

На правах рукописи

Клименко Наталья Сергеевна

**Межиндивидуальная вариабельность изменений состава
кишечной микробиоты при диетических интервенциях**

1.5.8. – математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук.

Научный руководитель:

Тягт Александр Викторович,
кандидат биологических наук,
ФГБУН Институт биологии гена РАН,
научный сотрудник группы
биоинформатики.

Официальные оппоненты:

Олескин Александр Владимирович,
доктор биологических наук, МГУ им.
Ломоносова, профессор кафедры
общей экологии биологического
факультета.

Андронов Евгений Евгеньевич,
доктор биологических наук, ФГБНУ
Всероссийский научно-
исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии,
заведующий лабораторией
микробиологического мониторинга и
биоремедиации почв.

Ведущая организация:

Государственный Научный Центр
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
“Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова” Российской академии
наук

Защита состоится 26 июня 2023 года в 15-00 на заседании диссертационного совета 24.1.101.01 (утвержден приказом Минобрнауки России от 16 декабря 2013 года No 978/нк, номер изменен приказом Минобрнауки России № 561/нк от 03.06.2021) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН (ИППИ РАН) по адресу: г. Москва, Большой Каретный переулок, д.19 стр. 1.
e-mail: Kazen@iitp.ru (Казенников Олег Васильевич).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИППИ РАН.
Автореферат разослан ... 2023 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
24.1.101.01,
доктор биологических наук

Казенников Олег Васильевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Организм человека находится в тесной связи с населяющими его микробными сообществами. При этом кишечное микробное сообщество примечательно тем, что принимает непосредственное участие в усвоении человеком питательных веществ и оказывает существенное влияние на работу различных систем органов. Для ряда заболеваний – таких, как сердечно-сосудистые заболевания, ожирение, онкологические и аллергические заболевания – обнаружены ассоциации со специфическими изменениями в составе микробиома.

Среди всех микробных сообществ, населяющих тело человека, микробиота толстого кишечника уникальна относительной устойчивостью своего видового состава во времени, и в то же время способностью существенно меняться при воздействии определенных факторов, в частности, при изменении питания. Анализ временных серий образцов микробиоты от отдельных индивидов показал, что в целом межиндивидуальная вариабельность состава микробиоты превышает внутрииндивидуальную вариабельность во времени. При этом кратковременные изменения рациона, прием лекарственных средств и пробиотических продуктов, а также заболевания могут приводить к существенным изменениям состава микробиоты в достаточно короткие сроки. Для отдельных интервенций продемонстрирован их воспроизводимый и устойчивый эффект на состав микробиома. Между тем, накапливается все больше свидетельств того, что степень изменения микробиома в ответ на определенную интервенцию существенно варьирует от индивида к индивиду. Данные наблюдения имели место для различных типов диетических интервенций, таких как прием пробиотиков и пребиотиков, употребление определенных продуктов и изменение характера питания в целом. На настоящий момент неизвестны биологические механизмы, которые определяют межиндивидуальную вариабельность ответа на интервенцию. Понимание их позволило бы не только углубить существующие знания об экологии кишечного микробиома, но и прогнозировать эффективность той

или иной интервенции для конкретного индивида. Таким образом, исследование межиндивидуальной вариабельности изменений состава кишечной микробиоты является важной и перспективной темой для изучения, как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Степень разработанности темы

В настоящий момент растет число исследований, результаты которых указывают на то, что эффективность применения диетических интервенций для лечения заболеваний и улучшения метаболических показателей существенно варьирует от индивида к индивиду. Были предложены термины “респондер” и “нереспондер”, характеризующие участников с большим и меньшим ответом на определенную диетическую интервенцию, соответственно. Для ряда интервенций было установлено, что вариабельность ответа частично обусловлена составом микробиоты участников до интервенции. В основном подобные наблюдения были получены в небольших независимых исследованиях. Малый размер выборок, а также различия в дизайне исследований и экспериментально-аналитических подходах, затрудняют обобщение полученных в них выводов. В частности, остается открытым вопрос, насколько универсальны микробиотные признаки респондеров на различные типы диетических интервенций.

Цели и задачи исследования

Целью работы являлся анализ межиндивидуальной вариабельности изменений состава кишечной микробиоты при различных диетических интервенциях, а именно при приеме обогащенного кисломолочного продукта и при следовании диете, богатой пищевыми волокнами, а также изучение признаков состава микробиоты, позволяющих предсказать степень его изменения в результате интервенций.

Задачи

1. Оценить состав и корреляционную структуру кишечной микробиоты городского населения в двух независимых группах;
2. Проанализировать ассоциации между составом кишечной микробиоты и значениями внутренних и внешних факторов -

- рационом питания и антропометрическими данными участников, а также копрологическими параметрами образцов микробиоты;
3. Выявить изменения состава микробиоты в результате двух диетических интервенций - приема обогащенного кисломолочного продукта и следования диете, богатой пищевыми волокнами;
 4. Оценить межиндивидуальную вариабельность изменения состава микробиоты при каждой из исследуемых интервенций;
 5. Проанализировать зависимость степени изменения состава микробиоты от ее изначального состава и значений других факторов на момент начала интервенции;
 6. Сопоставить найденные признаки, ассоциированные с высокой степенью изменения, между двумя интервенциями;
 7. В случае обнаружения универсальных признаков, ассоциированных со степенью изменения микробиоты независимо от типа интервенции, валидировать их используя внешние данные;
 8. Проанализировать возможность прогнозирования степени изменения микробиома по его составу непосредственно перед интервенцией.

Научная новизна и практическая значимость работы

В данной работе с использованием единого экспериментально-аналитического подхода было проведено исследование динамики состава микробиоты в ходе двух различных диетических интервенций на больших выборках в целом здоровых добровольцев (N1=206, N2=130). Данные исследования являются первыми крупномасштабными интервенционными исследованиями изменения микробиома, выполненными на российской популяции с помощью высокопроизводительного секвенирования последовательностей гена 16S рРНК. Для каждой из интервенций были найдены изменения структуры кишечного сообщества, не описанные ранее, а также воспроизведены некоторые ранее опубликованные наблюдения.

Впервые была предложена модель, позволяющая с использованием метода машинного обучения по составу микробиома в первой временной точке оценить степень его

изменения в результате интервенции. Было оценено качество работы модели и определены микробные таксоны, которые вносят наибольший вклад в предсказание и воспроизводятся при кросс-валидации для каждой из интервенций.

Впервые показано, что микробиомные признаки, определяющие степень изменения сообщества, существенно схожи между интервенциями различного типа. Была введена концепция потенциала изменения как составляющей степени изменения, которая определяется исключительно внутренними микробиотными признаками, и предложен способ его оценки.

Впервые установлена отрицательная ассоциация потенциала изменения со средним взвешенным количеством генов на геном в сообществе и положительная - с соотношением Bacteroidetes:Firmicutes.

Впервые была освещена проблема вычислительной зависимости между степенью изменения микробиома кишечника и альфа разнообразием, ранее наблюдавшаяся для макроэкологических сообществ.

Полученные результаты создают основу для разработки и оценки эффективности персонализированных рекомендаций по питанию на основании анализа микробиома с целью профилактики и лечения заболеваний.

Выносимые на защиту положения

1. Степень изменения микробиоты кишечника человека в результате краткосрочных диетических интервенций превышает внутрииндивидуальную вариацию в отсутствие изменения рациона, но не превышает межиндивидуальную вариацию.
2. Степень изменения микробиома кишечника человека в результате краткосрочных диетических интервенций зависит от изначального состава микробиома.
3. Существуют микробиомные признаки, определяющие степень изменения сообщества, общие между интервенциями различного типа.

4. Степень изменения микробиома в ходе диетических интервенций прямо коррелирует с отношением *Bacteroidetes:Firmicutes* (B:F) сообщества до интервенции.
5. Степень изменения микробиома в ходе диетических интервенций обратно коррелирует со средним взвешенным предсказанным количеством генов на микроорганизм в сообществе до интервенции.
6. Степень изменения микробного сообщества, рассчитанная с использованием мер бета-разнообразия, имеет вычислительную зависимость от значения альфа разнообразия данного сообщества.
7. Разработан и валидирован способ предварительной оценки степени изменения микробиома по его составу путем оценки расстояния до множества других образцов крупной выборки, содержащей по одному образцу микробиоты на индивида.

Личный вклад автора

Автор диссертации внесла значительный вклад в проведение изложенных ниже исследований. Основной объем биоинформатической работы был выполнен ею самостоятельно: первичный анализ микробиомных данных секвенирования, работа с публичными базами данных, а также статистический анализ микробиомных данных (а именно определение сопредставленных групп бактерий, анализ ассоциаций между составом микробиома и различными факторами, анализ изменений состава микробиома). Также автором был самостоятельно разработан подход к предсказанию степени изменений на основе изначального состава микробиоты. Автор принимала непосредственное участие в планировании экспериментов, обсуждении результатов и написании научных публикаций по результатам. Интерпретация результатов была выполнена совместно с коллабораторами. Коллабораторами были выполнены организация исследования (набор участников, подготовка метаданных, контроль за ходом исследования), сбор биоматериала и экспериментальная работа с ним вплоть до получения данных секвенирования.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В разделе содержится обзор современных статей, посвященных исследованию кишечной микробиоты, механизмов ее взаимодействия с организмом хозяина, способов модуляции состава микробиоты, а также межиндивидуальной вариабельности ответа микробиоты на диетические интервенции.

Глава 2. Межиндивидуальная вариабельность состава микробиоты городского населения и ее связь с рационом и другими характеристиками

Вариабельность состава кишечной микробиоты и его ассоциации с факторами различной природы были изучены на двух независимых группах, для которых впоследствии было проведено два типа интервенций.

Первая группа включала 206 человек. Для большей части участников данного исследования (170 человек) до забора первого образца микробиоты была собрана информация о частоте употребления пищевых продуктов, поле, возрасте, индексе массы тела, факте приема антибиотиков в течение 3 месяцев, предшествовавших исследованию. Впоследствии на данной группе было проведено исследование влияния на микробиоту диеты, богатой волокнами (ДБВ), в связи с чем далее она обозначена как группа исследования ДБВ. Вторая группа включала 130 человек. Для 94 участников исследования до забора первого образца была собрана информация о поле, возрасте, индексе массы тела, частоте стула; по образцам кала, собранным у участников, была получена копрограмма и оценен показатель консистенции по Бристольской шкале. Впоследствии на данной группе было проведено исследование влияния на микробиоту приема обогащенного кисломолочного продукта (ОКП), в связи с этим далее она обозначена как группа исследования ОКП.

Таксономический состав микробиоты участников исследования был достаточно разнообразен и в общих чертах соответствовал ранее описанному составу кишечных метагеномов населения Российской Федерации, полученных с помощью

полногеномного секвенирования. В обеих группах преобладали представители родов *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, а также неклассифицированные бактерии из семейств *Lachnospiraceae* и *Eubacteriaceae*.

Кроме того, в микробиомах участников из двух независимых групп прослеживалась схожая корреляционная структура. В результате анализа этой структуры были найдены кластеры совместно встречающихся групп бактерий, названные кооперативами (Рис. 1). Предположительно, симбиотические связи могут лежать в основе формирования следующих кооперативов (кооперативы обозначены по наименованию наиболее представленного из присутствующих в них таксонов):

- В **Akkermansia-кооперативе** - между бактериями, катаболизирующими полисахариды растительного (*Ruminococcaceae*) и эндогенного происхождения (*Akkermansia*) с образованием водорода, и метаногенными археями (*Methanobrevibacter*), которые используют водород для производства метана.
- В **Blautia-кооперативе** - между производителями ацетата и лактата (*Blautia*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*) и бактериями, способными производить масляную кислоту из этих соединений: *Anaerostipes* и *Eubacterium*.

Примеры кооперативов, образованных бактериями, предположительно занимающими сходную нишу:

- **Bacteroides-кооператив**, включающий бактерии, ассоциированные с рационом, богатым продуктами животного происхождения: *Alistipes*, *Bacteroides*, *Odoribacter* и *Parabacteroides*.
- **Slackia-кооператив**, члены которого метаболизируют лактозу и участвуют в метаболизме изофлавонов - *Slackia* и *Collinsella*.
- **Veillonella-кооператив**, члены которого, *Veillonella* и *Haemophilus* в норме в основном представлены в верхних отделах пищеварительного тракта.

Следующие кооперативы включают таксоны, ассоциированные с заболеваниями человека:

- **Enterobacteriaceae-кооператив**, включающий неклассифицированных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

и *Staphylococcus*, ассоциированных с воспалительными заболеваниями кишечника.

Найденные группы сопредставленных микроорганизмов были использованы в дальнейших анализах в целях уменьшения размерности.

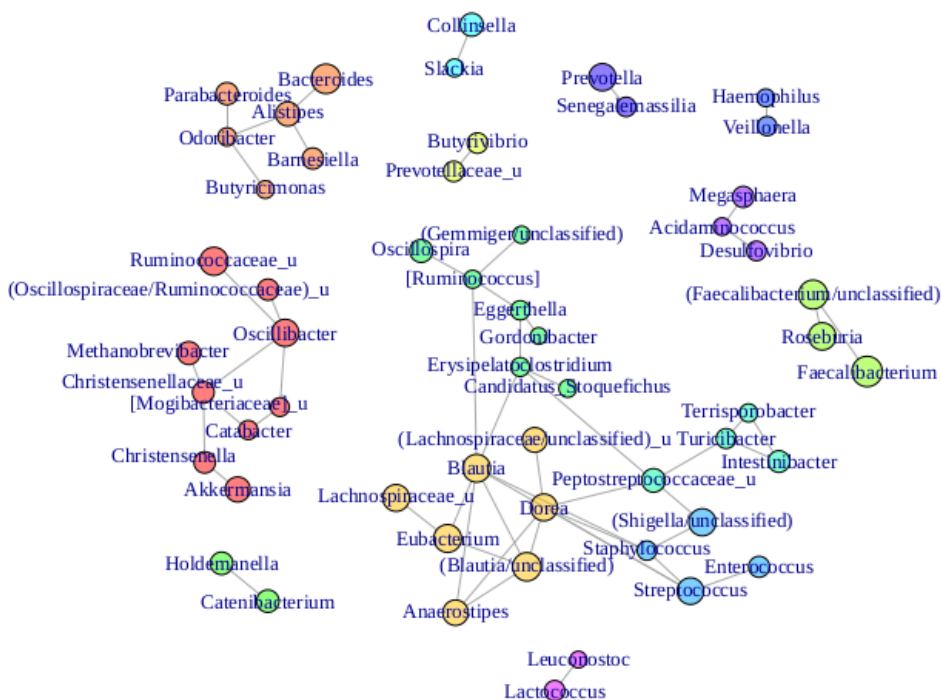


Рис. 1 - Сопредставленные группы бактерий, найденные в группе ОКП. Цветом обозначены различные кооперативы.

В результате сопоставления состава микробного сообщества с антропометрическими данными, долговременной диетой и характеристиками стула были выявлены ранее не известные ассоциации, а также валидированы некоторые из ранее описанных. Среди ассоциаций, воспроизводящих и расширяющих более ранние наблюдения:

- Различия в относительной представленности Bacteroides-кооператива между мужчинами и женщинами резонируют с

находками исследования Vanderputte с соавторами (PMID26069274), показавшего, что члены отдела Bacteroidetes выше представлены в более твердом стуле, характерном для женщин.

- Положительная корреляция между разнообразием микробиоты и частотой употребления овощей и фруктов (согласно опроснику) согласуется с наблюдениями большего богатства микробиоты у вегетарианцев.
- Ассоциация представленности бактерии *Streptococcus thermophilus* и частоты употребления молочных продуктов вероятно является следствием широкого использования данной бактерии для закваски кисломолочных продуктов.
- Положительная зависимость представленности неклассифицированных бактерий из семейства Erysipelotrichaceae, представленность которого повышена у людей с неблагоприятным липидным профилем, и показателем копрологического исследования “Мыла”, указывающем на нарушения обмена липидов.

Среди ассоциаций, обнаруженных впервые:

- Положительная зависимость между частотой употребления фруктов и представленностью неклассифицированной бактерии, близкородственной *Clostridium clariflavum*, которая известна способностью расщеплять не перевариваемые человеком сложные углеводы.
- Отрицательная зависимость между разнообразием микробиоты и показателем копрологического исследования “Растворимые растительные волокна”, высокие значения которого наблюдаются у пациентов с ускоренной эвакуацией пищи из кишечника и при нарушениях функции поджелудочной железы.

Глава 3. Влияние кратковременных диетических интервенций на состав микробиоты

Каждая из описанных выше групп участвовала в исследовании влияния кратковременных диетических интервенций на состав микробиоты. В рамках неконтролируемого исследования влияния диеты богатой волокнами (ДБВ), 206 человек в течение 2 недель изменили свое питание согласно рекомендациям диетолога,

сформированным индивидуально для каждого участника на основе анализа результатов опросника по его долговременному питанию. По факту большая часть рекомендаций для всех участников касалась увеличения в рационе количества пищи, богатой растительными волокнами, и снижения количества пищи, богатой животным белком и насыщенными жирами. Для краткости данная интервенция обозначена в работе как диета богатая волокнами. В рамках исследования влияния ОКП 130 человек в течение 1 месяца ежедневно употребляли 250 мл кисломолочного продукта, обогащенного культурой *Bifidobacterium animalis* (штамм ВВ-12) в количестве 10^7 КОЕ/г. Данный штамм считается пробиотическим, было показано, что он способен выживать в пищеварительном тракте человека, оказывать воздействие на кишечное микробное сообщество, улучшать функционирование кишечника. Для оценки влияния интервенции на состав микробиоты для обеих групп были собраны образцы микробиоты (стула) непосредственно перед началом и по завершении интервенций.

Для корректной интерпретации изменений, произошедших в результате диетических интервенций, была оценена вариабельность, возникающая на этапе подготовки образцов (между техническими репликами (N=10, Рис. 2, “техн.репл.”)), между образцами одного индивида без изменения питания, собранными с промежутками в 3 дня (N=10, Рис. 2, “внутриинд.3”) и 2 недели (N=17, Рис. 2, “внутриинд.14”), а также между разными индивидами из одной (N1=130, N2=206, Рис. 2, “межинд.внутригрупп.”) и из разных выборок (N=336, Рис. 2, “межинд.межгрупп.”). Сравнение значений расстояний между составами микробиоты в различных группах образцов показало, что:

- Расстояние между образцами, собранными у одного человека в один момент времени, было значимо ниже расстояния между образцами, собранными в разные моменты без изменения человеком рациона, при этом длительность временного промежутка не оказывала влияния (3 дня или 2 недели);
- Расстояние между образцами одного человека при диетической интервенции значимо превышало расстояние без изменения рациона; при этом тип (ДВБ или ОКП) и временной промежуток (2 недели или 1 месяц) интервенции не оказывали влияния на вариабельность;

- Расстояние между образцами одного человека, как при условии изменения рациона, так и без изменения, было значимо ниже расстояния между образцами разных людей.

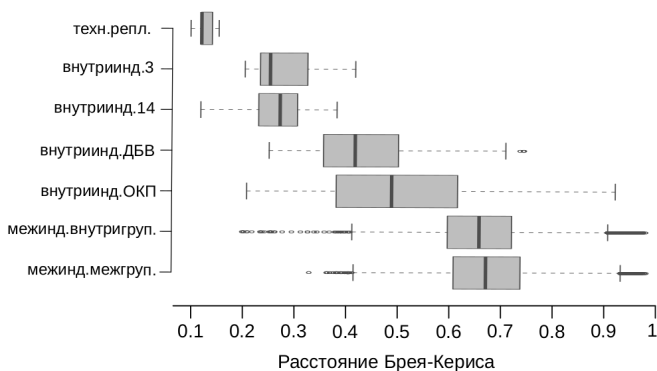


Рис. 2 - Вклад экспериментальных факторов в профили состава микробиоты. Показаны распределения попарных расстояний внутри подгруппы (метрика расстояния Брея-Кертиса). Расшифровка обозначений приведена в тексте.

Анализ вариаций показал, что состав микробиоты участников ДБВ исследования значимо и однонаправленно изменился в результате интервенции (Рис. 3а). При этом в исследовании ОКП изменения были на границе значимости (Рис. 3б).

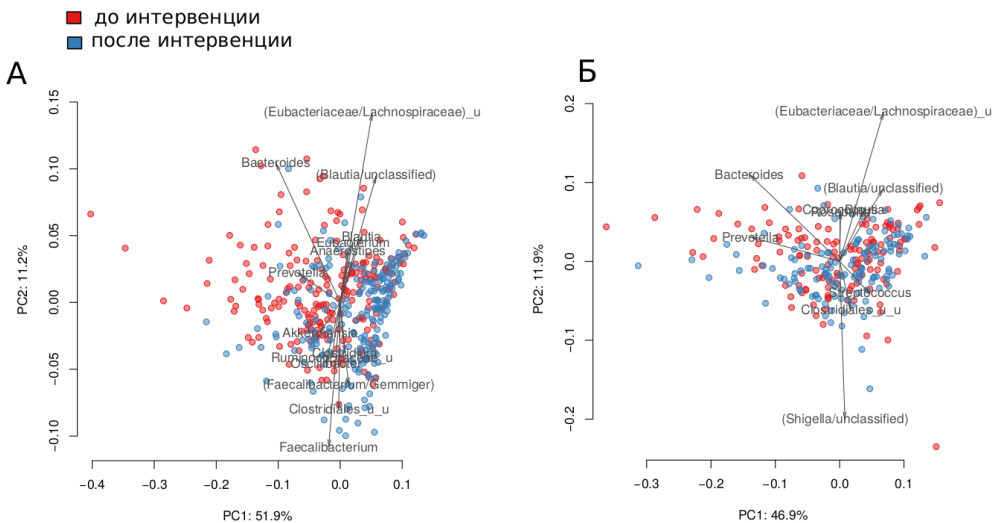


Рис. 3 - Изменение таксономического состава микробиоты в целом после следования ДБВ (А) и приема ОКП (Б). График отражает расположение образцов в двух главных координатах, полученных с помощью метода PCoA с использованием меры различия взвешенный UniFrac. Стрелками обозначены таксоны, объясняющие наибольшую долю вариации в выбранных координатах, при этом длина стрелки пропорциональна значению вариации, объясненной таксоном. Угол стрелки отражает распределение объясненной вариации между координатами.

Изменения структуры кишечного сообщества в результате интервенций были проанализированы по относительной представленности микробных таксонов на уровнях от типа до вида (Рис. 4). Изменения на уровне отдельных таксонов были более выражены в ДБВ исследовании по сравнению с ОКП. Наиболее выраженные изменения в ходе интервенции ДБВ включают в себя:

- Снижение представленности таксонов, устойчивых по отношению к желчи и ассоциированных с рационом, богатым животным белком и насыщенными жирами (*Bacteroides*, *Alistipes*, *Barnesiella*, *Bacteroides*-кооператив);
- Снижение представленности родов *Veillonella* и *Prevotella*, ассоциированных в западной популяции с регулярным

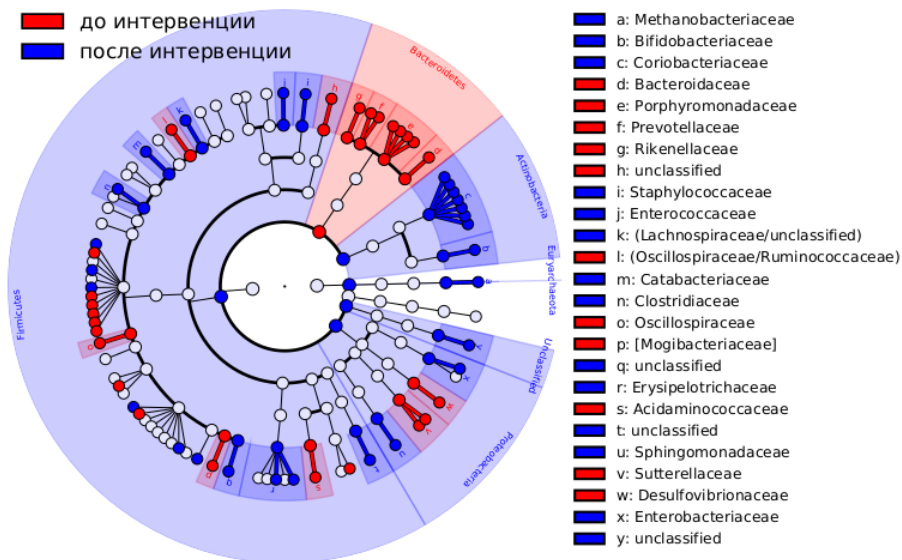
- повышенным употреблением простых сахаров;
- Повышение представленности *Ruminococcus* и *Eubacterium*, производящих масляную кислоту из полисахаридов растительного происхождения;
 - Повышение представленности бактерий типа *Actinobacteria*, в частности, *Bifidobacterium*, а также археи *Methanobrevibacter*, имеющих симбиотический отношения с бактериями производящими масляную кислоту.
 - Для двух кооперативов, содержащих бактерии, производящие масляную кислоту, наблюдались разнонаправленные изменения: снижение *Faecalibacterium*-кооператива и повышение *Blautia*-кооператива.

Все описанные выше изменения (кроме снижения представленности *Faecalibacterium*-кооператива), в целом ассоциированы со здоровым состоянием кишечника, благоприятными показателями липидного и углеводного обмена. В то же время наблюдались изменения, характерные для картины дисбаланса кишечного микробного сообщества, а именно:

- небольшое, но значимое снижение альфа разнообразия;
- повышение относительной представленности бактерий *Staphylococcus* и *Enterobacteriaceae*.

Подобные эффекты наблюдались и ранее в кратковременных диетических интервенциях, например, в исследовании влияния на микробиоту устойчивого крахмала. Одна из гипотез - «шоковый эффект» в результате относительно быстрого изменения спектра поступающих питательных веществ, которое может ненадолго нарушить экологию кишечного сообщества.

A



Б

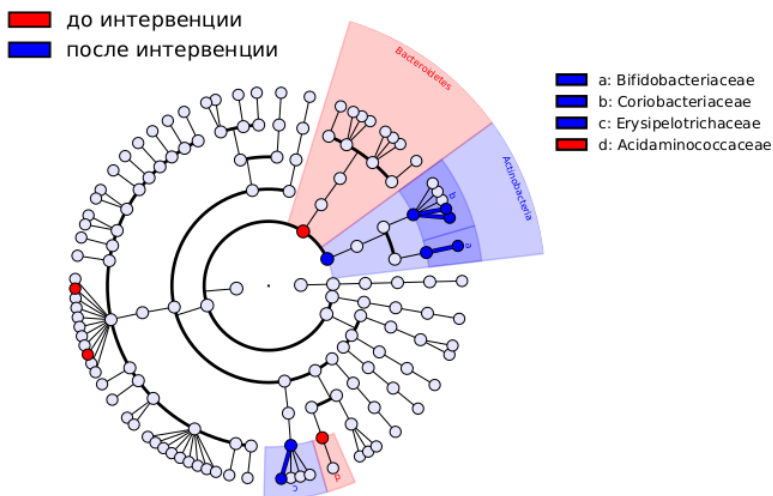


Рис. 4 - Изменения в структуре кишечного сообщества на уровне родов, семейств и типов, произошедших после ДБВ (А) и ОКП (Б) интервенций. Красные внутренние узлы и листья кладограммы

обозначают таксоны, которые уменьшились в представленности, а синие - таксоны, которые увеличились. Буквенные обозначения приведены только для семейств и типов. Центральные узлы кладограммы соответствуют типам, крайние узлы - родам. Промежуточные таксономические уровни размещаются между ними.

В исследовании ОКП “шокового эффекта” не наблюдалось: альфа-разнообразия и представленность провоспалительных таксонов остались без изменений в ходе интервенции. Среди наиболее примечательных изменений:

- увеличение доли *Bifidobacterium* - причем не только вида *B. animalis*, который входил в состав ОКП, но также других представителей рода - *B. bifidum* и *B. longum*;
- повышение представленности нескольких представителей семейства *Coriobacteriaceae* (вида *Adlercreutzia equolifaciens*, *Collinsella aerofaciens*, *Slackia*-кооператива), участвующих в метаболизме изофлавонов.

Глава 4. Вариабельность ответа микробного сообщества на диетические интервенции

Анализ влияния на микробиоту диетических интервенций выявил межиндивидуальную вариабельность степени изменения микробиоты. Степень изменения микробиоты не была значимо ассоциирована ни с одним из факторов метаданных, измеренных в первой временной точке. Однако была найдена ее связь с исходными характеристиками микробиома: отрицательная - с альфа-разнообразием и средним взвешенным предсказанным количеством генов на бактерию в сообществе (СКГ), и положительная - с отношением *Bacteroidetes:Firmicutes* (B:F) (Рис. 5А).

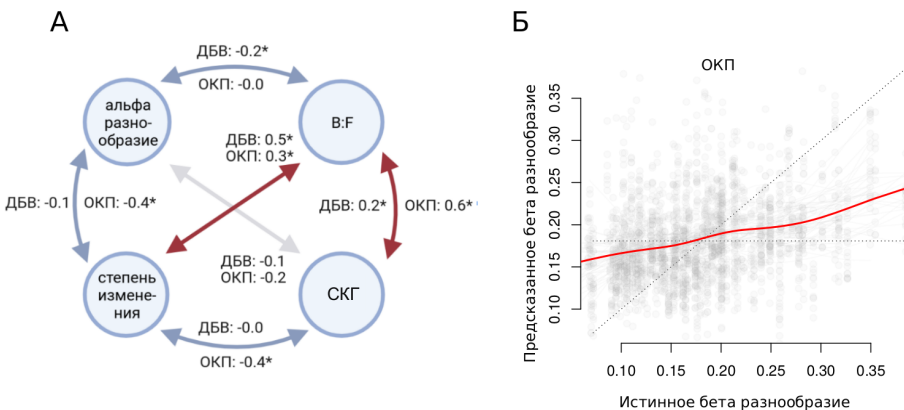


Рис. 5 - Зависимость степени изменения микробиоты от ее состава в первой временной точке. А - Частные корреляции Пирсона для степени изменения микробиома и его параметров в первой временной точке. Рядом со стрелками приведены частные корреляции, полученные для каждой из интервенций. Символом “*” помечены частные корреляции с уровнем значимости $p < 0.05$. Б - Результат работы регрессионной модели на тестовых выборках в ходе кросс-валидации для исследования ОКП.

Для более детального исследования зависимости степени изменения микробиома от его начального состава для каждой из интервенций были построены регрессионные модели с помощью алгоритма машинного обучения. Модели предсказывали степень изменений по видовому составу микробиома в первой временной точке. По результатам кросс-валидации качество предсказания моделей существенно отличалось от качества случайного предсказания (R^2 0.13 для ДБВ и 0.11 для ОКП, в то время как после перемешивания индексов случайным образом R^2 0.0059 и 0.0060, соответственно). Таксоны, которые внесли наибольший вклад в предсказание частично совпадали для двух интервенций (4 из 10 отобранных для каждого исследования). Они включали *Prevotella copri*, *Bifidobacterium adolescentis*, а также неклассифицированные виды родов *Streptococcus* и *[Ruminococcus]* (род из семейства *Lachnospiraceae*). Для всех общих таксонов наблюдался восходящий тренд зависимости степени изменения от

представленности.

Таким образом, для двух интервенций наблюдались общие микробиотные признаки, частично определяющие степень изменения. Мы ввели понятие потенциала изменения как составляющей степени изменения микробиома образца, которая определяется исключительно его внутренними микробиотными признаками и не зависит от типа интервенции. Также мы ввели понятие ландшафта потенциала изменения как его распределения в многомерном пространстве представленности таксонов. Мы предположили, что области ландшафта с низким потенциалом изменения будут характеризоваться повышенной плотностью образцов при исследовании достаточно больших выборок. В таком случае, потенциал изменения образца можно оценить по его положению относительно образцов других индивидов выборки в многомерном пространстве представленности таксонов по одной временной точке. Один из способов такой оценки - расчет среднего бета разнообразия между данным образцом и образцами остальных индивидов.

Мы оценили ландшафт потенциала изменений для двух исследуемых интервенций, рассчитав среднее бета-разнообразие между каждым микробиомом и всеми другими микробиомами данного исследования в первой временной точке. Потенциал изменения положительно коррелировал со степенью изменений произошедших при интервенциях (Рис. 6 А). При этом, включив в анализ частных корреляций наряду со степенью изменений потенциал изменения, мы показали, что именно последний значимо ассоциирован с микробиотными характеристиками в первой временной точке (Рис. 6 А). Схожим образом, тестирование описанной выше регрессионной модели на значениях потенциала изменения привело к улучшению показателей качества предсказания (R^2 0.30 для ДБВ и 0.30 для ОКП, Рис. 6 Б).

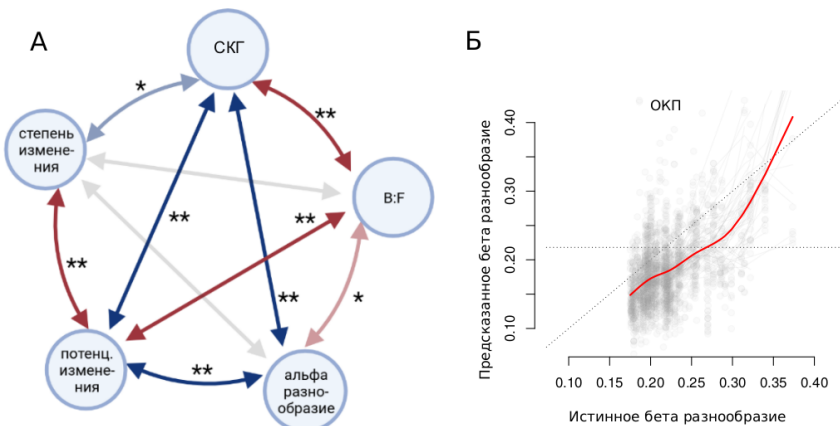


Рис. 6 - Зависимость потенциала изменения микробиома от степени изменения при интервенциях, а также от состава микробиома в первой временной точке. А - Частные корреляции Пирсона для потенциала изменения, степени изменения микробиома и его параметров в первой временной точке. Рядом со стрелками приведены “*” в случае значимой корреляции ($p < 0.05$) в одном исследовании, и “**” - в двух исследованиях. Б - Результат работы регрессионной модели на тестовых выборках в ходе кросс валидации для исследования ОКП (при тестировании использовались значения потенциала изменения, а при обучении - значения истинных изменений).

Зависимости, найденные для потенциала изменения, были валидированы на независимой когорте TwinsUK (N=548 образцов), включающей по одной временной точке на индивида. С использованием различных мер бета и альфа разнообразия были подтверждены:

- отрицательная ассоциация потенциала изменения с альфа разнообразием;
- отрицательная ассоциация потенциала изменения со средним взвешенным количеством генов в сообществе;
- положительная ассоциация потенциала изменения с отношением В:Ф (Рис. 7).

Интересным образом, ассоциации потенциала изменения с альфа разнообразием и СКГ сонаправлены (отрицательны), при

этом между самими величинами наблюдается зависимость того же направления (отрицательная). Данное наблюдение подчеркивает тот факт, что альфа разнообразие и СКГ, будучи связанными между собой, вносят независимый вклад в предсказание потенциала изменений. Они совместно определяют богатство метаболического потенциала сообщества в целом и его функциональную избыточность на двух разных уровнях: уровне отдельных микроорганизмов (СКГ) и сообщества в целом (альфа-разнообразии).

В ходе валидации было также обнаружено, что в зависимости между потенциалом изменения и альфа разнообразием имеют место математическая и биологическая составляющие, при этом направление математической составляющей зависит от выбранной метрики бета разнообразия. Был предложен метод введения поправки на математическую составляющую путем генерации случайных микробиомных профилей с заданным разнообразием.

Выводы

1. Степень изменения микробиома кишечника человека в результате краткосрочных диетических интервенций превышает внутрииндивидуальную вариацию в отсутствие изменения рациона, но не превышает межиндивидуальную вариацию.
2. Степень изменения микробиома зависит от его изначального состава. При этом, микробиомные признаки, определяющие степень изменения сообщества, существенно схожи между интервенциями различного типа.
3. Степень изменения микробиома прямо коррелирует с отношением *Bacteroidetes:Firmicutes* (B:F) сообщества до интервенции.
4. Степень изменения микробиома обратно коррелирует со средним взвешенным предсказанным количеством генов на микроорганизм в сообществе до интервенции.
5. Степень изменения микробиома, рассчитанная с использованием мер бета-разнообразия, имеет вычислительную зависимость от значения альфа разнообразия данного сообщества.
6. Степень изменения микробиома можно предварительно оценить

до интервенции по его составу, путем оценки расстояния до множества других образцов крупной выборки, содержащей по одному образцу микробиоты на индивида.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. Klimenko, N. S., Tyakht, A. V., Popenko, A. S., Vasiliev, A. S., Altukhov, I. A., Ischenko, D. S., ... & Musienko, S. V. (2018). Microbiome responses to an uncontrolled short-term diet intervention in the frame of the citizen science project. *Nutrients*, 10(5), 576.
2. Volokh, O.*, Klimenko, N.*, Berezhnaya, Y., Tyakht, A., Nesterova, P., Popenko, A., & Alexeev, D. (2019). Human gut microbiome response induced by fermented dairy product intake in healthy volunteers. *Nutrients*, 11(3), 547. * - совместное первое авторство.
3. Klimenko, N., Odintsova, V., Revel-Muroz, Tyakht, A. (2022). The hallmarks of dietary intervention-resilient gut microbiome. *npj Biofilms and Microbiomes*, 8, 77.

Тезисы конференций:

1. Klimenko, N., Popenko A., Alexeev D., Tyakht A., "Variation of Microbiome Response to the Dietary Interventions: General and Intervention-Specific Microbial Signatures of Responders", *Nutrients: Nutritional Advances in the Prevention and Management of Chronic Disease*, Barcelona, Spain, 2019.
2. Klimenko N., Popenko A., Alexeev D., Tyakht A. "Machine learning for microbiota analysis: interindividual variability of the response to dietary intervention", *Biotechnology: state of the art and perspectives*, Moscow, Russia, 2019 (устная презентация).