

Оценка микробиоты кишечника у пациентов с болезнью Паркинсона с помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии

И.В. Красаков^{1,2}, И.В. Литвиненко², Г.Г. Родионов¹, И.И. Шантырь¹, Е.В. Светкина¹

¹ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова», Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Представлены результаты сравнительного исследования состава микробиоты кишечника 16 пациентов с 3-й стадией болезни Паркинсона и 94 неврологически здоровых лиц сопоставимого возраста методом газовой хромато-масс-спектрометрии. В пристеночном слое кишечника у пациентов с болезнью Паркинсона общее количество микробных маркеров увеличено на 43% по сравнению с группой контроля. Увеличение происходит за счет повышения количества условно-патогенной флоры в 2 раза и уменьшения в 2 раза количества микробных маркеров полезной микрофлоры. Полученные результаты могут рассматриваться как промежуточные и нуждаются в валидации на репрезентативном числе пациентов. Необходимы также оценка взаимосвязи иммунного статуса с изменениями микробиоты и разработка методов коррекции выявленных изменений. Анализ эффективности восстановления качественного и количественного состава микробиоты должен проводиться с применением методов оценки биоэквивалентной дозы леводопы.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, микробиота кишечника, газовая хромато-масс-спектрометрия.

Адрес для корреспонденции: 194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2. ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова. E-mail: ikrasakov@gmail.com. Красаков И.В.

Для цитирования: Красаков И.В., Литвиненко И.В., Родионов Г.Г., Шантырь И.И., Светкина Е.В. Оценка микробиоты кишечника у пациентов с болезнью Паркинсона с помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2018; 12(4): 23–29.

DOI: 10.25692/ACEN.2018.4.3

Evaluation of gut microbiota in Parkinson's disease using gas chromatography with mass spectrometric detection

Igor V. Krasakov^{1,2}, Igor V. Litvinenko², Gennadiy G. Rodionov¹, Igor I. Shantyry¹, Ekaterina V. Svetkina¹

¹Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russia;

²Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

The paper presents preliminary results of a comparative study assessing the gut microbiota in patients with Parkinson's disease and the control group using the gas chromatography with mass spectrometric detection. Sixteen patients with stage 3 Parkinson's disease and 94 age-matched persons without Parkinson's disease were examined. It was revealed that the total number of microbial markers in parietal intestinal microbiota in patients with Parkinson's disease was increased by 43% compared with the control group. This increase is due to a 2-fold increase in the number of conditional-pathogenic flora, and at the same time there was a 2-fold decrease in the number of microbial markers of useful microflora. The obtained results may be regarded as preliminary and need to be assessed in a large cohort of patients with Parkinson's disease. It is also necessary to assess the relationship between immune status and changes in microbiota, and to develop methods of correction of the revealed changes. Analysis of the efficiency of restoration of qualitative and quantitative composition of microbiota should be carried out using methods for the assessment of bioequivalence levodopa dose.

Keywords: Parkinson's disease, gut microbiota, gas chromatography-mass spectrometry.

For correspondence: 194044, Russia, St. Petersburg, ul. Akad. Lebedeva, 4/2, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine. E-mail: ikrasakov@gmail.com. Igor V. Krasakov.

For citation: Krasakov I.V., Litvinenko I.V., Rodionov G.G., Shantyry I.I., Svetkina E.V. [Evaluation of gut microbiota in Parkinson's disease using gas chromatography with mass spectrometric detection]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2018; 12(4): 23–29. (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2018.4.3

Вегетативные расстройства являются неотъемлемой частью клинической картины заболевания у большинства пациентов с болезнью Паркинсона (БП) [1–3]. До 80% пациентов с БП имеют проблемы с желудочно-кишечным трактом [4]: нарушения моторики кишечника, запоры. Патофизиология запора при БП обусловлена дегенерацией энтерической нервной системы, вызванной отложением в ней патологической изоформы белка α -синуклеина [5]. Это сопровождается местным воспалением, оксидативным стрессом и кишечной проницаемостью. Описанные изменения за долго предшествуют двигательным расстройствам при БП, что является основанием для гипотезы о дебюте патофизиологического процесса синуклеинопатии именно с гастроинтестинального тракта [6].

Запор – не единственная проблема желудочно-кишечного тракта, развивающаяся при БП. Все чаще внимание исследователей привлекает состав кишечной микрофлоры/микробиоты при данном заболевании. Микробиоту кишечника (МБК) не случайно называют «забытым органом». В ее состав входит до 100 трлн бактерий, что в десятки раз больше количества клеток человеческого тела. Полный геном МБК составляют около 3 млн генов, что в 150 раз больше генома человека. Треть МБК является общей для большинства людей, в то время как две трети индивидуальны для каждого человека [7]. До 50–60% состава МБК окончательно не изучено [8]. Существуют гипотезы о возможном влиянии такой большой популяции бактерий и их генома на поведение и физиологию человека; в частности, предложена теория двустороннего взаимодействия системы МБК–ствол мозга [9].

В настоящее время активно изучается проблема взаимосвязи так называемого синдрома тонкокишечного дисбиоза – повышенного заселения тонкой кишки микрофлорой, и БП. Указанный синдром выявляется у четверти пациентов с БП, что значительно превышает его распространенность в популяции. Недавние исследования показали, что в стуле пациентов с БП значительно снижено содержание бактерий семейства *Prevotellaceae* по сравнению с группой контроля, а также повышен уровень содержания эндотоксина кишечной палочки [10]. Наблюдается достоверное снижение уровня бактерий рода *Blautia*, *Coprococcus*, *Roseburia* в стуле пациентов с БП по сравнению с группой контроля. Кроме того, у пациентов с БП снижение уровня бактерий рода *Faecalibacterium* сочетается с повышением уровня *Ralstonia* в слизистой оболочке кишечника [10].

На генетическом уровне в МБК пациентов с БП отмечается существенная дисрегуляция генов, вовлеченных в синтез и секрецию липополисахаридов [11]. Выраженность синдрома тонкокишечного дисбиоза коррелирует с тяжестью двигательных расстройств у пациентов с БП, а его коррекция приводит к снижению выраженности моторных флуктуаций [12]. Более того, выявлена положительная корреляция между числом энтеробактерий и выраженностью постуральной неустойчивости и расстройства ходьбы у пациентов с БП [13]. Приведенные данные позволяют предположить, что на синтез дофамина в головном мозге влияют дофаминпродуцирующие ферменты, чью активность контролирует МБК [14]. Учитывая, что бактерии рода *Bacillus*, входящие в состав МБК, способны синтезировать дофамин [15], можно считать, что ориентировочно половина содержания уровня дофамина в организме приходится на МБК [16].

Влияние МБК на центральную нервную систему продемонстрировано на примере гнотобиотов, а также приема оральных антибиотиков, пробиотиков [17]. Гнотобиотические животные (гнотобиоты) – это животные, получаемые после гистерэктомии с целью исключения получения микробиоты матери во время прохождения через родовые пути. Гнотобиоты выращиваются в особых условиях, они полностью свободны от микрофлоры или являются носителями только определенных видов микроорганизмов. Уровень катехоламинов (дофамин, норадреналин и серотонин), определяемый в разных отделах головного мозга (лобная кора, стриатум и гиппокамп), у мышей-гнотобиотов и мышей из группы контроля существенно различается. У стерильных мышей по сравнению с группой контроля значительно выше уровень обмена катехоламинов в стриатуме [18] и общий уровень дофамина в головном мозге [19]. Данные результаты объясняют повышенную двигательную активность стерильных мышей по сравнению с группой контроля [18]. Синтез ферментов, участвующих в процессе преобразования тирозина в дофамин (тирозингидроксилаза, ДОФА-декарбоксилаза), подвержен влиянию системы МБК–ствол мозга [20]. В связи с этим высока вероятность контроля уровня дофамина в стволе мозга симбиотическими бактериями. Более того, уровень мозгового тирозина контролируется именно МБК, т.к. у стерильных мышей отмечается его достоверное снижение по сравнению с группой контроля [19].

У гнотобиотов-мышей отмечается усиление экспрессии гена D1-дофаминового рецептора в гиппокампе и снижение в стриатуме, в отличие от группы контроля. Экспрессия гена фактора роста нервов (*NGFI-A*), играющего важную роль в нейропластичности, значительно снижена в префронтальной коре и стриатуме именно у стерильных мышей, что отражает снижение синаптической пластичности в стриатуме. Отмечено увеличение экспрессии белков, вовлеченных в синаптогенез (синаптофизин и PSD-95), в стриатуме у стерильных мышей. В то же время различий в лобной коре и гиппокампе между стерильными мышами и группой контроля не выявлено. Проведенное дополнительное исследование [18] показало различие между стерильными мышами и группой контроля в экспрессии еще 23 генов в стриатуме. Полученные результаты подтверждают влияние МБК на работу стриатума, вероятно, играющее важную роль в патогенезе БП.

Среди антибиотиков отдельного внимания заслуживает миноциклин – полусинтетический антибиотик из группы тетрациклинов, который, помимо влияния на МБК, приводит к снижению активности каспазы-1 (интерлейкин-1 β -превращающий фермент) и индукцибельной NO-синтазы, играющих важную роль в апоптозе. Миноциклин блокирует нейродегенерацию нигростриарных дофаминергических нейронов, а также истощение дофамина в стриатуме и *nucleus accumbens* при индуцированном 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином паркинсонизме у мышей [21]. *In vitro* миноциклин обеспечивает нейропротективный эффект тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов в модели на основе введения ротенона [22]. В опытах с дрозофилами выявлено, что миноциклин обладает противовоспалительным и антиоксидантным действием, оказывая потенциальный дофаминергический эффект [23]. Миноциклин хорошо показал себя как потенциальный препарат для терапии БП во II фазе клинических исследований, в настоящее время планируется проведение III фазы [24]. Он обладает способностью восстанавливать

физиологическую МБК за счет снижения отношения *Firmicutes/Bacteroidetes* [25]. Принимая во внимание данный факт и учитывая выявленные нейропротективные возможности миноциклина при БП, можно предположить, что симбиотические бактерии кишечника играют важную роль в патогенезе БП. Определенным нейропротективным эффектом при БП обладает также ампициллин. Терапия ампициллином предотвращала двигательные и поведенческие расстройства у мышей, которым был введен антиген стрептококка группы А, приводящий к развитию дисфункции дофаминергической системы [26]. Введение ампициллина способствовало повышению уровня тирозингидроксилазы, D1- и D2-рецепторов в стриатуме без снижения уровня антигенстрептококка группы А. Поскольку при БП ярко выражена дисфункция центральной дофаминергической системы, можно предположить, что ампициллин оказывает свое действие опосредованно за счет влияния на МБК и систему МБК–ствол мозга.

В теории применение пробиотиков в правильных дозах может положительно влиять на синдром тонкокишечного дисбиоза и, предположительно, на центральную нервную систему. В 2011 г. была показана возможность пробиотической бактерии *Bacillus sp. JPI* преобразовывать L-тирозин в леводопу (99,4% преобразования) *in vitro* [27]. Лакто- и бифидобактерии способны продуцировать антиоксиданты, витамины и биологически активные вещества [28] и, следовательно, ограничивать избыточное количество свободных радикалов, приводя к снижению нейродегенерации. Проведено пилотное исследование, которое показало, что регулярное потребление ферментированного молока, содержащего *Lactobacillus casei Shirota*, снижает выраженность запора у пациентов с БП [29].

Влияние хронической кишечной инфекции на течение БП наиболее полно изучено на модели *Helicobacter pylori*, обсемененность которой широко распространена у пациентов с БП. Носительство данной бактерии приводит к снижению всасывания леводопы и усилению выраженности моторных флуктуаций [30], а инфицирование *H. pylori* – к снижению уровня дофамина в моторных областях головного мозга у мышей [31]. Вероятно, обсемененность *H. pylori* непосредственно не участвует в патогенезе БП, а приводит к системному воспалению и аутоиммунному ответу [32]. Эрадикация бактерии, в свою очередь, снижает выраженность кахексии [33], повышает всасывание леводопы и уменьшает инвалидизацию пациентов с БП [34].

Все описанные явления, происходящие при БП на фоне изменения МБК, могут быть объяснены в том числе усилением системного воспаления. У мышей-гнотобиотов, в отличие от мышей с нормальной микрофлорой, повышена проницаемость гематоэнцефалического барьера [35]. Данный факт объясняется снижением синтеза окклюдинов и клаудинов, обеспечивающих работу плотных контактов гематоэнцефалического барьера, которые регулируют барьерную функцию. Вероятно, синтез данных белков обеспечивается работой физиологической МБК. Измененная МБК при БП приводит к активации толл-подобных рецепторов 2 и 4 (TLR2/4), являющихся важным компонентом врожденной иммунной системы, что на фоне повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера приводит к активации воспалительных процессов в головном мозге [36]. Приведенные факты могут свидетельствовать об общности патогенеза воспалительных и дегенеративных заболеваний нервной системы на примере БП и рассеянного склероза [37].

Таким образом, существуют веские основания полагать, что качественное или количественное изменение МБК может играть существенную роль в патогенезе БП.

Оценка изменений МБК при БП может помочь в решении практических задач:

- окончательное описание специфики МБК;
- оценка взаимосвязи выраженности расстройств МБК и хронического воспалительного процесса при БП;
- объективная оценка влияния измененной МБК на всасывание леводопы и, как следствие, на степень выраженности двигательных расстройств и моторных флуктуаций;
- разработка подходов к коррекции нарушений МБК при БП.

Применяемые на сегодняшний день в клинической практике методы определения микробиологического статуса, а также диагностики инфекций имеют определенные ограничения и недостатки. Например, существенным недостатком классического бактериологического исследования, помимо дороговизны и длительности (7–10 дней), является невозможность оценить роль некультивируемых микроорганизмов в инфекционно-воспалительном процессе, прежде всего связанном с анаэробами. Иммуносерологический метод, используемый в качестве дополнительного к классическому, является непрямым, поскольку выявляет не возбудителя, а иммунный ответ на него, который может иметь индивидуальные вариации. Известные молекулярно-биологические методы при несомненных преимуществах (прямое определение возбудителя, высокая специфичность и чувствительность, универсальность, скорость, возможность диагностики хронических и латентных инфекций) имеют такие серьезные недостатки, как частые ложноположительные результаты и невозможность адекватной количественной оценки [38].

Исходя из вышеизложенного, очевидна необходимость в надежном количественном экспресс-методе диагностики дисбактериозов и определения возбудителей инфекции. По нашему мнению, таким методом может стать хемодифференциация микроорганизмов с помощью метода газовой хроматографии, совмещенного с масс-спектрометрией (ГХ-МС), основанного на количественном определении маркерных веществ микроорганизмов (жирных кислот, альдегидов, спиртов и стероидов).

ГХ-МС позволяет получить уникальную информацию о составе особых мономерных химических компонентов микробной клетки, поступающих в плазму крови и характерных для тех или иных таксонов. Эти компоненты (маркеры) могут быть выделены из других химических составляющих суммарной биомассы биологических объектов и использованы для детектирования микроорганизмов соответствующего рода или вида. Суть анализа состоит в прямом извлечении из подлежащего исследованию образца с помощью химической процедуры высших жирных кислот, их разделения на хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализа состава в динамическом режиме на масс-спектрометре. Поскольку хроматограф соединен в едином приборе с масс-спектрометром и снабжен компьютером с соответствующими программами автоматического анализа и обработки данных, сам процесс анализа занимает 30 мин, а с учетом времени пробоподготовки и расчета данных – не более 3 ч. Его результатом является количественное определение состава микроорганизмов, присутствующих в биологических жидкостях и тканях.

К настоящему времени состав жирных кислот большинства клинически значимых микроорганизмов хорошо изучен, показана его воспроизводимость, оценена родо- и видоспецифичность.

Предлагаемая технология позволяет не только проводить мониторинг этих соединений в образцах, но и рассчитывать численность микроорганизмов того или иного таксона в образце. В этом принципиальное отличие метода, придающее ему качественно новое свойство – возможность разложения суперпозиции всего пула микробных маркеров для оценки вклада каждого из сотен видов микроорганизмов, присутствующих, например, в фекалиях. В 2010 г. метод ГХ-МС разрешен Росздравнадзором к применению в качестве новой медицинской технологии «Оценка микробиологического статуса человека методом хромато-масс-спектрометрии». Обнаруженные в результате систематических исследований особенности гомеостаза микробных маркеров в крови и адекватность его профиля составу МБК здорового человека обеспечили уникальную возможность мониторировать состояние МБК по анализу крови.

Цель исследования – оценить качественный и количественный состав пристеночной МБК у пациентов с БП и провести сравнение с составом МБК группы контроля с использованием ГХ-МС.

Материалы и методы

В пилотное исследование были включены 16 пациентов (7 мужчин и 9 женщин; возраст 58–67 лет) с БП 3-й стадии по функциональной шкале Хен–Яра. В группу сравнения вошли 94 пациента (25 мужчин и 69 женщин; возраст 55–65 лет) с различной соматической патологией (отобраны методом сплошной выборки), проходившие стационарное обследование и лечение в ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова и не имевшие неврологических заболеваний.

Количественный состав пристеночной МБК определяли на газовом хроматографе «Agilent 7890» («Agilent Technologies», США) с масс-селективным и пламенно-ионизационным детекторами.

Отобранную у обследуемых кровь в объеме 40 мкл высушивали с добавлением равного по объему количества метанола и подвергали кислому метанолизу в 1 М HCl в метаноле. Метанолиз проводили в 0,4 мл реактива на 10–15 мг сухого остатка в течение 1 ч при 80°C. На этой стадии происходит освобождение жирных кислот и альдегидов из сложных липидов микроорганизмов и других клеток жидкости в виде метиловых эфиров и диметилацеталей. Эти компоненты экстрагировали гексаном (400 мкл) в течение 5 мин, гексановый экстракт высушивали, а сухой остаток обрабатывали N,O-бис(триметил-силлил)-трифторацетамидом в количестве 20 мкл в течение 15 мин при 80°C для получения триметилсилильных эфиров окси-кислот и стеролов. К реакционной смеси эфиров добавляли 80 мкл гексана.

Для проведения анализа 2 мкл смеси эфиров вводили в инжектор ГХ-МС посредством автоматической системы ввода проб (автосэмплер), которая обеспечивает воспроизводимость времени удерживания хроматографических пиков и повышает точность автоматической обработки данных.

Хроматографическое разделение пробы осуществляли на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фа-

зой HP-5ms длиной 25 м и внутренним диаметром 0,25 мм, газ-носитель – гелий. Режим анализа – программируемый, скорость нагрева термостата колонки – 7°C/мин в диапазоне 135–320°C. Выдержка при начальной температуре – 1,5 мин; температура испарителя – 250°C, интерфейса – 250–300°C. Интервалы и ионы выбирали таким образом, чтобы селективно детектировать маркеры определяемых видов микроорганизмов.

На основании принципов, изложенных в публикации [39], рассчитаны объединенные статистические показатели пристеночной МБК: общее количество клеток, количество маркеров полезной и условно-патогенной микрофлоры, анаэробы, аэробы и их соотношение.

Статистическую обработку полученных результатов (оценка медианы, квартилей и 50% доверительного интервала) проводили с помощью пакета статистических программ «Statistica 6.0».

Результаты и обсуждение

В пристеночном слое кишечника у пациентов с БП общее количество микробных маркеров было увеличено на 43% по сравнению с группой контроля (табл. 1). Различались количественный и качественный состав МБК. У больных БП было больше, чем в контроле, микробных маркеров условно-патогенной микрофлоры: *Staphylococcus intermedius* – на 61%, *Eubacterium lentum* (группа А) – в 5,8 раза, *Clostridium histolyticum* – в 2,8 раза, *Peptostreptococcus Anaerobius* – в 3,6 раза, *Ruminococcus* – в 3,8 раза, *Nocardia* и *Nocardia asteroides* – в 2 раза, *Clostridium propionicum* и *Sem. Enterobacteriaceae (E. coli и пр.)*, а также микробных маркеров Микр грибов, ситостерол – в 1,7 раза, Микр грибы, кампестерол и микробных маркеров *Herpes* – в 2,8 раза. В 2 раза снизилось количество микробных маркеров *Propionibacterium* и ряда других бактерий (*Streptococcus*, *Cl. difficile*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium acnes*).

Количество микробных маркеров полезной микрофлоры у пациентов с БП было ниже, чем в группе контроля: *Eubacterium/Cl.coccoides* – в 6,3 раза, *Bifidobacterium* – в 2,5 раза, *Propionibacterium/Cl. subterm.* – в 1,5 раза, *Lactobacillus* – на 24% (рис. 1).

Таким образом, у пациентов с БП соотношение полезной и условно-патогенной микрофлоры было практически в 4 раза ниже этого показателя в группе контроля (табл. 2). Количество бактерий-аэробов превалировало по отношению к анаэробам в 2 раза, на что указывает снижение соотношения анаэробы/аэробы в 1,8 раза.

Таким образом, в пристеночном слое кишечника у пациентов с БП общее количество микробных маркеров увеличено на 43% по сравнению с группой контроля. Данное увеличение происходит за счет двукратного повышения количества маркеров условно-патогенной микрофлоры и параллельного снижения вдвое количества микробных маркеров полезной микрофлоры.

Для достоверности эксперимента в группу контроля были включены пациенты старшей возрастной категории, состав МБК которых значительно отличается от условной «нормы». Сравнение с показателями здоровых людей молодого поколения [38] в данном случае некорректно, т.к. различия между группами будут выражены значительно ярче.

Таблица 1. Статистические показатели пристеночной микробиоты кишечника группы контроля и пациентов с БП (количество клеток/г×10⁵)
Table 1. Statistical indicators of near-wall intestinal microbiota in the control group and patients with Parkinson's disease (number of cells/g×10⁵)

Группы и таксоны микроорганизмов / Groups and taxons of microorganisms	Контроль / Control (n=94)		БП / Parkinson disease (n=16)	
	медиана / mediana	50% интервал / 50% DI	медиана / mediana	50% интервал / 50% DI
Грамположительные кокки, аэробные или факультативные / Gram-positive coccuses, aerobic or facultative				
<i>Streptococcus</i> (оральные / oral forms)	2670	2075–3655	–	–
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1110	715–1630	1786*	1540–3482
<i>Streptococcus mutans</i>	270	200–350	292	279–344
Анаэробы / Anaerobi				
<i>Eubacterium lentum</i> (группа A / group A)	224	130–430	1300*	1238–1709
<i>Eubacterium/Cl. coccooides</i>	5130	2760–9300	817*	662–962
<i>Clostridium hystolyticum</i>	536	270–1070	1520*	1055–2010
<i>Clostridium ramosum</i>	5084	3840–7050	4348	3774–5292
<i>Cl. difficile</i>	130	86–200	–	–
<i>Clostridium propionicum</i>	–	–	11 711	11 119–13 138
<i>Propionibacterium</i>	10	0,1–40	5*	2–31
<i>Propionibacterium/Cl. subterm.</i>	1350	730–2130	911*	897–1809
<i>Propionibacterium jensenii</i>	310	100–850	–	–
<i>Propionibacterium acnes</i>	44	0,1–135	–	–
<i>Peptostreptococ. anaerobius 1, 2</i>	131	0,1–230	475*	56–1498
<i>Lactobacillus</i>	8100	5700–11 860	6167*	5550–7432
<i>Bifidobacterium</i>	2330	1400–050	914*	714–1621
Актиномицеты / Actinobacteria				
<i>Actinomyces viscosus</i>	790	510–1190	883	464–1168
<i>Ruminococcus</i>	1110	710–1340	4208*	3633–4295
Грамположительные палочки аэробные или факультативные / Gram-positive bacilli, aerobic or facultative				
<i>Nocardia, 14:1d11</i>	3500	2580–4675	6436*	5797–7003
<i>Nocardia asteroides</i>	1090	546–1600	2237*	2095–2781
<i>Rhodococcus</i>	203	130–265	181	155–203
<i>Corineform CDC-group XX</i>	400	270–523	333	258–630
Грамотрицательные палочки аэробные или факультативные / Gram-negative bacilli, aerobic or facultative				
Семейство / Family Enterobacteriaceae (<i>E. coli</i> и пр.) (<i>E. coli</i> and others)	0	0–34	158*	124–207
Грибы, вирусы и пр. / Fungi, viruses, etc.				
Микр грибы, ситостерол / Micro-fungi, cytosterol	19	9–40	33*	17–41
Микр грибы, кампестерол / Micro-fungi, campesterol	–	–	1008	852–1219
<i>Candida</i>	290	100–450	351	297–528
<i>Streptomyces</i>	266	177–407	194	139–529
<i>Herpes</i>	1380	340–3240	3932*	2881–3932
Цитомегаловирус	–	–	3539	3108–4333
<i>Pseudonocardia</i>	35	20–50	30	27–42
Общее количество клеток / Whole number of cells	36 591	28 876– 38 540	52 196*	50 525–68 404

Примечание: здесь и в табл. 2 * – p<0,05 по сравнению с контролем (критерий Манна–Уитни).
Note: here and in the Table 2 * – p<0.05 in comparison with control group (Mann–Whitney test)

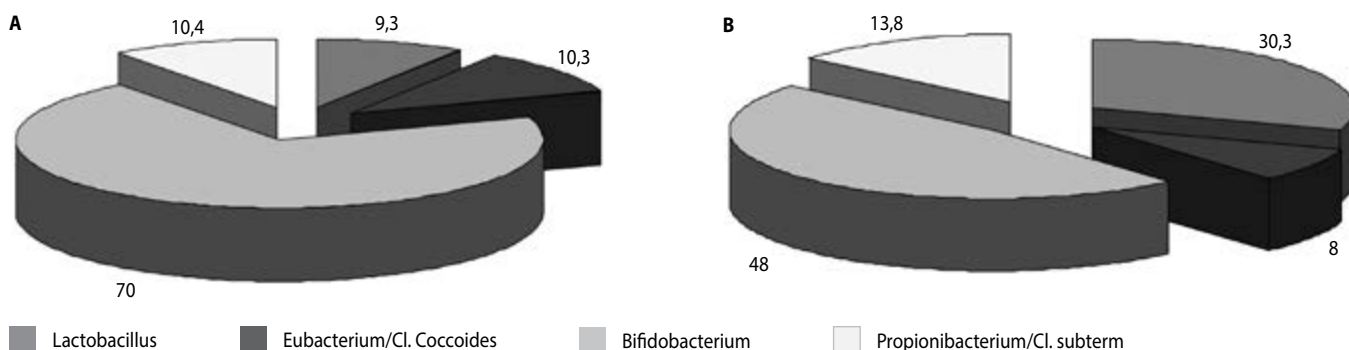


Рис. 1. Доля отдельных представителей микроорганизмов в структуре МБК у пациентов группы контроля (А) и у пациентов с БП (В)
Fig. 1. Proportion of particular microorganisms in the structure of intestinal microbiota

Таблица 2. Объединенные статистические показатели пристеночной МБК в группах сравнения (количество клеток/г×10⁵)
Table 2. Combined statistical parameters of near-wall intestinal microbiota in the groups under comparison (number of cells/g×10⁵)

Показатели микрофлоры / Parameters of microflora	Контроль / Control (n=94)		БП / Parkinson disease (n=16)	
	медиана / mediana	50% интервал / 50% DI	медиана / mediana	50% интервал / 50% DI
Маркеры полезной микрофлоры / Markers of useful microflora	16 910	13 500–26 800	8667*	7963–11 873
Маркеры условно-патогенной микрофлоры / Markers of opportunistic microflora	17 691	15 300–24 100	36 431*	34 295–46 910
Маркеры полезной микрофлоры/ маркеры условно-патогенной микрофлоры / Markers of useful microflora/markers of opportunistic microflora	0,96	0,79–1,43	0,25*	0,22–0,27
Анаэробы / Anaerobi	25 358	19 800–34 200	26 534	26 028–36 494
Аэробы / Aerobi	9243	6300–17 000	17 891*	16 484–20 606
Анаэробы/аэробы / Anaerobi/aerobi	2,74	2,51–3,08	1,56*	1,40–1,67
Общая сумма / Total sum	36 591	26 800–47 800	52 196*	50 525–68 404

Полученные результаты являются промежуточными, и для их уточнения необходима оценка МБК у большего числа пациентов с БП. В дальнейшем, после получения достоверных и валидированных данных, большой интерес будет представлять разработка способов коррекции дисбиоза при помощи антибиотиков и метаболитов, а также оценка динамики изменения иммунного статуса и моторных флуктуаций на

этом фоне. Очевидно, что для отражения изменений всасываемости леводопы на фоне коррекции МБК недостаточно оценки только субъективного мнения пациента (дневники Хаузера). В настоящее время нами завершается внедрение методов оценки биоэквивалентности дозы леводопы в плазме, что позволит объективно оценить влияние коррекции МБК на фармакодинамику и фармакокинетику леводопы.

Список литературы/References

1. Illarionov S.N., Levin O.S. (eds.) *Rukovodstvo po diagnostike i lecheniyu bolezni Parkinsona* [A Guide to the Diagnosis and Treatment of Parkinson's Disease]. Moscow, 2017. 336 p. (In Russ.)
2. Levin O.S., Fedorova N.V. *Bolezn' Parkinsona* [Parkinson's Disease]. Moscow, 2016. 384 p. (In Russ.)
3. Litvinenko I.V. *Bolezn' Parkinsona* [Parkinson's Disease]. Moscow, 2006. 216 p. (In Russ.)
4. Ueki A., Otsuka M. Life style risks of Parkinson's disease: association between decreased water intake and constipation. *J Neurol* 2004; 251(suppl 7): v118–23. DOI: 10.1007/s00415-004-1706-3. PMID: 15505750.
5. Cersosimo M.G., Benarroch E.E. Pathological correlates of gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2012; 46: 559–564. DOI: 10.1016/j.nbd.2011.10.014. PMID: 22048068.
6. Braak H., de Vos R.A., Bohl J., Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006; 396: 67–72. DOI: 10.1016/j.neulet.2005.11.012. PMID: 16330147.
7. Franzosa E.A., Huang K., Meadow J.F. et al. Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: E2930–E2938. DOI: 10.1073/pnas.1423854112. PMID: 25964341.
8. Browne H.P., Forster S.C., Anonye B.O. et al. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* 2016; 533: 543–546. DOI: 10.1038/nature17645. PMID: 27144353.
9. Cryan J.F., Dinan T.G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 701–712. DOI: 10.1038/nrn3346. PMID: 22968153.
10. Forsyth C.B., Shannon K.M., Kordower J.H. et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One* 2011; 6: e28032. DOI: 10.1371/journal.pone.0028032. PMID: 22145021.
11. Keshavarzian A., Green S.J., Engen P.A. et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015; 30: 1351–1360. DOI: 10.1002/mds.26307. PMID: 26179554.
12. Tan A.H., Mahadeva S., Thalha A.M. et al. Small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20: 535–540. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2014.02.019. PMID: 24637123.
13. Scheperjans F., Aho V., Pereira P.A. et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 2015; 30: 350–358. DOI: 10.1002/mds.26069. PMID: 25476529.
14. Thakur A.K., Shakya A., Husain G.M. et al. Gut-microbiota and mental

- health: current and future perspectives. *J Pharmacol Clin Toxicol* 2014; 2: 1016.
15. Cryan J.F., Dinan T.G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 701–712. DOI: 10.1038/nrn3346. PMID: 22968153.
 16. Wall R., Cryan J.F., Ross R.P. et al. Bacterial neuroactive compounds produced by psychobiotics. *Adv Exp Med Biol* 2014; 817: 221–239. DOI: 10.1007/978-1-4939-0897-4_10. PMID: 24997036.
 17. Parashar A., Udayabanu M. Gut microbiota: Implications in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017; 38: 1–7. DOI: 10.1016/j.parkrelid.2017.02.002. PMID: 28202372.
 18. Diaz Heijtz R., Wang S., Anuar F. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 3047–3052. DOI: 10.1073/pnas.1010529108. PMID: 21282636.
 19. Matsumoto M., Kibe R., Ooga T. et al. Cerebral low-molecular metabolites influenced by intestinal microbiota: a pilot study. *Front Syst Neurosci* 2013; 7: 9. DOI: 10.3389/fnsys.2013.00009. PMID: 23630473.
 20. Daubner S.C., Le T., Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* 2011; 508: 1–12. DOI: 10.1016/j.abb.2010.12.017. PMID: 21176768.
 21. Du Y., Ma Z., Lin S. et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 14 669–14 674. DOI: 10.1073/pnas.251341998. PMID: 11724929.
 22. Radad K., Moldzio R., Rausch W.D. Minocycline protects dopaminergic neurons against long-term rotenone toxicity. *Can J Neurol Sci* 2010; 37: 81–85. DOI: 10.1017/S0317167100009690. PMID: 20169778.
 23. Inamdar A.A., Chaudhuri A., O'Donnell J. The protective effect of minocycline in a paraquat-induced Parkinson's disease model in drosophila is modified in altered genetic backgrounds. *Parkinsons Dis* 2012; 2012: 938528. DOI: 10.1155/2012/938528. PMID: 22900232.
 24. NINDS NET-PD Investigators. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology* 2006; 66: 664–671. DOI: 10.1212/01.wnl.0000201252.57661.e1. PMID: 16481597.
 25. Yang T., Santisteban M.M., Rodriguez V. et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension* 2015; 65: 1331–1340. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315. PMID: 25870193.
 26. Lotan D., Cunningham M., Joel D. Antibiotic treatment attenuates behavioral and neurochemical changes induced by exposure of rats to group A streptococcal antigen. *PLoS One* 2014; 9: e101257. DOI: 10.1371/journal.pone.0101257. PMID: 24979049.
 27. Surwase S.N., Jadhav J.P. Bioconversion of L-tyrosine to L-DOPA by a novel bacterium *Bacillus* sp. *JPJ. Amino Acids* 2011; 41: 495–506. DOI: 10.1007/s00726-010-0768-z. PMID: 20963458.
 28. LeBlanc J.G., Milani C., de Giori G.S. et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol* 2013; 24: 160–168. DOI: 10.1016/j.copbio.2012.08.005. PMID: 22940212.
 29. Cassani E., Privitera G., Pezzoli G. et al. Use of probiotics for the treatment of constipation in Parkinson's disease patients. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2011; 57: 117–121. DOI: 10.1038/s41531-018-0042-8. PMID: 21587143.
 30. Mridula K.R., Borgohain R., Chandrasekhar Reddy V. et al. Association of *Helicobacter pylori* with Parkinson's Disease. *J Clin Neurol* 2017; 13: 181–186. DOI: 10.3988/jcn.2017.13.2.181. PMID: 28406585.
 31. Senkovich O.A., Yin J., Ekshyyan V. et al. *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils. *Infect Immun* 2011; 79: 3106–3116. DOI: 10.1128/IAI.01275-10. PMID: 21576328.
 32. Arai H., Furuya T., Mizuno Y., Mochizuki H. Inflammation and infection in Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 2006; 21: 673–678. DOI: 10.14670/HH-21.673. PMID: 16528677.
 33. Dobbs R.J., Dobbs S.M., Weller C. et al. Role of chronic infection and inflammation in the gastrointestinal tract in the etiology and pathogenesis of idiopathic parkinsonism. Part 1: eradication of *Helicobacter* in the cachexia of idiopathic parkinsonism. *Helicobacter* 2005; 10: 267–275. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2005.00331.x. PMID: 16104942.
 34. Fiddian-Green R.G. *Helicobacter pylori* eradication and L-dopa absorption in patients with PD and motor fluctuations. *Neurology* 2007; 68: 1085. DOI: 10.1212/01.wnl.0000260440.07107.99. PMID: 17389325.
 35. Braniste V., Al-Asmakh M., Kowal C. et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* 2014; 6: 263ra158. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009759. PMID: 25411471.
 36. Anderson G., Seo M., Berk M. et al. Gut permeability and microbiota in Parkinson's disease: role of depression, tryptophan catabolites, oxidative and nitrosative stress and melatonergic pathways. *Curr Pharm Des* 2016; 22: 6142–6151. DOI: 10.2174/1381612822666160906161513. PMID: 27604608.
 37. Litvinenko I.V., Krasakov I.V., Bisaga G.N. et al. [Modern conception of the pathogenesis of neurodegenerative diseases and therapeutic strategy]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova* 2017; (6) (suppl 2): 3–10. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro2017117623-10.
 38. Rodionov G.G., Shantyr I.I., Svetkina E.V. et al. [Evaluation of the wall intestinal microbiota of healthy people by gas chromatography – mass spectrometry method]. *Translyatsionnaya meditsina* 2017; 4(6): 34–42. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2017-4-6-34-42.
 39. Budnikov G.K. (ed.) *Problemy analiticheskoy khimii* [Problems of Analytical Chemistry]. Moscow, 2010; 11: 293–368. (In Russ.)

Поступила/Received 26.06.2018
Принята в печать/Accepted 31.08.2018

Со списком литературы на русском языке можно ознакомиться на сайте журнала.

Информация об авторах: Красаков Игорь Вячеславович – к.м.н., рук. центра экстрапирамидных заболеваний ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова, асс. каф. нервных болезней ВМедА им. С.М. Кирова;
Литвиненко Игорь Вячеславович – д.м.н., проф., нач. каф. нервных болезней ФГБВОУ ВО ВМедА им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;
Родионов Геннадий Георгиевич – д.м.н., доц., зав. НИЛ токсикологии и лекарственного мониторинга ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова, Санкт-Петербург, Россия;
Шантырь Игорь Игнатьевич – д.м.н., проф., зав. НИО биоиндикации ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова, Санкт-Петербург, Россия;
Светкина Екатерина Владимировна – н.с. НИЛ токсикологии и лекарственного мониторинга ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова, Санкт-Петербург, Россия

Information about the authors: Igor V. Krasakov, PhD (Med.), Head of Center of extrapyramidal disorders, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine; assistant, Department of nervous diseases, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia; Igor V. Litvinenko, D. Sci. (Med.), Prof., Head of Department of nervous diseases, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia; Gennadiy G. Rodionov, D. Sci. (Med.), Ass. Prof., Head of Laboratory of toxicology and drug monitoring, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russia; Igor I. Shantyr, D. Sci. (Med.), Prof., Head of Laboratory of bioindication, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russia; Ekaterina V. Svetkina, researcher, Laboratory of toxicology and drug monitoring, Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russia