

ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ЭКОлаб»

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

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук

С. Г. Марданлы

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Методология и методы исследования	10
Материалы и методы исследования	12
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	21
Степень достоверности и апробация результатов исследования	21
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	23
Роль микробиоты в липидном и углеводном обмене человека	23
1.1. Микробные маркеры - малые молекулы микробного происхождения	24
1.2. Понятие дисбиоза кишечника, причины его развития.	33
1.3. Дислипидемия как причина возраст-ассоциированных неинфекционных заболеваний	38
1.4. Связь нарушений липидного обмена и дисбиоза кишечника	42
1.5. Дислипидемии при нарушениях углеводного обмена и дисбактериоз кишечника (метаболический синдром и СД 2 типа).....	44
1.6. Современные направления коррекции дислипидемий у больных с СД 2 типа.....	46
1.7. Особенности использования метода математического моделирования в биологии и медицине....	52
1.8. Заключение	61
ГЛАВА 2. Интегральная оценка нарушений углеводного и липидного обмена по концентрациям микробных маркеров в крови.....	62
2.1. Определение критериев интегральной оценки состояния микробиома лиц пожилого возраста при нарушении углеводного обмена	63
2.2. Создание математических моделей предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа и дислипидемии у лиц пожилого возраста.....	69
2.2.1. Модель предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови	70
2.2.2. Модель предиктивной диагностики сочетанной дислипидемии по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови	77
2.3. Изучение методом математического моделирования концентраций малых молекул микробного происхождения в крови при разных типах ДЛП.....	83
2.4. Заключение по 2 главе	89
ГЛАВА 3. Интегральная оценка состояния микробиома по содержанию микробных маркеров в крови..	90
3.1. Оценка особенностей структуры микробиома у лиц пожилого возраста при различных вариантах нарушения липидного и углеводного обмена	90
3.2. Оценка особенностей нарушения углеводного обмена методом микробиом-ассоциированной экспосомики у лиц пожилого возраста	98
3.3. Оценка особенностей нарушения липидного обмена методом микробиом-ассоциированной экспосомики у лиц пожилого возраста	100

3.4. Компьютерная программа предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови.....	112
3.5. Заключение по 3 главе	114
Заключение	116
Выводы	118
Практические рекомендации.....	120
Перспективы дальнейшей разработки темы	120
Список сокращений.....	120
Список терминов	122
Список использованной литературы	124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Персонафицированная медицина является перспективным направлением медицинской науки, развивающимся, за счет широкого использования подходов системной биологии и медицины, а также использования профилактики и предиктивной диагностики [15,93,101]. Ядром предиктивной диагностики являются ОМИК-технологии, которые за счет использования систем распознавания образов и многомерной статистики могут успешно обрабатывать большие массивы данных, извлекая, необходимую информацию [137,188].

ОМИК-технологии на сегодняшний момент динамично развиваются и применяются в диагностике неизлечимых или трудноизлечимых заболеваний со сложной, стертой симптоматикой или протекающих бессимптомно за счет выявления новых критериев и установления, решающих правил. Динамично расширяется как спектр диагностируемых заболеваний, так и спектр химических соединений, которые до сих пор не имели диагностической значимости в рамках диагностики, используемой, в реактивной медицине [105,112,162,201,214].

Микробиом, рассматриваемый как отдельный орган человека, в существенной степени влияет на регуляцию генов и индивидуальное развитие макроорганизма, имеет решающее значение для его иммунологического, гормонального и метаболического гомеостаза [17]. В процессе симбиотической деятельности макро- и микроорганизмов в кровь непрерывно поступают жизненно необходимые биологически активные молекулы, образованные как в процессе переработки поступающей пищи, так и жизнедеятельности бесконечно огромного числа самых разнообразных бактерий, архей, грибов, вирусов [45]. Качество и количество поступающих молекул определяют 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 атеросклероз зависимых заболеваний [6,20]. Дефицит или избыток углеводов – к различным видам диабета. Развитию гипергликемии предшествует развитие дислипидемии [11, 12,13, 98,95,186,203].

Огромное количество факторов, влияющих на качественный и количественный состав генерируемых микробиотой низкомолекулярных соединений и их генетическая связь с продуцентом диктует необходимость разработки технологии микробиом-ассоциированной экспосомики, способной описать совокупность факторов окружающей среды, влияющих на регуляцию генов и индивидуальное развитие организмов [175]. «Хотя экспосом, в отличие от генома, не является внутри- или межклеточным параметром, учет вклада окружающей среды необходим для прогнозирования фенотипа организма, а также ранней диагностики и индивидуализированного подбора лечения [53,211,143,200].

Таким образом, получение методом высокоэффективной хромато-масс-спектрометрии и линейного дискриминационного анализа прецизионных качественных и количественных критериев экспосома, связанных с продукцией и регистрацией в крови низкомолекулярных компонентов крови, жирные кислоты, спирты, альдегиды, стероиды), продуцируемых бактериями микробиоты желудочно-кишечного тракта с последующим выбором молекул-маркеров, ответственных за патологический процесс макроорганизма на примере диабета и сочетанной дислипидемии у пациентов пожилого возраста и создание с применением многомерной статистики, систем распознавания образов и «микротехнологий», технологии микробиом-ассоциированной экспосомики для интегральной оценки нарушений липидного и углеводного обмена по химическому составу выбранных маркеров [4,14] является актуальным.

Применение микробиом-ассоциированной экспосомики, как методики интегральной оценки микробно-тканевого комплекса силизистой оболочки ЖКТ может быть особенно эффективно при нарушении обмена веществ, а именно при нарушении углеводного обмена. По результатам морфологических исследований слизистая оболочка кишечника при сахарном диабете инфильтрована макрофагами, имеет воспалительный профиль и имеет все признаки иммунной

активации [40]. Ожидается существенное влияние химических соединений микробного происхождения на состав микробиом-ассоциированного экспосома и значимый вклад бактериального эндотоксина в общую эндотоксимию [14]. По данным IDF (International Diabetes Federation), в мире насчитывается более 350 млн людей, больных диабетом, и тенденция к росту сохраняется [12]. Несмотря на то, что сахарный диабет 2 типа (СД2) встречается во всех возрастных группах, включая детей [95], он по-прежнему считается заболеванием, характерным для людей в старшей возрастной группе [186]. Число новых случаев СД2 скачкообразно увеличивается после 45 лет [12]. Развитию гипергликемии предшествует дислипидемия, а частота встречаемости нарушений липидного обмена при СД2 достигает 72–85% [11].

Диабет часто следует за ожирением и метаболическим синдромом (МС). Основными диагностическими критериями МС являются повышенный уровень триглицеридов (ТГ) в крови и сниженное содержание липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) [98]. Полагают, что такой же тип дислипидемии характерен и для СД2 [203].

Степень разработанности темы исследования

Основанием для проведения диссертационного исследования послужила актуальность разработки нового направления персонифицированной медицины – метаболомики, предназначенного для изучения уникальных соотношений концентраций химических веществ в биосубстратах, характерных для различных процессов, протекающих в живых клетках [71]. По мере развития метаболомики химические вещества, используемые для оценки состояния системы разделили на вещества, продуцируемые человеческими клетками и вещества, привнесённые извне. Последние являются факторами окружающей среды, влияющими на регуляцию генов и индивидуальное развитие организма [209]. Хотя экспосом в отличие от генома, протеома и метаболома не является внутри- или межклеточным параметром, учет его вклада необходим для оценки нарушений липидного и углеводного обмена. В настоящем исследовании для расчета задействуется только часть экспосома – малые молекулы микробного

происхождения, что позволяет сосредоточиться на системе взаимодействий микробиота – макроорганизм.

Малые молекулы микробного происхождения начиная с 90-х годов прошлого века исследуются в связи со своей способностью влиять на иммунные реакции макроорганизма и течение патологических процессов. К малым молекулам микробного происхождения относятся альдегиды, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, гидроксикислоты с длиной углеродной цепи от 10 до 24 атомов углерода, а также стерины. Источником малых молекул являются белки мембраны клеточной стенки микроорганизмов [6]. Продукция малых молекул связана с количеством микроорганизмов, скоростью всасывания в кровь, скоростью вывода с мочей и других процессов. Множество разнонаправленных процессов, влияющих на текущую концентрацию малых молекул в крови приводит к тому, что концентрация имеет большую дисперсию среднего значения и не может характеризовать процессы [34]. Поэтому исследование патологических процессов нарушения липидного и углеводного обмена с помощью концентраций малых молекул в крови можно использовать только с применением многомерной статистики, систем распознавания образов, распространенных для омик-технологий [8,22]. Таким образом, часть экспосома, связанная с продукцией малых молекул микроорганизмами можно отнести к микробиом-ассоциированной экспосомике.

Применение микробиом-ассоциированной экспосомики дает возможность определить состояние микробиома и выявить специфическое соотношение концентраций компонентов клеточной стенки микроорганизмов в крови при сахарном диабете и сочетанной дислипидемии, полученных методом линейного дискриминантного анализа их концентраций [32,35].

Вышеизложенное свидетельствует о необходимости изучения функциональной активности микробиома человека, а также определения специфических соотношений концентраций компонентов клеточной стенки микроорганизмов 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 флотипов *Bacteroidetes* к микробным маркерам *Firmicutes* (В/Ф).

Впервые обоснованы референсные значения показателя В/Ф 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-технического университета (ГГТУ), (Справка о внедрении от 01.09.2021г.; уровень внедрения – учрежденческий)

Выпущено учебное пособие «Предиктивная диагностика сахарного диабета 2 типа и сочетанной дислипидемии по анализу экспосома 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

Методология настоящего исследования спланирована в соответствии с поставленной целью. Объектами исследования стали малые молекулы микробного происхождения, выделенные из крови людей. Предметом исследования явились результаты исследований концентраций малых молекул микробного происхождения в крови людей. Научная литература, посвященная проблеме исследования 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

Объекты исследования

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

Кровь пациентов с различной степенью нарушений липидного и углеводного обмена

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 гипертриглицеридемией - 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%), «ГТГ» - 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.

Материалы и методы исследования

Сбор образцов крови

Способ организации выборки обследованных больных носил характер рандомизированного отбора с формированием простой случайной выборки больных.

Характеристика пациентов. Отбор пациентов и исследование биохимии липидного профиля крови проводилось в период 2013-2016 годов на базе 3 медицинских учреждений: РГНКЦ геронтологии, Москва - 114 человек в возрасте 45-90 лет с полиморбидностью из отделений: терапии 1, терапии 2, кардиологии, гастроэнтерологии (ответственный исполнитель: Плетенева О.П.); ГКБ им. Н.А. Ворохобова, Москва - 63 человека в возрасте 45-90 лет из 2-го эндокринологического отделения (ответственный исполнитель: Бревнова Н.В.) с диагнозом СД 2 типа (диагноз поставлен на основании клинико-anamнестического исследования и результатов биохимического анализа крови врачом-эндокринологом).

Все исследованные пациенты, не имели симптомов острых кишечных инфекций и не принимали антибиотиков и нестероидных противовоспалительных препаратов в течение 2 месяцев до забора образцов. Пациенты с диагнозом СД 2 находились на комплексной пероральной терапии сахароснижающими препаратами: бигуанидами (метформин) и сульфонилмочевины (глибенкламид) в различных дозировках. Так же из выборки были исключены больные, находящиеся в тяжелых критических состояниях, и имеющие сложные общесоматические патологии.

Материалом исследования являлась цельная венозная кровь пациентов, которую отбирали в индивидуальную пластиковую пробирку фирмы Vassuette КЗ ЭДТА, объемом 5 мл, транспортировали в специализированных медицинских боксах с хладогентом в течение 2 часов в лабораторию.

Исследование липидного профиля проводили в лаборатории липидного обмена РГНКЦ.

Определение концентраций микробных маркеров проводилось на базе МНИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского.

Биохимический анализ крови

Забор крови для фенотипирования дислипидемий (определения типов ДЛП) проводился через 12-14 часов после последнего приема пищи. Для определения липидного профиля проводили преаналитический этап – получение плазмы крови центрифугированием. Вакуумные пробирки «Vacutainer» с кровью помещали в центрифугу «Labmaster ABC-GF35R» и проводили центрифугирование 10 мин., при 3000 об/мин, при 15⁰С.

Затем пробирки помещали в биохимический анализатор «Advia 1800 Siemens Healthcare Diagnostics», США – Германия, который входит в автоматическую систему биохимического и иммунологического анализа «Labcell». Система автоматизированно определяла необходимые биохимические показатели: глюкозу (Глю), триглицериды (ТГ), общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП), холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП).

Фенотипирование ДЛП осуществлялось по классификации, предложенной в 1967 году D.Fredrickson et al., одобренной и расширенной в 1970 году ВОЗ [87].

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Реактивы, используемые для хромато-масс-спектрометрического исследования крови на содержание микробных маркеров:

- Н-Гексан, х.ч., ЗАО «Вектон» г. Санкт-Петербург, Россия

- Метанол, х.ч., ЗАО «Вектон» г. Санкт-Петербург, Россия
- Соляная кислота, х.ч., ЗАО «Вектон» г. Санкт-Петербург, Россия
- Тридекановая кислота, ч., ЗАО «Вектон» г. Санкт-Петербург, Россия
- Дейтерометанол, ч.д.а., ЗАО «Вектон» г. Санкт-Петербург, Россия
- BSTFA + TMCS 99:1, ЗАО «Вектон» г. Санкт-Петербург, Россия
- Этоксиэтан, ч.д.а., ЗАО «Вектон» г. Санкт-Петербург, Россия
- Гелий газообразный очищенный (сжатый), марки А, ООО «Технологии Технических Газов» г. Москва, Россия.

Материалом для исследования служила цельная кровь из вены, которую отбирали в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), замораживали при -18°C и транспортировали в лабораторию в течение 30–60 минут. Кровь отбирали согласно Методическим указаниям «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» МУ 4.2.2039-05 пункт 3 [24]. Доставленные пробы подвергали анализу на состав микробных маркеров. Пробоподготовка по исследованию микробных маркеров крови осуществлялась согласно учебно-методическому пособию «Методика масс-спектрометрии микробных маркеров как способ оценки пристеночной кишечной микробиоты при заболеваниях органов пищеварения» [23].

Для анализа кровь в количестве 40 мкл пипеткой переносили в виалу, емкостью 1,5 мл, с завинчивающейся крышкой с тефлонированной прокладкой, затем подсушивали (при снятой крышке) в термостате при 80°C с добавлением равного по объему крови метанола для ускорения сушки. Затем, к загустевшей пробе добавляли 400 мкл 1М HCl в метаноле, завинчивали плотно крышкой и подвергали кислому метанолизу при 80°C в течение одного часа, в результате чего происходило высвобождение жирных кислот, входящих в состав сложных липидов пробы, в виде метиловых эфиров. К охлажденной реакционной среде добавляли 300 нг внутреннего стандарта - дейтерометилловый эфир тридекановой кислоты, растворенного в гексане. Затем проводили экстракцию 400 мкл гексана, встряхивали смесь на вортексе и позволяли отстояться в течение 5 мин при комнатной температуре. Экстракт (декантат) переносили в чистую виалу,

высушивали 7 мин при 80⁰С, и сухой остаток обрабатывали 20 мкл N,O-бис (триметилсилил)-трифторацетамида (BSTFA) для получения триметилсилильных эфиров окси-кислот, альдегидов и стеролов при той же температуре и при закрытой крышке в течение 10 мин. К реакционной смеси добавляли 80 мкл гексана и, при анализе с использованием автосемплера, переносили смесь в коническую вставку, которую помещали в ту же виалу, в которой проводили силилирование. Завинчивали виалу плотно крышкой и устанавливали в автосэмплер для автоматического ввода 1-2 мкл в инжектор газового хроматографа МАЭСТРО 7820А с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 разделение ионов проводили на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой Ультра-1 Хьюлетт-Паккард длиной 25 м и внутренним диаметром 0.20 мм. Режим анализа-программированный, скорость нагрева термостата колонки - 5град/мин в диапазоне 130-320⁰С. Масс-спектрометр квадрупольный, с ионизацией электронами (70эВ) работал в режиме масс-фрагментографии (МФ) селективных ионов (multiple ions monitoring - МИМ), при периодическом детектировании до 30 ионов в пяти интервалах времени. Газ носитель-гелий [29].

Интервалы и ионы выбирали таким образом, чтобы селективно измерять концентрации маркерных жирных кислот определяемых видов микроорганизмов. В том числе использовали сильный ион $m/z = 87$ в спектрах жирных кислот (ЖК) для детектирования малых количеств микробных кислот C12-C15, C17, C19. Ион 175 взят постоянно в каждом режиме для детектирования β-оксикислот, для которых он специфичен и интенсивен в спектре. Интенсивные ионы 301, 315 и далее через 14 единиц массы (структуры M-15) выбраны в качестве свидетелей молекулярного иона оксикислот тридекановой, тетрадекановой и следующих в гомологическом ряду. Интерпретация данных масс-фрагментограмм состоит в соотношении пиков к определенным веществам на основании их массы, соотношения интенсивности (площадей) и времени хроматографического удерживания. Последнее определяли заранее по хроматограммам, полученным в режиме полного сканирования, когда можно точно определить природу

химического компонента клетки по его полному масс-спектру. Такой алгоритм детектирования масс-спектральных параметров биологической пробы позволяет детектировать около двухсот известных жирных кислот (ЖК), спиртов и стеролов,

Площади пиков маркеров интегрировали автоматически по заданной программе. Затем эти данные вводили в программу расчета, подготовленную в электронных таблицах EXCEL. Для количественного расчета использовали данные калибровки по дейтерированной тридекановой кислоте и чистым культурам клинических изолятов микроорганизмов. 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* может составлять 20%.

Определение некоторых типов клеточных жирных кислот и альдегидов микроорганизмов

В настоящее время известен химический состав большинства микроорганизмов, зачастую, трудно выявить единственный вид, для которого характерен строго определенный маркер, т.к. через некоторое время обнаруживается второй, третий и т.д. организм, имеющий в составе то же вещество. В таблице 1 приведен перечень 72 маркеров клинически-значимых микроорганизмов (жирных кислот, альдегидов, спиртов и пр.) методом мультиионной масс-фрагментографии из всего количества - около 170 маркеров [31].

Таблица 1 – Малые молекулы, определяемые масс-спектрометрическим анализом крови

№	Обозначение химического соединения*	Название	Микроорганизмы - источники малых молекул
Жирные кислоты			
1	C10	Декановая	<i>Streptococcus</i>
2	iC12	Изолауриновая	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
3	a13	Антеизотридекановая	<i>Bacillus cereus, Brevibacterium</i>
4	i14	Изомиристиновая	<i>Streptomyces, Bacillus, Actinobacterium</i>

№	Обозначение химического соединения*	Название	Микроорганизмы - источники малых молекул
5	14:1Δ9	9,10 - тетрадеценовая	<i>Clostridium, Streptococcus pneumoniae</i>
6	14:1Δ11	11,12-тетрадеценовая	<i>Simonsiella, Nocardia, Kingella kingae</i>
7	C14:0	Миристиновая	<i>Lactobacillus, Helicobacter, Campylobacter, Streptococcus</i>
8	15:1Δ9	9,10-пентадеценовая	<i>Clostridium propionicum, Bacteroides hypermegas</i>
9	i15	Изопентадекановая	<i>Propionibacterium, Bacteroides</i>
10	a15	Антеизопентадекановая	<i>Bacillus megaterium</i>
11	16:1Δ7	7,8-гексадеценовая	<i>Clostridium ramosum, Streptococcus</i>
	16:1Δ9t	Транс-9,10-гексадеценовая	<i>Nocardia asteroides</i>
12	16:1Δ11	11,12-гексадеценовая	<i>Ruminococcus</i>
13	i16:0	Изопальмитиновая	<i>Streptomyces, Nocardiosis</i>
14	10Me16	10-метилгексадекановая	<i>Rhodococcus</i>
15	i17:1	Изопентадеценовая	<i>Campylobacter mucosales</i>
16	C17:0	Гептадеценовая	<i>Candida</i>
17	i17:0	Изогептадекановая	<i>Bacillus, Propionibacterium, Prevotella</i>
18	a17:0	Антеизогептадекановая	<i>Corynebacterium</i>
19	17cyc	Циклогептадекановая	сем. <i>Enterobacteriaceae</i>
20	18:1Δ11	Цис-вакценовая	<i>Lactobacillus, Streptococcus, Pseudomonas</i>
21	i18	Изооктадекановая	<i>Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Bacillus subtilis, Clostridium difficile</i>
22	10Me18	10-метил-октадекановая	<i>Mycobacterium, Nocardia, Corynebacterium bovi</i>
23	19cyc	Циклононадекановая	<i>Enterococcus</i>
24	i19	Изононадекановая	<i>Bacillus subtilis, Bacteroides hypermegas</i>
25	a19	Антеизононадекановая	<i>Staphylococcus</i>
26	20:1Δ11	11-эйкозеновая	<i>Streptococcus mutans</i>
Гидроксикислоты			
27	3h12	3-гидроксилауриновая	<i>Acinetobacter, Pseudomonas, Vibrio, Neisseria, Moraxella, Kingella</i>
28	2h12	2-гидроксилауриновая	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
29	3hi13	3-гидроксиизо-тридекановая	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
30	3h13	3-гидрокситридекановая	<i>Bacteroides hypermegas</i>
31	3h14	3-гидроксимиристиновая	<i>Alcaligenes, Fusobacterium, Haemophilus</i>
32	2h14	2-гидроксимиристиновая	<i>Alcaligenes, Sphingomonas</i>
33	3h15	3-гидрокси-пентадекановая	<i>Bacteroides ruminicola</i>
34	3hi15	3-гидроксиизо-пентадекановая	<i>Porphyromonas</i>
35	2hi15	2-гидроксиизо-пентадекановая	<i>Flavobacterium</i>
36	3ha15	3-гидроксиантеизо-	<i>Bacteroides ruminicola</i>

№	Обозначение химического соединения*	Название	Микроорганизмы - источники малых молекул
		пентадекановая	
37	3hi17	Гидроксиизо-гептадекановая	<i>Bacteroides, Flavobacterium, Cytophaga, Riemerella</i>
38	2hi17	2-гидроксиизо-гептадекановая	<i>Bacteroides</i>
39	3h17	3-гидрокси-гептадекановая	<i>Bacteroides ruminicola, B. thetaiotaomicron</i>
40	3ha17	3-гидроксиантеизо-гептадекановая	<i>Bacteroides ruminicola</i>
41	10h18:1	10-гидрокси-октадеценная	<i>Clostridium perfringens</i>
42	3h18	3-гидроксистеариновая	<i>Francisella, Brucella, Achromobacter, Helicobacter pylori</i>
43	10h18	10-гидроксистеариновая	<i>Clostridium perfringens</i>
44	3h20	3-гидроксиэйкозановая	<i>Chlamydia trachomatis</i>
45	3hi20	3-гидроксиизо-эйкозановая	<i>Chlamydia trachomatis, Legionella</i>
Спирты			
46	16alc	n-пальмитиновый	<i>Moraxella</i>
47	18alc, 2-ОН	Стеариновый, 2-ОН	<i>Mycobacterium MAIS, n18 – Moraxella</i>
48	2h20alc	2-оксиэйкозиловый	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Альдегиды:			
49	12a	Лауриновый	<i>Butyrivibrio</i>
50	13a	Тридекановый	<i>Butyrivibrio, Selenomonas</i>
51	i14a	Изомиристиновый	<i>Bifidobacterium, Butirivibrio</i>
52	i15a	Изопентадекановый	<i>Butyrivibrio, Lactobacillus (rumen), Propionibacterium</i>
53	a15a	Антеизопентадекановый	<i>Butyrivibrio, Eubacterium, Propionibacterium freudenreichii</i>
54	15a	Пентадекановый	<i>Butyrivibrio</i>
55	16:1Δ9a	9,10-гексадеценная	<i>Butyrivibrio, Lactobacillus, Eubacterium, Peptostreptococcus anaerobius</i>
56	16a	Пальмитиновый	<i>Clostridium fallax, Lachnospira, Butyrivibrio, Lactobacillus</i>
57	i17a	Изогептадекановый	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
58	a17a	Антеизогептадекановый	<i>Eubacterium, Propionibacterium freudenreichii</i>
59	17суса	Циклогептадекановый	<i>Clostridium</i>
60	17a	Гептадекановый	<i>Lactobacillus (rumen)</i>
61	18:1a	Октадеценный	<i>Eubacterium, Clostridium</i>
62	18a	Стеариновый	<i>Clostridium thermocellum</i>
63	a16a	Антеизопальмитиновый	<i>Clostridium acetobutilicum, Cl. butiricum</i>
64	19суса	Циклононадекановый	<i>Lactobacillus</i>
65	19a	Нонадекановый	<i>Clostridium turobotiricum</i>
Стерины			
66	Copr-Chol	Копростанол -	<i>Eubacterium</i>

№	Обозначение химического соединения*	Название	Микроорганизмы - источники малых молекул
		холестанол	
67	Chol-en-2-ОН	Холестендиол	Простой герпес
68	Chol-dien	Холестадиенон	Цитомегаловирус
69	Pneumocis	Пневмоцистерол	<i>Pneumocystis carini, P. hominis</i>
70	Camp	Кампестерол	<i>Micromicete (campesterol)</i>
71	Ergo	Эргостерол	<i>Aspergillus, Mucor</i>
72	Sito, β -sito	Ситостерол, β -ситостерол	<i>Micromicetes (sitosterol)</i>

*** - Обозначения веществ: 18:1 – 18 - число атомов углерода, цифра после двоеточия - число двойных связей; h - оксикислота; a,i - в начале означает разветвление; сус - циклопропановая кислота. Например, ha17 - 3-гидроксиантеизогептадекановая кислота**

При анализе всех компонентов/маркеров в совокупности нетрудно определить род или вид наиболее вероятного микроорганизма-источника, однако существует много других процессов, в результате которых концентрации могут изменяться в сторону увеличения или уменьшения. Для анализа таких зашумленных данных используется линейный дискриминантный анализ, позволяющий найти экспосомный отпечаток (по аналогии с отпечатком пальца) нарушения липидного или углеводного обмена. Для получения «экспосомного отпечатка» все компоненты унифицируются и рассматриваются как равнозначные переменные. Пошаговый алгоритм исключения компонентов с анализом сопряжённости позволяет подобрать именно такое соотношение, которое будет дискриминировать опытную группу и группу сравнения наилучшим образом, обеспечивая максимально возможную специфичность и чувствительность модели.

Определение факторной нагрузки для всего пула компонентов в исследуемых группах позволит выявить наиболее значимые компоненты и по их химическим свойствам сделать предположение о микроорганизме-источнике и состоянии барьерной функции слизистой оболочки тощей кишки.

Полезна информация и о химических группах и их факторной нагрузке: например, отсутствие оксикислот указывает на снижение концентрации компонентов, источником которых являются грамотрицательные микробы, отсутствие альдегидов - большой группы плазмалогенсодержащих организмов;

снижение концентрации альфа-оксикислот указывает на снижение концентраций источников определенных видов, для которых характерны сфинголипиды, включающие в себя эти альфа-оксикислоты (в отличие от бета-оксикислот ЛПС).

Статистические методы исследования

Решающие правила классификации объектов были построены с помощью линейного дискриминантного анализа концентраций малых молекул микробного происхождения (МММП) в крови методом пошагового исключения компонентов и анализом сопряженности. Рассчитывали классификационные уравнения, качественные характеристики моделей (прогностическая точность, специфичность, чувствительность), статистическую значимость разделения групп, дискриминантную функцию, координаты центроидов. Количественная оценка специфических соотношений компонентов концентраций МММП в крови рассчитывается по расстояниям от центроидов. Этот показатель называется коэффициент уникальности.

Проводился описательный анализ количественных и порядковых данных с расчетом значений среднего арифметического (M), стандартного отклонения (SD), 95% доверительного интервала (ДИ) для среднего, медианы (Med) и интерквартильного размаха (IQR) для всех экспериментальных групп. Распределение качественных переменных представлялось в виде значений выборочной доли (W), ее стандартной ошибки (SE) и 95% ДИ для доли.

Сравнение достоверности различий количественных и порядковых признаков между группами проводилось по следующему алгоритму. После проверки допущений для применения параметрического многофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями (GLM), проводился расчет статистической значимости модели по критериям След Пилая и Лямбда Вилкса, а в дальнейшем, в зависимости от характера выборочных распределений и равенства дисперсий - двухфакторный одномерный параметрический ($ANOVA$ - t -критерии для несвязанных выборок) или непараметрический (критерии Манна-Уитни) дисперсионный анализ. Для всех статистических тестов устанавливался пороговый уровень альфа-ошибки $p < 0,05$.

Тестирование статистических гипотез о случайном распределении номинативных переменных между обследуемыми группами проводилось по методу согласия Пирсона с использованием критерия Хи-квадрат и при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$ проводился попарный анализ межгрупповых различий генеральных (популяционных) долей каждой категории соответствующей переменной с помощью z-критерия для качественных данных (после проверки допущений) с поправкой альфа-ошибки на множественные сравнения. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программных пакетов Statistica 8.0. и MS Office Excel 2010 [35].

Основные положения диссертации, 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.

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» протокол № 1 от 15 июня 2021 года года и на заседании Ученого Совета ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора протокол №11 от 27 декабря 2021 г.

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); DII (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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Роль микробиоты в липидном и углеводном обмене человека

Современные исследования микробиома человека убедительно доказали взаимосвязь микробиома и макроорганизма [45,2]. Количество клеток микроорганизмов, населяющих тело человека, не уступает по численности количеству клеток макроорганизма, а по количеству информации, заключенной в совокупном метагеноме значительно превосходит макроорганизм [15,16]. По степени организации микробное сообщество имеет сложную структуру, позволяющее демонстрировать социальное поведение и реакцию на изменения окружающей среды и обменных процессов, происходящих в самом макроорганизме. Создавая биологические сообщества, консорциумы в различных биотопах они существуют в симбиотических взаимоотношениях, размножаются и функционируют в едином целом. Микробы определяют благоприятные условия для поддержания гомеостаза внутренней среды и жизнеобеспечения всего макроорганизма [5,42].

Известно, что микробиом обладает высоким информационным потенциалом, так как реакция микробиома на заболевания или синдромы, которые ведут к заболеваниям, появляется задолго до клинических проявлений болезней [1,25]. Реакция микробиома на заболевания может проявляться в изменении количественного и качественного состава микроорганизмов, населяющих различные локусы, изменение их функциональной активности, которая найдет отражение в концентрации метаболитов микрофлоры и прочих химических соединений, связанных с их присутствием в различных биосубстратах [16,14]. Анализ концентраций метаболитов и малых молекул, направленный на поиск молекул – маркеров заболевания сложен, так как множество разнонаправленных процессов нивелируют изменения концентраций и средние величины концентраций имеют высокую дисперсию значений [18,155,156,209,34].

1.1. Микробные маркеры - малые молекулы микробного происхождения

Метод газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ-МС) основан на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации, который позволяет анализировать молекулярный состав образцов и идентифицировать атипические клетки по наличию в них специфических метаболитов, в первую очередь, насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, стеролов, гидроксикислот, альдегидов [27].

В основе метода ГХ-МС - высокоточное определение малых молекул, входящих в состав клеточных липидов микроорганизмов, а также являющихся их специфическими метаболитами. Лабораторный этап исследований состоит из двух шагов: пробоподготовка биологического материала и непосредственно исследование на газожидкостном хроматографе масс-спектре [94].

Цель пробоподготовки - извлечение с помощью химической процедуры целевых маркеров и их модификация до производных, пригодных для анализа методом газовой хроматографии масс-спектрометрии. Биоматериал подвергается пробоподготовке в том виде, в котором был отобран у пациента.

На первом этапе реакцией кислотного метанолиза молекулярные маркеры высвобождаются из сложных липидов микроорганизмов и других клеток образца в виде метиловых эфиров и диметилацеталей.

Продукты экстрагируются и подвергаются дериватизации для улучшения хроматографической подвижности гидроксикислот и стеролов. На этапе пробоподготовки в пробу вводится внутренний стандарт – дейтерированная тридекановая кислота, по которому, в дальнейшем происходит количественный расчет [23].

После пробоподготовки образец представляет собой смесь компонентов микробных молекул, естественных компонентов биологической пробы и молекул, извлеченных из средств отбора (при использовании тампонов, урогенитальных щеточек и т.п.). Попадая в хроматограф, смесь делится на индивидуальные молекулярные компоненты при продвижении по капиллярной колонке в токе газа-носителя. Разделенные молекулы попадают в детектор, где происходит их

ионизация под действием электронного удара и регистрация образовавшихся ионов. Регистрируются 5 химических групп соединений [6].

Насыщенные жирные кислоты - алифатические одноосновные карбоновые кислоты с открытой цепью, которые содержат неразветвленную цепь атомов углерода (от 4 до 24, включая карбоксильный) [59]. Жирные кислоты встречаются в составе клеточной стенки микроорганизмов, а также могут быть продуктом метаболизма микроорганизмов или макроорганизма [97]. Жирные кислоты различаются по количеству углеродных атомов в цепи, а также, в случае ненасыщенных кислот, по положению, конфигурации и количеству двойных и тройных связей. Жирные кислоты можно условно поделить на низшие (до семи атомов углерода), средние (восемь — двенадцать атомов углерода) и высшие (более двенадцати атомов углерода) [97].

Ненасыщенные жирные кислоты - содержат двойную или, что бывает редко, тройную связь. Полиненасыщенные (полиеновые) жирные кислоты имеют две и более двойные или тройные связи. Двойные связи в природных полиненасыщенных жирных кислотах — изолированные (несопряженные). Как правило, связи имеют цис-конфигурацию, что придает таким молекулам дополнительную жесткость [36].

Гидроксикислоты (спиртокислоты) – это производные карбоновых кислот, содержащие в радикале, соединенном с карбоксилем, одну, две или несколько гидроксильных групп [28]. Гидроксижирные кислоты являются необычными метаболитами и редко встречаются в значительных количествах в нормальной физиологии человека. Гидроксикислоты используются для идентификации грамотрицательных микроорганизмов. Масс-спектры ЛПС *Enterobacteriaceae* показали присутствие лауриновой (m / z 199), миристиновой (m / z 227), пальмитиновой (m / z 255) и 3-гидроксимиристиновой (m / z 243) кислот. Липополисахарид (ЛПС) *Pseudomonas aeruginosa* давал характерные фрагментные ионы, указывающие на 3-гидроксидекановую (m / z 187), лауриновую и 2-гидроксилауриновую (m / z 215) кислоты [113]. ЛПС *Neisseria*

gonorrhoeae можно отличить от других по присутствию связанной сложноэфирной связью 3-гидроксилауриновой кислоты [160].

Гидроксикислоты так же обнаруживаются в крови при расстройствах, связанных с нарушением окисления жирных кислот. Повышенные концентрации 3-гидрокси-жирных кислот в крови указывают на нарушения длинно- и короткоцепочных 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназ [58].

Тейхоевые и липотейхоевые кислоты - основные компоненты клеточной стенки грамположительных бактерий, вместе с пептидогликаном играют главную роль в развитии цитокин-индуцированного шока при грамположительном сепсисе (являясь своеобразным эквивалентом липополисахариду грамотрицательных бактерий). Пептидогликан клеточной стенки грамположительных бактерий (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis*) - стимулирует выброс IL-6 и TNF- α моноцитами периферической крови человека. Под действием ферментов в макроорганизме пептидогликан быстро разрушается, но и его фрагменты обладают цитокин-индуцирующей активностью [123].

Стерины - природные органические соединения, производные стероидов, содержащие гидроксильную группу в положении 3 [10]. В основе структуры стерина лежит насыщенный тетрациклический углеводород стеран. Для человека представляет большую диетическую опасность группа оксипроизводных стерина, играющих одну из ключевых ролей в патогенезе атеросклероза. Критическим фактором в проявлении заболевания является развитие процесса накопления холестерина в интима сосудов, который зависит от соотношения поступления стерола в сосудистую стенку и его обратного выхода в плазму крови [82].

Альдегиды - класс органических соединений, содержащих альдегидную группу (-CHO). ИЮПАК определяет альдегиды как вещества вида R-CHO, в которых карбонильная группа связана с одним атомом водорода и одной группой R. Альдегидная группа содержится во многих природных веществах, таких, как углеводы (альдозы), некоторые витамины (ретинол, пиридоксаль), а также в клеточной стенке бактерий. Альдегиды токсичны. Способны накапливаться в

организме. Кроме общетоксического, обладают раздражающим и нейротоксическим действием. Эффект зависит от молекулярной массы: чем она больше, тем слабее раздражающее, но сильнее наркотическое действие, причём ненасыщенные альдегиды токсичнее насыщенных. Некоторые обладают канцерогенными свойствами [28].

Все исследуемые химические соединения, определяемые в настоящем анализе, имеют микробное происхождение, так как при их отборе были проведены специальные исследования. Так как состав жирных кислот видоспецифичен для большинства микроорганизмов, то с конца 80х годов прошлого века это свойство применяется для идентификации микроорганизмов [27]. Добавление к жирным кислотам гидроксикислот, стеринов и альдегидов увеличивает специфичность и чувствительность идентификации микроорганизмов методом ГХ-МС [94]. Чувствительность методики, включающей метанолиз и силилирование пробы позволяет определять нанокolicества жирных кислот, гидроксикислот, альдегидов и стиролов на газовом хроматографе, а масс-спектрометрический модуль точно идентифицировать полученное соединение. Таким образом, малые молекулы можно определять не только в гное, слюне и фекалиях, где их содержание довольно высокое, но и в смывах с влажной поверхности и даже в крови.

При ГХ-МС исследовании крови пациентов было определено, что жирные кислоты с четным количеством атомов углерода ($C_{12} - C_{18}$) являются компонентами с наибольшими концентрациями. К ним относятся олеиновая $C_{18:1}$, пальмитиновая $C_{16:0}$, линолевая $C_{18:2}$, стеариновая $C_{18:0}$, пальмитолеиновая $C_{16:1}$, а также полиненасыщенные ЖК $C_{20:n}$, $C_{22:n}$, холестерин, насыщенные прямоцепочечные альдегиды и 2-гидроксикислоты. По некоторым наблюдениям высокие концентрации могут наблюдаться для длинноцепочечных кислот $C_{20} - C_{26}$ и нечетных кислот — пентадекановой $C_{15:0}$ и гептадекановой (маргариновая) $C_{17:0}$. Биохимический анализ метаболома человека указывает на возможность того, что данные компоненты могут являться липидными компонентами клеток организма человека. В крови также

обнаруживаются разветвленные четные жирные кислоты i14, i16 и нечетные i15 и a15, i17 и a17, ненасыщенные ЖК с необычным для млекопитающих положением двойной связи 16:1d9, 18:1d7, 17:1. Данные жирные кислоты имеют микробное происхождение и специфичны для микроорганизмов, населяющими в основном кишечник.

В некоторых исследованиях применяют специфичные соединения в качестве маркеров микроорганизмов, непосредственно определяемых в биологической жидкости. Примером может служить исследование, в котором ведется диагностика кандидомикоза по концентрации арабинитола. Есть исследования, в которых неспецифическую диагностику бактерий проводят по мурамовой кислоте. Известны исследования в которых определяют присутствие микроорганизмов в биоматериале по концентрации β -оксимиристиновой кислоты, а колонизацию некоторыми видами *Haemophilus* определяют по специфическим оксикислотам. В работе [86] исследователи проводят дифференциацию видов *Campylobacter* по жирнокислотному составу.

Bifidobacterium spp. определяли по плазмалогену, входящему в состав клеточной мембраны данных микроорганизмов. Отличительной особенностью этих бактерий является наличие октадеценового альдегида (18:1a) в химической структуре плазмалогена [199].

Lactobacillus spp. Лактобациллы имеют четкий маркер - лактобацилловую кислоту (19сус) [199,169], которая встречается и у других бактерий (псевдомонад, некоторых энтеробактерий). Для лактобацилл маркером является пальмитолеиновый альдегид (16:1a), компонент липида плазмалагена и цис-вакценовая кислота (18:1 Δ 11).

Eubacterium spp. Представители этого рода являются одними из основных обитателей кишечника [172]. Маркер *Eubacterium spp.* - дегидрохолестерол (копростанол) является их продуктом интерактивного метаболизма, а так же клеток организма-хозяина [145]. Различные виды *Eubacterium* определяли по специфическим жирным альдегидам, например *E.lentum* по изо-гексадекановому альдегиду (i16a)[181].

Propionibacterium. Идентификацию пропионобактерий проводили, используя изо- и антеизо-гептадекановые альдегиды (i17a и a17a), согласно базе данных MIDI Inc.

Enterobacteriaceae. Энтеробактерии очень похожи по профилю ЖК, допускают родовую дифференциацию в чистой культуре клеток, но вряд ли различимы в целом при одновременном присутствии в сообществе микроорганизмов. Их маркеры β-оксимиристиновая кислота (hl4), циклогептадекановая (17сус) и цис-вакценовая (18:1A11) кислоты имеют ранг семейства, при многочисленных перекрестах с представителями других семейств. При отсутствии псевдомонад реально оценивать количество энтеробактерий в целом по концентрации 17сус [181].

Klebsiella sp. Клебсиеллы среди других членов семейства *Enterobacteriaceae* имеют отличительный признак – 2-оксимиристиновую кислоту (2hl4) [30], в составе ЛПС, которая в данном сообществе оказывается маркером рода.

Peptostreptococcus anaerobius. Данный микроорганизм имеет в профиле ЖК редко встречающиеся четные изоокислоты с числом атомов углерода от десяти до шестнадцати [146]. Максимальной в профиле является изотетрадекановая кислота i14, которую можно использовать в качестве маркера.

Ruminococcus. Определяли по 11-гексадеценовой кислоте, обнаруженной в природных изолятах руминококков [148].

Propionibacterium acnes определяется по относящемуся только к ней маркеру - изопентадекановой кислоте (i15a) [181].

Bacillus. Присутствие бацилл видов *B.cereus* и *B.subtilis* можно детектировать по специфическим разветвленным кислотам с 13 атомами углерода: i13 и a13. *B.megaterium* определяли по остатку антеизо-пентадекановой (ai15) кислоты [181].

Acinetobacter. В качестве родового признака удобно использовать 2-оксидодекановую кислоту при наличии 3-оксидодекановой [181].

Clostridium ramosum и ее группа (*C. innocuum*, *C. clostridioforme*), отличаются высоким содержанием в мембране 7-гексадеценовой (16:1Δ7) кислоты [102].

Некоторые вещества характерные для большинства микроорганизмов: это пальмитиновая(16:0), стеариновая (18:0), миристиновая (14:0), олеиновая, лауриновая (12:0) кислоты и некоторые др. Кислоты с 18 и 16 атомами углерода присутствуют во всех клетках и не могут быть маркерами.

Clostridium perfringens отличается наличием маркеров: 10-оксистеариновой (10hl8) и 10-оксиоктадеценовой (10hl8:1) кислот, легко определяемых по специфическим ионам в масс-спектре [100]. Эти вещества не являются клеточными компонентами самих клостридий, а связаны с разложением клеток ткани макроорганизма бактериальными ферментами.

Bacteroides. Анаэробы *B.Fragilis* определяли по маркерам оксикислот: гидроксид-изо-гептадекановой(hi17) и антеизогептадекановой (ha17)[138].

Streptococcus. Многие стрептококки “невидимы” на фоне компонентов биологической жидкости из-за совпадения собственных жирных кислот с кислотами субстрата. Однако группа оральных стрептококков (α -стрептококки), *S. salivarius* и др., имеющих в составе декановую кислоту C10 [54], а также мононенасыщенные кислоты:11,12-гексадеценовую(16:1 Δ 7) и цис-вакценовую(18:1 Δ 11) [86].

Streptococcus mutans – анаэробный стрептококк, характерным маркером для которого является 11-эйкозеновая кислота (20:1 Δ 9) [86].

Enterococcus. Энтерококки группы *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* могут быть обнаружены по лактобацилловой (19сус) кислоте, при условии, что лактобациллы определены по 18:1 Δ 11.

Micromycetes. Неспецифическим маркером клинически значимых микроскопических грибов (*Aspergillus*, *Candida*, *Mucor* и др.) является эргостерол [54], а также кампестерол и ситостерол [104].

Flavobacterium (*Sphingobacterium*, *Chriseobacterium*). Для этих бактерий характерно наличие разветвленных нечетных 2-оксикислот в составе клеточных сфинголипидов (2hi15, 2hi17), которые могут служить маркерами в клинических пробах [92].

Streptomyces, Nocardiosis. В профилях ЖК биологических жидкостей пациентов присутствует значительное количество изогексадекановой кислоты (i16), существенно превышающее возможную долю *P. anaerobius* и *Bacillus*, имеющих это вещество в составе клеточной мембраны. Редкими организмами, обладающих этим признаком являются представители рода *Streptomyces* и некоторых других актиномицетов (например, *Nocardiosis dasonviley*, выделенный из биоптата слизистой оболочки кишечника). Известны некоторые штаммы стрептомицетов, имеющие до 40% i16 в профиле жирных кислот [107]. Так же стрептомицеты принимают участие в колонизации и воспалениях различных органов человека [107].

Actinomadura. Определяли по 10-метил-гептадекановой кислоте (10Me17) за вычетом вклада родококков [135].

Pseudonocardia. Этих представителей рода аэробных актиномицетов определяли по изо-гексадеценной кислоте (i16:1)

Rhodococcus. Данных анаэробов определяли по 10-метил-гексадекановой кислоте (10Me16) [168].

Nocardia. Определяли по изомеру тетрадеценной (предположительно, 14:1d11) кислоты.

Nocardia asteroides и другие виды определяли по транс-9,10-гексдеценной кислоте (16:1Δ9t) [158].

Helicobacter pylori. Маркер гидроксидекадекановая кислота (h18) характерна для рода *Francisella* и вида *Helicobacter pylori* [89]. В данном случае по h18 определяли *Helicobacter pylori* или *Francisella filomiragia*. *Helicobacter pylori* является бактерией, принимающей непосредственное участие в заболеваниях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [61], однако ее так же обнаруживают в атеросклеротических бляшках [83]. Кроме того, ГХ-МС анализ штаммов, выделенных из биоптатов кишечника, показал наряду с традиционно известными для *H. pylori* ЖК (18:1d11, 16:0, 19сус, 3h16, 3h18) наличие 11Me18:1, 2h18:1 и 11-ОМе-19. В профиле ЖК *H. pylori* присутствует 11Me18:1 и

неидентифицированный компонент с относительным временем удерживания 19,735, совпадающий с RRT=19,733 для 11-оксиметил-нонадекановой кислоты.

Campylobacter mucosalis. Данный вид микроорганизмов определяли по изо-гептадеценовой (i17:1) кислоте [86], при учете вклада бактерий родов *Chriseobacterium* и *Flavobacterium*, если присутствовал их маркер 2h15.

Fusobacterium spp., *Haemophilus*. Этих бактерий определяли по отличительному компоненту в клеточных ЖК - 3-оксимиристиновой кислоте (3h14) [107,135], которая к тому же встречается и у других грамотрицательных организмов клинического значения, таких как *E.coli*, *Klebsiella*, *Serratia* и другие.

Staphylococcus. Стафилококки содержат нечетные изо- и антеизо - разветвленные кислоты с числом атомов углерода 15, 17 и 19 [148]. В качестве родового маркера в данном сообществе использовалась антеизо -нонадекановая (ai19) кислота.

Corinebacterium CDC groups. *Listeria spp* После учета всех микроорганизмов, имеющих в составе ЖК антеизо-гептадекановую кислоту, часто наблюдается остаток.

Pseudomonas aeruginosa. Псевдомонады имеют четкие маркеры из состава C10 и C12 оксикислот [9], которые допускают их ограниченную видовую дифференциацию даже на фоне биологической жидкости. В родовой идентификации использовалась 3-оксидекановую кислоту (3h10). Альтернативных микроорганизмов с таким признаком в биологических жидкостях человека нет. Для *P. Aeruginosa* проводилась видовая идентификация по специфичной для вида 2-оксидодекановой кислоте (2h12) и 3-оксидодекановой кислоте (3-оксилауриновая кислота, 3h12).

Mycobacterium spp. Для определения микобактерий может использоваться неспецифический маркер - туберкулостеариновая кислота (10-метил-октадекановая-10Me18) [133]. Дополнительным маркером для *M.tuberculosis* при этом оказалась 3-ОН-2,4,6-триметил-тетракозановая кислота [66].

На настоящий момент международные базы данных содержат информацию по более чем 170 веществам микробного происхождения, обнаруживаемым в крови человека.

Данные соединения несомненно относятся к экспозому - совокупности факторов окружающей среды, влияющей на регуляцию генов и индивидуальное развитие организмов.

1.2. Понятие дисбиоза кишечника, причины его развития.

Со времен И.И. Мечникова, считается, что многочисленные кишечные микробы в значительной мере определяют физическое и духовное здоровье человека. Так же И. И. Мечников сравнивал микробиоту кишечника с функцией печени и предлагал рассматривать ее в качестве отдельного органа [17, 44]. Учение И.И. Мечникова стало основополагающим в теории нормобиоценоза. Он был убежден, что слизистые оболочки человека покрыты биопленкой, состоящей из сотен видов микроорганизмов, которая обеспечивает защиту от болезнетворных микробов и патогенов [25].

Культивирование *in vitro*, которое было «краеугольным камнем» микробиологии с XIX века, не может описать сложного состава микробных сообществ, населяющих различные биотопы организма человека [33].

По современным представлениям, микробиота - это сложное сообщество, которое помогает поддерживать метаболический гомеостаз и экологический баланс макроорганизма [44]. В организме взрослого человека насчитывается около 100 триллионов бактерий, 80% из которых обитают в кишечнике, что примерно в десять раз больше собственных клеток организма человека. Ведущим микробиоценозом организма человека является кишечник. Микробиом кишечника насчитывает более 3500 бактериальных видов и более 5000 бактериальных штаммов (около 2-3 кг биомассы), которые кодируют в 150 раз больше генов, чем человеческий геном [1, 29, 25]. Подавляющее большинство микробного разнообразия (90-99%) представлено бактериальными филами *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, при этом 50-80% бактерий филогенетически

принадлежат к типу *Firmicutes*, состоящему в основном из бактерий, принадлежащих к кластридиальным кластерам XIVa и IV. Другие типы, населяющие кишечник человека, это *Actinobacteria* (3–15%), *Proteobacteria* (1–20%), *Verrucomicrobia* (0.1%), *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Spyrochaetes* и *Lentisphaerae* [50, 57, 91].

Микробиота кишечника, доступная для культивирования, включает три главные группы микроорганизмов:

- 1) облигатная, индигенная или основная (бактероиды, бифидобактерии, лактобактерии, энтерококки;
- 2) факультативная, включающая условно-патогенные микроорганизмы (пептострептококки, кластридии, вейлонеллы стафилококки, пептострептококки, кампилобактер, дрожжеподобные грибы);
- 3) транзиторная или случайная (микобактерии, коринебактерии, синегнойная палочка)

Облигатные представители нормобиоты составляют 80% сформированной микробиоты, факультативные - менее 9,5% и транзиторные - до 0,5%. Около 20% представителей микробиоты человека обитает в полости рта, 15-16% – в ротоглотке, 40% – в эзофагогастродуоденальной зоне и кишечнике, 18-20% – на кожных покровах и 2-10% – в урогенитальном тракте. В составе микробиоты пищеварительного тракта выделяют просветную и мукозную (пристеночную). Просветная микрофлора, обеспечивающая полостное симбионтное пищеварение, обитает и функционирует в полостной среде пищеварительного тракта, а мукозная, участвующая в пристеночном пищеварении, – на поверхности слизистых оболочек в составе бактериальных биопленок [78, 130]. Так же до недавнего времени считалось, что тонкая кишка стерильна. Однако установлено, что в физиологических условиях содержание бактерий в тонкой кишке колеблется от 10^4 на 1 мл содержимого в тощей кишке до 10^7 на 1 мл в подвздошной, при этом в проксимальных отделах тонкой кишки обнаруживаются преимущественно грамположительные аэробные бактерии, в дистальных - грамотрицательные энтеробактерии и анаэробы [215,91].

Учитывая огромную роль микробиоты в поддержании и формировании многих биологических функций организма хозяина, предполагается рассматривать человека как «супернадорганизм», существование которого обеспечивается хромосомным геномом и геномом тысячи различных видов микроорганизмов, находящихся в симбиотических взаимоотношениях между собой и макроорганизмом [132]. Эти внутриволюционные взаимоотношения определяет система регуляции симбиоза. Симбиотическая система включает в себя 7 подсистем[195]:

1. регулирование внутриволюционных симбиотических взаимоотношений прокариотических клеток (Quorum Sensing)
2. регулирование внутриволюционных симбиотических взаимоотношений эукариотических клеток отдельных тканей высших организмов
3. Регулирование межвидовых симбиотических взаимоотношений прокариотических организмов в отдельных биотопах
4. Регулирование симбиотических взаимоотношений эукариотических клеток различных тканей и органов высших организмов
5. регулирование симбиотических взаимоотношений организма хозяина и его микрофлоры (Cross-Talk)
6. регулирование симбиотических взаимоотношений органелл в отдельных эукариотических клетках
7. регулирование взаимоотношений прокариотических организмов и эукариотических клеток с бактериофагами и вирусами

Микробное сообщество, в целом является стабильной экосистемой у здоровых взрослых людей, однако, изменения нормальной микробиоты кишечника были выявлены в ряде заболеваний и патологических состояний, таких как сахарный диабет 2 типа, ожирение, синдром раздраженной толстой кишки, а также воспалительных заболеваний кишечника [80].

Развитие дисбиоза и возникновение различных патологических состояний, а также хронических заболеваний в организме обусловлено нарушением системы регуляции симбиотических взаимоотношений макроорганизма и его микробным

сообществом, возникающих под действием неблагоприятных условий окружающей среды, физико-химических и биологических факторов [41].

Возраст является одним из основных факторов риска хронических заболеваний человека, таких как сердечно-сосудистые заболевания, рак, диабет типа 2 и нейродегенеративные нарушения. Постарение иммунной системы, или иммунозависимость, способствует повышению восприимчивости к инфекциям, аутоиммунным заболеваниям, хроническим воспалительным заболеваниям и раку [128]. Старение сопровождается постепенным снижением многих физиологических функций организма, предрасполагающих к метаболическим нарушениям и повышенному риску смертности, а также изменению микробиоценоза кишечника как у беспозвоночных, так и позвоночных животных, включая грызунов и человека [55].

Начиная с 1900 годов и на протяжении всего 20 века считалось, что первичное заселение кишечника микроорганизмами происходит после рождения, а первая колонизация кожных покровов – во время прохождения младенца через родовые пути матери. Более поздние исследования показывают, что бактерии присутствуют уже в меконии, амниотической жидкости, плаценте, пуповинной крови [179]. Формирование микробиоты начинается еще внутриутробно и во многом зависит от питания матери в пренатальный период [153], способа родоразрешения [196], и некоторых других факторов [68]. Далее микробиота кишечника развивается в течение первых двух лет жизни, а затем остается значительно стабильной [69].

Гомеостаз микробного сообщества может быть нарушен в связи с развитием различных хронических заболеваний: воспалительные заболевания кишечника, синдром раздраженного кишечника, ожирение, метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа, аутоиммунные заболевания [182]. Дисбиоз у пожилых людей также объясняется связанными с возрастом изменениями в физиологии и образе жизни, такими как ферментативная недостаточность, нарушенная барьерная функция, смена местожительства, несбалансированная диета, применение фармакотерапии в соответствии с гериатрическими состояниями [182].

Особенностью фекальной микробиоты пожилых людей является изменение соотношения фил *Firmicutes* / *Bacteroidetes*, при этом, в микробиоценозе пожилых людей наблюдается более высокая доля *Firmicutes*, тогда как в микробиоте молодых людей более высокие пропорции *Bacteroidetes* [204], однако некоторые другие исследования этого не подтвердили [163]. Предполагается, что снижение представителей типа *Bacteroidetes* скорее всего связано с географической средой местообитания людей, состоянием их здоровья и применяемой фармакотерапией, нежели с самим процессом старения. Показано, что с возрастом происходит значительное снижение *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii* и бутират продуцирующих микроорганизмов из класса *Clostridium cluster XIVa* (*Clostridium coccooides* / *Eubacterium rectale*) и увеличение популяции микроорганизмов, принадлежащих к типу *Proteobacteria* (семейства *Enterobacteriaceae*, родов *Moraxella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Kingella spp.* и др.) [204]. Для представителей нормобиоты рода *Lactobacillus spp.* наблюдались различные результаты, показывающие как снижение [163], так и увеличение [119] количества микроорганизмов в микробном сообществе кишечника пожилых людей.

Снижение бутират продуцирующих микроорганизмов из класса *Clostridium cluster XIVa* (*Clostridium coccooides* / *Eubacterium rectale*) и группы *Faecalibacterium prausnitzii* в кишечной микробиоте пожилых лиц коррелирует с синдромом хрупкости, госпитализацией, антибиотикотерапией и терапией нестероидными противовоспалительными препаратами [64].

В исследованиях [122] было показано, что микробиота кишечника долгожителей, была обогащена факультативными анаэробами, принадлежащими к родам *Bacillus*, *Streptococcus* и нескольким членам семейства *Enterobacteriaceae*, тогда как представители, продуцирующие бутират класса *Clostridium cluster XIVa* (*Clostridium coccooides* / *Eubacterium rectale*) и группы *Faecalibacterium prausnitzii* были значительно снижены.

Если в составе микробиоты кишечника взрослого организма содержится 4–5 видов рода *Bifidobacterium*, то в пожилом возрасте встречается лишь один

доминирующий вид этого рода: *Bifidobacterium adolescentis*, либо *Bifidobacterium angulatum* и *Bifidobacterium longum* [187]. Одним из объяснений снижения *Bifidobacterium* у пожилых людей является снижение их адгезии из-за изменения химического состава и структуры слизистой оболочки толстой кишки [182]. Выявлено, что наблюдаемые с возрастом изменения приводят к низкому разнообразию и изменению соотношений бактерий на уровне видов рода *Bifidobacterium*. С возрастом наблюдается увеличение количества факультативных анаэробов, что также подчеркивает различия кишечной микробиоты у молодого и пожилого человека [204].

1.3. Дислипидемия как причина возраст-ассоциированных неинфекционных заболеваний

В последние годы пристальное внимание исследователей привлечено к изучению нарушений липидного и углеводного обмена как этиологического фактора развития сердечно-сосудистых заболеваний и инсулиннезависимого сахарного диабета 2 типа (СД 2)[202]. Чтобы понять, какие изменения углеводного и липидного обмена происходят в пожилом и старческом возрасте, необходимо иметь современные общие представления о распределении основных энергетических субстратов: глюкозы и насыщенных жирных кислот (пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0)) в организме. Экзогенные пальмитиновая и стеариновая кислоты связываются в триглицериды (ТГ) уже в цитоплазме энтероцитов. ТГ объединяются апобелком В-48 в хиломикроны (ХМ), которые секретируются в кровь, так же триглицериды секретируются в кровь печенью в виде липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП). ЛПОНП служат не только для продукции свободных жирных кислот, которые наряду с глюкозой усваиваются клетками в качестве субстрата энергии, но и для транспорта холестерина, поэтому углеводный и липидный обмен тесно связаны с распределением в организме холестерина.

Показано также, что резистентность к инсулину возникает вследствие накопления триглицеридов в клетках не жировых тканей, главным образом, в

скелетной мышце и печени [163]. Депонирование жира вне жировой ткани обусловлено нарушением баланса между поступлением энергетических субстратов (жирных кислот и глюкозы) в организм и их расходом: поступление энергии превышает уровень ее потребления. В средней возрастной группе такое явление наблюдается при гиперфагии и гиподинамии. Однако следует отметить, что сердечно-сосудистые заболевания и СД 2 в большей степени характерны для пожилого и старческого возраста [119].

Стационарный уровень глюкозы в крови поддерживается благодаря совместному действию двух гормонов – глюкагона и инсулина, которые секретируются поджелудочной железой. β -клетки поджелудочной железы, вырабатывающие инсулин, реагируют на повышение уровня глюкозы в крови, α -клетки, вырабатывающие глюкагон, – на его снижение. Глюкоза транспортируется в эти клетки благодаря действию специфического трансмембранного переносчика GLUT-2. Глюкоза связывается с белком ChREPB (белок, связывающий элемент, распознающий углеводы), расположенным на ядерной мембране [127]. Этот белок контролирует транскрипцию генов, ответственных за метаболизм углеводов и липидов. Запасы гликогена в печени ограничены, поэтому излишки поступающей в организм глюкозы «сбрасываются» в жировую ткань. Поддержание стационарного уровня глюкозы в крови необходимо для эффективной работы головного мозга, клетки которого не чувствительны к действию инсулина. Рецепторы к инсулину располагаются на мембране миоцитов, гепатоцитов и адипоцитов. В схеме распределения глюкозы печень играет роль накопителя, скелетная и сердечная мышца – потребителя, а жировая ткань – аккумулятора излишков глюкозы, которые запасаются в виде жира. В других тканях поступление глюкозы в клетки не зависит от инсулина и осуществляется переносчиком глюкозным транспортёром (GLUT). Печень, мышцу и жировую ткань можно рассматривать как единый метаболический узел, в котором энергия распределяется в основном для выполнения физической работы у мужчин и накопления жира для вынашивания плода у женщин. Распределение в организме таких субстратов, как глюкоза, жирные кислоты и холестерин, контролируется

самим этим субстратом, так как они, непосредственно воздействуя на ядерные рецепторы, управляет экспрессией генов, контролирующей их собственный метаболизм.

Другим энергоносителем в организме человека являются жирные кислоты, в основном, пальмитиновая и стеариновая. Распределение жирных кислот также происходит в крови, и в нем задействованы те же органы. Глюкоза – быстро усваивающийся энергетический субстрат, поэтому она потребляется клетками преимущественно в дневное бодрствование. Жирные кислоты используются клетками как топливо в ночное время суток, т.е. в период длительного голодания. Аккумуляцию жира в жировой ткани можно рассматривать также как адаптационное приспособление, позволяющее переживать, не теряя активности, периоды голода. В связи с тем, что секреция гормона роста имеет ярко выраженный циркадный ритм, он управляется гипоталамусом: гипофиз секретирует соматотропный гормон, который активирует гормон-чувствительную липазу (ГЧЛ), гидролиз триглицеридов и мобилизацию жирных кислот из жировой ткани в кровь. В схеме распределения жирных кислот накопителем субстрата выступает жировая ткань, размеры которой во много раз превышают размеры депо глюкозы – отложений гликогена, потребителем – мышечная ткань и другие клетки, а печень здесь является преобразователем. Преобразовательная функция печени обуславливается ферментативной системой элонгации и сатурации углеводородной цепи разнообразных жирных кислот, поступающих в гепатоциты. В результате печень секретирует в кровь преимущественно пальмитиновую и стеариновую кислоты.

Пул жирных кислот в крови образуется в результате гидролиза триглицеридов, поступающих из тонкого кишечника (хиломикроны), из печени (липопротеиды очень низкой плотности - ЛПОНП), и триглицеридов, аккумулированных в жировой ткани. Для переноса жирных кислот в клетки-потребители существует система низкоспецифичных переносчиков, так как углеводородные молекулы свободно проникают сквозь липидный бислой плазматической мембраны. Перенос жирных кислот через мембрану опосредуется

инсулиновым рецептором. В жировой ткани инсулин не только способствует проникновению жирных кислот в адипоциты, но ингибирует гормон-чувствительную липазу (ГЧЛ), предупреждая гидролиз триглицеридов. Таким образом, инсулин служит в жировой ткани для накопления глицерина и жирных кислот в виде триглицеридов.

Несмотря на то, что жирные кислоты довольно свободно преодолевают барьер плазматических мембран, их расходование внутри клетки лимитировано. Жирная кислота не может пройти сквозь двойную мембрану митохондрий. Для ее проникновения внутрь митохондрии, где расположены ферментативная система β -окисления жирных кислот и электрон-транспортная цепь, существует специальный переносчик карнитин. Связывание карнитина и жирной кислоты осуществляется ферментом карнитин-пальмитоил трансферазой-1, который контролируется гормоном жировой ткани лептином. Лептин фактически регулирует утилизацию жирных кислот как субстратов энергии. Уровень секреции лептина зависит от размеров жировой ткани – чем больше клеточная масса жировой ткани, тем больше секретируется лептина. Однако в ответ на увеличение количества гормона в крови снижается число его рецепторов на клеточной мембране. Клеточная масса жировой ткани достигает своего максимума к 25 годам, ко времени, когда прекращается прирост соматических клеток. Можно полагать, что секреция лептина жировой тканью к этому времени стабилизируется, что, в свою очередь, приводит к установлению стационарного уровня расходования жирных кислот в клетках-потребителях.

После 25 лет наступает стабилизация уровня жирных кислот в крови. В отличие от глюкозы, уровень которой в крови поддерживается поджелудочной железой и действием двух гормонов, поддержание постоянства содержания жирных кислот в крови не может быть обеспечен аналогичным механизмом. Дело в том, что избыток жирных кислот просто некуда сбросить, и он задерживается в жировой ткани. Таким образом, жировая ткань депонирует как избыток глюкозы, так и избыток жирных кислот. При постоянстве числа клеток в ткани аккумуляция избыточного субстрата приводит к увеличению размера адипоцита.

Объем адипоцита не может увеличиваться беспредельно. Достигнув предела накопления жира, адипоцит «включает» систему его гидролиза, не зависящую от гормона роста. Дело в том, что ГЧЛ – фермент, имеющий невысокую специфичность к триглицеридам. Находясь в жировой ткани, ГЧЛ гораздо в большей степени гидролизует диглицериды [79]. Основным субстратом для фермента являются эфиры холестерина, поэтому основное место локализации ГЧЛ – стероидогенные ткани. Предполагается, что при достижении определенного размера адипоцита стимулируется некая, пока не выделенная липаза, специфичная к триглицеридам. Итогом неконтролируемого гормоном гидролиза триглицеридов становится постепенное возрастание количества жирных кислот, мобилизуемых из жировой ткани, и увеличение их содержания в крови. Большая часть выбрасываемых в кровь жирных кислот направляется в печень. Жировая ткань содержит большое количество олеиновой кислоты. Эта кислота стимулирует секрецию ЛПОНП печенью. Таким образом, пул жирных кислот в крови формируется из двух потоков – из жирных кислот, поставляемых жировой тканью и печенью. Для чего понадобилась дополнительная поставка жирных кислот из печени? Во-первых, потому что печень унифицирует все жирные кислоты, преобразуя их в пальмитиновую и стеариновую кислоты; во-вторых, система липопротеидов, частично генерируемая печенью, обеспечивает транспорт и распределение в организме холестерина.

1.4. Связь нарушений липидного обмена и дисбиоза кишечника

Микробиота кишечника может способствовать нарушению липидного метаболизма и ожирению с помощью нескольких механизмов:

- 1) благодаря способности микробных метаболитов-короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), таких как ацетат и пропионат, индуцировать сигналы через эпителиальные рецепторы кишечника;
- 2) через повышенную кишечную проницаемость с транслокацией бактериальных метаболитов, что приводит к высокому уровню хронического воспаления [139].

Известно, что КЦЖК, такие как ацетат, пропионат и бутират, регулируют иммунный гомеостаз кишечника и служат источником энергии для эпителиальных клеток кишечника. Так же КЦЖК опосредованно влияют на метаболические процессы путем индукции глюконеогенеза в кишечнике [77]. КЦЖК абсорбируются из кишечника и могут оказывать сильное воздействие на энергетический гомеостаз и чувствительность к инсулину в периферических метаболических тканях через различные рецепторы, сопряжённые с G-белком (GPCR-серпентины), такие как GPR41 и GPR43 [64,120].

Микробиота кишечника регулирует энергетический и липидный метаболизм, посредством быстрого увеличения содержания жира в организме, несмотря на снижение потребления пищи и увеличение производства триглицеридов в печени. Упрощение мышей без микробов способствовало абсорбции моносахаридов и короткоцепочечных жирных кислот путем ферментации и, таким образом, увеличивало *de novo*-печеночный липогенез и запасание жира за счет увеличения мРНК связывающего белка с рецептором белка (ChREBP) и регулирования активности липопротеиновой липазы (ЛПЛ) [120,106]. Насыщенные жиры стимулируют печеночный стеатоз и влияют на состав микробиоты кишечника путем увеличения деградации пищевого жира в дистальный отдел кишечника. Восокожирная диета, основанная на пальмовом масле, увеличивала накопление жира в печени, уменьшала микробное разнообразие и увеличивала соотношение *Firmicutes/ Bacteroidetes*. При повышенном поступлении пальмового масла в тонкий кишечник наблюдалось также увеличение количества генов, связанных с липидным метаболизмом, в дистальном отделе тонкого кишечника [56,191]. Интересно, что недавнее исследование показало, что микробиота кишечника заметно влияет на метаболизм липидов в печени, независимо от ожирения [126,205].

В некоторых исследованиях показано, что при ожирении происходит изменения соотношения бактериальных фило типов: увеличением *Firmicutes* и снижением *Bacteroidetes* [79,76]. Такие изменения в бактериальном сообществе приводят к увеличению общего энергетического пула в организме, что

способствует увеличению веса, гипергликемии и гиперинсулинемии [128,117,179]. На мышцах было показано, что микробиота также влияет на целостность кишечного барьера; в случае ожирения и / или диеты с высоким содержанием жиров, происходит изменения в целостности кишечного барьера, что приводит к повышенной кишечной проницаемости и увеличению транслокации эндотоксина (липополисахарида грамотрицательных бактерий) в системный кровоток. Повышенная транслокация эндотоксина в кровоток называется метаболической эндотоксемией и связана с возникновением метаболических заболеваний [55, 153, 150].

Бактерии кишечника генерируют промежуточные предшественники, которые далее метаболизируются хозяином на продукты, которые оказывают прямое воздействие на уровни липидов. В этой связи, было показано, что триметиламин- *N*- оксид (ТМАО) является метаболитом, который увеличивает атеросклероз у мышей и сердечно-сосудистый риск у людей, частично благодаря нарушениям транспорта обратного холестерина, холестерина и стерола и / или количеству и составу желчных кислот [90]. В связи с этим, ТМАО получают вторично путем печеночного окисления триметиламина (ТМА), который сначала продуцируется через кишечный микрополоподобный метаболизм диетического холина и L-карнитина [68,70].

1.5. Дислипидемии при нарушениях углеводного обмена и дисбактериоз кишечника (метаболический синдром и СД 2 типа)

Углеводный обмен тесно связан с составом микробиоты кишечника. Одними из наиболее крупных исследований считаются, проведенные в Китае [204] и Швеции [119]. В обеих работах было доказано, что сахарный диабет 2 типа (СД-2) ассоциирован со снижением бактерий, продуцирующих КЦЖК – *Roseburia* и *Faecalibacterium prausnitzii*. В более ранних работах предполагалось увеличение соотношения филумов *Firmicutes/Bacteroidetes* [127, 196], однако ни в Китае, ни в Швеции это не подтвердилось, также в этих масштабных исследованиях не подтвердилась и уменьшение разнообразия микробиоты

кишечника при наличии СД-2. В работе китайских исследователей было обнаружено увеличение представленности *Escherichia coli* (филум *Proteobacteria*) у больных СД-2, эта взаимосвязь была выявлена и в исследовании Larsen и соавторов [125]. Особую роль во взаимосвязи микробиоты кишечника и нарушений метаболизма глюкозы играет неоднократно упоминавшееся системное вялотекущее воспаление. Сигнал, передающийся в клетку через специфичные к бактериальным компонентам и токсинам рецепторы TLR, индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов – интерлейкинов, фактора некроза опухоли α и др. [122]. Это ведет к развитию системного воспаления, стеатоза, гиперинсулинемии, инсулинорезистентности, нарушению углеводного обмена, СД-2 [84]. Упомянутые ранее КЦЖК модулируют работу некоторых гормонов, принимающих участие в углеводном обмене, например, глюкагон-подобного пептида или грелина. Кроме того, КЦЖК, связываясь с рецепторами GPCRs подавляют вялотекущее воспаление [189, 193]. Имеются также данные о том, что КЦЖК активируют глюконеогенез в кишечнике цАМФ-зависимым путем [77]. Предполагается, что процессы регуляции обмена глюкозы вовлечены и желчные кислоты. В печени синтезируются первичные желчные кислоты, в составе желчи они поступают в кишечник, и часть из них трансформируется во вторичные желчные кислоты. Вторичные желчные кислоты активируют продукцию глюкагон-подобного пептида L-клетками кишечника [191]. Отдельного внимания заслуживает слизистый слой кишечника. Изменения кишечной микробиоты, помимо прочего, могут сопровождаться повреждением т.н. «tight-junction», или белков плотных контактов (зонулина и окклюдина), выполняющих барьерную функцию. Восстановление кишечной микробиоты ведет к регенерации целостности кишечного барьера, снижению уровня метаболической эндотоксемии и инсулинорезистентности [67, 150]. Расщепляющие муцин бактерии *Akkermansia muciniphila*, способствующие обновлению слоя слизи, покрывающего поверхность эпителия, находятся в обратной корреляционной связи с развитием ожирения и сахарного диабета 2 типа. А употребление мышами пробиотика, в состав которого входят бактерии *Akkermansia muciniphila* в течение 4 недель у

особей с ожирением ведет к восстановлению слизистого слоя, снижению веса, снижению эндотоксемии и нормализации углеводного обмена [81]. Синтез белков «tight-junction» снижается и под воздействием эндоканнабиноидной системы [149, 90], которая активируется липополисахаридом грамотрицательных бактерий [67, 150, 149].

1.6. Современные направления коррекции дислипидемий у больных с СД 2 типа.

Нарушения в микроэкологии кишечника отражаются изменениями в соотношении бактериальных типов, родов и видов. Основным источником эндотоксина в макроорганизме являются грамотрицательные патогенные и оппортунистические бактерии, в первую очередь, энтеробактерии и бактероиды, широко представленные в составе фекальной микробиоты; их количество увеличивается с возрастом и развитием возраст-ассоциированных патологий. Так же при старении увеличивается кишечная проницаемость, ослабевает барьерная функция кишечника, бактериальные эндо- и экзотоксины транслоцируют через кишечную стенку в кровоток и способствуют хроническому системному воспалению. Хроническое системное воспаление, в свою очередь, связано с развитием возрастных метаболических нарушений и патологических процессов, которым часто сопутствует дисбиоз микробного сообщества кишечника, сопровождающийся развитием эндотоксинемии.

Основные причины повышения уровня ТГ в крови - нарушение их метаболизма. Триглицерид-содержащие липопротеиды крови – это липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикроны (ХМ). ЛПОНП секретируются в кровь печенью, ХМ – энтероцитами. Изменение уровня ТГ в крови может быть обусловлено как избыточной продукцией частиц липопротеидов, так и их недостаточным клиренсом [196].

Изменение функциональности энтероцитов подтверждается наблюдаемым при СД2 снижением содержания в крови кампестерола, маркера абсорбции холестерина [84], а также усилением секреции апо В-48, основного белка ХМ

[189]. Одновременно с повышением секреции ХМ нарушается их клиренс [127]. С другой стороны, увеличивается секреция в кровь ЛПОНП печенью [196] и также снижается их катаболизм, что вызвано снижением активности липопротеидлипазы, особенно в жировой ткани [84]. При СД2 изменяется тип ЛПОНП: увеличивается их размер, они становятся более насыщенными ТГ, эфирами ХС и фосфолипидами [189,193]. В крови увеличивается также количество ремнантов ХМ и ЛПОНП [77].

Принятая точка зрения, что СД2 является последним этапом развития МС, обусловила тот факт, что диабетическую дислипидемию стали определять по тем же показателям, что и дислипидемию при МС, т.е. ориентируясь на содержание в крови ТГ, ЛПВП и ЛПНП [191].

В нашем исследовании мы использовали традиционную диагностику дислипидемий по Фредрикссону, разделив их на гиперхолестеринемию, триглицеридемию и сочетанную дислипидемию. При этом референсным значением для уровня ТГ считали рекомендованный ВОЗ показатель 1,7 ммоль/л. Сочетанная дислипидемия, как и гипертриглицеридемия отличаются высоким содержанием ТГ в крови, поэтому при общепринятом определении только ТГ упускается из виду разная этиология нарушений липидного обмена. Гипертриглицеридемия встречается не чаще, чем гиперхолестеринемия и не может быть признана диабетической дислипидемией.

Микробиота кишечника играет важную роль в поддержании оптимального состояния здоровья макроорганизма и участвует в этиопатогенезе многих метаболических заболеваний, таких как дислипидемия и сахарный диабет 2 типа [150,81,149,90]. Многие исследования показывают взаимосвязь определенных микроорганизмов, а точнее количества их генов оперативных таксономических единиц (OTU), присутствующих в кишечнике, с метаболическими путями СД 2 типа [110,77].

В исследованиях Qin и соавт. [163] и Karlsson соавт. [119] было установлено, что СД 2 типа был связан с дисбиотическими нарушениями в кишечной микробиоте. В фекальной микробиоте лиц с СД 2 типа было

обнаружено уменьшение количества OTU бутират продуцирующих бактерий, принадлежащих к филу *Firmicutes: Clostridiales sp. SS3/4*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* и *Roseburia inulinivorans*. Так же было обнаружено увеличение (количества OTU) условно-патогенной флоры: *Bacteroides caccae*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium symbiosum*, *Eggerthella lenta* и *Escherichia coli*. Муциндеградирующие микробные виды *Akkermansia spp. (A.muciniphila)* и сульфатовосстанавливающие виды *Desulfovibrio spp.*, также были наиболее представлены (по количеству OTU) в кишечном микробиоценозе лиц с СД 2. В группе лиц с СД 2 авторы наблюдали увеличение численности 4 видов *Lactobacillus spp.* и уменьшение 5 видов бутират продуцирующих *Clostridium spp.* Виды *Lactobacillus* положительно коррелировали с глюкозой натощак и гликированным гемоглобином (HbA1c), тогда как виды *Clostridium* отрицательно коррелировали с глюкозой натощак, HbA1c и другими метаболическими маркерами. Оба вида не коррелировали с индексом массы тела (ИМТ) испытуемых. При метагеномном исследовании были идентифицированы бактерии *Roseburia* и *Faecalibacterium prausnitzii*, а также выявлены их перекрестные метаболические пути как наиболее важные при СД 2 [119]. Снижение количества *Bifidobacterium spp.* и *Faecalibacterium prausnitzii* наблюдается у пациентов с избыточной массой тела, ожирением и/или сахарным диабетом 2 типа [127,196]. Интересно, что уровень *Bifidobacterium* и *Faecalibacterium prausnitzii* коррелирует с анти-воспалительными эффектами [84]. Эти бактерии являются индигенными представителями кишечного микробиоценоза человека, которые производят бутират, они улучшают контроль уровня глюкозы в крови и чувствительность к инсулину [150,81,149].

Принимая во внимание эти результаты, пациенты с диабетом 2 типа демонстрируют повышенное количество видов нескольких оппортунистических патогенов и снижение количества полезных бактерий, продуцирующих бутират.

Более ранние исследования на людях, а также у мышей показали, что ожирение и нарушение метаболизма глюкозы связаны с измененным соотношением между двумя основными филами в кишечнике человека, *Firmicutes*

и *Bacteroidetes* [136]. Однако ни шведское, ни китайское исследование не подтвердили эти выводы. Они также не подтвердили, что диабет типа 2 ассоциируется с более низким разнообразием, что в противном случае можно было бы ожидать от исследований у людей, не страдающих диабетом, где богатство бактериальных генов с низким содержанием в кишечнике (маркер разнообразия) было связано с высоким риском ожирения и коморбидностью заболеваний по сравнению с людьми с высоким богатством [217,74].

В датском исследовании уровни *Proteobacteria* были повышены у пациентов с диабетом 2-го типа [217] и, так же, количество кишечной палочки *Escherichia coli* (принадлежащих к типу *Proteobacteria*) было увеличено у пациентов с диабетом 2-го типа в китайском исследовании [74], эти грамотрицательные бактерии могут продуцировать липополисахарид (ЛПС), вызывая субклиническое состояние воспаления, что является характерной чертой как диабета 2 типа, так и ожирения.

Микробиота людей, страдающих СД 2, демонстрирует некоторые потенциальные взаимосвязанные функции, такие как усиление мембранного транспорта сахаров, транспорт аминокислот с разветвленной цепью, восстановление сульфатов и экспрессию микробных генов. Однако, наблюдается снижение биосинтеза бутирата и генов, участвующих в синтезе витаминов, таких как рибофлавин [168]. Дисбиотические нарушения у диабетиков наблюдались и ранее, но необходимо выяснить, являются ли данные изменения, приводящие к увеличению кишечной проницаемости и как следствие к метаболической эндотоксемии причиной или следствием диабета. В исследованиях на людях показано, что внутривенное введение липополисахарида (ЛПС) провоцировало метаболическую эндотоксемию и системную инсулинрезистентность (ИР), также наблюдалась связь между ЛПС и развитием СД 2 [109]. Толл-подобный рецептор 4 (TLR4) присутствует в инсулинчувствительных тканях и клетках. Воспалительный путь, индуцированный ЛПС-TLR4, усиливает экспрессию индуцируемой синтазы оксида азота. Оксид азота ингибирует сигналы трансдукции инсулина посредством фосфорилирования субстрата инсулинового

рецептора 1 (IRS1) в серине, что приводит к подавлению продукции инсулина и к увеличению уровня глюкозы в крови. [125, 178] В другом пути толл-подобные рецепторы (TLR) непосредственно вызывают воспалительные реакции, приводящие к активации провоспалительных цитокинов, которые также могут индуцировать фосфорилирование IRS1 в серине, что приводит к подавлению действия инсулина [176].

Основные представления о составе микробиоты кишечника человека связаны с анализом образцов фекалий, выявления энтеротипов (копротипов) проведено молекулярно-генетическим методом 16S рРНК по фекалиям [60, 85]. Следует иметь в виду, что микробиологические данные, основанные на анализах по фекалиям, не отражают полного состава в различных отделах кишечника. Состав активной части микробиоты значительно варьирует между различными отделами ЖКТ [73]. Несмотря на то, что микробная популяция бактерий в толстой кишке ($10^{11} - 10^{12}$ КОЕ/мл) превышает на несколько порядков микробное сообщество тонкого кишечника ($10^4 - 10^8$ КОЕ/мл) [164], сообщество микроорганизмов толстого кишечника, определенное по фекалиям не гомеостатично и не физиологично по отношению к хозяину и является автономным [151], так же именно в мукозном слое тонкого кишечника происходит усвоение пищевого химуса, поступающего из желудка, всасывание всех полезных микронутриентов, а от микробиоты кишечной стенки зависит продукция большого числа биологически активных веществ: ферментов, витаминов, иммуностимуляторов, сигнальных молекул, медиаторов; пристеночная микробиота слизистой оболочки находится в непосредственной близости с иммунными клетками кишечника [194]. Адгезивная микробиота сосредоточена на апикальной мембране энтероцитов и колоноцитов крипт и Пейеровых бляшек кишечника, т.е. в зоне ассимиляции нутриентов. Предполагается, что изменения качественного и количественного состава адгезивного микробного сообщества мукозного слоя оказывают влияние на пищеварительно-транспортные процессы в тонкой и толстой кишке [194, 103]. Микроорганизмы в количестве 10^{11} клеток/см³ распределены в пристеночном

слое муцина [173], прочного геля, состоящего из пептидогликана, продуцируемого бокаловидными клетками эпителия слизистой оболочки кишечника. Толстая и тонкая кишки отличаются между собой не только по основным свойствам и функциям, но и по строению и составу муцинового слоя, более того, существуют значительные качественные и количественные различия между микробными сообществами в просвете кишечника и в пристеночном мукозном слое, покрывающим слизистую оболочку кишечника, что показано в исследованиях как на животных [99], так и на людях [192, 157].

Исходя из вышеизложенного, для оценки дисбиоза более ценной является информация о микробной колонизации в стенке кишечника, которая обеспечивается адгезивными свойствами бактерий. В отличие от микробиоты фекалий, именно эти микроорганизмы наиболее точно отражают состояние микробной экологии человека [210].

Из физиологии обмена биологических жидкостей известно, что обмен 70% жидкости плазмы с межклеточным пространством происходит за 1 мин. Поэтому метаболиты и малые фрагменты микробных биополимеров поступают в кровь практически сразу по мере их образования [133]. Доказано, что малые молекулы микробного происхождения (SMOM), присутствуют в крови человека постоянно [66]. Они образуют гомеостаз (уравновешивание про- и противовоспалительной активности клеток) в организме, нарушение которого происходит при различных заболеваниях и патологиях. В здоровом организме источником SMOM является нормальная симбионтная микробиота [197].

Установлено, что различные микроорганизмы имеют в сумме около 200 жирных кислот, отличающихся от таковых организма человека [198, 134]. Профиль жирных кислот клеток микроорганизмов определяет их таксономическую принадлежность и применяется в качестве хемодифференциации методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) [72, 88]. В исследованиях хромато-масс-спектрометрическим методом доказано, что состав химических маркеров микроорганизмов, выделенных из биоптатов слизистой оболочки кишечника

коррелирует с маркерами в крови [111]. Так же показана разница между микробным составом в различных отделах кишечника и фекалиях методом хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров [144].

Многие исследования кишечного микробиоценоза проведены современными молекулярно-генетическими методами: высокопроизводительное метагеномное 16S рРНК секвенирование и полногеномное секвенирование, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), а также забытым классическим методом бактериологического посева [96, 166, 185]. Каждый из методов имеет свои определенные преимущества и недостатки [171]. Например, традиционный культурально-биохимический метод бактериологического посева определяет лишь 10 –15 видов микробиоты фекалий, и он не в состоянии отразить реальную картину качественного и количественного состава микробиоты кишечника, биоразнообразия кишечной микробиоты, так как большинство бактериальных видов желудочно-кишечного тракта нельзя культивировать [154]. Недостатком анализа копий 16S rRNA является наличие у некоторых бактерий одного рода нескольких оперонов rRNA и поэтому генные копии не могут быть пересчитаны в количественные показатели для микроорганизмов [71, 108]. Для подсчета численности могут использоваться разные гены мишени, специфичность праймеров, разное число копий 16S в геноме, что может исказить результаты подсчетов генов, а, следовательно, и микробной принадлежности микроорганизмов. Еще сообщалось о редком горизонтальном переносе генов участвующих в идентификации, что так же может повлиять на результат [216, 154].

1.7. Особенности использования метода математического моделирования в биологии и медицине

Такие науки как геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика существуют относительно давно, однако особенно стремительно они стали развиваться в течение последнего десятилетия. В 1971 г. Linus Pauling с соавт.

впервые высказали идею о том, что вся информация о функциональном состоянии организма отражена в качественном и количественном составе биологических жидкостей организма [160]

Позже Nicholson J.K. с соавт. (1999) ввел понятие «метабономика», означающее динамический метаболический ответ живых систем на биологические стимулы, в то время как под термином «метабономика» понималась наука, изучающая метаболические профили на клеточном и органном уровне и связанная преимущественно с нормальным эндогенным метаболизмом. Сейчас разница между двумя этими понятиями практически упразднилась, и в мировой литературе чаще используется термин «метабономика».

Метабономика является системой технологий, направленных на объяснение и изучение метаболомов. Подобно геномам и протеомам, существуют метаболомы, содержащиеся как в клетках одноклеточных организмов, так и в клетках тканей многоклеточных организмов. В метаболомах биологических жидкостей человека и животных можно обнаружить различные метаболиты при нормальных метаболических процессах и при воздействии токсикантов на организм. [156]

Метабономика – это научное направление, занимающееся изучением низкомолекулярных соединений, входящих в состав метаболома. Метаболом представляет собой комплекс всех низкомолекулярных (как правило, не более 1 кДа) метаболитов в клетке, ткани, органе, биологической жидкости, являющихся промежуточными или конечными продуктами обмена веществ.

Целью метабономики является изучение ответной реакции организма на какое-либо патофизиологическое воздействие, например, болезнь, воздействие лекарственных препаратов или окружающей среды.

В результате любого воздействия на организм происходят множественные изменения концентраций различных метаболитов с целью поддержания гомеостаза. Внутриклеточные метаболиты находятся в динамическом равновесии с метаболитами биологических жидкостей, омывающих клетки. Таким образом, любой клеточный ответ будет отражен в изменяющемся составе биологических

жидкостей организма, таких как кровь, моча, семенная, фолликулярная или церебральная жидкости. Анализируя полученные метаболические профили можно получить своеобразный «отпечаток» (fingerprint), отражающий физиологическое состояние организма [71].

Начиная с 2002 г. активно развивается метабономика — новая технология количественного измерения динамического мультипараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические или генетические изменения [19].

Для изучения метаболических профилей в качестве исследуемых образцов чаще всего используются биологические жидкости, такие как сыворотка (плазма) крови, моча, асцитическая жидкость, слюна, бронхиальные смывы и т.д., поскольку они наиболее просты для забора и пробоподготовки. Однако наибольшее количество исследований до настоящего времени проводилось с сывороткой крови и мочой [21]

Для проведения метаболических исследований чаще всего используются ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия (в виде прямого масс-спектрометрического анализа или в сочетании с газовой хроматографией, высокоэффективной жидкостной хроматографией, капиллярным электрофорезом). Поскольку исследование метаболических профилей является крайне перспективным и многообещающим научным подходом, метаболические исследования проводятся в различных областях медицины.

Применение метабономики в психиатрии позволяет выявить биомаркеры заболеваний и предикторы его развития и эффективности терапии [115]. Например, исследование метаболических профилей при болезни Паркинсона выявило повышенный уровень глутатиона, и сниженный уровень мочевой кислоты [62]. Предикторы болезни Баттена – повышенный уровень ГАМК и сниженный уровень глюкозы [161]. Метаболические профили при шизофрении – концентрации жирных кислот и кетоновых тел (глицериновая, эйкозеновая, β -оксимасляная, пировиноградная кислоты и цистин) в сыворотках крови и моче [212]. Болезнь Альцгеймера можно выявить по уровню норадреналина и

метаболическим профилям, связанных с ним метаболитов – тирозина, триптофана, пурина и токоферола [116].

Применение метаболомики в ранней диагностике повреждений миокарда может существенно снизить смертность. У пациентов с признаками ишемии существенно различаются уровни ГАМК, мочевой и лимонной кислоты, так же гипоксантина, триметиламин-N-оксида и аконитовой кислоты.

Исследования метаболического профиля в гинекологии проводятся в разных направлениях: изучение этиологии, патогенеза и поиск биомаркеров эндометриоза, идентификация различных маркеров в онкогинекологии, в частности при таких заболеваниях, как рак шейки матки и рак яичника, изучение особенностей метаболома при синдроме поликистозных яичников, попытки найти предикторы преэклампсии. В недавних исследованиях Vouk K. и соавт. (2012) обнаружили повышенные уровни фосфатидилхолина и сфингомиелина в плазме женщин, страдающих эндометриозом. Синдромом поликистозных яичников характеризуется изменением концентраций следующих метаболитов: аргинин, лизин, орнитин, пролин, глутамат, ацетон, цитрат и гистидин.

Наиболее успешное применение метаболомики в онкологии связано с диагностикой и лечением рака молочной железы. С помощью ЯМР-спектromетрии (для исследований метаболического профиля *in vivo*) определяется повышенный уровень холин-содержащих соединений – глицерофосфохолина и глюкозы. С помощью хроматомасс-спектриметрии строится модель ранней диагностики колоректального рака. В основе модели заложены концентрации сывороточных биомаркеров альфа-оксимасляной, кинуреновой, аспаргиновой кислот, цистамина. Возможна диагностика колоректального рака по продуктам совместного метаболизма организма хозяина и микробиоты кишечника. Cheng Y. и соавт. показали высокие показатели прогностической точности панели, включающей концентрацию в моче лимонной, гиппуровой, 2-аминомасляной, миристиновой и кинуреновой кислот, пара-крезола и путресцина. Такое сложное заболевание как рак головного мозга характеризуется достоверным изменением

метаболического профиля холин-содержащих соединений и N-ацетиласпартата, исследуемого МРТ и ЯМР-спектроскопией.

Особенность применения метаболомики в гастроэнтерологии связана с изучением метаболитов микробного происхождения. Кишечник (прежде всего, толстая кишка) в «суперорганизме» человека и микробиоты представляет собой своеобразный биореактор с практически неограниченным метаболическим потенциалом, определяемым возможностями именно микробиома. Организм человека при этом «сотрудничает» с микробиотой благодаря так называемому явлению метаболической интеграции, существование которого недавно было постулировано отечественными учеными. При этом человек получает от микроорганизмов целый ряд ключевых метаболитов, не только поддерживающих его энергетический баланс (короткоцепочечные жирные кислоты и др.), но и активно участвующих в регуляции экспрессии его генов, нейротрансмиссии и иммуномодуляции.

По мнению ряда исследователей, уровень ряда низкомолекулярных метаболитов в крови, например, некоторых карбоновых кислот, во многом определяется именно метаболической активностью микробиоты кишечника. В связи с этим особый интерес представляют метаболомические исследования при таких заболеваниях органов пищеварения, как воспалительные заболевания кишечника (язвенный колит и болезнь Крона), синдром раздраженного кишечника (СРК), целиакия (глютеновая энтеропатия), кишечные инфекции (*Clostridium difficile*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*) и др.), где роль нарушений микробиоценоза кишечника весьма велика.

«Метаболическое профилирование» и «биохимическое профилирование» — также широко используемые термины для описания метаболических исследований. Метаболическое профилирование является способом определения качества и/или количества небольших молекул в биологическом образце. Анализ может включать один или несколько технологических приемов, таких, как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография (ГХ), капиллярный электрофорез (КЭФ), масс-спектрометрия (МС) и ядерный

магнитный резонанс (ЯМР). В настоящее время эффективный способ извлекать значащую метаболическую информацию состоит в комбинировании результатов ЯМР-спектроскопии высокого разрешения определяемой биологической жидкости с мультивариантными методами статистики. Основные компоненты (ОК) — новые переменные, созданные от линейных комбинаций стартовых спектральных данных так, что каждый последующий ОК имеет определенное отличие от предыдущего, причем первый ОК в сравнении с другими имеет разницу в наборе данных в наибольшей степени. Участок первых двух или трех ОК дает лучшее представление о разновидности набора данных в двух или трех измерениях. Так создаются карты ОК, которые могут визуально отразить поведение образцов под влиянием любого токсиканта. «Рисунок» ЯМР спектра биологической жидкости определен его метаболическим профилем. Это достаточно простой подход для научных исследований. Однако в условиях протекания биохимических процессов *in vivo* все значительно сложнее, поскольку эффекты, вызванные генетической модификацией, болезнью, пищей, образом жизни, действием введенного препарата, развиваются в режиме реального времени. Для решения подобных многофакторных задач разработаны (и активно разрабатываются) автоматические методы классификации метаболических данных, на основе которой строится математическая модель, предсказывающая правильный выбор класса для каждого образца. Методика позволяет количественно описать статистические границы, которые характеризуют каждый класс образца в терминах их метаболических профилей, и отличить образцы, которые не принадлежат ни к одному из классов. Исследуемый образец может быть отнесен как к единственному классу, так и ко многим классам. Построив исчерпывающий ряд моделей, можно предусмотреть классификацию для широкого диапазона образцов биообъектов.

Преобладание частичного дискриминантного анализа методом наименьших квадратов (PLS-DA), используемого для анализа наборов метаболических данных (действительно, это самый известный инструмент для выполнения классификации и регрессии в метаболомике), можно сказать, привело к тому, что

все исследователи полностью осведомлены об альтернативных алгоритмах многомерной классификации. Отчасти это может быть связано с широкой доступностью PLS-DA в большинстве известных статистических программных пакетов, где его реализация очень проста, если используются настройки по умолчанию. Кроме того, одно из предполагаемых преимуществ PLS-DA заключается в том, что он обладает способностью анализировать высоколинейные и зашумленные данные. Кроме того, известно, что калибровочная модель предоставляет множество полезных статистических данных, таких как точность прогнозирования, а также графики и графики нагрузок.

Дискриминантный анализ используется для принятия решения о том, какие переменные различают (дискриминируют) две или более возникающие совокупности (группы). Иными словами, необходимо определить, отличаются ли совокупности по среднему какой-либо переменной (или линейной комбинации переменных), и затем использовать эту переменную, чтобы предсказать для новых членов их принадлежность к той или иной группе оптимальным способом. Под оптимальным способом понимается либо минимум математического ожидания потерь, либо минимум вероятности ложной классификации (ВЛК).

Дискриминантный анализ позволил сопоставить группы пациентов по нозологии. Кроме того, такой подход к делению пациентов на группы позволил выделить наиболее информативные признаки точности группирования, значимость параметров и факторную нагрузку.

Суть анализа сводится к построению решающего правила, позволяющего по результатам измерения параметров объекта (концентраций метаболитов микрофлоры) определить группу, к которой он принадлежит. Такое решающее правило выражается в классификационных функциях и расстояниях до центроидов (расстояние Махаланобиса) в дискриминантном пространстве. Дискриминантное пространство образуется при проведении дискриминантного анализа над случаями с заданной принадлежностью к группам.

В статистике расстояние Махаланобиса - евклидово расстояние между векторами случайных величин, которое было в 1936 году предложено индийским

статистиком Махаланобисом. Центроид это центр масс множества точек, которое задано набором точек, определённо принадлежащих данному множеству в N -мерном евклидовом пространстве. Центроид это аналог среднего в одномерной статистике, однако в многомерной статистике по минимальному расстоянию от центроида до исследуемой точки определяют класс, к которому она принадлежит. Однако также стоит учитывать, на каком размере области сосредоточены точки множества, чтобы оценить значимость расстояния между данной точкой и центроидом. Для этого используется среднее квадратичное отклонение точек множества от координат центроида, так как отдаление данной точки от центроида меньше среднее квадратичное отклонения.

Для выбора переменных сравнивают корреляции переменных между собой, чтобы отбросить скоррелированные переменные. Для оценки применимости дискриминантного анализа необходимо оценить отношение величины внутригрупповой изменчивости к величине общей изменчивости, что определяется лямбдой Вилкса. Wilk's Lambda — лямбда Уилкса (статистика Уилкса) — рассчитывается как частное детерминанты матрицы внутригрупповых дисперсий (ковариаций) к детерминанту суммарной ковариационной матрицы. Чем больше лямбда Уилкса, тем значительнее этот признак, а чем меньше общее значение этой статистики, тем лучше было выполнено разделение групп.

Partial Lambda — частная лямбда. Данная статистика указывает частное лямбды Уилкса после добавления значения этой переменной к лямбде Уилкса до прибавления переменной. В случае если переменная вносит заметный вклад в разделение групп, лямбда Уилкса снизится. Таким образом, снижение частной лямбды, увеличивает ценность данного признака.

F-remove — F-условие, относящееся к выключению настоящего признака из анализа, а p-level — это уровень его значимости. Значимость признака тем важнее, чем более значимое изменение влечет за собой его исключение в дискриминацию групп.

Толерантность - это критерий избыточности признака, который рассчитывается, как $1-R^2$, где R^2 — коэффициент многократной корреляции этого

признака со всеми прочими признаками анализа. Признак тем сильнее связан со всеми остальными признаками, чем ниже толерантность. Чем выше коэффициент множественной корреляции, тем больше данный признак скоррелирован с другими, использованными в модели.

Для интерпретации дискриминантной функции для исследуемых групп и выбранных переменных, необходимо сначала проверить значимость исследуемых функций и использовать исключительно значимые функции. Потом, для любой значащей функции нужно проанализировать стандартизованные коэффициенты бета. Чем выше стандартный коэффициент бета, тем выше относительный собственный вклад переменной в дискриминацию, исполняемую соответствующей дискриминантной функцией. Для снижения вероятности ложной классификации исследуется матрица факторной структуры с корреляциями между дискриминирующей функцией и исследуемыми переменными. Таким образом, необходимо оценить средние для значимых дискриминирующих функций для того, чтобы определить, какие функции и между какими совокупностями проводят дискриминацию.

Применение метабономики микробиоты для оценки резистентности организма к инфекции бактериальной, вирусной или грибковой этиологии в литературе называется микробиом-ассоциированная метаболомика. Микробиота обладает более широкими возможностями для реакции на присутствие возбудителя или прочие воздействия, так как совокупный геном микроорганизмов содержит более чем в 100 раз больше Кб информации, которая передается от микроорганизма к микроорганизму через горизонтальный перенос генов с помощью обмена плазмидами и взаимным инфицированием умеренными бактериофагами. Возможность быстро перестраиваться и менять метаболитный профиль делает микробиоту высокочувствительным сенсором заболеваний, дополняющим известные методы диагностики, принятые в реактивной медицине, а также позволяет расширить возможности персонализированной медицины для прогноза развития заболеваний и подбора эффективных методов профилактики.

1.8. Заключение

Анализ данных литературы отечественных и зарубежных авторов показал, что исследование инфекционных заболеваний с позиций реактивной медицины, недостаточно эффективно не смотря на серьезные достижения в последние годы по многим направлениям диагностики. Подходы персонифицированной медицины, основанные на анализе метаболома с широким применением биоинформационных методов классификации и прогноза, являются перспективными как в решении задач научных исследований, так и в практическом здравоохранении.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Интегральная оценка нарушений углеводного и липидного обмена по концентрациям микробных маркеров в крови

В результате нарушений липидного и углеводного обмена происходит изменение количественного и качественного состава микрофлоры в различных биотопах, изменяется проницаемость слизистых оболочек, снижается активность биохимических процессов в печени, изменяется активность иммунологических процессов. В результате множества разнонаправленных процессов изменяются концентрации малых молекул микробного происхождения в крови, для которых сложно определить статистически значимые изменения, в виду высокой дисперсии значений [175]. Тем не менее, выявление сложных биохимических маркеров нарушений углеводного и липидного обмена может расширить возможности диагностики и определить группы риска, а также формы заболеваний со стертой симптоматикой или на ранних стадиях. Для интегральной оценки необходимо определить общие характеристики изменений системы макроорганизм-микробиота в условиях нарушения углеводного обмена. Для этого необходимо выяснить пороговые значения концентраций бактериального плазмалогена и энлотоксина при сахарном диабете 2 типа [3].

Для более точного персонифицированного исследования состояния макроорганизм-микробиота необходимо выявить липидный отпечаток дислипидемии и сахарного диабета 2 типа, по специфическому соотношению концентраций малых молекул микробного происхождения в крови, определяемый линейным дискриминантным анализом. Линейный дискриминантный анализ позволит нам оценить различные виды дислипидемий и оценить глубину и направленность изменений в системе макроорганизм - микробиота. Полученные решающие правила интегральной и персонифицированной оценки состояния системы позволит более точно исследовать взаимосвязь деформации липидного профиля и уровней холестерина, глюкозы и прочих параметров нарушений [4].

2.1. Определение критериев интегральной оценки состояния микробиома лиц пожилого возраста при нарушении углеводного обмена

Интегральную оценку нарушений углеводного (СД2) и липидного (ДЛП) обмена пациентов характеризовали общими изменениями системы макроорганизм-микробиота.

Эндотоксин представляет собой термостабильный компонент наружной части клеточной мембраны грамотрицательных микроорганизмов, т.е. это липополисахарид (ЛПС), состоящий из 3-х частей: гидрофобного липида А – гликолипида Ре-хемотипа, гидрофильного ядра и полисахарида [46,208].

Образ-распознающие рецепторы – белки, присутствующие на поверхности клеток иммунной системы, способные распознавать стандартные молекулярные паттерны, такие как липополисахарид (ЛПС), пептидогликан, липопептиды и липотейхоевые кислоты, флагеллин, бактериальная и вирусная ДНК, вирусная двухцепочечная РНК [7,131]. Липотейхоевые кислоты являются важными строительными элементами клеточной стенки грамположительных, а липополисахариды (ЛПС) - грамотрицательных бактерий. Эти компоненты высвобождаются при лизисе бактериальных клеток, затем обнаруживаются клетками макроорганизма через Toll-подобные рецепторы (TLR) 2 и 4, что вызывает синтез провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли (TNF) - α , интерлейкина (IL) -1, IL-6), которые путем рекрутирования макрофагов и эозинофилов вызывают воспаление и боль, а затем, в конечном итоге, полный бактериальный лизис и клиренс [1,49]. Так же образраспознающие рецепторы TLR4, TLR2, TLR9 взаимодействуют с лигандами кишечной микробиоты и осуществляют функции защиты от инфекции и поддержание тканевого гомеостаза [165,48]. Комплекс TLR4 является ключевым элементом клеточной связи для распознавания ЛПС. Биологические эффекты обусловлены взаимодействием ЛПС с рецептором TLR4, который распознает эндотоксин в кооперации с внеклеточными белками MD2, CD14 и LBP [159].

Так же системное воспаление связано с ионными каналами с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP), которые являются значимыми в

воспалительных реакциях не только посредством нейро-возмущения, но и через функции в эндотелиальных, эпителиальных и провоспалительных иммунных клетках [183]. TRP-каналы являются белковыми рецепторами, которые ответственны за ряд физиологических процессов - сенсорных функций: трансдукция вкуса и запаха, термочувствительность, ноцицепция; гомеостатических функций: проницаемость катионов Ca^{2+} и реабсорбция катионов Mg^{2+} , осморегуляция; подвижных функций: сокращение мышц и вазомоторика [51,124,152].

Первое исследование, посвященное распознаванию эндотоксина через TRP-каналы, привело к открытию ионного канала с транзиторным рецепторным потенциалом анкиринового подсемейства, представитель 1 (TRPA1), как первого эндотоксинового сенсора [141]. В данном исследовании [141] было показано, что активация ЛПС в сенсорных нейронах не зависела от TLR4, а была связана с функциональной экспрессией TRPA1. В более позднем исследовании было продемонстрировано, что TRPA1 является не единственным сенсором чувствительным к ЛПС, отмечается чувствительность других TRP-каналов подсемейств: ванилоидного - представитель 1 (TRPV1), меластатинового - представитель 3 (TRPM3) и представитель 8 (TRPM8) [63]. TLR4-опосредованные эффекты в различных типах клеток требуют введения ионов Ca^{2+} путем активации других представителей семейства каналов TRP, а именно, TRPC6 и TRPM7 [177,190]. В эндотелиальных клетках ЛПС связывается с TLR4-ассоциированной комплексной молекулой CD14 [52], что вызывает гидролиз фосфатидилхолина с последующим образованием диацилглицерола (ДАГ) [174,213]. Впоследствии ДАГ активирует TRPC6, что приводит к увеличению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , и к взаимодействию с адапторным белком первичного ответа миелоидной дифференциации 88 (MyD88), индукции воспаления и активации пути NF- κ B [190]. Таким образом, вместе с нарушением Ca^{2+} - зависимого эндотелиального барьера [140,121,206], TRPC6-опосредованное увеличение Ca^{2+} также связано с воспалительными реакциями.

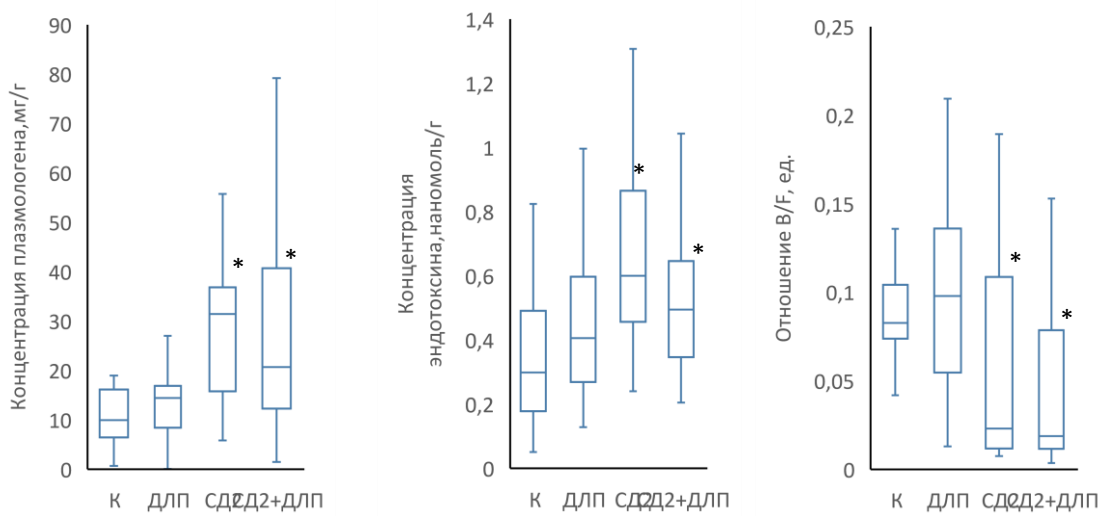
Объектом исследования являлись 168 человек в возрасте 45-90 лет отобранных методом случайной выборки в НКЦ Геронтологии из различных клинических отделений. Постановка диагноза СД 2 типа осуществлялась врачами-специалистами на основании клинико-anamnestических данных и результатов лабораторных исследований. На основании поставленного диагноза были сформированы основная группа (СД 2) – 105 пациентов и группа сравнения (ГС) – 63 пациента. Средний возраст пациентов в основной группе составил $68 \pm 11,3$ лет, в группе сравнения $68 \pm 11,5$ лет. Группы сопоставимы по возрасту. Гендерные различия не учитывались.

По результатам ГХ-МС анализ малых молекул микробного происхождения в крови определили концентрации альдегидов, насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, гидроксикислот и стероидов. Статистическую обработку результатов одноименных показателей в каждой группе сравнения проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0, построение диаграмм осуществлялось с помощью программы Microsoft Excel 2016 и Statistica 10.0.

Для выбора критерия оценки статистической значимости отличия выборок была проведена оценка нормальности распределения с помощью критериев Шапиро-Уилка (W) и Колмогорова-Смирнова (K-C) с модификацией Лиллиефорса (Лилл). Значения критериев для концентрации плазмалогена в крови составили K-C $d = 0,1636$, $p < 0,01$; Лилл $p < 0,01$ и $W = 0,9198$, $p = 0,000001$. Для концентрации эндотоксина в крови значения критериев составили K-C $d = 0,0744$, $p > 0,20$; Лилл $p < 0,05$ $W = 0,9499$; $p = 0,00001$. Из представленных данных следует, что распределение значений концентраций плазмалогена и эндотоксина в крови не соответствует нормальному. Для проверки статистически значимых различий двух независимых групп, распределение значений в которых не является нормальным, был использован U-критерий Манна-Уитни.

Для интегральной оценки структуры микробиома человека использовано определение концентрации микробных маркеров бактериального плазмалогена и эндотоксина в крови. На основании проведенного исследования соотношения

распространенности филотипов и в соответствии с данными литературы исследовали прогностическую точность показателя В/Ф и концентраций плазмалогена и эндотоксина в крови.



а) плазмалоген

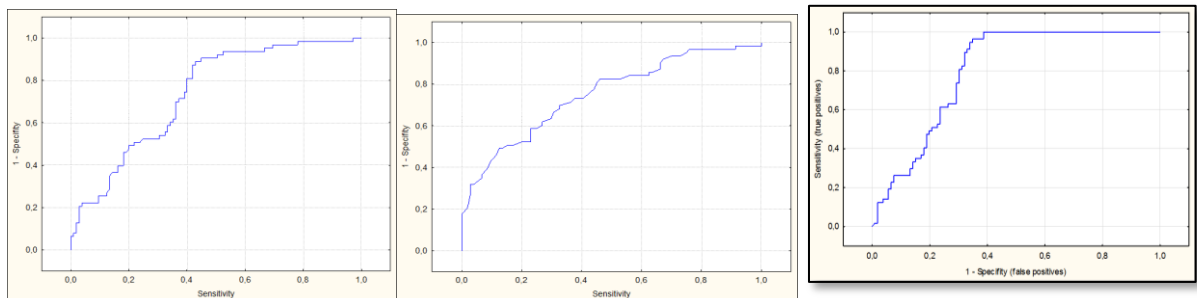
б) эндотоксин

в) отношение В/Ф

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

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

Для расчета решающих правил – пороговых значений концентраций бактериального эндотоксина и плазмалогена в крови пациентов использовали ROC-анализ. Результаты ROC-анализа для концентраций бактериального эндотоксина и плазмалогена в крови пациентов представлены на рисунке 2 и в таблице 2.



а) плазмалоген

б) эндотоксин

в) В/Ф

Рисунок 2 - ROC кривая для а) плазмалогена, б) эндотоксина в) В/Ф с показателем AUC - площадью, ограниченной ROC-кривой

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 отсеечения)	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

Из данных представленных на рисунке 2 и в таблице 2 следует, 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.

В таблице 2 показано, что концентрация микробных маркеров бактериального плазмалогена в крови 20,66 мкг/мл может с 68,45% точностью прогнозировать увеличение концентрации бактериального плазмалогена в крови, характерное для сахарного диабета 2 типа. Для концентрации микробных

маркеров бактериального эндотоксина 0,48 нмоль/мл прогностическая точность эндотоксемии, характерной для сахарного диабета 2 типа ниже и составляет 65,48%. Два исследуемых параметра обладают более высокой чувствительностью, чем специфичностью.

Методом ГХ-МС крови концентрацию микробных маркеров бактериального плазмалогена (мкг/мл) определяют по концентрации октадеценового альдегида (18:1a), который входит в состав клеточной стенки микроорганизмов, представителей индигенной нормобиоты, родов *Bifidobacterium spp.* и *Eubacterium spp.* [184,147]. Повышенная концентрация октадеценового альдегида может указывать на высокую интенсивность обсемененности кишечника микроорганизмами родов *Bifidobacterium spp.* и *Eubacterium spp.*, что является показателем присутствия представителей нормобиоценоза в физиологически достаточном количестве. Учитывая, важность плазмалогена для управления выбросом холестерина из клеток, так как плазмалоген является протектором окисления полиненасыщенных жиров, и поддержания нормальной нервной деятельности, так как плазмалоген стимулирует нервные клетки и осуществляет межклеточные функции, увеличение концентрации плазмалогена является положительным фактором. Симбионтная микробиота является резервуаром плазмалогена, который входит в состав мембран анаэробных бактерий. Увеличение концентрации плазмалогена в крови при СД 2 может также указывать на увеличение проницаемости кишечной стенки.

Для определения концентрации эндотоксина в крови методом ГХ-МС суммируют 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* [184,147]. Увеличение концентрации бактериального эндотоксина в крови свидетельствует об увеличении количества условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов в микробиоценозе лиц

с патологией СД 2 по сравнению с микробиоценозом лиц без СД 2. Умеренная активация клеток при низких дозах эндотоксина с увеличением дозы переходит в гиперактивацию, которая сопровождается усиленной продукцией воспалительных цитокинов, усиленной активацией системы комплемента и факторов свертывания крови, что способствует развитию системного вялотекущего воспаления.

На основании представленных данных можно утверждать, что в патогенезе сахарного диабета 2 типа принимает участие микробиота кишечника. Более высокие значения концентрации фосфолипида-плазмалогена и липополисахарида - эндотоксина указывают на то, что при сахарном диабете 2 типа в микробиоценозе преобладают представители нормобиоценоза и условно-патогенные микроорганизмы, продуцирующие эндотоксин. Более высокие концентрации плазмалогена и эндотоксина в системном кровотоке указывают на увеличение кишечной проницаемости для грамотрицательных микроорганизмов, нарушение функции колонизационной резистентности и выраженные дисбиотические нарушения микробного сообщества у пациентов основной группы. Для оценки состояния микробиоценоза и прогнозирования сахарного диабета 2 типа были определены решающие правила, в виде пороговых значений концентраций плазмалогена и эндотоксина в крови пожилых лиц с предполагаемым или установленным диагнозом СД 2 типа.

С помощью ROC-анализа выявлено, что значения выше 20,66 мкг/мл для плазмалогена и 0,48 нмоль/мл - для эндотоксина, определяют наличие патологии сахарного диабета 2 типа, при сопутствующих клинико-anamнестических данных.

2.2. Создание математических моделей предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа и дислипидемии у лиц пожилого возраста

Целью предиктивной диагностики в нашей работе является поиск уникального соотношения концентраций малых молекул микробного происхождения характерного для сахарного диабета 2 типа и дислипидемии. Высокая точность предиктивной диагностики гарантируется применением

методов многомерной статистики, благодаря которым возможен эффективный анализ сильно зашумленных данных. Применяемый в настоящей работе набор методов, можно отнести к омик-технологиям, а именно к микробиом-ассоциированной липидомике.

2.2.1. Модель предиктивной диагностики сахарного диабета 2 типа по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови

Для определения состояния микробиома пациентов специфического для сахарного диабета 2 типа методом линейного дискриминантного анализа провели группировку показателей концентраций молекулярных маркеров микробного происхождения в крови по клинко-анамнестическому обследованию пациентов врачом-эндокринологом и терапевтом. Проведено наблюдательное исследование образцов крови у пациентов амбулаторного наблюдения РГНКЦ: 114 пациента в возрасте от 45 до 90 лет (средний возраст - $67,1 \pm 1,4$ лет, М-68,4%, Ж-31,6%) с ДЛП. В исследование включены образцы крови, собранные у пациентов, обращавшихся в консультационно-диагностический центр вышеназванного учреждения в течение 2011-2018 годов. Гендерные различия не учитывались. 68 пациентов (средний возраст - $68,1 \pm 1,7$ лет, М-70,6%, Ж-29,4%) из ГК Больницы №67 им. Ворохобова ДМЗ.

Критерием отнесения в основную группу считалось наличия сахарного диабета 2 типа. Группа сравнения была сформирована из пациентов, обращавшихся в консультационно-диагностический центр РГНКЦ, не имеющих в анамнезе диагноза сахарный диабет 2 типа.

Статистическое исследование параметров функциональной активности микробиома кишечника в исследуемых группах представлены в таблице 3. Средние значения показателей в таблице рассчитаны как медианы, в скобках указан интерквартильный разброс. Использование медиан, интерквартильного разброса и непараметрических методов оценки статистической значимости обусловлено отсутствием нормального распределения. Для расчета статистически-значимых различий использовали U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 3 – Относительные концентрации молекулярных маркеров в крови в исследуемых группах

Название маркера	Обозначение маркера	Относительные концентрации ММ		Статистическая значимость, $p < 0,05$
		Основная группа	Группа сравнения	
1	2	3	4	5
Декановая кислота	10:0	0,7 (0,52 - 0,95)	0,56 (0,39 - 0,81)	0,013
Изопальмитиновый альдегид	i16a	1,57 (1,15 - 2,32)	0,9 (0,64 - 1,3)	$p < 0,001$
Антеизотридекановая	a13	0,04 (0,03 - 0,05)	0,03 (0,02 - 0,05)	0,035
Изомиристиновая	i14	0,28 (0,21 - 0,34)	0,22 (0,12 - 0,33)	0,003
9-Тетрадеценная	14:1d9	0,06 (0,04 - 0,09)	0,06 (0,03 - 0,07)	0,109
11-Тетрадеценная	14:1d11	0,5 (0,32 - 0,78)	0,39 (0,25 - 0,77)	0,088
Изолауриновая	i12	0,02 (0,01 - 0,03)	0,02 (0,01 - 0,02)	0,018
3-Гидроксилауриновая	3h12	0,02 (0,01 - 0,02)	0,01 (0,01 - 0,02)	0,001
2-Гидроксилауриновая	2h12	0,01 (0,01 - 0,01)	0,01 (0 - 0,01)	0,204
Изопентадекановая	i15	1,06 (0,79 - 1,36)	0,8 (0,49 - 1,3)	0,013
Антеизопентадекановая	a15	1,17 (0,92 - 1,57)	0,88 (0,51 - 1,4)	0,007
9-Пентадеценная	15:1d9	0,06 (0,04 - 0,08)	0,03 (0,02 - 0,06)	$p < 0,001$
3-Гидроксиизотридекановая	3hi13	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,854
3-Гидрокситридекановая	3h13	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,921
10-Метилпентадекановая	10Me15	0,13 (0,1 - 0,17)	0,09 (0,05 - 0,16)	0,001
9-Изогексадеценная	i16:1d9	0,07 (0,05 - 0,09)	0,05 (0,02 - 0,08)	$p < 0,001$
Изопальмитиновая	i16	4,18 (3,23 - 5,77)	3,48 (1,88 - 4,86)	0,012
7-гексадеценная	16:1d7	4,61 (3,18 - 6,51)	3,37 (1,88 - 4,59)	$p < 0,001$
3-Гидроксимиристиновая	3h14	0,04 (0,03 - 0,06)	0,02 (0,02 - 0,04)	$p < 0,001$
2-Гидроксимиристиновая	2h14	0,03 (0,02 - 0,04)	0,02 (0,01 - 0,03)	$p < 0,001$
Гептадекановая	17:0	42,63 (32,18 - 53,46)	30,96 (19,67 - 44,44)	$p < 0,001$
2-Гидроксиизопентадекановая	2hi15	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,58
10-Метилгексадекановая	10Me16	0,41 (0,3 - 0,51)	0,24 (0,15 - 0,39)	$p < 0,001$
Изононадекановая	i19	0,61 (0,38 - 10,25)	6,56 (4,38 - 11,72)	$p < 0,001$
3-Гидроксиизопентадекановая	3hi15	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,854
Антеизогептадекановая	a17	5,98 (4,5 - 8,05)	4,85 (2,75 - 6,93)	0,008
Цис-вакценовая	18:1d11	45,35 (34,96 - 58,71)	43,43 (28,54 - 57,1)	0,242
9-Изогептадеценная	i17:1d9	0,03 (0,02 - 0,04)	0,02 (0,01 - 0,03)	$p < 0,001$
9-Гептадеценная	17:1d9	0,46 (0,35 - 0,73)	0,37 (0,25 - 0,61)	0,037
Циклогептадекановая	17cyc	0,02 (0,01 - 0,03)	0,01 (0,01 - 0,03)	0,092
Лауриновая	12:0	4,29 (2,89 - 5,86)	3,74 (2,21 - 5,5)	0,046
Изооктадекановая	i18	0,09 (0,07 - 0,14)	0,07 (0,04 - 0,11)	0,005
10-Метилгептадекановая	10Me17	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	1
3-Гидроксиальпмитиновая	3h16	0,33 (0,24 - 0,42)	0,24 (0,15 - 0,36)	0,001
11-октадеценный альдегид	18:1d11a	8,73 (4,46 - 16,23)	4,66 (2,54 - 7,52)	$p < 0,001$
3-Гидроксиизогептадекановая	3hi17	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,986
Антеизононадекановая	a19	0,91 (0,7 - 1,17)	0,68 (0,39 - 0,89)	$p < 0,001$
9-октадеценный альдегид	18:1d9a	27,67 (15,47 - 48,15)	14,17 (8,31 - 21,62)	$p < 0,001$

Название маркера	Обозначение маркера	Относительные концентрации ММ		Статистическая значимость, $p < 0,05$
		Основная группа	Группа сравнения	
1	2	3	4	5
3-Гидроксистеариновая	3h18	0,08 (0,05 - 0,1)	0,03 (0,02 - 0,06)	$p < 0,001$
10-Гидроксистеариновая	10h18	0,11 (0,09 - 0,15)	0,06 (0,04 - 0,09)	$p < 0,001$
Циклононадекановая	19cyc	0,05 (0,03 - 0,09)	0,05 (0,03 - 0,07)	0,661
Копростанол	Coprostanol	0,03 (0,02 - 0,05)	0,02 (0,01 - 0,03)	$p < 0,001$
Изогептадекановый альдегид	i17a	2,65 (1,65 - 4,07)	1,32 (0,91 - 2,33)	$p < 0,001$
11-Эйкозеновая	20:1d11	1,05 (0,74 - 2,38)	1,17 (0,7 - 1,81)	0,942
Холестендиол	Cholestendiol	1,34 (0,48 - 2,86)	0,6 (0,36 - 1,08)	0,01
Кампестерол	Campesterol	0,27 (0,19 - 0,44)	0,13 (0,08 - 0,22)	$p < 0,001$
транс-9-гексадеценовая	16:1d9t	0,85 (0,6 - 1,18)	1,01 (0,7 - 1,47)	0,02
β -Ситостерол	β -Sitosterol	0,19 (0,11 - 0,29)	0,09 (0,05 - 0,18)	$p < 0,001$
Изопентадекановый альдегид	i15a	0,35 (0,24 - 0,57)	0,2 (0,11 - 0,28)	$p < 0,001$
11-Гексадеценовая	16:1d11	0,6 (0,43 - 0,87)	0,59 (0,35 - 0,79)	0,684
10-Метилгектадекановая	10Me18	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	1
Тетрадекановый альдегид	14a	0,81 (0,58 - 1,31)	0,41 (0,26 - 0,61)	$p < 0,001$
7-Тетрадеценовая	14:1d7	0,06 (0,04 - 0,08)	0,04 (0,03 - 0,05)	$p < 0,001$
3-Гидроксипентадекановая	3h15	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	1
Антеизопентадекановый	a15a	0,72 (0,4 - 1,11)	0,38 (0,21 - 0,59)	$p < 0,001$
Ергостерол	Ergosterol	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,843
Изомиристиновый альдегид	i14a	0,61 (0,38 - 0,89)	0,33 (0,22 - 0,51)	$p < 0,001$
Холестерол	Cholesterol	16,9 (11,97 - 21,39)	13,89 (10,15 - 20,06)	0,061
Холестадиенон	Cholestadienon	0,98 (0,47 - 2,64)	0,43 (0,12 - 1,27)	$p < 0,001$
Эйкозеновая	20:1	6,31 (4,72 - 8,82)	5,33 (3,24 - 7,63)	0,027
3-Гидроксиизоэйкозановая	3hi20	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	1
3-Гидроксиэйкозановая	3h20	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,921
Антеизогептадеценовая	a17:1	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	1
2-Гидроксидокозановая	2h22	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	1
2-Гидрокситетракозановая	2h24	0,96 (0,63 - 1,4)	0,41 (0,25 - 0,75)	$p < 0,001$
2-Гидроксигексакозановая	2h26	0,05 (0,03 - 0,06)	0,02 (0,01 - 0,03)	$p < 0,001$

Примечание. Полужирным шрифтом отмечены значения с уровнем достоверности $p < 0,05$.

В таблице 3 показано, что значения относительных концентраций для концентраций 45 микробных маркеров в исследуемых группах из 66 имеют статистически значимые отличия ($p < 0,05$).

Для расчета уникального соотношения концентраций микробных маркеров характерных для сахарного диабета 2 типа по относительным концентрациям микробных маркеров в крови с помощью прикладных программ Statistica 10.0 проведен линейный дискриминантный канонический анализ, анализ

сопряженности с прямой пошаговой процедурой включения показателей концентраций микробных маркерных веществ в крови.

При проведении линейного дискриминантного анализа были исключены все показатели концентраций в крови, кроме: 3h14, 10Me16, i19, i17:1d9, Cholestendiol, 16:1d9t, 2h24.

На основе включенных компонентов концентраций микробных маркеров в крови была рассчитана математическая модель с условным названием СД2.

Значение Лямбда Уилкса составило 0,59036, $p < 0,0001$, что свидетельствует о хорошей дискриминации изучаемых признаков (Таблица 4).

Таблица 4 - Характеристика показателей, включенных в модель, при проведении линейного дискриминантного анализа

Относительные концентрации ММ	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	F-критерий включения	p (<0,05)
3h14	0,655572	0,900532	17,12051	0,000057
10Me16	0,619658	0,952725	7,69125	0,00623
i19	0,658335	0,896751	17,84612	0,000041
i17:1d9	0,605807	0,974507	4,05471	0,045779
Cholestendiol	0,607184	0,972298	4,4162	0,037217
16:1d9t	0,617513	0,956034	7,12806	0,008398
2h24	0,6096	0,968443	5,05068	0,026028

В таблице 4 показано, что наименьшее значение частной лямбды Уилкса отмечается для изононадекановой (i19) кислоты (0,896751), что указывает на наибольший вклад этого показателя в дискриминацию исследуемых групп.

Для оценки качества математической модели проанализируем значения правильно классифицированных объектов в группах (Таблица 5).

Таблица 5 - Матрица классификации. Процент правильной классификации в каждой из групп.

Группы	Правильно классифицированы	Основная группа	Группа сравнения
Основная	78,95	45	12
Сравнения	89,62	11	95
Всего	85,89	56	107

Из данных, представленных в таблице 5 видно, что 85,89% случаев имеют правильную классификацию. В основной группе 78,95% объектов

классифицированы корректно. В группе сравнения корректность классификации составляет 89,62%.

Таким образом, можно рассчитать значения специфичности, чувствительности и прогностической точности математической модели (Таблица 6).

Таблица 6 - Оценка прогностической точности математической модели СД2

Показатель	Полученные результаты, %
Специфичность предложенного метода	80,35
Чувствительность предложенного метода	88,78
Точность (эффективность диагностики) предложенного метода	85,89

Математическая модель СД2 имеет 85,89% прогностической точности (Таблица 6), при 80,35% специфичности и 88,78% чувствительности, что является высокими прогностическими показателями.

Рассчитанная математическая модель может классифицировать объекты с помощью решающих правил, которые классифицируют объекты по значениям диагностических коэффициентов. Диагностические коэффициенты рассчитываются на основании классификационных уравнений. Значения относительных концентраций, соответствующих микробных маркеров в крови подставляются в уравнения, приведенные ниже. Полученные значения функций сравниваются. Функция, значение которой будет максимально, указывает на принадлежность объекта к соответствующей группе (Таблица 7).

Таблица 7 – Коэффициенты классификационных уравнений модели СД2

Относительные концентрации ММ	Основная группа	Группа сравнения
3h14	18,45319	50,27408
10Me16	4,31408	7,99243
i19	0,08892	-0,09055
i17:1d9	0,78395	17,94938
Cholestendiol	-0,02671	0,13923
16:1d9t	1,77337	0,77123
2h24	0,25028	1,02427
Константа	-3,48501	-4,59125

В соответствии с коэффициентами уравнений, представленными в таблице 7, составлены классификационные уравнения:

$$F_{OG} = 18,45319 * 3h14 + 4,31408 * 10Me16 + 0,08892 * i19 + 0,78395 * i17:1d9 - 0,02671 * Cholestendiol + 1,77337 * 16:1d9t + 0,25028 * 2h24 - 3,48501$$

$$F_{GC} = 50,27408 * 3h14 + 7,99243 * 10Me16 -$$

$$0,09055 * i19 + 17,94938 * i17:1d9 + 0,13923 * Cholestendiol + 0,77123 * 16:1d9t + 1,02427 * 2h24 - 4,59125, \text{ где}$$

F_{OG} – классификационная функция, при максимальном значении которой, состояние микробиома пациента соответствует специфическому соотношению концентраций молекулярных маркеров при сахарном диабете 2 типа;

F_{GC} - классификационная функция, при максимальном значении которой, состояние микробиома пациента соответствует отсутствию специфического соотношения концентраций молекулярных маркеров при сахарном диабете 2 типа;

$3h14$ – концентрация 3-гидроксимиристиновой кислоты в крови, нмоль/мл;

$10Me16$ – концентрация 10-метил-гексадекановой кислоты в крови, нмоль/мл;

$i19$ – концентрация изононадекановой кислоты в крови, нмоль/мл;

$i17:1d9$ – концентрация 9-изогептатадеценной кислоты в крови, нмоль/мл;

Cholestendiol – концентрация холестендиола в крови, нмоль/мл;

$16:1d9t$ – концентрация транс-9-гексадеценной кислоты в крови, нмоль/мл;

$2h24$ – концентрация 2-гидрокситетракозановой кислоты в крови, нмоль/мл.

Для расчета степени изменений состояния микробиома необходимо использовать дискриминантные функции. В случае дискриминации 2 групп используется 1 дискриминантная функция, которая представляет собой линейное уравнение, позволяющее рассчитать координату точки в зависимости от концентраций малых молекул микробного происхождения.

Дискриминантная функция для исследуемых групп представлена уравнением:

$$\text{Root} = -18,3297 * 3h14 - 2,1188 * 10Me16 + 0,1034 * i19 - 9,8878 * i17:1d9 - 0,0956 * Cholestendiol + 0,5773 * 16:1d9t - 0,4458 * 2h24 + 1,2555,$$

где

Root – дискриминантная функция, определяющая координаты объекта в дискриминантном пространстве;

3h14 – концентрация 3-гидроксимиристиновой кислоты в крови, нмоль/мл;

10Me16 – концентрация 10-метил-гексадекановой кислоты в крови, нмоль/мл;

i19 – концентрация изононадекановой кислоты в крови, нмоль/мл;

i17:1d9 – концентрация 9-изогептатадеценной кислоты в крови, нмоль/мл;

Cholestendiol – концентрация холестендиола в крови, нмоль/мл;

16:1d9t – концентрация транс-9-гексадеценной кислоты в крови, нмоль/мл;

2h24 – концентрация 2-гидрокситетракозановой кислоты в крови, нмоль/мл.

Таблица 8 – Значения координат центроидов исследуемых групп в дискриминантном пространстве

Названия групп	Значения координат центроидов дискриминантной функции D
Основная группа	-0,607077
Группа сравнения	1,128949

По данным, представленным в таблице 8, рассчитаем квадрат расстояний Махалобиса (геометрическое расстояние между точками в n-мерном пространстве) и определим достоверность различий между группами.

Таблица 9 – Квадрат расстояния Махалобиса исследуемых групп в дискриминантном пространстве

Показатель	Значение
Квадрат расстояния Махалобиса между группами	3,013786
Достоверность различий между группами, p	$3,46 \cdot 10^{-15}$

Из данных представленный в таблице 9 видно, что между группами есть статистически значимые различия.

Для расчета степени микробиологических нарушений используем коэффициент уникальности.

Таким образом, методом математического моделирования были определены значимые МММП, которые могут являться предиктивными критериями развития СД 2 типа в возрастной группе 45-90 лет.

2.2.2. Модель предиктивной диагностики сочетанной дислипидемии по концентрациям малых молекул микробного происхождения в крови

Для определения состояния микробиома пациентов специфического для дислипидемии методом линейного дискриминантного анализа провели группировку показателей концентраций молекулярных маркеров микробного происхождения в крови по клинко-анамнестическому обследованию пациентов врачом-эндокринологом и терапевтом. Проведено наблюдательное исследование образцов крови у пациентов амбулаторного наблюдения института геронтологии: 97 пациентов в возрасте от 45 до 90 лет. В исследование включены образцы крови, собранные у пациентов, обратившихся в консультационно-диагностический центр вышеназванного учреждения в течение 2011-2018 годов. Гендерные различия не учитывались.

Критерием отнесения в основную группу считалось наличия дислипидемии (57 человек). Группа сравнения была сформирована из пациентов, обратившихся в консультационно-диагностический центр, вышеназванного учреждения не имеющих в анамнезе диагноза дислипидемия (40 чел.).

Статистическое исследование параметров функциональной активности микробиома кишечника в исследуемых группах представлены в таблице 10. Средние значения показателей в таблице рассчитаны как медианы, в скобках указан интерквартильный разброс. Использование медиан, интерквартильного разброса и непараметрических методов оценки статистической значимости обусловлено отсутствием нормального распределения. Для расчета статистически-значимых различий использовали U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 10 – Относительные концентрации молекулярных маркеров в крови в исследуемых группах

Наименование	Концентрация в крови МММП, наномоль/г		Статистическая значимость, p<0,05
	Основная группа	Группа сравнения	
Изопальмитиновый альдегид	1,24 (1,9 - 0,89)	0,68 (1,04 - 0,58)	p<0,01
11-октадеценовый альдегид	5,91 (13,17 - 3,49)	3,79 (8,23 - 2)	0,113

Наименование	Концентрация в крови МММП, наномоль/г		Статистическая значимость, $p < 0,05$
	Основная группа	Группа сравнения	
9-октадеценый альдегид	18,7 (39,2 - 11,34)	10,83 (24,28 - 6,79)	0,041
Изогептадекановый альдегид	1,87 (3,34 - 1,24)	1,18 (1,88 - 0,83)	0,011
Изопентадекановый альдегид	0,28 (0,49 - 0,17)	0,12 (0,28 - 0,11)	$p < 0,01$
Тетрадекановый альдегид	0,63 (1,21 - 0,41)	0,26 (0,47 - 0,2)	$p < 0,01$
Антеизопентадекановый альдегид	0,53 (1 - 0,35)	0,24 (0,46 - 0,2)	$p < 0,01$
Изомиристиновый альдегид	0,45 (0,78 - 0,32)	0,25 (0,42 - 0,2)	$p < 0,01$
3-Гидроксилауриновая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,697
2-Гидроксилауриновая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	-
3-Гидроксиизотридекановая	0,03 (0,05 - 0,02)	0,02 (0,04 - 0,01)	$p < 0,01$
3-Гидрокситридекановая	0,03 (0,04 - 0,02)	0,02 (0,03 - 0,01)	$p < 0,01$
3-Гидроксимиристиновая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,358
2-Гидроксимиристиновая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,016
2-Гидроксиизопентадекановая	0,29 (0,39 - 0,19)	0,21 (0,33 - 0,13)	0,011
3-Гидроксиизопентадекановая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,372
3-Гидроксипальмитиновая	0,06 (0,09 - 0,03)	0,02 (0,05 - 0,01)	$p < 0,01$
3-Гидроксиизогептадекановая	0,1 (0,13 - 0,07)	0,05 (0,07 - 0,04)	$p < 0,01$
3-Гидроксистеариновая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	-
10-Гидроксистеариновая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	-
3-Гидроксипентадекановая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,697
3-Гидроксиизоэйкозановая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	-
3-Гидроксиэйкозановая	0,78 (1,18 - 0,43)	0,31 (0,5 - 0,23)	$p < 0,01$
2-Гидроксидокзановая	0,03 (0,05 - 0,02)	0,02 (0,03 - 0,01)	$p < 0,01$
2-Гидрокситетракозановая	0,01 (0,02 - 0,01)	0,01 (0,02 - 0,01)	0,057
2-Гидроксигексакозановая	0,01 (0,01 - 0,01)	0 (0,01 - 0)	0,01
Декановая кислота	0,66 (0,88 - 0,42)	0,46 (0,62 - 0,31)	$p < 0,01$
Антеизотридекановая	0,03 (0,04 - 0,03)	0,02 (0,04 - 0,01)	0,017
Изолауриновая	0,02 (0,03 - 0,01)	0,01 (0,02 - 0,01)	0,038
Изопентадекановая	1,02 (1,35 - 0,7)	0,51 (0,77 - 0,42)	$p < 0,01$
Антеизопентадекановая	1,16 (1,64 - 0,79)	0,62 (0,9 - 0,46)	$p < 0,01$
10-Метилпентадекановая	0,11 (0,16 - 0,08)	0,07 (0,11 - 0,03)	$p < 0,01$
Изопальмитиновая	3,87 (5,26 - 2,7)	2,15 (3,48 - 1,81)	$p < 0,01$
Гептадекановая	37,36 (51,16 - 28,73)	21,82 (34,94 - 16,81)	$p < 0,01$
10-Метилгексадекановая	0,37 (0,46 - 0,23)	0,17 (0,3 - 0,15)	$p < 0,01$
Изононадекановая	3,54 (9,6 - 0,4)	6,04 (10,2 - 4,38)	0,034
Антеизогептадекановая	5,61 (7,3 - 3,67)	3,25 (4,85 - 2,52)	$p < 0,01$

Наименование	Концентрация в крови МММП, наномоль/г		Статистическая значимость, $p < 0,05$
	Основная группа	Группа сравнения	
Циклогептадекановая	0,02 (0,03 - 0,01)	0,01 (0,02 - 0)	0,147
Лауриновая	4,08 (5,7 - 2,74)	2,67 (3,75 - 1,81)	$p < 0,01$
Изооктадекановая	0,09 (0,11 - 0,06)	0,05 (0,07 - 0,04)	$p < 0,01$
10-Метилгептадекановая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	-
Антеизононадекановая	0,81 (1,04 - 0,58)	0,43 (0,68 - 0,34)	$p < 0,01$
Циклононадекановая	0,04 (0,07 - 0,03)	0,04 (0,05 - 0,03)	0,174
11-Эйкозеновая	0,93 (1,55 - 0,68)	0,99 (1,47 - 0,63)	0,373
транс-9-гексадеценовая	0,85 (1,22 - 0,59)	0,91 (1,46 - 0,71)	0,568
10-Метилоктатадекановая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	-
Эйкозеновая	5,38 (7,93 - 4,02)	4,35 (6,83 - 2,68)	0,028
Изомиристиновая	0,28 (0,34 - 0,19)	0,14 (0,22 - 0,1)	$p < 0,01$
9-Тетрадеценовая	0,06 (0,08 - 0,04)	0,03 (0,05 - 0,02)	$p < 0,01$
11-Тетрадеценовая	0,49 (0,8 - 0,3)	0,28 (0,39 - 0,16)	$p < 0,01$
9-Пентадеценовая	0,05 (0,07 - 0,03)	0,02 (0,04 - 0,01)	$p < 0,01$
9-Изогексадеценовая	0,07 (0,09 - 0,04)	0,03 (0,05 - 0,01)	$p < 0,01$
7-гексадеценовая	4,22 (6,07 - 2,87)	2,07 (3,63 - 1,7)	$p < 0,01$
Цис-вакценовая	40,98 (55,49 - 30,55)	37,76 (50,02 - 27,87)	0,333
9-Изогептадеценовая	0,02 (0,03 - 0,01)	0,02 (0,02 - 0,01)	0,012
9-Гептадеценовая	0,44 (0,69 - 0,31)	0,26 (0,44 - 0,21)	$p < 0,01$
11-Гексадеценовая	0,6 (0,81 - 0,43)	0,48 (0,76 - 0,3)	0,096
7-Тетрадеценовая	0,05 (0,07 - 0,03)	0,03 (0,05 - 0,02)	0,013
Антеизогептадеценовая	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	-
Копростанол	0,03 (0,05 - 0,02)	0,02 (0,02 - 0,01)	$p < 0,01$
Холестендиол	0,76 (1,67 - 0,39)	0,4 (0,61 - 0,18)	$p < 0,01$
Кампестерол	0,2 (0,36 - 0,13)	0,11 (0,16 - 0,07)	$p < 0,01$
β -Ситостерол	0,15 (0,24 - 0,08)	0,06 (0,14 - 0,04)	$p < 0,01$
Ергостерол	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,697
Холестерол	15,35 (20,23 - 10,81)	11,64 (14,12 - 8,38)	0,042
Холестадиенон	0,67 (1,46 - 0,31)	0,3 (1,08 - 0,07)	0,03

Примечание. Полужирным шрифтом отмечены статистически значимые показатели, U-критерий Манн-Уитни ($p < 0,05$).

В таблице 10 показано, что значения 46 концентраций для микробных маркеров из 64 в исследуемых группах имеют статистически значимые отличия ($p < 0,05$).

Для расчета уникального соотношения концентраций малых молекул микробного происхождения характерных для дислипидемии по относительным концентрациям микробных маркерных веществ в крови с помощью прикладных программ Statistica 10.0 проведен линейный дискриминантный канонический анализ, анализ сопряженности с прямой пошаговой процедурой включения показателей концентраций микробных маркерных веществ в крови.

При проведении линейного дискриминантного анализа пошагово были исключены все показатели концентраций малых молекул, кроме: 9-изогептадеценовой кислоты (17:1d9); 11-эйкозеновой кислоты (20:1d11); изомиристинового альдегида (i14a) в крови, потому что данные маркеры вносят наибольший вклад в патологию ДЛП.

На основе включенных компонентов концентраций микробных маркеров в крови была рассчитана математическая модель с условным названием СЧДЛ.

Значение Лямбда Уилкса составило 0,7148, $p < 0,0001$, что свидетельствует о хорошей дискриминации изучаемых признаков (Таблица 10).

Таблица 11 – Характеристика показателей, включенных в модель, при проведении линейного дискриминантного анализа

Относительные концентрации ММ	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	F-критерий включения	p (<0,05)
<i>17:1d9</i>	<i>0,919015</i>	<i>0,777807</i>	<i>26,567</i>	<i>0,000001</i>
20:1d11	0,770191	0,928102	7,20455	0,008609
i14a	0,787692	0,907482	9,48142	0,002729

В таблице 11 показано, что наименьшее значение частной лямбды Уилкса отмечается для 9-изогептадеценовой кислоты (17:1d9) (0,777807), что указывает на наибольший вклад этого показателя в дискриминацию исследуемых групп.

Для оценки качества математической модели проанализируем значения правильно классифицированных объектов в группах (Таблица 12).

Таблица 12 – Матрица классификации. Процент правильной классификации в каждой из групп.

Группы	Правильно классифицированы	Основная группа	Группа сравнения
Основная	78,95	12	45
Сравнения	70	28	12
Всего	75,26	40	57

Из данных, представленных в таблице 12 видно, что 75,26% случаев имеют правильную классификацию. В основной группе 78,95% объектов классифицированы корректно. В группе сравнения корректность классификации составляет 70,0%.

Таким образом, можно рассчитать значения специфичности, чувствительности и прогностической точности математической модели (Таблица 13).

Таблица 13 – Оценка прогностической точности математической модели СЧДЛ

Показатель	Полученные результаты, %
Специфичность предложенного метода	70,0
Чувствительность предложенного метода	78,95
Точность (эффективность диагностики) предложенного метода	78,94

Математическая модель СЧДЛ имеет 75,26% прогностической точности (Таблица 13), при 78,94% специфичности и 78,95% чувствительности, что является высокими прогностическими показателями.

Рассчитанная математическая модель может классифицировать объекты с помощью решающих правил, которые классифицируют объекты по значениям диагностических коэффициентов. Диагностические коэффициенты рассчитываются на основании классификационных уравнений. Значения относительных концентраций, соответствующих микробных маркеров в крови подставляются в уравнения, приведенные ниже. Полученные значения функций сравниваются. Функция, значение которой будет максимально, указывает на принадлежность объекта к соответствующей группе (Таблица 14).

Таблица 14 – Коэффициенты классификационных уравнений модели СЧДЛ

Относительные концентрации ММ	Основная группа	Группа сравнения
17:1d9	8,35295	3,11004
20:1d11	-0,26162	0,52985
i14a	1,5673	0,69688
Константа	-3,6892	-1,97188

В соответствии с коэффициентами уравнений, представленными в таблице 13, составлены классификационные уравнения:

$$F_{OG} = 8,35295 * 17:1d9 - 0,26162 * 20:1d11 + 1,5673 * i14 - 3,6892$$

$$F_{TC} = 3,11004 * 17:1d9 + 0,52985 * 20:1d11 + 0,69688 * i14 - 1,97188,$$

где

F_{OG} – классификационная функция, при максимальном значении которой, состояние микробиома пациента соответствует специфическому соотношению концентраций молекулярных маркеров при сочетанной дислипидемии;

F_{TC} – классификационная функция, при максимальном значении которой, состояние микробиома пациента соответствует отсутствию специфического соотношения концентраций молекулярных маркеров при сочетанной дислипидемии;

17:1d9 – концентрация 9-изогептадеценовой кислоты в крови, нмоль/мл;

20:1d11 – концентрация 11-эйкозеновой кислоты в крови, нмоль/мл;

i14 – концентрация изомиристинового альдегида в крови, нмоль/мл.

Кроме классификации дискриминантный анализ можно применить для оценки степени состояния микробиома человека по глубине изменений соотношений относительных концентраций молекулярных маркеров микробного происхождения в крови. Для расчета степени изменений состояния микробиома определим удаленность точек исследуемых объектов в системе координат дискриминантной функции от координат центроидов (аналогов средних значений) основной группы и группы сравнения (Таблица 15).

Дискриминантная функция для исследуемых групп представлена уравнением:

$$D = -4,12882 * 17:1d9 + 0,62329 * 20:1d11 - 0,68546 * i14 + 1,74258,$$

где

D – дискриминантная функция, определяющая координаты объекта в дискриминантном пространстве;

17:1d9 – концентрация 9-изогептадеценовой кислоты в крови, нмоль/мл;

20:1d11 – концентрация 11-эйкозеновой кислоты в крови, нмоль/мл;

i14 – концентрация изомиристинового альдегида в крови, нмоль/мл.

Таблица 15 – Значения координат центроидов исследуемых групп в дискриминантном пространстве

Названия групп	Значения координат центроидов дискриминантной функции D
Основная группа	-0,52364
Группа сравнения	0,74619

По данным, представленным в таблице 15, рассчитаем квадрат расстояний Махаланобиса (геометрическое расстояние между точками в n-мерном пространстве) и определим достоверность различий между группами.

Таблица 16 – Квадрат расстояния Махаланобиса исследуемых групп в дискриминантном пространстве

Показатель	Значение
Квадрат расстояния Махаланобиса между группами	1,612472
Достоверность различий между группами, p	0,000001

Из данных представленный в таблице 16 видно, что между группами есть статистически значимые различия.

Для расчета степени дислипидемии используем коэффициент уникальности.

Таким образом, найденные решающие правила – классификационные уравнения линейного дискриминантного анализа математической модели СЧДЛ. Можно считать критериями предиктивной диагностики развития ДЛП в возрастной группе 45-90 лет.

2.3. Изучение методом математического моделирования концентраций малых молекул микробного происхождения в крови при разных типах ДЛП

Пациенты с дислипидемией были разделены на 3 группы ГХС, ГТГ и СЧДЛ в соответствии с классификацией Фредриксона [87]. Пациенты без ДЛП были определены в группу норма. По результатам газового хроматографического - масс-спектрометрического анализа крови были получены концентрации малых молекул микробного происхождения. Пациенты с дислипидемиями составили

группы: «ГХС» - пациенты с гиперхолитериномией - 33 человека (20,2%), «ГТГ» - пациенты с триглицериномией - 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%).

Для расчета уникального соотношения концентраций малых молекул микробного происхождения характерных для разных вариантов дислипидемии по относительным концентрациям микробных маркерных веществ в крови с помощью прикладных программ Statistica 10.0 проведен линейный дискриминантный канонический анализ, анализ сопряженности с прямой пошаговой процедурой включения показателей концентраций микробных маркерных веществ в крови.

При проведении линейного дискриминантного анализа пошагово были исключены все показатели концентраций малых молекул кроме: i16:1d9, 16:1d7, 10h18, изомиристинового альдегида (i14a) в крови, т.к. они вносят наибольший вклад в развитие нарушений липидного обмена в возрастной группе 45-90 лет.

На основе включенных компонентов концентраций микробных маркеров в крови была рассчитана математическая модель с условным названием ДЛП.

Значение Лямбда Уилкса составило 0,66287, $p < 0,0001$, что свидетельствует о хорошей дискриминации изучаемых признаков (Таблица 17).

Таблица 17 – Характеристика показателей, включенных в модель, при проведении линейного дискриминантного анализа

Относительные концентрации ММ	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	F-критерий включения	p (<0,05)
i16:1d9	0,70866	0,935391	3,56872	0,015556
16:1d7	0,805754	0,822675	11,1366	0,000001
10h18	0,702979	0,942949	3,12595	0,027558
i14a	0,704088	0,941465	3,21236	0,024651

В таблице 17 показано, что наименьшее значение частной лямбды Уилкса отмечается для (16:1d7) (0,822675), что указывает на наибольший вклад этого показателя в дискриминацию исследуемых групп.

Для оценки качества математической модели проанализируем значения правильно классифицированных объектов в группах (Таблица 18).

Таблица 18 – Матрица классификации. Процент правильной классификации в каждой из групп

Группы	Правильно классифицированы	Группа сравнения	ГХС	СЧДЛ	ГТГ
Н	50	20	7	12	1
ГХС	15,78947	23	6	7	2
СЧДЛ	70,17544	11	4	40	2
ГТГ	18,51852	9	4	9	5
Всего	43,82716	63	21	68	10

Из данных, представленных в таблице 18 видно, что 43,8% случаев имеют правильную классификацию. В группе сравнения 50% объектов классифицированы корректно. В группах ГХС корректность классификации составляет – 15,8, СЧДЛ – 70,2%, ГТГ – 18,5%.

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

$$\text{Root 1} = 10,05256 \cdot i_{16:1d9} - 0,41187 \cdot 16:1d7 - 3,77953 \cdot 10h_{18} - 0,44943 \cdot i_{14a} + 1,9628$$

$$\text{Root 2} = 17,5639 \cdot i_{16:1d9} + 0,13483 \cdot 16:1d7 - 2,73574 \cdot 10h_{18} - 0,73326 \cdot i_{14a} - 0,98308$$

$$\text{Root 3} = -16,2887 \cdot i_{16:1d9} + 0,1661 \cdot 16:1d7 + 2,0512 \cdot 10h_{18} - 1,0007 \cdot i_{14a} + 0,8207$$

где

Root1, Root2, Root3, – дискриминантные функции, определяющие координаты объекта в дискриминантном пространстве;

$i_{16:1d9}$ – концентрация 9-изогексадеценовой кислоты в крови, нмоль/мл;

$16:1d7$ – концентрация 7-гексадеценовой кислоты в крови, нмоль/мл;

$10h_{18}$ – концентрация 10-гидроксистеариновой кислоты в крови, нмоль/мл;

i_{14} – концентрация изомиристинового альдегида в крови, нмоль/мл.

Координаты центроидов исследуемых групп представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Значения координат центроидов исследуемых групп в дискриминантном пространстве математической модели ДЛП

Обозначение групп	Значения координат центроидов дискриминантной функции		
	Root1	Root2	Root3
Н	0,610923	-0,095938	0,101401
ГХС	0,608499	-0,069323	-0,108336
СЧДЛ	-0,729453	-0,185858	-0,001402
ГТГ	-0,22152	0,632063	0,005209

По данным, представленным в таблице 19 рассчитали квадрат расстояний Махалобиса (геометрическое расстояние между точками в n-мерном пространстве) и определим достоверность различий между группами.

Таблица 20 – Квадрат расстояния Махалобиса исследуемых групп в дискриминантном пространстве

	Н	ГХС	СЧДЛ	ГТГ
Н	0	0,044704	<i>1,815263</i>	<i>1,232199</i>
ГХС	0,044704	0	<i>1,815132</i>	<i>1,193765</i>
СЧДЛ	<i>1,815263</i>	<i>1,815132</i>	0	<i>0,927035</i>
ГТГ	<i>1,232199</i>	<i>1,193765</i>	<i>0,927035</i>	0

Примечание. Полужирным курсивом выделены значения, имеющие статистическую значимость ($p < 0,05$)

Представим расположение центроидов на 3d графике.

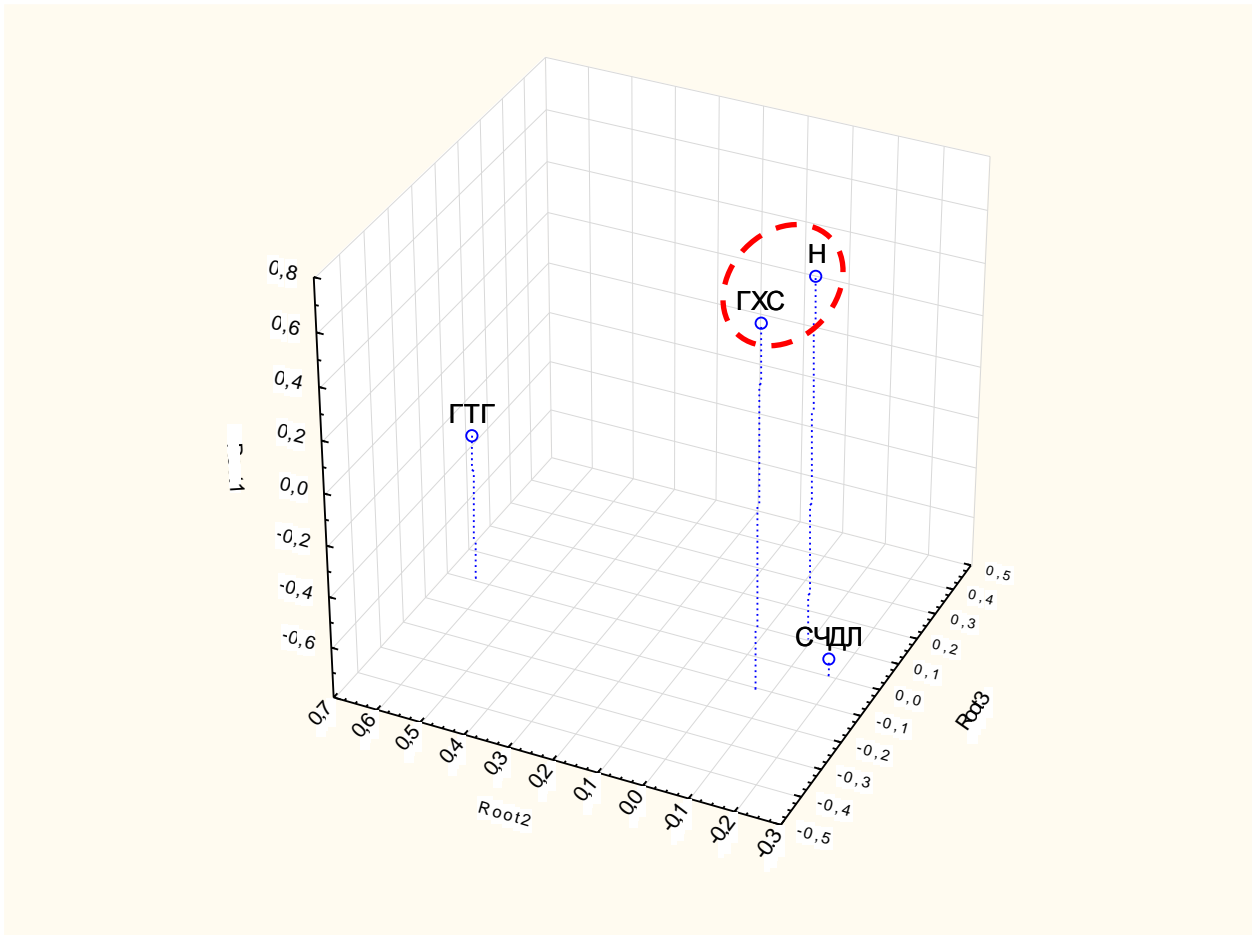


Рисунок 3 – Расположение центроидов для исследуемых групп с различными видами дислипидемии в дискриминантном пространстве.

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

На рисунке 3 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 группы норма. Группа ГТГ находится дальше всех от нормы, что указывает на максимальные изменения соотношений концентраций малых молекул 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.

Известно, что состояние ГХС возникает при снижении синтеза желчных кислот с возрастом и половой дисфункции. При этом с возрастом так же происходит атеросклероз сосудов [38]. Атеросклероз - это хронический воспалительный процесс сопровождающийся изменениями сосудистой стенки

средних и крупных артерий, характеризующееся локальным накоплением холестерина и сосудистым воспалением [170]. Первоначальный пусковой механизм атерогенеза, по-видимому, является результатом гемодинамического стресса, то есть турбулентного кровотока, который вызывает активацию эндотелиальных клеток в областях, подверженных атеросклерозу (артериальные бифуркации), при этом гиперхолестеринемия (ГХС), т.е. повышенное содержание общего холестерина в крови является компенсаторной функцией данного состояния.

Накопление холестерина в интиме при ГХС может быть реакцией на атерогенез сосудистой стенки [142]. 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 [129]. По этой причине изменение 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 с дисфункцией жировой ткани. Для гипертриглицеридемии характерно сочетание неблагоприятных факторов (курение, нерациональное питание, алкоголизм и старение населения) которое приводит к необратимому нарушению липидного обмена, выражающегося в увеличении уровня триглицеридов в крови. Функциональная активность микробиома статистически значимо изменяется, что мы наблюдаем на рисунке 3.

Сочетанная дислипидемия (СЧДЛ) является самой тяжелой формой дислипидемии. Она вызвана накоплением в крови 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.

2.4. Заключение по 2 главе

Таким образом применение микробиом-ассоциированной экспосомики для оценки разных типов нарушений липидного обмена позволяет адекватно определить глубину и направленность изменений соотношений концентраций микробных маркеров, указывающих влияния типа дислипидемии на степень нарушения взаимодействия микробиома и макроорганизма.

ГЛАВА 3. Интегральная оценка состояния микробиома по содержанию микробных маркеров в крови

3.1. Оценка особенностей структуры микробиома у лиц пожилого возраста при различных вариантах нарушения липидного и углеводного обмена

По результатам газового хроматографического - масс-спектрометрического анализа крови были получены концентрации микробных маркеров в крови. Все полученные химические соединения были ассоциированы с маркерами микроорганизмов разделенных на 4 основных фило типа, характеризующих состояние микробиома человека и царство *Fungi*.

Микробные маркеры которые относятся к соответствующим фило типам:

Actinobacterium:

- Изооктадекановая,(i18),
- Изогептадекановый альдегид,(i17a),
- Тетрадекановый альдегид,(14a),
- Изомиристиновый альдегид,(i14a),
- Изопентадекановая,(i15),
- 10-Метилпентадекановая,(10Me15),
- Изопальмитиновая,(i16),
- 10-Метилгексадекановая,(10Me16),
- Антеизогептадекановая,(a17),
- 10-Метилгептадекановая,(10Me17),
- транс-9-гексадеценная,(16:1d9t),
- 10-Метилоктатадекановая,(10Me18),
- Изомиристиновая,(i14),
- 11-Тетрадеценная,(14:1d11)

Bacteroides

- 3-Гидрокситридекановая,(3h13),
- 2-Гидроксиизопентадекановая,(2hi15),

- 3-Гидроксипальмитиновая,(3h16),
- 3-Гидроксиизогептадекановая,(3hi17),
- 3-Гидроксипентадекановая,(3h15),

Furmikuts

- Изопальмитиновый альдегид,(i16a),
- 11-октадеценовый альдегид,(18:1d11a),
- 9-октадеценовый альдегид,(18:1d9a),
- Изопентадекановый альдегид,(i15a),
- Антеизопентадекановый альдегид,(a15a),
- 10-Гидроксистеариновая,(10h18),
- Антеизотридекановая,(a13),
- Изолауриновая,(i12),
- Антеизопентадекановая,(a15),
- Антеизононадекановая,(a19),
- Циклононадекановая,(19сус),
- 11-Эйкозеновая,(20:1d11),
- 9-Тетрадеценовая,(14:1d9),
- 9-Пентадеценовая,(15:1d9),
- 7-гексадеценовая,(16:1d7),
- Цис-вакценовая,(18:1d11),
- 11-Гексадеценовая,(16:1d11),
- 7-Тетрадеценовая,(14:1d7),
- Копростанол,(Coprostanol)

Proteobacterium

- 3-Гидроксилауриновая,(3h12),
- 2-Гидроксилауриновая,(2h12),
- 3-Гидроксиизотридекановая,(3hi13),
- 3-Гидроксимиристиновая,(3h14),
- 2-Гидроксимиристиновая,(2h14),

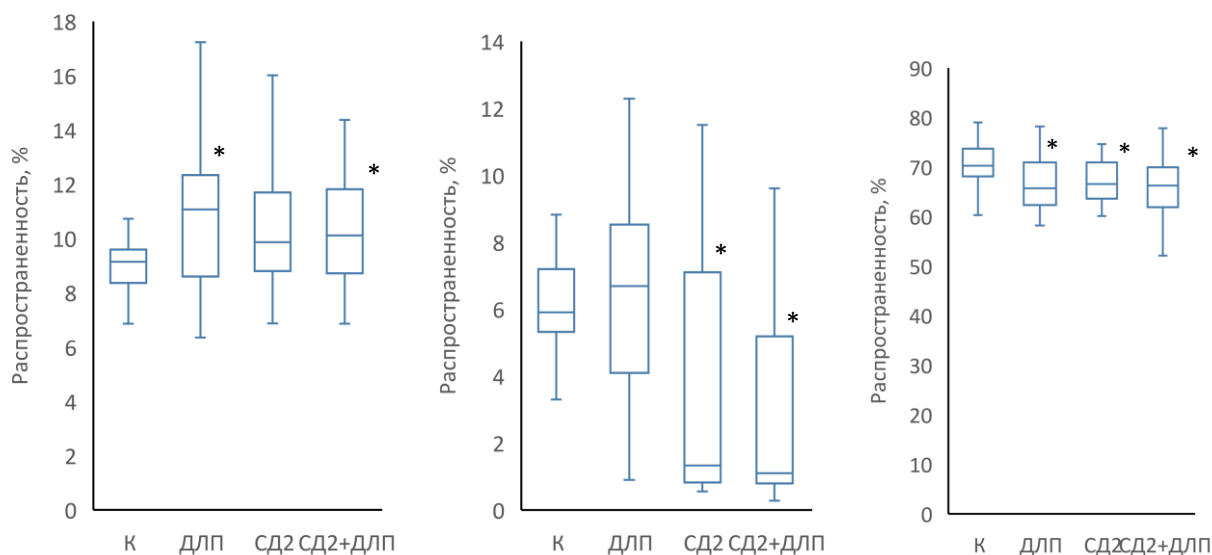
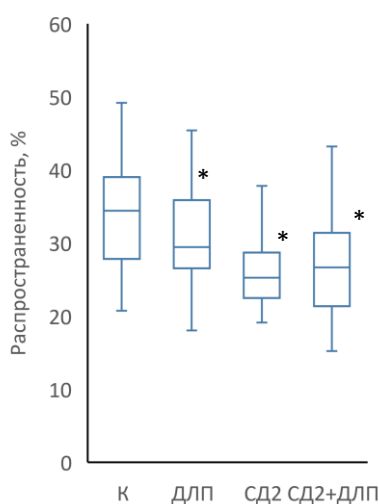
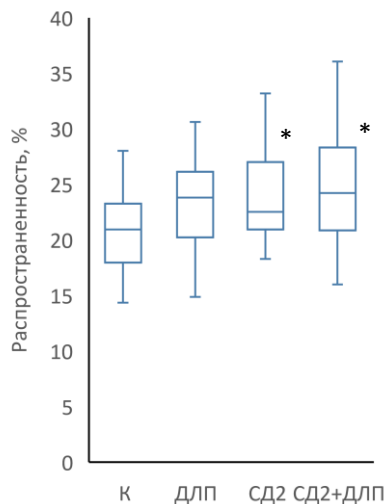
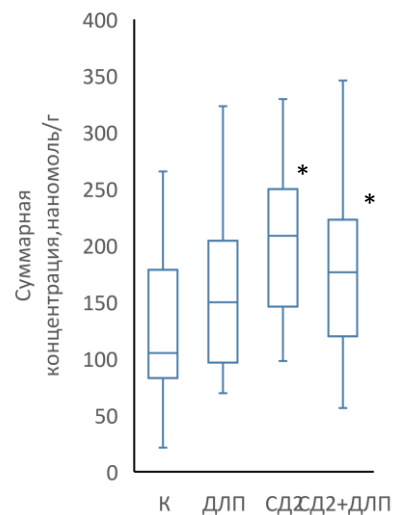
- 3-Гидроксиизопентадекановая,(3hi15),
- 3-Гидроксистеариновая,(3h18),
- 3-Гидроксиизоэйкозановая,(3hi20),
- Циклогептадекановая,(17сус),
- 9-Изогептадеценная,(i17:1d9),
- 9-Изогексадеценная,(i16:1d9),

Fungi

- Гептадеценная кислота,(17:1)
- 2-гидроксилигноцериновая кислота,(2h24)
- Кампестерол
- β -ситостерол
- Эргостерол

Чтобы нивелировать влияние, таких процессов, как проницаемость кишечной стенки, активность иммунной системы и прочее были взяты относительные концентрации (представленность) компонента. Представленность рассчитывается как доля присутствия каждого компонента в суммарной концентрации всех компонентов в крови. Представленность флотипов рассчитывали, как сумму всех относительных концентраций компонентов клеточной стенки соответствующего флотипа. Полученное распределение по флотипам, будет в значительной степени отличаться от аналогичных показателей, полученных секвенированием или другими способами, так как пул определяемых концентраций компонентов клеточной стенки ограничен количеством уникальных соединений. Исследование информативности такого подхода так же является одной из задач данного исследования.

Результаты средних (медианных) значений с интерквартильным разбросом в группах К – контроль, ДЛП – дислипидемия, СД2 – сахарный диабет 2 типа и СД2+ДЛП – сочетание сахарного диабета 2 типа и дислипидемии представлено на рисунке 4:

а) *Actinobacteria*г) *Firmicutes*б) *Bacteroidetes*д) *Fungi*в) *Proteobacteria*

е) Суммарная концентрация микробных маркеров в крови

Рисунок 4 – Распространенность филотипов микробиома при разных вариантах сочетаний состояния углеводного и липидного обмена у лиц пожилого возраста

Примечание. *- обозначены значения показателей, имеющих статистически значимую разницу с группой К ($p < 0,05$).

На рисунке 4 показано, что микроорганизмы фило типа *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.

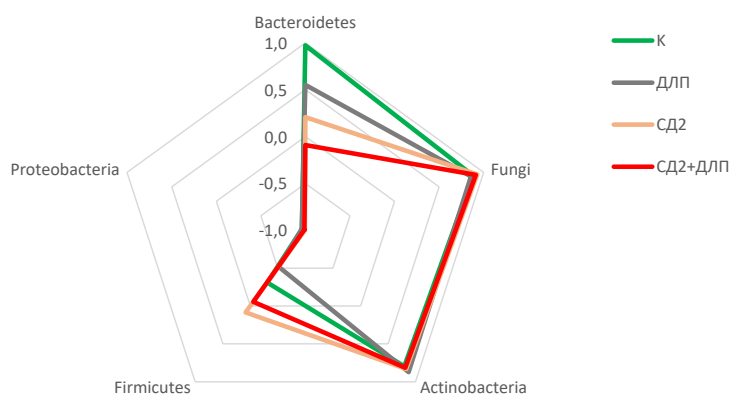


Рисунок 5 – Результаты факторного анализа представленности филотипов микробиоценоза при различных вариантах сочетаний состояния углеводного и липидного обмена

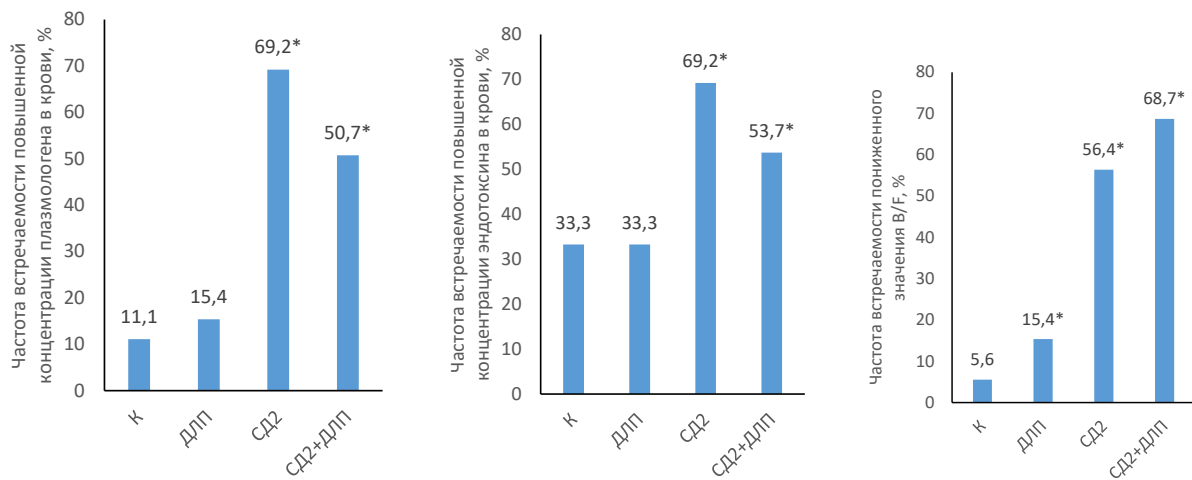
На рисунке 5 показано, что филотипы *Actinobacteria* и *Fungi* имеют высокие показатели прямой корреляции с фактором 1, а *Proteobacteria* имеют высокие показатели обратной корреляции с фактором 1 во всех исследуемых группах.

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

Коэффициент корреляции филотипа *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.

Для оценки информативности референсных значений интегральных показателей микробиом-ассоциированного экспозома проведем частотный анализ значений концентраций микробных маркеров бактериального плазмалогена и эндотоксина, а также показателя В/Ф, превышающих пороговые значения, представленные в таблице 2.



а) Плазмалогена

б) Эндотоксин

в) Соотношение В/Ф

Рисунок 6 – Частота встречаемости показателей вне нормы у пациентов с нарушением углеводного и липидного обмена

Из анализа частоты встречаемости показателей вне нормы (Рисунок 6) 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 подтверждают данные из рисунка 1а и 1б, где показано аналогичное увеличение 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 21.

Таблица 21 – Результаты корреляционного анализа концентраций биохимических показателей нарушений углеводного и липидного обмена с представленностью филоотипов микроорганизмов

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

По данным, представленным в таблице 21 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 филоотипа *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 22.

Таблица 22 – 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 22 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.

3.2. Оценка особенностей нарушения углеводного обмена методом микробиом-ассоциированной экспосомики у лиц пожилого возраста

Определение взаимосвязи между степенью деформации микробиома и уровнем глюкозы использовали корреляционный анализ Пирсона. [22]. Статистическую обработку результатов одноименных показателей в каждой группе сравнения проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2016 и Statistica 10.0.

Полученные в результате обработки данных концентраций малых молекул в крови методом дискриминантного анализа коэффициент уникальности в основной группе и группе сравнения представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Коэффициент уникальности в опытной и контрольной группе

Показатель	Значения в группах		Уровень значимости, $p < 0,05$
	СД 2, n=105	ГС, n=63	
Коэффициент уникальности, ед.	0,56 (0,51 - 0,6)	0,39 (0,34 - 0,43)	<i>p < 0,001</i>
Концентрация глюкозы в крови, ммоль/л.	7,5 (6,4 - 10,9)	5,5 (5,15 - 5,8)	<i>p < 0,001</i>

Примечания: Результат представлен в виде медианы, 25 и 75 перцентиля в скобках. Полужирным курсивом выделены статистически значимые отличия.

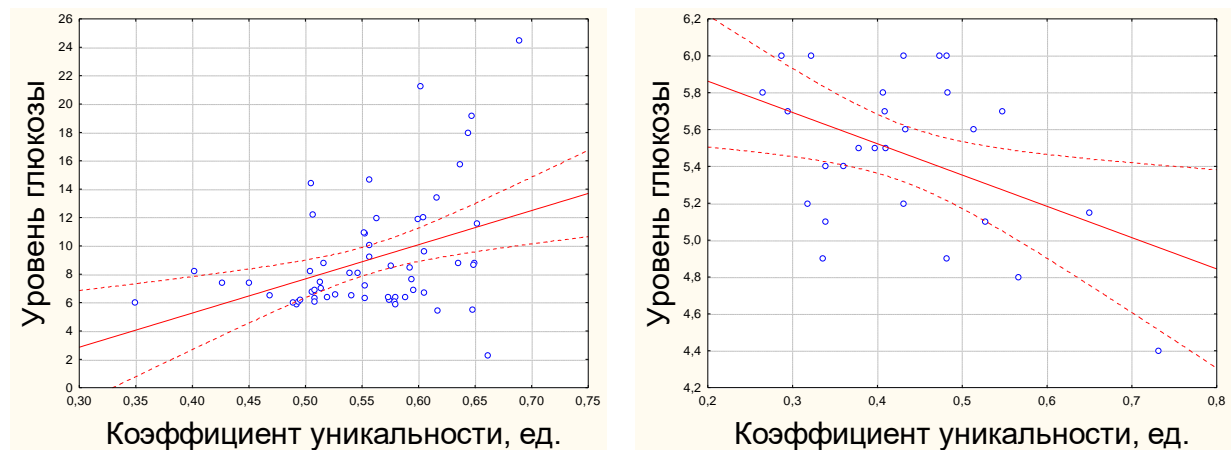
В таблице 23 показано, что коэффициент уникальности в основной группе статистически значимо выше, чем в группе сравнения. В основной группе значение коэффициента уникальности указывает на среднюю степень

согласованности, а в группе сравнения — на слабую. Уровень глюкозы в крови пациентов основной группы указывает на проявления диабета, в то время как в группе сравнения уровень глюкозы в крови пациентов также повышен, и достигает верхней границы нормы.

Для выявления зависимости между степенью деформации микробиома и уровнем глюкозы в крови был проведен корреляционный анализ в основной группе и группе сравнения. Результаты корреляционного анализа представлены в таблице 24 и на рисунке 7.

Таблица 24 – Результаты корреляционного анализа уровня глюкозы в крови и коэффициента уникальности дискриминантного анализа концентраций малых молекул в крови пациентов исследуемых групп

Параметр	Значения для	
	Основной группы	Группы сравнения
Коэффициент корреляции	<i>0,43</i>	<i>-0,57</i>
Уровень статистической значимости, $p < 0,05$	0,02	0,002



а) пациенты с сахарным диабетом 2 типа

б) пациенты группы сравнения

Рисунок 7 – Диаграмма рассеяния уровня глюкозы и коэффициента уникальности в основной группе и группе сравнения

В таблице 24 показано, что корреляция между уровнем глюкозы и коэффициентом уникальности сахарного диабета 2 типа разнонаправлена в основной группе и группе сравнения. Из графиков, представленных на рисунке 7 можно отметить, что для пациентов группы сравнения характерно повышение уровня глюкозы в крови с увеличением коэффициента уникальности. Для основной группы, в которую были включены пациенты с сахарным диабетом, увеличение коэффициента уникальности приводит к снижению уровня глюкозы.

В группе сравнения наблюдается снижение уровня глюкозы при увеличении деформации микробиома, характерной для сахарного диабета 2 типа. Рост уровня глюкозы в крови пациентов сопровождается патологические изменения в органах системы углеводного обмена с момента качественного перехода к состоянию пациента, характеризующему сахарный диабет 2 типа.

Данная особенность отмечается для лиц пожилого возраста и может быть особенностью развития сахарного диабета 2 типа только для данной возрастной группы, или общей характеристикой развития сахарного диабета 2 типа, что будет понятно, после дополнительных исследований на других возрастных группах пациентов.

Также следует учитывать особенность группы сравнения, где часть пациентов с сочетанной дислипидемией и повышенным уровнем глюкозы имеют показатели коэффициента уникальности — 0,39 ед., что соответствует слабой и умеренной степени согласованности. Таким образом, деформация микробиома, характерная для сахарного диабета 2 типа в основной группе и группе сравнения имеет не большие, хотя и статистически значимые различия.

На основании представленных данных можно утверждать, что патогенез сахарного диабета 2 типа влияет на систему углеводного обмена, таким образом, что увеличение степени тяжести заболевания приводит к снижению содержания глюкозы в крови пациентов, в то время как в группе сравнения увеличение деформации микробиома сопровождается увеличением концентрации глюкозы в крови.

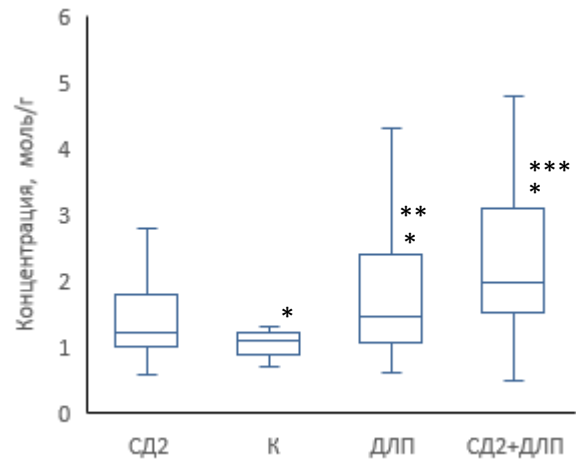
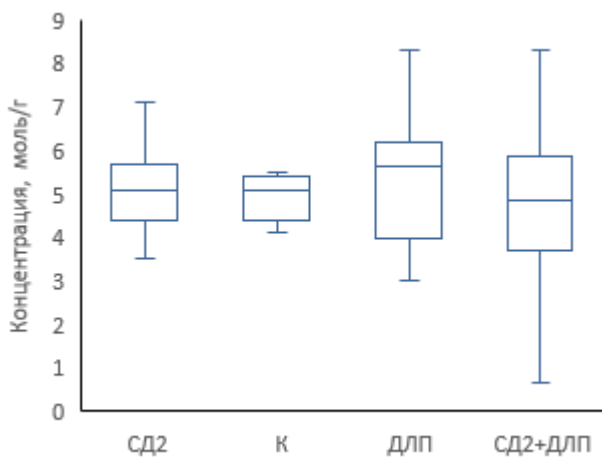
3.3. Оценка особенностей нарушения липидного обмена методом микробиом-ассоциированной экспосомики у лиц пожилого возраста

Для характеристики исследуемых групп определим концентрации основных показателей углеводного и липидного обмена, а также при их сочетании (Таблица 25, Рисунок 8).

Таблица 25 – Характеристика исследуемых групп по показателям углеводного и липидного обмена

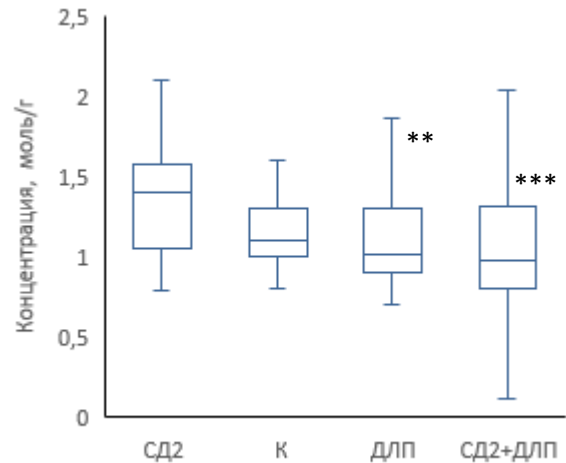
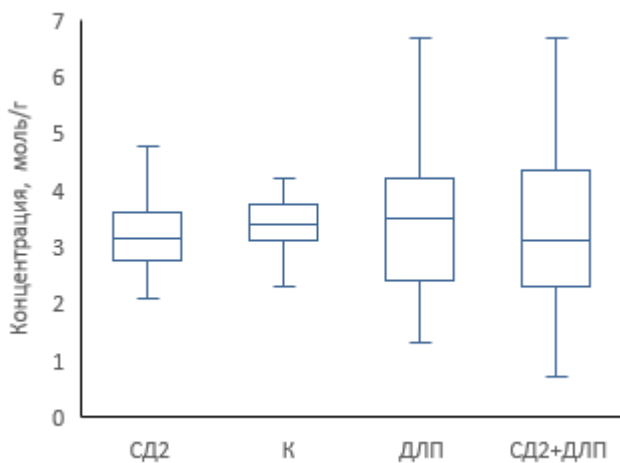
	Группа сравнения	ДЛП	СД2	СД2+ДЛП
ОХС	5,1 (5,4 - 4,4)	5,65 (6,1 - 4)	5,1 (5,7 - 4,4)	4,87 (5,86 - 3,7)
ТГ	1,1 (1,2 - 0,9)	1,47 (2,4 - 1,1)*	1,23 (1,7 - 1)*	1,98 (3,1 - 1,53)* ** ***
ХС ЛПНП	3,4 (3,7 - 3,3)	3,5 (4,2 - 2,4)	3,15 (3,57 - 2,77)	3,1 (4,34 - 2,33)
ХС ЛПВП	1,1 (1,3 - 1)	1,01 (1,3 - 0,9)	1,4 (1,58 - 1,07) **	0,98 (1,3 - 0,8) ***
Глюкоза (ммоль/л)	5,5 (5,8 - 5,4)	5,55 (5,8 - 5,1)	6,55 (7,5 - 6,2)* **	8,8 (11,9 - 7,65)* ** ***

Примечание: * - обозначены статистически значимые отличия (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) от группы сравнения; ** - от группы ДЛП; *** - от группы СД2.



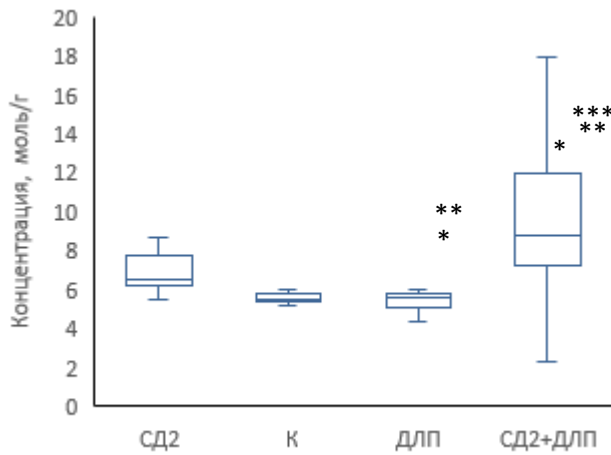
а) ОХС

б) ТГ



в) ХС ЛПНП

г) ХС ЛПВП



д) Глюкоза

Рисунок 8 – Характеристика исследуемых групп по показателям углеводного и липидного обмена

Примечание: * - обозначены статистически значимые отличия (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) от группы сравнения; ** - от группы ДЛП; *** - от группы СД2.

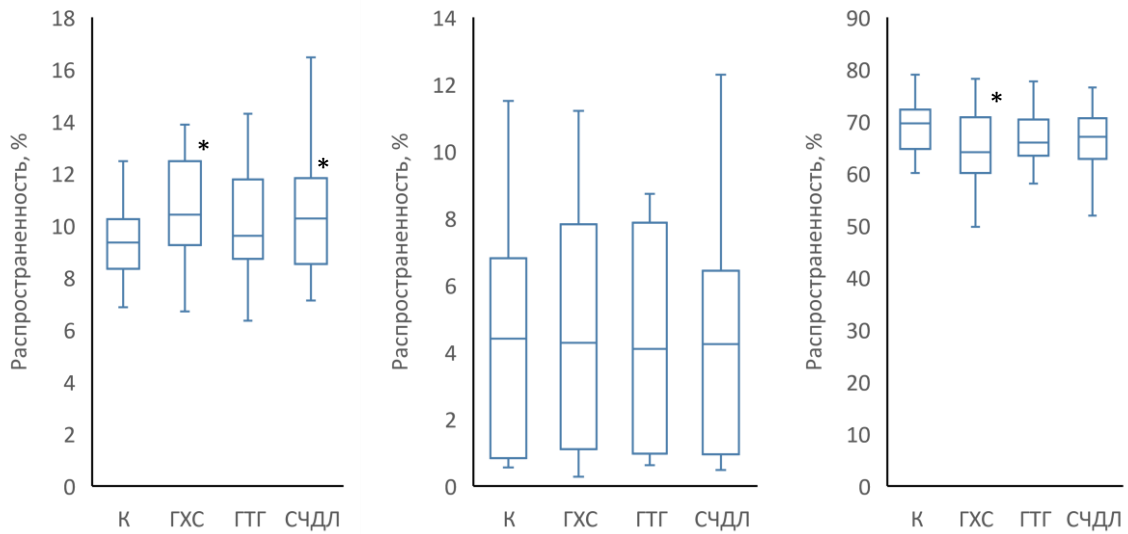
На рисунке 8 показано, что для показателя ОХС и ХС ЛПНП для всех исследуемых групп нет статистически значимых изменений. Для ТГ показатели в исследуемых группах выше, чем в группе сравнения (Таблица 25). Показатели ТГ в группе СД2 ниже, чем в группе ДЛП и СД2+ДЛП (Рисунок 8б). Таким образом ТГ повышаются при дислипидемии больше, чем сахарном диабете 2 типа, а при сочетании СД2 и ДЛП основным фактором является ДЛП.

Для показателя ХС ЛНВП исследуемые группы не различаются с группой сравнения (Рисунок 8г). При СД2 показатель ХС ЛПВП повышается относительно ДЛП, а при сочетанной СД2 и ДЛП снижается относительно СД2. Таким образом СД2 повышает концентрацию ХС ЛПВП в крови, но при сочетании с ДЛП концентрация ХС ЛПВП снижается.

Концентрация глюкозы не повышается при ДЛП (Рисунок 8д), но увеличивается при СД2, а при сочетании СД2 и ДЛП увеличивается относительно СД2, относительно ДЛП и относительно группы сравнения.

Полученные показатели согласуются с данными представленными в большинстве публикаций, посвященных исследованиям нарушений липидного и углеводного обмена [12,11,98].

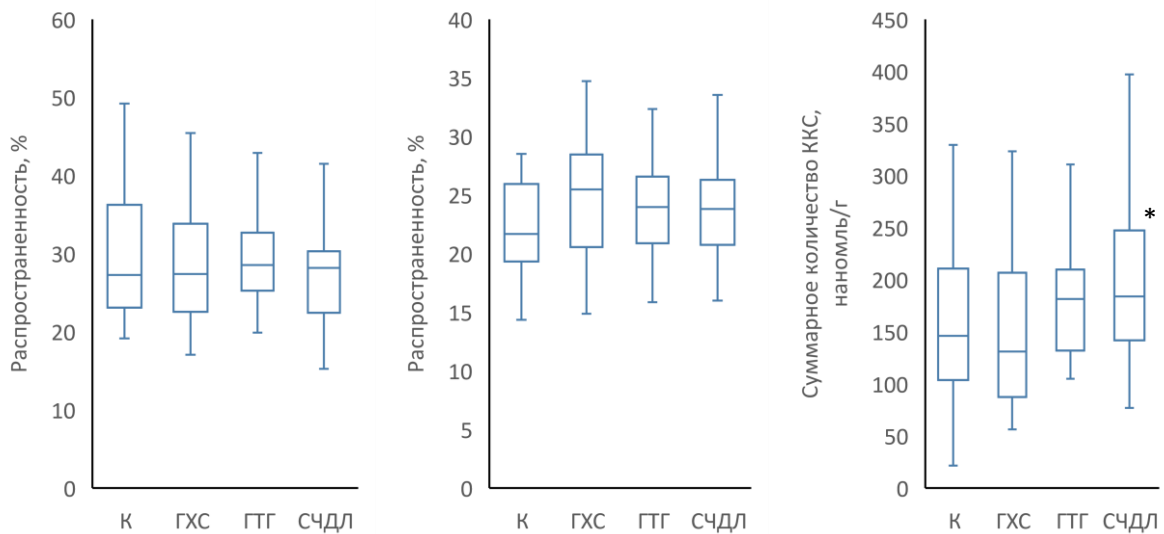
Для характеристики структуры микробиома при различных проявлениях нарушений липидного обмена провели сравнение показателей представленности по флотипам микробиома. Результаты представлены на рисунке 9.



а) *Actinobacteria*

б) *Bacteroidetes*

в) *Proteobacteria*



г) *Firmicutes*

д) *Fungi*

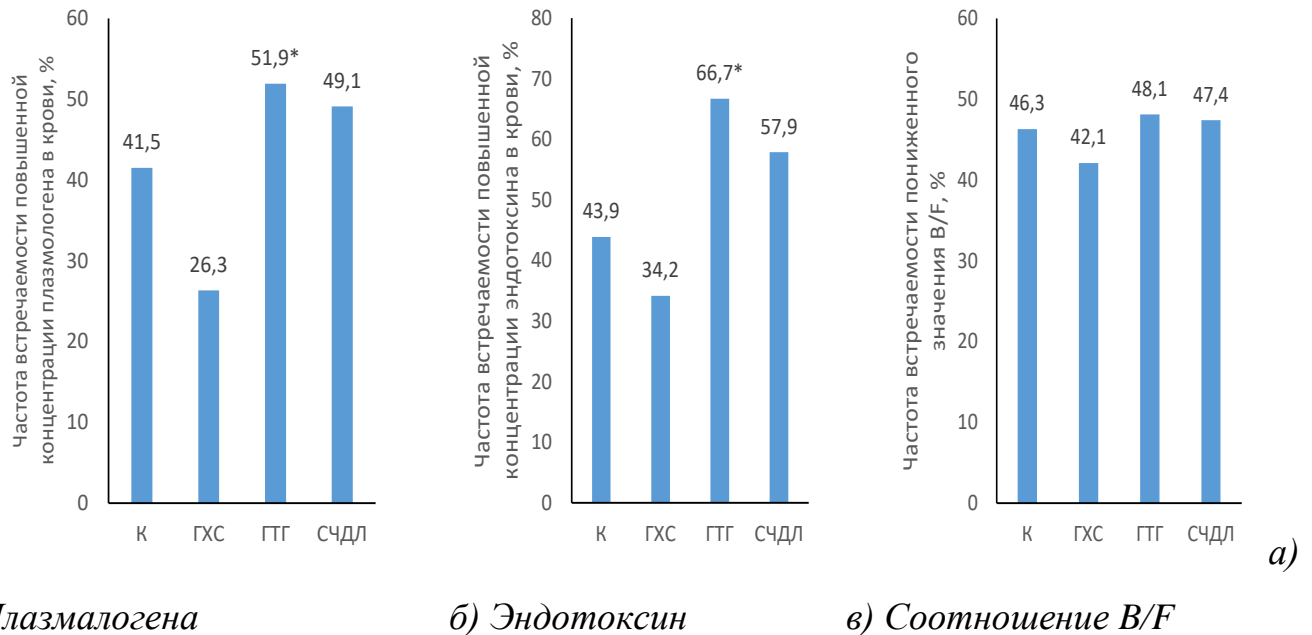
е) Суммарная концентрация
микробных маркеров в крови

Рисунок 9 – Распространенность флотипов микробиома при разных проявлениях липидного обмена у лиц пожилого возраста

На рисунке 9 показано, что микроорганизмы флотипа *Actinobacteria* увеличивают свою представленность при гиперхолестеринемии и сочетанной дислипидемии. Флотип *Proteobacteria* снижает представленность при

гиперхолестеринемии. Статистически значимое увеличение компонентов клеточной стенки в крови наблюдается при сочетанной дислипидемии.

Из анализа частоты встречаемости показателей вне нормы (Рисунок 10) можно отметить, что при гипертриглицеринемии статистически значимо увеличивается число пациентов с показателями вне нормы для концентрации плазмалогена, эндотоксина.



Плазмалогена

б) Эндотоксин

в) Соотношение В/Ф

Рисунок 10 – Частота встречаемости показателей вне нормы у пациентов с нарушением углеводного и липидного обмена

Исследование корреляционной связи между концентрациями биохимических показателей нарушений липидного обмена с представленностью флотипов микроорганизмов представлено в таблице 26.

Таблица 26 – Результаты корреляционного анализа концентраций биохимических показателей нарушений липидного обмена с представленностью флотипов микроорганизмов

	ОХС	ТГ	ХС ЛПНП	ХС ЛПВП	Глюкоза	ОХС	ТГ	ХС ЛПНП	ХС ЛПВП	Глюкоза
	<i>Контроль</i>					<i>Гиперхолестеринемия</i>				
V/F	-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>				
V/F	0,119	0,056	-0,237	-0,211	-0,084	0,222	-0,191	0,158	0,002	-0,518

	ОХС	ТГ	ХС ЛПНП	ХС ЛПВП	Глюко за	ОХС	ТГ	ХС ЛПНП	ХС ЛПВП	Глюко за
<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

В таблице 26 показано, что уровень глюкозы в группе контроль имеет обратную корреляцию с *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, а также с соотношением В/Ф.

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*.

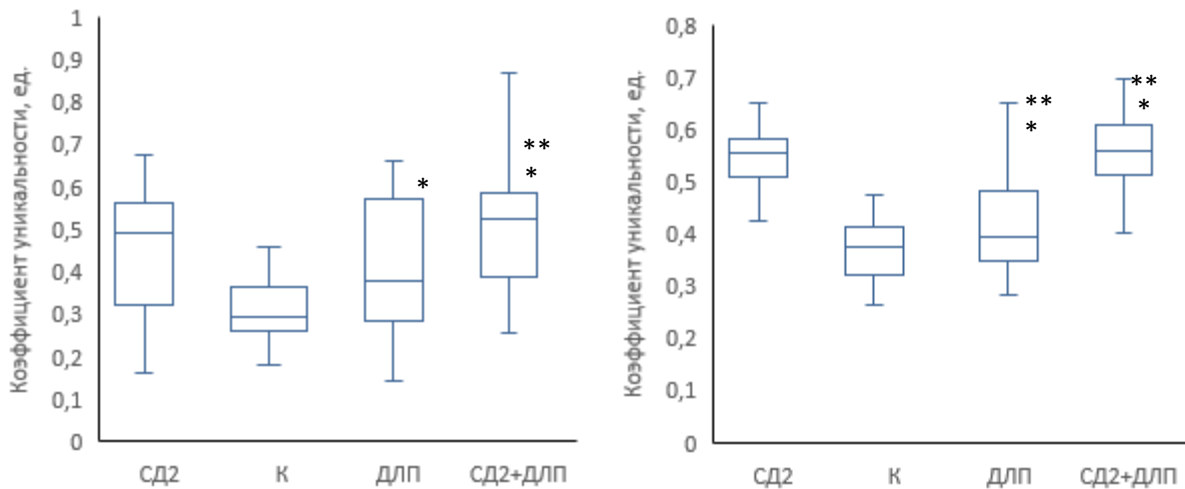
Таким образом, наблюдается обратная корреляционная связь во всех группах кроме группы Гиперхолестеринемии между уровнем глюкозы и представленностью *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, а представленностью *Proteobacteria* и *Fungi* связано с уровнями триглицеридами и липидов низкой и высокой плотности.

Используем результаты предиктивного анализа для характеристики влияния сахарного диабета и дислипидемии на основные показатели нарушений углеводного и липидного обмена (Таблица 27, Рисунок 11).

Таблица 27 – Характеристика исследуемых групп по показателям углеводного и липидного обмена

	Группа сравнения	ДЛП	СД2	СД2+ДЛП
КУ СЧДЛ	0,29 (0,36 - 0,26)	0,38 (0,57 - 0,28)	0,49 (0,56 - 0,32)*	0,53 (0,59 - 0,39)* **
КУ СД2	0,38 (0,41 - 0,32)	0,39 (0,48 - 0,35)	0,56 (0,58 - 0,51)* **	0,56 (0,61 - 0,51)* **

Примечание: * - обозначены статистически значимые отличия (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) от группы сравнения; ** - от группы ДЛП; *** - от группы СД2.



а) Коэффициент уникальности СЧДЛ б) Коэффициент уникальности СД2

Рисунок 11 – Характеристика исследуемых групп по результатам предиктивного анализа

Примечание: * - обозначены статистически значимые отличия (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) от группы сравнения; ** - от группы ДЛП; *** - от группы СД2.

На рисунке 11 показано, что в группе ДЛП коэффициенты уникальности ДЛП и СД2 не имеют статистически значимых отличий при очевидной тенденции к росту (Таблица 27). При СД2 деформация микробиома существенно больше, что отражается на графиках (Рисунок 11). Увеличение коэффициента уникальности СЧДЛ при ДЛП и СД2 не отличаются между собой, а для коэффициента уникальности СД2 отличаются, что указывает на сахарный диабет, как на более мощный фактор изменения соотношения концентраций малых молекул микробного происхождения в крови.

Для выявления тенденций и взаимосвязи исследуемых показателей проведем корреляционный анализ показателей углеводного и липидного обмена с коэффициентами уникальности (Таблица 28).

Таблица 28 – Коэффициенты корреляции основных показателей углеводного и липидного обмена и коэффициентов уникальности СЧДЛ и СД2

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

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

В таблице 28 показано, что коэффициент уникальности СЧДЛ имеет прямую корреляцию с показателями ТГ и ХС ЛПВП в группе ДЛП. ТГ имеет прямую слабую корреляцию в группе СД2, которая увеличивается при сочетании СД2 и ДЛП. В группе СД2 появляется слабая прямая корреляция с ОХС и обратная корреляция с концентрацией глюкозы. Коэффициент уникальности СД2 не коррелирует с показателями липидного обмена, но имеет слабую прямую корреляцию в группе СД2 и обратную корреляцию в группе ДЛП.

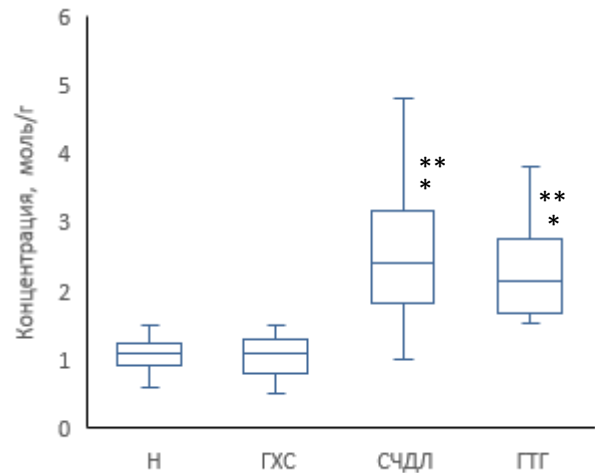
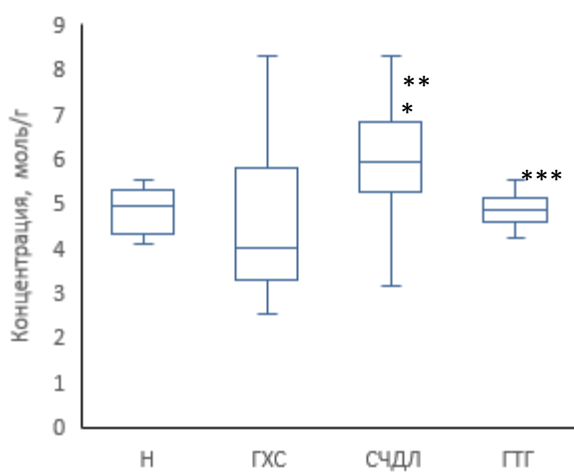
Таким образом, нарушения липидного обмена находятся в обратной связи с нарушениями углеводного обмена при отсутствии сахарного диабета 2 типа, а сахарный диабет 2 типа снижает активность нарушения липидного обмена. При условии сочетанного СД2 и ДЛП с усилением липидного обмена увеличиваются ТГ.

Для характеристики групп, выделенных в соответствии с видом нарушения липидного обмена, определим концентрации основных показателей углеводного и липидного обмена, а также при их сочетании (Таблица 29, Рисунок 12).

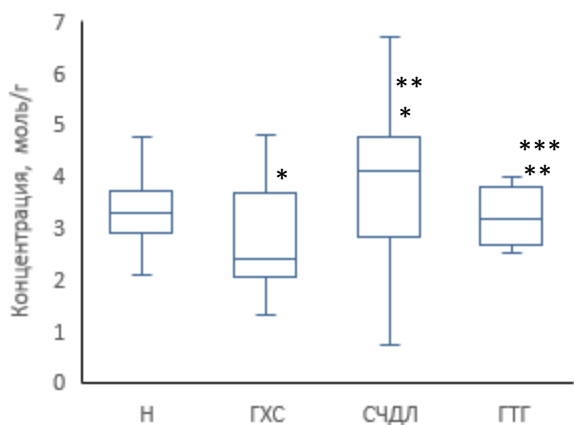
Таблица 29 – Характеристика видов нарушений липидного обмена по показателям углеводного и липидного обмена

	Группа сравнения	ГХС	СЧДЛ	ГТГ
ОХС	4,92 (5,3 - 4,33)	4 (5,8 - 3,3)	5,9 (6,8 - 5,6)* **	4,85 (5,1 - 4,58) ***
ТГ	1,1 (1,23 - 0,9)	1,09 (1,3 - 0,8)	2,4 (3,16 - 1,9)* **	2,16 (2,7 - 1,7)* **
ХС ЛПНП	3,3 (3,7 - 2,9)	2,4 (3,69 - 2,05)*	4,1 (4,65 - 2,81)* **	3,16 (3,75 - 2,73) ** ****
ХС ЛПВП	1,15 (1,4 - 1)	1 (1,25 - 0,8)*	1,03 (1,3 - 0,81)	0,94 (1,25 - 0,79)*
Глюкоза	6,05 (7,65 - 5,6)	5,85 (6,9 - 5,5)	6,86 (8,8 - 6,1) **	7,4 (10,9 - 6)
Гликированный гемоглобин (%)	10,1 (11,6 - 9,5)	9,5 (12,7 - 9,2)	9,85 (11,25 - 8,6)	10,2 (10,7 - 8,5)

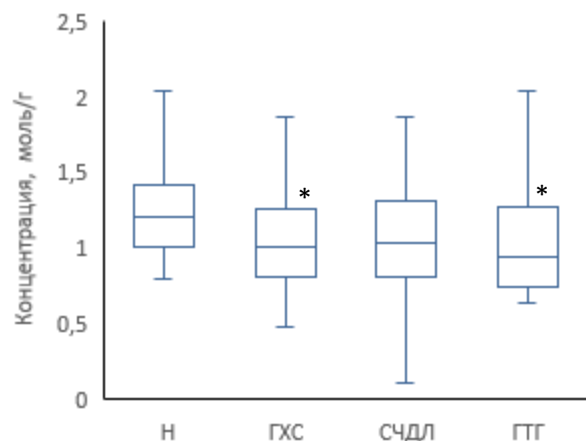
Примечание: * - обозначены статистически значимые отличия (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) от группы сравнения; ** - от группы ГХС; *** - от группы СЧДЛ.



а) ОХС

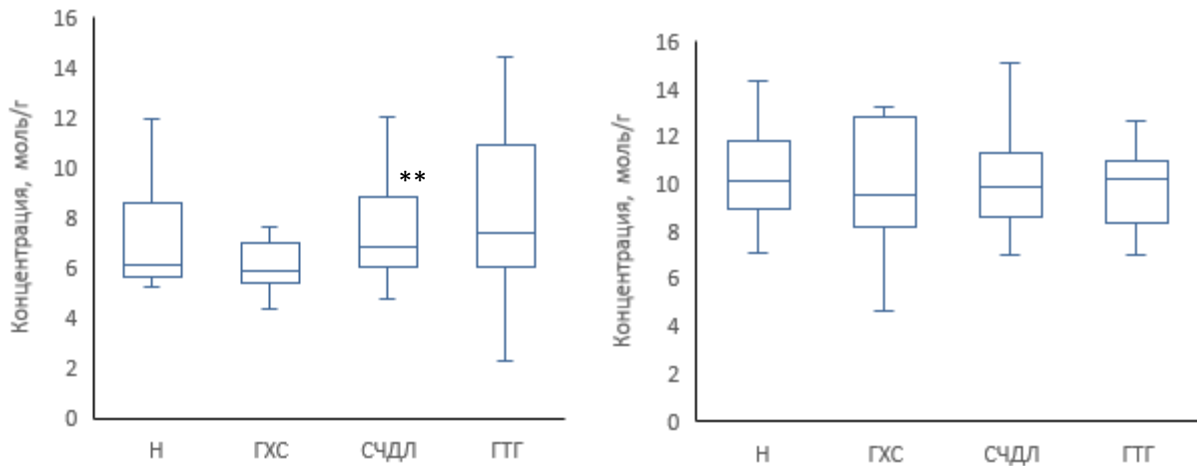


б) ТГ



в) ХС ЛПНП

г) ХС ЛПВП



д) Глюкоза

е) Гликированный гемоглобин

Рисунок 12 – Характеристика исследуемых групп по показателям углеводного и липидного обмена

Примечание: * - обозначены статистически значимые отличия (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) от группы сравнения; ** - от группы ДЛП; *** - от группы СД2.

На рисунке 12 показано, что для показателя гликированный гемоглобин изменения показателей для всех исследуемых групп не имеют статистически значимых различий. В группе ГХС снижается ХС ЛПНП и ХС ЛПВП. Полученный результат для липидов высокой плотности имеет понятное объяснение, что развитие гиперхолестеринемии приводит к увеличению рециркуляции холестерина в печени, что приводит к снижению концентрации липидов высокой плотности. Снижение липидов низкой плотности может происходить за счет компенсаторных механизмов метаболизма гепатобиллиарной системы печени у пожилых людей. При СЧДЛ отмечается повышение ОХС, ТГ, ХС ЛПНП относительно группы сравнения и группы ГХС (Таблица 28), что соответствует современным представлениям о липидном обмене. Относительно группы ГХС при СЧДЛ увеличивается концентрация глюкозы в крови.

Для ГТГ отмечается увеличение ТГ и снижение ХС ЛПВП относительно группы сравнения, увеличение ТГ, ХС ЛПНП относительно ГХС и снижение ХС ЛПНП относительно СЧДЛ.

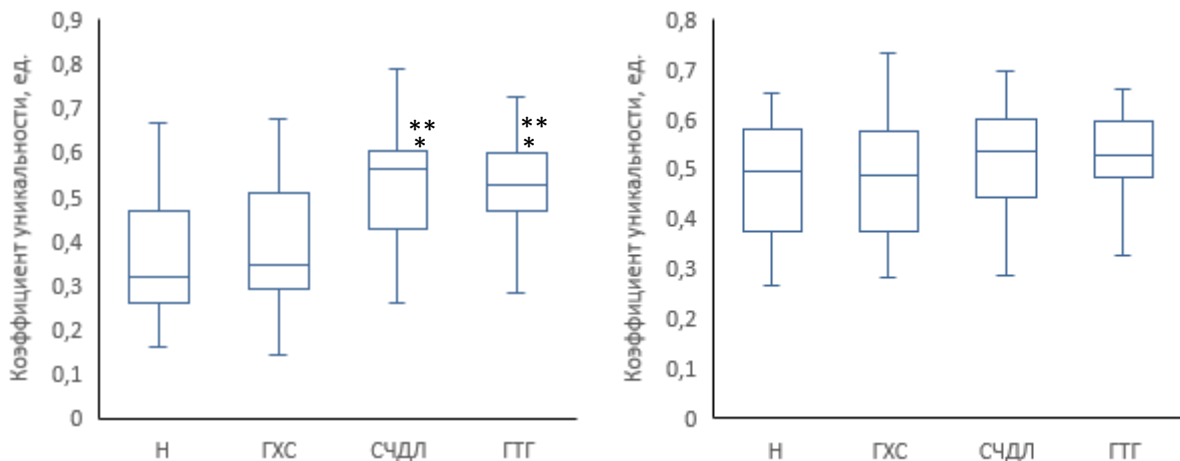
Таким образом, для ГХС характерно снижение ХС липидов, для СЧДЛ характерно повышение ОХС, ТГ, ХС липидов низкой плотности и глюкозы в крови, а для ГТГ увеличиваются ТГ.

Используем результаты предиктивного анализа для характеристики влияния сахарного диабета и дислипидемии на основные показатели нарушений углеводного и липидного обмена (Таблица 30, Рисунок 13).

Таблица 30 – Характеристика исследуемых групп по показателям углеводного и липидного обмена

	Группа сравнения	ГХС	СЧДЛ	ГТГ
КУ СЧДЛ	0,31 (0,47 - 0,26)	0,35 (0,5 - 0,29)	0,56 (0,6 - 0,46)* **	0,53 (0,6 - 0,47)* **
КУ_СД2	0,48 (0,58 - 0,38)	0,49 (0,57 - 0,38)	0,53 (0,6 - 0,44)	0,53 (0,6 - 0,48)

Примечание: * - обозначены статистически значимые отличия (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) от группы сравнения; ** - от группы ГХС; *** - от группы СЧДЛ.



а) Коэффициент уникальности СЧДЛ б) Коэффициент уникальности СД2

Рисунок 13 – Характеристика исследуемых групп по результатам предиктивного анализа

Примечание: * - обозначены статистически значимые отличия (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) от группы сравнения; ** - от группы ДЛП; *** - от группы СД2.

На рисунке 13 показано, что коэффициент уникальности СД2 для исследуемых групп не меняется. Коэффициент уникальности СЧДЛ увеличивается для СЧДЛ и ГТГ относительно группы сравнения и ГХС, что также было показано на 3-х мерной диаграмме рассеяния (Рисунок 3).

Таблица 31 – Коэффициенты корреляции основных показателей углеводного и липидного обмена и коэффициентов уникальности СЧДЛ и СД2 при сахарном диабете 2 типа

	Группа сравнения	ГХС	СЧДЛ	ГТГ
КУ СЧДЛ				
ОХС	-0,146	-0,005	0,049	-0,338
ТГ	-0,048	0,076	0,195	0,364
ХС ЛПНП	-0,102	-0,289	-0,111	-0,324
ХС ЛПВП	-0,035	0,336	-0,021	0,063
Глюкоза	0,054	-0,324	-0,326	0,060
Гликированный гемоглобин	-0,130	-0,095	-0,137	-0,500
КУ СД2				
ОХС	-0,174	0,167	-0,263	-0,499
ТГ	0,023	0,115	0,148	0,040
ХС ЛПНП	-0,075	0,085	-0,193	-0,199
ХС ЛПВП	0,284	0,126	-0,034	0,414
Глюкоза	0,580	0,421	0,411	0,255
Гликированный гемоглобин	0,189	0,516	-0,101	0,225

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

В таблице 31 показано, что коэффициент уникальности СЧДЛ не имеет статистически значимых корреляционных связей ни в одной из всех исследуемых групп. Коэффициент уникальности СД2 имеет прямую корреляцию с уровнем глюкозы в крови в группе сравнения и СЧДЛ, и обратную корреляцию с ОХС в группах СЧДЛ и ГТГ.

При сахарном диабете в группе сравнения и групп 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.

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

Программа "Диабет - скрин" (Рисунок 14) предназначена для оценки углеводного и липидного обмена и предиктивного анализа состояния здоровья пожилого человека. Исходными данными для предиктивного анализа являются концентрации компонентов клеточной стенки микроорганизмов в крови, которые определяются методом газожидкостной хроматографии масс-спектрометрии. В результате предиктивного анализа определяются маркеры сахарного диабета 2 типа.

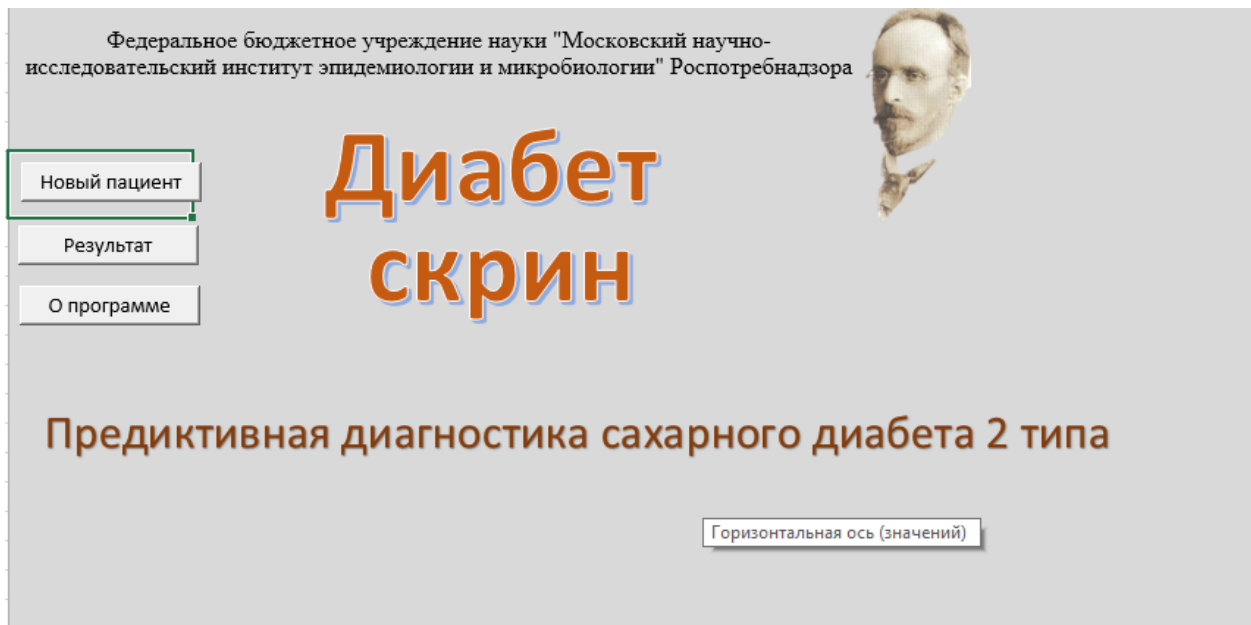



Рисунок 14 – Титульный лист компьютерной программы «Диабет-скрин»

После внесения концентраций всех компонентов клеточной стенки микроорганизмов в крови в нижней части программы выдается прогноз в виде текстовой строки (Рисунок 15).

Диабет - скрин



История болезни

ФИО

Возраст

Концентрации малых молекул в крови

Концентрации компонентов клеточной стенки микроорганизмов в венозной крови			
3-гидроксимиристиновой кислоты	3h14	нмоль/мл	39,04088
10-метил-гексадекановой кислоты	10Me16	нмоль/мл	21,62106
изононадекановой кислоты	i19	нмоль/мл	1,206587
9-изогептатадеценной кислоты	i17:1d9	нмоль/мл	2,208863
холестердиола	Cholester	нмоль/мл	0,618157
транс-9-гексадеценной кислоты	16:1d9t	нмоль/мл	0,119356
2-гидрокситетракозановой кислоты	2h24	нмоль/мл	0,0172
			0,027241

Результаты биохимического анализа слюны указывают на отсутствие маркеров сахарного диабета 2 типа

Рисунок 15 – Лист ввода первичных данных и первичных расчетов компьютерной программы «Диабет - скрин»

Если согласно расчетам по классификационным уравнениям дискриминантного анализа определяется наличие сахарного диабета 2 типа, то выдается строка: «Результаты биохимического анализа слюны указывают на присутствие маркеров дисбиоза ротоглотки.»; если дисбиоз не выявился то: «Результаты биохимического анализа слюны указывают на присутствие маркеров сахарного диабета 2 типа». в противном случае: «Результаты биохимического анализа слюны указывают на отсутствие маркеров сахарного диабета 2 типа».

Для удобства пользователя в программе имеется лист описания программы в котором коротко изложена информация о предназначении программы и правилах ее использования (Рисунок 16).

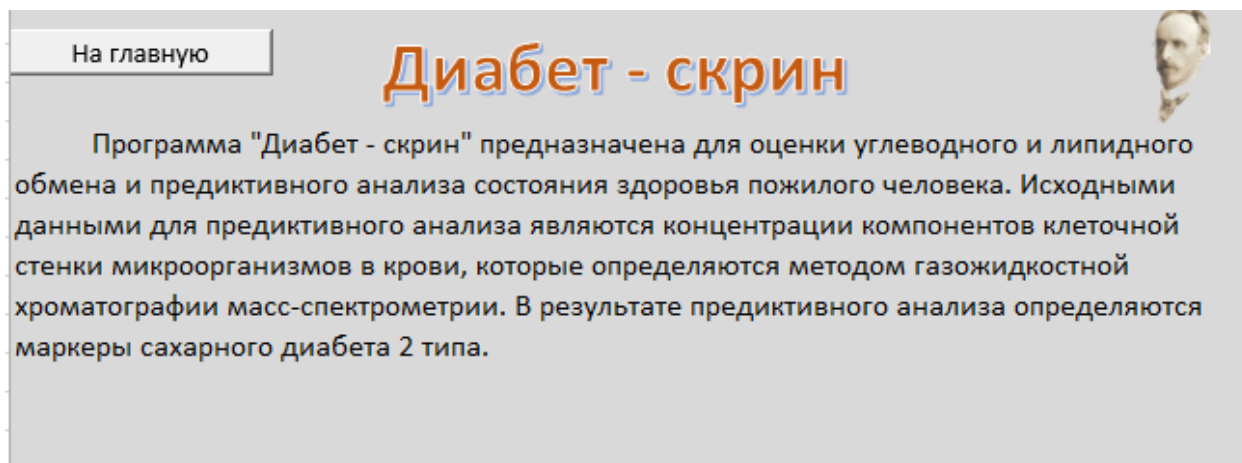


Рисунок 16 – Описание компьютерной программы «Диабет - скрин»

Программа реализована в среде Microsoft Excel 2007 и выше, что является распространенным программным обеспечением в сфере практического здравоохранения.

3.5. Заключение по 3 главе

Появление в крови малых молекул микробного происхождения происходит в результате множества разнонаправленных процессов, одним из наиболее влиятельных является процесс диффузии через слизистую оболочку двенадцатиперстной кишки в результате нарушения барьерной функции слизистой. Распределение малых молекул в зависимости от фило типа микроорганизма источника дает возможность сравнить изменения соотношений фило типов с учетом их представленности, взаимодействия с иммунной системой, скоростью вывода из организма и других процессов, влияющих на их концентрацию в крови. Из данных полученных в 3 главе можно отметить, что при нарушении углеводного обмена снижается представленность *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*, а для *Actinobacteria* представленность увеличивается. Представленность *Firmicutes* связана обратной корреляционной связью с уровнем глюкозы в крови в норме и при сахарном диабете 2 типа. Уровень триглицеридов в крови связан прямой корреляцией с представленностью *Bacteroidetes*. Таким образом, можно предполагать, что есть определенный механизм патогенеза нарушения

углеводного обмена, являющийся причиной для биохимических нарушений и изменением представленности фило типов.

Разработка программы для ЭВМ позволяет применять результаты микробиом-ассоциированной экспосомики в сфере практического здравоохранения для дальнейших исследований состояния микробиома при нарушениях липидного и углеводного обмена.

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 «ДЛП», позволяющая по концентрациям микробных маркеров в крови определить степень и направленность изменения микробиома при различных вариантах

нарушений липидного обмена. С помощью модели «ДЛП» 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 флотипов 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 флотипов 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 фило типов *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 в современной физико-химической биотехнологии, в практическом здравоохранении и являются частью персонифицированной 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.

Список сокращений

ЗОН FA – компоненты липида А липополисахарида грамотрицательных микроорганизмов

V/F – отношение *Bacteroidetes* к *Firmicutes*

BSTFA - N,O-бис (триметилсилил)-трифторацетамид

ChREBP - углевод-реагирующий элемент-связывающий белок

GLUT - Глюкозный транспортер

HbA1c - гликированный гемоглобин

IL - интерлейкины

IRS - субстрат инсулинового рецептора
MyD88 - миелоидная дифференциация
NF-κB - универсальный фактор транскрипции каппа-би
SMOM - малые молекулы микробного происхождения
TLR – толл-подобные рецепторы
TNF - фактор некроза опухоли
TRP - транзиторный рецепторный потенциал
ГЖХ — газо-жидкостная хроматография
ГТГ – гипертриглицеридемия (ХС < 5,5 ммоль/л ТГ > 1,7 ммоль/л)
ГХ-газовая хроматография
ГХ-МС - газовая хроматография-масс-спектрометрия
ГХС – гиперхолестеринемия (ХС > 5,5 ммоль/л ТГ < 1,7 ммоль/л)
ГЧЛ - гормон-чувствительная липаза
ДАГ - диацилглицерол
ДЛП – дислипидемия
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖК – жирные кислоты
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
КОЕ – колонии образующие единицы
КЦЖК (КЖК) — короткоцепочечные жирные кислоты
КЭФ - капиллярный электрофорез
ЛДА – линейный дискриминантный анализ
ЛПВП – липопротеиды высокой плотности
ЛПЛ - липопротеиновая липаза
ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП - липопротеиды очень низкой плотности
ЛППП – липопротеиды промежуточной плотности
ЛПС – липополисахарид – эндотоксин грамотрицательных микроорганизмов
ММ - микробные маркеры
МММП-малые молекулы микробного происхождения

МС - метаболическим синдромом

ОРВИ — острые респираторные вирусные инфекции;

ОХС (ХС) – общий холестерин

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РНК - рибонуклеиновая кислота

С18а – октадеценовый альдегид – компонент бактериального плазмалогена

СД 2 – патология сахарного диабета 2 типа

СЧДЛ – сочетанная дислипидемия (ХС > 5,5 ммоль/л ТГ > 1,7 ммоль/л)

ТГ – триглицериды

ТМА - триметиламин

ТМАО - триметиламин- N- оксид

ХМ-хиломикроны

ХС ЛПВП – холестерин липопротеидов высокой плотности

ХС ЛПНП – холестерин липопротеидов низкой плотности

ЭВМ – электронно-вычислительная машина

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

Список терминов

Линейный дискриминантный анализ – является обобщением линейного дискриминанта Фишера, метода, используемого в статистике, распознавании образов и обучении машин для поиска линейной комбинации признаков, которая описывает или разделяет два, или более классов или событий. Получившаяся комбинация может быть использована как линейный классификатор, или, более часто, для снижения размерности перед классификацией.

Расстояние Махаланобиса — мера расстояния между векторами случайных величин, обобщающая понятие евклидова расстояния.

Коэффициент уникальности – соотношение расстояний махалонобиса от центроида норма до координат объекта к сумме расстояний от координат объекта до каждого из центроидов.

ОМИК-технологии – изучение пула характеристик биологического объекта направленная на коллективную характеристику и количественную оценку пулов биологических молекул, которые отражаются в структуре, функциях и динамике организма или организмов.

Экспосом – химические соединения - часть метаболома, имеющие внешнее происхождение и привнесенные с пищей, водой, воздухом или микроорганизмами.

Микробиом-ассоциированная экспосомика – часть экспосома имеющая микробное происхождение

Диагностика дислипидемий по Фредериксону – классификация дислипидемий в зависимости от того, уровень каких именно липидов и липопротеидов выходит за пределы нормы. Предложена Дональдом Фредриксоном в 1965 г.

Список использованной литературы

1. Бабин, В.Н. Биохимические и молекулярные аспекты симбиоза человека и его микрофлоры. / В.Н. Бабин, И.В. Домарадский А.В. Дубинин, О.А. Кондракова // Российский химический журнал (ЖРХО им. Менделеева). – 1994. – Т. 38, №6. – С. 66-78.
2. Бабин, В.Н. Молекулярные аспекты симбиоза в системе хозяин-микрофлора / В.Н. Бабин, О.Н. Минушкин, А.В. Дубинин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1998; № 6. – С. 76-82.
3. 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. Терешина, А.Ю. Миронов, В.В. Помазанов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т. 66. № 9. – С. 565-570.
4. 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. Киселева, В.В. Помазанов – Орехово-Зуево, 2021. – 38 с.
5. Белобородова, Н.В. Интеграция метаболизма человека и его микробиома при критических состояниях / Н.В. Белобородова // Общая реаниматология. – 2012. – Т. 8, №4. – С. 42-54.
6. Белобородова, Н.В. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином. / Н.В. Белобородова, Г.А. Осипов // Вестник РАМН. 1999. – Т.16, №7 – С. 25-31.
7. Бондаренко, В.М. Роль эндотоксина кишечной микрофлоры в физиологии и патологии человека / В.М. Бондаренко, В.Г. Лиходед // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электрон. журн.) – 2012. – №3. – С. 2-7.
8. Боровиков, В. П. STATISTICA: Статистический анализ и обработка данных в среде Windows / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. — М.: Филинь, 1997. —

608 с. — ISBN 589568033-X.

9. Вейант Р. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий / Р. Вейант, У. Мосс, Д. Холлис, Дж. Джордан, Э. Кук, М. Дейншвар // М.: Мир, 1999. – С. 612-783
10. Гауптман, З. "Органическая химия" / З. Гауптман, Ю. Грефе, Х. Ремане // М.: Химия, 1979. – 832 с.
11. Глинкина, И.В. Лечение нарушений липидного обмена при сахарном диабете 2 типа / И.В. Глинкина // Лечащий врач – 2002. – №6. – С. 6-8.
12. Дедов, И. И. Сахарный диабет 2 типа у детей и подростков / И.И. Дедов, О. В. Ремизов, В. А. Петеркова // Сахарный диабет. – 2001. – № 4. – С. 26-32.
13. Дедов, И.И. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клиничко-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, О.К. Викулова // Сахарный диабет. – 2017. – Т. 20, №1. – С. 13-41.
14. Затевалов, А.М. Микробиом-ассоциированная экспосомика - новое перспективное направление предиктивной диагностики / А.М. Затевалов, С.Л. Безродный, С.Г. Марданлы, В.В. Помазанов // В сборнике: Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Сборник материалов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной Году науки и технологий. Под общей редакцией С.Г. Марданлы, В.В. Помазанова, В.А. Киселевой. Орехово-Зуево, 2021. – С. 106-109.
15. Затевалов А.М. Оценка степени микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки и кишечника с помощью методов математического моделирования / А.М. Затевалов, Е.П. Селькова, С.С. Афанасьев, А.В. Алешкин, А.Ю. Миронов, М.П. Гусарова, Н.В. Гудова // Клин. лаб. диагн. – 2016. – Т. 61, № 2. – С. 117-121.
16. Затевалов, А.М. Практическое применение микробиом-ассоциированной метаболомики для интегральной оценки состояния микробиоценоза респираторного тракта / А.М. Затевалов, А.С. Оганесян, Н.В. Гудова, Е.П.

- Селькова, А.Ю. Миронов // В сборнике: Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2019. – С. 77-84.
- 17.Зверев, В.В. Микроэкология и гуморальный иммунитет слизистых открытых полостей человека в норме и при патологических состояниях. Учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / В.В. Зверев, Ю.В. Несвижский, Е.А. Воропаева, С.С. Афанасьев, В.А. Алёшкин, А.В. Караулов, Х.М. Галимзянов, О.В. Макаров, Е.А. Богданова, О.В. Рубальский, М.С. Афанасьев, Н.С. Матвеевская, Д.С. Афанасьев, Т.Н. Савченко, В.А. Метельская, Е.Е. Рубальская, Е.О. Рубальский. – Астрахань – Москва: АГМА, 2011. – 80 с.
- 18.Ибрагимов, Т.И. Обоснование выбора материала несъемных зубных протезов для больных сахарным диабетом / Т.И. Ибрагимов, А.Ю. Нурмагомедов, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, А.И. Лебедеенко, С.Д. Арутюнов // Институт стоматологии. – 2001. – Т. 4, №13. – С. 26-30.
- 19.Колоколова, Т.Н. Метаболический анализ биологических жидкостей человека с помощью спектроскопии ЯМР ^1H (обзор) / Т.Н. Колоколова, О.Ю. Савельев, Н.М. Сергеев // Аналит. химия. – 2008. – Т. 63, № 2. – С. 118-136.
- 20.Кцюян, Ж. А. Спектр и уровень содержания низкомолекулярных соединений микробного происхождения при периодической болезни / Ж. А. Кцюян, Г. А. Осипов, Н. Н. Саркисян, К. Г. Карагезян // Вестник РАМН. – 2002. – № 2. – С. 41-45.
- 21.Лохов, П.Г. Масс-спектрометрические методы в метаболизме / П.Г. Лохов, А.И. Арчаков // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54, вып. 5. – С. 497-511.
- 22.Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Под ред. Н.В. Трухачевой. – М.: Гэотар-медиа, 2013. – 384 с.
- 23.Методика масс-спектрометрии микробных маркеров как способ оценки

- пристеночной кишечной микробиоты при заболеваниях органов пищеварения. Под редакцией Г.А. Осипова, В.П. Новиковой / Учебно-методическое пособие. – Санкт-Петербург, 2013. – 83 с.
24. Методические указания МУ 4.2.2039-05 Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 126 с.
25. Мечников, И.И. Этюды оптимизма. / И.И. Мечников // М.: Наука, 1988.
26. Минушкин, О.Н. Дисбактериоз кишечника. / О.Н. Минушкин, М.Д. Ардатская, В.Н. Бабин и др. // Рос. мед. журн. – 1999. – №3. – С. 40-5.
27. Митрука, Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине / Б.М. Митрука // М.: Медицина, 1978. – 608 с.
28. Нейланд, О. Я. Органическая химия. / О. Я. Нейланд – М.: Высшая школа, 1990. – 751 с.
29. Осипов, Г.А. Патент на изобретение RU 2501011 С2, 10.12.2013. Способ калибровки системы газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС), оснащенной специальным ПО, для определения маркеров микроорганизмов в исследуемой пробе материала биологического происхождения, Заявка № 2012101198/15 от 10.01.2012.
30. Осипов, Г.А. Хромато-масс-спектрометрическое исследование микроорганизмов и их сообществ: Дис. ... д-ра биол. наук. М.; 1995.
31. Осипов, Г.А. Патент на изобретение № 2146368 «Способ выявления возбудителя инфекционного процесса в стерильных биологических средах макроорганизма» / Г.А. Осипов, Н.В. Белобородова // 21.10.1997. – регистрация в Госреестре изобретений РФ от 10.03.2000.
32. Основы статистического анализа в медицине: Учебное пособие / В.И. Чернов, И.Э. Есауленко, С.Н. Семенов, Н.П. Сереженко. — Воронеж, 2003. — 113 с.
33. Парфенов, А.И. Что нам дал вековой опыт познания симбионтной кишечной микрофлоры / А.И. Парфенов, В.М. Бондаренко // Арх. пат. – 2012. – №2. –

- С. 21-25.
34. Помазанов, В.В. Микроэкологический статус человека и его определение. В сборнике: Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации / В.В. Помазанов // Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2019. – С. 167-184.
35. Прикладная медицинская статистика: учебное пособие / Под ред. В.М. Зайцева. – СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2006. – 432 с.
36. Северин, Е.С. Биологическая химия / Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов, С.А. Силаева // М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 364 с.
37. Справочник химика / Редколлегия: Никольский Б. П. и др. – 2-е издание // Ленинград, Москва: Химия, 1964. – Т. 2. – С. 270-295.
38. Терёшина, Е. В. Метаболические нарушения — основа зависимых от возраста заболеваний или старения организма? Состояние проблемы / Е.В. Терёшина // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22, № 1. С. 129–138
39. Тец, В.В. Справочник по клинической микробиологии. Санкт-Петербург. – 1994. – 223 с.
40. Ткач, С.М. Соотношение основных фенотипов кишечной микробиоты у больных сахарным диабетом 2 типа / С.М. Ткач, А.А. Дорофеева // *Clinical Endocrinology and Endocrine Surgery*. – 2018. – Т. 3, №62. С. 7-14
41. Ткаченко, Е.И. Питание, микробиоценоз и интеллект человека / Е.И. Ткаченко, Ю.Л. Успенский // - СПб.: СпецЛит., 2006. – 590 с.
42. Ткаченко, Е.И. Трофологические аспекты ноосферогенеза. К 90-летию со дня рождения А.М. Уголева / Е.И. Ткаченко, С.И. Ситкин, Л.С. Орешко, О.И. Медведева // *Эксп. клин. гастр.* – 2016. – Т. 2, № 126. – С. 4–13.
43. Хефтман Э. М. Биохимия стероидов / Пер. с англ. канд. хим. наук Л. В. Козлова; Под ред. и с предисл. проф. И. В. Торгова. — М.: Мир, 1972. – 176 с.
44. Чернин, В.В. Участие просветной и мукозной микробиоты кишечника

- человека в симбионтном пищеварении / В.В. Чернин, В.М. Бондаренко, А.И. Парфенов // Бюл. Оренбург. науч. центра УрО РАН (электрон. журн.). – 2013. – № 4.
45. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б. А. Шендеров // М.: Грантъ, 2001.
46. Яковлев, М.Ю. Кишечный эндотоксин и воспаление. Национальное руководство по дерматовенерологии / М.Ю. Яковлев // М.: ГЭОТАР-медиа. – 2011. – №8. – С. 99 – 414.
47. Abbas, A.K. Cellular and Molecular Immunology / A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai // Elsevier Philadelphia, PA, USA: 2014.
48. Abreu, M.T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function / M.T. Abreu // Nature Reviews Immunology. – 2010. – V. 10, N 2. – P. 131-44.
49. Akira, S. Toll-like receptor signaling / S. Akira, K. Takeda // Nature Reviews Immunology. – 2004. – N. 4. – P. 499–511.
50. Alander, M., Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption / M. Alander, R. Satokari, R. Korpela, M. Saxelin, T. Vilpponen-Salmela, T. Mattila-Sandholm // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – V. 65, N. 1. P. 351–354.
51. Alonso-Carbajo, L. Muscling in on TRP channels in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes / L. Alonso-Carbajo, M. Kecskes, G. Jacobs, A. Pironet, N. Syam, K. Talavera, R. Vennekens // Cell Calcium. – 2017. – V. 66. – P. 48-61.
52. Andonegui, G. Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: A role for CD14 versus Toll-like receptor 4 within microvessels / G. Andonegui, S.M. Goyert, P. J. Kubes // Immunology. – 2002. – V. 169. – P. 2111-2119.
53. Andrianou, X.D. Exposome-based public health interventions for infectious diseases in urban settings / X.D. Andrianou, A. Pronk, K.S. Galea, R. Stierum, M. Loh, F. Riccardo, P. Pezzotti, K.C. Makris // Environment International. – 2021. – V.146. – P. 106-246.

54. Axelsson, B.-O. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography - mass spectrometry / B.-O. Axelsson, A. Saraf, L. Larsson // *Journal of Chromatography B*. – 1995. – V. 666. – P. 77-84.
55. Bäckhed, F. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. / F. Bäckhed, H. Ding, T. Wang, L.V. Hooper, G.Y. Koh, A. Nagy, C.F. Semenkovich, J.I. Gordon // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2004. – V. 101. – P. 15718–15723.
56. Bäckhed, F. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. / F. Bäckhed, H. Ding, T. Wang, L.V. Hooper, G.Y. Koh, A. Nagy, C.F. Semenkovich, J.I. Gordon // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2004. – V. 101. – P. 15718-15723.
57. Bäckhed, F. Host-bacterial mutualism in the human intestine / F. Bäckhed, R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson, J.I. Gordon // *Science*. – 2005. – V. 25, N. 307. – P. 1915-1920.
58. Baskind, N.E. Understanding subfertility at a molecular level in the female through the application of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy / N.E. Baskind, C. McRae, V. Sharma, J. Fisher // *Human Reproduction Update*. – 2011. – V. 17, N. 2. – P. 228-241.
59. Beld, J., Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. J. Beld, D.J. Lee, M.D. Burkart, *Molecular BioSystems*. – 2015. – V. 11, N. 1. – P. 38-59.
60. Biagi, E. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians / E. Biagi, L. Nylund, M. Candela, R. Ostan, L. Bucci, E. Pini, J. Ninkila, D. Monti, R. Satokari, C. Franceschi, P. Brigidi, W. De Vos // *PLoS One*. – 2010 – V. 5, N.5. – P.10667.
61. Birek, C., Detection of *Helicobacter pylori* in oral aphthous ulcers / C. Birek, R. Grandhi, K. McNeil, D. Singer, G. Ficarra, G. Bowden // *Journal of Oral Pathology and Medicine*. – 1999. – V. 28, N. 5. – P. 197-203.
62. Bogdanov, M. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease / M. Bogdanov, W.R. Matson, L. Wang, T. Matson, R.

- Saunders-Pullman, S.S. Bressman, M. Flint Beal // *Brain*. – 2008. – V. 131, N. 2. – P. 389-396.
63. Boonen, B. Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels / B. Boonen, Y.A. Alpizar, A. Sanchez, A. Lopez-Requena, T. Voets, K. Talavera // *Cell Calcium*. – 2018. – V.73. – P. 72-81.
64. Brown, A.J. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids / A.J. Brown, S.M. Goldsworthy, A.A. Barnes, M.M. Eilert, L. Tcheang, D. Daniels, A.I. Muir, M.J. Wigglesworth, I. Kinghorn, N.J. Fraser, N.B. Pike, J.C. Strum, K.M. Steplewski, P.R. Murdock, J.C. Holder, F.H. Marshall, P.G. Szekeres, S. Wilson, D.M. Ignar, S.M. Foord, A. Wise, S. Dowell // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – P. 11312-11319.
65. Brown, A.J. Novel cannabinoid receptors / A.J. Brown // *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – V.152, N. 5. – P. 567-575.
66. Candore, G., Low grade inflammation as a common pathogenetic denominator in age-related diseases: novel drug targets for anti-ageing strategies and successful ageing achievement / G. Candore, C. Caruso, E. Jirillo, T. Magrone, S. Vasto // *Curr. Pharm.* – 2010. – V. 16. – P. 584-596.
67. Cani, P. D. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. / P. D. Cani, A. M. Neyrinck, F. Fava, C. Knauf, R. G. Burcelin, K. M. Tuohy, G. R. Gibson, N. M. Delzenne // *Diabetologia*. – 2007. – V. 50, N. 11. – P. 2374-2383.
68. Cani, P.D. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance / P.D. Cani J. Amar, M.A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A.M. Neyrinck, F. Fava, K.M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmée, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrières, J.F. Tanti, G.R. Gibson, L. Casteilla, N.M. Delzenne, M.C. Alessi, R. Burcelin // *Diabetes*. – 2007. – V. 56. – P. 1761–1772.
69. Cani, P.D. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice / P.D. Cani, R.

- Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A.M. Neyrinck, N.M. Delzenne, R. Burcelin // *Diabetes*. – 2008. – V. 57. – P.1470-1481.
- 70.Cani, P.D. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability / P.D. Cani, S. Possemiers, T. Van de Wiele, Y. Guiot, A. Everard, O. Rottier, L. Geurts, D. Naslain, A. Neyrinck, D.M. Lambert, G.G. Muccioli, N.M. Delzenne // *Gut*. – 2009. – V. 58. – P. 1091-1103.
- 71.Chong, C.Y.L. Factors Affecting Gastrointestinal Microbiome Development in Neonates / C.Y.L. Chong, F.H. Bloomfield, J.M. O'Sullivan // *Nutrients*. – 2018. – V. 10, N. 3. – P. 274.
- 72.Chu, D.M., The early infant gut microbiome varies in association with a maternal high-fat diet / D.M. Chu, K.M. Antony, J. Ma, A.L. Prince, L. Showalter, M. Moller, K.M. Aagaard // *Genome Med*. – 2016. – V. 8, N. 1. – P. 77.
- 73.Claesson, M.J., Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly / M.J. Claesson, S. Cusack, O. O'Sullivan, R. Greene-Diniz, H. de Weerd, E. Flannery, J.R. Marchesi, D. Falush, T. Dinan, G. Fitzgerald, C. Stanton, D. van Sinderen, M. O'Connor, N. Harnedy, K. O'Connor, C. Henry, D. O'Mahony, A.P. Fitzgerald, F. Shanahan, C. Twomey, C. Hill, R.P. Ross, P.W. O'Toole // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2011. – V. 108, N. 1. – P. 4586-4591.
- 74.Claesson, M.J. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly / M.J. Claesson, Jeffery I.B., Conde S., Power S.E., O'Connor E.M., Cusack S., Harris H.M., Coakley M., Lakshminarayanan B., O'Sullivan O., Fitzgerald G.F., Deane J., O'Connor M., Harnedy N., O'Connor K, O'Mahony D., van Sinderen D., Wallace M., Brennan L., Stanton C., Marchesi J.R., A.P. Fitzgerald, Shanahan F, Hill C., Ross R.P., O'Toole PW // *Nature*. – 2012. – V. 488, N. 7410. – P. 178-184.
- 75.Corsini, A. Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor / A. Corsini, M. Raiteri, M.R. Soma, F. Bernini, R. Fumagalli, R. Paoletti // *American Journal of Cardiology*. –

1995. – V. 76, N. 2. – P. 21A-28A.
76. Craciun, S. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glyceryl radical enzyme / S. Craciun, E.P. Balskus // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2012. – V. 109. – P. 21307–21312.
77. De Vadder, F. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits / F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, D. Goncalves, J. Vinera, C. Zitoun, A. Duchamp, F. Backhed, G. Mithieux // *Cell*. – 2014. – V. 156, N 1-2. – P. 84-96.
78. de Vos, W.M. Role of the intestinal microbiome in health and disease: From correlation to causation / W.M. De Vos, E.A. de Vos // *Nutrition Reviews*. – 2012. – V. 70, N 1. – P. 45-56.
79. De Wit, N. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine / N. De Wit, M. Derrien, H. Bosch-Vermeulen, E. Oosterink, S. Keshtkar, C. Duval, J. de Vogel-van den Bosch, M. Kleerebezem, Müller M., R. van der Meer // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2012. – V. 303, N. 5. – P. G589–G599.
80. Eckburg, P.B. Diversity of the human intestinal microbial flora. P.B. Eckburg, E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S.R. Gill, K.E. Nelson, D.A. Relman // *Science*. – 2005. – V. 308, N. 5728. – P. 1635-1638.
81. Everard, A. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity / A. Everard, C. Belzer, L. Geurts, J.P. Ouwerkerk, C. Druart, L.B. Bindels, Y. Guiot, M. Derrien, G.G. Muccioli, N.M. Delzenne, W.M. de Vos, P.D. Cani // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2013. – V. 110, N. 22. – P. 9066-9071.
82. Falk, E. Pathogenesis of atherosclerosis. / E. Falk // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2006. – V. 47, N. 8. – P. C7-C12.
83. Farsak, B. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in Human Atherosclerotic Plaques by PCR / B. Farsak, A. Yildirim, Y. Akyön, A. Pinar, M. Oç, E. Böke, S. Kes, L. Tokgözoğlu // *Journal of Clinical*

- Microbiology. – 2000. – V. 38, N. 12. – P. 4408-4411.
84. Fitzgerald, K. A. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex / Fitzgerald, K. A. Rowe D. C., Golenbock D. T. // *Microbes Infect.* – 2004. – V. 6, N. 15. – P. 1361-1367.
85. Fouhy, F. Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps / F. Fouhy, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, P.D. Cotter // *Gut Microbes.* – 2012. – V.3, N. 3. – P. 203-220.
86. Françoise Gavini, C.C. Differences in the Distribution of Bifidobacterial and Enterobacterial Species in Human Faecal Microflora of Three Different (Children, Adults, Elderly) Age Groups / C.C. Françoise Gavini // *Microbial Ecology in Health and Disease.* – 2001. – V. 13, N. 1. – P. 40-5.
87. Fredrickson, D.S. A System for phenotyping hyperlipoproteinemia / D.S. Fredrickson, R.S. Lees // *Circulation.* – 1965. – V. 31. – P. 321-327.
88. Funkhouser, L.J. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission / L.J. Funkhouser, S.R. Bordenstein // *PLoS Biol.* – 2013. – V.11, N. 8. – P. 1001-1631.
89. Geis, G. Unusual fatty acid substitution in lipids and lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* / G. Geis, H. Leying, S. Suerbaum, W. J. Opferkuch // *Clin. Microbiol.* – 1990. – V. 28, N. 5. – P. 930-932.
90. Geurts, L. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue / Geurts L. Lazarevic V., Derrien M., Everard A., Van Roye M., Knauf C., Valet P., Girard M., Muccioli G.G., François P., de Vos W.M., Schrenzel J., Delzenne N.M., Cani P.D. // *Frontiers in Microbiology.* – 2011. – V. 2. – P. 149.
91. Gill, S.R. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome / S.R. Gill. M. Pop, R.T. Deboy, P.B. Eckburg, P.J. Turnbaugh, B.S. Samuel, J.I. Gordon, D.A. Relman, C.M. Fraser-Liggett, K.E. Nelson // *Science.* – 2006. – V. 312, N. 5778. – P. 1355-1359.
92. Gill, S.R., Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach /

- S.R. Gill, E.M. Bik, P.B. Eckburg, K.E. Nelson, E.A. Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M.J. Blaser, D.A. Relman // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2006. – V. 103, N. 3. – P. 732-737.
93. Ginsburg, G.S., *From Science to Value* / G.S. Ginsburg, K.A. Phillips // *Precision Medicine: Health Aff (Millwood)*. – 2018. – V. 37, N. 5. – P. 694-701.
94. Goodfellow, M., *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. / M. Goodfellow, D. Minnikin // London: Academic Press. – 1985.
95. Goran, M. I. Obesity and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in children and adolescents / M. I. Goran, G. D. Ball, M. L. Cruz // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2003. – V. 88. – P. 1417-1427.
96. Gosalbes, M.J. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants / M.J. Gosalbes, S. Llop, Y. Vallès, A. Moya, F. Ballester, M.P. Francino // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2013. – V. 43, N. 2. – P. 198-211.
97. Gurr, M.I. *Lipids: Biochemistry, Biotechnology and Health, 6-th Edition* / M.I. Gurr, J.L. Harwood, K.N. Frayn, D.J. Murphy, R.H. Michell // Wiley-Blackwell. – 2016. – P. 151-164.
98. Hardy, D.S. Association of glycemic index and glycemic load with risk of incident coronary heart disease among Whites and African Americans with and without type 2 diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities Study / D.S. Hardy, D.M. Hoelscher, C. Aragaki, J. Stevens, L.M. Steffen, J.S. Pankow, E. Boerwinkle // *Annals of Epidemiology*. – 2010. – V. 20, N. 8. – P. 610-616.
99. Hayashi, H. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP / H. Hayashi, M. Sakamoto, M. Kitahara, Y. Benno // *Medical Microbiology and Immunology*. – 2003 – V. 47. – P. 557-570.
100. He, F. Differences in Composition and Mucosal Adhesion of Bifidobacteria Isolated from Healthy Adults and Healthy Seniors / F. He, A.C. Ouwehand, E. Isolauri, M. Hosoda, Y. Benno, S. Salminen // *Current Microbiology*. – 2014. – V. 43, N. 5. – P. 351–354.

101. Ho, D. Enabling Technologies for Personalized and Precision Medicine. / Quake, S. R., McCabe, E., Chng, W. J., Chow, E. K., Ding, X., Gelb, B. D., Ginsburg, G. S., Hassenstab, J., Ho, C. M., Mobley, W. C., Nolan, G. P., Rosen, S. T., Tan, P., Yen, Y., Zarrinpar, A. // *Trends in biotechnology*. – 2020. – V. 38, N. 5. – P. 497–518.
102. Hopkins, M. J., Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. / M. J. Hopkins, G. T. Macfarlane // *Journal of Medical Microbiology*. – 2002. – V. 51, N. 5. – P. 448-454.
103. Hopkins M.J. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. / M.J. Hopkins, R. Sharpe, G.T. Macfarlan // *Gut*. – 2001. – V. 48, N. 2. – P. 198-205.
104. Howell, S.A. Sterols of fungi responsible for superficial skin and nail infection / S.A. Howell, M.K. Moore, A.I. Mallet, W.C. Noble // *Journal of general microbiology*. – 1990. – V. 136, N. 2. – P. 241-247.
105. Hu, C. Multi-omics profiling: the way towards precision medicine in metabolic diseases. / C. Hu, W. Jia // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2021. – V.13, N. 8. – P. 576-593.
106. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. – 2012. – V. 486. P. 207-214.
107. Jantzen, E. Fatty acid taxonomy of *Haemophilus* species, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus vaginalis* (*Corinebacterium vaginale*) / Jantzen E., Berdal B.P., Omland T. // *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. – 1991. – V. 88. – P. 89-93.
108. Jašarević, E. The maternal vaginal microbiome partially mediates the effects of prenatal stress on offspring gut and hypothalamus / E. Jašarević Howard C.D., K. Morrison, Misic. A, Weinkopff T., Scott P., Hunter C., Beiting D., T.L. Bale // *Nature neuroscience*. – 2018. – V. 21, N. 8. – P. 1061-1071.
109. Jeffery, I.B. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-

- specific alterations in faecal microbiota / I.B. Jeffery, P.W. O'Toole, L. Öhman, n M.J. Claesso, J. Deane, E.M. Quigley, M. Simrén // *Gut*. – 2012. – V. 61, N. 7. – P. 997-1006.
110. Jernberg, C., Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota / C. Jernberg, S. Lofmark, C. Edlund, J.K. Jansson // *Microbiology*. – 2010. – V. 156. – P. 3216-3223.
111. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol*. 2005 Oct;51(4):270-4.
112. Jin, Q. Metabolomics in Diabetes and Diabetic Complications: Insights from Epidemiological Studies / Q. Jin, R.C.W. Ma // *Cells*. – 2021. V. 10, N. 11. – P. 2832.
113. Jones, P.M., Clinical applications of 3-hydroxy fatty acid analysis by gas chromatography-mass spectrometry / Jones, P.M., Bennett, M.J. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – V. 1811, N. 11. – P. 657-662.
114. Joseph E. Pizzorno and Michael T. Murray *Textbook of Natural Medicine*. Book. – Fifth Edition. – 2020.
115. Kaddurah-Daouk, R. Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases / Kaddurah-Daouk R., Krishnan K.R.R. // *Neuropsychopharmacology*. – 2009. – V. 34, N. 1. – P. 173-186.
116. Kaddurah-Daouk, R. Metabolomic changes in autopsy-confirmed Alzheimer's disease / R. Kaddurah-Daouk, Rozen S., W. Matson, Han X., Hulette C.M., J.R. Burke, Doraiswamy P.M., K.A. Welsh-Bohmer // *Alzheimer's & Dementia Journal*. – 2011. – V. 7, N. 3. – P. 309-317.
117. Kalliomäki, M. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight / M. Kalliomäki, M.C. Collado, S. Salminen, E. Isolauri // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2008. – V. 87. – P. 534–538.
118. Kalliomäki, M. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. / M. Kalliomäki, M.C. Collado, S. Salminen, E.

- Isolaure // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2008. – V. 87. – P. 534–538.
119. Karlsson, F. H. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control / F. Karlsson H., V. Tremaroli, Nookaew I., G. Bergstrom, C. J. Behre, Fagerberg B., Nielsen J., F. Backhed // Nature. – 2013. – V. 498, N. 7452. – P. 99-103.
120. Kimura, I. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43 / I. Kimura, K. Ozawa, D. Inoue, T. Imamura, K. Kimura, T. Maeda, Terasawa K., Kashihara D., Hirano K., T. Tani, T. Takahashi, S. Miyauchi, G. Shioi, H. Inoue, Tsujimoto G // Nature Communications. – 2013. – V. 4. – P. 1829
121. Kini, V. A new role for PTEN in regulating transient receptor potential canonical channel 6-mediated Ca^{2+} entry, endothelial permeability, and angiogenesis. / V. Kini, A. Chavez, D. Mehta // Journal of Biological Chemistry. – 2010. – V. 285. – P. 33082–33091.
122. Koeth, R. A. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis / R.A. Koeth, Z. Wang, B.S. Levison, J.A. Buffa, E. Org, B.T. Sheehy, E.B. Britt, X. Fu, Y. Wu, L. Li, J.D. Smith, J.A. DiDonato, J. Chen, Li H., Wu G.D., Lewis J.D., M. Warriar, J.M. Brown, R.M. Krauss, W.H. Tang, F.D. Bushman, A.J. Lusic, S.L. Hazen // Nature Medicine. – 2013. – V. 19. – P. 576–585.
123. Kulshin, V. A. Structural characterization of the lipid A component of *Pseudomonas aeruginosa* wild-type and rough mutant lipopolysaccharides / V.A. Kulshin, U. Zähringer, B. Lindner, K.E. Jäger, B.A. Dmitriev, E.T. Rietschel // European journal of biochemistry. – 1991. – V. 198, N. 3. – P. 697-704.
124. Laing, R. J. ThermoTRPs and pain / R.J. Laing, A. Dhaka // The Neuroscientist. – 2016. – V. 22. – P. 171–187.
125. Larsen, N., Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults / N. Larsen, F.K. Vogensen, F.W. van den Berg, D.S. Nielsen, A.S. Andreasen, B.K. Pedersen, W.A. Al-Soud, S.J. Sørensen, L.H.

- Hansen, M. Jakobsen // PLoS One. – 2010. – V. 5, N. 2. – P. e9085.
126. le Roy, T. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice / T. le Roy, M. Llopis, P. Lepage, A. Bruneau, S. Rabot, Bevilacqua C., Martin P., Philippe C., Walker F., Bado A., G. Perlemuter, A.M. Cassard-Doulicier, P. Gérard // Gut. – 2013. – V. 62, N. 12. – P. 1787-1794.
127. Ley, R. E., Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity / R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, J. I. Gordon // Nature. – 2006. – V. 444, N. 7122. – P. 1022-1023.
128. Ley, R. E. Obesity alters gut microbial ecology / R.E. Ley, F. Bäckhed, P. Turnbaugh, C.A. Lozupone, R.D. Knight, J.I. Gordon // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2005. – V. 102. – P. 11070-11075.
129. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. / P. Libby // Nature. – 2002. – V. 420, N. 6917. – P. 868–874.
130. Lozupone, C.A. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota / Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon J.I., Jansson J.K., Knight R // Nature. – 2012. – V. 489. – P. 220-230.
131. Mahla, R.S. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology / Mahla R.S., Reddy M.C., Prasad D.V., Kumar H. // Frontiers in Immunology. – 2013. – V. 4. – P. 248.
132. Mahowald, M.A., Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla / M.A. Mahowald, F.E. Rey, H. Sedorf, P.J. Turnbaugh, R.S. Fulton, A. Wollam, Shah N., C. Wang, V. Magrini, R.K. Wilson, B.L. Cantarel, P.M. Coutinho, Henrissat B., Crock L.W., Russell A., Verberkmoes N.C., Hettich R.L., J.I. Gordon // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2009. – V. 106, N. 14. – P. 5859-5864.
133. Mäkituokko, H. The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition / H. Mäkituokko, K. Tiihonen, S. Tynkkynen, L. Paulin, N. Rautonen // British Journal of Nutrition. – 2010. – V. 103, N. 2. – P. 227-234.
134. Mandal, S. Fat and vitamin intakes during pregnancy have stronger

- relations with a pro-inflammatory maternal microbiota than does carbohydrate intake / S. Mandal, K.M. Godfrey, D. McDonald, W.V. Treuren, J.V. Bjørnholt, Midtvedt T., Moen B., Rudi K., R. Knight, A.L. Brantsæter, S.D. Peddada, M. Eggesbø // *Microbiome*. – 2016. – V. 4, N. 1. – P. 55.
135. Mannheim, W. Systematik von *Actinobacillus*, *Haemophilus* and *Pasteurella*: Basenzusammensetzung der DNS, Atmungschinone und kulturell-biochemische Eigenschaften repräsentativer Sammlungsstämme / W. Mannheim, S. Pohl, R. Holländer // *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene*. – 1980. – V. 246, N. 4. – P. 512-540.
136. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BioMed Central*. – 2009. – V. 9. – P. 123.
137. Martínez Arbas, S. Challenges, Strategies, and Perspectives for Reference-Independent Longitudinal Multi-Omic Microbiome Studies / S. Martínez Arbas, S.B. Busi, P. Queirós, L. de Nies, M. Herold, P. May, P. Wilmes, E.E.L. Muller, S. Narayanasamy // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – V. 12. – P. 666244.
138. Mayberry, W. R. Identification of *Bacteroides species* by cellular fatty acid profiles / W.R. Mayberry, D.W. Lambe, K.P. Jr. Ferguson // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1982. – V. 32, N. 1. – P. 21
139. Mehal, W. Z. The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD / W. Z. Mehal // *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. – 2013. – V. 10, N. 11. – P. 637-644.
140. Mehta, D. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability / D. Mehta, A.B. Malik // *Physiological Reviews*. – 2006. – V. 86. – P. 279-367.
141. Meseguer, V. TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins / V. Meseguer, Y.A. Alpizar, Luis E., Tajada S., Denlinger B., Fajardo O., Manenschijn J.A., Fernández-Peña C., A. Talavera, Kichko T., B. Navia, Sánchez A., Señarís R., Reeh P., M.T. Pérez-García, López-López J.R., T. Voets, Belmonte C., Talavera K, F. Viana // *Nature Communications*. – 2014. – V. 5. – P. 3125.

142. Michel, J. B. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury / J.B. Michel, O. Thauinat, X. Houard, O. Meilhac, G. Caligiuri, A. Nicoletti // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2007. – V. 27, N. 6. – P. 1259–1268.
143. Miller, G. W. The exposome in the community / G. W. Miller // *The Exposome*. – 2020. – P. 211–235.
144. Moles, L. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life / L. Moles M. Gómez, H. Heilig, G. Bustos, S. Fuentes, W. de Vos, L. Fernández, Rodríguez J.M., E. Jiménez // *Public Library of Science One*. – 2013. – V. 8, N. 6. – P. e66986.
145. Mosca, A. Cellular Fatty Acid Composition, Soluble-Protein Profile, and Antimicrobial Resistance Pattern of *Eubacterium lentum* / A. Mosca, P. Summanen, S. M. Finegold, G. De Michele, G. Miragliotta // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1998. – V. 36, N. 3. – P. 752–755.
146. Moss, C. W. Cellular fatty acids of *Peptococcus variabilis* and *Peptostreptococcus anaerobius* / C.W. Moss, M.A. Lambert, G.L. Lombard // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1977. – V. 5, N. 6. – P. 665-667.
147. Moss, C. W. Identification of microorganisms by gas chromatographic – mass spectrometric analysis of cellular fatty acids / C.W. Moss, S.R. Dees // *Journal of Chromatography A*. – 1985. – V. 12. – P. 595–604.
148. Mott, G. E. Plasmonylethanolamin: growth factor for cholesterol-reducing *Eubacterium* / G.E. Mott, A.W. Brinkley // *Journal of Bacteriology*. – 1979. – V. 139, N. 3. – P. 755-760
149. Muccioli, G. G. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex / G. G. Muccioli // *Drug Discovery Today*. – 2010. – V. 15. – P. 11-12.
150. Muccioli, G. G. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. G. G. Muccioli, D. Naslain, F. Backhed, C. S. Reigstad, D. M. Lambert, N. M. Delzenne, P. D. Cani // *Molecular Systems Biology*. – 2010. – V.

6. – P. 392.
151. Mueller, S., Saunier K., Hanisch C., Norin E., Alm L., Midtvedt T., Cresci A., Silvi S., Orpianesi C, Verdenelli M.C., Clavel T., Koebnick C., Zunft H.J., Doré J., Blaut M. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72, N. 2. – P. 1027-1033.
152. Mulier M., Vriens J., Voets T. TRP channel pores and local calcium signals. *Cell Calcium*. – 2017. – V. 66. – P. 19–24.
153. Musso, G. Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for metabolic disorders / G. Musso, R. Gambino, M. Cassader // *Current Opinion in Lipidology* 2010. – V. 21. – P. 76-83.
154. Nagpal, R. Gut Microbiota Composition in Healthy Japanese Infants and Young Adults Born by C-Section / R. Nagpal, Y. Yamashiro // *Annals of Nutrition and Metabolism*. – 2018. – V. 73, N. 3. – P. 4-11.
155. Nicholson, J. K. Systems biology: Metabonomics / J. K. Nicholson, J. C. Lindon // *Nature*. – 2008. – V. 455, N. 7216. – P. 1054-1056.
156. Nicholson J.K. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data / J.K. Nicholson, J.C. Lindon, Holmes E // *Xenobiotica*. – 1999. – V. 29, N. 11. – P. 1181-1189.
157. Odamaki T. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study / T. Odamaki, K. Kato, Sugahara H., Hashikura N., Takahashi S., Xiao J.Z., Abe F., R. Osawa // *BioMed Central Microbiology*. – 2016. – V. 16. – P. 90.
158. Parekh, P.J. The role and influence of gut microbiota in pathogenesis and management of obesity and metabolic syndrome / P.J. Parekh, Arusi E., Vinik A.I., D.A. Johnson // *Frontiers in Endocrinology*. – 2014. – V. 5. – P. 47.
159. Park, B.S., Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes / B.S. Park, J.O. Lee // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2013. – V. 45. – P.

e66

160. Pauling L., Robinson A.B., Teranishi R., Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography // Proceedings of the National Academy of Sciences USA – 1971. – V. 68, N. 10. – P. 2374-2376.
161. Pears M.R., Cooper J.D., Mitchison H.M. et al. High resolution ¹HNMR-based metabolomics indicates a neurotransmitter cycling deficit in cerebral tissue from a mouse model of Batten disease // Journal of Biological Chemistry. – 2005. – V. 280, N. 52. – P. 42508-42514.
162. Perera C.J., Role of Pancreatic Stellate Cell-Derived Exosomes in Pancreatic Cancer-Related Diabetes: A Novel Hypothesis / Falasca M., Chari S.T., Greenfield J.R., Xu Z., Pirola R.C., Wilson J.S., Apte M.V. // Cancers (Basel). – 2021. – V. 13, N. 20. – P. 5224.
163. Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., Liang S., Zhang W., Guan Y., Shen D., Peng Y., Zhang D., Jie Z., Wu W., Qin Y., Xue W., Li J., Han L., Lu D., Wu P., Dai Y., Sun X., Li Z., Tang A., Zhong S., Li X., Chen W., Xu R., Wang M., Feng Q., Gong M., Yu J., Zhang Y., Zhang M., Hansen T., Sanchez G., Raes J., Falony G., Okuda S., Almeida M., LeChatelier E., Renault P., Pons N., Batto J.M., Zhang Z., Chen H., Yang R., Zheng W., Li S., Yang H., Wang J., Ehrlich S.D., Nielsen R., Pedersen O., Kristiansen K., Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes // Nature. – 2012. – V. 490, N. 7418. – P. 55-60
164. Rajilic-Stojanovic, M. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults / Rajilic-Stojanovic M., Heilig H.G., Molenaar D., Kajander K., Surakka A., Smidt H., de Vos W.M. // Environ Microbiology. – 2009. – V. 11, N. 7. – P. 1736-1751.
165. Rakoff-Wahoum, S. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis / Rakoff-Wahoum S., Paglino J., Esmali-Varzaeh F., Edberg S., Medzhitov R. // Cell. – 2004. – V. 118, N. 2. – P. 229-241.

166. Rautava, S. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial / Rautava S., Collado M.C., Salminen S., Isolauri E. // *Neonatology*. – 2012. – V. 102, N. 3. – P. 178-84.
167. Reiner, Z. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) / Reiner Z., Catapano A.L., De Backer G., Graham I., Taskinen M.R., Wiklund O., Agewall S., Alegria E., Chapman M.J., Durrington P., Erdine S., Halcox J., Hobbs R., Kjekshus J., Filardi P.P., Riccardi G., Storey R.F., Wood D // *European Heart Journal*. – 2011. –V. 32, N. 14. – P. 1769-818.
168. Rigottier-Gois, L. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis / L. Rigottier-Gois // *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*. – 2013. –V. 7, N. 7. – P. 1256-1261.
169. Rizzo, A. F. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of lactobacilli / Rizzo A. F., Korkeala H., Mononen I. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1987. – V. 53, N. 12. – P. 2883-2888.
170. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s / R. Ross // *Nature*. – 1993. – V. 362, N. 6423. – P. 801–809.
171. Rutayisire, E. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants life: a systematic review / Rutayisire E., Huang K., Liu Y., Tao F. // *BioMed Central Gastroenterology*. – 2016. – V. 16, N. 1. – P. 86.
172. Sadzikowski, M. R. Cholesterol-reducing bacterium from human feces / Sadzikowski M. R., Sperry JF, Wilkins T.D. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1977. – V. 34, N. 4. – P. 355-362.
173. Salazar, N., Microbial targets for the development of functional foods accordingly with nutritional and immune parameters altered in the elderly / Salazar N., López P., Valdés L., Margolles A., Suárez A., Patterson A.M., Cuervo

- A., de los Reyes-Gavilán C.G., Ruas-Madiedo P., González S., Gueimonde M. // *Journal of the American College of Nutrition*. – 2013. – V. 32. – P. 399-406.
174. Sands, W.A. The role of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C in the production of diacylglycerol for nitric oxide synthesis in macrophages activated by IFN-gamma and LPS / W.A. Sands, J.S. Clark, F.Y. Liew // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1994. – V. 199. – P. 461-466.
175. Santos S. Applying the exposome concept in birth cohort research: a review of statistical approaches / Maitre L, Warembourg C, Agier L, Richiardi L, Basagaña X, Vrijheid M. // *European Journal of Epidemiology*. – 2020. – V. 35, N. 3. – P. 193-204.
176. Saraswati, S. Aging and the human gut microbiota-from correlation to causality / Saraswati S. Sitaraman R. // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – V. 5 – P. 764.
177. Schappe, M.S. Chanzyme TRPM7 mediates the Ca²⁺ influx essential for lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 endocytosis and macrophage activation / Sztejn K., Stremaska M.E., Mendu S.K., Downs T.K., Seegren P.V., Mahoney M.A., Dixit S, Krupa JK, Stipes EJ, Rogers JS, Adamson S.E., Leitinger N., Desai BN // *Immunity*. – 2018. – V. 48. – P. 59-74.
178. Scher, J.U. The microbiome and rheumatoid arthritis / J.U. Scher, S.B. Abramson // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2011. – V. 7, N. 10. – P. 569-578.
179. Schwartz, A. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects / Schwartz A., Taras D., Schäfer K., Beijer S., Bos N.A., Donus C., Hardt P.D. // *Obesity (Silver Spring)*. – 2010. – V. 18. – P. 190-195.
180. Seid, R.C.Jr. Identification of ester-linked fatty acids of bacterial endotoxins by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry / Seid R.C. Jr., Bone W.M., Phillips L.R. // *Analytical Biochemistry*. – 1986. – V. 155, N. 1. – P. 168-176.
181. Sherlock. Microbial identification system. Database on microbial cellular fatty acids / MIDI Inc. Delavare. – 1994.

182. Shih, D.M. Flavin containing monooxygenase 3 exerts broad effects on glucose and lipid metabolism and atherosclerosis / Shih D.M., Wang Z., Lee R., Meng Y., Che N., Charugundla S., Qi H., Wu J., Pan C., Brown J.M., Vallim T., Bennett B.J., Graham M., Hazen S.L., Lusis A.J. / *Journal of Lipid Research*. – 2015. – V. 56. – P. 22-37.
183. Sousa-Valente, J. A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation / Sousa-Valente J., Brain S.D. // *Seminars in immunopathology* – 2018. – V. 40. – P. 229-236.
184. Stead, D.E. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria / Stead D.E., Sellwood J.E., Wilson J., I. Viney. // *Journal of applied bacteriology*. – 1992. – V. 72. – P. 315-321.
185. Steel, J.H. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor / Steel J.H., Malatos S., Kennea N., Edwards A.D., Miles L., Duggan P., Reynolds P.R., Feldman R.G., Sullivan M.H. // *Journal of Pediatric Research*. – 2005. – V. 57, N. 3. – P. 404-411.
186. Steinberger, J. Obesity, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk in children: an american heart association scientific statement from the atherosclerosis, hypertension, and obesity in the young committee (council on cardiovascular disease in theyoung) and the diabetes committee (council on nutrition, physical activity, and metabolism) / J. Steinberger, R. Daniels // *Circulation*. – 2003. – V. 107. – P. 1448-1453.
187. Tang, W.H. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk / Tang W.H., Wang Z., Levison B.S., Koeth R.A., Britt E.B., Fu X., Wu Y, Hazen S.L. // *The New England Journal of Medicine*. – 2013. – V. 368. – P. 1575–1584.
188. Tarazona, S. Harmonization of quality metrics and power calculation in multi-omic studies / Tarazona S., Balzano-Nogueira L, Gómez-Cabrero D., Schmidt A., Imhof A., Hankemeier T., Tegnér J., Westerhuis J.A., Conesa A. // *Nature Communications*. – 2020. – V. 11, N. 1. – P. 3092.

189. Tarini, J. The fermentable fibre inulin increases postprandial serum short-chain fatty acids and reduces free-fatty acids and ghrelin in healthy subjects / Tarini J., Wolever T. M. // *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. – 2010. – V. 35, N 1. – P. 9-16.
190. Tauseef M., TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation / Tauseef M Knezevic N., Chava K.R., Smith M., Sukriti S., Gianaris N., Obukhov A.G., Vogel S.M., Schraufnagel D.E., Dietrich A., Birnbaumer L., Malik A.B., Mehta D. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2012. – V. 209. – P. 1953-1968.
191. Thomas, C. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis / Thomas C., Gioiello A., Noriega L., Strehle A., Oury J., Rizzo G., Macchiarulo A., Yamamoto H., Matakaki C., Pruzanski M., Pellicciari R., Auwerx J., Schoonjans K. // *Cell Metabolism*. – 2009. – V. 10, N. 3. – P. 167-177.
192. Tiihonen, K. Human intestinal microbiota and healthy ageing / Tiihonen K., Ouwehand A.C., Rautonen N. // *Ageing Research Reviews*. – 2010. – V. 9. – P. 107-116.
193. Tolhurst, G. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2 / Tolhurst G. Heffron H., Lam Y. S., Parker H. E., Habib A. M., Diakogiannaki E., Cameron J., Grosse J., Reimann F., Gribble F. M. // *Diabetes*. – 2012. – V. 61, N 2. – P. 364-371.
194. Tongeren, S.P. Fecal microbiota composition and frailty / Tongeren S.P., Slaets J.P., Harmsen H.J., Welling G.W. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71, N. 10. – P. 6438-6442.
195. Tschop, M.H. Getting to the core of the gut microbiome / Tschop M.H., Hugenholtz P., Karp C.L. // *Nature Biotechnology*. – 2009. – V. 27, N. 4. – P. 344-346.
196. Turnbaugh, P. J., Ley R. E., Mahowald M. A., Magrini V., Mardis E. R., Gordon J. I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest // *Nature*. – 2006. – V. 444, N. 7122. – P. 1027-1031.
197. Vallejo, A.N. Immunological hurdles of ageing: indispensable research of

- the human model / A.N. Vallejo // *Ageing Research Reviews*. – 2011. – V. 10. – P. 315-318.
198. Vasilopoulos, T. Comorbidity and chronic conditions in the National Social Life, Health and Aging Project (NSHAP), Wave 2 / Vasilopoulos T Kotwal A., Huisingh-Scheetz M.J., Waite L.J., McClintock M.K., Dale W. // *The Journals of Gerontology: Series B*. – 2014. – V. 69, N. 2. – P. S154–165.
199. Veerkamp J. H. Fatty Acid Composition of Bifidobacterium and Lactobacillus Strains // *Bacteriology*. – 1971. – V. 108, N. 2. – P. 861–867.
200. Vermeulen, R. The exposome and health: Where chemistry meets biology / Vermeulen R., Schymanski E.L., Barabási A.L., Miller G.W. // *Science*. – 2020. – V. 367, N. 6476. – P. 392-396.
201. Wang Q.Y., Current progress in metabolomics of gestational diabetes mellitus / You L.H., Xiang L.L., Zhu Y.T., Zeng Y. // *World Journal of Diabetes*. – 2021. – V. 12, N. 8. – P. 1164-1186.
202. Wang, Z. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease / Klipfell E., Bennett B.J., Koeth R., Levison B.S., Dugar B., Feldstein A.E., Britt E.B., Fu X., Chung Y.M., Wu Y., Schauer P., Smith J.D., Allayee H., Tang W.H., DiDonato J.A., Lusis A.J., Hazen S.L.// *Nature*. – 2011. – V. 472. – P. 57-63.
203. Warraich, H.L. Role for combination therapy in diabetic dyslipidemia // Wong N.D., Rana J.S. / *Current Cardiology Reports*. – 2015. – V. 17, N. 5. – P. 32.
204. Warriar, M. The tmao-generating enzyme flavin monooxygenase 3 is a central regulator of cholesterol balance / Warriar M., Shih D.M., Burrows A.C., Ferguson D., Gromovsky A.D., Brown A.L., Marshall S., McDaniel A., Schugar R.C., Wang Z., Sacks J., Rong X., Vallim T.A., Chou J., Ivanova P.T., Myers D.S., Brown H.A., Lee R.G., Crooke R.M., Graham M.J., Liu X., Parini P., Tontonoz P., Lusis A.J., Hazen S.L., Temel R.E., Brown J.M. // *Cell Reports*. – 2015. – v. 10, N. 3. – P. 326-338.
205. Watanabe M., Bile acids induce energy expenditure by promoting

- intracellular thyroid hormone activation / Watanabe M., Houten S.M., Matakı C., Christoffolete M.A., Kim B.W., Sato H., Messaddeq N., Harney J.W., Ezaki O., Kodama T., Schoonjans K., Bianco A.C., Auwerx J. // *Nature*. – 2006. – V. 439. – P. 484-489.
206. Weissmann, N. Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice / Weissmann N., Sydykov A., Kalwa H., Storch U., Fuchs B., Mederos y Schnitzler M., Brandes R.P., Grimminger F., Meissner M., Freichel M., Offermanns S, Veit F., Pak O., Krause K.H., Schermuly R.T., Brewer A.C., Schmidt H.H., Seeger W., Shah A.M., Gudermann T., Ghofrani H.A., Dietrich A. // *Nature Communications*. – 2012. – V. 3. – P. 649.
207. Weverling-Rijnsburger, A.W. Total cholesterol and risk of mortality in the oldest old / Blauw G.J., Lagaay A.M., Knook D.L., Meinders A.E., Westendorp R.G. // *Lancet*. – 1997. –V. 18, N. 350. – P. 1119–1123.
208. Whitfield, C. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides / Whitfield C., Trent M.S. // *Annu Rev Biochem*. – 2014. – V. 83. – P. 99-128.
209. Wild, C. P. The exposome: from concept to utility / C. P. Wild // *International journal of epidemiology*. – 2012. – V. 41, N. 1, P. 24-32.
210. Woodmansey, E.J. Intestinal bacteria and ageing / E.J. Woodmansey // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2017. – V. 102. – P. 1178-86;
211. Xue J., Towards Mass Spectrometry-Based Chemical Exposome: Current Approaches, Challenges, and Future Directions / Lai Y., Liu C.W., Ru H. // *Toxics*. – 2019. – V. 7, N. 3. – P. 41.
212. Yang, J. Potential metabolite markers of schizophrenia / Yang J., Chen T., Sun L., Zhao Z., Qi X., Zhou K., Cao Y., Wang X., Qiu Y., Su M., Zhao A., Wang P., Yang P., Wu J., Feng G., He L., Jia W., Wan C. // *Molecular Psychiatry* – 2013. – V. 18, N. 1. – P. 67-78.
213. Zhang, L. Lipopolysaccharide activated phosphatidylcholine-specific phospholipase c and induced IL-8 and MCP-1 production in vascular endothelial cells / Zhang L., Li H.Y., Li H., Zhao J., Su L., Zhang Y., Zhang S.L., Miao J.Y.

// Journal of Cellular Physiology. – 2011. – V. 226. – P. 1694-1701.

214. Zhang, Y. Emerging Applications of Metabolomics to Assess the Efficacy of Traditional Chinese Medicines for Treating Type 2 Diabetes Mellitus / Yang Y., Ding L., Wang Z., Xiao Y., Xiao W. // Frontiers in Pharmacology. – 2021. – V. 12. – P. 735410.
215. Zoetendal, E.G. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract / Zoetendal E.G., Akkermans A.D., Akkermans-van Vliet W.M., Visser JAGM, Vos W.M. // Microbial Ecology in Health and Disease. – 2001. – V. 13. – P. 129-134.
216. Zou, Z.H. Prenatal and postnatal antibiotic exposure influences the gut microbiota of preterm infants in neonatal intensive care units / Z.H. Zou, D. Liu, Li H.D., Zhu D.P., He Y., Hou T., J.L. Yu // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2018. – V. 17, N. 1. – P.9
217. Zwielehner, J. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of *Bacteroides*, *Bifidobacteria* and *Clostridium cluster IV* in institutionalized elderly / J. Zwielehner, K. Liszt, M. Handschur, C. Lassl, A. Lapin, A.G. Haslberger // Experimental Gerontology. – 2009. – V. 44, N. 7. – P. 440-446.