

Диагностический потенциал кишечной микробиоты при болезни Паркинсона

Петров В.А.¹, Алифирова В.М.¹, Салтыкова И.В.¹, Жукова И.А.¹, Жукова Н.Г.¹, Дорофеева Ю.Б.¹, Иккерт О.П.^{1,2}, Миронова Ю.С.¹, Титова М.А.¹, Сазонов А.Э.¹, Карпова М.Р.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, проспект Ленина, 36

РЕЗЮМЕ

Введение. В настоящий момент ведется активная работа по поиску биомаркеров болезни Паркинсона (БП), в частности для проведения ранней диагностики данного заболевания. Одним из потенциальных источников биомаркеров является кишечная микробиота, изменения в составе которой при БП активно изучаются.

Целью данной работы является идентификация микробиотных биомаркеров БП с оцененной точностью диагностики, в том числе и дифференциальной, относительно других неврологических заболеваний для пациентов российской популяции.

Материалы и методы. В исследование было включено 192 метагеномных профиля кишечной микробиоты, полученных в результате ампликонного секвенирования бактериальной 16S рРНК от пациентов с болезнью Паркинсона ($n = 93$), лиц контрольной группы ($n = 66$) и другими неврологическими заболеваниями ($n = 33$). Для создания классифицирующих моделей использовали наивный байесовский классификатор, искусственную нейронную сеть, машину опорных векторов, обобщенную линейную модель и регрессию методом частичных наименьших квадратов.

Результаты. Оптимальные показатели классификации пациентов по составу кишечной микробиоты на валидационной выборке (чувствительность 91,30%, специфичность 91,67% при точности в 91,49%) продемонстрировал наивный байесовский алгоритм при использовании представленности микроорганизмов родов *Christensenella*, *Methanobrevibacter*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Catabacter*, *Desulfovibrio*, *Sphingomonas*, *Yokenella*, *Atopobium*, *Fusicatenibacter*, *Cloacibacillus*, *Bulleidia*, *Acetanaerobacterium* и *Staphylococcus* в качестве предикторов.

Выводы. Информация о таксономическом составе кишечной микробиоты может быть использована для проведения дифференциальной диагностики болезни Паркинсона.

Ключевые слова: микробиота кишечника, болезнь Паркинсона, 16S секвенирование, машинное обучение, диагностика.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта программы УМНИК (договор № 7588ГУ/2015 от 22.09.2015) и гранта РФФИ № 18-415-703004.

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие. Исследование одобрено независимым этическим комитетом СибГМУ (протокол № 3669 от 22.12.2014).

✉ Петров Вячеслав Алексеевич, e-mail: vyacheslav.a.petrov@mail.ru.

Для цитирования: Петров В.А., Алифирова В.М., Салтыкова И.В., Жукова И.А., Жукова Н.Г., Дорофеева Ю.Б., Иккерт О.П., Миронова Ю.С., Титова М.А., Сазонов А.Э., Карпова М.Р. Диагностический потенциал кишечной микробиоты при болезни Паркинсона. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (4): 92–101. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-4-92-101>

УДК 616.858:616.34-008.87]-07

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-4-92-101>

Diagnostic potential of gut microbiota in Parkinson's disease

Petrov V.A.¹, Alifirova V.M.¹, Saltykova I.V.¹, Zhukova I.A.¹, Zhukova N.G.¹, Dorofeeva Yu.B.¹, Ikkert O.P.^{1,2}, Titova M.A.¹, Mironova Yu.S.¹, Sazonov A.E.¹, Karpova M.R.¹

¹ Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk State University
36, Lenin Ave., 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Background. Nowadays many efforts are taken in searching for Parkinson's disease biomarkers, especially for an early recognition of the disease. The gut microbiota is one of the potential sources of biomarkers, changes in the composition of which in PD are actively studied.

The aim of this study is to identify microbiota biomarkers in the Parkinson's disease with an estimated accuracy of the diagnostics, including differential diagnostics, relative to other neurological diseases for patients of the Russian population.

Material and methods. One hundred ninety-two metagenomics profiles from patients with Parkinson's disease ($n = 93$), people with other neurological diagnoses ($n = 33$), and healthy controls ($n = 66$) were included in this study. These profiles were obtained with amplicon sequencing of bacterial 16S rRNA genes. Classifying models were made using the naive Bayes classifier, the artificial neural network, support vector machine, generalized linear model, and partial least squares regression.

As a result we established that an optimal classification by the composition of the gut microbiota on the validation sample (sensitivity 91.30%, specificity 91.67% at 91.49% accuracy) amid patients was demonstrated with a naive Bayes classifier using the representation of the following genera as predictors: *Christensenella*, *Methanobrevibacter*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Catabacter*, *Desulfovibrio*, *Sphingomonas*, *Yokenella*, *Atopobium*, *Fusicatenibacter*, *Cloacibacillus*, *Bulleidia*, *Acetanaerobacterium*, and *Staphylococcus*.

Conclusions. Information of the gut microbiota taxonomic composition may be used in differential diagnosis of Parkinson's disease.

Key words: gut microbiota, Parkinson's disease, 16S rRNA gene sequencing, machine learning, diagnostics.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This work was supported by the grant of the UMNIK program (agreement No. 7588GU / 2015 dated 09/22/2015) and the grant of the Russian Foundation for Basic Research No. 18-415-703004.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed informed consent. The study approved by the ethical Committee of the SSMU (Protocol No. 3669 or 22.12.2014).

For citation: Petrov V.A., Alifirova V.M., Saltykova I.V., Zhukova I.A., Zhukova N.G., Dorofeeva Yu.B., Ikkert O.P., Titova M.A., Mironova Yu.S., Sazonov A.E., Karpova M.R. Diagnostic potential of gut microbiota in Parkinson's disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (4): 92–101. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-4-92-101>.

ВВЕДЕНИЕ

Среди неврологических заболеваний важное место занимает болезнь Паркинсона (БП) – хроническое нейродегенеративное заболевание, поражающее дофаминергические нейроны черной субстанции головного мозга и проявляющееся, в первую очередь, в виде моторных нарушений: ригидности, дрожания, постуральной нестабильности. На настоящий момент БП поражены около 4 млн человек по всему миру, и ее распространенность в популяции, согласно прогнозам, будет только возрастать [1]. Ввиду отсутствия методов радикальной терапии заболевания, с одной стороны, и длительного периода бессимптомного течения – с другой, большое внимание уделяется поиску подходов к ранней диагностике БП, определению и изучению новых маркеров болезни. Основываясь на исследованиях, проведенных Н. Braak и соавт. [2], в ходе которых установлено раннее вовлечение нейронов кишечника в процесс нейродегенерации, желудочно-кишечный тракт рассматривается в качестве одного из перспективных источников биомаркеров.

Известно, что кишечник человека служит местом обитания сложного многокомпонентного сообщества, состоящего из триллионов симбиотических микроорганизмов, включая бактерий, археев, простейших, грибов и вирусов. Это сообщество, также называемое микробиотой или микробиомом, играет важную роль в жизнедеятельности организма-хозяина, принимая участие в пищеварении [3], секреции витаминов и биологически активных веществ [4], поддержании физиологического уровня воспаления в кишечнике, тем самым защищая от внедрения патогенов [5]. Было показано, что при многих заболеваниях, как системных, так и протекающих на местном уровне, происходит изменение состава кишечной флоры [6]. Подобный факт характерен и для БП – за последние 3 года было проведено несколько работ, подтвердивших изменения в представленности кишечных микроорганизмов при данном заболевании [7–12]. В трех работах были предложены алгоритмы, основанные на применении микробиоты в качестве предиктора для диагностики БП [9, 11, 12], однако их применение ограничено. Во-первых, перечень найденных микроорганизмов-предикторов для разных популяций различался, что, вероятнее всего, является результатом этнико-географического своеобразия состава микробиоты [13]. Во-вторых, подбор коэффициентов и оценка точности диагностических алгоритмов проводились на одной и той же выборке,

что ведет к искажению оценки прогностических свойств предложенных моделей [14]. Неизвестно также, является ли микробиотический ландшафт кишечника при БП уникальным только для этого заболевания, либо подобные изменения наблюдаются и при других тяжелых нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваниях, что способно повлиять на специфичность диагностики с использованием микробиоты.

Целью данной работы является идентификация микробиотных биомаркеров БП с определенной точностью диагностики, в том числе и дифференциальной, относительно других неврологических заболеваний для российской популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 192 метагеномных профиля кишечной микробиоты, полученных в результате ампликонного секвенирования по фрагменту V3-V4 гена бактериальной 16S рРНК, которые были проанализированы и опубликованы ранее нашим коллективом [15, 16]. Все образцы делили на две группы: экспериментальную, в которую вошло 93 метагеномных профиля от пациентов с подтвержденным диагнозом болезни Паркинсона, и контрольную. В состав контрольной группы вошло 66 образцов от группы здорового контроля без признаков нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваний и 33 – пациентов с другими неврологическими заболеваниями: рассеянный склероз – 15 человек, эссенциальный тремор – 10, идиопатическая семейная дистония – 5 пациентов, а также по одному пациенту с диагнозами «множественная системная атрофия», «деменция с тельцами Леви» и «острый рассеянный энцефаломиелит».

План и проведение научно-исследовательской работы полностью соответствовали принципам Надлежащей клинической практики и Хельсинкской декларации (включая поправки). Письменное информированное согласие получали от всех пациентов или от их близких родственников и лиц, официально признанных ответственными за пациентов на момент проведения исследования. Пациенты и их родственники были информированы о характере исследования, его цели и возможных осложнениях, а также могли в любое время в одностороннем порядке прервать исследование.

Анализ данных с секвенатора осуществлялся в программном обеспечении QIIME 1.9.1 [17], для определения таксономического положения прочтенных применяли базы данных GreenGenes версии 13.5 и HITdb [18, 19]. Статистический анализ проводили с использованием языка программи-

рования R [20]. Для расчета бета-разнообразия использовали многомерное шкалирование в метрике weighted Unifrac [21] при нормализации данных по алгоритму CSS [22]. Влияние диагноза, пола и возраста пациентов на совокупный состав микробиоты определяли по алгоритму ANOSIM и с использованием непараметрического дисперсионного анализа с оценкой достоверности при 9999 перестановках в пакете *vegan* [23]. Для поиска различий в таксономическом составе метабеномов на уровне родов применяли статистическую модель *fitZig* пакета *metagenomeSeq* [22]. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$ после применения поправки на множественные сравнения по методу Бенджамини – Хохберга.

Отбор признаков и обучение алгоритмов проводилось в пакете *caret* [24] языка R. Для классификации использовались следующие алгоритмы: наивный байесовский классификатор, однослойная искусственная нейронная сеть, машина опорных векторов с применением радиальной базисной функции, обобщенная линейная модель и регрессия методом частичных наименьших квадратов. Перед обучением данные центрировали и шкалировали. Всю выборку разбивали на две неравные части: обучающую (146 образцов, или 75% от общей выборки) и тестовую (46 образцов, или 25% от общей выборки). Образцы распределялись в выборки случайно и равновероятно. На обучающей выборке проводили подгонку коэффициентов моделей с оценкой точности классификации (частное верных предсказаний и общего числа предсказаний) при 10-кратной перекрест-

ной проверке. После обучения модели проверяли на тестовой выборке с расчетом чувствительности и специфичности классификации.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При визуализации бета-разнообразия микробиоты в пространстве первой и второй главных координат (рис. 1) линейной разделимости между экспериментальной и контрольной группами не наблюдалось, однако определялась кластеризация пациентов в зависимости от заболевания. Так, пациенты с болезнью Паркинсона располагались в нижней части графика, пациенты группы здорового контроля группы – в верхней левой, пациенты с другими неврологическими заболеваниями находились ближе к середине графика. Непараметрический дисперсионный анализ и алгоритм ANOSIM подтвердили данное наблюдение: коэффициент детерминации для переменной «диагноз» составил 0,103 ($p = 0,0001$) и 0,123 ($p = 0,0001$) соответственно. Возраст пациентов также оказывал влияние на совокупный таксономический состав метабеномов по результатам непараметрического дисперсионного анализа, но сила эффекта была невысокой ($R^2 = 0,019$, $p = 0,0007$). Пол на данной выборке вклада в бета-разнообразии не вносил.

Согласно обнаруженному вкладу возраста, поиск различий в составе кишечной микробиоты на уровне родов между контрольной и экспериментальной группой для выбора списка предикторов проводили с учетом возраста в качестве ковариаты.

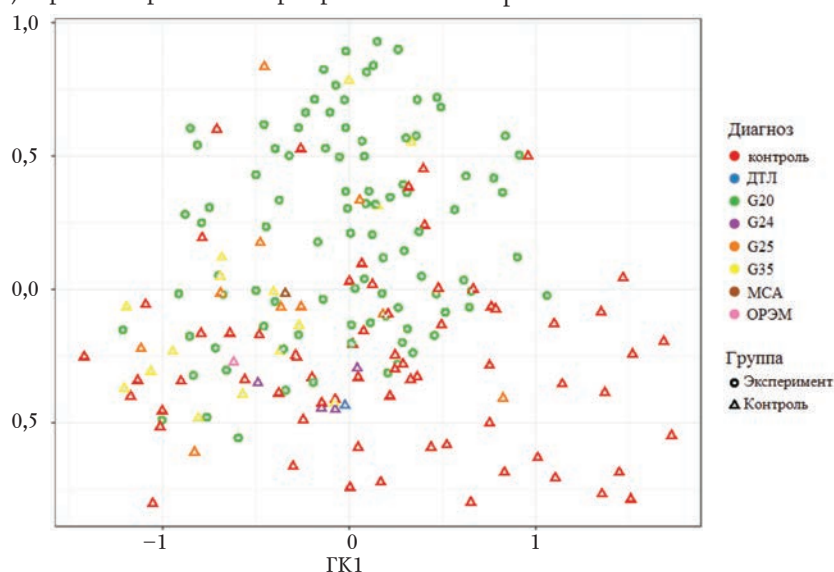


Рис. 1. Графики многомерного неметрического шкалирования микробиоты кишечника в пространстве первой (ГК1) и второй (ГК2) главных координат

Fig. 1. Graphs of multidimensional non-metric scaling of the intestinal microbiota in the space of the first and second main coordinates

В результате было обнаружено, что в микробиоте пациентов экспериментальной группы по сравнению с объединенной контрольной группой повышается содержание бактерий родов *Acetanaerobacterium*, *Anaerococcus*, *Atopobium*, *Bulleidia*, *Cloacibacillus*, *Christensenella*, *Catabacter*, *Desulfovibrio*, *Staphylococcus*, *Succinivibrio*, *Yokenella*, *p-75-a5*, *Enterococcus*, *Sphingomonas*, *Papillibacter*, *Oxalobacter*, *Leuconostoc*, а также архея *Methanobrevibacter*, и снижается представленность *Fusicatenibacter* (табл. 1).

В полученном перечне по алгоритму рекурсивного исключения проводили поиск комбинации предикторов, способной давать наиболее высокую точность классификации пациентов (рис. 2, а). В результате обнаружена комбинация из 14 ро-

дов микроорганизмов, обладающая потенциально максимальными показателями точности классификации ($0,77 \pm 0,09\%$): *Christensenella*, *Methanobrevibacter*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Catabacter*, *Desulfovibrio*, *Sphingomonas*, *Yokenella*, *Atopobium*, *Fusicatenibacter*, *Cloacibacillus*, *Bulleidia*, *Acetanaerobacterium* и *Staphylococcus*.

При тренировке моделей на обучающей выборке были получены следующие результаты (рис. 2, б). Наиболее высокой средней точностью классификации при перекрестной проверке (77%) обладала машина опорных векторов с радиальной базисной функцией, средняя точность наивного байесовского алгоритма с ядерной оценкой плотности распределения была несколько ниже и составила 76%, тогда как медианы точности класси-

Таблица 1
Table 1

Различия в содержании микроорганизмов на уровне родов, использованные для создания классифицирующих моделей						
Differences in the content of microorganisms at the genus level used to create classification models						
Род Genus	Образцов, G20 Samples	Образцов, контроль Samples, control	ОТЕ, G20 OTU, G20	ОТЕ, контроль Control	logFC	<i>p</i>
<i>Bulleidia</i>	33	11	145	44	-1,107	0,00044
<i>Staphylococcus</i>	31	15	79	33	-0,940	0,00001
<i>Succinivibrio</i>	34	16	203	100	-0,863	0,01428
<i>Yokenella</i>	44	22	228	54	-0,779	0,01285
<i>Cloacibacillus</i>	44	12	193	64	-0,745	0,01285
<i>Desulfovibrio</i>	55	36	364	153	-0,661	0,01285
<i>p-75-a5</i>	40	15	152	48	-0,649	0,02296
<i>Acetanaerobacterium</i>	30	5	50	13	-0,643	0,00294
<i>Enterococcus</i>	88	62	893	447	-0,619	0,03285
<i>Christensenella</i>	94	85	2 460	1 140	-0,597	0,03803
<i>Sphingomonas</i>	45	12	106	36	-0,578	0,01285
<i>Papillibacter</i>	63	37	310	134	-0,542	0,03571
<i>Oxalobacter</i>	48	23	149	69	-0,541	0,03462
<i>Anaerococcus</i>	15	9	44	18	-0,538	0,02296
<i>Methanobrevibacter</i>	76	40	443	179	-0,532	0,01285
<i>Catabacter</i>	80	61	851	381	-0,488	0,04690
<i>Leuconostoc</i>	56	36	202	98	-0,466	0,03421
<i>Atopobium</i>	55	36	123	72	-0,333	0,04690
<i>Fusicatenibacter</i>	91	95	1 523	1 919	0,726	0,03421

Примечание. Образцов, G20 – количество пациентов с болезнью Паркинсона, имеющих данную ОТЕ в составе кишечной микробиоты; образцов, контроль – количество пациентов контрольной группы, имеющих данную ОТЕ в составе кишечной микробиоты; ОТЕ, G20 – количество прочтений данной ОТЕ в группе пациентов с болезнью Паркинсона; ОТЕ, контроль – количество прочтений данной ОТЕ в контрольной группе; logFC – кратность различия в представленности ОТЕ, логарифмирована по основанию 2; положительные значения logFC свидетельствуют о повышении содержания ОТЕ у пациентов объединенной контрольной группы; *p*-значения приведены с поправкой на множественное сравнение по Бенджамини – Хохбергу.

Note. Samples, G20 - the number of patients with Parkinson's disease having this OTU as part of the intestinal microbiota; samples, control - the number of patients in the control group having this OTU as part of the intestinal microbiota; OTU, G20 - the number of counts of this OTU in the group of patients with Parkinson's disease; OTU, control - the number of counts of this OTU in the control group; logFC - the multiplicity of differences in the representation of OTU, logarithmically based on base 2; positive values of logFC indicate an increase in the content of OTU in patients of the joint control group; *p*-values are adjusted for multiple Benjamini-Hochberg comparisons.

фикации с использованием этих алгоритмов были одинаковы и составили 79%. Регрессия методом частичных наименьших квадратов обладала такой же средней точностью классификации, как и наивный байесовский алгоритм, однако медиана точности для данного алгоритма составила 73%. Однослойная нейронная сеть при сходной медианной точности классификации показала меньшую среднюю точность 75%. Наименьшими показателями

средней и медианной точности обладала обобщенная линейная модель – 72 и 74% соответственно.

В результате тестирования моделей на валидационной выборке было обнаружено, что оптимальные показатели чувствительности, специфичности и точности определения наличия БП по составу кишечной микробиоты пациентов продемонстрировал наивный байесовский алгоритм (табл. 2).

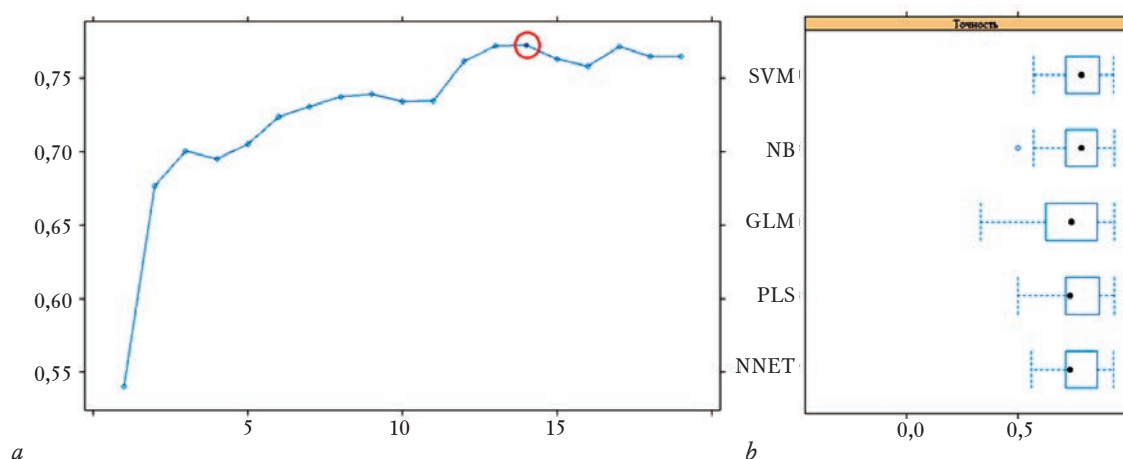


Рис. 2. Кривая зависимости точности предсказания от числа переменных (а). Кругами отмечены различные варианты классификации в зависимости от числа включенных признаков, закрашенным обведенным кругом – оптимальный вариант; б – медианы точности классификации. Черные точки – медианы; границы ящиков показывают первый и третий квартиль, длина усов равна 1,5 длины межквартильного размаха; незакрашенными точками отмечены выбросы. SVM – машина опорных векторов, NB – наивный байесовский классификатор, GLM – обобщенная линейная модель, PLS – регрессия методом частичных наименьших квадратов, NNET – искусственная нейронная сеть

Fig. 2. The dependence of the accuracy of the prediction on the number of variables (a). The circles indicate different classification options depending on the number of included features, the shaded circle – the best option; b – medians of classification accuracy. Black dots are medians; the borders of the boxes show the first and third quartiles, the length of the mustache is 1.5 times the length of the inter-quartile range; open dots indicate outliers. SVM – reference vector machine, NB – naive Bayesian classifier, GLM – generalized linear model, PLS – partial least squares regression, NNET – artificial neural network

Таблица 2
Table 2

Результаты проверки классифицирующих моделей на валидационной выборке			
Validation model classification test results			
Модель Model	Точность, % (95%-й ДИ) Accuracy, % (95% CI)	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %
NB	91,49 (79,62; 97,63)	91,30	91,67
SVM	82,98 (69,19; 92,35)	100,00	66,67
PLS	76,6 (61,97; 87,7)	65,22	87,50
NNET	76,6 (61,97; 87,7)	69,57	83,33
GLM	63,83 (48,52; 77,33)	65,22	62,50

Примечание. NB – наивный байесовский классификатор, SVM – машина опорных векторов, PLS – регрессия методом частичных наименьших квадратов, NNET – искусственная нейронная сеть, GLM – обобщенная линейная модель.

Note. NB is a naive Bayesian classifier, SVM is a support vector machine, PLS is a partial least squares regression, NNET is an artificial neural network, GLM is a generalized linear model.

Машина опорных векторов продемонстрировала наиболее высокую чувствительность и низкую специфичность классификации. Классификаторы, основанные на применении метода частичных наименьших квадратов и однослойной нейронной сети, показали одинаковую точность классификации, при этом нейронная сеть характеризовалась более высокой чувствительностью, но меньшей специфичностью. Обобщенная линейная модель оказалась наименее подходящей для определения БП на основе оценки особенностей состава кишечной микробиоты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что структура микробиома при БП характеризуется достаточно высокой степенью уникальности, что потенциально позволяет использовать информацию о его таксономическом составе для проведения диагностики заболевания, в том числе и дифференциальной, по отношению к другим тяжелым неврологическим (нейродегенеративным и нейровоспалительным) заболеваниям. С учетом раннего появления признаков нейродегенерации в нервной системе кишечника [25] данный алгоритм потенциально может оказаться эффективным и для проведения диагностики на раннем этапе заболевания, до появления первых клинических признаков.

В результате исследований по данной тематике, проведенных другими коллективами, также была показана пригодность данных о составе микробиоты для дифференциации пациентов с БП и здоровых лиц [9, 11, 12]. Разработанные классификационные алгоритмы отличаются относительно высокой специфичностью до 90%, однако низкой чувствительностью, достигающей 66,7% лишь при использовании дополнительной клинической информации [9]. Это ограничивает применение такого подхода в реальной клинической практике без существенной доработки.

В основе алгоритмов классификации, предложенных в ранее проведенных работах, лежали обобщенная линейная модель и ROC-анализ, которые не дают хорошего качества предсказания при отсутствии линейной разделимости классов. Более того, подгонка и проверка алгоритмов проводились на одной и той же выборке, что приводит к переобучению – завышению параметров качества классификации – точности, специфичности и чувствительности алгоритма [14]. Структура метагеномных данных отличается высокой сложностью, по этой причине использование валидационной выборки для проверки качества классифицирующих особенно важно [26].

В результате данного исследования впервые проведена оценка точности классификации пациентов исходя из таксономического состава кишечной микробиоты относительно БП на валидационной выборке. Полученные в ходе работы параметры чувствительности классификации пациентов варьировали от 65,22 до 100%, специфичности – от 62,50 до 91,67%. Достаточно интересен тот факт, что оптимальные параметры классификации (чувствительность 91,30%, специфичность 91,67% при точности 91,49%) были получены с использованием технически простого наивного байесовского классификатора с ядерной оценкой плотности распределения. В данном случае этот алгоритм оказался наиболее подходящим для диагностики, поскольку более стабилен на выборках относительно малого размера, к которым можно отнести и выборку, использованную в нашем исследовании, а также достаточно эффективно работает с данными сложной структуры [27].

Список предикторов, использованный для обучения классифицирующих моделей, примененный в различных исследованиях, также различался. С одной стороны, это можно объяснить различным подходом к выбору уровня таксонов, применяемого для классификации, а также использованием разных алгоритмов биоинформатического анализа. В двух работах для этой цели применяли информацию о составе микробиоты на уровне семейств [9, 11], в другом исследовании использовались данные о представленности ОТЕ [12]. В рамках данного исследования для построения классификатора применялась информация о родовом составе микробиома. С другой стороны, на список предикторов могли повлиять и различия в таксономическом составе микробиоты, наблюдаемые между различными популяциями людей [13]. По этой причине использование информации о функциональном составе микробиоты ввиду ее относительной гомогенности может оказаться оптимальным вариантом для создания классификатора, подходящего для применения жителями разных стран. Немаловажным фактом является и то, что в данном исследовании в качестве группы контроля использовались не только здоровые люди, но и пациенты с другими неврологическими заболеваниями, что также могло повлиять на итоговый состав перечня биомаркеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения исследования установлено, что информация о таксономическом составе кишечной микробиоты потенциально может быть использована для проведения дифференци-

альной диагностики болезни Паркинсона. Разработка новых неинвазивных биомаркеров для диагностики БП, в том числе и на доклиническом этапе, позволит начать терапию заболевания еще до полной потери дофаминергических нейронов, что улучшит качество жизни пациентов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Goetze O., Wiczorek J., Mueller T., Przuntek H., Schmidt W.E., Woitalla D. Impaired gastric emptying of a solid test meal in patients with Parkinson's disease using ¹³C-sodium octanoate breath test. *Neuroscience Letters*. 2005; 375 (3): 170–173. DOI: 10.1016/j.neulet.2004.11.007.
- Braak H., Ghebremedhin E., Rüb U., Bratzke H., Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*. 2004; 318 (1): 121–134. DOI: 10.1007/s00441-004-0956-9.
- Patrascu O., Béguet-Crespel F., Marinelli L., Le Chatelier E., Abraham A.L., Leclerc M., Klopp C., Terrapon N., Henrissat B., Blottière H.M., Doré J. A fibrolytic potential in the human ileum mucosal microbiota revealed by functional metagenomic. *Scientific Reports*. 2017; 7: 40248. DOI: 10.1038/srep40248.
- Fischbach M.A., Segre J.A. Signaling in host-associated microbial communities. *Cell*. 2016; 164 (6): 1288–1300. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.037.
- Stiemsma L.T., Reynolds L.A., Turvey S.E., Finlay B.B. The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies. *ImmunoTargets and Therapy*. 2015; 4: 143. DOI: 10.2147/ITT.S61528.
- Li J., Zhao F., Wang Y., Chen J., Tao J., Tian G., Wu S., Liu W., Cui Q., Geng B., Zhang W. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*. 2017; 5 (1): 14. DOI: 10.1186/s40168-016-0222-x.
- Unger M.M., Müller J.C., Mankel K., Eggert K.M., Bohne K., Bodden M., Stiasny-Kolster K., Kann P.H., Mayer G., Tebbe J.J., Oertel W.H. Postprandial ghrelin response is reduced in patients with Parkinson's disease and idiopathic REM sleep behaviour disorder: a peripheral biomarker for early Parkinson's disease? *Journal of Neurology*. 2011; 258 (6): 982–990. DOI: 10.1007/s00415-010-5864-1.
- Hill-Burns E.M., Debelius J.W., Morton J.T., Wisemann W.T., Lewis M.R., Wallen Z.D., Peddada S.D., Factor S.A., Molho E., Zabetian C.P., Knight R. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Movement Disorders*. 2017; 32 (5): 739–749.
- Scheperjans F., Aho V., Pereira P.A., Koskinen K., Paulin L., Pekkonen E., Haapaniemi E., Kaakkola S., Eerola-Rautio J., Pohja M., Kinnunen E. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*. 2015 March 1; 30 (3): 350–358. DOI: 10.1002/mds.26069.
- Keshavarzian A., Green S.J., Engen P.A., Voigt R.M., Naqib A., Forsyth C.B., Mutlu E., Shannon K.M. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2015; 30 (10): 1351–1360. DOI: 10.1002/mds.26307.
- Hopfner F., Künstner A., Müller S.H., Künzel S., Zeuner K.E., Margraf N.G., Deuschl G., Baines J.F., Kuhlensäuer G. Gut microbiota in Parkinson disease in a northern German cohort. *Brain Research*. 2017; 1667: 41–45. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.04.019.
- Bedarf J.R., Hildebrand F., Coelho L.P., Sunagawa S., Bahram M., Goeser F., Bork P., Wüllner D.U. Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients. *Genome Medicine*. 2017; 9 (1): 39. DOI: 10.1186/s13073-017-0428-y.
- Tyakht A.V., Kostryukova E.S., Popenko A.S., Belenkin M.S., Pavlenko A.V., Larin A.K., Karpova I.Y., Selezneva O.V., Semashko T.A., Ospanova E.A., Babenko V.V. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature Communications*. 2013; 4: 2469. DOI: 10.1038/ncomms3469.
- Dobbin Kevin K., Simon Richard M. Optimally splitting cases for training and testing high dimensional classifiers. *BMC Medical Genomics*. 2011; 4: 31. DOI: 10.1186/1755-8794-4-31.
- Петров В.А., Салтыкова И.В., Жукова И.А., Алифирова В.М., Жукова Н.Г., Дорофеева Ю.Б., Тяхт А.В., Коварский Б.А., Алексеев Д.Г., Кострюкова Е.С., Миронова Ю.С., Ижболдина О.П., Никитина М.А., Первозчикова Т.В., Файт Е.А., Бабенко В.В., Вахитова М.Т., Говорун В.М., Сазонов А.Э. Исследование микробиоты кишечника при болезни Паркинсона. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 162 (12): 700–703. [Petrov V.A., Saltykova I.V., Zhukova I.A., Alifirova V.M., Zhukova N.G., Dorofeeva Y.B., Tyakht A.V., Kovarsky B.A., Alekseev D.G., Kostryukova E.S., Mironova Y.S. Analysis of gut microbiota in patients with Parkinson's disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 162 (6): 734–737 (in Russ.)].
- Петров В.А., Алифирова В.М., Салтыкова И.В., Жукова И.А., Жукова Н.Г., Дорофеева Ю.Б., Тяхт А.В., Алтухов И.А., Кострюкова Е.С., Титова М.А., Миронова Ю.С., Ижболдина О.П., Никитина М.А., Первозчикова Т.В., Файт Е.А., Сазонов А.Э. Сравнительный анализ кишечной микробиоты при болезни Паркинсона и других неврологических заболеваниях. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (5): 113–125. [Petrov V.A., Alifirova V.M., Saltykova I.V., Zhukova I.A., Zhukova N.G., Dorofeeva Yu.B., Tyakht A.V., Altukhov I.A., Kostryukova E.S., Titova M.A., Mironova Yu.S., Izhboldina O.P., Nikitina M.A., Perevozchikova T.V., Fait E.A., Sazonov A.E. Comparison study of gut microbiota in case of Parkinson's disease and other neurological disorders. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (5): 113–125 (in Russ.)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-5-113-125.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Pena A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.

- Nature Methods*. 2010; 7 (5): 335–336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.
18. Ritari J., Salojärvi J., Lahti L., de Vos W.M. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics*. 2015; 16: 1056. DOI: 10.1186/s12864-015-2265-y.
19. DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72 (7): 5069–5072. DOI: 10.1128/AEM.03006-05.
20. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org>.
21. Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005 Dec.; 71 (12): 8228–8235. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
22. Paulson J.N., Stine O.C., Bravo H.C., Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nature Methods*. 2013; 10 (12): 1200–1202. DOI: 10.1038/nmeth.2658.
23. Oksanen J., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O’Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H., Wagner H., Oksanen M.J. Package ‘vegan’. *Community Ecology Package, version*. 2013; 2 (9): 1–295.
24. Kuhn M. Caret package. *Journal of Statistical Software*. 2008; 28 (5): 1–26.
25. Braak H., de Vos R.A., Bohl J., Del Tredici K. Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner’s and Auerbach’s plexuses in cases staged for Parkinson’s disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters*. 2006; 396 (1): 67–72. DOI: 10.1016/j.neulet.2005.11.012.
26. Pasolli E., Truong D.T., Malik F., Waldron L., Segata N. Machine learning meta-analysis of large metagenomic datasets: tools and biological insights. *PLoS Computational Biology*. 2016; 12 (7): e1004977. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004977.
27. Hand D.J., Yu K. Idiot’s Bayes – not so stupid after all? *International Statistical Review*. 2001; 69 (3): 385–398. DOI: 10.1111/j.1751-5823.2001.tb00465.x.

Вклад авторов

Петров В.А. – разработка концепции и дизайна; анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи. Алифинова В.М. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Салтыкова И.В. – анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Жукова И.А. – анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Жукова Н.Г. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Дорофеева Ю.Б. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Иккерт О.П. – анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Титова М.А. – анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи. Миронова Ю.С. – анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи. Сазонов А.Э. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания; окончательное утверждение для публикации рукописи. Карпова М.Р. – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания.

Author contributions

Petrov V.A. – development of the concept and design; data analysis and interpretation; justification of the manuscript.

Alifirova V.M. – substantiation of the manuscript and verification of critical intellectual content, final approval for publication of the manuscript.

Saltykova I.V. – analysis and interpretation of data; substantiation of the manuscript and verification of critical intellectual content.

Zhukova I.A. – Analysis and interpretation of data, substantiation of the manuscript and verification of critical intellectual content.

Zhukova N.G. – substantiation of the manuscript and verification of critical intellectual content, final approval for publication of the manuscript.

Dorofeeva Yu.B. – concept and design development, data analysis and interpretation.

Ikkert O.P. – analysis and interpretation of data, substantiation of the manuscript and verification of critical intellectual content.

Titova M.A. – analysis and interpretation of data; justification of the manuscript.

Mironova Yu.S. – analysis and interpretation of data, justification of the manuscript.

Sazonov A.E. – development of a concept and design, analysis and interpretation of data, substantiation of the manuscript and verification of critical intellectual content; final approval for manuscript publication.

Karpova M.R. – substantiation of the manuscript and verification of critical intellectual content.

Сведения об авторах

Петров Вячеслав Алексеевич, мл. науч. сотрудник, ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Алифирова Валентина Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Салтыкова Ирина Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Жукова Ирина Александровна, канд. мед. наук, доцент, кафедра неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Жукова Наталья Григорьевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Дорофеева Юлия Борисовна, мл. науч. сотрудник, ЦНИЛ, ассистент, кафедра биологии и генетики, СибГМУ, г. Томск.

Иккерт Ольга Павловна, канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник, ЦНИЛ, СибГМУ; ст. преподаватель, Инженерная школа новых производственных технологий, Научно-образовательный центр Н.М. Кижнера, НИ ТГУ, г. Томск.

Титова Марина Андреевна, канд. мед. наук, доцент, кафедра неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Миронова Юлия Сергеевна, аспирант, кафедра неврологии и нейрохирургии, СибГМУ, г. Томск.

Сазонов Алексей Эдуардович, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник, ЦНИЛ, СибГМУ, г. Томск.

Карпова Мария Ростиславовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии СибГМУ, г. Томск.

(✉) **Петров Вячеслав Алексеевич**, e-mail: vyacheslav.a.petrov@mail.ru.

Поступила в редакцию 31.05.2018

Подписана в печать 12.09.2019

Authors information

Petrov Vyacheslav A., Junior Researcher, Central Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Alifirova Valentina M., DM, Professor, Head of the Neurology and Neurosurgery Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Saltykova Irina V., PhD, Researcher, Central Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Zhukova Irina A., PhD, Associate Professor, Neurology and Neurosurgery Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Zhukova Natalia G., DM, Professor, Neurology and Neurosurgery Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Dorofeeva Yulia B., Junior Researcher, Central Research Laboratory; Assistant Professor, Biology and Genetics Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Ikkert Olga P., PhD, Junior Researcher, Central Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation; Senior Lecturer, Engineering School of New Manufacturing Technologies, The Scientific and Educational Center named after N.M. Kizhner, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation.

Titova Marina A., PhD, Associate Professor, Neurology and Neurosurgery Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Mironova Yulia S., Post-Graduate Student, Neurology and Neurosurgery Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Sazonov Alexey E., DM, Chief Researcher, Central Research Laboratory, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Karpova Mariia R., DM, Professor, Head of the Microbiology and Virusology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Petrov Vyacheslav A.**, e-mail: vyacheslav.a.petrov@mail.ru.

Received 31.05.2018

Accepted 12.09.2019