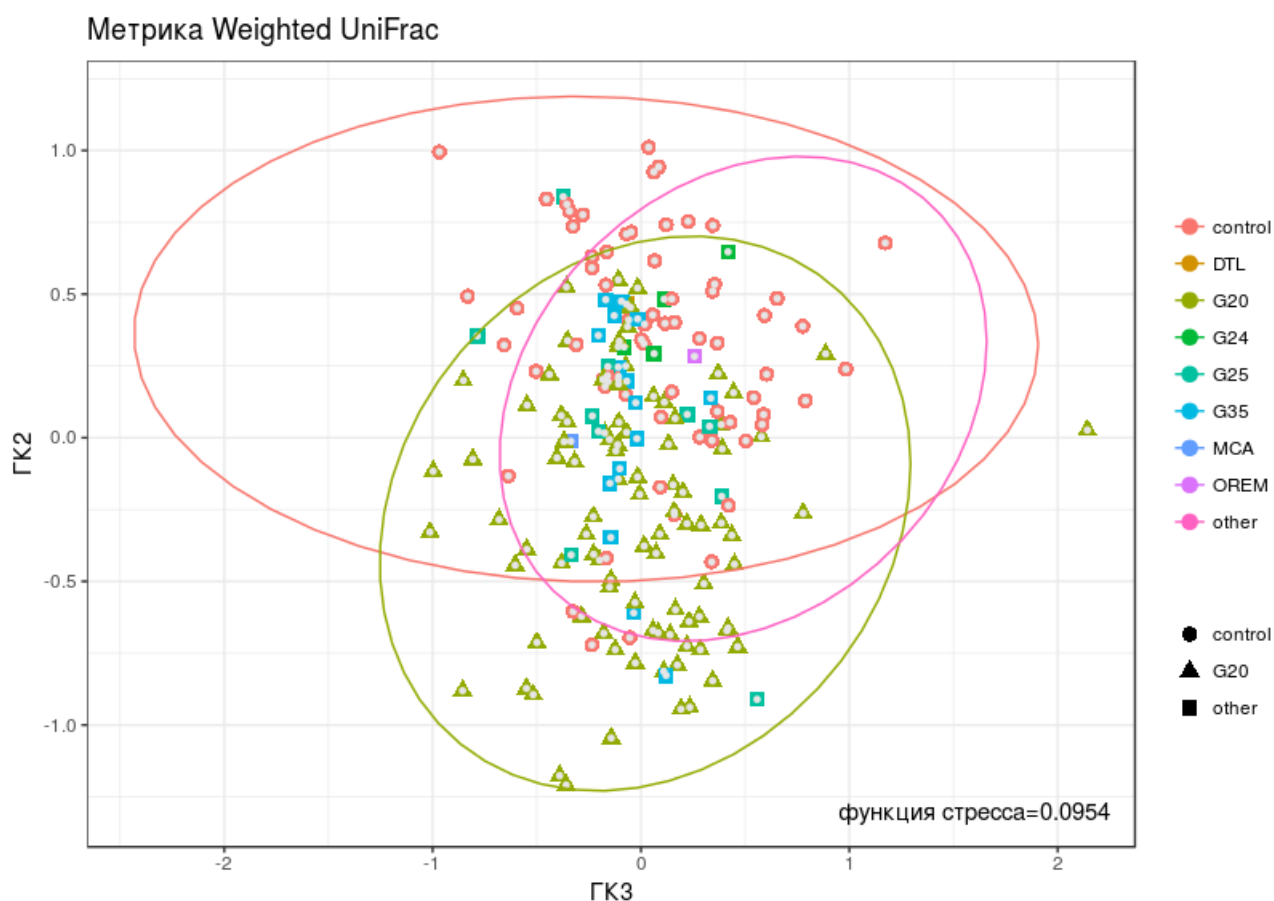


Рисунок 15 — графики многомерного неметрического шкалирования микробиоты кишечника в пространстве второй и третьей главных координат.

Красными кружками обозначены пациенты контрольной группы, оранжевым квадратом обозначен пациент с деменцией с тельцами Леви, болотно-зелеными треугольниками обозначены пациенты с болезнью Паркинсона, ярко-зелеными квадратами обозначены пациенты с идиопатической семейной дистонией, бирюзовыми квадратами обозначены пациенты с эссенциальным тремором, голубыми квадратами обозначены пациенты с рассеянным склерозом, синим квадратом обозначен пациент с диагнозом множественная системная атрофия, фиолетовым квадратом обозначен пациент с диагнозом острый рассеянный энцефаломиелит. Красной линией (совпадающей по цвету с контрольной группой) обозначены границы контрольной группы (95% ДИ), болотно-зеленой линией (совпадающей по цвету с группой пациентов с болезнью Паркинсона) обозначены границы группы пациентов с болезнью Паркинсона (95% ДИ), розовой линией обозначены границы группы пациентов с другими неврологическими заболеваниями (95% ДИ).

3.1.4 Анализ корреляционных сетей в микробиоте кишечника

Для оценки степени кооперации внутри бактериальных сообществ, составляющих микробиоту кишечника у лиц здорового контроля и пациентов с болезнью Паркинсона, рассчитывались попарные корреляции между представленностями бактерий на родовом и видовом уровнях. На базе попарных корреляций составлялись корреляционные графы (или сети). На уровне родов, в объединенную корреляционную сеть (рис 16) вошли 47 узлов, представляющих отдельные бактериальные рода, и 95 ребер, представляющих корреляционные связи между ними. Графы, имеющие менее трех вершин, исключали, при проведении анализа сети граф рассматривали как ненаправленный. Коэффициент кластеризации в объединенной сети составил 0.499. Диаметр объединенной сети составил 6, радиус сети составил 1. Централизация объединенной сети составила 0.135, среднее число соседей составило 4.043. Плотность сети имела значение 0.088, гетерогенность сети составила 0.616.

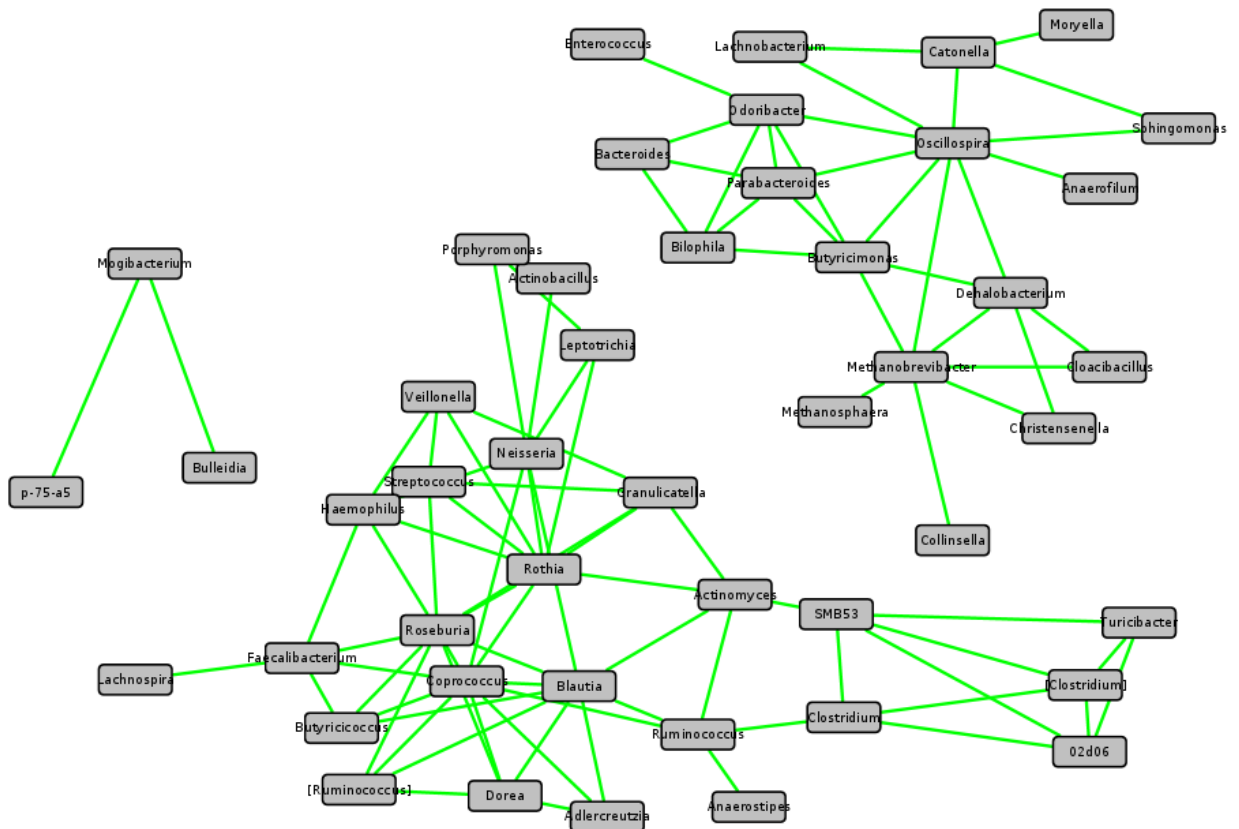


Рисунок 16 — корреляционная сеть микробиоты объединенной группы пациентов с болезнью Паркинсона и лиц контрольной группы на уровне родов.

Узлы сети (отмечены прямоугольниками) представляют отдельные бактериальные роды. Ребра сети представляют корреляционные связи между родами (зеленый цвет — прямая корреляционная связь, красный цвет — обратная корреляционная связь). В сеть включали пары бактерий со значением ρ но Спирмена не менее 0,5 по модулю и со значимостью корреляции $p < 0.05$ после применения поправки Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения.

При включении в расчет только пациентов контрольной группы размер корреляционной сети вырос: в нее вошло 52 узла, представляющих отдельные бактериальные роды и 194 ребра, представляющих корреляционные связи между ними (рис 17). Коэффициент кластеризации при этом снизился до 0.492. Диаметр и радиус сети увеличились, диаметр до 8, а радиус сети до 4. Также возросла и централизация сети до 0.317, и практически вдвое увеличилось среднее число соседей — 7.462. Плотность и гетерогенность сети также увеличились до 0.146 и 0.918 соответственно.

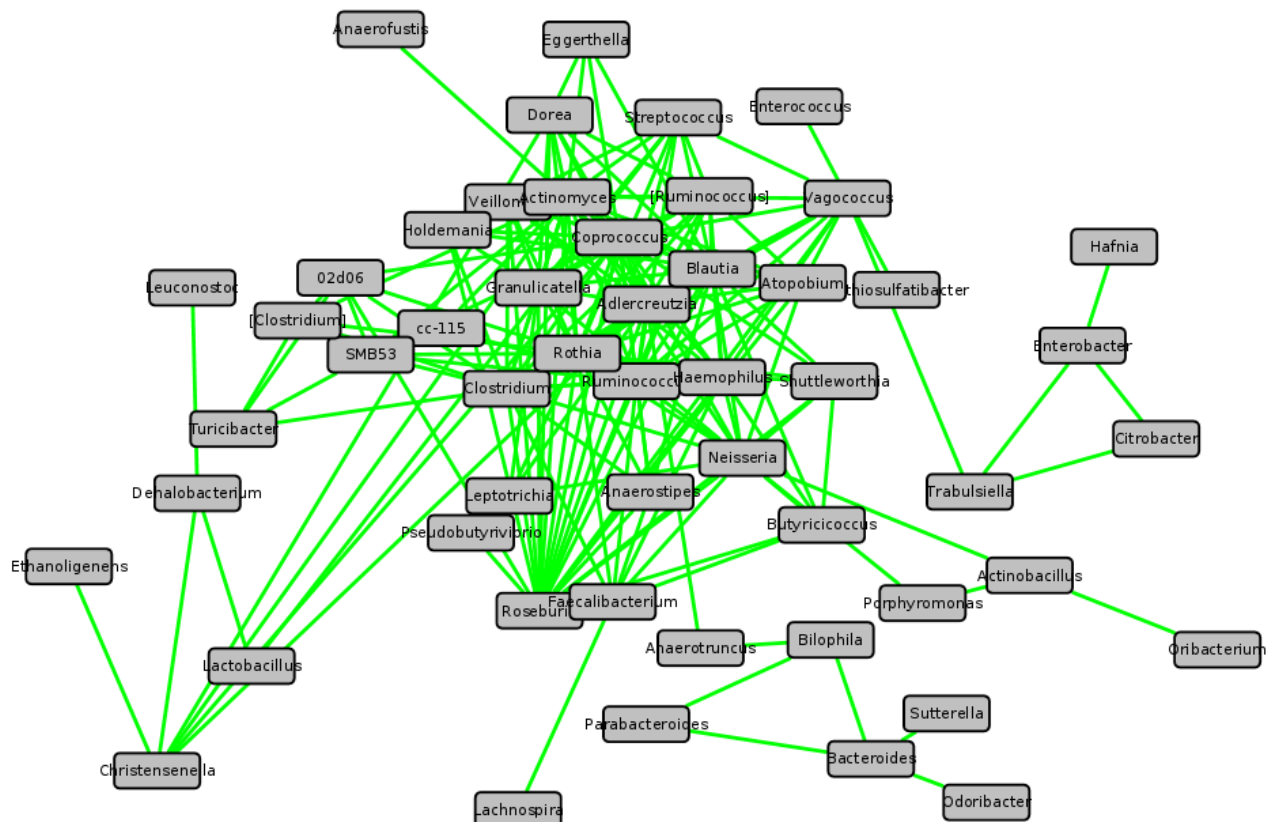


Рисунок 17 — корреляционная сеть микробиоты лиц контрольной группы на уровне родов. Узлы сети (отмечены прямоугольниками) представляют отдельные бактериальные рода.

Ребра сети представляют корреляционные связи между родами (зеленый цвет — прямая корреляционная связь, красный цвет — обратная корреляционная связь). В сеть включали пары бактерий со значением rho Спирмена не менее 0,5 по модулю и со значимостью корреляции $p < 0.05$ после применения поправки Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения.

В свою очередь, при проведении корреляционного анализа для бактериальных родов, входящих в состав микробиоты кишечника при болезни Паркинсона, отмечалось уменьшение размера сети и числа корреляционных связей между ее компонентами (рис. 18). Так, в сеть вошли 36 узлов, представляющих отдельные бактериальные рода и 51 ребро, представляющее корреляционные связи между ними. Коэффициент кластеризации по сравнению с контрольной группой и смешанной выборкой вырос и составил 0.531. Диаметр, радиус и централизация сети снизились по сравнению с сетью, построенной для пациентов контрольной группы (диаметр сети 7, радиус сети 1, централизация сети 0.156). Среднее число соседей, плотность и гетерогенность сети снизились

по сравнению с контрольной и объединенной группой (среднее число соседей 2.833, плотность 0.081, гетерогенность 0.579). Также в данной сети отмечается наличие отрицательных корреляционных связей между парами бактерий *Catonella-Neisseria*, *Catonella-Vagococcus* и *Catonella-Oribacterium*.

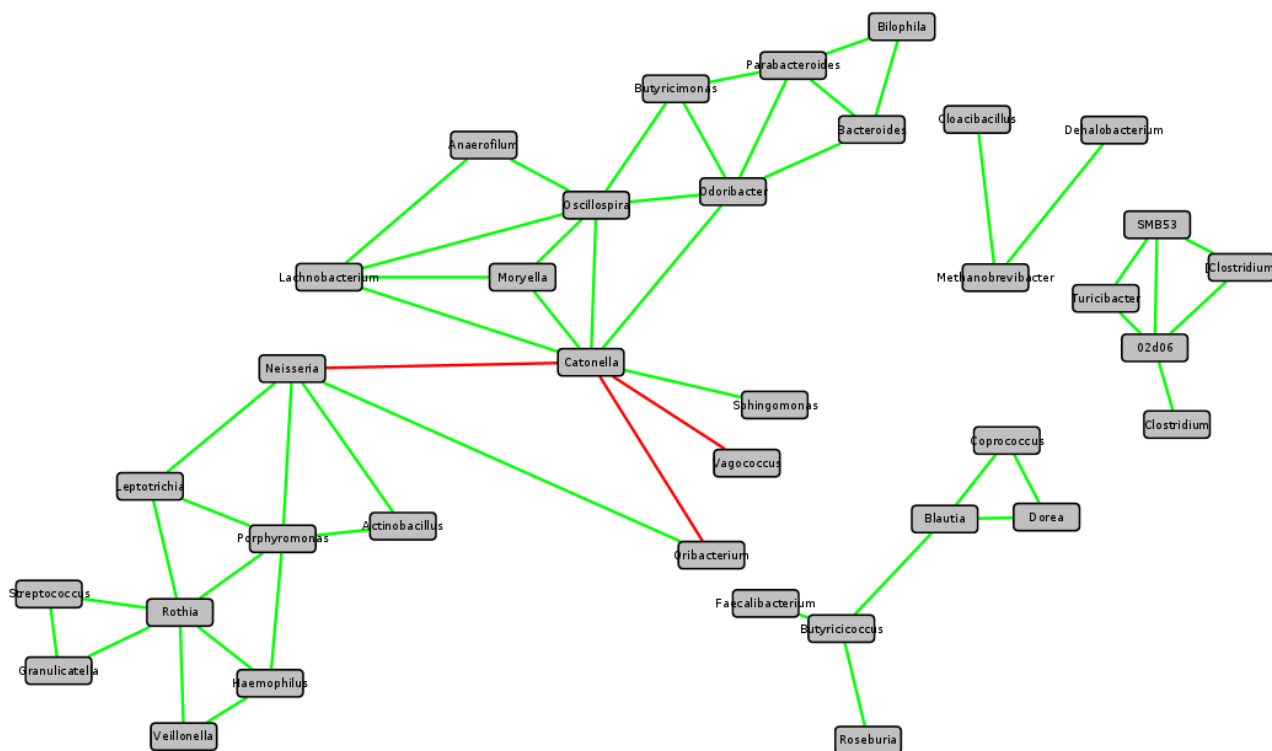


Рисунок 18 — корреляционная сеть микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на уровне родов. Узлы сети (отмечены прямоугольниками) представляют отдельные бактериальные рода.

Ребра сети представляют корреляционные связи между родами (зеленый цвет — прямая корреляционная связь, красный цвет — обратная корреляционная связь). В сеть включали пары бактерий со значением ρ о Спирмена не менее 0,5 по модулю и со значимостью корреляции $p < 0.05$ после применения поправки Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения.

На уровне видов в объединенной корреляционной сети насчитывалось 18 узлов, представляющих отдельные бактериальные виды, и 26 ребер, представляющих корреляционные связи между ними (рис. 19). Коэффициент кластеризации в объединенной сети составил 0.372. Диаметр объединенной сети составил 5, радиус сети составил 1. Централизация объединенной сети составила 0.140, среднее число соседей составило 2.889. Плотность сети имела значение 0.170, гетерогенность сети составила 0.515.

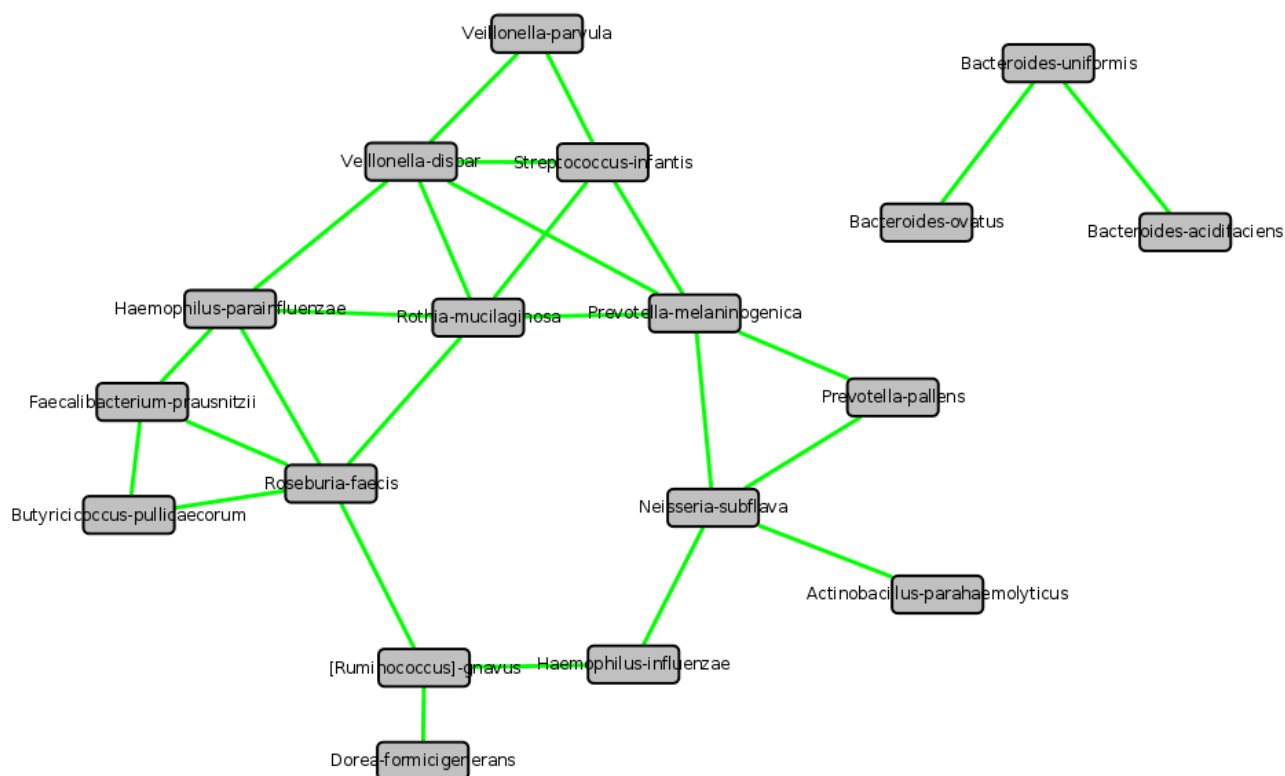


Рисунок 19 — корреляционная сеть микробиоты объединенной группы пациентов с болезнью Паркинсона и лиц контрольной группы на уровне видов.

Узлы сети (отмечены прямоугольниками) представляют отдельные бактериальные виды. Ребра сети представляют корреляционные связи между видами (зеленый цвет — прямая корреляционная связь, красный цвет — обратная корреляционная связь). В сеть включали пары бактерий со значением ρ о Спирмена не менее 0,5 по модулю и со значимостью корреляции $p < 0.05$ после применения поправки Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения.

Корреляционная сеть, составленная для лиц контрольной группы, имела в своем составе 30 узлов, представляющих отдельные бактериальные виды, и 66 ребер, представляющих корреляционные связи между ними (рис. 20). Коэффициент кластеризации при этом увеличился до 0.502. Диаметр сети увеличился до 6, а радиус сети не изменился. Централизация сети возросла до 0.317, также увеличилось среднее число соседей до 4.4. Плотность сети снизилась и составила 0.152, гетерогенность сети увеличилась до 0.703. В сети отмечались отрицательные корреляционные связи между парами бактерий *[Eubacterium] dolichum-Prevotella copri* и *Prevotella copri-Bacteroides uniformis*.

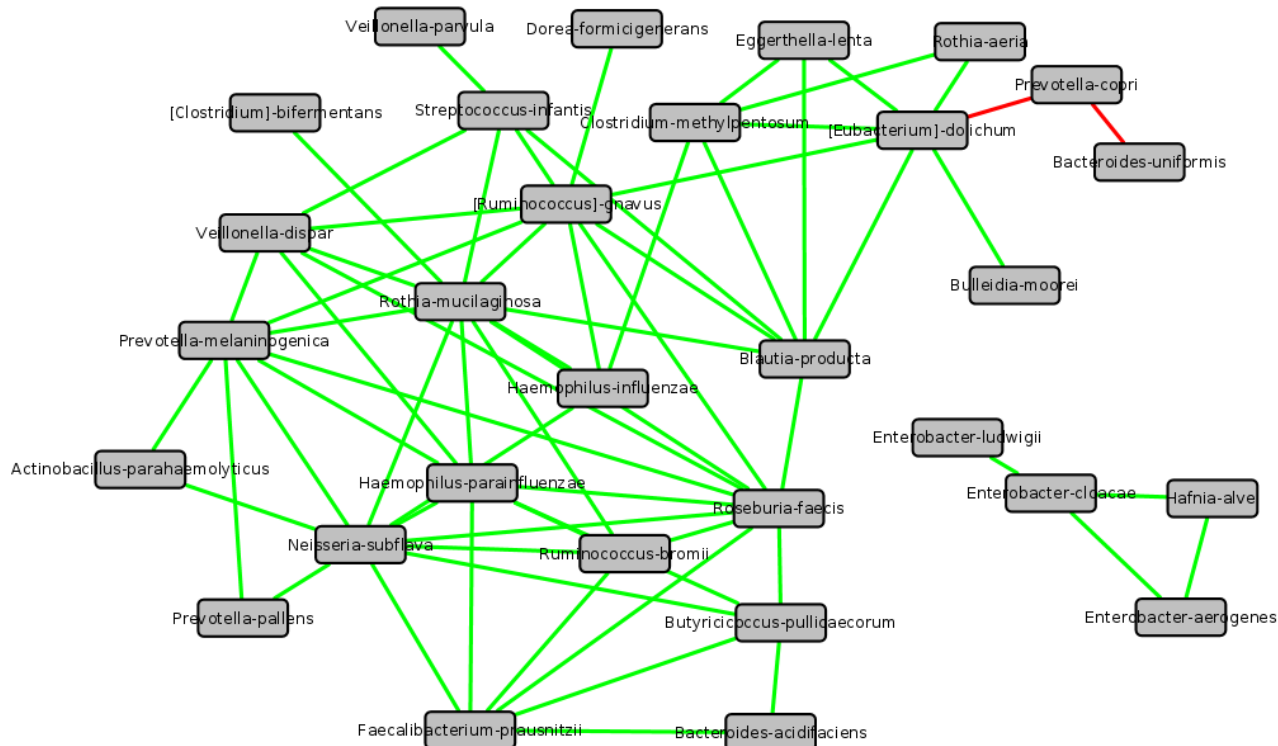


Рисунок 20 — корреляционная сеть микробиоты лиц контрольной группы на уровне видов.

Узлы сети (отмечены прямоугольниками) представляют отдельные бактериальные виды. Ребра сети представляют корреляционные связи между видами (зеленый цвет — прямая корреляционная связь, красный цвет — обратная корреляционная связь). В сеть включали пары бактерий со значением ρ о Спирмена не менее 0,5 по модулю и со значимостью корреляции $p < 0.05$ после применения поправки Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения.

В микробиоте у пациентов с болезнью Паркинсона на уровне видов при построении корреляционной сети сохраняется тенденция на снижение числа узлов (до 24) и ребер (до 24) в сравнении с лицами контрольной группы (рис. 21). Коэффициент кластеризации оказался напротив более низким по сравнению с контрольной группой и смешанной выборкой и составил 0.201. Диаметр и радиус сети у пациентов с болезнью Паркинсона и лиц контрольной группы оказались одинаковыми. Централизация корреляционной сети у пациентов с болезнью Паркинсона на уровне видов снизилась по сравнению с пациентами контрольной группы и составила 0.142. Среднее число соседей, плотность и гетерогенность сети также снизились по сравнению с контрольной группой (среднее число соседей 2.0, плотность 0.087, гетерогенность 0.559). В сети присутствовали

отрицательные корреляционные связи между парами бактерий *Bifidobacterium longum-Prevotella stercorea* и *Roseburia faecis-Sphingomonas yabuuchiae*.

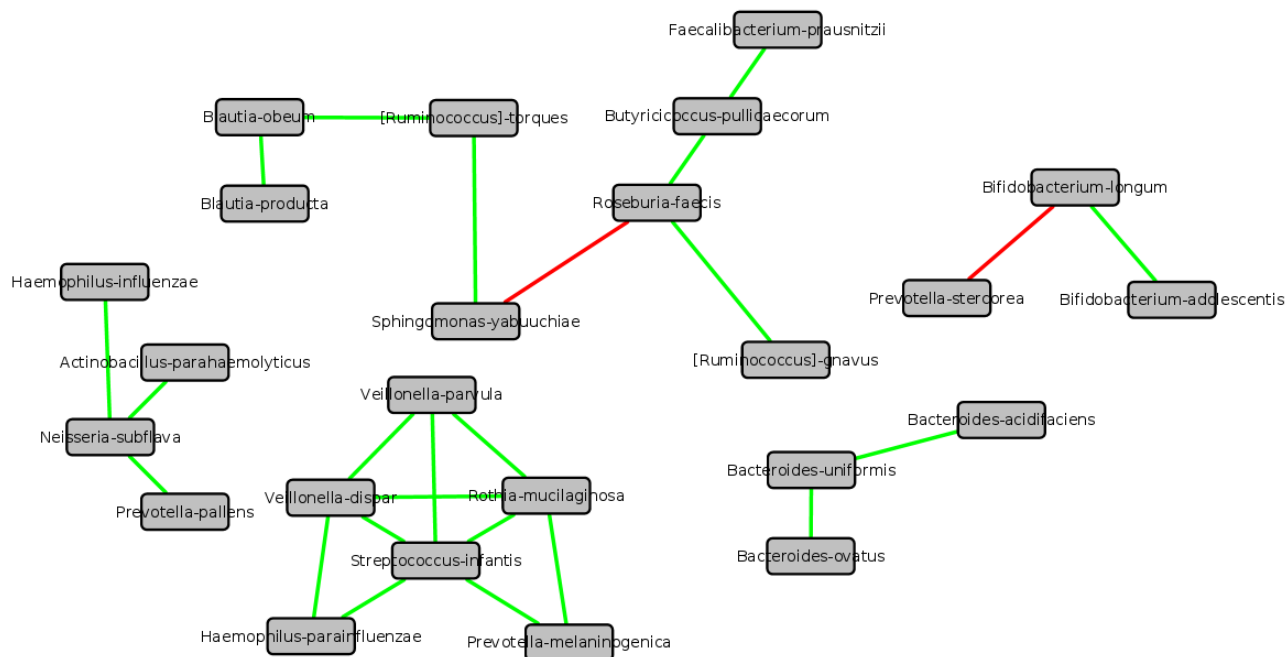


Рисунок 21 — корреляционная сеть микробиоты пациентов с болезнью Паркинсона на уровне видов.

Узлы сети (отмечены прямоугольниками) представляют отдельные бактериальные виды. Ребра сети представляют корреляционные связи между видами (зеленый цвет — прямая корреляционная связь, красный цвет — обратная корреляционная связь). В сеть включали пары бактерий со значением rho Спирмена не менее 0,5 по модулю и со значимостью корреляции $p < 0.05$ после применения поправки Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения.

Анализ корреляционных сетей бактерий, составляющих микробиоту кишечника, также подтверждает наблюдаемое снижение таксономического разнообразия у пациентов с болезнью Паркинсона. Представление информации о микробиоме в виде сети позволяет более подробно исследовать совокупные свойства сообщества и его разнообразие за счет применения дополнительных методов анализа, базирующихся на теории графов (*M.Layeghifard et al, 2017*). Так, было установлено, что в кишечной микробиоте при болезни Паркинсона наблюдается снижение числа кооперирующихся таксонов, которое сопровождается уменьшением количества корреляционных взаимодействий между отдельными бактериями и снижением плотности сети. По сравнению с

микробиотой здоровых, микробиота 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. На уровне видов напротив, коэффициент кластеризации корреляционной сети, полученной для больных, численно ниже, однако такое снижение объясняется распадом общего графа на отдельные не связанные между собой сети, для каждой из которых коэффициент кластеризации низкий ввиду малого количества узлов в их составе (от 3 до 7). Все эти факторы могут свидетельствовать о нарушении кооперации в микробиоме при болезни Паркинсона.

Как и снижение α -разнообразия, нарушение кооперации в кишечной экосистеме наблюдается при воспалительных заболеваниях кишечника (*H.Sokol et al, 2017*). В этой связи, нарушение межмикробной кооперации также может быть косвенным признаком протекания воспалительных процессов. В других работах по данной тематике подобного рода анализ не проводился, однако провоспалительный характер микробиома кишечника при болезни Паркинсона отмечается также в исследовании на американской популяции, где он был связан с увеличением представленности бактерий рода *Ralstonia* и снижением *Roseburia* в микробиоте (*A.Keshavarzian et al, 2015*).

3.1.5 Особенности состава кишечной микробиоты на различных таксономических уровнях

Для определения подробных различий в составе кишечной микробиоты между группами больных с болезнью Паркинсона, другими неврологическими заболеваниями (группа сравнения) и контрольной группой микробиоту агрегировали на различных таксономических уровнях — от типа до вида.

На уровне типов (таб. 2, рис 22) в микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона отмечалось преобладание бактерий *Synergistetes*, *Chlorobi* и *Actinobacteria* по сравнению с микробиотой лиц контрольной группы.

Таблица 2. Различия в содержании микроорганизмов на уровне типов

Тип	Образцов, контроль	Образцов, БП	ОТЕ, контроль	ОТЕ, БП	logFC	p-значения
<i>Synergistetes</i>	6	44	36	193	0,9390	0,0250
<i>Chlorobi</i>	5	25	11	54	0,7188	0,0158
<i>Actinobacteria</i>	67	95	4148	11457	0,4537	0,0499
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с болезнью Паркинсона						

Кол-во образцов в группе БП – количество пациентов с болезнью Паркинсона, имеющих данную ОТЕ в составе кишечной микробиоты; кол-во образцов в группе Другие НЗ – количество пациентов с другими неврологическими заболеваниями, имеющих данную ОТЕ в составе кишечной микробиоты; кол-во образцов в контрольной группе – количество пациентов контрольной группы, имеющих данную ОТЕ в составе кишечной микробиоты; кол-во прочтений в группе БП – количество прочтений данной ОТЕ в группе пациентов с болезнью Паркинсона; кол-во прочтений в группе Другие НЗ – количество прочтений данной ОТЕ в группе пациентов с другими неврологическими заболеваниями; кол-во прочтений в контрольной группе – количество прочтений данной ОТЕ в контрольной группе; LogFC – кратность различия в представленности ОТЕ; положительные значения свидетельствуют о более выраженном содержании данной ОТЕ у лиц с болезнью Паркинсона; p приведены с поправкой на множественное сравнение по Бенджамини-Хохбергу (здесь и далее).

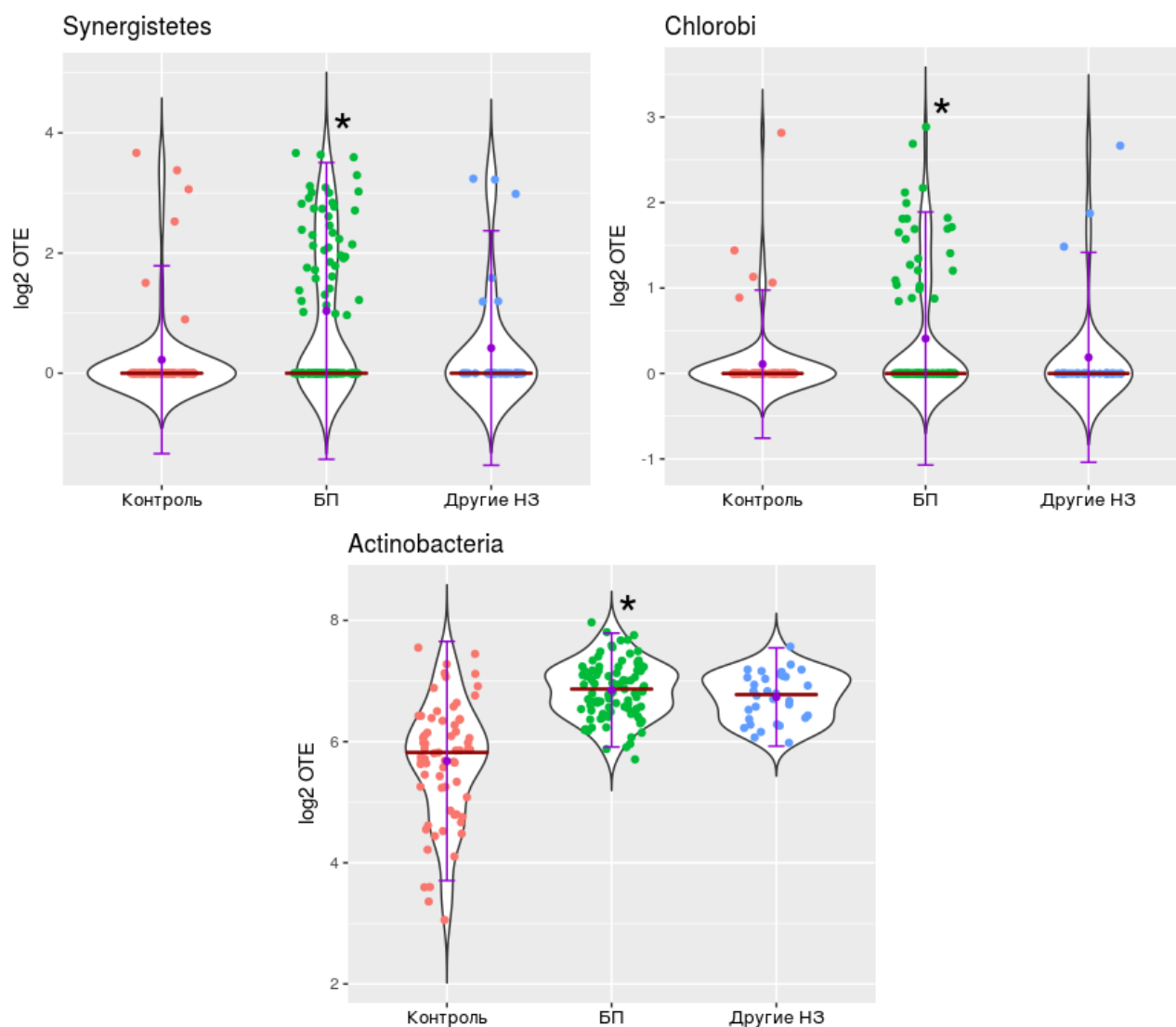


Рисунок 22 — графики содержания типов микроорганизмов в микробиоте кишечника.

На графике отображена представленность микроорганизмов в группах пациентов с болезнью Паркинсона (БП, зеленые точки), лиц с другими неврологическими заболеваниями (Другие НЗ, синие точки) и пациентов контрольной группы (Контроль, оранжевые точки). Стороны графиков отображают кривые плотности распределения содержания микроорганизмов, красная черта показывает медиану представленности микроорганизмов, фиолетовая точка показывает среднее значение представленности микроорганизмов, разброс показывает стандартное отклонение содержания микроорганизмов. * — по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Таблица 3. Различия в содержании микроорганизмов на уровне классов

Класс	Образцов, контроль	Образцов, БП	ОТЕ, контроль	ОТЕ, БП	logFC	p-значения
Synergistia	6	44	36	193	0,9490	0,0276
Epsilonproteobacteria	5	17	12	50	0,7403	0,0377
Chlorobia	5	25	11	54	0,7116	0,0129
Actinobacteria	64	95	1597	4952	0,6375	0,0455
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с болезнью Паркинсона						
Класс	Образцов, БП	Образцов, Other	ОТЕ, БП	ОТЕ, Другие НЗ	logFC	p-значения
RF3	39	5	154	10	-1,1965	0,0004
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с другими неврологическими заболеваниями						

На уровне классов (таб. 3, рис. 23) данная тенденция сохранилась: микробиота пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению со здоровым контролем характеризовалась повышением содержания бактерий Synergistia, Epsilonproteobacteria, Chlorobia и Actinobacteria. Также у пациентов с болезнью Паркинсона отмечалось повышение представленности класса RF3 в сравнении с пациентами, страдающими от других неврологических заболеваний.

На уровне отрядов (таб. 4, рис. 24) у пациентов с болезнью Паркинсона отмечалось повышение представленности бактерий Sphingomonadales, Aeromonadales, Bacillales, Synergistales, Nautiliales, Chlorobiales и SHA-98 по сравнению со здоровыми. В свою очередь, пациенты с другими неврологическими патологиями характеризовались повышением представленности отрядов Sphingomonadales и Aeromonadales по сравнению с контрольной группой и снижением содержания отрядов ML615J-28, RF32 и Bacillales по сравнению с пациентами, страдающими болезнью Паркинсона.

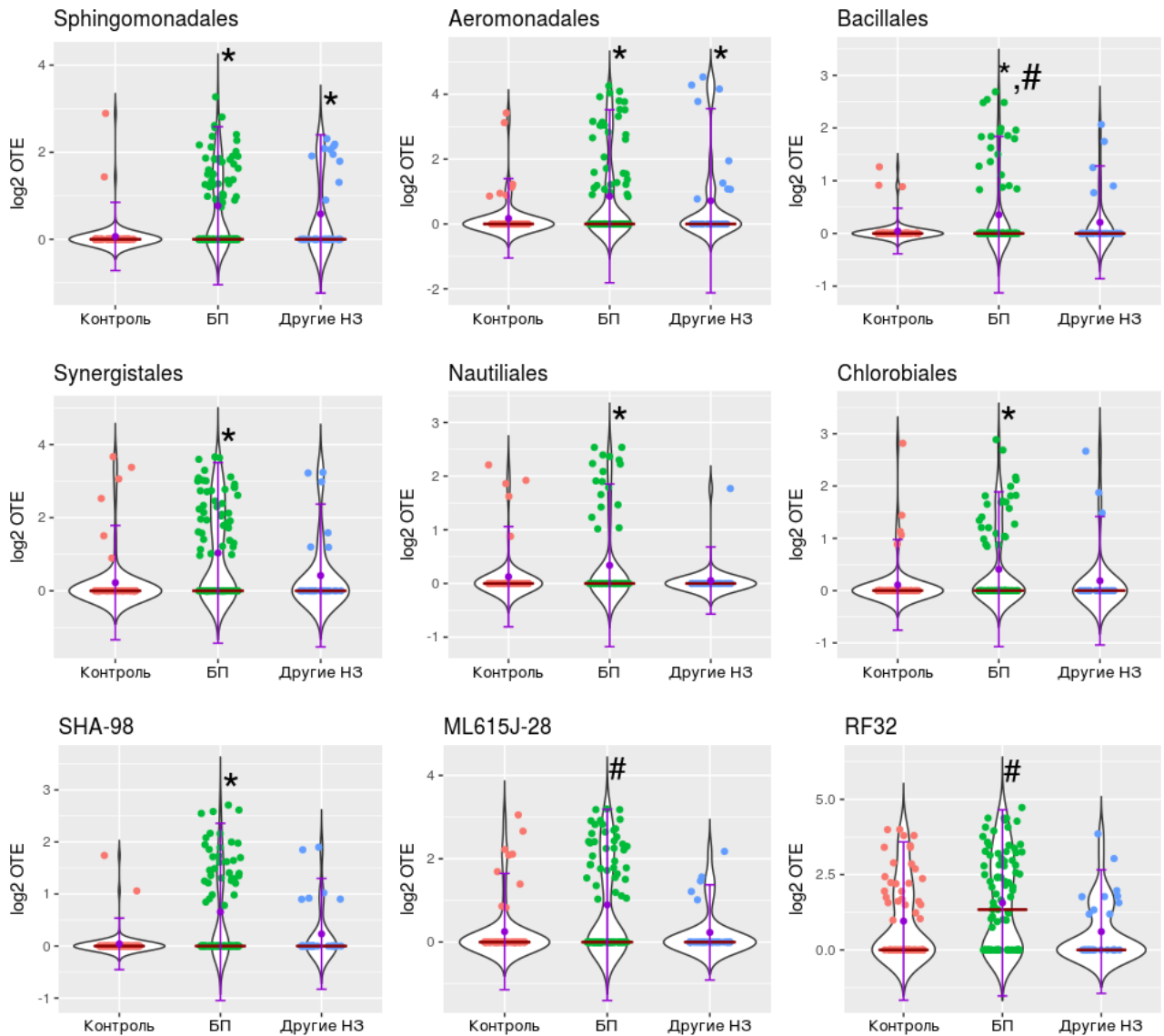


Рисунок 23 — график содержания классов микроорганизмов в микробиоте кишечника.

На графике отображена представленность микроорганизмов в группах пациентов с болезнью Паркинсона (БП, зеленые точки), лиц с другими неврологическими заболеваниями (Другие НЗ, синие точки) и пациентов контрольной группы (Контроль, оранжевые точки). Стороны графиков отображают кривые плотности распределения содержания микроорганизмов, красная черта показывает медиану представленности микроорганизмов, фиолетовая точка показывает среднее значение представленности микроорганизмов, разброс показывает стандартное отклонение содержания микроорганизмов. * — по сравнению с контролем, # — по сравнению с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

Таблица 4. Различия в содержании микроорганизмов на уровне отрядов

Отряд	Образцов, контроль	Образцов, БП	ОТЕ, контроль	ОТЕ, БП	logFC	p-значения
Sphingomonadales	2	45	8	106	1,1861	0,0000
Aeromonadales	7	34	23	203	1,0455	0,0075
Bacillales	3	20	3	50	0,9901	0,0001
Synergistales	6	44	36	193	0,9490	0,0175
Nautiliales	5	17	12	50	0,7403	0,0229
Chlorobiales	5	25	11	54	0,7116	0,0071
SHA-98	2	39	3	87	0,5814	0,0217
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с болезнью Паркинсона						
Отряд	Образцов, БП	Образцов, Другие НЗ	ОТЕ, БП	ОТЕ, Другие НЗ	logFC	p-значения
ML615J-28	39	5	154	10	-1,1965	0,0002
RF32	56	10	401	37	-0,9324	0,0217
Bacillales	20	5	50	9	-0,6560	0,0474
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с другими неврологическими заболеваниями						
Отряд	Образцов, контроль	Образцов, Другие НЗ	ОТЕ, контроль	ОТЕ, Другие НЗ	logFC	p-значения
Aeromonadales	7	9	23	77	1,2379	0,0052
Sphingomonadales	2	10	8	28	0,9703	0,0004
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с другими неврологическими заболеваниями						

На уровне семейств (таб. 5, рис 25) в микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона в сравнении со здоровым контролем преобладали бактерии Sphingomonadaceae, Succinivibrionaceae, Staphylococcaceae, Synergistaceae, Chlorobiaceae, а также Nautiliaceae и Gracilibacteraceae. Микробиота пациентов с другими неврологическими заболеваниями характеризовалась снижением представленности семейств Gracilibacteraceae и Porphyromonadaceae по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона и ростом содержания Sphingomonadaceae и Succinivibrionaceae по сравнению с контрольной группой.

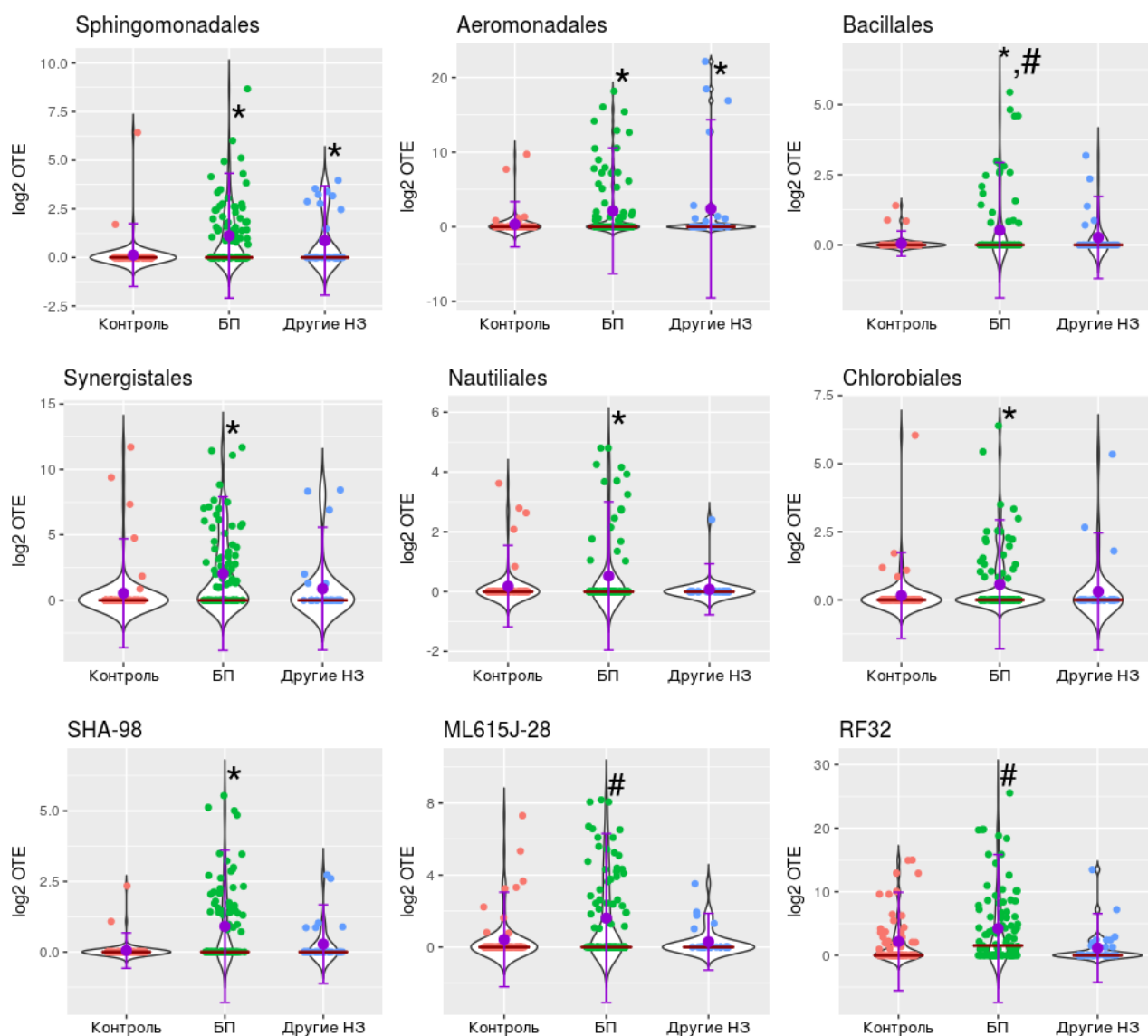


Рисунок 24 — график содержания отрядов микроорганизмов в микробиоте кишечника.

На графике отображена представленность микроорганизмов в группах пациентов с болезнью Паркинсона (БП, зеленые точки), лиц с другими неврологическими заболеваниями (Другие НЗ, синие точки) и пациентов контрольной группы (Контроль, оранжевые точки). Стороны графиков отображают кривые плотности распределения содержания микроорганизмов, красная черта показывает медиану представленности микроорганизмов, фиолетовая точка показывает среднее значение представленности микроорганизмов, разброс показывает стандартное отклонение содержания микроорганизмов. * — по сравнению с контролем, # — по сравнению с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

Таблица 5. Различия в содержании микроорганизмов на уровне семейств

Семейство	Образцов, контроль	Образцов, БП	ОТЕ, контроль	ОТЕ, БП	logFC	p-значения
Sphingomonadaceae	2	45	8	106	1,1861	0,0001
Succinivibrionaceae	7	34	23	203	1,0455	0,0126
Staphylococcaceae	3	20	3	50	0,9901	0,0003
Synergistaceae	6	44	36	193	0,9490	0,0287
Nautiliaceae	5	17	12	50	0,7403	0,0466
Gracilibacteraceae	6	37	15	90	0,7313	0,0466
Chlorobiaceae	5	25	11	54	0,7116	0,0126
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с болезнью Паркинсона						
Семейство	Образцов, БП	Образцов, Другие НЗ	ОТЕ, БП	ОТЕ, Другие НЗ	logFC	p-значения
Gracilibacteraceae	37	5	90	18	-1,0147	0,0083
Porphyromonadaceae	95	31	2404	520	-0,7600	0,0022
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с другими неврологическими заболеваниями						
Семейство	Образцов, контроль	Образцов, Другие НЗ	ОТЕ, контроль	ОТЕ, Другие НЗ	logFC	p-значения
Succinivibrionaceae	7	9	23	77	1,2379	0,0083
Sphingomonadaceae	2	10	8	28	0,9703	0,0016
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с другими неврологическими заболеваниями						

На уровне бактериальных родов (таб. 6, рис. 26-28) микробиота кишечника пациентов с болезнью Паркинсона характеризовалась повышением представленности *Klebsiella*, *Sphingomonas*, *Enterococcus*, *Succinivibrio*, *Staphylococcus*, p-75-a5, *Cloacibacillus*, *Catonella*, *Lebetimonas*, *Peptoniphilus*, *Christensenella* и снижением содержания *Dethiosulfatibacter* по сравнению с контрольной группой. В микробиоте пациентов с другими неврологическими заболеваниями повышено содержание бактерий *Succinivibrio*, *Klebsiella*, *Sphingomonas*, *Peptostreptococcus*, *Gardnerella* по сравнению с контрольной группой, а также *Gardnerella* и *Blautia* по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона. В то же время у пациентов с другими неврологическими заболеваниями снижена представленность родов *Dethiosulfatibacter*, *Victivallis*, *Methanosphaera* по сравнению с контрольной группой и *Desulfovibrio*, *Parabacteroides* по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона.

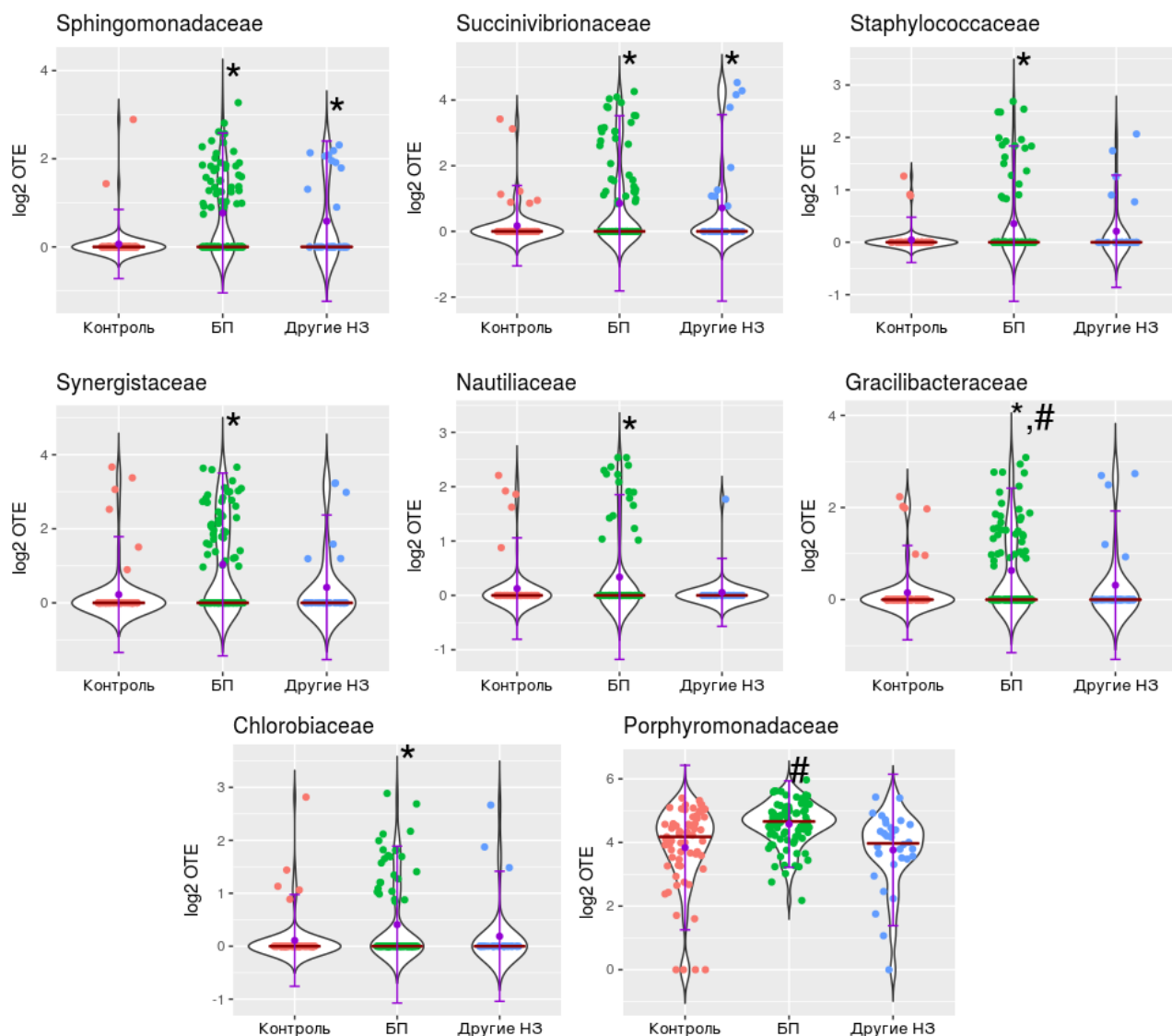


Рисунок 25 — график содержания семейств микроорганизмов в микробиоте кишечника.

На графике отображена представленность микроорганизмов в группах пациентов с болезнью Паркинсона (БП, зеленые точки), лиц с другими неврологическими заболеваниями (Другие НЗ, синие точки) и пациентов контрольной группы (Контроль, оранжевые точки). Стороны графиков отображают кривые плотности распределения содержания микроорганизмов, красная черта показывает медиану представленности микроорганизмов, фиолетовая точка показывает среднее значение представленности микроорганизмов, разброс показывает стандартное отклонение содержания микроорганизмов. * — по сравнению с контролем, # — по сравнению с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

Таблица 6. Различия в содержании микроорганизмов на уровне родов

Род	Образцов, контроль	Образцов, БП	ОТЕ, контроль	ОТЕ, БП	logFC	р-значения
<i>Klebsiella</i>	14	60	66	613	1,2734	0,0196
<i>Sphingomonas</i>	2	45	8	106	1,1861	0,0002
<i>Enterococcus</i>	21	65	71	361	1,0923	0,0019
<i>Succinivibrio</i>	7	34	23	203	1,0455	0,0165
<i>Staphylococcus</i>	3	20	3	50	0,9901	0,0004
<i>p-75-a5</i>	6	40	19	152	0,9648	0,0165
<i>Cloacibacillus</i>	6	44	36	193	0,9490	0,0261
<i>Catonella</i>	18	57	63	244	0,7515	0,0367
<i>Lebetimonas</i>	5	17	12	50	0,7403	0,0421
<i>Peptoniphilus</i>	9	33	21	87	0,7217	0,0363
<i>Christensenella</i>	15	49	33	150	0,7172	0,0167
<i>Dethiosulfatibacter</i>	10	26	26	52	-0,6399	0,0173
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с болезнью Паркинсона						
Род	Образцов, БП	Образцов, Другие НЗ	ОТЕ, БП	ОТЕ, Другие НЗ	logFC	р-значения
<i>Desulfovibrio</i>	55	14	364	69	-0,8953	0,0250
<i>Parabacteroides</i>	95	31	2338	500	-0,7512	0,0036
<i>Gardnerella</i>	11	9	18	18	0,6491	0,0206
<i>Blautia</i>	95	32	17502	9937	0,5771	0,0421
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с другими неврологическими заболеваниями						
Род	Образцов, контроль	Образцов, Другие НЗ	ОТЕ, контроль	ОТЕ, Другие НЗ	logFC	р-значения
<i>Succinivibrio</i>	7	9	23	77	1,2379	0,0102
<i>Klebsiella</i>	14	17	66	100	1,0801	0,0167
<i>Dethiosulfatibacter</i>	10	5	26	8	-0,9917	0,0002
<i>Sphingomonas</i>	2	10	8	28	0,9703	0,0017
<i>Peptostreptococcus</i>	8	16	16	41	0,9529	0,0006
<i>Victivallis</i>	3	2	10	4	-0,7888	0,0041
<i>Methanosphaera</i>	8	3	24	14	-0,7622	0,0363
<i>Gardnerella</i>	4	9	7	18	0,6514	0,0165
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с другими неврологическими заболеваниями						

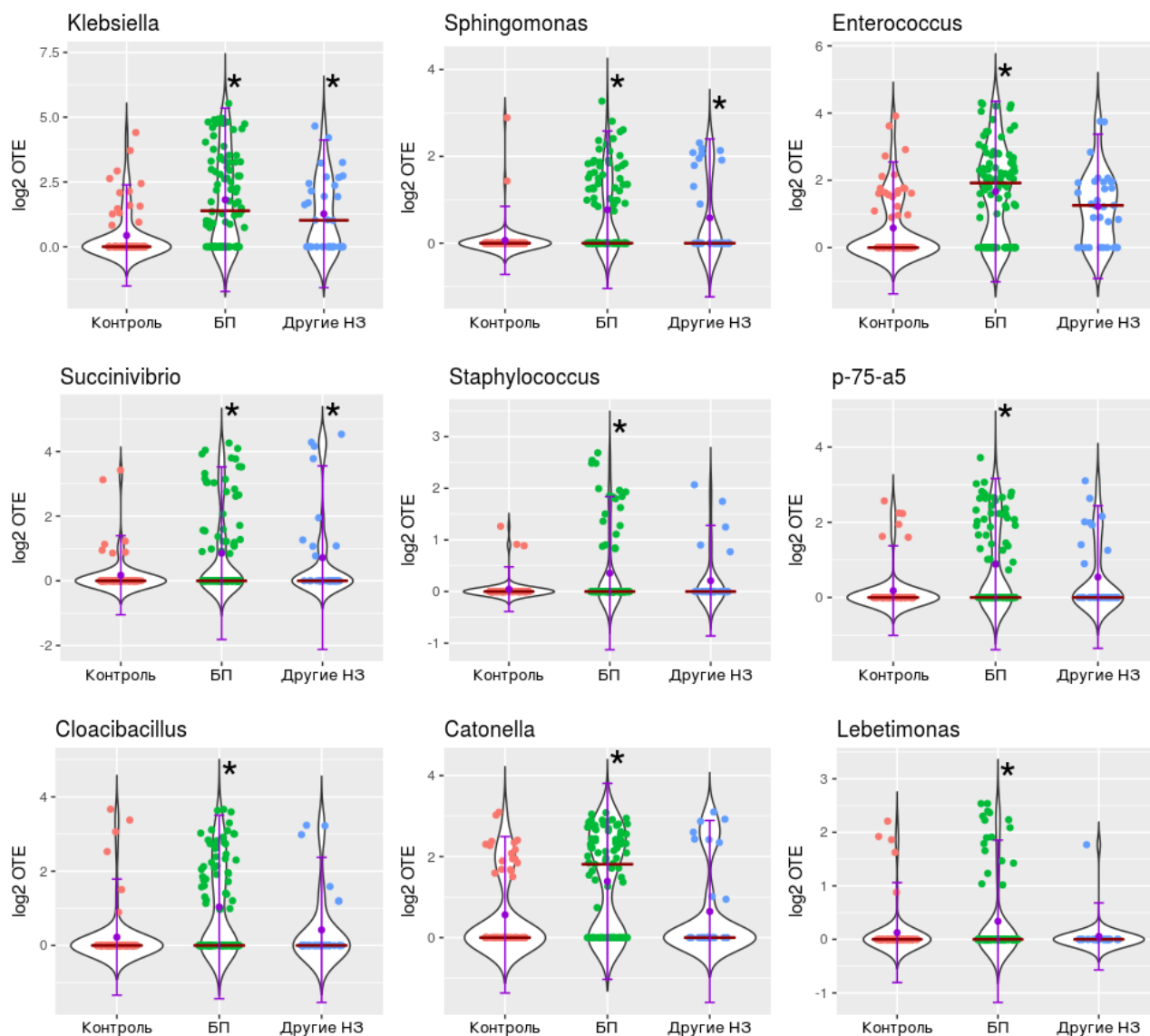


Рисунок 26 – графики содержания родов микроорганизмов в микробиоте кишечника.

На графике отображена представленность микроорганизмов в группах пациентов с болезнью Паркинсона (БП, зеленые точки), лиц с другими неврологическими заболеваниями (Другие НЗ, синие точки) и пациентов контрольной группы (Контроль, оранжевые точки). Стороны графиков отображают кривые плотности распределения содержания микроорганизмов, красная черта показывает медиану представленности микроорганизмов, фиолетовая точка показывает среднее значение представленности микроорганизмов, разброс показывает стандартное отклонение содержания микроорганизмов. * — по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

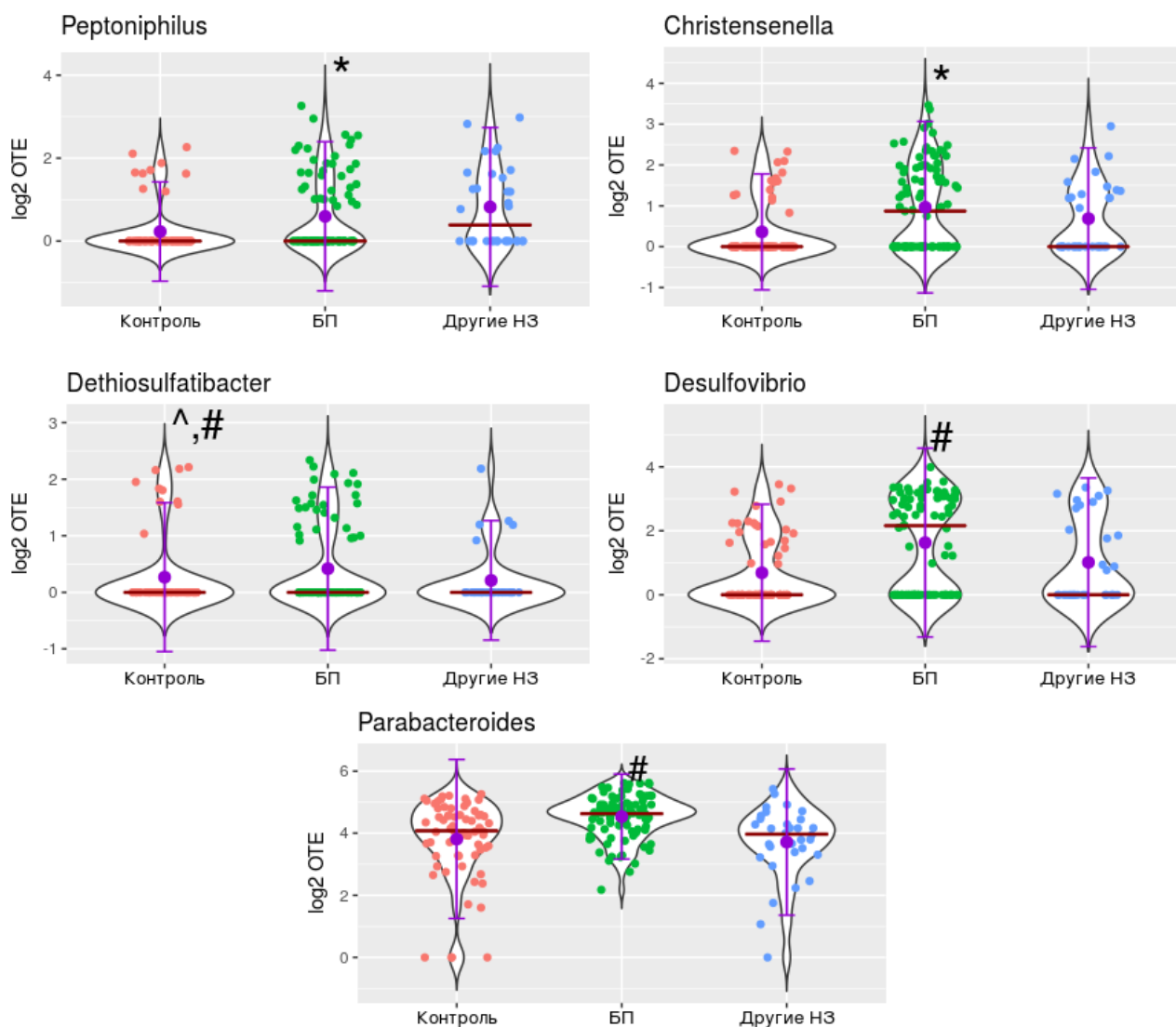


Рисунок 27 – графики содержания родов микроорганизмов в микробиоте кишечника.

На графике отображена представленность микроорганизмов в группах пациентов с болезнью Паркинсона (БП, зеленые точки), лиц с другими неврологическими заболеваниями (Другие НЗ, синие точки) и пациентов контрольной группы (Контроль, оранжевые точки). Стороны графиков отображают кривые плотности распределения содержания микроорганизмов, красная черта показывает медиану представленности микроорганизмов, фиолетовая точка показывает среднее значение представленности микроорганизмов, разброс показывает стандартное отклонение содержания микроорганизмов. * — по сравнению с контролем, # — по сравнению с другими неврологическими заболеваниями, ^ - по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона, $p < 0,05$.

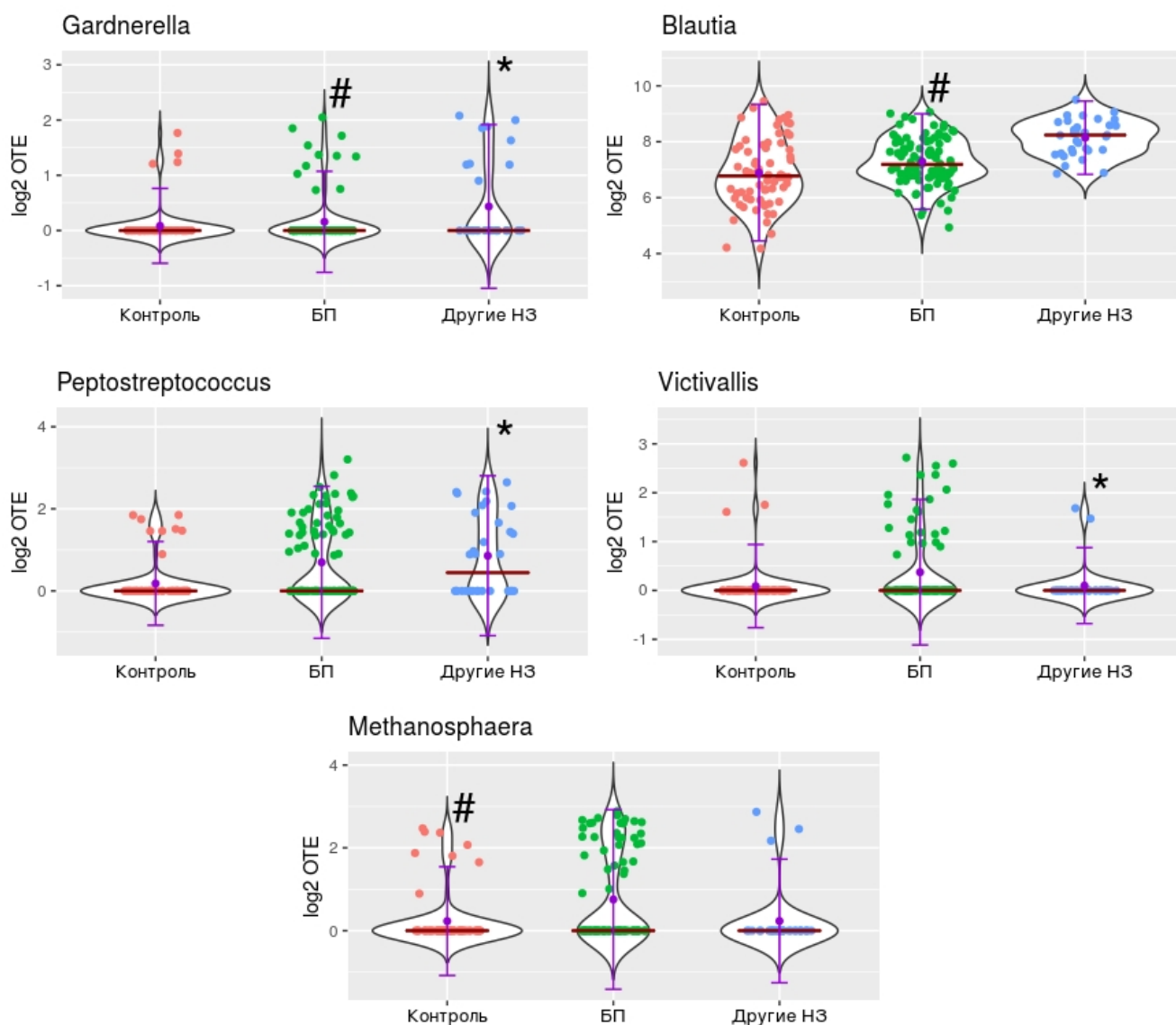


Рисунок 28 — графики содержания родов микроорганизмов в микробиоте кишечника.

На графике отображена представленность микроорганизмов в группах пациентов с болезнью Паркинсона (БП, зеленые точки), лиц с другими неврологическими заболеваниями (Другие НЗ, синие точки) и пациентов контрольной группы (Контроль, оранжевые точки). Стороны графиков отображают кривые плотности распределения содержания микроорганизмов, красная черта показывает медиану представленности микроорганизмов, фиолетовая точка показывает среднее значение представленности микроорганизмов, разброс показывает стандартное отклонение содержания микроорганизмов. * — по сравнению с контролем, # — по сравнению с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

На видовом уровне (таб. 7, рис. 29-30) микробиота пациентов с болезнью Паркинсона отличалась ростом представленности бактерий *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus mucosae*, *Sphingomonas yabuuchiae*, *Staphylococcus epidermidis*,

Bifidobacterium bifidum и *Pseudomonas veronii* по сравнению с контрольной группой и *Bacteroides eggerthii*, *[Eubacterium] cylindroides*, *Bifidobacterium breve* по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями. В свою очередь, у пациентов с другими неврологическими заболеваниями отмечалось повышение представленности *Sphingomonas yabuuchiae* и снижение содержания *Victivallis vadensis* и *Prevotella pallens* по сравнению с контрольной группой.

Таблица 7. Различия в содержании микроорганизмов на уровне видов

Вид	Образцов, контроль	Образцов, БП	ОТЕ, контроль	ОТЕ, БП	logFC	р-значения
<i>Bifidobacterium breve</i>	2	42	6	128	1,5923	0,0000
<i>Lactobacillus mucosae</i>	16	58	89	522	1,2510	0,0269
<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>	2	45	8	106	1,1861	0,0001
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	20	3	50	0,9901	0,0003
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	15	65	71	382	0,7851	0,0353
<i>Pseudomonas veronii</i>	3	13	6	27	0,7089	0,0200
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с болезнью Паркинсона						
Вид	Образцов, БП	Образцов, Другие НЗ	ОТЕ, БП	ОТЕ, Другие НЗ	logFC	р-значения
<i>Bacteroides eggerthii</i>	58	8	312	40	-1,4346	0,0008
<i>[Eubacterium] cylindroides</i>	32	6	165	16	-1,3657	0,0032
<i>Bifidobacterium breve</i>	42	5	128	12	-0,8039	0,0168
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с другими неврологическими заболеваниями						
Вид	Образцов, контроль	Образцов, Другие НЗ	ОТЕ, контроль	ОТЕ, Другие НЗ	logFC	р-значения
<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>	2	10	8	28	0,9703	0,0011
<i>Victivallis vadensis</i>	3	2	10	4	-0,7888	0,0030
<i>Prevotella pallens</i>	9	4	17	8	-0,5727	0,0269
Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов с другими неврологическими заболеваниями						

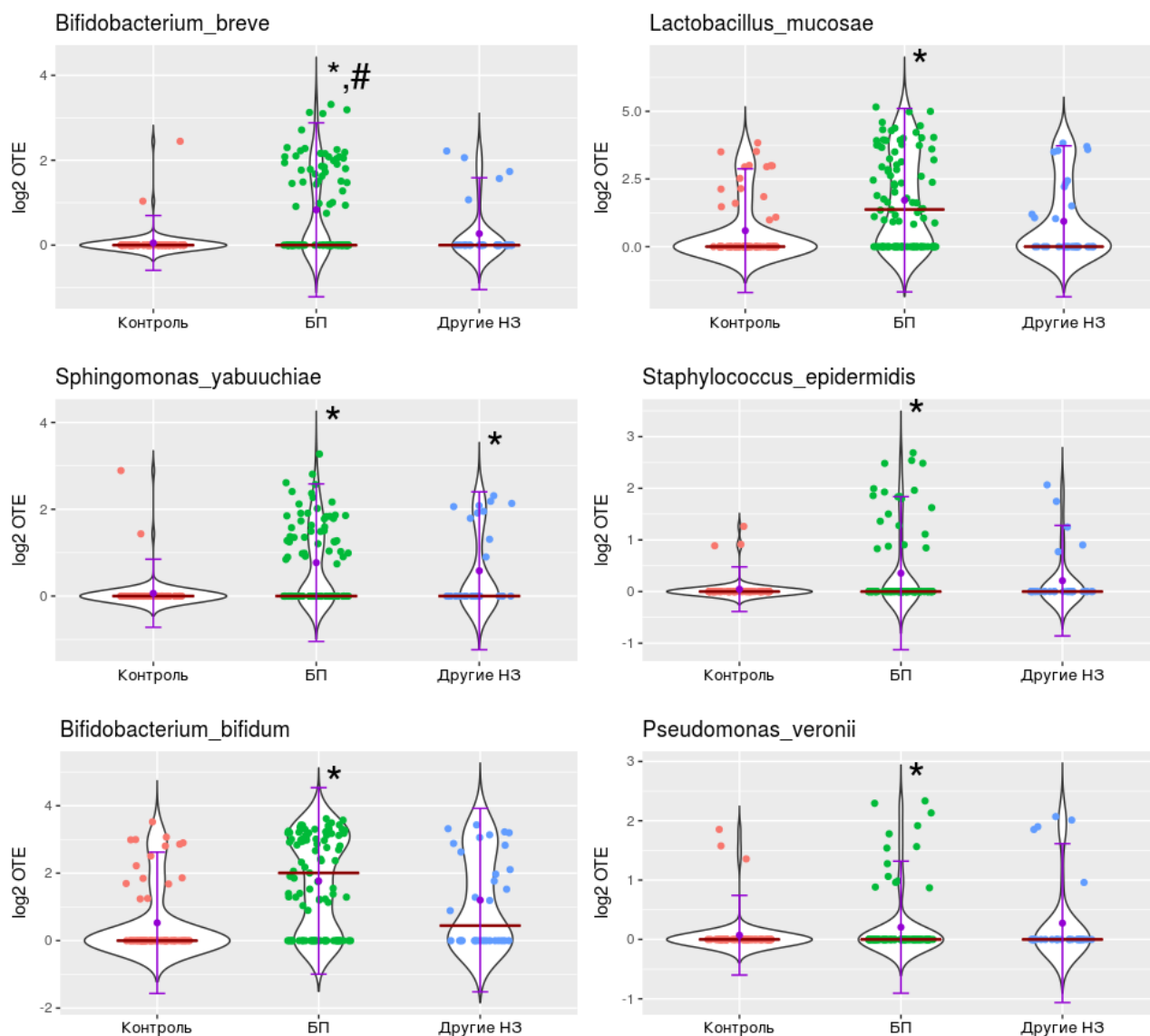


Рисунок 29 — графики содержания видов микроорганизмов в микробиоте кишечника.

На графике отображена представленность микроорганизмов в группах пациентов с болезнью Паркинсона (БП, зеленые точки), лиц с другими неврологическими заболеваниями (Другие НЗ, синие точки) и пациентов контрольной группы (Контроль, оранжевые точки). Стороны графиков отображают кривые плотности распределения содержания микроорганизмов, красная черта показывает медиану представленности микроорганизмов, фиолетовая точка показывает среднее значение представленности микроорганизмов, разброс показывает стандартное отклонение содержания микроорганизмов. * — по сравнению с контролем, # — по сравнению с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

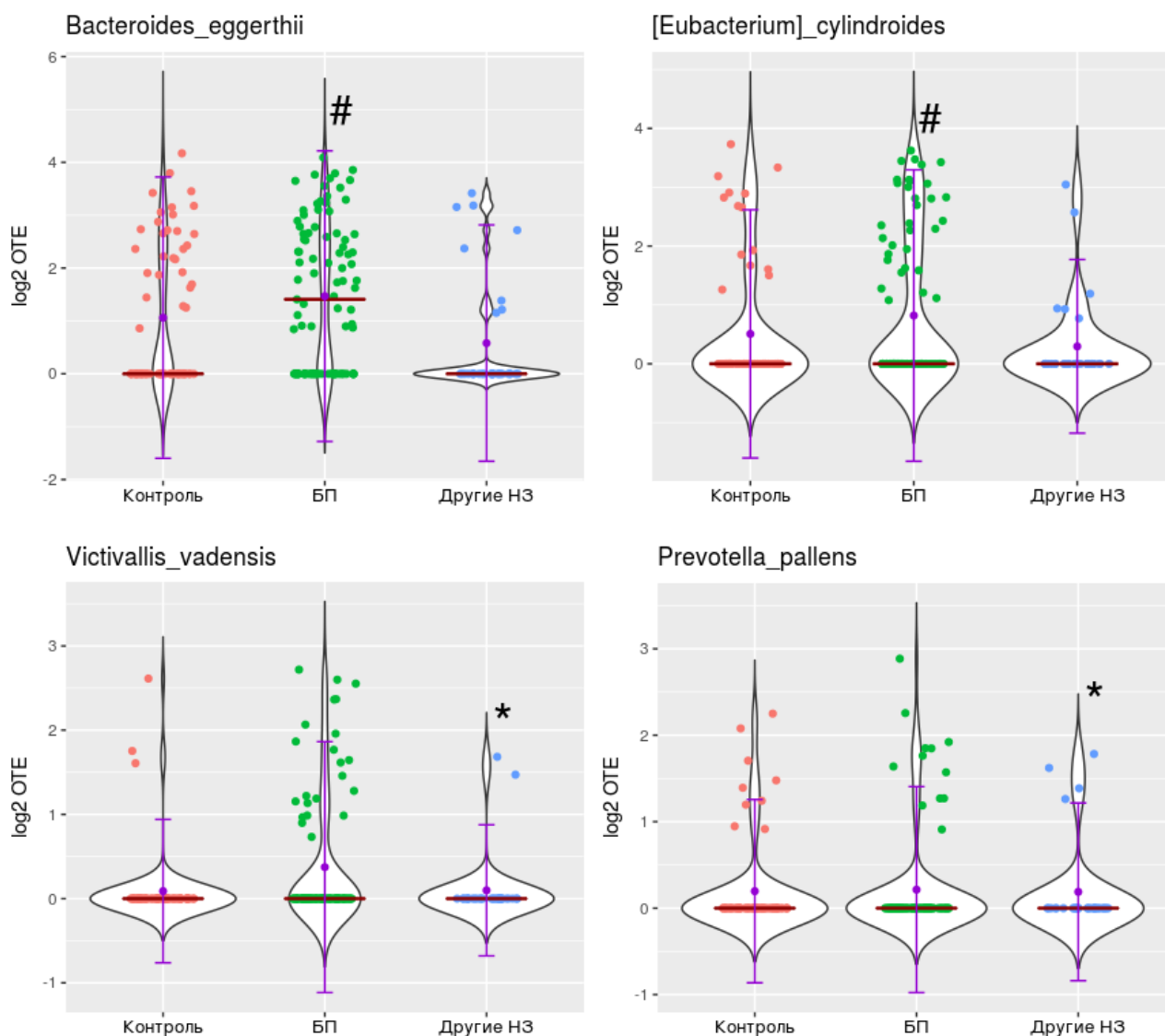


Рисунок 30 — графики содержания видов микроорганизмов в микробиоте кишечника.

На графике отображена представленность микроорганизмов в группах пациентов с болезнью Паркинсона (БП, зеленые точки), лиц с другими неврологическими заболеваниями (Другие НЗ, синие точки) и пациентов контрольной группы (Контроль, оранжевые точки). Стороны графиков отображают кривые плотности распределения содержания микроорганизмов, красная черта показывает медиану представленности микроорганизмов, фиолетовая точка показывает среднее значение представленности микроорганизмов, разброс показывает стандартное отклонение содержания микроорганизмов. * — по сравнению с контролем, # — по сравнению с другими неврологическими заболеваниями, $p < 0,05$.

У пациентов с болезнью Паркинсона наблюдается своеобразие состава микробиоты кишечника на всех таксономических уровнях. С точки зрения особенностей взаимодействия конкретных микроорганизмов с организм-

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 болезнью Паркинсона отмечается повышение представленности бактерий потенциальных продуцентов короткоцепочечных жирных кислот — ацетата и бутирата. К таким микроорганизмам можно отнести *Succinivibrio* и *Acetanaerobacterium* — продуценты ацетата (*S.M.O'Herrin and W.R.Kenealy, 1993; S.Chen and X.Dong, 2004; S.Fukuda et al, 2011*), *Anaerococcus* и *Eubacterium cylindroides* — продуценты бутирата (*E.C.Murphy and I.M.Frick, 2013; P.Jeraldo et al, 2016*), *Peptoniphilus*, *Bifidobacterium breve* и *Bifidobacterium bifidum* — продуценты ацетата и бутирата (*E.C.Murphy and I.M.Frick, 2013; V.Bunesova et al, 2018*). Увеличение содержания бифидобактерий у пациентов с болезнью Паркинсона, определяемое как 16S-секвенированием, так и РТ-ПЦР также отмечается в других исследованиях (*M.M.Unger et al, 2016; E.M.Hill-Burns et al, 2017*).

Как обсуждалось ранее, короткоцепочечные жирные кислоты являются продуктами бактериальной ферментации неперевариваемых 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.Ríos-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*). Гистондеацетилазы (HDAC, англ. histone deacetylase) — группа ферментов, в состав которых входят пять различных классов: класс I —

HDAC 1, 2, 3 и 8; класс IIa — HDAC 4, 5, 7, и 9; класс IIb — HDAC 6 и 10; класс III, включающий белки сиртуины, и класс IV — HDAC 11 (*L.Mouchiroud et al, 2014*). Данные ферменты катализируют удаление ацетильной группы белков-гистонов, участвующих в упаковке цепочек молекулы ДНК в ядре (*D.D.Leipe and D.Landsman, 1997*). Предполагается также, что гистондеацетилазы I и II классов способны осуществлять деацетилирование и негистонных белков (*L.Mouchiroud et al, 2014*). Совместно с ферментами гистонацетилазами они регулируют конденсацию хроматина, таким образом влияя на экспрессию многих генов в организме; при этом, ацетилирование гистонов чаще всего ассоциировано с увеличением генетической экспрессии, тогда как гистондеацетилазы вызывают репрессию транскрипции за счет снижения доступности промоторов генов. В целом, с ингибированием гистондеацетилазы ассоциированы «положительные» для организма человека эффекты — ингибиторы оказывают противоопухолевое и противовоспалительное действие, однако, при болезни Паркинсона эффект от них неоднозначен.

С одной стороны, известно, что ингибиторы деацетилазы способны оказывать нейропротективный эффект на культуре нейронов (*I.F.Harrison and D.T.Dexter, 2013; Choong et al, 2016*). С другой стороны, 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*). Фармакологическое ингибирование активности антагониста гистондеацетилазы, фермента гистонацетилазы, также оказывает протективный эффект (*S.V.Hegarty et al, 2016*).

Роль ингибиторов гистондеацетилазы в регуляции экспрессии, токсичности и конформации α -синуклеина также неоднозначна. Так, показано, что ингибирование гистондеацетилазы способно снижать токсичность α -синуклеина (*E.Kontopoulos et al, 2006*). Однако, ингибирование HDAC6 увеличивает

содержание олигомерной формы α -синуклеина, тогда как повышенная экспрессия данного фермента увеличивает продукцию шаперонов, предотвращающих агрегацию α -синуклеина (*Y.Du 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 болезнью Паркинсона, 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. Однако, ввиду противоречивых результатов исследований, посвященных ингибированию гистондеацетилазы и нейродегенерации, данный вопрос требует дальнейшего активного изучения.

Интересным фактом при болезни Паркинсона является увеличение представленности в кишечной микробиоте ОТЕ бактерий, характеризующихся высокой степенью конкордантности у человека по данным близнецовых исследований.

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, семейств Christensenellaceae и Methanobacteriaceae (рода *Christensenella* и *Methanobrevibacter*, соответственно) по сравнению с контрольной группой, а также класса RF и порядков RF32 и ML615J-28 — по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями. Увеличение представленности

Christensenellaceae и археев рода *Methanobrevibacter* в кишечной микробиоте у пациентов с болезнью Паркинсона отмечается также по результатам других работ по данной тематике (E.M.Hill-Burns et al, 2017; M.M.Unger et al, 2016). Кроме того, содержание археев рода *Methanobrevibacter* в микробиоте кишечника увеличивается и при рассеянном склерозе (Jangi et al, 2016).

Наследственный фон рассматривается как один из этиологических факторов, опосредующих развитие болезни Паркинсона. 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 содержания бактерий с высокой конкордантностью при болезни Паркинсона может быть связано с влиянием генетических факторов, опосредующих предрасположенность к заболеванию, на состав микробиома. Полиморфизмы в генах белков иммунной системы, связанные с болезнью Паркинсона по данным полногеномных ассоциативных исследований, представляют наибольший интерес. Среди таких белков можно отметить LRRK2, TLR9, IL1R2, HLA-DQA1, HLA-DRB6, а также некоторые другие (D.Chang et al, 2017). Особенности врожденного иммунитета могут повлиять на тренды заселения кишечника микроорганизмами в детстве и последующий «отбор» бактерий иммунной системой, приводя к своеобразию состава наследуемых компонентов микробиоты у пациентов.

Кроме того, известно, что наличие бактерий рода *Christensenella* и археев *Methanobrevibacter* в кишечной микробиоте ассоциировано с изменением веса (J.K.Goodrich et al, 2014). Касательно *Christensenella*, результаты метагеномных исследований и заражения модельных животных позволяют с уверенностью утверждать о связи данных бактерий со снижением массы тела (J.K.Goodrich et al, 2014; R.Li et al, 2017), однако для *Methanobrevibacter* данная ассоциация неоднозначна — имеются сведения о повышении содержания данных бактерий при ожирении (L.K.Stenman et al, 2016; C.A.Mbakwa et al, 2015). Известно, что при заболевании болезнью Паркинсона 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 болезни Паркинсона является повышение представленности потенциально пробиотических бактерий, в частности микроорганизмов родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. 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 ДНК 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 значимые различия отсутствуют (*S.Hasegawa et al, 2015*).

В случае нейровоспалительных заболеваний, в частности при рассеянном склерозе, представленность лактобактерий наоборот увеличивалась в контрольной группе. Известно, что бактерии рода *Lactobacillus* способны взаимодействовать с *n.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 болезнью Паркинсона его сывороточный уровень снижается по сравнению с контролем (*M.M.Unger et al, 2011*).

Также к потенциальным пробиотикам с повышенной представленностью при болезни Паркинсона можно отнести и бактерий рода *Oxalobacter*. Эти микроорганизмы участвуют в метаболизме оксалата и рассматриваются в 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 болезнью Паркинсона американской популяции (*A.Keshavarzian et al, 2015*).

Ранее было показано, что при болезни Паркинсона 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). Для кишечной микробиоты пациентов с рассеянным склерозом также характерно увеличение содержания данной бактерии (Jangi et al, 2016). В результате нашего исследования было получено, что у пациентов в микробиоте кишечника повышается содержание бактерий *Bifidobacterium bifidum*, которые также способны к деградации муцина (K.Nishiyama et al, 2017). При этом, содержание бифидобактерий при другом нейродегенеративном заболевании, болезни Альцгеймера, наоборот, повышалось в группе здоровых (Vogt 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 болезни Паркинсона (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 микроорганизмами и тканями кишечника.

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 микробиома кишечника пациентов с болезнью Паркинсона за счет повышения содержания условно-патогенных бактерий.

Так, у пациентов с болезнью Паркинсона отмечается увеличение содержания бактерий рода *Desulfovibrio*. 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* 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* повышается при раке кишечника, 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* способен активировать экспрессию TNFSF15 (белок из семейства ФНО) 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 воспалительных заболеваний кишечника (*D.Q.Shih et al, 2009*).

К условно-патогенным микроорганизмам, свойственным кишечной микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона, также относятся энтерококки, 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, 2015*).

Увеличение содержания оппортунистических патогенов *Klebsiella* в микробиоте кишечника также наблюдается у пациентов с артериальной гипертонией (*J.Li et al, 2017*) и при гастроэнтеритах (*L.Ganji et al, 2016*). Известно, что эктопический рост «оральных» бактерий, в частности рода *Klebsiella*, в кишечнике способен приводить к развитию дизбиоза и местного Th1-зависимого воспаления (*K.Atarashi et al, 2017*).

Достаточно интересным фактом является обнаруженное увеличение представленности актинобактерий в микробиоте пациентов. Бактерий этого типа, в частности нокардий и *M.tuberculosis*, рассматривают в качестве агентов, потенциально способных приводить к развитию болезни Паркинсона (*K.Berstad and J.E.R.Berstad, 2017*). Кроме того, в рамках ретроспективных популяционных исследований установлено, что туберкулез является одним из факторов, увеличивающих риск развития болезни Паркинсона (*C-H.Shen et al, 2016*). Однако для доказательства непосредственного участия микобактерий в развитии заболевания требуется экспериментальное подтверждение.

Кишечная микробиота пациентов характеризуется увеличением содержания типов Synergistetes, Chlorobi и Actinobacteria. Synergistetes — грамотрицательные анаэробы, населяющие желудочно-кишечный тракт млекопитающих, включая и человека. Представителей этого типа зачастую относят к условно-патогенным микроорганизмам, поскольку их количество повышается в зонах абсцессов, при инфекциях мягких тканей и периодонтите (*E.Jumas-Bilak and H.Marchandin, 2014*). С другой стороны, в кишечной микробиоте долгожителей отмечается повышение содержания ОТЕ типа Synergistetes, класса Synergistia и порядка Synergistales, а также других ассоциированных с болезнью Паркинсона бактерий, в частности рода *Bifidobacterium*, и семейства *Christensenellaceae* (*A.Santoro et al, 2018*). Изменения в нейронах, наблюдаемые при болезни Паркинсона, подобны таковым, наблюдаемым при естественном старении организма (*W.R.Markesbery et al, 2009*). Такое совпадение в изменениях микробного ландшафта между долгожителями и пациентами с болезнью Паркинсона может отражать увеличение темпа старения нейронов периферической нервной системы кишечника при данном заболевании.

Наличие оппортунистических патогенов в составе микробиоты способно индуцировать нейродегенеративные процессы. Как обсуждалось ранее, α -синуклеин обладает антибактериальной активностью и его экспрессия растет в ответ на бактериальную нагрузку (*S.C.Park et al, 2016*). Провоспалительные сигналы, проходящие через сигнальный путь Toll-подобного рецептора 2,

который отвечает за распознавание бактериальных агентов, увеличивают экспрессию и токсичность α -синуклеина (*N.Dzamko et al, 2017*).

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 болезни Паркинсона. В любом случае, подобный микробиотический ландшафт приводит к ухудшению состояния кишечника и повышенной секреции провоспалительных факторов, что является дополнительным фактором, нарушающим физиологический состав микробиоты. Это позволяет рассматривать метагеном подобного состава в качестве компонента «порочного патогенетического круга» — нарушение работы кишечника → изменение состава микробиоты → ухудшение состояния кишечника → еще более выраженные изменения в микробиоте и т.д.

Отмечается также некоторое совпадение в составе микробиоты кишечника, характерной для болезни Паркинсона, с микробиотой, наблюдаемой при шизофрении. Так у пациентов с шизофренией наблюдается повышение представленности семейства *Succinivibrionaceae* и родов *Succinivibrio*, *Lactobacillus*, *Klebsiella* и *Methanobrevibacter* (*Y.Shen et al, 2018*). Данный факт может быть связан с тем, что при шизофрении наблюдается увеличение концентрации дофамина, которая корректируется применением нейролептиков. При болезни Паркинсона наоборот, базально уровень дофамина низкий, коррекция производится его предшественниками и агонистами, в частности леводопой. Дофамин, в свою очередь, является медиаторной молекулой для бактерий, он секретируется ими и способен модулировать их рост наряду с другими катехоламинами (*P.Holzer and A.Farzi, 2014; K.S.Kinney et al, 2000*). Дисбаланс дофамина в организме и его медикаментозная коррекция, наблюдаемые и в том, и в другом случае, потенциально способны привести к сходству в метагеномном составе микробиома.

3.1.6 Реконструкция метаболического потенциала микробиоты

В рамках исследования проводилась реконструкция метаболического потенциала микробиоты. После реконструкции проводилась оценка функциональной избыточности микробиоты – сравнительная оценка числа копий генов того или иного метаболического пути в совокупном геноме (метагеноме) микробиоты пациентов разных групп. Как обсуждалось ранее, одной из ключевых функций кишечной микробиоты является синтетическая. Важными продуктами синтеза микроорганизмов кишечника являются короткоцепочечные жирные кислоты, в частности бутират, а также витамины и витаминоподобные вещества. По этой причине в ходе работы в метагеномах реконструировали содержание генов, входящих в состав метаболических путей синтеза бутирата из предшественников: сукцината, глутарата и ацетил-КоА и генов, входящих в состав путей продукции витаминов группы В и витамина К.

По результатам нашего исследования, в ходе реконструкции метаболических путей синтеза бутирата было обнаружено, микробиота пациентов с болезнью Паркинсона характеризуется функциональной избыточностью относительно генов, входящих в метаболический путь синтеза бутирата из предшественника ацетил-КоА по сравнению со здоровым контролем (таб. 8).

Таблица 8 — представленность метаболических путей в микробиоте пациентов по результатам реконструкции

Продукт	Контроль	БП	Другие НЗ
Сукцинат	0.233[0.213;0.274]	0.245[0.214;0.272]	0.232[0.222;0.266]
Ацетил-КоА	0.461[0.429;0.527]	0.508[0.472;0.567]*	0.492[0.458;0.567]
Глутарат	0.23[0.204;0.258]	0.218[0.201;0.241]	0.22[0.21;0.239]

Значения приведены в виде Медиана[Q1;Q3] ед. при поправке по Бенджамини-Хохбергу. Контроль — пациенты контрольной группы, БП — пациенты с болезнью Паркинсона, Другие НЗ — пациенты с другими неврологическими заболеваниями, *- $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

При анализе данных реконструкции содержания генов, входящих в метаболический путь синтеза бутирата (таб. 9), было установлено, что у пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению с контрольной группой в

метагеномах кишечника повышается содержание генов, кодирующих ферменты 4-гидроксибутирил-КоА дегидратазу, винулацетил-КоА Дельта-изомеразу, 3-гидроксибутирил-КоА дегидрогеназу, 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназу, ацетил-КоА С-ацетилтрансферазу, еноил-КоА гидратазу, 3-гидроксибутирил-КоА эпимеразу и додеценил-КоА изомеразу и снижается содержание генов бутират киназы, фосфатбутирилтрансферазы и сукцинил-КоА трансферазы. По сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями, при болезни Паркинсона в метагеномах кишечника повышается представленность генов, кодирующих 4-гидроксибутирил-КоА дегидратазу, винулацетил-КоА дельта-изомеразу, 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназу и снижается содержание генов, кодирующих бутират киназу, фосфатбутирилтрансферазу и сукцинил-КоА трансферазу. У пациентов с другими неврологическими заболеваниями по сравнению со здоровым контролем в метагеномах кишечника увеличивается содержание генов ферментов 3-гидроксибутирил-КоА дегидрогеназы и ацетил-КоА С-ацетилтрансферазы.

Данные метаболической реконструкции свидетельствуют о потенциальном повышении продукции бутирата кишечными бактериями в группе пациентов с болезнью Паркинсона. В метагеномах отмечается увеличение содержания генов, кодирующих ферменты метаболического пути, ассоциированного с синтезом бутирата. Однако, прямые измерения концентрации короткоцепочечных жирных кислот, проведенные на малой выборке пациентов германской популяции, показали увеличение концентрации изобутирата, тогда как содержание бутирата у пациентов с болезнью Паркинсона снижалось (*M.M.Unger et al, 2016*). Ввиду этого требуются дополнительные исследования концентрации данных метаболитов, в частности у пациентов российской популяции.

При анализе данных реконструкции содержания генов, входящих в метаболические пути синтеза витаминов (таб. 10), было установлено, что в метагеноме кишечника пациентов с болезнью Паркинсона снижается представленность генов, входящих в метаболические пути связанные с продукцией витаминов В12, В2 и В3 по сравнению с лицами группы контроля и

группой сравнения (за исключением метаболического пути А синтеза В3) и увеличивается содержание генов, ассоциированных с синтезом В6 по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями.

Таблица 9 — представленность метаболических путей в микробиоте пациентов по результатам реконструкции

Ген	Контроль	БП	Другие НЗ
4-гидроксибутират дегидрогеназа	0[0;0,001]	0[0;0,001]	0[0;0,001]
Транс-2-еноил-КоА редуктаза	0,002[0,001;0,004]	0,003[0,001;0,006]	0,002[0,001;0,004]
Еноил редуктаза ацилпереносящего белка	0,114[0,104;0,125]	0,113[0,1;0,122]	0,114[0,098;0,123]
Фосфатбутирил трансфераза	0,025[0,017;0,034]	0,02[0,014;0,025]*	0,023[0,018;0,029]
Бутират киназа	0,041[0,034;0,053]	0,034[0,028;0,043]*.#	0,045[0,036;0,054]
Ацетат КоА-трансфераза	0,003[0,003;0,005]	0,003[0,002;0,005]	0,004[0,003;0,005]
Бутирил-КоА-ацетоацетат КоА-трансфераза	0,006[0,005;0,008]	0,006[0,004;0,01]	0,006[0,005;0,009]
4-гидроксибутаноил-КоА дегидратаза	0,021[0,017;0,027]	0,029[0,02;0,039]*.#	0,021[0,016;0,028]
Винилацетил-КоА Дельта-изомераза	0,021[0,017;0,027]	0,029[0,02;0,039]*.#	0,021[0,016;0,028]
3-гидроксибутирил-КоА дегидрогеназа	0,081[0,071;0,089]	0,096[0,084;0,107]*	0,086[0,079;0,102]*
3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназа	0,004[0,001;0,013]	0,017[0,006;0,036]*.#	0,007[0,001;0,018]
Ацетил-КоА С-ацетилтрансфераза	0,079[0,069;0,088]	0,087[0,074;0,095]*	0,085[0,079;0,098]*
Сукцинил-КоА трансфераза	0,008[0,006;0,012]	0,005[0,004;0,008]*.#	0,008[0,006;0,016]
Еноил-КоА гидратаза	0,078[0,066;0,093]	0,088[0,078;0,11]	0,085[0,075;0,102]
3-гидроксибутирил-КоА эпимераза	0,004[0,001;0,012]	0,017[0,006;0,036]*.#	0,007[0,001;0,018]
Додеценоил-КоА изомераза	0,001[0;0,004]	0,005[0,001;0,014]*.#	0,001[0;0,006]
Глютаконат КоА-трансфераза	0,001[0,001;0,002]	0,002[0,001;0,003]	0,001[0,001;0,002]

Значения приведены в виде Медиана[Q1;Q3] ед. при поправке по Бенджамини-Хохбергу. Контроль — пациенты контрольной группы, БП — пациенты с болезнью Паркинсона, Другие НЗ — пациенты с другими неврологическими заболеваниями, *- $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

По данным метаанализа литературы было установлено, что недостаток витамина В12 ассоциирован с развитием периферической нейропатии при

болезни Паркинсона (*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 болезни Паркинсона может выступать одним из механизмов, ухудшающих состояние нейронов периферической нервной системы кишечника, что в итоге может приводить к нарушению моторной функции кишечника за счет ускорения нейродегенеративных процессов.

Таблица 10 — представленность метаболических путей в микробиоте пациентов по результатам реконструкции

Витамин	Контроль	БП	Другие НЗ
В1	0,665[0.64;0.692]	0,653[0.627;0.674]*, #	0,685[0.663;0.712]
В12, метаболический путь А	1,345[1.21;1.507]	1,258[1.078;1.344]*, #	1,46[1.359;1.552]*
В12, метаболический путь В	1,648[1.483;1.867]	1,545[1.372;1.689]*, #	1,818[1.66;1.943]*
В12, метаболический путь С	0,309[0.277;0.333]	0,292[0.248;0.312]*, #	0,324[0.302;0.345]*
В12, метаболический путь D	0,486[0.435;0.561]	0,454[0.379;0.49]*, #	0,54[0.496;0.592]*
В2, метаболический путь А	0,673[0.62;0.731]	0,629[0.569;0.682]*, #	0,689[0.629;0.741]
В2, метаболический путь В	0,343[0.315;0.371]	0,324[0.294;0.353]*, #	0,355[0.328;0.39]
В3, метаболический путь А	0,931[0.915;0.953]	0,902[0.883;0.93]*	0,92[0.89;0.947]
В3, метаболический путь В	0,684[0.66;0.7]	0,65[0.623;0.683]*, #	0,692[0.652;0.723]
В5	0,888[0.848;0.908]	0,893[0.867;0.912]	0,895[0.885;0.928]
В6, метаболический путь А	0,201[0.179;0.238]	0,212[0.189;0.233]#	0,19[0.163;0.212]
В6, метаболический путь В	0,121[0.1;0.137]	0,115[0.097;0.136]	0,11[0.086;0.135]
В7, метаболический путь А	0,235[0.219;0.258]	0,234[0.201;0.259]	0,235[0.219;0.251]
В7, метаболический путь В	0,852[0.821;0.892]	0,861[0.819;0.897]	0,835[0.818;0.885]
В9, метаболический путь А	1,257[1.217;1.32]	1,244[1.192;1.304]#	1,336[1.246;1.387]
В9, метаболический путь В	0,928[0.901;0.993]	0,926[0.886;0.979]#	0,997[0.922;1.026]*
К	0,165[0.109;0.242]	0,191[0.136;0.267]#	0,135[0.075;0.207]*

Значения приведены в виде Медиана[Q1;Q3] ед. при поправке по Бенджамини-Хохбергу. Контроль — пациенты контрольной группы, БП — пациенты с болезнью Паркинсона, Другие НЗ — пациенты с другими неврологическими заболеваниями, *- $p < 0.05$ по сравнению с контролем; # - $p < 0.05$ по сравнению с Other.

Метаболический потенциал по продукции витамина К оказался снижен у пациентов с другими неврологическими заболеваниями по сравнению с

пациентами с болезнью Паркинсона и контрольной группой. Известно, что витамин К3 способен к активации белкового воспалительного комплекса, «инфламмосомы» (*W.Wang et al, 2016*). При болезни Паркинсона в нейронах в ходе активации инфламмосомы происходит увеличение продукции коротких изоформ α -синуклеина, обладающих склонностью к агрегации и цитотоксичностью (*W.Wang et al, 2016*). В этой связи увеличенную продукцию витамина К микробиотой можно рассматривать в качестве одного из механизмов, приводящих к повышению агрегации α -синуклеина в нейронах кишечника.

Таким образом, по данным реконструкции метаболического потенциала кишечной микробиоты установлено, что в микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона наблюдаются изменения в профиле продукции витаминов по сравнению со здоровым контролем и пациентами группы сравнения.

3.2 Микробиота кишечника как источник биомаркеров болезни Паркинсона

3.2.1 Перечень бактериальных родов, выбранных для обучения классификаторов

Для устранения влияния возраста пациентов на качества предсказания с использованием классификаторов осуществляли поиск различий на уровне бактериальных родов между группой пациентов с болезнью Паркинсона (группа БП) и объединенной группой здорового контроля и лиц с другими неврологическими заболеваниями (объединенная контрольная группа) при учете влияния возраста. В группе пациентов с болезнью Паркинсона 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 (таб. 11).

Далее из предложенного перечня с помощью рекурсивного исключения переменных отбирали рода, комбинация которых давала наиболее точное предсказание наличия болезни Паркинсона. В результате применения алгоритма выбран перечень, состоящий из 14 родов, обладающих максимальными показателями точности классификации и каппы Коэна (0.77 ± 0.09 и 0.55 ± 0.17 соответственно, таб. 12, рис. 31). В перечень вошли следующие микроорганизмы: *Christensenella*, *Methanobrevibacter*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Catabacter*, *Desulfovibrio*, *Sphingomonas*, *Yokenella*, *Atopobium*, *Fusicatenibacter*, *Cloacibacillus*, *Bulleidia*, *Acetanaerobacterium* и *Staphylococcus* (рис. 32).

Таблица 11. Различия в содержании микроорганизмов на уровне родов, использованные для создания классифицирующих моделей

Род	Образцов, БП	Образцов, контроль	ОТЕ, БП	ОТЕ, контроль	logFC	р-значения
Bulleidia	33	11	145	44	-1,107	0,00044
Staphylococcus	31	15	79	33	-0,940	0,00001
Succinivibrio	34	16	203	100	-0,863	0,01428
Yokenella	44	22	228	54	-0,779	0,01285
Cloacibacillus	44	12	193	64	-0,745	0,01285
Desulfovibrio	55	36	364	153	-0,661	0,01285
p-75-a5	40	15	152	48	-0,649	0,02296
Acetanaerobacterium	30	5	50	13	-0,643	0,00294
Enterococcus	88	62	893	447	-0,619	0,03285
Christensenella	94	85	2460	1140	-0,597	0,03803
Sphingomonas	45	12	106	36	-0,578	0,01285
Papillibacter	63	37	310	134	-0,542	0,03571
Oxalobacter	48	23	149	69	-0,541	0,03462
Anaerococcus	15	9	44	18	-0,538	0,02296
Methanobrevibacter	76	40	443	179	-0,532	0,01285
Catabacter	80	61	851	381	-0,488	0,04690
Leuconostoc	56	36	202	98	-0,466	0,03421
Atopobium	55	36	123	72	-0,333	0,04690
Fusicatenibacter	91	95	1523	1919	0,726	0,03421

Положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов объединенной контрольной группы

Образцов, БП – количество пациентов с болезнью Паркинсона, имеющих данную ОТЕ в составе кишечной микробиоты; образцов, контроль – количество пациентов контрольной группы, имеющих данную ОТЕ в составе кишечной микробиоты; ОТЕ, БП – количество прочтений данной ОТЕ в группе пациентов с болезнью Паркинсона; ОТЕ, контроль – количество прочтений данной ОТЕ в контрольной группе; logFC – кратность различия в представленности ОТЕ, логарифмирована по основанию 2; р-значения приведены с поправкой на множественное сравнение по Бенджамини-Хохбергу.

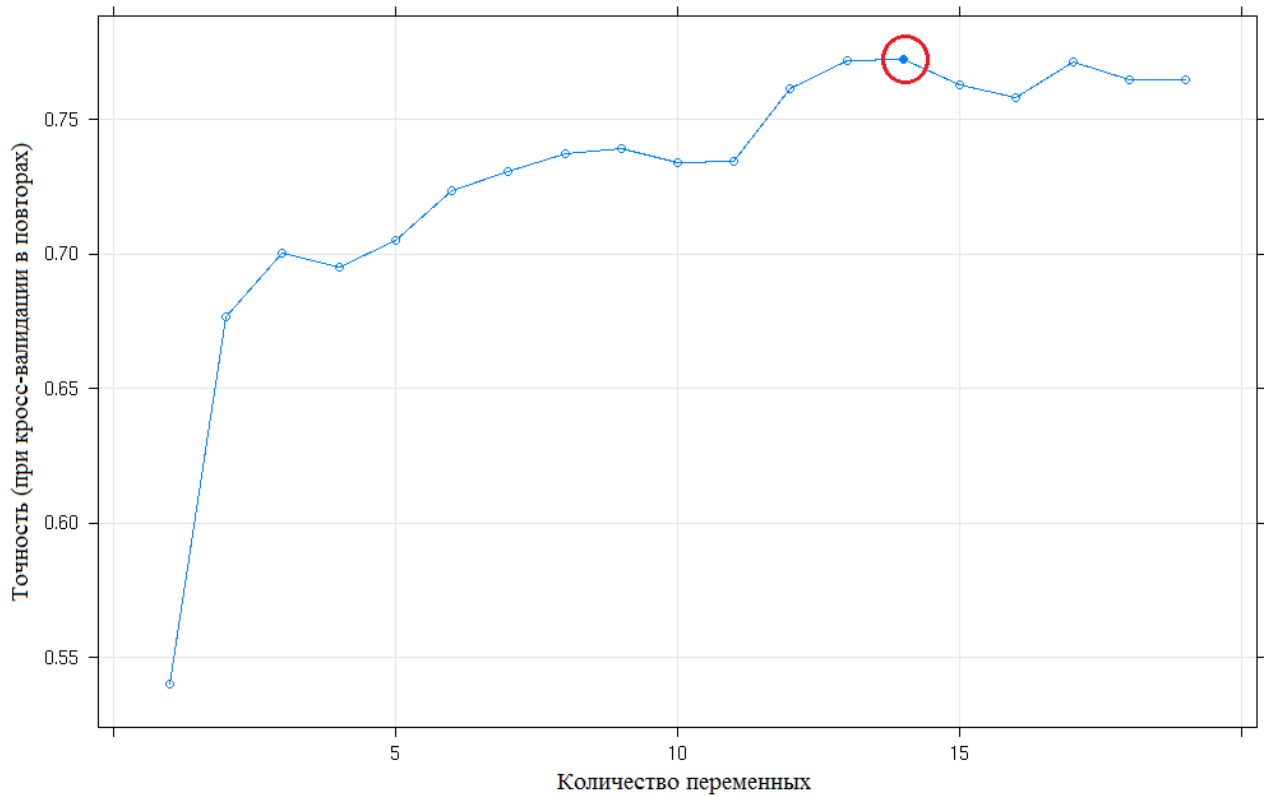


Рисунок 31. Кривая зависимости точности предсказания от числа переменных

Кружками на кривой отмечены различные варианты классификации в зависимости от числа включенных признаков, закрашенным кружком, обведенным красным, отмечен оптимальный вариант.

Таблица 12. Рекурсивный отбор переменных для создания классифицирующих моделей.

Количество переменных	Точность±ст.отклонение	Каппа±ст.отклонение
1	0,5403±0,0992	0,0797±0,1972
2	0,6764±0,1085	0,3517±0,2177
3	0,7002±0,0848	0,4014±0,1687
4	0,6949±0,0945	0,3902±0,1885
5	0,7048±0,0820	0,4103±0,1642
6	0,7236±0,1026	0,4476±0,2055
7	0,7306±0,1005	0,4618±0,2011
8	0,7374±0,1005	0,4754±0,2004
9	0,7389±0,0922	0,4788±0,1831
10	0,7338±0,0807	0,4684±0,1602
11	0,7343±0,0843	0,4687±0,1686
12	0,7616±0,0805	0,5239±0,1600
13	0,7719±0,0844	0,5446±0,1681
14 – выбранная модель	0,7721±0,0866	0,5452±0,1721
15	0,7631±0,0903	0,5269±0,1794
16	0,7581±0,0874	0,5171±0,1730
17	0,7713±0,0923	0,5432±0,1833
18	0,7647±0,0877	0,5298±0,1746
19	0,7647±0,0915	0,5300±0,1820

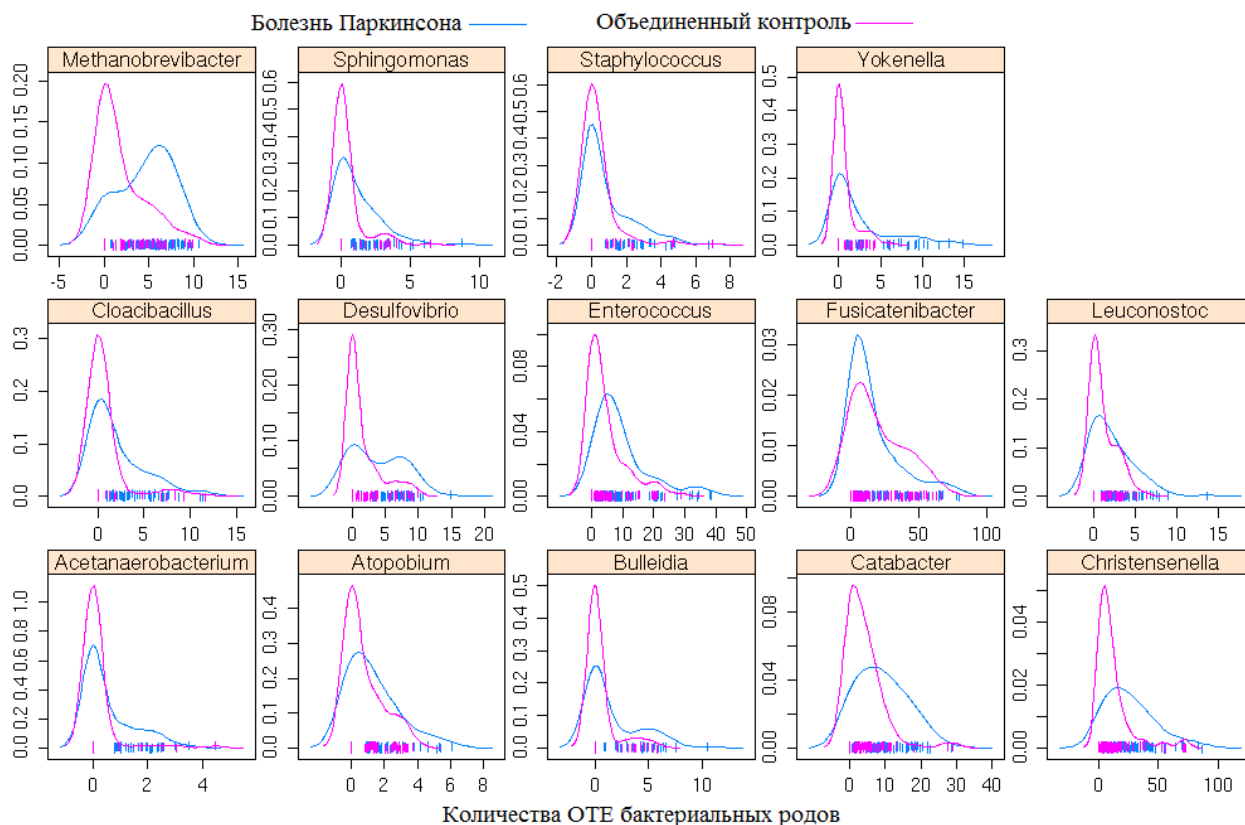


Рисунок 32. Кривые распределения плотности представленности бактериальных родов из перечня переменных, использовавшихся для создания классифицирующих моделей.

Синим цветом отмечены кривые, соответствующие распределению представленности бактерий в экспериментальной группе, розовым цветом отмечены кривые, соответствующие распределению представленности бактерий в объединенной контрольной группе. Синими палочками по оси абсцисс отмечено содержание бактерий в образцах экспериментальной группы, розовыми палочками — в образцах объединенной контрольной группы.

3.2.2 Обучение классифицирующих моделей

Для создания классификаторов использовали метод частичных наименьших квадратов (далее PLS), наивный байесовский классификатор (далее NB), обобщенную линейную модель (далее GLM), однослойную искусственную нейронную сеть с сигмоидной активационной функцией (далее NNET) и машину опорных векторов с применением радиальной базисной функции (далее SVM).

В результате проведения обучения PLS на обучающей выборке обнаружено, что наибольшей точностью обладает вариант классификатора с использованием только первой главной компоненты. Медиана точности классификации составила

73%, средняя точность 76% (таб. 13, рис. 33, 34) при медиане каппы Коэна 0.46 и средней каппы Коэна 0.52 (таб. 14, рис. 33, 35). При обучении алгоритма NB медиана точности классификации при оптимальных параметрах (использование ядерной оценки плотности для определения плотности распределения величин) составила 79%, средняя точность классификации 76% (таб. 13, рис. 33, 34) при медиане каппы Коэна 0.57 и ее среднем значении 0.51 (таб. 14, рис. 33, 35). При использовании обобщенной линейной модели медиана точности классификации составила 74%, средняя точность классификации 72% (таб. 13, рис. 33, 34) при медиане каппы Коэна 0.48 и ее среднем значении 0.44 (таб. 14, рис. 33, 35). Нейронная сеть оптимальной структуры (один слой, содержащий один нейрон) позволила осуществить классификацию пациентов со средней точностью 75% и медианой точности 73% (таб. 13, рис. 33, 34) при среднем значении каппы Коэна 0.50 и ее медиане 0.46 (таб. 14, рис. 33, 35). Медиана точности классификации с использованием SVM с оптимальными параметрами: сигма равным 0.144 и тау равным 16, составила 79%, средняя точность составила 77% (таб. 13, рис. 33, 34), при значении медианы каппы Коэна 0.57 и средней каппы Коэна 0.55 (таб. 14, рис. 33, 35).

Таблица 13. Результаты обучения моделей. Точность классификации.

Классификатор\ точность	Минимум	Первый квартиль	Медиана	Среднее	Третий квартиль	Максимум
PLS	0,5	0,7143	0,7333	0,7602	0,8643	0,9333
SVM	0,5714	0,7143	0,7857	0,7732	0,8667	0,9286
NB	0,5	0,719	0,7857	0,7559	0,846	0,9333
NNET	0,5625	0,7143	0,7333	0,7492	0,846	0,9286
GLM	0,3333	0,6295	0,7417	0,7191	0,8429	0,9333

Таблица 14. Результаты обучения моделей. Каппа Коэна.

Классификатор\ каппа Коэна	Минимум	Первый квартиль	Медиана	Среднее	Третий квартиль	Максимум
PLS	0	0,4286	0,4643	0,5179	0,724	0,8673
SVM	0,1429	0,4286	0,5714	0,5509	0,7321	0,8571
NB	0	0,4325	0,5714	0,5086	0,692	0,8673
NNET	0,125	0,4286	0,4643	0,4978	0,692	0,8571
GLM	-0,3636	0,2589	0,4821	0,4373	0,6879	0,8673

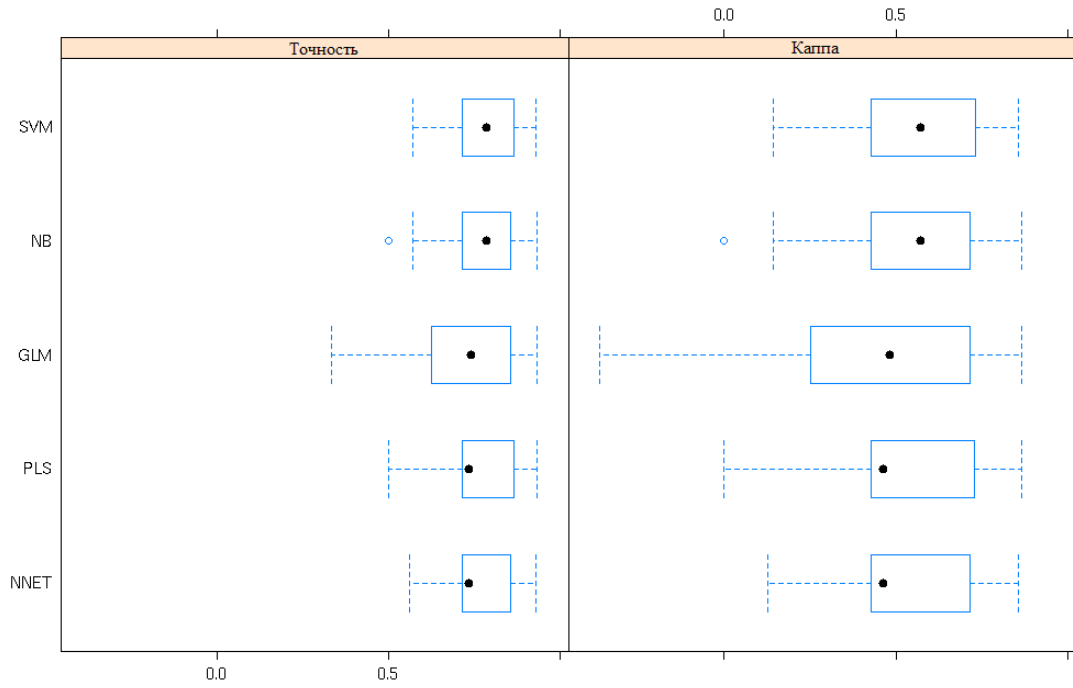


Рисунок 33 – медианы точности классификации и каппы Коэна.

Черной точкой на графике отмечены медианы, границы ящиков показывают первый и третий квартиль, длина усов равна 1,5 длины межквартильного размаха, не закрашенными точками отмечены выбросы.

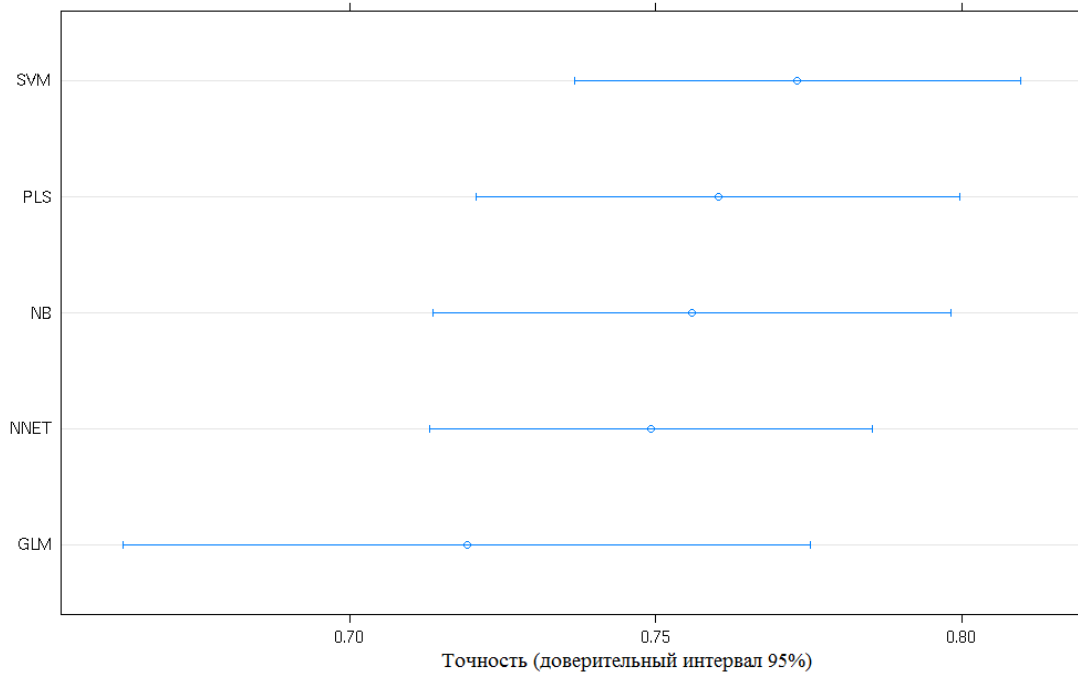


Рисунок 34 – средние значения точности классификации.

Точкой на графике отмечены медианы, усами отмечены значения доверительного интервала.

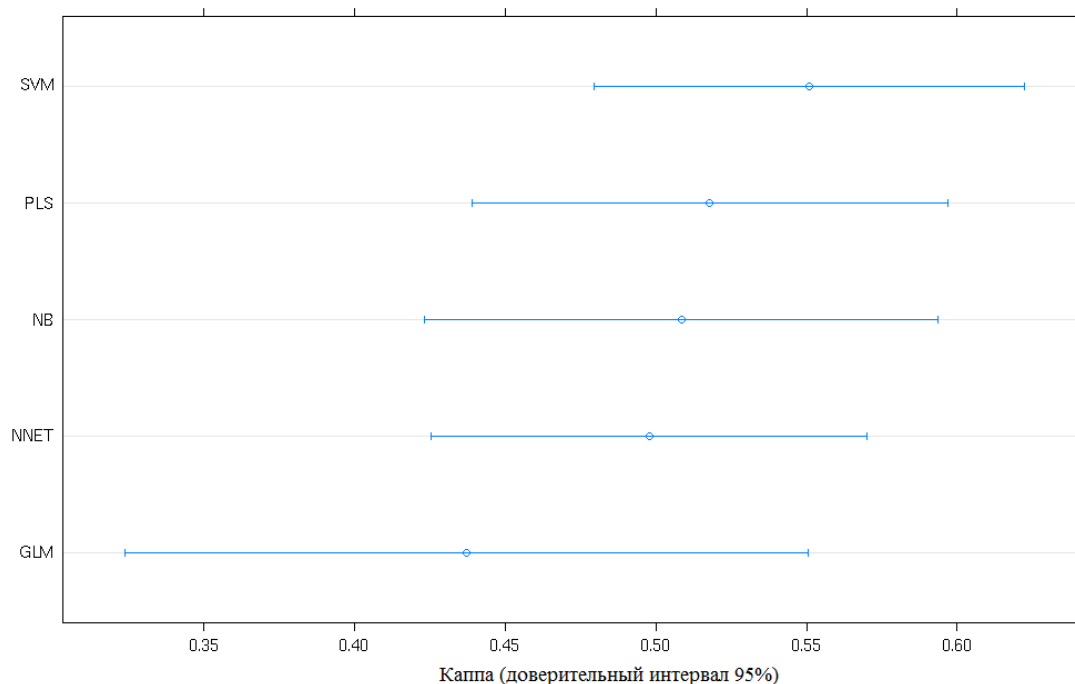


Рисунок 35 – средние значения каппы Коэна.

Точкой на графике отмечены медианы, усами отмечены значения доверительного интервала.

После проведения обучения все классификаторы проверяли на валидационной выборке, оценивая точность классификации, чувствительность, специфичность и каппу Коэна (таб. 15). В результате было обнаружено, что наиболее высокой точностью классификации при оптимальном балансе чувствительности и специфичности, обладал наивный байесовский классификатор (точность 91.49%, чувствительность 91.30%, специфичность 91.67%). Классификатор, основанный на машине опорных векторов, при наиболее высоком значении чувствительности на валидационной выборке обладал достаточно низкой специфичностью классификации и, соответственно, меньшей итоговой точностью классификации (точность 82.98%, чувствительность 100.00%, специфичность 66.67%). Классификаторы, основанные на применении метода частичных наименьших квадратов и однослойной нейронной сети, показали одинаковую точность классификации в 76.60%, при этом ANN характеризовалась более высокой чувствительностью, но меньшей специфичностью по сравнению с PLS (чувствительность 69.57% и 65.22, специфичность 83.33% и 87.5%

соответственно). Модель, основанная на применении обобщенной линейной модели, оказалась наименее подходящей для классификации пациентов на основе состава кишечной микробиоты (точность 63.83%, чувствительность 65.22%, специфичность 62.50%).

Таблица 15. Результаты проверки классифицирующих моделей на валидационной выборке.

Модель	Точность, % (ДИ 95%)	Каппа Коэна	Чувствительность, %	Специфичность, %
NB	91,49 (79,62; 97,63)	0,8297	91,30	91,67
SVM	82,98 (69,19; 92,35)	0,6619	100,00	66,67
PLS	76,6 (61,97; 87,7)	0,5296	65,22	87,50
NNET	76,6 (61,97; 87,7)	0,5304	69,57	83,33
GLM	63,83 (48,52; 77,33)	0,2769	65,22	62,50

Таким образом, наиболее оптимальной моделью для классификации пациентов по признаку наличия болезни Паркинсона 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 ранее проведенных исследованиях было показано, что таксономический состав микробиоты кишечника может быть потенциально использован для диагностики болезни Паркинсона (*F.Scheperjans et al, 2015; F.Hopfner et al, 2017; J.R.Bedarf et al, 2017*). Известные классификаторы в целом характеризуются достаточно высокой специфичностью, до 90%, однако низкой чувствительностью, достигающей 66,7% лишь только при использовании дополнительных клинических маркеров, таких как шкала констипации Векснера, что ограничивает применение их в реальной практике без доработки.

В качестве классифицирующих алгоритмов в ранее проведенных исследованиях были использованы такие подходы, как обобщенная линейная модель и ROC-анализ. Однако, в случае отсутствия линейной делимости данные подходы дают плохое качество предсказания. Кроме того, во всех

предыдущих работах подгонка и проверка алгоритмов проводилась на одной и той же выборке, что приводит к так называемому переобучению — завышению параметров качества (точности, чувствительности, специфичности) классификации (*K.K.Dobbin and R.M.Simon, 2011*). Ввиду сложной структуры метагеномных данных, наличие валидационной выборки для проверки качества классификации особенно важно (*E.Pasolli et al, 2016*).

В ходе нашего исследования впервые проведена оценка точности классификации пациентов по составу кишечной микробиоты относительно болезни Паркинсона на валидационной выборке. Полученные нами оценки чувствительности классификации пациентов варьировали от 65,22% до 100%, специфичности от 62,50% до 91,67%. Минимальными параметрами характеризовалась обобщенная линейная модель — в данном случае наблюдается отсутствие линейной делимости классов, что ограничивает эффективность данного алгоритма. Более высокой точностью обладали регрессия методом частичных наименьших квадратов, нейронная сеть и машина опорных векторов. Эти алгоритмы, в частности нейронная сеть, требуют больших объемов выборки для поиска сложных закономерностей в данных, по этой причине на имеющихся данных их точность оказалась недостаточна.

Достаточно интересен тот факт, то оптимальные параметры классификации (чувствительность 91,30%, специфичность 91,67% при точности в 91,49%) 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:

- 1) 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*);

- 2) характеризуется низкой дисперсией оценок вероятности принадлежности к классу, что дает возможность эффективно работать со сложными данными (*D.J.Hand and K.Yu, 2001*).

Недостатком данного алгоритма является плохая точность классификации

данных, полученных из распределений с отличающимися свойствами. Применительно к диагностике болезни Паркинсона это означает, что полученная модель может быть использована только для пациентов российской популяции, для других популяций необходим перерасчет параметров алгоритма. С другой стороны, остальные алгоритмы, использованные в работе, также обладают этим недостатком. Более того, он может быть несколько скорректирован (*S.Magliacane et al, 2017*).

Отмечается также и различия в списках предикторов, использованных для создания алгоритмов для диагностики болезни Паркинсона по составу микробиоты кишечника пациентов. Это можно объяснить различным подходом к выбору таксономических единиц, которые были использованы для классификации. В работах *F.Scheperjans et al, 2015* и *F.Hopfner et al, 2017* в качестве предикторов применялась информация о таксономическом составе микробиоты на уровне бактериальных семейств, в другом исследовании были использованы данные о представленности ОТЕ (*J.R.Bedarf et al, 2017*). В нашей работе для построения классификатора применялась информация о родовом составе микробиома. С другой стороны, на список предикторов могли повлиять и различия в таксономическом составе микробиоты, наблюдаемые между различными популяциями людей (*A.V.Tyakht et al, 2013*). По этой причине, использование информации о функциональном составе микробиоты, ввиду ее относительной гомогенности, может оказаться оптимальным вариантом для создания классификатора, подходящего для применения жителями разных стран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено, что болезнь Паркинсона характеризуется изменениями в таксономической и функциональной композиции микробиоты кишечника как по сравнению с группой здорового контроля, так и с пациентами с другими неврологическими заболеваниями.

Важным интегральным параметром, характеризующим состав микробиоты, является ее видовое разнообразие. Так, в результате исследования отмечалось снижение таксономического разнообразия микробиоты кишечника у пациентов с болезнью Паркинсона и другими неврологическими заболеваниями по сравнению с микробиотой пациентов группы здорового контроля. Оценка попарных различий между микробиомами исследуемых групп, или β -разнообразия, показала, что наличие того или иного неврологического заболевания у пациента оказывало значимое влияние на состав кишечной микробиоты, объясняя порядка 10% дисперсии таксономического состава микробиоты.

Анализ корреляционных сетей бактерий, составляющих микробиоту кишечника, также подтвердил наблюдаемое снижение таксономического разнообразия у пациентов с болезнью Паркинсона. По сравнению с микробиотой здоровых, во микробиоте пациентов наблюдалось нарушение кооперации между бактериями, выраженное в снижении размеров корреляционной сети и уменьшении числа взаимодействующих микроорганизмов.

У пациентов с болезнью Паркинсона наблюдалось 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.

К микроорганизмам, ассоциированным с продукцией короткоцепочечных жирных кислот, представленность которых изменялась при болезни Паркинсона, относятся бактерии родов *Succinivibrio*, *Acetanaerobacterium*, *Anaerococcus*,

Peptoniphilus, а также видов *Eubacterium cylindroides*, *Bifidobacterium breve* и муцинодеградирующей бактерии *Bifidobacterium bifidum*. К бактериям с возможными пробиотическими свойствами, которые по результатам исследования, были ассоциированы с болезнью Паркинсона, относились микроорганизмы рода *Oxalobacter*, и видов *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus mucosae*, *Bifidobacterium bifidum*. В микробиоте пациентов с болезнью Паркинсона также отмечалось увеличение представленности ОТЕ микроорганизмов с высокой степенью конкордантности: класса RF, порядков RF32, SHA-98 и ML615J-28, родов *Christensenella* и *Methanobrevibacter*. Также, с наличием болезни Паркинсона было ассоциировано увеличение представленности условно-патогенных бактерий родов *Desulfovibrio*, *Cloacibacillus*, *Klebsiella*, *Sphingomonas*, *Enterococcus*, и вида *Staphylococcus epidermidis*.

Кроме того, микробиота пациентов с болезнью Паркинсона характеризовалась увеличением представленности бактерий типов Synergistetes, Chlorobi и Actinobacteria, классов Synergistia, Epsilonproteobacteria, Chlorobia и Actinobacteria, отрядов Sphingomonadales, Aeromonadales, Bacillales, Synergistales, Chlorobiales, семейств Sphingomonadaceae, Succinivibrionaceae, Staphylococcaceae, Synergistaceae, Chlorobiaceae, Nautiliaceae и Gracilibacteraceae, родов *p-75-a5* и *Lebetimonas*, видов *Sphingomonas yabuuchiae* и *Pseudomonas veronii*, а также снижением содержания бактерий рода *Dethiosulfatibacter* по сравнению с контрольной группой.

У пациентов с другими неврологическими заболеваниями отмечалось повышением представленности отрядов Sphingomonadales и Aeromonadales, семейств Sphingomonadaceae и Succinivibrionaceae, родов *Succinivibrio*, *Klebsiella*, *Sphingomonas*, *Peptostreptococcus*, *Gardnerella*, вида *Sphingomonas yabuuchiae*, и снижение содержания родов *Dethiosulfatibacter*, *Victivallis*, *Methanosphaera*, видов *Victivallis vadensis* и *Prevotella pallens* по сравнению с контрольной группой. Пациенты с другими неврологическими заболеваниями также характеризовались снижением содержания бактерий отряда Bacillales, семейств Gracilibacteraceae, Porphyromonadaceae, родов *Desulfovibrio*, *Parabacteroides*, и увеличением

представленности родов *Gardnerella* и *Blautia* по сравнению с пациентами с болезнью Паркинсона.

Наряду с изменением таксономического состава кишечной микробиоты, при болезни Паркинсона также наблюдались сдвиги в ее функциональном потенциале по данным реконструкции. Показано, что микробиота пациентов с болезнью Паркинсона 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 болезнью Паркинсона снижалась представленность генов, входящих в метаболические пути связанные с продукцией витаминов В12, В2 и В3 по сравнению с лицами группы контроля и группой сравнения (за исключением метаболического пути А синтеза В3) и увеличивалось содержание генов, ассоциированных с синтезом витаминов В6 и К по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями.

В результате проведенной работы было показано, что таксономическая композиция кишечной микробиоты может послужить источником биомаркеров болезни Паркинсона. В рамках работы проводилось определение потенциальных маркерных микроорганизмов, на основе которых осуществлялось обучение и валидация классифицирующих алгоритмов, в результате чего был подобран оптимальный вариант — наивный байесовский классификатор, использование которого позволило достигнуть максимальных параметров качества классификации (чувствительность 91,30%, специфичность 91,67% при точности в 91,49%) пациентов по перечню биомаркерных микроорганизмов кишечной микробиоты.

Таким образом, по результатам нашего исследования в микробиоте кишечника при болезни Паркинсона наблюдался дисбаланс таксономического и функционального состава. Предполагается следующая схема участия микробиома в патогенезе болезни Паркинсона:

- 1) Рост содержания условно-патогенных бактерий приводит к развитию местного воспаления в кишечнике, при этом истончение муцинового слоя под действием

муцин-деградирующих бактерий увеличивает проницаемость кишечной стенки для патогенов. В ходе воспалительного процесса происходит увеличение экспрессии и секреции α -синуклеина, провоспалительных цитокинов.

2) Повышение содержания продуцентов КЖК и генов метаболического пути синтеза бутирата в микробиоте приводит к увеличению продукции короткоцепочечных жирных кислот, которые являются ингибиторами гистондеацетилаз эукариотических клеток. Эффекты, связанные с ингибированием гистондеацетилаз включают в себя индукцию апоптоза, увеличение экспрессии «патологических» изоформ α -синуклеина и стресс-чувствительных протеинкиназ дельта, а также снижение экспрессии генов, кодирующих шапероны, участвующие в контроле фолдинга α -синуклеина.

3) Повышение чувствительности к проапоптотическим стимулам вкупе с ростом экспрессии α -синуклеина и снижением секреции нейропротективных витаминов В2 и В12 микробиотой приводят к ускорению темпов нейродегенерации и накопления телец Леви в нервных клетках.

Подобное состояние микробиоты кишечника вписывается в общепринятые гипотезы о природе и месте возникновения первичных очагов нейродегенерации при болезни Паркинсона. В рамках гипотезы Х.Брака о первичности периферического (в т.ч. и кишечного) нейродегенеративного процесса, такое состояние кишечной микробиоты является подходящим «плацдармом» для запуска нейродегенерации с последующим прионоподобным распространением телец Леви по организму по механизму ретроградного аксонального транспорта. В рамках гипотезы о первичности поражения дофаминергических нейронов ЦНС такая картина может быть результатом нарушения иннервации периферических отделов кишечника — снижение перистальтики и трофики кишечника приводит к изменению таксономического состава кишечника. Это ведет к активации воспаления и иммунного ответа, что еще больше нарушает структуру микробиоты.

Использование биомаркеров нового типа, метагеномных биомаркеров,

является перспективным направлением для разработки современных диагностических средств. С использованием информации о микробиоме возможно различать пациентов с болезнью Паркинсона от лиц с другими неврологическими заболеваниями, что свидетельствует о своеобразии кишечной микробиоты при данной патологии.

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%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1) Результаты, полученные в ходе исследования, подтверждают возможность использования информации о составе кишечной микробиоты для проведения диагностики болезни Паркинсона.

2) Изменения в таксономическом составе кишечной микробиоты, наблюдаемые при болезни Паркинсона, позволяют рассмотреть возможность использования коррекции микробиома с использованием трансплантации микробиоты от здоровых доноров.

Перспективы дальнейшей разработки темы

1) Для улучшения качества диагностики болезни Паркинсона с использованием информации о составе кишечной микробиоты рекомендовано подробное исследование функциональной активности микробиома с использованием полногеномного секвенирования с дальнейшим использованием данной информации в качестве дополнительного биомаркера.

2) Для уточнения паттернов секреции короткоцепочечных жирных кислот микробиотой кишечника при болезни Паркинсона рекомендовано исследование метаболомного профиля кишечного содержимого пациентов.

3) Для установления роли изменений состава микробиоты кишечника в этиологии и патогенезе болезни Паркинсона (индукция заболевания или его следствие) рекомендована оценка влияния отдельных микроорганизмов и композиций микроорганизмов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, на продукцию α -синуклеина в клеточной модели *in vitro*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1) Анучин А.М., Чувелев Д.И., Кировская Т.А., Олескин А.В. Действие нейромедиаторных моноаминов на ростовые характеристики *Escherichia coli* K-12 // Микробиология. 2008. Т. 77. № 6. С. 758–765.
- 2) Ардатская М. Д. и др. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – №. 5 (117).
- 3) Жиленкова О. Г. и др. Масс-спектрометрический анализ микробных метаболитов как экспрессный прием оценки состояния природных микробиоценозов в медицинской и санитарно-гигиенической практике // Лабораторная служба. – 2016. – Т. 5. – №. 3. – С. 43-43.
- 4) Иллариошкин С. Н. Течение болезни Паркинсона и подходы к ранней диагностике // Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей по материалам II Национального конгресса (под ред. СН Иллариошкина, ОС Левина). М. – 2011. – С. 41-47.
- 5) Кожевников А. А. и др. Кишечная микробиота: современные представления о видовом составе, функциях и методах исследования // РМЖ. – 2017. – Т. 25. – №. 17. – С. 1244-1247.
- 6) Кожиева М. Х. и др. Кишечная микробиота человека и рассеянный склероз // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. Спецвыпуски. – 2017. – Т. 117. – №. 10. – С. 11-19.
- 7) Маликина К.Д., Шишов В.А., Чувелёв Д.И., Кудрин В.С., Олескин А.В. Регуляторная роль нейромедиаторных аминов в клетках *Saccharomyces cerevisiae* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 672–677.
- 8) Огородова Л. М. и др. Сравнительный анализ орофарингеальной микробиоты у больных хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой различной степени тяжести // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70. – №. 6. Doi: 10.15690/vramn532
- 9) Олескин А. В., Эль-Регистан Г. И., Шендеров Б. А. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота–хозяин: роль нейромедиаторов //

Микробиология. — 2016. — Т. 85, № 1. — С. 1–24.

10) Страховская М.Г., Иванова Е.В., Фрайкин Г.Я. Стимулирующее влияние серотонина на рост дрожжей *Candida guilliermondii* и бактерий *Streptococcus faecalis* // Микробиология. 1993. Т. 62. № 1. С. 46–49.

11) Шендеров Б. А. и др. Кишечная микробиота человека и нейродегенеративные заболевания //Поликлиника. – 2016. – №. 1-1. – С. 7-13.

12) Шендеров Б. А. Роль митохондрий в профилактической, восстановительной и спортивной медицине //Вестник восстановительной медицины. – 2018. – Т. 83. – №. 1. – С. 21-31.

13) Шендеров Б. А. Роль питания и симбиотической микробиоты в эпигенетике хронических соматических заболеваний //Вопросы диетологии. – 2015. – Т. 5. – №. 1. – С. 22.

14) Шпаков А.О. Сигнальные молекулы бактерий непептидной природы QS-типа // Микробиология. 2009. Т. 78. № 2. С. 163–175.

15) Abbott R. D. et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease //Neurology. – 2001. – Т. 57. – №. 3. – С. 456-462. doi:10.1212/WNL.57.3.456

16) Abeysirigunawardena S. C. et al. Evolution of protein-coupled RNA dynamics during hierarchical assembly of ribosomal complexes //Nature communications. – 2017. – Т. 8. – №. 1. – С. 492. doi:10.1038/s41467-017-00536-1

17) Akbar U. et al. Weight loss and impact on quality of life in Parkinson's disease //PloS one. – 2015. – Т. 10. – №. 5. – С. E0124541. doi:10.1371/journal.pone.0124541.

18) Alauzet C., Marchandin H., Lozniewski A. New insights into *Prevotella* diversity and medical microbiology //Future microbiology. – 2010. – Т. 5. – №. 11. – С. 1695-1718. doi: 10.2217/fmb.10.126.

19) Alekseyenko A. V. et al. Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis //Microbiome. – 2013. – Т. 1. – №. 1. – С. 31. doi: 10.1186/2049-2618-1-31.

20) Amaral F. A. et al. Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Т. 105. – №. 6. – С. 2193-2197. doi:10.1073/pnas.0711891105.

- 21) Ang Z., Ding J. L. GPR41 and GPR43 in obesity and inflammation—protective or causative? //Frontiers in immunology. – 2016. – T. 7. – C. 28. doi:10.3389/fimmu.2016.00028.
- 22) Arumugam M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome //Nature. – 2011. – T. 473. – №. 7346. – C. 174. doi:10.1038/nature09944.
- 23) Atarashi K. et al. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation //Science. – 2017. – T. 358. – №. 6361. – C. 359-365. doi: 10.1126/science.aan4526.
- 24) Bäckhed F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine //science. – 2005. – T. 307. – №. 5717. – C. 1915-1920. doi:10.1126/science.1104816
- 25) Banks W. A. Evidence for a cholecystokinin gut-brain axis with modulation by bombesin //Peptides. – 1980. – T. 1. – №. 4. – C. 347-351.
- 26) Barry G. Integrating the roles of long and small non-coding RNA in brain function and disease //Molecular psychiatry. – 2014. – T. 19. – №. 4. – C. 410. doi: 10.1038/mp.2013.196.
- 27) Barry G., Mattick J. S. The role of regulatory RNA in cognitive evolution //Trends in cognitive sciences. – 2012. – T. 16. – №. 10. – C. 497-503. doi: 10.1016/j.tics.2012.08.007.
- 28) Bedarf J. R. et al. Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients //Genome medicine. – 2017. – T. 9. – №. 1. – C. 39. doi:10.1186/s13073-017-0428-y.
- 29) Berer K. et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – C. 201711233. doi: 10.1073/pnas.1711233114.
- 30) Berstad K., Berstad J. E. R. Parkinson's disease; the hibernating spore hypothesis //Medical hypotheses. – 2017. – T. 104. – C. 48-53. doi: 10.1016/j.mehy.2017.05.022.
- 31) Bhattarai Y. et al. Human-derived gut microbiota modulates colonic secretion in mice by regulating 5-HT3 receptor expression via acetate production //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2017. – T. 313. – №. 1. – C. G80-G87. doi: 10.1152/ajpgi.00448.2016.

- 32) Bien-Ly N., Watts R. J. The Blood-Brain Barrier's Gut Check //Science translational medicine. – 2014. – T. 6. – №. 263. – C. 263fs46-263fs46. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa2543
- 33) Bik E. M. et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – T. 103. – №. 3. – C. 732-737. doi:10.1073/pnas.0506655103.
- 34) Bindels L. B., Dewulf E. M., Delzenne N. M. GPR43/FFA2: physiopathological relevance and therapeutic prospects //Trends in pharmacological sciences. – 2013. – T. 34. – №. 4. – C. 226-232. doi: 10.1016/j.tips.2013.02.002
- 35) Bono F. et al. Role of dopamine D2/D3 receptors in development, plasticity, and neuroprotection in human iPSC-derived midbrain dopaminergic neurons //Molecular neurobiology. – 2018. – T. 55. – №. 2. – C. 1054-1067. doi: 10.1007/s12035-016-0376-3
- 36) Boontham P. et al. Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis //Clinical science. – 2008. – T. 115. – №. 11. – C. 343-351. doi: 10.1042/CS20080018
- 37) Borg I., Groenen P. J. F. Modern multidimensional scaling: Theory and applications. – Springer Science & Business Media, 2005. ISBN 0-387-94845-7
- 38) Borgdorff H. et al. The association between ethnicity and vaginal microbiota composition in Amsterdam, the Netherlands //PloS one. – 2017. – T. 12. – №. 7. – C. E0181135. doi:10.1371/journal.pone.0181135.
- 39) Braak H. et al. Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology //Neuroscience letters. – 2006. – T. 396. – №. 1. – C. 67-72. doi: 10.1016/j.neulet.2005.11.012
- 40) Braak H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology //Cell and tissue research. – 2004. – T. 318. – №. 1. – C. 121-134. doi: 10.1007/s00441-004-0956-9
- 41) Braak H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease //Neurobiology of aging. – 2003. – T. 24. – №. 2. – C. 197-211. doi: 10.1016/S0197-

4580(02)00065-9

42) Braniste V. et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice //Science translational medicine. – 2014. – T. 6. – №. 263. – C. 263ra158-263ra158. doi:10.1126/scitranslmed.3009759.

43) Breton J. et al. Gut commensal E. coli proteins activate host satiety pathways following nutrient-induced bacterial growth //Cell metabolism. – 2016. – T. 23. – №. 2. – C. 324-334. doi: 10.1016/j.cmet.2015.10.017

44) Brooks A. W. et al. Phylosymbiosis: relationships and functional effects of microbial communities across host evolutionary history //PLoS biology. – 2016. – T. 14. – №. 11. – C. e2000225. doi: 10.1371/journal.pbio.2000225.

45) Brooks G. et al. Jawetz Melnick&Adelbergs Medical Microbiology 26/E. – McGraw Hill Professional, 2012. ISBN 71815783

46) Brucker R. M., Bordenstein S. R. The capacious hologenome //Zoology. – 2013. – T. 116. – №. 5. – C. 260-261. doi: 10.1016/j.zool.2013.08.003.

47) Brucker R. M., Bordenstein S. R. The roles of host evolutionary relationships (genus: Nasonia) and development in structuring microbial communities //Evolution. – 2012. – T. 66. – №. 2. – C. 349-362. doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01454.x

48) Brüssow H. Turning the inside out: the microbiology of atopic dermatitis //Environmental microbiology. – 2016. – T. 18. – №. 7. – C. 2089-2102. doi: 10.1111/1462-2920.13050.

49) Bunesova V., Lacroix C., Schwab C. Mucin cross-feeding of infant bifidobacteria and Eubacterium hallii //Microbial ecology. – 2018. – T. 75. – №. 1. – C. 228-238. doi: 10.1007/s00248-017-1037-4

50) Butler B., Sambo D., Khoshbouei H. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission //Journal of chemical neuroanatomy. – 2017. – T. 83. – C. 41-49. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.06.001

51) Cacabelos R. Parkinson's disease: from pathogenesis to pharmacogenomics //International journal of molecular sciences. – 2017. – T. 18. – №. 3. – C. 551. doi:10.3390/ijms18030551

- 52) Calabrese V. et al. Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis //Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – T. 115. – C. 80-91. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.379.
- 53) Caporaso J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data //Nature methods. – 2010. – T. 7. – №. 5. – C. 335. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
- 54) Chang D. et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci //Nature genetics. – 2017. – T. 49. – №. 10. – C. 1511. doi:10.1038/ng.3955.
- 55) Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population //Scandinavian Journal of statistics. – 1984. – C. 265-270.
- 56) Chaparro J. M. et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility //Biology and Fertility of Soils. – 2012. – T. 48. – №. 5. – C. 489-499. doi: 10.1007/s00374-012-0691-4
- 57) Charlson E. S. et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract //American journal of respiratory and critical care medicine. – 2011. – T. 184. – №. 8. – C. 957-963. doi: 10.1164/rccm.201104-0655OC
- 58) Chen J. et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls //Scientific reports. – 2016. – T. 6. – C. 28484.
- 59) Chen S., Dong X. *Acetanaerobacterium elongatum* gen. nov., sp. nov., from paper mill waste water //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2004. – T. 54. – №. 6. – C. 2257-2262. doi: 10.1099/ijs.0.63212-0
- 60) Chen T. et al. Fiber-utilizing capacity varies in *Prevotella*-versus *Bacteroides*-dominated gut microbiota //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 2594. doi:10.1038/s41598-017-02995-4.
- 61) Chen Y. E., Tsao H. The skin microbiome: current perspectives and future challenges //Journal of the American Academy of Dermatology. – 2013. – T. 69. – №. 1. – C. 143-155. e3. doi: 10.1016/j.jaad.2013.01.016
- 62) Choong C. J. et al. A novel histone deacetylase 1 and 2 isoform-specific inhibitor

- alleviates experimental Parkinson's disease //Neurobiology of aging. – 2016. – T. 37. – C. 103-116. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.001
- 63) Chu D. M. et al. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery //Nature medicine. – 2017. – T. 23. – №. 3. – C. 314. doi: 10.1038/nm.4272.
- 64) Clarke G. et al. Priming for health: gut microbiota acquired in early life regulates physiology, brain and behaviour //Acta Paediatrica. – 2014. – T. 103. – №. 8. – C. 812-819. doi: 10.1111/apa.12674
- 65) Coenye T., Vandamme P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes //FEMS Microbiology Letters. – 2003. – T. 228. – №. 1. – C. 45-49. doi:10.1016/S0378-1097(03)00717-1
- 66) Cohen L. J. et al. Identification of the Colicin V bacteriocin gene cluster by functional screening of a human microbiome metagenomic library //ACS infectious diseases. – 2017. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00081
- 67) Cole J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis //Nucleic acids research. – 2013. – T. 42. – №. D1. – C. D633-D642. doi:10.1093/nar/gkt1244.
- 68) Costello E. K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time //Science. – 2009. – T. 326. – №. 5960. – C. 1694-1697. doi:10.1126/science.1177486.
- 69) Cox P. A., Kostrzewa R. M., Guillemin G. J. BMAA and neurodegenerative illness //Neurotoxicity research. – 2018. – T. 33. – №. 1. – C. 178-183. doi: 10.1007/s12640-017-9753-6
- 70) Craven M. et al. Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn's disease //PLoS One. – 2012. – T. 7. – №. 7. – C. E41594. doi: 10.1007/s12640-017-9753-6
- 71) Dai Z. L., Wu G., Zhu W. Y. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health //Front Biosci. – 2011. – T. 16. – №. 1. – C. 1768-86.
- 72) Davila-Gay A. M. et al. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut

- microbiota and consequences for the host //Pharmacological Research. – 2013. – T. 68. – №. 1. – C. 95-107.
- 73) De Magalhães J. P., Finch C. E., Janssens G. Next-generation sequencing in aging research: emerging applications, problems, pitfalls and possible solutions //Ageing research reviews. – 2010. – T. 9. – №. 3. – C. 315-323. doi:10.1016/j.arr.2009.10.006.
- 74) Del Borgo C. et al. Postpartum fever in the presence of a fibroid: *Sphingomonas paucimobilis* sepsis associated with pyomyoma //BMC infectious diseases. – 2013. – T. 13. – №. 1. – C. 574. doi:10.1186/1471-2334-13-574.
- 75) Deng H., Wang P., Jankovic J. The genetics of Parkinson disease //Ageing research reviews. – 2018. – T. 42. – C. 72-85. doi: 10.1016/j.arr.2017.12.007
- 76) DeSantis T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB //Applied and environmental microbiology. – 2006. – T. 72. – №. 7. – C. 5069-5072. doi: 10.1128/AEM.03006-05
- 77) Desbonnet L. et al. Microbiota is essential for social development in the mouse //Molecular psychiatry. – 2014. – T. 19. – №. 2. – C. 146. doi:10.1038/mp.2013.65.
- 78) Dewhirst F. E. et al. The human oral microbiome //Journal of bacteriology. – 2010. – T. 192. – №. 19. – C. 5002-5017. doi: 10.1128/JB.00542-10
- 79) Di Pilato V. et al. The esophageal microbiota in health and disease //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2016. – T. 1381. – №. 1. – C. 21-33. doi: 10.1111/nyas.13127
- 80) Dias-Jácome E. et al. Gastric microbiota and carcinogenesis: the role of non-*Helicobacter pylori* bacteria: a systematic review //Revista Española de Enfermedades Digestivas. – 2016. – T. 108. – №. 9. – C. 530-540. doi: 10.17235/reed.2016.4261/2016
- 81) Dickson R. P. et al. Bacterial topography of the healthy human lower respiratory tract //MBio. – 2017. – T. 8. – №. 1. – C. E02287-16. doi: 10.1128/mBio.02287-16.
- 82) Dobbin K. K., Simon R. M. Optimally splitting cases for training and testing high dimensional classifiers //BMC medical genomics. – 2011. – T. 4. – №. 1. – C. 31. doi:10.1186/1755-8794-4-31.
- 83) Domingo M. C. et al. *Cloacibacillus* sp., a potential human pathogen associated with bacteremia in Quebec and New Brunswick //Journal of clinical microbiology. –

2015. – T. 53. – №. 10. – C. 3380-3383. doi:10.1128/JCM.01137-15.

84) Dong T. et al. Alteration of stomach microbiota compositions in the progression of gastritis induces nitric oxide in gastric cell //Experimental and therapeutic medicine. – 2017. – T. 13. – №. 6. – C. 2793-2800. doi:10.3892/etm.2017.4373

85) Dreno B. et al. Skin microbiome and acne vulgaris: Staphylococcus, a new actor in acne //Experimental dermatology. – 2017. – T. 26. – №. 9. – C. 798-803. doi: 10.1111/exd.13296

86) Du Y. et al. Histone deacetylase 6 regulates cytotoxic α -synuclein accumulation through induction of the heat shock response //Neurobiology of aging. – 2014. – T. 35. – №. 10. – C. 2316-2328. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.04.029

87) Dzamko N. et al. Toll-like receptor 2 is increased in neurons in Parkinson's disease brain and may contribute to alpha-synuclein pathology //Acta neuropathologica. – 2017. – T. 133. – №. 2. – C. 303-319. doi:10.1007/s00401-016-1648-8.

88) Edgar R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST //Bioinformatics. – 2010. – T. 26. – №. 19. – C. 2460-2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461

89) Ellis M. L. et al. Probiotic properties of Oxalobacter formigenes: an in vitro examination //Archives of microbiology. – 2016. – T. 198. – №. 10. – C. 1019-1026. doi:10.1007/s00203-016-1272-y

90) Faith D. P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity //Biological conservation. – 1992a. – T. 61. – №. 1. – C. 1-10.

91) Faith D. P. Systematics and conservation: on predicting the feature diversity of subsets of taxa //Cladistics. – 1992b. – T. 8. – №. 4. – C. 361-373.

92) Faust K. et al. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome //PLoS computational biology. – 2012. – T. 8. – №. 7. – C. e1002606. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002606

93) Fearnley J. M., Lees A. J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity //Brain. – 1991. – T. 114. – №. 5. – C. 2283-2301. doi: 10.1093/brain/114.5.2283

94) Fernando M. R. et al. Butyrate enhances antibacterial effects while suppressing

- other features of alternative activation in IL-4-induced macrophages //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2016. – T. 310. – №. 10. – C. G822-G831. doi: 10.1152/ajpgi.00440.2015
- 95) Festi D. et al. Gut microbiota and metabolic syndrome //World journal of gastroenterology: WJG. – 2014. – T. 20. – №. 43. – C. 16079. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16079.
- 96) Figliuolo V. R. et al. Sulfate-reducing bacteria stimulate gut immune responses and contribute to inflammation in experimental colitis //Life sciences. – 2017. – T. 189. – C. 29-38. doi: 10.1016/j.lfs.2017.09.014.
- 97) Fischbach M. A., Segre J. A. Signaling in host-associated microbial communities //Cell. – 2016. – T. 164. – №. 6. – C. 1288-1300. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.037.
- 98) Forsyth C. B. et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease //PloS one. – 2011. – T. 6. – №. 12. – C. e28032. doi:10.1371/journal.pone.0028032.
- 99) Forsythe P., Kunze W. A. Voices from within: gut microbes and the CNS //Cellular and molecular life sciences. – 2013. – T. 70. – №. 1. – C. 55-69. doi: 10.1007/s00018-012-1028-z
- 100) Fouhy F. et al. A pilot study demonstrating the altered gut microbiota functionality in stable adults with Cystic Fibrosis //Scientific Reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 6685. doi: 10.1038/s41598-017-06880-y
- 101) Frank D. N. et al. The human nasal microbiota and Staphylococcus aureus carriage //PloS one. – 2010. – T. 5. – №. 5. – C. e10598. doi: 10.1371/journal.pone.0010598.
- 102) Fukuda K. et al. Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene //Journal of UOEH. – 2016. – T. 38. – №. 3. – C. 223-232. doi: 10.7888/juoeh.38.223
- 103) Fukuda S. et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate //Nature. – 2011. – T. 469. – №. 7331. – C. 543. doi: 10.1038/nature09646
- 104) Gaig C., Tolosa E. When does Parkinson's disease begin? //Movement Disorders. – 2009. – T. 24. – №. S2. – C. 656-664. doi:10.1002/mds.22672

- 105) Ganji L. et al. Dysbiosis of fecal microbiota and high frequency of *Citrobacter*, *Klebsiella* spp., and Actinomycetes in patients with irritable bowel syndrome and gastroenteritis //Gastroenterology and Hepatology from bed to bench. – 2016. – T. 9. – №. 4. – C. 325.
- 106) Gill S. R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome //science. – 2006. – T. 312. – №. 5778. – C. 1355-1359. doi:10.1126/science.1124234
- 107) Goetze O. et al. Impaired gastric emptying of a solid test meal in patients with Parkinson's disease using ¹³C-sodium octanoate breath test //Neuroscience letters. – 2005. – T. 375. – №. 3. – C. 170-173. doi:10.1016/j.neulet.2004.11.007
- 108) Goldstein D. S. et al. Cardiac sympathetic denervation in Parkinson disease //Annals of internal medicine. – 2000. – T. 133. – №. 5. – C. 338-347.
- 109) Goodrich J. K. et al. Human genetics shape the gut microbiome //Cell. – 2014. – T. 159. – №. 4. – C. 789-799. doi:10.1016/j.cell.2014.09.053
- 110) Goyal D. K., Miyan J. A. Neuro-immune abnormalities in autism and their relationship with the environment: a variable insult model for autism //Frontiers in endocrinology. – 2014. – T. 5. – C. 29. doi: 10.3389/fendo.2014.00029
- 111) Guo J. et al. Microbial community analysis with ribosomal gene fragments from shotgun metagenomes //Applied and environmental microbiology. – 2016. – T. 82. – №. 1. – C. 157-166. doi:10.1128/AEM.02772-15
- 112) Gupta S., Prasad G. V. R. K., Mukhopadhaya A. *Vibrio cholerae* porin OmpU induces caspase-independent programmed cell death upon translocation to the host cell mitochondria //Journal of Biological Chemistry. – 2015. – T. 290. – №. 52. – C. 31051-31068. doi: 10.1074/jbc.M115.670182
- 113) Gupta V. K., Paul S., Dutta C. Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 1162. doi:10.3389/fmicb.2017.01162.
- 114) Hague K. et al. The distribution of Lewy bodies in pure autonomic failure: autopsy findings and review of the literature //Acta neuropathologica. – 1997. – T. 94. – №. 2. – C. 192-196.
- 115) Hall N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology

- //Journal of Experimental Biology. – 2007. – T. 210. – №. 9. – C. 1518-1525. doi: 10.1242/jeb.001370
- 116) Hamady M., Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges //Genome research. – 2009. – T. 19. – №. 7. – C. 1141-1152. doi: 10.1101/gr.085464.108
- 117) Hamer H. M. et al. The role of butyrate on colonic function //Alimentary pharmacology & therapeutics. – 2008. – T. 27. – №. 2. – C. 104-119. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x
- 118) Hand D. J., Yu K. Idiot's Bayes—not so stupid after all? //International statistical review. – 2001. – T. 69. – №. 3. – C. 385-398. doi: 10.1111/j.1751-5823.2001.tb00465.x
- 119) Handelsman J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products //Chemistry & biology. – 1998. – T. 5. – №. 10. – C. R245-R249. doi: 10.1016/S1074-5521(98)90108-9
- 120) Harrison I. F., Dexter D. T. Epigenetic targeting of histone deacetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease? //Pharmacology & therapeutics. – 2013. – T. 140. – №. 1. – C. 34-52. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.05.010
- 121) Hasegawa S. et al. Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease //PLoS One. – 2015. – T. 10. – №. 11. – C. e0142164. doi: 10.1371/journal.pone.0142164
- 122) Hawkes C. H., Del Tredici K., Braak H. A timeline for Parkinson's disease //Parkinsonism & related disorders. – 2010. – T. 16. – №. 2. – C. 79-84. doi: 10.1016/j.parkreldis.2009.08.007.
- 123) Heckman M. G. et al. Parkinson's disease susceptibility variants and severity of Lewy body pathology //Parkinsonism & related disorders. – 2017. – T. 44. – C. 79-84. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.09.009
- 124) Hegarty S. V., Sullivan A. M., O'Keefe G. W. The Epigenome as a therapeutic target for Parkinson's disease //Neural regeneration research. – 2016. – T. 11. – №. 11. – C. 1735. doi:10.4103/1673-5374.194803.
- 125) Heijtz R. D. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and

- behavior //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – T. 108. – №. 7. – C. 3047-3052. doi: 10.1073/pnas.1010529108.
- 126) Heintz-Buschart A. et al. The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder //Movement Disorders. – 2018. – T. 33. – №. 1. – C. 88-98. doi: 10.1002/mds.27105
- 127) Hill-Burns E. M. et al. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome //Movement disorders. – 2017. – T. 32. – №. 5. – C. 739-749. doi: 10.1002/mds.26942.
- 128) Hilty M. et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways //PloS one. – 2010. – T. 5. – №. 1. – C. E8578. doi: 10.1371/journal.pone.0008578.
- 129) Hird S. M. Evolutionary biology needs wild microbiomes //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 725. doi: 10.3389/fmicb.2017.00725
- 130) Hoban A. E. et al. Microbial regulation of microRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex //Microbiome. – 2017. – T. 5. – №. 1. – C. 102. doi: 10.1186/s40168-017-0321-3
- 131) Holmqvist S. et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats //Acta neuropathologica. – 2014. – T. 128. – №. 6. – C. 805-820. doi: 10.1007/s00401-014-1343-6.
- 132) Holzer P., Farzi A. Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis //Microbial endocrinology: the microbiota-gut-brain axis in health and disease. – Springer, New York, NY, 2014. – C. 195-219. doi:10.1007/978-1-4939-0897-4_9
- 133) Hooper L. V. et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine //Science. – 2001. – T. 291. – №. 5505. – C. 881-884.
- 134) Hopfner F. et al. Gut microbiota in Parkinson disease in a northern German cohort //Brain research. – 2017. – T. 1667. – C. 41-45. doi: 10.1016/j.brainres.2017.04.019.
- 135) Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components //Journal of educational psychology. – 1933. – T. 24. – №. 6. – C. 417.
- 136) Huang Y. J. et al. Understanding the role of the microbiome in chronic obstructive pulmonary disease: principles, challenges, and future directions //Translational

Research. – 2017. – T. 179. – C. 71-83. doi: 10.1016/j.trsl.2016.06.007.

137) Hugon P. et al. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings //The Lancet Infectious Diseases. – 2015. – T. 15. – №. 10. – C. 1211-1219.

138) Imhann F. et al. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease //Gut. – 2016. – C. Gutjnl-2016-312135. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312135

139) Inagaki F. et al. Microbial community in a sediment-hosted CO₂ lake of the southern Okinawa Trough hydrothermal system //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – T. 103. – №. 38. – C. 14164-14169. doi:10.1073/pnas.0606083103

140) Jangi S. et al. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis //Nature communications. – 2016. – T. 7. – C. 12015.

141) Jay Z. J., Inskeep W. P. The distribution, diversity, and importance of 16S rRNA gene introns in the order Thermoproteales //Biology direct. – 2015. – T. 10. – №. 1. – C. 35. doi:10.1186/s13062-015-0065-6

142) Jeffery I. B. et al. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? //Nature Reviews Microbiology. – 2012. – T. 10. – №. 9. – C. 591. doi:10.1038/nrmicro2859

143) Jeraldo P. et al. Capturing one of the human gut microbiome's most wanted: reconstructing the genome of a novel butyrate-producing, clostridial scavenger from metagenomic sequence data //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 783. doi: 10.3389/fmicb.2016.00783.

144) Jin H. et al. Histone Hyperacetylation Up-regulates Protein Kinase C δ in Dopaminergic Neurons to Induce Cell Death RELEVANCE TO EPIGENETIC MECHANISMS OF NEURODEGENERATION IN PARKINSON DISEASE //Journal of Biological Chemistry. – 2014. – T. 289. – №. 50. – C. 34743-34767. doi:10.1074/jbc.M114.576702.

145) Jumas-Bilak E., Marchandin H. The phylum synergistetes //The Prokaryotes. – Springer Berlin Heidelberg, 2014. – C. 931-954. ISBN 978-3-642-38954-2. doi:

10.1007/978-3-642-38954-2_384

- 146) Jung T. H. et al. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway //Nutrition research and practice. – 2015. – T. 9. – №. 4. – C. 343-349. doi: 10.4162/nrp.2015.9.4.343
- 147) Karl J. P. et al. Fecal concentrations of bacterially derived vitamin K forms are associated with gut microbiota composition but not plasma or fecal cytokine concentrations in healthy adults //The American journal of clinical nutrition. – 2017. – T. 106. – №. 4. – C. 1052-1061. doi: 10.3945/ajcn.117.155424.
- 148) Kaufmann H. et al. Autonomic failure as the initial presentation of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies //Neurology. – 2004. – T. 63. – №. 6. – C. 1093-1095. doi: 10.1212/01.wnl.0000138500.73671.dc
- 149) Keshavarzian A. et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease //Movement Disorders. – 2015. – T. 30. – №. 10. – C. 1351-1360. DOI: 10.1002/mds.26307
- 150) Kinney K. S. et al. Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacteria—mechanistic studies //Life sciences. – 2000. – T. 67. – №. 25. – C. 3075-3085. doi: 10.1016/S0024-3205(00)00891-2
- 151) Kinross J. M., Darzi A. W., Nicholson J. K. Gut microbiome-host interactions in health and disease //Genome medicine. – 2011. – T. 3. – №. 3. – C. 14. doi: 10.1186/gm228
- 152) Klein A. M. et al. Molecular evidence for metabolically active bacteria in the atmosphere //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 772. doi: 10.3389/fmicb.2016.00772
- 153) Kohl K. D. et al. Gut microbial ecology of lizards: insights into diversity in the wild, effects of captivity, variation across gut regions and transmission //Molecular ecology. – 2017. – T. 26. – №. 4. – C. 1175-1189. doi: 10.1111/mec.13921.
- 154) Kontopoulos E., Parvin J. D., Feany M. B. α -synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity //Human molecular genetics. – 2006. – T. 15. – №. 20. – C. 3012-3023. doi:10.1093/hmg/ddl243

- 155) Krajmalnik-Brown R. et al. Gut bacteria in children with autism spectrum disorders: challenges and promise of studying how a complex community influences a complex disease //Microbial ecology in health and disease. – 2015. – T. 26. – №. 1. – C. 26914. doi: 10.3402/mehd.v26.26914
- 156) Kramer P., Bressan P. Humans as superorganisms: How microbes, viruses, imprinted genes, and other selfish entities shape our behavior //Perspectives on Psychological Science. – 2015. – T. 10. – №. 4. – C. 464-481. doi: 10.1177/1745691615583131.
- 157) Kuhn M. et al. Caret package //Journal of statistical software. – 2008. – T. 28. – №. 5. – C. 1-26.
- 158) La Cognata V. et al. Splicing: is there an alternative contribution to Parkinson's disease? //Neurogenetics. – 2015. – T. 16. – №. 4. – C. 245-263. doi:10.1007/s10048-015-0449-x.
- 159) Langille M. G. I. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences //Nature biotechnology. – 2013. – T. 31. – №. 9. – C. 814. doi:10.1038/nbt.2676
- 160) Laphorne S. et al. Gut microbial diversity is reduced and is associated with colonic inflammation in a piglet model of short bowel syndrome //Gut Microbes. – 2013. – T. 4. – №. 3. – C. 212-221. doi: 10.4161/gmic.24372
- 161) Laphorne S. et al. Gut microbial diversity is reduced and is associated with colonic inflammation in a piglet model of short bowel syndrome //Gut Microbes. – 2013. – T. 4. – №. 3. – C. 212-221. Laphorne S. et al. Gut microbial diversity is reduced and is associated with colonic inflammation in a piglet model of short bowel syndrome //Gut Microbes. – 2013. – T. 4. – №. 3. – C. 212-221.
- 162) Layeghifard M., Hwang D. M., Guttman D. S. Disentangling interactions in the microbiome: a network perspective //Trends in microbiology. – 2017. – T. 25. – №. 3. – C. 217-228. doi: 10.1016/j.tim.2016.11.008
- 163) Le Bars P. et al. The oral cavity microbiota: between health, oral disease, and cancers of the aerodigestive tract //Canadian journal of microbiology. – 2017. – T. 63. – №. 6. – C. 475-492. doi: 10.1139/cjm-2016-0603

- 164) LeBlanc J. G. et al. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria //Microbial cell factories. – 2017. – T. 16. – №. 1. – C. 79. doi:10.1186/s12934-017-0691-z.
- 165) Lebreton F. et al. Transferable vancomycin resistance in clade B commensal-type *Enterococcus faecium* //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2018. doi: 10.1093/jac/dky039.
- 166) Lederberg J., McCray A. T. Ome SweetOmics--A Genealogical Treasury of Words //The Scientist. – 2001. – T. 15. – №. 7. – C. 8-8.
- 167) Leipe D. D., Landsman D. Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily //Nucleic acids research. – 1997. – T. 25. – №. 18. – C. 3693-3697.
- 168) Leng Y., Chuang D. M. Endogenous α -synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity //Journal of Neuroscience. – 2006. – T. 26. – №. 28. – C. 7502-7512. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0096-06.2006
- 169) Ley R. E. et al. Evolution of mammals and their gut microbes //Science. – 2008. – T. 320. – №. 5883. – C. 1647-1651. doi: 10.1126/science.1155725
- 170) Ley R. E., Peterson D. A., Gordon J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine //Cell. – 2006. – T. 124. – №. 4. – C. 837-848.
- 171) Li J. et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome //Nature biotechnology. – 2014. – T. 32. – №. 8. – C. 834. doi:10.1038/nbt.2942
- 172) Li J. et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension //Microbiome. – 2017. – T. 5. – №. 1. – C. 14. doi:10.1186/s40168-016-0222-x.
- 173) Li R. et al. Effects of oral florfenicol and azithromycin on gut microbiota and adipogenesis in mice //PloS one. – 2017. – T. 12. – №. 7. – C. E0181690. doi:10.1371/journal.pone.0181690.
- 174) Liu B. et al. Vagotomy and Parkinson disease A Swedish register-based matched-cohort study //Neurology. – 2017. – T. 88. – №. 21. – C. 1996-2002.

doi:10.1212/WNL.0000000000003961

175) Liu H. et al. Escherichia coli noncoding RNAs can affect gene expression and physiology of Caenorhabditis elegans //Nature communications. – 2012. – T. 3. – C. 1073. doi:10.1038/ncomms2071.

176) Lloyd-Price J., Abu-Ali G., Huttenhower C. The healthy human microbiome //Genome medicine. – 2016. – T. 8. – №. 1. – C. 51.

177) Lozupone C. A. et al. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities //Applied and environmental microbiology. – 2007. – T. 73. – №. 5. – C. 1576-1585. doi:10.1128/AEM.01996-06.

178) Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities //Applied and environmental microbiology. – 2005. – T. 71. – №. 12. – C. 8228-8235. doi:10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005

179) MacFabe D. F. Enteric short-chain fatty acids: microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: implications in autism spectrum disorders //Microbial ecology in health and disease. – 2015. – T. 26. – №. 1. – C. 28177. doi:10.3402/mehd.v26.28177.

180) Macfarlane G. T., Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health //Journal of AOAC International. – 2012. – T. 95. – №. 1. – C. 50-60. doi:10.5740/jaoacint.SGE_Macfarlane

181) Magliacane S. et al. Causal transfer learning //arXiv preprint arXiv:1707.06422. – 2017.

182) Markesbery W. R. et al. Lewy body pathology in normal elderly subjects //Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. – 2009. – T. 68. – №. 7. – C. 816-822. doi:10.1097/NEN.0b013e3181ac10a7.

183) Maslowski K. M. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 //Nature. – 2009. – T. 461. – №. 7268. – C. 1282. doi:10.1038/nature08530.

184) Maslowski K. M., Mackay C. R. Diet, gut microbiota and immune responses //Nature immunology. – 2010. – T. 12. – №. 1. – C. 5. doi: 10.1038/ni0111-5.

- 185) Mason M. R. et al. Deep sequencing identifies ethnicity-specific bacterial signatures in the oral microbiome //PloS one. – 2013. – T. 8. – №. 10. – C. E77287. doi: 10.1371/journal.pone.0077287
- 186) Mbakwa C. A. et al. Gut colonization with *Methanobrevibacter smithii* is associated with childhood weight development //Obesity. – 2015. – T. 23. – №. 12. – C. 2508-2516. doi: 10.1002/oby.21266
- 187) McDonald D. et al. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome //GigaScience. – 2012. – T. 1. – №. 1. – C. 7. doi:10.1186/2047-217X-1-7.
- 188) Meric M. et al. Water-borne *Sphingomonas paucimobilis* epidemic in an intensive care unit //Journal of Infection. – 2009. – T. 58. – №. 3. – C. 253-255. doi: 10.1016/j.jinf.2009.01.007.
- 189) Meuric V. et al. Signature of microbial dysbiosis in periodontitis //Applied and environmental microbiology. – 2017. – T. 83. – №. 14. – C. E00462-17. doi: 10.1128/AEM.00462-17.
- 190) Mika F., Hengge R. Small regulatory RNAs in the control of motility and biofilm formation in *E. coli* and *Salmonella* //International journal of molecular sciences. – 2013. – T. 14. – №. 3. – C. 4560-4579. doi:10.3390/ijms14034560
- 191) Minguéz-Castellanos A. et al. Do α -synuclein aggregates in autonomic plexuses predate Lewy body disorders? A cohort study //Neurology. – 2007. – T. 68. – №. 23. – C. 2012-2018. doi: 10.1212/01.wnl.0000264429.59379.d9
- 192) Minter M. R. et al. Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease //Scientific reports. – 2016. – T. 6. – C. 30028. doi: 10.1038/srep30028.
- 193) Miyake S. et al. Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to clostridia XIVa and IV clusters //PLOS One. – 2015. – T. 10. – №. 9. – C. e0137429.
- 194) Moeller A. H. et al. Chimpanzees and humans harbour compositionally similar gut enterotypes //Nature communications. – 2012. – T. 3. – C. 1179. doi:10.1038/ncomms2159.

- 195) Moitinho-Silva L. et al. Integrated metabolism in sponge–microbe symbiosis revealed by genome-centered metatranscriptomics //The ISME journal. – 2017. – T. 11. – №. 7. – C. 1651. doi: 10.1038/ismej.2017.25.
- 196) Montiel-Castro A. J. et al. The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality //Frontiers in integrative neuroscience. – 2013. – T. 7. – C. 70. doi: 10.3389/fnint.2013.00070
- 197) Mouchiroud L. et al. Transcriptional coregulators: fine-tuning metabolism //Cell metabolism. – 2014. – T. 20. – №. 1. – C. 26-40. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.027.
- 198) Moya A., Ferrer M. Functional redundancy-induced stability of gut microbiota subjected to disturbance //Trends in microbiology. – 2016. – T. 24. – №. 5. – C. 402-413. doi: 10.1016/j.tim.2016.02.002.
- 199) Müller D. B. et al. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives //annual review of genetics. – 2016. – T. 50. – C. 211-234. doi:10.1146/annurev-genet-120215-034952
- 200) Murphy E. C., Frick I. M. Gram-positive anaerobic cocci–commensals and opportunistic pathogens //FEMS microbiology reviews. – 2013. – T. 37. – №. 4. – C. 520-553. doi: 10.1111/1574-6976.12005.
- 201) Murray A. E. et al. Microbiome composition and diversity of the ice-dwelling sea anemone, *Edwardsiella andrillae* //Integrative and comparative biology. – 2016. – T. 56. – №. 4. – C. 542-555. doi: 10.1093/icb/icw095.
- 202) Natale G. et al. Parkinson’s disease and the gut: a well known clinical association in need of an effective cure and explanation //Neurogastroenterology & Motility. – 2008. – T. 20. – №. 7. – C. 741-749. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01162.x
- 203) Natividad J. M. M., Verdu E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications //Pharmacological research. – 2013. – T. 69. – №. 1. – C. 42-51. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.007
- 204) Ng W. L., Bassler B. L. Bacterial quorum-sensing network architectures //Annual review of genetics. – 2009. – T. 43. – C. 197-222. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134304
- 205) Nishiyama K. et al. *Bifidobacterium bifidum* Extracellular Sialidase Enhances

- Adhesion to the Mucosal Surface and Supports Carbohydrate Assimilation //mBio. – 2017. – T. 8. – №. 5. – C. E00928-17. doi:10.1128/mBio.00928-17
- 206) Noyce A. J. et al. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease //Annals of neurology. – 2012. – T. 72. – №. 6. – C. 893-901. doi:10.1002/ana.23687
- 207) O'Herrin S. M., Kenealy W. R. Glucose and carbon dioxide metabolism by *Succinivibrio dextrinosolvens* //Applied and environmental microbiology. – 1993. – T. 59. – №. 3. – C. 748-755.
- 208) Park S. C. et al. Functional characterization of alpha-synuclein protein with antimicrobial activity //Biochemical and biophysical research communications. – 2016. – T. 478. – №. 2. – C. 924-928. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.052
- 209) Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. Переиздано в Parkinson J. An essay on the shaking palsy //The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences. – 2002. – T. 14. – №. 2. – C. 223-236.
- 210) Pasolli E. et al. Machine learning meta-analysis of large metagenomic datasets: tools and biological insights //PLoS computational biology. – 2016. – T. 12. – №. 7. – C. e1004977. doi:10.1371/journal.pcbi.1004977.
- 211) Patrascu O. et al. A fibrolytic potential in the human ileum mucosal microbiota revealed by functional metagenomic //Scientific Reports. – 2017. – T. 7. – C. 40248. doi:10.1038/srep40248.
- 212) Paulson J. N. et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys //Nature methods. – 2013. – T. 10. – №. 12. – C. 1200. doi: 10.1038/nmeth.2658
- 213) Pearson K. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space //The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science. – 1901. – T. 2. – №. 11. – C. 559-572. doi:10.1080/14786440109462720.
- 214) Peng L. et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers //The Journal of nutrition. – 2009. – T. 139. – №. 9. – C. 1619-1625. doi: 10.3945/jn.109.104638

- 215) Pereira P. et al. Bile microbiota in primary sclerosing cholangitis: Impact on disease progression and development of biliary dysplasia //PloS one. – 2017. – T. 12. – №. 8. – C. e0182924. doi: 10.1371/journal.pone.0182924
- 216) Pérez T. et al. Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem //Mucosal immunology. – 2010. – T. 3. – №. 4. – C. 355.
- 217) Perez-Muñoz M. E. et al. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome //Microbiome. – 2017. – T. 5. – №. 1. – C. 48. doi:10.1186/s40168-017-0268-4
- 218) Peterson D. A. et al. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases //Cell host & microbe. – 2008. – T. 3. – №. 6. – C. 417-427. doi:10.1016/j.chom.2008.05.001.
- 219) Pimentel M. M. G. et al. Parkinson disease: α -synuclein mutational screening and new clinical insight into the p. E46K mutation //Parkinsonism & related disorders. – 2015. – T. 21. – №. 6. – C. 586-589. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.03.011
- 220) Quast C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools //Nucleic acids research. – 2012. – T. 41. – №. D1. – C. D590-D596. doi:10.1093/nar/gks1219
- 221) Qureshi I. A., Mehler M. F. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease //Nature Reviews Neuroscience. – 2012. – T. 13. – №. 8. – C. 528. doi: 10.1038/nrn3234.
- 222) R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Режим доступа: <https://www.R-project.org/>
- 223) Reck M. et al. Stool metatranscriptomics: A technical guideline for mRNA stabilisation and isolation //BMC genomics. – 2015. – T. 16. – №. 1. – C. 494. doi: 10.1186/s12864-015-1694-y.
- 224) Richard M. L. et al. Mucosa-associated microbiota dysbiosis in colitis associated cancer //Gut microbes. – 2017. – C. 1-12. doi: 10.1080/19490976.2017.1379637
- 225) Richterich P. Estimation of errors in “raw” DNA sequences: a validation study //Genome Research. – 1998. – T. 8. – №. 3. – C. 251-259. doi:10.1101/gr.8.3.251.

- 226) Ricotta C., Burrascano S. Beta diversity for functional ecology //Preslia. – 2008. – T. 80. – №. 1. – C. 61-72.
- 227) Ríos-Covián D. et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 185. doi:10.3389/fmicb.2016.00185.
- 228) Ritari J. et al. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database //BMC genomics. – 2015. – T. 16. – №. 1. – C. 1056. doi: 10.1186/s12864-015-2265-y
- 229) Rodrigues Hoffmann A. The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals //Veterinary dermatology. – 2017. – T. 28. – №. 1. – C. 60. doi: 10.1111/vde.12408.
- 230) Rosignoli P. et al. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells //Carcinogenesis. – 2001. – T. 22. – №. 10. – C. 1675-1680.
- 231) Rousk J., Bengtson P. Microbial regulation of global biogeochemical cycles //Frontiers in microbiology. – 2014. – T. 5. – C. 103. doi: 10.3389/fmicb.2014.00103
- 232) Rutherford N. J. et al. Prion-like transmission of α -synuclein pathology in the context of an NFL null background //Neuroscience letters. – 2017. – T. 661. – C. 114-120. doi: 10.1016/j.neulet.2017.09.054.
- 233) Rutherford S. T., Bassler B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control //Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2012. – T. 2. – №. 11. – C. A012427. doi: 10.1101/cshperspect.a012427
- 234) Saedisomeolia A., Ashoori M. Riboflavin in Human Health: A Review of Current Evidences //Advances in food and nutrition research. – Academic Press, 2018. – T. 83. – C. 57-81. doi: 10.1016/bs.afnr.2017.11.002
- 235) Saint-Georges-Chaumet Y. et al. Targeting microbiota-mitochondria inter-talk: Microbiota control mitochondria metabolism //Cellular and Molecular Biology. – 2015. – T. 61. – №. 4. – C. 121-124. doi : 10.14715/cmb/2015.61.4.20
- 236) Saltykova I. V. et al. Biliary Microbiota, Gallstone Disease and Infection with

- Opisthorchis felinus* //PLOS neglected tropical diseases. – 2016. – T. 10. – №. 7. – C. e0004809. doi:10.1371/journal.pntd.0004809.
- 237) Santarelli A. et al. Oral ulcer by *Sphingomonas paucimobilis*: first report //International journal of oral and maxillofacial surgery. – 2016. – T. 45. – №. 10. – C. 1280-1282. doi: 10.1016/j.ijom.2016.07.006
- 238) Santoro A. et al. Gut microbiota changes in the extreme decades of human life: a focus on centenarians //Cellular and Molecular Life Sciences. – 2018. – T. 75. – №. 1. – C. 129-148. doi: 10.1007/s00018-017-2674-y
- 239) Sato K., Sakakibara Y. MetaVelvet-SL: an extension of the Velvet assembler to a de novo metagenomic assembler utilizing supervised learning //DNA research. – 2014. – T. 22. – №. 1. – C. 69-77. doi: 10.1093/dnares/dsu041.
- 240) Scharschmidt T. C. et al. Commensal microbes and hair follicle morphogenesis coordinately drive Treg migration into neonatal skin //Cell host & microbe. – 2017. – T. 21. – №. 4. – C. 467-477. e5. doi: 10.1016/j.chom.2017.03.001
- 241) Scheperjans F. et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype //Movement Disorders. – 2015. – T. 30. – №. 3. – C. 350-358. doi: 10.1002/mds.26069
- 242) Schicho R. et al. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon //Gastroenterology. – 2006. – T. 131. – №. 5. – C. 1542-1552. doi: 10.1053/j.gastro.2006.08.035
- 243) Schmidt T. S. B., Rodrigues J. F. M., Von Mering C. Ecological consistency of SSU rRNA-based operational taxonomic units at a global scale //PLOS computational biology. – 2014. – T. 10. – №. 4. – C. e1003594. doi:10.1371/journal.pcbi.1003594.
- 244) Schwarz E. et al. Analysis of microbiota in first episode psychosis identifies preliminary associations with symptom severity and treatment response //Schizophrenia research. – 2017. doi: 10.1016/j.schres.2017.04.017
- 245) Sender R., Fuchs S., Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body //PLOS biology. – 2016. – T. 14. – №. 8. – C. e1002533. Doi: 10.1371/journal.pbio.1002533
- 246) Shannon C. E. A mathematical theory of communication (parts I and II) //Bell

System Tech. J. – 1948. – T. 27. – C. 379-423.

247) Shannon P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks //Genome research. – 2003. – T. 13. – №. 11. – C. 2498-2504. doi:10.1101/gr.1239303.

248) Sharpton T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data //Frontiers in plant science. – 2014. – T. 5. – C. 209. doi: 10.3389/fpls.2014.00209

249) Shen C. H. et al. Association between tuberculosis and Parkinson disease: a nationwide, population-based cohort study //Medicine. – 2016. – T. 95. – №. 8. doi:10.1097/MD.0000000000002883.

250) Shen Y. et al. Analysis of gut microbiota diversity and auxiliary diagnosis as a biomarker in patients with schizophrenia: A cross-sectional study //Schizophrenia research. – 2018. doi: 10.1016/j.schres.2018.01.002.

251) Shih D. Q. et al. Microbial induction of inflammatory bowel disease associated gene TL1A (TNFSF15) in antigen presenting cells //European journal of immunology. – 2009. – T. 39. – №. 11. – C. 3239-3250. doi:10.1002/eji.200839087.

252) Simpson E. H., Sutherland G., Blackwell D. E. Nature //Measurement of diversity. – 1949. – T. 163. – C. 688.

253) Sivaprakasam S. et al. Cell-Surface and Nuclear Receptors in the Colon as Targets for Bacterial Metabolites and Its Relevance to Colon Health //Nutrients. – 2017. – T. 9. – №. 8. – C. 856. doi: 10.3390/nu9080856

254) Snider E. J., Freedberg D. E., Abrams J. A. Potential role of the microbiome in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma //Digestive diseases and sciences. – 2016. – T. 61. – №. 8. – C. 2217-2225. doi: 10.1007/s10620-016-4155-9

255) Sobko T. et al. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract //Free Radical Biology and Medicine. – 2006. – T. 41. – №. 6. – C. 985-991. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.020

256) Sokol H. et al. Specificities of the intestinal microbiota in patients with inflammatory bowel disease and Clostridium difficile infection //Gut microbes. – 2017. – C. 1-6. doi: 10.1080/19490976.2017.1361092

257) Soret R. et al. Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control

- gastrointestinal motility in rats //Gastroenterology. – 2010. – T. 138. – №. 5. – C. 1772-1782. e4. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.053.
- 258) Stenman L. K., Burcelin R., Lahtinen S. Establishing a causal link between gut microbes, body weight gain and glucose metabolism in humans—towards treatment with probiotics //Beneficial microbes. – 2016. – T. 7. – №. 1. – C. 11-22. doi: 10.3920/BM2015.0069
- 259) Stiemsma L. T. et al. The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies //ImmunoTargets and therapy. – 2015. – T. 4. – C. 143. doi: 10.2147/ITT.S61528
- 260) Stilling R. M. et al. Friends with social benefits: host-microbe interactions as a driver of brain evolution and development? //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2014. – T. 4. – C. 147. doi: 10.3389/fcimb.2014.00147
- 261) Suau A. et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut //Applied and environmental microbiology. – 1999. – T. 65. – №. 11. – C. 4799-4807.
- 262) Sudo N. et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice //The Journal of physiology. – 2004. – T. 558. – №. 1. – C. 263-275. doi:10.1113/jphysiol.2004.063388.
- 263) Sullivan A. et al. The microbiome and the pathophysiology of asthma //Respiratory research. – 2016. – T. 17. – №. 1. – C. 163. doi: 10.1186/s12931-016-0479-4
- 264) Tarasova T. V. et al. The role of alpha-synuclein in the development of the dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area //Doklady Biological Sciences. – Pleiades Publishing, 2016. – T. 466. – №. 1. – C. 5-7. doi: 10.1134/S0012496616010117
- 265) Tarn J. et al. Identification of free-living and particle-associated microbial communities present in hadal regions of the Mariana Trench //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 665. doi: 10.3389/fmicb.2016.00665
- 266) Telford G. et al. The Pseudomonas aeruginosa Quorum-Sensing Signal Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone Has Immunomodulatory Activity //Infection

and immunity. – 1998. – T. 66. – №. 1. – C. 36-42.

267) Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota //Biochemical Journal. – 2017. – T. 474. – №. 11. – C. 1823-1836. doi:10.1042/BCJ20160510.

268) Tomé C. M. L. et al. Inflammation and α -Synuclein's Prion-like Behavior in Parkinson's disease—is there a link? //Molecular neurobiology. – 2013. – T. 47. – №. 2. – C. 561-574. doi:10.1007/s12035-012-8267-8

269) Track N. S. Regulatory peptides of the gut and brain //Canadian Journal of Surgery. – 1983. – T. 26. – №. 3. – C. 211-3, 228.

270) Turnbaugh P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins //nature. – 2009. – T. 457. – №. 7228. – C. 480. doi:10.1038/nature07540

271) Turnbaugh P. J. et al. The human microbiome project //Nature. – 2007. – T. 449. – №. 7164. – C. 804. doi:10.1038/nature06244

272) Tyakht A. V. et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia //Nature communications. – 2013. – T. 4. – C. 2469. doi:10.1038/ncomms3469

273) Ulusoy A. et al. Caudo-rostral brain spreading of α -synuclein through vagal connections //EMBO molecular medicine. – 2013. – T. 5. – №. 7. – C. 1119-1127. doi:10.1002/emmm.201302475

274) Underly R. et al. Expression of Alzheimer-Type Neurofibrillary Epitopes in Primary Rat Cortical Neurons Following Infection with Enterococcus faecalis //Frontiers in aging neuroscience. – 2016. – T. 7. – C. 259. doi:10.3389/fnagi.2015.00259.

275) Unger M. M. et al. Postprandial ghrelin response is reduced in patients with Parkinson's disease and idiopathic REM sleep behaviour disorder: a peripheral biomarker for early Parkinson's disease? //Journal of neurology. – 2011. – T. 258. – №. 6. – C. 982-990. doi: 10.1007/s00415-010-5864-1

276) Unger M. M. et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls //Parkinsonism & related disorders. – 2016. – T. 32. – C. 66-72. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.08.019

277) Ushakova G. et al. The effect of long-term lactobacilli (lactic acid bacteria) enteral

- treatment on the central nervous system of growing rats //The Journal of nutritional biochemistry. – 2009. – T. 20. – №. 9. – C. 677-684. doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.06.010.
- 278) van Schaik W. The human gut resistome //Phil. Trans. R. Soc. B. – 2015. – T. 370. – №. 1670. – C. 20140087. doi: 10.1098/rstb.2014.0087
- 279) Velázquez O. C., Lederer H. M., Rombeau J. L. Butyrate and the colonocyte //Dietary fiber in health and disease. – Springer, Boston, MA, 1997. – C. 123-134.
- 280) Villanueva R. Neurobiology of major depressive disorder //Neural plasticity. – 2013. – T. 2013. doi: 10.1155/2013/873278
- 281) Visanji N. P. et al. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future //Acta neuropathologica communications. – 2013. – T. 1. – №. 1. – C. 2. doi:10.1186/2051-5960-1-2
- 282) Vizcarra J. A., Wilson-Perez H. E., Espay A. J. The power in numbers: gut microbiota in Parkinson's disease //Movement Disorders. – 2015. – T. 30. – №. 3. – C. 296-298. doi:10.1002/mds.26116
- 283) Vogt N. M. et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 13537.
- 284) Volkmann E. R. et al. Systemic sclerosis is associated with specific alterations in gastrointestinal microbiota in two independent cohorts //BMJ open gastroenterology. – 2017. – T. 4. – №. 1. – C. E000134. doi: 10.1136/bmjgast-2017-000134
- 285) Wainwright M. et al. Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km //FEMS Microbiology Letters. – 2003. – T. 218. – №. 1. – C. 161-165. doi: 10.1111/j.1574-6968.2003.tb11513.x
- 286) Wang J. et al. Regional and global elevational patterns of microbial species richness and evenness //Ecography. – 2017. – T. 40. – №. 3. – C. 393-402. doi: 10.1111/ecog.02216
- 287) Wang Q. et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy //Applied and environmental microbiology. – 2007. – T. 73. – №. 16. – C. 5261-5267.
- 288) Wang W. et al. Caspase-1 causes truncation and aggregation of the Parkinson's

- disease-associated protein α -synuclein //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – T. 113. – №. 34. – C. 9587-9592. doi:10.1073/pnas.1610099113.
- 289) Wang Z. et al. Skin microbiome promotes mast cell maturation by triggering stem cell factor production in keratinocytes //Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2017. – T. 139. – №. 4. – C. 1205-1216. e6. doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.019.
- 290) Whittaker R. H. Evolution and measurement of species diversity //Taxon. – 1972. – C. 213-251.
- 291) Wickham H. ggplot2: elegant graphics for data analysis //J Stat Softw. – 2010. – T. 35. – №. 1. – C. 65-88.
- 292) Wierzchos J. et al. Microbial colonization of Ca-sulfate crusts in the hyperarid core of the Atacama Desert: implications for the search for life on Mars //Geobiology. – 2011. – T. 9. – №. 1. – C. 44-60. doi: 10.1111/j.1472-4669.2010.00254.x
- 293) Willemze R. A. et al. Neural reflex pathways in intestinal inflammation: hypotheses to viable therapy //Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. – 2015. – T. 12. – №. 6. – C. 353. doi:10.1038/nrgastro.2015.56
- 294) Wirdefeldt K. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence //European journal of epidemiology. – 2011. – T. 26. – №. 1. – C. 1. doi:10.1007/s10654-011-9581-6
- 295) Woese C. R., Fox G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1977. – T. 74. – №. 11. – C. 5088-5090. doi:10.1073/pnas.74.11.5088
- 296) Wong A. C. N., Vanhove A. S., Watnick P. I. The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: lessons from *Drosophila melanogaster* //Disease models & mechanisms. – 2016. – T. 9. – №. 3. – C. 271-281. doi: 10.1242/dmm.023408
- 297) Xie Y. et al. Association of plasma homocysteine, vitamin B12 and folate levels with cognitive function in Parkinson's disease: A meta-analysis //Neuroscience letters. – 2017. – T. 636. – C. 190-195. doi: 10.1016/j.neulet.2016.11.007
- 298) Yarygin K. et al. Abundance profiling of specific gene groups using precomputed gut metagenomes yields novel biological hypotheses //PloS one. – 2017. – T. 12. – №.

4. – C. E0176154. doi: 10.1371/journal.pone.0176154
- 299) Yozgat Y. et al. *Sphingomonas paucimobilis* bacteraemia and shock in a patient with rheumatic carditis // *Indian journal of medical microbiology*. – 2014. – T. 32. – №. 4. – C. 451. Doi: 10.4103/0255-0857.142253.
- 300) Yu G. et al. Molecular characterization of the human stomach microbiota in gastric cancer patients // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2017. – T. 7. – C. 302. doi: 10.3389/fcimb.2017.00302
- 301) Zhang X. et al. Deep Metaproteomics Approach for the Study of Human Microbiomes // *Analytical chemistry*. – 2017. – T. 89. – №. 17. – C. 9407-9415. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02224.
- 302) Zhu X. et al. Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system // *Oncotarget*. – 2017. – T. 8. – №. 32. – C. 53829. doi: 10.18632/oncotarget.17754.
- 303) Zis P. et al. Non-motor symptoms burden in treated and untreated early Parkinson's disease patients: argument for non-motor subtypes // *European journal of neurology*. – 2015. – T. 22. – №. 8. – C. 1145-1150. doi:10.1111/ene.12733.
- 304) Zis P. et al. Peripheral neuropathy in idiopathic Parkinson's disease: A systematic review // *Journal of the neurological sciences*. – 2017. – T. 378. – C. 204-209. doi: 10.1016/j.jns.2017.05.023