

На правах рукописи

Безродный Святослав Леонидович

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА МИКРОБИОМ-АССОЦИИРОВАННОЙ
ЭКСПОСОМИКИ ДЛЯ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ НАРУШЕНИЙ
ЛИПИДНОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У ЛИЦ ПОЖИЛОГО
ВОЗРАСТА**

Специальность 1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Оболенск - 2022 г.

Работа выполнена в Закрытом акционерном обществе «ЭКОлаб»

Научный руководитель:

Марданлы Сейфаддин Гашим оглы, доктор медицинских наук (3.2.2. Эпидемиология), доцент, Закрытое акционерное общество «ЭКОлаб», президент.

Официальные оппоненты:

Афанасьев Станислав Степанович

доктор медицинских наук (1.5.11. Микробиология), профессор, заслуженный деятель науки РФ, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник, г. Москва

Червинец Вячеслав Михайлович

доктор медицинских наук (1.5.11. Микробиология), профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий кафедрой, г. Тверь

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Астрахань

Защита состоится « ____ » _____ 2022 г. в 11-00 часов на заседании Диссертационного совета 64.1.002.01 при ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора по адресу: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора и на сайте www.obolensk.org.

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Применение ОМИК-технологий в микробиологии и медицине значительно увеличивает эффективность диагностики и лечения различных заболеваний за счет системного подхода к интегральной оценке микробного сообщества. Микробиом, рассматриваемый как единая биосистема, обладает всеми свойствами биологического объекта. Микробиота, интегрированная в макроорганизме, в существенной степени влияет на регуляцию генов и индивидуальное развитие макроорганизма, имеет решающее значение для его иммунологического, гормонального и метаболического гомеостаза (Бондаренко В.М. и др., 2015; Шендеров Б.А., 2018; Затевалов А.М. и др., 2020).

В процессе симбиотической деятельности макроорганизма и микроорганизмов микробиом человека поставляет в кровь жизненно необходимые биологически активные молекулы, образованные как в процессе переработки поступающей пищи, так и жизнедеятельности огромного числа самых разнообразных бактерий, архей, грибов, вирусов (Шендеров Б.А. и др. 2019; Червинец В.М. и др., 2020).

Исследования тесной взаимосвязи макроорганизма и микробиоты позволили рассматривать последнюю как основную детерминанту здоровья и заболеваний человека. Известно, что для характеристики микробиома человека используют соотношение *Bacteroidetes* к *Firmicutes*. Усиление доминирования *Firmicutes* в микробиоме при угнетении *Bacteroidetes* и *Prevotella* связывают с нарушением углеводного обмена (Кожевников А.А. 2017; Булатова Е.М. 2013).

Биосистема человека на молекулярном уровне определяет характер развития и жизнеспособность макроорганизма на всем этапе его жизненного цикла. Патологический синдром, связанный, например, с нарушением обмена низкомолекулярных составляющих липидов и липопротеидов, т.е. изменением соотношения их концентрации в крови, является одним из главных факторов риска возраст-зависимых заболеваний. При нарушении липидного обмена развитию гипергликемии предшествует развитие дислипидемии (Терешина Е.В. и др., 2013 Серова Л.Д. и др., 2011).

Известно, что сахарный диабет является одной из самых серьезных проблем здравоохранения XXI в. По данным Международной Федерации Диабета, в мире насчитывается более 463 миллионов людей, больных диабетом, а к 2045 году прогнозируется рост до 700 миллионов и в последние годы наблюдается неуклонный рост числа больных сахарным диабетом 2 типа (СД2), что представляет собой неинфекционную пандемию человечества (National Diabetes Statistics Report, 2020). Диабет 3 типа (СД3) проявляется как инсулинорезистентность тканей головного мозга, что влияет на когнитивные функции и вносит свой вклад в развитие болезни Альцгеймера.

Огромное количество факторов, влияющих на качественный и количественный состав генерируемых микробиотой низкомолекулярных соединений и их генетическая связь с продуцентом диктует необходимость разработки новых направлений ОМИК-технологий - микробиом-ассоциированной экспосомики, которая может выявить совокупность факторов окружающей среды, влияющих на регуляцию генов и индивидуальное развитие организмов (Wild C.P., 2005; Rappaport S.M., 2010; Vermeulen R. et. al., 2020). В связи с этим исследование нарушений углеводного и липидного обмена методом микробиом-ассоциированной экспосомики с целью интегральной оценки состояния лиц пожилого возраста является

актуальным. Основным ядром работы является применение аппарата математического моделирования для исследования нарушений углеводного и липидного обмена человека по концентрациям малых молекул микробного происхождения (МММП) в исследуемой крови.

Степень разработанности темы исследования

Основанием для проведения диссертационного исследования послужила актуальность разработки нового направления персонафицированной медицины – метаболомики. Метаболом человека можно разделить на химические вещества, продуцируемые человеческими клетками, и вещества, привнесённые извне (экспосом), которые являются факторами окружающей среды, влияющими на регуляцию генов и индивидуальное развитие организма. В настоящем исследовании для расчета задействуется только часть экспосома – микробные маркеры, что позволяет сосредоточиться на системе взаимодействий микробиота – макроорганизм.

По мере развития хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, начиная с 90-х годов прошлого века, микробные маркеры используются для идентификации изолированных штаммов микроорганизмов и изучения метаболических процессов в клетках и органах человека (Mitruka B.M., 1975; White D.C. et. al., 1988; Stead D.E. et. al., 1992; Помазанов В.В. 1980, Осипов Г.А. 1990 и др.). При изучении метаболома возникает задача оценки концентраций микробных маркеров, которые имеют высокую дисперсию значений. Для решения этой задачи используется многомерная статистика и программы распознавания образов, широко распространенные для ОМИК-технологий. Таким образом, часть экспосома, связанная с микробными маркерами, можно отнести к микробиом-ассоциированной экспосомике.

Вышеизложенное свидетельствует о необходимости изучения функциональной активности микробиома человека, а также определения специфических соотношений концентраций малых молекул микробного происхождения для уточнения диагностики и исследования эффективности лечения сахарного диабета и сочетанной дислипидемии.

Цель исследования:

Исследовать особенности взаимодействия микробиома и макроорганизма человека при нарушениях углеводного и липидного обмена веществ у лиц пожилого возраста с применением принципов и подходов микробиом-ассоциированной экспосомики.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности структуры микробиома лиц пожилого возраста при нарушениях углеводного и липидного обмена по соотношению концентраций микробных маркеров в крови.
2. Построить математические модели микробиом-ассоциированной экспосомики для описания изменения метаболизма человека при нарушениях углеводного и липидного обмена.
3. Исследовать взаимосвязь состояния микробиома и показателей нарушения углеводного и липидного обмена у лиц пожилого возраста.
4. Разработать программу для ЭВМ по предиктивной диагностике сахарного диабета 2 типа и нарушений липидного обмена.

Научная новизна

Впервые определены интегральные критерии оценки состояния микробиома лиц пожилого возраста при сахарном диабете 2 типа по концентрациям бактериального эндотоксина и плазмалогена.

Впервые обоснованы референсные значения концентраций бактериального плазмалогена и эндотоксина в крови: не более 20,66 мкг/мл и не более 0,48 нмоль/мл соответственно, позволяющие при значении данных концентраций и выше прогнозировать развитие СД2 типа.

Впервые определены интегральные критерии оценки структуры микробиома лиц пожилого возраста при сахарном диабете 2 типа по соотношениям представленности микробных маркеров филоципов *Bacteroidetes* к микробным маркерам *Firmicutes* (B/F).

Впервые обоснованы референсные значения показателя B/F не менее 0,049 ед., позволяющий при значении ниже 0,049 прогнозировать развитие СД2 типа.

Впервые для предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа методом линейного дискриминантного анализа определены решающие правила концентраций малых молекул микробного происхождения в крови и на этом основании создана математическая модель, описывающая состояние микробиома человека при сахарном диабете 2 типа

Впервые для предиктивной диагностики, сочетанной дислипидемии методом линейного дискриминантного анализа определены решающие правила концентраций малых молекул микробного происхождения в крови и на этом основании созданы математическая модель, описывающая состояние микробиома человека при сочетанной дислипидемии

Теоретическая и практическая значимость

Определены референсные значения концентраций бактериального эндотоксина и плазмалогена в крови для лиц пожилого возраста: не более 20,66 мкг/мл и не более 0,48 нмоль/мл соответственно.

Методом линейного дискриминантного анализа получены математические модели, описывающие состояние микробиома человека при сахарном диабете 2 типа и сочетанной дислипидемии.

Результаты внедрены в учебный процесс фармацевтического факультета Государственного гуманитарно-технологического университета, (Справка о внедрении от 01.09.2021г.; уровень внедрения – учрежденческий)

Выпущено учебное пособие «Предиктивная диагностика сахарного диабета 2 типа и сочетанной дислипидемии по анализу экспозома человека» 2021 г.; Уровень внедрения – федеральный) акт внедрения от 15.09.2021

Полученные классификационные уравнения использованы в программе «Диабет – скрин» для скрининговой диагностики сахарного диабета нарушений углеводного обмена. Получено авторское свидетельство на программу для ЭВМ «Диабет-скрин»; Уровень внедрения – федеральный)

Полученные классификационные уравнения использованы в программе «Дислипидемия – скрин» для скрининговой дифференциальной диагностики дислипидемии и лечения нарушений липидного обмена. Получено авторское свидетельство на программу для ЭВМ «Дислипидемия-скрин»; Уровень внедрения – федеральный)

Методология и методы исследования

Объектами исследования являлись микробных маркеров, компонентов клеточной стенки микроорганизмов (низкомолекулярные жирные кислоты, гидроксикислоты, альдегиды, стеролы), определявшиеся в крови людей пожилого возраста методом хромато-масс-спектрометрии.

Научная литература, посвященная проблеме изучения микробиоценозов и коррекции их нарушений, была проанализирована формально-логическими методами исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов.

Биологические образцы – венозная кровь – были получены у пациентов консультативно-диагностического центра ОСП «Российский геронтологический центр» ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Всего в работе было исследовано 163 человека, из них 48 (29,4%) женского и 115 (70,6%) мужского пола. Средний возраст $68,1 \pm 1,7$ лет. В группу контроля «К» были включены пациенты без нарушений углеводного и липидного обмена в количестве 18 человек (11,0%), средний возраст – $67,4 \pm 2,1$ лет.

Опытная группа состояла из 3 подгрупп: пациенты, у которых наряду с нарушением углеводного обмена по типу сахарного диабета 2 типа было установлено нарушение липидного обмена «СД₂+ДЛП» - 67 человек (41,1%); пациенты с дислипидемией без сахарного диабета «ДЛП» - 39 человек (23,93%); и пациенты с сахарным диабетом 2 типа без нарушений липидного обмена «СД₂» - 39 человек (23,93%). Для исследования особенностей состояния микробиома при различных типах дислипидемии пациенты групп «ДЛП» и «СД₂+ДЛП» были разделены на подгруппы «ГХС» - пациенты с гиперхолестеринемией - 33 человека (20,2%), «ГТГ» - пациенты с триглицеринемией - 23 человека (14,1%), «СЧДЛ» - пациенты с сочетанной дислипидемией - 50 человек (30,6%), а в группу сравнения объединили пациентов групп «К» и «СД₂» общей численностью 57 человек (35,0%).

В главе 2 диссертации «Интегральная оценка нарушений углеводного и липидного обмена по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови» использовались различные комбинации групп.

В разделе 2.1. «Определение критериев интегральной оценки состояния микробиома лиц пожилого возраста при нарушении углеводного обмена» для сравнения критериев использовали основную группу, состоящую из пациентов групп «СД₂+ДЛП» и «СД₂» численностью 106 человек (65,0%), а группа сравнения состояла из групп «К» + «ДЛП» численностью 57 человек (35,0%).

В разделе 2.2.1. «Модель предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови» использовали такую же комбинацию групп, как в разделе 2.1.

В разделе 2.2.2. «Модель предиктивной диагностики сочетанной дислипидемии по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови» для группы сравнения были отобраны пациенты из групп «К» + «СД₂» - 57 человек (35%), а в основную группу были включены пациенты из групп «ДЛП» и «СД₂+ДЛП» - 106 человек (35%).

В разделе 2.3. «Изучение методом математического моделирования концентраций малых молекул микробного происхождения в крови при разных типах ДЛП» использовали

подгруппы «ГХС» - 33 человека (20,2%), «ГТТ» - 23 человека (14,1%), «СЧДЛ» 50 человек (30,6%) и группу сравнения «К» + «СД2» - 57 человек (35%).

В главе 3 диссертации «Интегральная оценка состояния микробиома по содержанию микробных маркеров в крови» в разделе 3.1. «Оценка особенностей структуры микробиома у лиц пожилого возраста при различных вариантах нарушения липидного и углеводного обмена» использовали комбинацию групп пациентов аналогично разделу 2.2.2.

В разделе 3.2. «Оценка особенностей нарушения липидного обмена методом микробиом-ассоциированной экспосомики у лиц пожилого возраста» использовали комбинацию групп пациентов аналогично разделу 2.3.

Биохимические анализы крови для оценки нарушений углеводного и липидного обмена:

Диагностику нарушений липидного и углеводного обмена проводил врач-эндокринолог на основании анализа клинико-анамнестических данных, осмотра и физикального обследования, а также на основании результатов биохимических анализов. У пациентов определяли уровни биохимических показателей - концентрации в крови: глюкозы; триглицеридов (ТГ); общего холестерина (ОХС); холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП); холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП). Биохимическое определение концентраций проводили на автоматической системе биохимического и иммунологического анализа «Labcell». Пробоподготовка и выполнение анализа проводились в соответствии с инструкцией производителя.

Хромато-масс-спектрометрическое определение малых молекул микробного происхождения в крови

Малые молекулы микробного происхождения в крови определяли методом хромато-масс-спектрометрического анализа с использованием стандартных протоколов пробоподготовки и последующим использованием капиллярного газового хроматографа с масс-селективным детектором высокого разрешения.

На рисунке 1 приведены типичные хроматограммы альдегидов, жирных насыщенных и ненасыщенных кислот, гидроксикислот, кампостерола исследованных колоний микроорганизмов микробиома человека, выбранных в качестве маркеров при гликолипидемии и диабете.

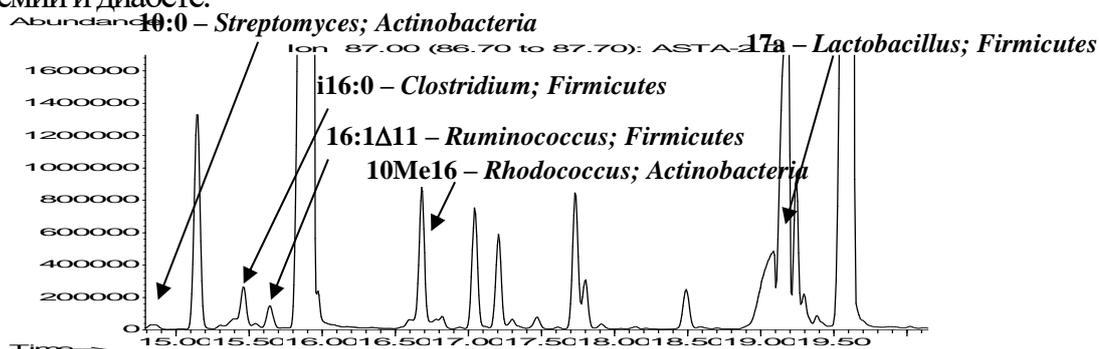


Рисунок 1 - Пример фрагмента хроматограммы: хроматографические пики выбранных маркеров

Площади пиков маркеров интегрировали автоматически по программе, прилагаемой к хроматографу. Затем эти данные вводили в программу расчета, подготовленную в электронных таблицах EXCEL. Для количественного расчета использовали данные калибровки по дейтерированной тридекановой кислоте. Ошибка количественных измерений

численности микроорганизмов из-за погрешности в подготовке проб и анализа, несоответствия состава жирных кислот чистых культур банка данных и изучаемого сообщества *in situ* не превышала 20%.

Полученные микробные маркеры относились к 5 группам химических соединений с длиной углеродной цепи от 10 до 26 атомов углерода: насыщенные альдегиды, гидроксикислоты, стерины, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты. Полный перечень определяемых микробных маркеров с указанием соответствующих микроорганизмов и их филоотипов указан в приложении текста диссертации. Расчет представленности филоотипов в микробиоценозе проводили как отношение суммы концентраций соответствующих микробных маркеров к суммарному пулу микробных маркеров.

Оценку структуры микробиома проводили по соотношениям филоотипов микроорганизмов, отношению В/Ф, суммарной концентрации всего определяемого пула микробных маркеров, концентрации плазмалогена и эндотоксина микробного происхождения.

Суммарный пул микробных маркеров определяли суммированием всех концентраций определяемых газовой хроматографией - масс-спектрометрией. Представленность филоотипов *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Fungi* определяли суммированием значений представленности всех микроорганизмов, относящихся к соответствующим филоотипам. Полученные значения представленности *Bacteroidetes* делили на представленность *Firmicutes* и получали показатель В/Ф.

Концентрацию плазмалогена (мкг/мл) определяли по концентрации октадецевого альдегида (18:1a), который входит в состав клеточной стенки микроорганизмов, представителей индигенной нормобиоты, родов *Bifidobacterium* и *Eubacterium*.

Для определения концентрации эндотоксина в крови суммировали концентрации компонентов липида А – гидроксикислот: 3h12, 2h12, hi13, 3h13, 3h14, 2h14, 2hi15, 3hi15, h16, 3hi17, h18, h15, ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий: *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacteroides hypermegas*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides fragilis*, *Helicobacter pylori*.

Математико-статистические методы.

В работе использованы методы вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm SE$) с использованием параметрических (t-критерий Фишера-Стьюдента) и непараметрических (U-критерий Вилкоксона) методов. Значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для оценки соответствия полученных результатов теоретической гипотезе использовали критерий согласия Пирсона - χ^2 . Расчеты проводились с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 8.0.»

Для оценки прогностической точности и определения пороговых значений использовали ROC-анализ с помощью пакета программ автоматическое построение искусственных нейронных сетей программы Statistica 8.0.

Оценку внутригрупповой изменчивости и взаимных корреляций использовали факторный анализ с помощью пакета программа Факторный анализ программы Statistica 8.0.

Построение линейной дискриминантной функции концентраций МММП проводили с помощью пакета Discriminant Analysis программы Statistica 8.0. Оценку корреляционно

ковариационной независимости переменных, отношение меры внутригрупповой изменчивости к мере общей изменчивости (лямбда Уилкса), классификацию результатов анализов исследуемых групп проводили с помощью решающих правил линейных дискриминантных функций.

Положения, выносимые на защиту:

1. Для интегральной оценки состояния микробиома человека при нарушениях углеводного и липидного обмена необходимо использовать интегральные критерии, рассчитанные по соотношению концентраций микробных маркеров в крови.
2. Подходы микробиом-ассоциированной экспосомики позволяют количественно охарактеризовать состояние микробиома человека в зависимости от степени тяжести нарушений углеводного и липидного обмена у лиц пожилого возраста.
3. Между показателями нарушений липидного, углеводного обмена и показателями микробиом-ассоциированной экспосомики обнаруживаются разнонаправленные корреляции, указывающие на взаимосвязь состояния макроорганизма и микробиома.
4. Микробиом-ассоциированная экспосомика позволяет проводить скрининговую диагностику сахарного диабета 2 типа и дислипидемии у лиц пожилого возраста.

Личное участие автора

Автор участвовал в организации всех этапов исследования; выборе объекта, разработке методологии проведения данного научного исследования, включающего на первоначальных этапах биохимическое, хромато-масс-спектрометрическое исследование крови с последующей разработкой системы интегральной оценки микробиома на основе математического моделирования и статистической обработки результатов, обосновании выводов и практических рекомендаций.

Хромато-масс-спектрометрические исследования выполнялись совместно с сотрудниками ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора д.б.н. Амерхановой А.М., и д.б.н. Затеваловым А.М. (математическое моделирование)

Степень достоверности и апробация результатов исследования:

О достоверности результатов работы свидетельствует достаточный объем исследований с применением современных высокочувствительных и специфичных методик, средств математического моделирования, адекватных методов статистической обработки полученных данных.

Диссертация апробирована на заседании Ученого Совета ЗАО «ЭКОлаб».

Основные положения диссертации доложены на: III Международном конгрессе «Профилактика и лечение метаболических нарушений и сосудистых заболеваний. Междисциплинарный подход», (Москва 2015 г.) VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены», (Санкт-Петербург, 2015г.); XVII Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов (Москва 2017 г.) VI Международном конгрессе «Профилактика и лечение метаболических нарушений и сосудистых заболеваний. Междисциплинарный подход», (Москва, 2018) Круглом столе "25 лет Геронтологическому обществу. Итоги и перспективы", организуемом совместно Московским отделением Геронтологического общества при РАН и Секцией Геронтологии МОИП МГУ (Москва, 2019); IV (XXVII) Национальном конгрессе эндокринологов «Инновационные технологии в

эндокринологии» (Москва, 2021); ДП (502-ом) Заседание Секции Геронтологии МОИП МГУ (Москва, 2021); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (on-line) «Микробиологические аспекты диагностики инфекционных заболеваний» (Ростов-на-Дону, 2021), VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (Орехово-Зуево, 2021).

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, в сборниках научных трудов и материалах конференций - 5, изобретений - 2.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 150 страницах машинописного текста, иллюстрированы 31 таблицами, 16 рисунками. Диссертационная работа включает обзор литературы, материалы и методы исследования, две главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы, содержащий 46 отечественных и 171 зарубежных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Использование концентраций малых молекул микробного происхождения в крови для интегральной оценки нарушений углеводного и липидного обмена

Использование концентраций микробных маркеров в крови для интегральной оценки нарушений углеводного и липидного обмена

Интегральную оценку нарушений углеводного (СД2) и липидного (ДЛП) обмена пациентов характеризовали общими изменениями системы макроорганизм-микробиота. Для интегральной оценки структуры микробиома человека использовано определение концентрации бактериального плазмалогена и эндотоксина в крови. На основании проведенного исследования соотношения распространенности фило типов и в соответствии с данными литературы исследовали прогностическую точность показателя В/Ф и концентраций плазмалогена и эндотоксина в крови.

Таблица 1 – Интегральные показатели состояния микробиома человека при нарушениях углеводного и липидного обмена

Показатели	Контроль	Дислипидемия	Сахарный диабет 2 типа	Сочетание дислипидемии и сахарного диабета 2 типа
Молекулярные маркеры бактериального плазмалогена	10[7,2-15,4]	14,4[8,6-16,6]	31,4[15,8-36,8]*	20,7[12,4-39,6]*
Молекулярные маркеры бактериального эндотоксина	0,3[0,2-0,5]	0,4[0,3-0,6]	0,6[0,5-0,9]*	0,5[0,3-0,6]*
Соотношение В/Ф	0,083 [0,076-0,103]	0,098 [0,058-0,134]	0,023 [0,012-0,107]*	0,019 [0,012-0,07]*

Примечание: * отмечены значения, которые статистически значимо отличаются от группы контроля ($p < 0,05$).

В таблице 1 показано, что статистически значимое изменение концентраций эндотоксина и плазмалогена, а также показателя В/Ф были характерны только для группы СД2 и СД2+ДЛП.

Для сравнения прогностической точности интегральных показателей сравнивали, результаты ROC-анализа концентрации плазмалогена, эндотоксина и В/Ф.

Результаты ROC-анализа для концентраций бактериального эндотоксина и плазмалогена в крови пациентов представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты ROC-анализа для концентраций бактериального плазмалогена и эндотоксина в крови пациентов с СД2 и группы сравнения

Параметр	Значения для		
	плазмалогена	эндотоксина	В/Ф
AUC (Площадь ограниченная ROC-кривой)	0,74	0,75	0,80
CutOff (Порог отсечения)	0,39	0,46	0,46
Пороговая концентрация	20,66 мкг/мл	0,48 нмоль/мл	0,049 ед.
Чувствительность, %	89,4	80,5	78,3
Специфичность, %	54,9	52,8	50,9
Прогностическая точность, %	68,5	65,5	68,7

В таблице 2 показано, что значения AUC для представленных параметров выше 0,5. Это указывает на возможность диагностики сахарного диабета 2 типа в данной возрастной группе по значениям концентраций бактериального плазмалогена, эндотоксина в крови и показателя В/Ф, используя пороговые значения 20,66 мкг/мл плазмалогена в крови, 0,48 нмоль/мл эндотоксина и 0,049 ед. показателя В/Ф. Концентрации бактериального плазмалогена и эндотоксина в крови обладают одинаковой прогностической точностью, а показатель В/Ф немного выше. Расчет качественных характеристик моделей, представленный в таблице 2, показал, что все исследуемые показатели имеют прогностическую точность, чувствительность и специфичность на одном уровне. Незначительно выше чувствительность и специфичность для показателя концентрация плазмалогена.

Создание математических моделей предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа и дислипидемий по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови

Были созданы модели предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа и сочетанной дислипидемии по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови. Для этого использовали метод линейного дискриминантного анализа с группировкой по комбинации групп, соответствующих задачи классификации модели. Для расчета уникального соотношения концентраций малых молекул микробного происхождения использовали все концентрации микробных маркеров с последующим исключением из модели согласно алгоритму дискриминантного анализа.

Математическая модель СД2 была построена методом линейного дискриминантного анализа при помощи алгоритма пошагового исключения компонентов с анализом сопряженности. Основная группа состояла из групп «СД2» + «СД2+ДЛП» численностью 106 человек. Группа сравнения состояла из групп «К» + «ДЛП» численностью 57 человек. В результате проведенного алгоритма исключения компонентов модель включала компоненты: 3h14, 10Me16, i19, i17:1d9, Cholestendiol, 16:1d9t, 2h24.

Модель СД2 имела 85,89 % прогностической точности, при 80,35 % специфичности и 88,78 % чувствительности.

Дискриминантная функция представлена уравнением: $Root = -18,3297*3h14 - 2,1188*10Me16 + 0,1034*i19 - 9,8878*i17:1d9 - 0,0956*Cholestendiol + 0,5773*16:1d9t - 0,4458*2h24 + 1,2555$. Координаты центроидов: группа сравнения=1,128949, основная группа = -0,607077. Квадрат расстояний Махаланобиса между центроидами равен 3,014 ($p= 3,46*10^{-15}$), что указывает на статистическую значимость показателей, полученных при использовании модели.

Математическая модель СЧДЛ так же была построена методом линейного дискриминантного анализа при помощи алгоритма пошагового исключения компонентов с анализом сопряженности. Основная группа состояла из подгруппы «СЧДЛ» численностью 57 человек. Группа сравнения состояла из групп «К» + «СД2» численностью 40 человек. В результате проведенного алгоритма исключения компонентов модель включала компоненты: 9-изогептадеценовой кислоты (17:1d9); 11-эйкозеновой кислоты (20:1d11); изомиристинового альдегида (i14a).

Модель «СЧДЛ» имела 75,26 % прогностической точности, при 78,94 % специфичности и 78,95 %, чувствительности.

Дискриминантная функция представлена уравнением: $D = -4,12882*17:1d9 + 0,62329*20:1d11 - 0,68546*i14a + 1,74258$. Координаты центроидов: группа сравнения = 0,74619, основная группа = -0,52364. Квадрат расстояний Махаланобиса между центроидами равен 1,6124 ($p = 0,000001$), что указывает на статистическую значимость показателей, полученных при использовании модели.

Математическая модель ДЛП так же была построена методом линейного дискриминантного анализа при помощи алгоритма пошагового исключения компонентов с анализом сопряженности. Пациенты с дислипидемией (ДЛП) были разделены на 3 группы гиперхолестеринемия (ГХС) – 38 человек, гипертриглицеридемия (ГТГ) – 27 человек и сочетанная дислипидемия (СЧДЛ) – 57 человек в соответствии с классификацией Фредриксона. Пациенты без ДЛП были определены в группу «норма» - 40 человек. В результате проведенного алгоритма исключения компонентов модель включала компоненты: i16:1d9, 16:1d7, 10h18, изомиристинового альдегида (i14a). В группе сравнения 50% объектов классифицированы корректно. В группах ГХС корректность классификации составляет – 15,8%, СЧДЛ – 70,2%, ГТГ – 18,5%. По результатам качественных характеристик модели отмечается что 43,8% случаев имеют правильную классификацию. Прогностическая точность модели «ДЛП» 43,8%, чувствительность – 51,5%, специфичность – 31,7%.

Для оценки степени и направленности изменений состояния микробиома при различных видах дислипидемии оценивали расположение их центроидов в дискриминантном пространстве и статистическую значимость расстояний Махаланобиса между центроидами. Каждый результат анализа можно представить в виде точки в координатах дискриминантного пространства, которые рассчитываются по 3 дискриминантным уравнениям (Root1, Root2, Root3)

Расположение центроидов исследуемых групп представлено на рисунке 2:

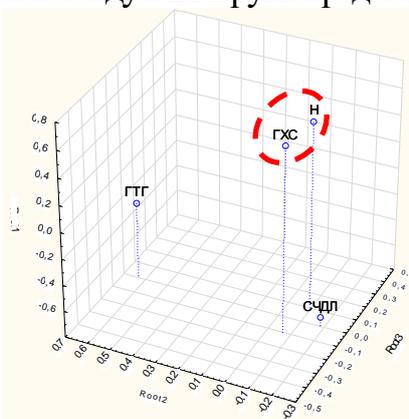


Рисунок 2– 3D график, иллюстрирующий расположение центроидов для исследуемых групп с различными видами дислипидемии в дискриминантном пространстве.

Примечание: В овал, обозначенный пунктирной линией, заключены центроиды групп, между которыми нет статистически значимой разницы ($p < 0,05$).

На рисунке 2 показано, что группа ГХС находится ближе всех к группе «норма», а соотношения концентраций малых молекул микробного происхождения для этих пациентов не имеют статистически значимых отличий от пациентов из этой группы. Группа ГТГ находится дальше всех от нормы, что указывает на максимальные изменения соотношений концентраций исследуемых веществ в крови у пациентов этой группы. Изменения концентраций в группе СЧДЛ практически равноудалены от группы «норма» и ГТГ, что указывает на специфичность изменений, не похожую на норму или ГТГ.

Нарушения липидного обмена по типу ГХС в пожилом возрасте наблюдаются как результат системного воспаления, в котором могут участвовать метаболиты микробного происхождения в частности эндотоксин. В результате локального воспаления на стенке сосудов откладываются макрофагами эфиры холестерина, которые затем преобразуются в моногидраты холестерина. Образующаяся бляшка приводит к окклюзии сосудов. Накопление холестерина в интиме при ГХС может быть реакцией на атерогенез сосудистой стенки. Патогенные явления атерогенеза связаны с дисфункцией и активацией эндотелия, адгезией, активацией и миграцией моноцитов/макрофагов, локальным окислительным стрессом, отложением липидов, синтезом внеклеточного матрикса (ЕСМ), миграцией гладкомышечных клеток (ГМК) и пролиферацией и неоваскуляризацией бляшки. По этой причине изменения в микробиоме не имеют статистически значимых различий с нормой. ГХС характеризуется увеличением концентрации ЛПНП в крови, которые являются конечным продуктом процессинга ЛП в крови.

Гипертриглицеридемия является одним из наиболее тяжелых форм нарушения липидного обмена. Она вызвана накоплением ЛПОНП, что указывает на нарушения процессинга ЛП на первом этапе. Это может быть обусловлено патологией печени (жировое перерождение) или дисфункцией жировой ткани. Для гипертриглицеридемии характерно сочетание неблагоприятных факторов (курение, нерациональное питание, алкоголизм и старение населения), которое приводит к необратимому нарушению липидного обмена, выражающемуся в увеличении уровня триглицеридов в крови. Функциональная активность микробиома статистически значимо изменяется, что мы наблюдаем на рисунке 2.

Сочетанная дислипидемия является самой тяжелой формой дислипидемии. Она вызвана накоплением в крови липопротеидов промежуточной плотности (ЛППП), что указывает на нарушения процессинга, связанного либо с дисфункцией жировой ткани, либо с нарушением функции ЛПВП. Большое расстояние между ГТГ и СЧДЛ показывает высокую степень влияния микробных маркеров на системный метаболизм энергетических субстратов (глюкозы и ЖК), приводящих к одновременному проявлению увеличения концентраций холестерина и триглицеридов.

Таким образом, методом математического моделирования были определены значимые МММП, которые могут являться предиктивными критериями развития ДЛП разного типа в возрастной группе 45-90 лет.

Оценка особенностей нарушения углеводного и липидного обмена с использованием микробиом-ассоциированной экспосомики у лиц пожилого возраста

Для характеристики структуры микробиома при нарушениях углеводного и липидного обмена провели сравнение показателей представленности по филотипам микробиома. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Распространенность филотипов микробиома при разных вариантах сочетаний состояния углеводного и липидного обмена у лиц пожилого возраста

Показатели	Контроль	Дислипидемия	Сахарный диабет 2 типа	Сочетание дислипидемии и сахарного диабета 2 типа
Actinobacteria	9,1[8,5-9,5]	11,1[8,7-12,3]*	9,9[8,8-11,7]	10,1[8,8-11,8]*
Bacteroidetes	5,9[5,4-7]	6,7[4,3-8,5]	1,3[0,8-7]*	1,1[0,8-4,9]*
Proteobacteria	70,2[69,1-73,2]	65,7[62,6-70,9]*	66,5[63,7-70,8]*	66,3[62,1-69,9]*
Firmicutes	34,4[28,8-38,6]	29,4[26,7-35,6]*	25,3[22,7-28,5]*	26,7[21,4-30,9]*
Fungi	20,9[18,7-22,5]	23,8[20,3-26]	22,5[21-26,9]*	24,2[21,1-28,3]*
Суммарная концентрация микробных маркеров в крови	105[85,1-165]	149,8[99,3-195,6]	208,6[150,9-243,9]*	176,2[121,9-220,8]*

Примечание: * отмечены значения, которые статистически значимо отличаются от группы контроля ($p < 0,05$).

В таблице 3 показано, что микроорганизмы филотипа *Actinobacteria* увеличивают свою представленность при дислипидемии, в том числе ассоциированную с сахарным диабетом 2 типа.

Bacteroidetes снижают представленность при сахарном диабете 2 типа, в том числе ассоциированным с дислипидемией.

Филотипы *Proteobacteria* и *Firmicutes* снижают представленность при нарушениях липидного, углеводного обмена и при их сочетании, а царство *Fungi* увеличивает представленность при нарушении углеводного обмена. Установлено, что при нарушении углеводного обмена наблюдается значимое увеличение компонентов малых молекул микробного происхождения в крови, что может быть связано с нарушением проницаемости кишечной стенки.

Таким образом, нарушения липидного обмена связаны с ростом численности *Actinobacteria*, а нарушения углеводного обмена - со снижением *Bacteroidetes*.

С помощью факторного анализа определяли корреляции показателей представленности филотипов микробиома при разных вариантах сочетаний состояния углеводного и липидного обмена.

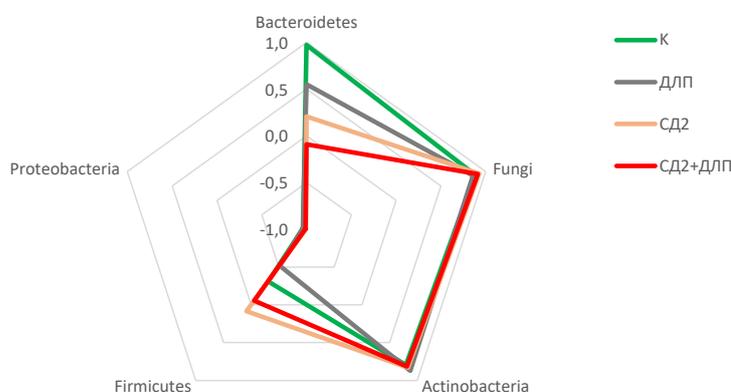


Рисунок 3 – Результаты факторного анализа представленности филотипов микробиоценоза при различных вариантах сочетаний состояния углеводного и липидного обмена

На рисунке 3 показано, что филоотипы *Actinobacteria* и *Fungi* имеют высокие показатели прямой корреляции с фактором 1, а *Proteobacteria* имеют высокие показатели обратной корреляции с фактором 1 во всех исследуемых группах.

Коэффициент корреляции *Bacteroidetes* снижается в ряду К – ДЛП – СД2 – ДЛП+СД2.

Коэффициент корреляции филоотипа *Firmicutes* изменяется в группах в области статистически не значимых значений.

Таким образом, соотношение распространенности *Bacteroidetes* к *Firmicutes* наиболее перспективно для интегральной оценки структуры микробиома человека при метаболических нарушениях.

Таблица 4 - Частота встречаемости показателей вне нормы у пациентов с нарушением углеводного и липидного обмена

Показатели	Группы			
	Конт- роль	Дисли- пидемия	Сахарный диабет 2 типа	Сочетание дисли-пидемии и сахарного диабета 2 типа
Микробные маркеры бактериального плазмалогена	11,1	15,4	69,2*	50,7*
Микробные маркеры бактериального эндотоксина	33,3	33,3	69,2*	53,7*
Соотношение В/Ф	5,6	15,4*	56,4*	68,7*

Примечание: * отмечены значения, которые статистически значимо отличаются от группы контроля ($p < 0,05$).

Из анализа частоты встречаемости показателей вне нормы (Таблица 4) можно отметить что при нарушении углеводного обмена статистически значимо увеличивается число пациентов с показателями вне нормы для концентрации плазмалогена, эндотоксина и соотношения В/Ф. А при нарушении липидного обмена статистически значимо увеличивается число пациентов с соотношением В/Ф вне нормы.

Рост концентрации плазмалогена и эндотоксина в крови может быть связан с нарушением проницаемости кишечной стенки, что подтверждается аналогичным увеличением концентрации компонентов клеточной стенки микроорганизмов в крови при нарушении углеводного обмена. Изменение структуры микробиома описываемое соотношением В/Ф более чувствительно к изменениям в макроорганизме.

Исследование корреляционной связи между концентрациями биохимических показателей нарушений углеводного и липидного обмена с представленностью филоотипов микроорганизмов представлено в таблице 5.

Таблица 5 - Результаты корреляционного анализа концентраций биохимических показателей нарушений углеводного и липидного обмена с представленностью филоотипов микроорганизмов

Показатель	ОХС	ТГ	Контроль			Дислипидемия				
			ХС ЛПНП	ХС ЛПВП	Глюко за	ОХС	ТГ	ХС ЛПНП	ХС ЛПВП	Глюко за
В/Ф	0,12	-0,47	0,15	0,18	0,63	0,02	0,10	0,14	-0,20	0,21
<i>Actinobacteria</i>	0,21	-0,42	0,29	-0,02	0,55	0,13	0,15	0,10	0,01	-0,15
<i>Bacteroidetes</i>	0,09	-0,46	0,14	0,15	0,64	0,02	0,13	0,15	-0,23	0,26
<i>Proteobacteria</i>	-0,14	0,37	-0,15	-0,22	-0,62	0,02	0,07	-0,04	0,02	0,30
<i>Firmicutes</i>	0,04	0,23	0,03	-0,23	-0,91	-0,19	0,06	-0,16	-0,22	0,35
<i>Fungi</i>	0,10	-0,32	0,09	0,27	0,57	-0,08	-0,18	0,02	0,00	-0,34

Показатель	ОХС	ТГ	ХС ЛПНП	ХС ЛПВП	Глюкоза	ОХС	ТГ	ХС ЛПНП	ХС ЛПВП	Глюкоза
	<i>Сахарный диабет 2 типа</i>					<i>Сахарный диабет 2 типа при дислипидемии</i>				
V/F	0,01	0,44	V/F	0,01	0,44	V/F	0,01	0,44	V/F	0,01
Actinobacteria	-0,26	0,10	-0,28	-0,16	0,02	0,07	0,12	-0,04	0,22	0,18
Bacteroidetes	0,03	0,45	-0,20	0,11	-0,29	0,08	-0,11	0,00	-0,10	-0,31
Proteobacteria	0,18	-0,13	0,29	0,04	0,05	-0,06	-0,08	0,06	-0,23	-0,06
Firmicutes	0,14	0,04	-0,24	-0,07	-0,39	0,03	-0,04	0,07	-0,10	-0,20
Fungi	-0,13	0,12	-0,27	0,01	-0,05	0,02	0,06	-0,07	0,18	0,02

Примечание: Полужирным курсивом выделены коэффициенты корреляции Пирсона, имеющие статистическую значимость ($p < 0,05$).

По данным, представленным в таблице 5 можно отметить, что при сахарном диабете 2 типа есть прямая корреляционная связь между уровнем триглицеридов и представленностью *Bacteroidetes*. Отмечается обратная сильная корреляционная связь в группе сравнения между уровнем глюкозы и представленностью *Firmicutes*. Обратная корреляционная связь, но меньшей силы отмечается между этими параметрами в группе сахарный диабет 2 типа. Это может быть связано с разнородностью филопита *Firmicutes*, который имеет в своем составе микроорганизмы с различными метаболическими путями, обеспечивающими быстрое переключение микробного пищеварения с одного субстрата на другой. При дислипидемии корреляционные связи не обнаруживаются.

Для оценки зависимости состояния микробиом-ассоциированного экспозома по показателю коэффициентов уникальности моделей СД2 и СЧДЛ и уровня основных биохимических показателей проанализированы результаты корреляционного анализа, представленные в таблице 6.

Таблица 6 - Коэффициенты корреляции основных показателей углеводного и липидного обмена и коэффициентов уникальности моделей СЧДЛ и СД2

	Коэффициент уникальности модели СЧДЛ				Коэффициент уникальности модели СД2			
	ГС	ДЛП	СД2	СД2+ДЛП	ГС	ДЛП	СД2	СД2+ДЛП
ОХС	-0,180	0,057	0,250	0,196	0,153	0,119	-0,015	0,031
ТГ	-0,132	0,368	0,364	0,400	0,114	-0,050	0,120	-0,238
ХС ЛПНП	-0,168	-0,060	0,063	0,041	0,228	0,107	0,034	0,161
ХС ЛПВП	0,149	0,416	-0,012	-0,145	0,220	0,240	0,151	-0,092
Глюкоза	0,706	-0,185	-0,371	-0,255	0,269	-0,503	0,388	0,323

Примечание: Полужирным курсивом выделены коэффициенты корреляции Пирсона, имеющие статистическую значимость ($p < 0,05$).

В таблице 6 показано, что коэффициент уникальности СЧДЛ, характеризующий степень тяжести нарушений липидного обмена, связан прямой корреляционной связью с уровнем триглицеридов, которая прослеживается и при нарушении углеводного обмена, и при сочетании нарушений углеводного и липидного обмена. При дислипидемии также имеется прямая корреляционная связь с уровнем холестерина липидов высокой плотности. Которая не прослеживается при нарушении углеводного обмена, в том числе в сочетании с нарушением липидного обмена. Наблюдается слабая обратная корреляционная связь с уровнем глюкозы при сахарном диабете 2 типа, которая не прослеживается при присоединении дислипидемии.

Коэффициент уникальности СД2, характеризующий степень тяжести нарушений углеводного обмена, связан обратной корреляционной связью с уровнем глюкозы при дислипидемии, и прямой корреляционной связью при сахарном диабете 2 типа.

На основании представленных данных можно утверждать, что нарушения углеводного обмена сопровождаются эндотоксемией, связанной с нарушением проницаемости кишечной

стенки, что приводит к увеличению содержания в крови общего пула компонентов клеточной стенки микроорганизмов, бактериального плазмалогена, и эндотоксина. Нарушения углеводного обмена сопровождаются подавлением роста в первую очередь *Bacteroidetes*, а также *Proteobacteria* и *Firmicutes*. При сахарном диабете снижается показатель соотношения В/Ф. Отмечается прямая корреляция уровня глюкозы и коэффициента уникальности модели СД2 при сахарном диабете 2 типа и обратная корреляция при дислипидемии.

Нарушения липидного обмена характеризуются увеличением представленности *Actinobacteria* и снижением показателя соотношения В/Ф. Отмечаются корреляции состояния микробиома, характерного для сочетанной дислипидемии с большинством биохимических показателей нарушения липидного обмена и с уровнем глюкозы.

Оценка особенностей нарушения липидного обмена у лиц пожилого возраста с использованием подходов микробиом-ассоциированной экспосомики

Для характеристики структуры микробиома при различных проявлениях нарушений липидного обмена провели сравнение показателей представленности по филотипам микробиома. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Распространенность филотипов микробиома при разных проявлениях липидного обмена у лиц пожилого возраста

Показатели	Контроль	Дислипидемия	Сахарный диабет 2 типа	Сочетание дислипидемии и сахарного диабета 2 типа
Actinobacteria	9,4[8,5-10]	10,4[9,4-12,3]*	10,2[8,9-11,8]	10,3[8,6-11,8]*
Bacteroidetes	4,4[0,8-6,7]	4,3[1,1-7,7]	1,4[0,8-7,1]	4,2[0,9-6,2]
Proteobacteria	69,6[65,1-72,2]	64,1[60,4-70,5]*	65,9[63,3-69,3]	67[62,8-70,3]
Firmicutes	27,3[23,1-35,5]	27,4[22,6-33,6]	28,3[23,3-30,2]	28,2[22,5-30,3]
Fungi	21,7[19,4-25,9]	25,5[20,7-28,2]	24,1[21,7-27,4]	23,8[20,8-26,1]
Суммарная концентрация микробных маркеров в крови	146[107,5-208,6]	131,1[88,2-200,5]	186,3[165,8-209,8]	184,1[145,5-244,7]*

Примечание: * отмечены значения, которые статистически значимо отличаются от группы контроля ($p < 0,05$).

В таблице 7 показано, что микроорганизмы филотипа *Actinobacteria* увеличивают свою представленность при гиперхолестеринемии и сочетанной дислипидемии. Филотип *Proteobacteria* снижает представленность при гиперхолестеринемии. Статистически значимое увеличение компонентов клеточной стенки в крови наблюдается при сочетанной дислипидемии.

Таблица 8 - Частота встречаемости показателей вне нормы у пациентов с нарушением углеводного и липидного обмена

Показатели	Группы			
	Конт-роль	гипер-холести-ринемия	гипер-триглице-ринемия	сочетанной дисли-пидемия
Микробные маркеры бактериального плазмалогена	41,5	26,3	51,9 *	49,1
Микробные маркеры бактериального эндотоксина	43,9	34,2	66,7 *	57,9
Соотношение В/Ф	46,3	42,1	48,1	47,4

Примечание: * отмечены значения, которые статистически значимо отличаются от группы контроля ($p < 0,05$).

Из анализа частоты встречаемости показателей вне нормы (Таблица 8) можно отметить, что при гипертриглицеринемии статистически значимо увеличивается число пациентов с показателями вне нормы для концентрации плазмалогена, эндотоксина.

Исследование корреляционной связи между концентрациями биохимических показателей нарушений липидного обмена с представленностью филоципов микроорганизмов представлено в таблице 6.

Таблица 9 - Результаты корреляционного анализа концентраций биохимических показателей нарушений липидного обмена с представленностью филоципов микроорганизмов

	ОХС	ТГ	ХС ЛПНП	ХС ЛПВП	Глю- коза	ОХС	ТГ	ХС ЛПНП	ХС ЛПВП	Глю- коза
	<i>Контроль</i>					<i>Гиперхолестеринемия</i>				
<i>B/F</i>	-0,008	-0,105	-0,056	-0,155	-0,493	0,056	-0,094	0,230	-0,066	-0,331
<i>Actinobacteria</i>	-0,148	-0,004	-0,160	-0,038	0,186	0,129	-0,091	0,090	-0,020	-0,110
<i>Bacteroidetes</i>	-0,009	-0,088	-0,055	-0,188	-0,526	0,044	-0,067	0,216	-0,068	-0,346
<i>Proteobacteria</i>	0,066	-0,009	0,172	-0,121	-0,124	-0,115	0,123	-0,171	0,067	-0,013
<i>Firmicutes</i>	0,034	0,245	-0,081	-0,287	-0,550	-0,125	0,215	-0,030	-0,137	-0,036
<i>Fungi</i>	-0,034	0,006	-0,154	0,178	0,138	0,091	-0,117	0,181	-0,084	0,085
	<i>Гипертриглицеридемия</i>					<i>Сочетанная дислипидемия</i>				
<i>B/F</i>	0,119	0,056	-0,237	-0,211	-0,084	0,222	-0,191	0,158	0,002	-0,518
<i>Actinobacteria</i>	-0,222	0,083	-0,366	0,327	0,206	0,030	0,236	-0,031	0,195	0,178
<i>Bacteroidetes</i>	0,163	0,049	-0,194	-0,244	-0,102	0,235	-0,217	0,167	-0,013	-0,531
<i>Proteobacteria</i>	0,263	0,204	0,532	-0,565	-0,081	0,046	-0,327	0,139	-0,143	-0,089
<i>Firmicutes</i>	0,219	-0,148	0,179	-0,310	-0,558	0,127	-0,078	0,105	-0,028	-0,319
<i>Fungi</i>	-0,254	-0,314	-0,535	0,600	0,042	-0,113	0,324	-0,189	0,058	0,044

Примечание: Полужирным курсивом выделены коэффициенты корреляции Пирсона, имеющие статистическую значимость (p<0,05).

В таблице 9 показано, что уровень глюкозы в группе контроль имеет обратную корреляцию с *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, а также с соотношением В/Г.

В группе Гипертриглицеринемия наблюдается обратная корреляция уровня глюкозы с *Firmicutes*, а при сочетанной дислипидемии с *Bacteroidetes*.

Холестерин липидов низкой плотности имеет прямую корреляцию с представленностью *Proteobacteria* и обратную корреляцию с *Fungi*.

Для холестерина липидов высокой плотности наблюдается зеркальная картина обратной корреляции с представленностью *Proteobacteria* и прямая корреляция с *Fungi*.

В группе Сочетанная дислипидемия уровень триглицеридов имеет обратную корреляцию с *Proteobacteria* и прямую с *Fungi*.

Таким образом, наблюдается обратная корреляционная связь во всех группах кроме группы Гиперхолестеринемии между уровнем глюкозы и представленностью *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, а представленностью *Proteobacteria* и *Fungi* связано с уровнями триглицеридами и липидов низкой и высокой плотности.

Для оценки зависимости состояния микробиом-ассоциированного экспозома по показателю коэффициентов уникальности моделей СД2 и СЧД1 и уровня основных биохимических показателей проанализированы результаты корреляционного анализа, представленные в таблице 10.

Таблица 10 - Коэффициенты корреляции основных показателей углеводного и липидного обмена и коэффициентов уникальности СЧДЛ и СД2 при нарушении липидного обмена у лиц пожилого возраста

	КУ СЧДЛ				КУ СД2			
	ГС	ГХС	СЧДЛ	ГТГ	ГС	ГХС	СЧДЛ	ГТГ
ОХС	-0,146	-0,005	0,049	-0,338	-0,174	0,167	-0,263	-0,499
ТГ	-0,048	0,076	0,195	0,364	0,023	0,115	0,148	0,040
ХС ЛПНП	-0,102	-0,289	-0,111	-0,324	-0,075	0,085	-0,193	-0,199
ХС ЛПВП	-0,035	0,336	-0,021	0,063	0,284	0,126	-0,034	0,414
Глюкоза	0,054	-0,324	-0,326	0,060	0,580	0,421	0,411	0,255

Примечание: Полужирным курсивом выделены коэффициенты корреляции Пирсона, имеющие статистическую значимость ($p < 0,05$).

Значения коэффициентов, приведённых в таблице 10, показывают, что при нарушении липидного обмена в группе сравнения и группе СЧДЛ увеличение содержания глюкозы приводит к увеличению коэффициента уникальности СД2, что соответствует современным представлениям. Увеличение коэффициента уникальности СД2 при снижении ОХС может быть связано с тем, что ОХС является препятствующим фактором для развития сахарного диабета при ГТГ и СЧДЛ.

Компьютерная программа предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови

Полученные в результате математического моделирования классификационные уравнения имеют диагностическую ценность, так как по состоянию экспосама указывают на наличие сахарного диабета 2 типа и сочетанной дислипидемии. Для внедрения в работу исследователей, использующих предиктивную диагностику в своей практике, были написаны программы для ЭВМ «Дислипидемия-скрин» и «Диабет-скрин».

Программа «Дислипидемия – скрин» предназначена для определения принадлежности пациента к группе риска нарушений липидного обмена по концентрациям микробных маркеров в крови. Исходными данными для программы являются концентрации 9-изогептадеценовой кислоты (17:1d9); 11-эйкозеновой кислоты (20:1d11); изомиристинового альдегида (i14a) в крови. Полученный результат с прогностической точностью 75,26% укажет принадлежность пациента к группе риска нарушений липидного обмена.

Программа "Диабет - скрин" предназначена для предиктивного анализа состояния здоровья пожилого человека, в результате которого определяется принадлежность пациента к группе риска развития сахарного диабета 2 типа. Исходными данными для предиктивного анализа являются концентрации малых молекул микробного происхождения в крови, определяемые методом газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Исходными данными для предиктивного анализа являются концентрации 3-гидроксимиристиновой, 10-метил-гексадекановой, изононадекановой, 9-изогептадеценовой, транс-9-гексадеценовой, 2-гидрокситетракозановой кислот и холестендиола в крови. Полученный результат с прогностической точностью 85,89% укажет принадлежность пациента к группе риска нарушений липидного обмена. Программа реализована в виде приложения MS Windows 10, имеет дружелюбный и интуитивно понятный интерфейс.

Заключение.

По концентрациям микробных маркеров в крови исследована система взаимодействия макроорганизм – микробиом человека у пожилых людей с нарушениями углеводного и липидного обмена.

В результате исследований были выбраны критерии интегральной оценки микробиома по концентрациям микробных маркеров микроорганизмов в крови, а именно концентрация бактериального плазмалогена и эндотоксина в крови, а также соотношение *Bacteroidetes/Firmicutes* (B/F) характеризующее структуру микробиома.

В результате проведенных исследований получены критические значения для концентрации бактериального плазмалогена (20,66 мкг/мл), эндотоксина (0,48 нмоль/мл) и соотношения B/F (0,049 ед.), рассчитанные на основании определения концентраций малых молекул микробного происхождения в крови, превышение которых с высокой степенью достоверности свидетельствует о структурных изменениях микробиома, характерных для развития сахарного диабета 2 типа.

Используя подходы микробиом-ассоциированной экспосомики, были получены классификационные уравнения линейного дискриминантного анализа для предиктивной диагностики риска развития сахарного диабета 2 типа и риска развития сочетанной дислипидемии. Получены критерии оценки степени изменения микробиома при сахарном диабете 2 типа и при сочетанной дислипидемии, которые называются коэффициентами уникальности и позволяют количественно оценить динамику заболевания. Полученные математические модели имеют высокие прогностические показатели: модель «СД2» - 85,89 % прогностической точности; модель «СЧДЛ» - 75,26 % прогностической точности. Прогностическая точность интегральных критериев оценки микробиома не превышала 69%.

С помощью линейного дискриминантного анализа была построена модель «ДПП», позволяющая по концентрациям микробных маркеров в крови определить степень и направленность изменения микробиома при различных вариантах нарушений липидного обмена. С помощью модели «ДПП» выявлено статистически незначимое изменение соотношений микробных маркеров при гиперхолестеринемии по отношению к норме, при одинаковой степени и различной направленности изменений состояния микробиома при гипертриглицеринемии и сочетанной дислипидемии.

Исследование представленности филотипов микробиома человека по концентрациям микробных маркеров в крови выявило различное изменение структуры при нарушениях липидного и углеводного обмена. Нарушение липидного обмена характеризуется увеличением представленности *Actinobacteria*, а нарушения углеводного обмена подавлением *Bacteroidetes*. При нарушении углеводного обмена за счет увеличения проницаемости кишечной стенки увеличивается суммарное количество компонентов клеточной стенки микроорганизмов в крови, количество бактериального плазмалогена и эндотоксина.

С помощью корреляционного анализа обнаружена обратная корреляционная связь между уровнем глюкозы и представленностью *Firmicutes* в норме и при сахарном диабете 2 типа. При дислипидемии корреляционная связь не обнаруживается, что указывает на высокую поливалентность *Firmicutes* при выборе субстрата. При сахарном диабете 2 типа выявлена прямая корреляционная связь между уровнем триглицеридов в крови и представленностью *Bacteroidetes*.

Коэффициент уникальности модели СЧДЛ показал разнонаправленные корреляции с биохимическими показателями липидного обмена при дислипидемии и сахарном диабете 2 типа, что указывает на его высокую информативность. Коэффициент уникальности модели СД2 показал прямую корреляцию с уровнем глюкозы при сахарном диабете 2 типа и обратную при дислипидемии.

Исследование представленности филотипов микроорганизмов при различных проявлениях дислипидемии показало увеличение представленности *Actinobacteria* и снижение *Proteobacteria* при гиперхолестеринемии.

Корреляции представленности филотипов микроорганизмов и показателей нарушения липидного и углеводного обмена выявил разнонаправленные корреляции *Proteobacteria* и *Fungi* при гипертриглицеринемии в отношении уровня холестерина низкой и высокой плотности, а при сочетанной дислипидемии в отношении триглицеридов. Уровень глюкозы имеет обратную корреляцию с *Firmicutes* при гипертриглицеринемии и с *Bacteroidetes* при сочетанной дислипидемии.

Коэффициент уникальности модели СЧДЛ не имел корреляций ни с одним из биохимических показателей углеводного и липидного обмена. Коэффициент уникальности модели СД2 показал прямую корреляцию с уровнем глюкозы и обратную с общим холестериновым числом при гипертриглицеринемии и сочетанной дислипидемии.

Для внедрения полученных результатов в сферу практического здравоохранения разработана программа для ЭВМ. Программа позволяет использовать результаты предиктивного анализа для диагностики сахарного диабета 2 типа по состоянию микробиома пациентов.

Выводы

1. С помощью концентраций микробных маркеров в крови определены критерии структуры микробиома человека, а именно представленность *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacterium*, *Fungi* соотношение В/Ф, суммарная концентрация микробных маркеров в крови, концентрация бактериального плазмалогена и бактериального эндотоксина.
2. Интегральной характеристикой состояния микробиома человека при нарушении углеводного обмена являются концентрации бактериального эндотоксина и плазмалогена в крови. Определены пороговые значения концентраций бактериального плазмалогена и эндотоксина в крови, а также показателя В/Ф (20,66 мкг/мл, 0,48 нмоль/мл и 0,049 ед. при AUC=0,74, 0,75 и 0,8 соответственно), изменения уровня которых в сравнении с референсными значениями указывают на высокий риск развития СД2.
3. С помощью линейного дискриминантного анализа концентраций микробных маркеров в крови созданы математические модели для микробиом-ассоциированной экспосомики, характеризующие нарушения углеводного обмена («СД2»), нарушения липидного обмена («СЧДЛ») и оценки состояния микробиома при различных типах дислипидемии («ДЛП»). Модели СД2, СЧДЛ, ДЛП имеют высокие прогностические показатели - 85,89%, 75,26% и 43,8% прогностической точности, 80,35%, 70% и 31,7% специфичности и 88,78%, 78,95% и 51,5% чувствительности соответственно.
4. Нарушения углеводного обмена у лиц пожилого возраста характеризуются увеличением суммарной концентрации микробных маркеров, бактериального плазмалогена и бактериального эндотоксина в крови, снижением представленности *Bacteroidetes* в микробиоме и снижением критерия структуры микробиома В/Ф. Увеличение уровня глюкозы в крови при нарушении углеводного обмена связано с изменениями структуры экспосома характерного для сахарного диабета 2 типа ($R=0,388$; $p < 0,05$).
5. Нарушения липидного обмена у лиц пожилого возраста характеризуются увеличением представленности *Actinobacteria*. При различных типах нарушений липидного обмена установленная корреляционная связь ТГ, ХС ЛПНП и ХС ЛПВП с представленностью

филотипов *Proteobacteria* и *Fungi*. Уровень глюкозы связан обратной корреляцией с представленностью *Bacteroidetes* и *Firmicutes* при нарушениях липидного обмена и в группе сравнения.

6. Для скрининговой диагностики сахарного диабета 2 типа и сочетанной дислипидемии разработан алгоритм расчета, реализованный в программах «Дислипидемия-скрин» и «Диабет-скрин», позволяющий с высокой прогностической точностью устанавливать диагноз СД2 и сочетанной дислипидемии.

Практические рекомендации:

1. Оценка степени нарушений углеводного и липидного обмена должна проводиться с учетом концентрации бактериального плазмалогена и эндотоксина в крови: для бактериального плазмалогена 20,66 мкг/мл и ниже; для бактериального эндотоксина 0,48 нмоль/мл и ниже.
- 2 Для скрининговых исследований сахарного диабета 2 типа и сочетанной дислипидемии можно использовать предиктивную диагностику, основанную на определении специфического соотношения малых молекул микробного происхождения в крови, реализованную в программе «Диабет-скрин»

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные результаты могут быть с успехом использоваться современной физико-химической биотехнологии, в практическом здравоохранении и являются частью персонализированной медицины, которая эффективна за счет выявления групп риска и прогноза развития заболеваний для коррекции профилактических или лечебных мер с учетом индивидуальных особенностей здоровья пациента, ранней диагностики диабета 2 и 3 типа (в том числе болезни Альцгеймера), нарушении липидного метаболизма, атеросклероза и др.

Публикации автора по теме диссертации

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. Безродный, С.Л. Кишечная микробиота как источник новых биомаркеров старения / С.Л. Безродный, Б.А. Шендеров // Вестник восстановительной медицины. – 2015. – № Т. 66, № 2. – С. 40-47. SCOPUS. IF=2.355. Цит. 10.

2. Безродный, С.Л. Оценка состояния кишечного микробиоценоза на основе бактериального эндотоксина и плазмалогена у лиц старшего возраста с патологией сахарного диабета 2 типа / С.Л. Безродный, С. Г. Марданлы, А.М. Затевалов, Е. В. Терёшина, А. Ю. Миронов, В. В. Помазанов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т. 66, № 9. – С. 565-570. SCOPUS. IF=0,544. Цит. 1.

3. Безродный, С.Л. Оценка состояния микробиома у лиц пожилого возраста с нарушениями углеводного и липидного обмена методом микробиом-ассоциированной экспосомики / С. Л. Безродный, С. Г. Марданлы, А. М. Затевалов, В.В. Помазанов, Э.Р. Мехтиев // MIR J – 2022. – Т. 9, №1. – С. 9–17. РИНЦ; IF= 0,842; Цит. 0.

Другие публикации

4. Безродный, С.Л. Развитие концепции экспосома в оценке влияния микробиома на нарушения липидного и углеводного обмена человека / С.Л. Безродный С. Г. Марданлы, А.М. Затевалов, Е. В. Терёшина, А. Ю. Миронов, В. В. Помазанов // Известия ГГТУ-Медицина *Фармация, Орехово-Зуево, РИО ГГТУ. – 2021. – Т. 008, №4. – С. 7-21

5. Затевалов, А.М. Оценка степени тяжести сахарного диабета 2 типа методом микробиом-ассоциированной экспосомики у пациентов с нарушениями углеводного и липидного обмена / А.М. Затевалов, **С.Л. Безродный**, С. Г. Марданлы, А. Ю. Миронов, В. В. Помазанов // Известия ГГТУ-Медицина *Фармация, Орехово-Зуево, РИО ГГТУ. – 2021. – Т. 008, №4. – С. 7-21.

6. **Безродный, С.Л.** Возможности применения пробиотиков в антивозрастном аспекте // Попова Е.Н., Орлова А.С., Пономарев А.Б., Суворов А.Н., **Безродный С.Л.**, Шендеров Б.А. В книге: микробиота. под редакцией Е.Л. Никонова и Е.Н. Поповой. Москва. – 2019. – С. 198-215.

7. **Безродный, С.Л.** Предиктивная диагностика сахарного диабета 2 типа и сочетанной дислипидемии по анализу экспосома человека. Учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / **С.Л. Безродный**, С.Г. Марданлы, А.М. Затевалов, Е.В. Терешина, В.А. Киселёва, В.В. Помазанов // Орехово-Зуево, 2021.

8. **Безродный, С.Л.** Практическое применение предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа у лиц пожилого возраста / **С.Л. Безродный**, А.М. Затевалов, Е.В. Терешина // В книге: Инновационные технологии в эндокринологии. Сборник тезисов IV (XXVII) Национального конгресса эндокринологов с международным участием. Москва, 2021. – С. 63.

Изобретения

9. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2022612817, 28.02.2022. Заявка № 2022611747 от 09.02.2022. «Дислипидемия-скрин» Марданлы С.Г., **Безродный С. Л.**, Садеков Т. Ш., Затевалов А.М., Терешина Е.В., Помазанов В.В. Заявитель: ЗАО «ЭКОлаб»

10. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2022612120, 08.02.2022. Заявка № 2020667858 от 01.02.2022. «Диабет-скрин» Марданлы С. Г., **Безродный С. Л.**, Садеков Т. Ш. Затевалов А.М., Терешина Е.В., Помазанов В.В. Заявитель: ЗАО «ЭКОлаб»

Список сокращений

ДЛП-дислипидемия	ЛДА – линейный дискриминантный анализ
СД2 – сахарный диабет 2-го типа	ОХС (ХС)-общий холестерол
ГХ-МС – газовая хроматография-масс-спектрометрия	ТГ – триглицериды
Н-норма	ХС ЛПНП – холестерол липопротеидов низкой плотности
СЧДЛ – сочетанная дислипидемия	ХС ЛПВП – холестерол липопротеидов высокой плотности
ГТГ- гипертриглицеридемия	ЛППП- липопротеиды промежуточной плотности
ГХС-гиперхолестеринемия	ЖК - жирные кислоты
ЛПС-липополисахарид	
КОЕ – колонии образующие единицы	