

На правах рукописи

КАШТАНОВА ДАРЬЯ АНДРЕЕВНА

**ВЗАИМОСВЯЗЬ ФАКТОРОВ РИСКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ И СОСТОЯНИЯ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ
С СОСТАВОМ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА**

14.01.05 – Кардиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2017

Работа выполнена в отделе изучения процессов старения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России

Научный руководитель:
д.м.н., профессор

Ткачева Ольга Николаевна

Научный консультант:
д.м.н., профессор

Кафарская Людмила Ивановна

Официальные оппоненты:

заведующая отделом возраст-ассоциированных заболеваний обособленного подразделения Медицинский научно-образовательный центр ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва
доктор медицинских наук

Орлова Яна Артуровна

профессор кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки России, г. Москва
доктор медицинских наук, профессор

Виллевалде Светлана Вадимовна

Ведущая организация: ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2017г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.016.01 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России по адресу: 101990, г. Москва, Петроверигский пер., д.10, стр.3.

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России (101990, г. Москва, Петроверигский пер., д.10, стр.3) и на сайте www.gnicpm.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, с.н.с.

Киселева Наталия Васильевна

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

16S рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота с константой седиментации 16 единиц Сведберга
АГ – артериальная гипертония
АД – артериальное давление
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспартатаминотрансфераза
ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
вчСРБ – высокочувствительный С-реактивный белок
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ – интерлейкин
ИМТ – индекс массы тела
КИМ – комплекс интима-медиа
КНП – коэффициент наклона прямой
ЛЖ – левый желудочек
ЛПС – липополисахарид
НТГ – нарушение толерантности к глюкозе
ОХС – общий холестерин
ПГТТ – пероральный глюкозотолерантный тест
РАМН – Российская академия медицинских наук
САД – систолическое артериальное давление
СД – сахарный диабет
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
СРПВ – скорость распространения пульсовой волны
ТГ – триглицериды
ФБГУ «ГНИЦПМ» Минздрава России – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства
ФР – факторы риска
ХСЛВП – холестерин липопротеинов высокой плотности
ХСЛНП – холестерин липопротеинов низкой плотности
ЧСС – частота сердечных сокращений
ЭКГ – электрокардиография
FDR – false discovery rate, поправка на множественное сравнение
Ggplot – grammar of graphics plot, пакет визуализации данных для языка программирования R
Glm2 – Generalized Linear Models2, статистический пакет для построения обобщенных линейных моделей
QIIME – Quantitative Insights Into Microbial Ecology, программный комплекс для количественной оценки микробиоты
MetaHit - METAGENOMICS OF THE HUMAN INTESTINAL TRACT, консорциум, созданный для изучения метагеномики кишечного тракта человека
OTU – operational taxonomic units, операционные таксономические единицы
UniFrac – unique fraction metric, расстояние, используемое для сравнения биологических сообществ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Болезни системы кровообращения неизменно занимают лидирующее место в структуре смертности и инвалидности как во всем мире, так и в России (Roth GA, et al. 2015). ВОЗ прогнозирует дальнейший рост сердечно-сосудистой заболеваемости, обусловленный старением населения и особенностями образа жизни, что делает раннюю диагностику и своевременную профилактику ССЗ еще более актуальными в современном мире. В основе ССЗ лежат изменения сосудистой стенки – развитие атеросклероза и повышение жесткости сосудистой стенки (Стражеско И.Д. и др. 2012), маркерами которых являются толщина КИМ и СРПВ соответственно. Известно, что в патогенезе развития этих состояний играют роль множество факторов, таких как нарушения обмена глюкозы и липидов, АГ, избыточная масса тела, курение, системное воспаление. Однако суть взаимодействий этих факторов изучена слабо, а этиология до настоящего момента обсуждается. Одной из современных гипотез о причинах развития повреждений сосудистой стенки и ССЗ является изменение состава кишечной микробиоты (Ettinger G, et al. 2014).

Метаболизм бактерий кишечника может оказывать влияние на организм человека. Число генов микробиома в более чем 150 раз превышает число собственных генов человека, что свидетельствует о его мощном метаболическом потенциале (Qin J, et al. 2010). Например, бактерии кишечника могут как стимулировать, так и препятствовать развитию хронического системного воспаления (Meijer K, et al. 2010, Nagpal R, et al. 2016) – связующего звена ССЗ и их ФР (Mathis D, et al. 2011). Существуют некоторые сведения о влиянии микробиоты на углеводный и липидный обмены (Zietek T, et al. 2016) и даже аппетит и АД (Bauer PV, et al. 2016, Boulange CL, et al. 2016).

Число исследований по изучению микробиоты кишечника лавинообразно растет. Были обнаружены некоторые ассоциации и механизмы влияния микробного состава на изменения сосудистой стенки, факторы сердечно-сосудистого риска (Singh V, et al. 2016). Однако до сих пор не проводились исследования по изучению взаимосвязи состава микробиоты кишечника с СРПВ, единичные работы оценивали питание вместе с клиническими показателями и факторами кардиоваскулярного риска. В свою очередь питание – мощнейший фактор, напрямую влияющий на состояние микробиоты. Современные ученые предполагают, что правильно подобранная диета

именно благодаря ее влиянию на микробиоту кишечника может быть методом профилактики ССЗ (Goldsmith JR, et al. 2014). Тем не менее, имеющиеся данные довольно разрозненны, а на территории РФ были проведены единичные работы в основном описательного характера, хотя считается, что микробный состав кишечника различается в зависимости от региона проживания (De Filippo C, et al. 2010).

Цель исследования. Изучить наличие и характер взаимосвязи между факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, состоянием сосудистой стенки и составом микробиоты кишечника у лиц без сердечно-сосудистых заболеваний.

Задачи исследования:

1. Изучить состав микробиоты кишечника в зависимости от наличия факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний (артериальной гипертензии, нарушений углеводного, липидного обмена, избыточной массы тела и ожирения, курения, возраста и пола);
2. Изучить состав микробиоты кишечника в зависимости от характера питания (калорийности, потребления основных нутриентов, потребления алкоголя);
3. Изучить наличие и характер взаимосвязи состава микробиоты кишечника с маркерами системного вялотекущего воспаления (уровнем высокочувствительного С-реактивного белка и интерлейкина-6);
4. Изучить наличие и характер взаимосвязи состава микробиоты кишечника с состоянием сосудистой стенки (толщиной комплекса интима-медиа и скоростью распространения пульсовой волны).

Научная новизна. Впервые изучался состав микробиоты кишечника относительно здоровых лиц, проживающих на территории Москвы и Московской области. Впервые в России и в числе первых в мире выполнен комплексный анализ состава микробиоты кишечника в зависимости от ФР ССЗ, состояния сосудистой стенки и системного вялотекущего воспаления у тщательно отобранной когорты относительно здоровых лиц с учетом характера питания. Было показано, что разнообразие микробиоты кишечника когорты здоровых лиц Московского региона выше, чем в сопоставимых образцах западных исследований. В числе первых обнаружена взаимосвязь состава микробиоты кишечника не только с атеросклерозом, но и с повышением жесткости сосудистой стенки. Найдены взаимосвязи факторов кардиоваскулярного риска, изменений сосудистой стенки, вялотекущего воспаления и

большой представленности в микробиоте кишечника оппортунистических патогенов, некоторые из которых в меньшей степени представлены у людей, потребляющих относительно больше крахмальных углеводов. Также обнаружена обратная взаимосвязь амилолитических бактерий с наличием ожирения.

Практическая значимость работы. Представленная работа является отражением новых трансляционных подходов в медицине, подтверждает возможность рассмотрения микробиоты кишечника в качестве мишени для коррекции модифицируемых ФР СЗЗ, субклинических изменений сосудистой стенки, а также в качестве маркера для диагностики субклинических изменений сосудистой стенки. Помогает дополнить принципы индивидуальной профилактики ССЗ. Подтверждает и дополняет результаты зарубежных исследований о взаимосвязи условно-патогенных бактерий с факторами сердечно-сосудистого риска, изменениями сосудистой стенки и низким потреблением т.н. «сложных» углеводов. Работа расширяет представление о существующих микробных сообществах, о нормальной микробиоте кишечника человека, предоставляет новые данные для последующих исследований микробиоты в России и мире.

Внедрение. Результаты исследования внедрены в научную и практическую работу отдела изучения процессов старения и возраст-ассоциированных заболеваний ФГБУ «ГНИЦПМ» Минздрава России.

Апробация диссертации. Состоялась 02.03.2017 г. на заседании апробационной комиссии ФГБУ «ГНИЦПМ» Минздрава России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в т.ч. 7 статей — в журналах, включенных в перечень ВАК РФ. Автор представил результаты работы в устных докладах на научных конференциях «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2016), «The obesity epidemic: Discussing the global health crisis» (Лондон, 2017), «NutrEvent» (Лилль, 2017) а также на II Всероссийском конгрессе по геронтологии и гериатрии (Москва, 2017).

Основные положения, выносимые на защиту:

- Относительно большее число бактерий условно-патогенных родов ассоциировано с повышением систолического артериального давления, абдоминальным ожирением и высоким индексом массы тела, вялотекущим системным воспалением, нарушениями метаболизма глюкозы;

- Состав микробиоты кишечника ассоциирован с состоянием сосудистой стенки, утолщением комплекса интима-медиа и увеличением скорости распространения пульсовой волны;
- Относительно меньшая представленность бактерий, расщепляющих полисахариды, взаимосвязана с наличием ожирения, а условно-патогенные бактерии, ассоциированные с нарушениями углеводного обмена, повышением артериального давления и субклиническим атеросклерозом, в меньшей степени представлены у лиц, потребляющих большее количество крахмальных углеводов.

Объем и структура диссертации. Диссертация представлена на 119 страницах компьютерной верстки, состоит из введения, четырех глав, включающих: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение полученных результатов; а также выводы, практические рекомендации, список сокращений и список литературы. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 14 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования стали мужчины и женщины в возрасте ≥ 25 лет без клинических проявлений хронических или острых заболеваний, но с возможным наличием факторов кардиоваскулярного риска, обратившихся в ФБГУ «ГНИЦПМ» Минздрава России для профилактического консультирования. Согласно поставленным задачам, было проведено одномоментное исследование на базе Отдела изучения процессов старения и профилактики возраст-ассоциированных заболеваний «ГНИЦПМ». Протокол был одобрен местным этическим комитетом. Пациентам была предоставлена полная информация об исследовании, они дали письменное согласие на участие в нем. Конфиденциальность данных пациентов была обеспечена с использованием кодовых номеров для идентификации пациентов в базе данных и компьютерных файлах. При выявлении критериев исключения участник выбывал из исследования на любом этапе.

Критериями исключения считали: клинические проявления атеросклеротического поражения сосудов (цереброваскулярные заболевания, все формы ишемической болезни сердца и другие клинические сердечно-сосудистые нарушения); АГ 2 и 3 степеней и/или прием антигипертензивного лечения, за исключением впервые выявленной АГ 1 степени, не требующей назначения

антигипертензивной терапии и носившей транзиторный характер; кардиомиопатии, гипертрофия миокарда левого желудочка: индекс массы миокарда левого желудочка ≥ 131 г/м² у мужчин и ≥ 113 г/м² у женщин; нарушения ритма и проводимости сердца: пароксизмальные нарушения ритма сердца, фибрилляция предсердий, синдром слабости синусового узла, атриовентрикулярная блокада II и III степеней; клапанные патологии сердца; СД I типа и другие эндокринные заболевания за исключением впервые выявленного СД-2, СД с микрососудистыми, макрососудистыми и другими осложнениями, прием противодиабетической терапии, заболевания щитовидной железы в анамнезе; хроническая почечная, сердечная, печеночная недостаточность; онкологические заболевания в анамнезе; аутоиммунные заболевания; морбидное ожирение – ИМТ > 40 кг/м²; воспалительные заболевания кишечника в анамнезе, наличие диспепсических проявлений, включая констипацию или диарею; регулярный прием любых лекарственных препаратов, а также антибактериальных в течение 3 предшествующих месяцев; беременность и период лактации; отказ от участия в исследовании.

Предварительное обследование включало в себя сбор анамнеза, изучение медицинской документации, физикальный осмотр, в т.ч. измерение антропометрических показателей: определение роста, массы тела, расчёт ИМТ, окружности талии и бедер, измерение АД (мм рт.ст.) и ЧСС (уд/мин). В дальнейшем осуществлялся забор венозной крови для лабораторных анализов: клинического и биохимического с определением уровней глюкозы, креатинина, мочевины, мочевой кислоты, калия, натрия, АСТ, АЛТ, билирубина, ОХС, ТГ, ХСЛВП, ХСЛНП и уровня тиреотропного гормона. Для оценки анатомического и функционального состояния сердца, сократимости миокарда, состояния клапанного аппарата, оценки ритма сердца регистрировали ЭКГ в 12 отведениях с использованием электрокардиографа Schiller Cardioovit AT-10 (Швейцария), трансторакальную эхокардиографию, проводившуюся по стандартной методике на приборе Philips iE-33 (Нидерланды) с измерением параметров структурных и функциональных параметров сердца, а также проводили тредмил-тест на приборе Bruce Intertrack, Schiller (Швейцария) для исключения ишемии миокарда.

На этапе предварительного обследования оценивались факторы сердечно-сосудистого риска. ФР считались: АГ 1 степени при уровне АД 140/90-159/99 мм рт.

ст.; дислипидемия при уровне ОХС > 5,0 ммоль/л и/или ХСЛНП > 3,0 ммоль/л и/или ХСЛВП < 1,0 ммоль/л для мужчин и < 1,2 ммоль/л для женщин и/или ТГ > 1,7 ммоль/л; наличие ожирения, диагностировалось при значении ИМТ ≥ 30 кг/м² или избыточной массы тела при ИМТ 25-29 кг/м² или абдоминального ожирения, которое диагностировали при значении окружности талии ≥ 94 см для мужчин и ≥ 80 см для женщин (Yumuk V, et al. 2015); курение, вне зависимости от количества выкуриваемых сигарет и стажа; нарушения метаболизма глюкозы, включая впервые выявленный СД-2, диагностировавшийся при уровне в венозной плазме тощаковой глюкозы $\geq 7,0$ ммоль/л или $\geq 11,1$ ммоль/л через 2 ч после ПГТТ, НТГ: уровень глюкозы < 7,0 ммоль/л и спустя 2 ч после ПГТТ $\geq 7,8$ и < 11,1 ммоль/л, а также гипергликемию натощак: при уровне глюкозы натощак $\geq 6,1$ и < 7,0 ммоль/л в венозной плазме (Дедов И.И. и др. 2013).

Всем участникам, которые соответствовали критериям включения/исключения по итогам проведенного скрининга, были выполнены основные методы исследования.

Основные методы исследования

Дуплексное сканирование сонных артерий проводили с определением толщины КИМ, количества атеросклеротических бляшек, процента стеноза на приборе Philips I22 (Голландия) в автоматическом режиме (воспроизводимость метода 95%) одним оператором. Нормой считалась толщина КИМ < 0,9мм, 0,9 - 1,5 мм – утолщением комплекса, утолщение стенки > 50% или утолщение КИМ $\geq 1,5$ мм рассматривалось как наличие атеросклеротической бляшки (Touboul PJ, et al. 2012). СРПВ определяли на приборе SphygmoCor (Австралия) высокоточным аппланационным тонометром, который накладывали на сонную и через небольшой промежуток времени на бедренную артерии, последовательно регистрировались пульсовые волны. Повышенной СРПВ считали значение > 10 м/с (Mancia G, et al. 2013).

Наличие и степень выраженности вялотекущего системного воспаления оценивали путем определения в сыворотке крови вчСРБ иммунотурбодиметрическим методом с использованием анализатора «Sapphire-400» (Япония), ИЛ-6 – иммуноферментным методом.

Характер питания изучали частотным методом с количественной оценкой потребляемых продуктов при помощи стандартизованной компьютерной программы «Анализ состояния питания человека» (версия 1.2.4 института питания РАМН 2003-

06). Оценивался качественный состав и объем потребляемых продуктов, общая калорийность рациона, химический состав с учетом «Норм физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения РФ» (Методические рекомендации МР 2.3.1.2432-08).

Анализ микробиоты кишечника. Всем участникам были выданы стерильные контейнеры для сбора анализов с лопаткой, проведен инструктаж по сбору кала и его хранению. Образцы подвергались оперативной заморозке. Анализ состава микробиоты кишечника доноров проводился на базе ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России и состоял из выделения ДНК и последующей подготовки библиотек и секвенирования. Собранные у участников образцы кала, хранившиеся при температуре -20°C , были разморожены, из 2 мл образцов выделены ДНК, после выделения тотальной ДНК и подготовки библиотек для секвенирования было выполнено секвенирование переменных участков V3-V4 гена 16S рРНК с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов) и прибора MiSeq Illumina (США) согласно рекомендациям производителя. Фильтрация ридов по качеству и таксономическая классификация происходили с использованием встроенного программного комплекса QIIME. Таксономический состав образцов был оценен путем классификации по базе данных 16S рРНК генов Greengenes v. 13.5 с помощью байесовского классификатора (Caporaso J, et al. 2010). Результатом классификации являются количества легших ридов на OTU.

Биоинформационный анализ. Статистический анализ выполнен на языке программирования R, версия 3.1.0 с применением графической оболочки RStudio. Статистический анализ для определения различий групп доноров образцов выполнялся с использованием тестов Манна-Уитни и построением обобщенных линейных моделей (библиотека glm2 (Zhang H, et al. 2011)), позволяющих анализировать непрерывные регрессоры и выявлять нелинейные взаимосвязи между данными распределенными ненормально, как и в случае биологических систем, в т.ч. микробиоты кишечника, с поправками на множественное сравнение по методу Бенджамини-Хохберга FDR. Так же использовались методы кластеризации (Arumugam M, et al. 2011). При построении графиков многомерного шкалирования было использовано расстояние UniFrac (Lozupone C, et al. 2011). Для иллюстраций был использован пакет ggplot. Чем выше оказывалось значение КНП – оценки влияния признака, отражающей взаимосвязь изучаемых факторов с представленностью OTU в логарифмическом масштабе и

определяющей направление и степень зависимости – тем сильнее считалось выявленное влияние. Различие принималось за значимое, если откорректированная величина р-значения превышала порог в 0,05. Для сравнительного анализа образцов кишечной микробиоты были использованы общедоступные метагеномные данные Turnbaugh PJ, et al. 2009, использовавших сопоставимые методы изучения микробиоты и включавших здоровых добровольцев с ФР ССЗ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общая клиническая характеристика участников

После скрининга в исследование были включены 92 участника в возрасте 25-76 лет. Средний возраст всех участников 52 ± 13 лет. Доля мужчин 28% ($n = 26$), женщин – 72% ($n = 66$). Средний возраст женщин составил 53 ± 13 лет, а средний возраст мужчин – 51 ± 13 лет. ФР считался возраст > 45 лет для мужчин и > 55 лет для женщин, таких участников было 55% ($n = 51$). Частота ФР отображена на рисунке 1.

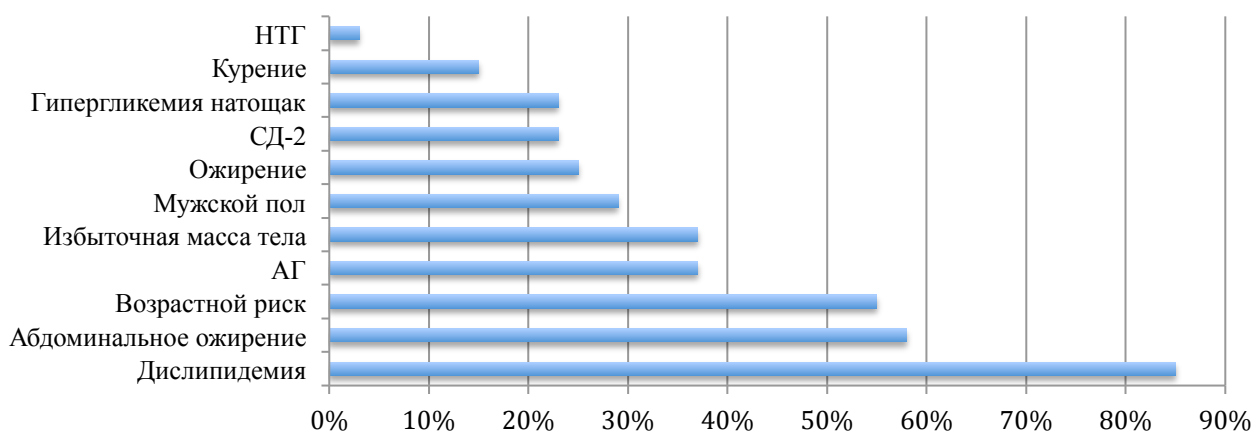


Рис. 1 Распространенность факторов сердечно-сосудистого риска среди всех участников исследования

Самым распространенным ФР было нарушение липидного обмена. Средний уровень ОХС составил $5,9 \pm 1,1$ ммоль/л, ХСЛНП – $3,98 \pm 1,02$ ммоль/л, ХСЛВП – $1,3 \pm 0,4$ ммоль/л, ТГ – $1,2 \pm 0,7$ ммоль/л. При этом повышенный уровень ОХС был зафиксирован у 78% пациентов ($n = 72$), ХСЛНП – у 82% пациентов ($n = 75$), ТГ – у 17% пациентов ($n = 16$), а сниженный уровень ХСЛВП – у 33% пациентов ($n = 30$). Реже встречались нарушения обмена глюкозы. Средний уровень глюкозы натощак составил $5,7 \pm 1,5$ ммоль/л, постпрандиальный уровень глюкозы – $5,4 \pm 1,4$ ммоль/л (без участников с СД-2). Гипергликемия натощак была отмечена у 23% человек ($n = 21$), НТГ – у 3% ($n = 3$). СД-2 был диагностирован у 23% участников ($n = 21$). АГ 1

степени была выявлена у 37% участников (n = 34). Средний ИМТ участников равен $27,3 \pm 18,7$ кг/м². Избыточная масса тела отмечалась у 37% человек (n = 34), ожирение – у 25% участников (n = 23). Абдоминальное ожирение выявлено у 58% человек (n = 53), среднее значение объема талии составило $98 \pm 11,5$ см у мужчин и 86 ± 15 см у женщин. Всего среди участников было 15% курильщиков (n = 14).

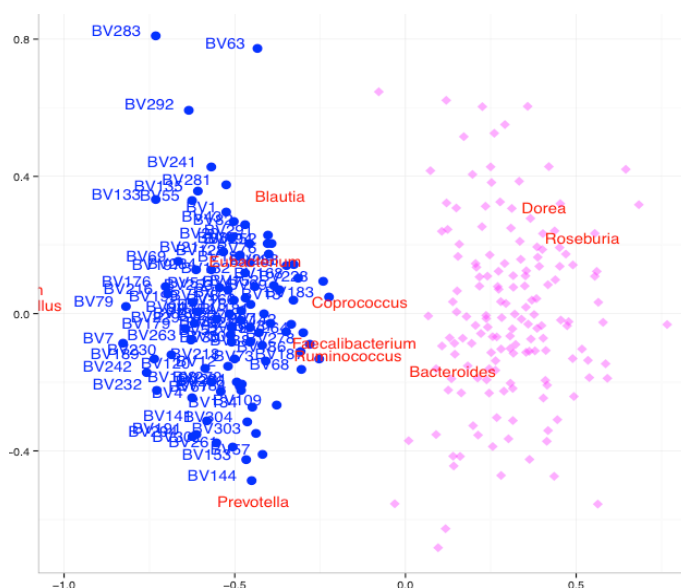
Общая характеристика состава микробиоты кишечника испытуемых

Секвенировано 92 образца кала по последовательностям 16S рРНК генов, V3-V4 переменные регионы. Получено в среднем 102582 ± 46284 ридов на образец. В результате в анализе были задействованы 102581 ± 39210 высококачественных ридов, что составило $87 \pm 2\%$ от их изначального количества. Из них $87,4 \pm 7,4 \%$ были классифицированы. При этом средний процент классификации с точностью до рода составил $97,41 \pm 0,9\%$. Самыми широко представленными оказались филумы Bacteroidetes ($12,7 \pm 9,86\%$) и Firmicutes ($57,09 \pm 13,6\%$). Эти два филума являются основой состава микробиоты кишечника человека (Thomas V, et al. 2015).

Самым распространенным родом в изучаемой выборке стал род *Blautia*. В работе MetaHit при определении «энтеротипов» или «фекотипов», род *Blautia* был наиболее широко представлен в третьем, самом «неоднозначном» энтеротипе – Ruminococcus. И с большим количеством бактерий именно этого рода оказалось ассоциировано множество нарушений, в их числе: повышение САД, СД-2 и предиабет, а также утолщение КИМ. *Blautia coccooides* были в 2008 переклассифицированы из *Clostridium coccooides* (Liu C, et al. 2008). *Blautia coccooides* gen. nov. (ранее называвшиеся *Clostridium coccooides*) относятся к кластеру *Clostridium XIVa*, который также называется группой *Clostridium coccooides* (Tuovinen E, et al. 2013).

В среднем 50% всего состава образцов пришлось на пять родов: *Blautia*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Clostridium*. Родовой состав несколько отличается от обычно наблюдаемой картины, когда самыми представленными бактериальными родами в микробиомах кала здоровых людей обычно являются *Bacteroides*, *Prevotella* или некоторые представители отдела Firmicutes, например *Ruminococcus* (Arumugam M, et al. 2011). При сравнении состава микробиоты образцов с исследованием Turnbaugh PJ, et al. 2009 года Калифорнийского университета, были также выявлены различия, наглядно отображенные на рисунке 2,

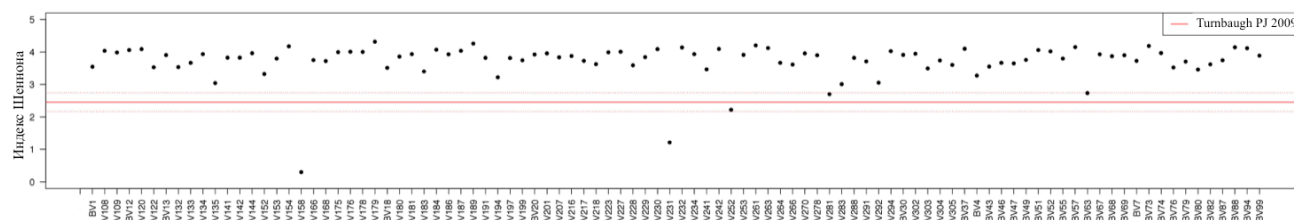
что говорит о необходимости изучения микробиоты кишечника для различных регионов в виду их значительной разнородности.



Примечание: синие точки – образцы настоящего исследования, розовые точки – образцы Turnbaugh PJ, et al., 2009г. Чем ближе образец к роду, тем больше содержание рода в образце

Рис. 2 График многомерного шкалирования образцов настоящего исследования и исследования Turnbaugh PJ

Разнообразие микробиоты изучалось с помощью индекса Шеннона и было достаточно высоким во всей выборке в сравнении с исследованием Turnbaugh PJ, et al. 2009 (рисунок 3).

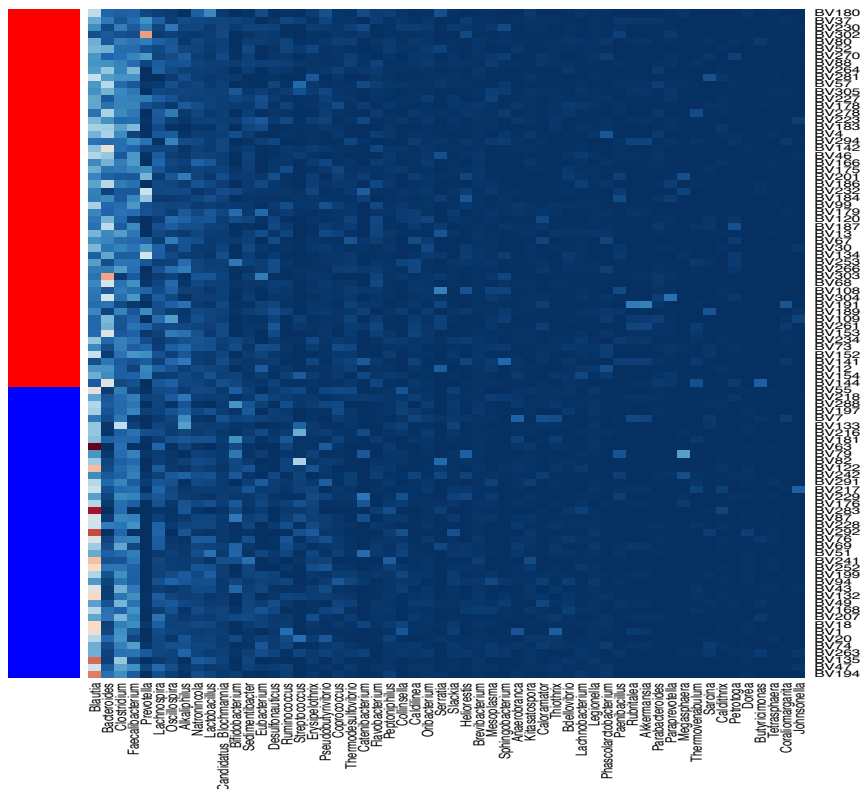


Примечание: черные точки – образцы исследования, красная линия – среднее значение альфа-разнообразия в исследовании Turnbaugh PJ, et al. 2009, пунктир – \pm стандартное отклонение.

Рис. 3 Индексы альфа-разнообразия в исследуемых образцах и образцах исследования Turnbaugh PJ

Индекс альфа-разнообразия для здоровой выборки, выбранной в качестве сравнения (Turnbaugh PJ, et al. 2009), составил $2,46 \pm 0,29$, в исследуемой когорте – $3,71 \pm 0,56$, что свидетельствует о богатстве микробиоты в группе испытуемых, а значит, и о ее стабильности как экосистемы.

Кластерный анализ. Кластерный анализ опытных образцов выполнен по алгоритму, которым были выделены энотротипы в работе Agumigam et al. 2011. Метод основан на кластеризации по k-средним с поиском оптимального числа кластеров. В результате было выделено 2 кластера образцов (рисунок 4).



Примечание: красным отмечены образцы, попавшие в кластер 1, синим – в кластер 2.

Рис. 4. Тепловая карта относительной представленности OTU в образцах в процентах, составляющих 85% суммарной представленности.

Эти кластеры нельзя назвать определенно четко разделенными: значение средней силуэтной ширины составило 0,22 при обычно используемом пороговом значении достоверности кластеризации в 0,8 (Kailing K, et al. 2004). Образцы из этих кластеров не различаются по полу и возрасту, но во втором кластере достоверно больше образцов от доноров с СД-2 ($p = 0,015$) и с утолщением КИМ ($p = 0,04$).

Также эти кластеры достоверно различаются по значению индексов альфа-разнообразия образцов, входящих в их состав. В первом кластере оно выше ($p < 0,001$), что характеризует микробиоту этих доноров – в основном без СД-2 и с нормальной толщиной КИМ – как потенциально более устойчивую к внешним воздействиям.

Взаимосвязь микробиоты и исследуемых показателей

Был проведен поиск возможных взаимосвязей между имеющимися клиническими данными доноров образцов и составом их микробиоты. В первом приближении был использован тест Манна-Уитни.

На уровне отделов тестом Манна-Уитни на довольно незначительном уровне достоверности ($p = 0,049$) было обнаружено, что представленность отдела Firmicutes выше у доноров с впервые выявленным СД-2, чем у доноров без СД-2. Более чувствительным методом поиска взаимосвязей является построение обобщенных линейных моделей. В отличие от других методов, этот анализ способен выявлять нелинейные взаимодействия, включать как категориальные, так и непрерывные переменные (разделение образцов на группы или значение биохимических параметров), а непрерывные величины могут иметь не только нормальное распределение. С целью ограничить возможность появления случайных результатов, анализ проводился по родовому составу микробиоты. В анализ вошли только те рода, чья средняя представленность составляет 95% от суммарной по всем образцам и по отделам, которые имеют ненулевую представленность хотя бы в половине образцов. Все достоверные результаты моделирования приведены далее.

Взаимосвязь состава микробиоты кишечника и факторов сердечно-сосудистого риска

При изучении ФР среди испытуемых и связи их с состоянием микробиоты было обнаружено, что само количество ФР ассоциировано с преобладанием грамтрицательных бактерий рода *Serratia* (филум *Proteobacteria*, класс *Gamma**proteobacteria*, семейство *Enterobacteriaceae*), считающихся условно-патогенными, количество которых было достоверно выше у пациентов с большим числом ФР ($p=0,0003$). Эти бактерии проявили себя и в других анализах.

Артериальная гипертензия и микробиота кишечника. При первом рассмотрении было выявлено, что у лиц с повышенным САД больше бактерий *Prevotella* ($p = 0,0001$), еще одного рода оппортунистических патогенов. В дальнейшем, для того, чтобы оценить максимально «чистую» выборку пациентов по данному показателю, была проанализирована микробиота кишечника участников без СД-2 с использованием метода обобщенного линейного анализа. Было обнаружено, что среди испытуемых без СД-2 САД было повышено у пациентов, чья микробиота содержала больше бактерий упомянутого ранее рода *Blautia* ($p = 0,002$).

Ожирение и микробиота кишечника. Абдоминальное ожирение было ассоциировано с повышением числа бактерий родов *Serratia* ($p = 0,004$) и *Prevotella* ($p = 0,0008$), и меньшим числом *Oscillospira* ($p = 0,0005$) в составе микробиоты

кишечника. Считается, что бактерии этого рода расщепляют сложные углеводы, то есть свидетельствуют об относительно «здоровом» питании, однако ассоциации этих бактерий с питанием обнаружено не было. ИМТ оказался выше у лиц с большей представленностью тех же родов условно-патогенных бактерий *Serratia* ($p=0,003$) и *Prevotella* ($p = 0,0003$).

Липидный обмен и микробиота кишечника. Нарушения липидного обмена были наиболее часто встречающимся ФР (рисунок 1). В настоящем исследовании не было обнаружено связи с ними состояния сосудистой стенки, а также каких-либо различий в составе кишечной микробиоты у лиц с нарушениями липидного обмена, ни рассматривая их по-отдельности, ни по факту наличия хотя бы одного из них как дислипидемии. Вероятно, это связано с тем, что участников с дислипидемией оказалось довольно много – 85% испытуемых имели те или иные нарушения. Возможно, при проведении проспективного интервенционного исследования с применением пробиотиков или пребиотиков могут быть выявлены закономерности изменения состава микробиоты.

Углеводный обмен и микробиота кишечника. Ранее упомянутые филумы (*Bacteroidetes* и *Firmicutes*) различались в группах с СД-2 и без него (таблица 1).

Таблица 1

Представленность филумов *Bacteroidetes* и *Firmicutes* у пациентов без и с СД-2

Представленность <i>Bacteroidetes</i>		Представленность <i>Firmicutes</i>	
Здоровые	Пациенты с СД-2	Здоровые	Пациенты с СД-2
13,6 ± 10,2%	9,1 ± 7,9%	55,8 ± 14%	63,8 ± 9,8%
p = 0,0009		p = 0,03	

Наличие СД-2 было ассоциировано также с большим количеством бактерий *Blautia* ($p = 0,007$); наблюдалась динамика увеличения числа этих бактерий в клиническом ряду пациентов с нормальным углеводным обменом, предиабетом и СД-2 ($p < 0,001$). Широко представленный в исследуемой выборке род *Blautia* – один из филума *Firmicutes*. Регрессионный анализ показал, что в клиническом ряду пациентов с нормальным углеводным обменом, предиабетом и СД-2 достоверная динамика повышения представленности наблюдается и для рода *Serratia* ($p = 0,003$), в этом же клиническом ряду отмечалось снижение числа бактерий филума *Bacteroidetes* ($p < 0,001$).

Возрастной риск и микробиота кишечника. У лиц старшего возраста уровень *Bacteroidetes* ($p = 0,006$) и *Prevotella* ($p = 0,001$) был достоверно ниже, чем среди

участников более молодого возраста. Род *Prevotella* оказался связан с различными нарушениями метаболизма. В исследование набирали здоровых участников, и пожилые люди, вошедшие в исследование, были представителями относительно благополучного старения. Возможно, таким образом в исследуемой когорте лиц практически без хронических заболеваний поддерживается метаболический баланс и баланс иммунной системы посредством «перераспределения» бактерий с провоспалительной активностью, однако это требует более подробного длительного изучения.

Микробиота кишечника и пол. Не было обнаружено достоверных различий в составе микробиоты у мужчин и женщин. В литературе имеются данные о том, что уровень половых гормонов оказывает влияние на микробиоту кишечника, однако в настоящей работе это не стало предметом изучения.

Курение и микробиота кишечника. Не было обнаружено достоверных различий в составе микробиоты у курильщиков и некурящих, возможно потому, что курящих в исследование было включено относительно мало – всего 15%.

Таким образом, были определены взаимосвязи большего количества условно-патогенных родов *Serratia* и *Prevotella*, а также рода *Blautia*, способных инициировать воспаление, с факторами сердечно-сосудистого риска, и амилитических бактерий *Oscillospira* – с отсутствием абдоминального ожирения (таблица 2).

Таблица 2

Основные выявленные взаимосвязи состава микробиоты кишечника с ФР ССЗ

Род	Характеристика	Связь с клиническими параметрами
Blautia	Грам (+), активируют секрецию TNF α , цитокинов	Прямая взаимосвязь с повышением САД у лиц без СД-2 (КНП = 0,315, p = 0,002)
		Прямая взаимосвязь с СД-2 (КНП = 0,195, p = 0,07) и предиабетом (КНП = 0,124, p < 0,001)
Oscillospira	Грам(+), ферментируют сложные углеводы	Обратная взаимосвязь с абдоминальным ожирением (КНП = -0,507, p < 0,001)
Prevotella	Грам (-), условные патогены	Прямая взаимосвязь с повышением САД (КНП = 0,566, p < 0,001)
		Прямая взаимосвязь с абдоминальным ожирением (КНП = 0,486, p < 0,001) и высоким ИМТ (КНП = 0,557, p < 0,001)
Serratia	Грам (-), условные патогены	Прямая взаимосвязь с абдоминальным ожирением (КНП = 1,203, p = 0,004) и высоким ИМТ (КНП = 0,638, p = 0,003)
		Прямая взаимосвязь с предиабетом и СД-2 (КНП = 0,565, p = 0,003)

Взаимосвязь состава микробиоты кишечника и питания

Общая характеристика питания участников. У 86 участников был проведен анализ питания. Средняя калорийность рациона составила $2176,2 \pm 654,2$ ккал. Среднее суточное потребление углеводов $209,3 \pm 91,8$ г; белков $76,6 \pm 22,6$ г; жиров $101,5 \pm 33$ г; пищевых волокон $8,4 \pm 3,7$ г; крахмала $109,5 \pm 68,1$, сахара $99,8 \pm 39,9$ мг; холестерина $228,9 \pm 120,8$ мг; медиана потребления этанола 1,5г (межквартильный размах 4). Примечательно, что именно с особенностями диеты было найдено сравнительно больше зависимостей, чем с остальными параметрами. В частности, представленность рода молочнокислых бактерий *Bifidobacterium* значительно снижалась у доноров, потребляющих высококалорийную пищу, большое количество холестерина или этанола. С ростом количества потребляемого крахмала представленность *Bifidobacterium* возрастала, а *Blautia* – падала. *Blautia* не гидролизуют крахмалы, в качестве основных источников энергии используют H_2 и CO_2 , хотя и могут ферментировать некоторые короткоцепочечные углеводы с образованием этанола, водорода, сукцината и др (Tuovinen E, et al. 2013). Основные результаты изучения связи микробиоты с диетой представлены в таблице 3.

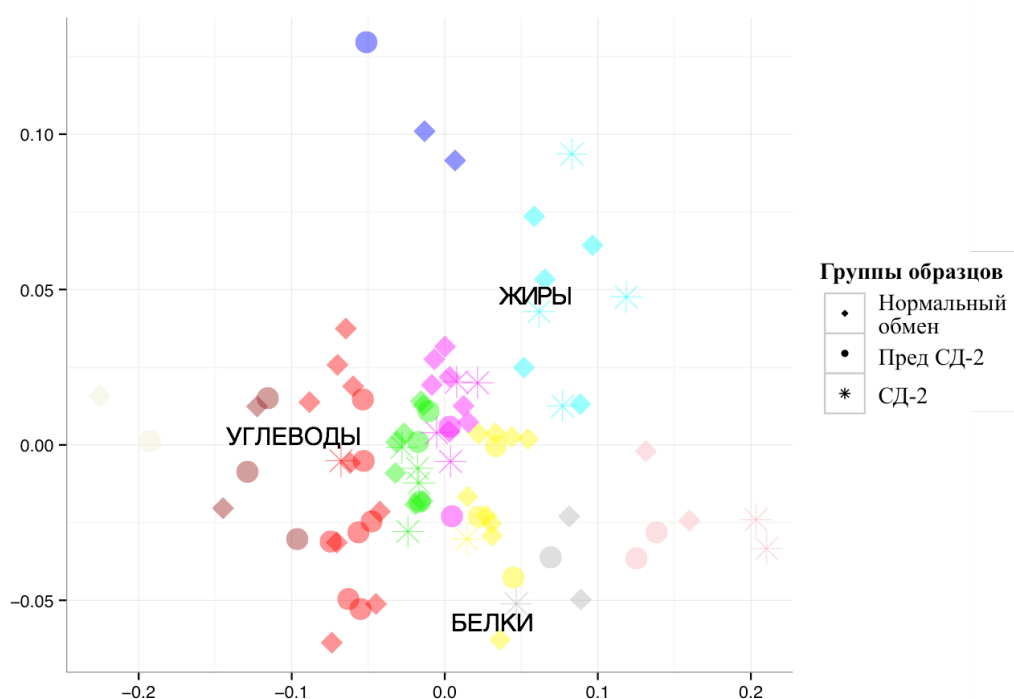
Таблица 3
Характер питания и состав микробиоты кишечника

	Размер эффекта (КНП)	Ст.ошибка	p	Таксон
Калорийность	0,11	0,035	0,009	Bacteroidetes
Жиры	0,65	0,177	0,008	Eubacterium
	-0,16	0,044	0,004	Megasphaera
Углеводы	0,22	0,056	<0,001	Bacteroidetes
Крахмал	-0,001	0,0003	0,007	Blautia
	0,002	0,0007	0,009	Bifidobacterium
Пищевые волокна	0,03	0,007	<0,001	Bacteroidetes
Холестерин	-0,002	0,0006	0,008	Bifidobacterium
Этанол	-0,05	0,014	0,006	Bifidobacterium

Анализ с разделением образцов на кластеры по питанию доноров.

С целью анализа конкретных типов диет, образцы изначально были разделены на 2 кластера методом k-медоид по матрице расстояний Брэй-Кертиса, построенной по процентному составу белков, жиров и углеводов в рационе доноров. Эти 2 кластера диеты имели достоверные различия по процентному соотношению белков, жиров и

углеводов ($p < 0,001$ для всех нутриентов). Во втором диетическом кластере было выявлено отличие по представленности рода *Prevotella* между образцами от здоровых доноров, с нарушениями углеводного обмена и с СД-2. Однако тренд был неочевиден, что может быть связано с довольно широким разбросом по составу нутриентов рациона. Так, доноры с нарушениями углеводного обмена, чьи образцы попали во второй диетический кластер, потребляли больше кальция по сравнению с другими донорами из того же кластера ($p = 0,03$). Поэтому был использован аналогичный метод поиска оптимальных диетических кластеров, но количество кластеров определялось по индексу Калинского-Гарабача, с целью выявить образцы с максимально схожим питанием: с использованием этого метода было выделено 10 кластеров (рисунок 5).



Примечание: цветами обозначена принадлежность к кластерам. Значками обозначен клинический статус доноров образцов: здоровые, наличие нарушений углеводного обмена, СД-2.

Рис. 5 График многомерного шкалирования образцов по составу их рациона.

Обращает на себя внимание кластер цианового цвета – доноры этих образцов питаются примерно одинаково, потребляя много жиров относительно других нутриентов, однако половина имеет СД-2, а другая нет. По возрасту, полу и количеству потребляемых калорий между этими двумя подвыборками различий нет ($p = 0,8, 0,5$ и $0,3$ соответственно), так же, как и по всем исследуемым элементам питания. Есть отличия в ИМТ, который достоверно выше среди лиц с СД-2 ($p = 0,03$).

Был выполнен регрессионный анализ образцов этого кластера, в результате которого обнаружено, что в образцах, у доноров которых есть СД-2, выше представленность рода *Blautia* ($p = 0,0001$), что согласуется с выводами из предыдущих регрессионных анализов представленной работы.

Взаимосвязь состава микробиоты кишечника с хроническим воспалением

Медианное значение вчСРБ среди участников составило 2,45 мг/л (межквартильный размах 2,03); у 12 участников уровень вчСРБ оказался ≥ 5 мг/л. Из всей представленности бактерий с уровнем вчСРБ положительно ассоциировались рода *Serratia* (КНП = 1,217, $p = 0,0001$) и *Paraprevotella* (КНП = 1,442, $p = 0,002$). Род *Paraprevotella* оказался положительно ассоциирован также с ИЛ-6 (КНП = 1,331, $p = 0,008$). Медианное значение ИЛ-6 составило 2,91 пг/мл (межквартильный размах 8,3), у 24 участников уровень этого маркера был ≥ 10 пг/мл. *Paraprevotella* и *Prevotella* относятся к семейству *Prevotellaceae*, которое неоднократно становилось находкой в работах по изучению взаимосвязей состава кишечной микробиоты с организмом человека. Считается, что они могут нарушать барьерную функцию слизистой кишечной стенки, т.к. активно расщепляют олигосахариды слизистого слоя, а также поддерживают неспецифическое воспаление. Таким образом, в настоящем исследовании бактерии этого семейства оказались ассоциированы с повышением САД, абдоминальным ожирением, ИМТ, СД-2 и воспалением.

Взаимосвязь состава микробиоты кишечника с состоянием сосудистой стенки

Среднее значение толщины КИМ среди участников составило $0,76 \pm 0,2$ мм. Среди всех испытуемых у 20 человек толщина КИМ превышала 0,9 мм. Этот показатель был связан со многими клиническими параметрами, в т.ч. с САД, СРПВ, уровнями мочевины, глюкозы, гликированного гемоглобина, а также возрастом. Толщина КИМ оказалась связана с высокой представленностью рода *Blautia* (КНП = 0,211, $p = 0,004$), что, вероятно, также взаимосвязано со способностью рода *Blautia* активировать секрецию фактора некроза опухоли альфа, цитокинов, причем ИЛ-8 даже в большей степени, чем токсин грамотрицательных бактерий ЛПС.

КИМ был утолщен у лиц с большим числом бактерий рода *Serratia* (КНП = 0,901, $p = 0,009$), и уровень стеноза сосудов был прямо взаимосвязан с высокой представленностью этого рода (КНП = 0,025, $p = 0,002$). Таким образом, была выявлена прямая взаимосвязь количества грамотрицательных бактерий рода *Serratia* с

абдоминальным ожирением, ИМТ, предиабетом и СД-2, системным вялотекущим воспалением, субклиническим атеросклерозом. Безусловно, для того, чтобы целостно оценить характер такой связи необходимо не только провести продольное исследование, но и включить в него изучение бактериального метаболома. Однако и по полученным результатам можно предположить некоторые закономерности. ЛПС грамотрицательных бактерий – это эндотоксин, который в физиологических концентрациях поддерживает баланс иммунной системы, а при его повышении запускает неспецифическое воспаление, которое считается основой развития метаболических нарушений. *Serratia* – возбудители нозокомиальных инфекций, метаболиты этого рода инициируют воспаление путем активации продукции интерлейкинов, ИЛ-6, ИЛ-8, ядерного фактора «каппа-би» и других участников воспаления путем стимуляции рецепторов, активируемых протеиназами типа 2. Сами бактерии рода *Serratia* выявлены при биопсии непосредственно в атеросклеротических бляшках, что позволяет предположить, что и бактерии, а не только их метаболиты могут принимать участие в формировании бляшек.

Среднее значение СРПВ составило $10,9 \pm 2,6$ м/с. СРПВ > 10 м/с была отмечена у 55 человек. СРПВ была ассоциирована с возрастом, уровнем САД, уровнями мочевины, глюкозы, гликированного гемоглобина, а также с возрастом. При первом рассмотрении всей выборки не было выявлено достоверных различий в составе микробиоты кишечника у пациентов с разной СРПВ. После разделения пациентов и изучения взаимосвязи СРПВ с составом микробиоты у испытуемых без СД-2, было обнаружено, что представленность *Bacteroides* достоверно выше у лиц с СРПВ ≥ 10 м/с (КНП = 0,374, $p < 0,001$). Вероятно, такие результаты могут быть связаны с существенным сокращением числа участников, с другой стороны – род *Bacteroides* достаточно неоднородный, некоторые из его представителей продуцируют энтеротоксины, другие ассоциированы с меньшей распространенностью факторов кардиоваскулярного риска. Возможно, именно с патогенными штаммами оказалось связано увеличение СРПВ у лиц без нарушений углеводного обмена. Решение подобной задачи требует проведения полногеномного секвенирования наряду с измерением уровней метаболитов бактерий, для оценки потенциального воздействия различных представителей рода.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены взаимосвязи факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний и относительно большей представленности в микробиоте кишечника условно-патогенных бактерий, потенциально инициирующих воспаление, и меньшей представленностью амилолитических бактерий. Обнаружены следующие закономерности: (1) прямая взаимосвязь повышения систолического артериального давления с бактериями родов *Prevotella* ($p < 0,001$) и *Blautia* ($p = 0,002$); (2) прямая взаимосвязь наличия сахарного диабета 2 типа с бактериями родов *Blautia* ($p = 0,007$) и *Serratia* ($p = 0,003$), а также филума *Firmicutes* ($p = 0,031$), обратная взаимосвязь с представленностью филума *Bacteroidetes* ($p < 0,001$). При кластеризации образцов обнаружено, что среди участников с относительно большим разнообразием микробного состава достоверно чаще встречается сахарный диабет 2 типа ($p = 0,02$); (3) прямая взаимосвязь ожирения с бактериями родов *Prevotella* ($p < 0,001$) и *Serratia* ($p = 0,004$), обратная связь ожирения с представленностью амилолитических бактерий рода *Oscillospira* ($p < 0,001$);
2. Обнаружены прямые взаимосвязи состава микробиоты кишечника с характером питания: (1) калорийности питания с большим содержанием бактерий филума *Bacteroidetes* ($p = 0,009$); (2) потребления углеводов в целом ($p = 0,001$) и пищевых волокон в частности ($p < 0,001$) с большей представленностью бактерий филума *Bacteroidetes*; а потребления крахмальных углеводов с меньшей представленностью бактерий рода *Blautia* ($p = 0,007$), и большим числом бактерий рода *Bifidobacterium* ($p = 0,009$); (3) потребления холестерина с меньшим содержанием бактерий рода *Bifidobacterium* ($p = 0,008$); потребления жиров с меньшим содержанием бактерий рода *Megasphaera* ($p = 0,004$); (4) потребления этанола с меньшим содержанием бактерий рода *Bifidobacterium* ($p = 0,006$).
3. Содержание бактерий грамотрицательных условно-патогенных родов в микробиоте кишечника ассоциировано с повышением маркеров системного вялотекущего воспаления. Большая представленность бактерий рода *Serratia* – с уровнем высокочувствительного С-реактивного белка ($p < 0,001$); большая представленность бактерий рода *Paraprevotella* – с уровнем высокочувствительного С-реактивного белка ($p = 0,002$) и интерлейкина-6 ($p = 0,008$).

4. Большая представленность условно-патогенных бактерий родов *Blautia* ($p = 0,004$) и *Serratia* ($p = 0,009$) ассоциирована с утолщением комплекса интима-медиа. При кластеризации образцов обнаружено, что в группе с относительно большим разнообразием микробного состава достоверно чаще встречается утолщение комплекса интима-медиа ($p = 0,04$). Повышение скорости распространения пульсовой волны ассоциировано с более высоким содержанием грамтрицательных бактерий рода *Bacteroides* ($p < 0,001$) у лиц без сахарного диабета 2 типа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты расширяют представление о нормальной микробиоте кишечника, ее взаимосвязи с факторами кардиоваскулярного риска и могут быть использованы в качестве сравнения при проведении последующих клинических исследований. Анализ состава микробиоты кишечника может претендовать на роль нового теста для оценки кардиоваскулярного риска и субклинических изменений сосудистой стенки.

Результаты позволяют предполагать, что микробиота кишечника может претендовать на роль мишени для персонализированной коррекции кардиоваскулярного риска.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций:

1. Каштанова Д.А., Ткачева О.Н., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы кардиоваскулярного риска. Часть 1. Микробиота кишечника, возраст и пол // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2015, Т. 14 №4, С. 92-95.
2. Каштанова Д.А., Ткачева О.Н., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы кардиоваскулярного риска. Часть 2. Микробиота кишечника и ожирение // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2015, Т. 14 №5, С. 83-86.
3. Ткачева О.Н., Каштанова Д.А., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы кардиоваскулярного риска. Часть 3. Липидный профиль, углеводный обмен и микробиота кишечника // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2015, Т. 14 №6, С. 83-86.
4. Каштанова Д.А., Егшатын Л.В., Ткачева О.Н. Участие микробиоты кишечника человека в процессах хронического системного воспаления // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015, Т. 17, № 4, С. 310-317.

5. Каштанова Д.А., Ткачева О.Н., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы кардиоваскулярного риска. Часть 4. Артериальная гипертония, курение и микробиота кишечника // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2016, Т. 15, №1, С. 69-72.
6. Каштанова Д.А., Ткачева О. Н., Егшатын Л.В., Плохова Е.В., Попенко А.С., Тяхт А.В., Алексеев Д.Г., Котовская Ю.В., Бойцов С.А. Взаимосвязь состояния сосудистой стенки, состава микробиоты кишечника и питания у лиц без сердечно-сосудистых заболеваний // Клиническая практика. 2016, №3, С. 62-71.
7. Каштанова Д.А., Ткачева О. Н., Попенко А.С., Тяхт А.В., Алексеев Д.Г., Котовская Ю.В., Бойцов С.А. Состав микробиоты кишечника и его взаимосвязь с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний среди относительно здоровых жителей Москвы и Московской области // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2017, Т. 16, №3, С. 56-61

Статьи в зарубежных журналах, индексируемых в системе Web of Science:

8. Kashtanova D.A., Popenko A.S., Tkacheva O.N., Tyakht A.B., Alexeev D.G., Boytsov S.A. Association between the gut microbiota and diet: fetal life, early childhood, and further life // Nutrition. 2016, Vol. 32, №6, P. 620-627.
9. Kashtanova D.A., Tkacheva O.N., Popenko A.S., Egshatyan L.V., Tyakht A.B., Alexeev D.G., Kotovskaya Yu.V., Plokhova E.V., Boytsov S.A. Gut microbiota and vascular biomarkers in patients without clinical cardiovascular diseases // Artery Research. 2017, Vol. 18, P. 41–48.
10. Egshatyan L.V., Kashtanova D.A., Popenko A.S., Tkacheva O.N., Tyakht A.B., Alexeev D.G., Karamnova N.S., Kostyukova E.S., Babenko V.V., Vakhitova M.T., Boytsov S.A. Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance // Endocrine Connections. 2016, Vol. 5, №1, P. 1-9.
11. Fedintsev A.Yu., Kashtanova D.A., Tkacheva O.N., Strazhesko I.D., Kudryavtseva A.V., Baranova A., Moscalev A.A. Markers of arterial health could serve as accurate non-invasive predictors of human biological and chronological age // Aging. 2017 Vol. 9 №4, P.1280-1292.

Тезисы конференций:

12. Egshatyan L.V., Kashtanova D.A., Popenko A.S., Tkacheva O.N., Tyakht A.B., Alexeev D.G., Karamnova N.S., Boytsov S.A. Gut microbiota and diet in patients with various glucose tolerance // Endocrine Abstracts. 2016, Vol. 41, EP451, 28–31 May 2016, 18th European Congress of Endocrinology, Munich, Germany.
13. Kashtanova D.A., Tkacheva O.N., Kotovskaya Yu.V., Popenko A.S., Tyakht A.B., Alexeev D.G., Boytsov S.A. Association between the gut microbiota composition, low-grade inflammation and blood pressure in patients without heart failure from Moscow and Moscow region // European Journal of Heart Failure. 2017, Vol. 19 (Suppl. S1), P. 513 (P2014), 29 April – 2 May 2017, 4th World Congress on Acute Heart Failure, Paris, France.
14. Каштанова Д.А., Ткачева О. Н., Егшатын Л.В., Попенко А.С., Тяхт А.В., Алексеев Д.Г., Бойцов С.А. Взаимосвязь состава микробиоты кишечника и вялотекущего воспаления // Научно-практическая ревматология. 2016, Т.54, Приложение 3, С. 25-26, 8–10 декабря 2016, I междисциплинарная научная конференция «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания», Москва, Россия.