

Особенности микробиоты кишечника у пациентов с различной массой тела

Л.В. Егшатын^{1,2}, О.Н. Ткачева³, Д.Г. Алексеев⁴, А.В. Тяхт⁴, А.С. Попенко⁴,
Е.С. Кострюкова^{4,5}, В.В. Бабенко⁴, М.Т. Вахитова⁵, С.А. Бойцов⁶

¹ ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия

² Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины» ФМБА России, Москва, Россия

⁵ Московский физико-технический институт, Москва, Россия

⁶ ФГБУ «ГНИЦ профилактической медицины», Минздрава России, Москва, Россия

Цель: изучить особенности состава микробиоты кишечника у пациентов с различной массой тела.

Материал и методы. В исследование включены 92 пациента в возрасте в среднем 52,8 лет (25–75) с различным индексом массы тела (ИМТ), с абдоминальным ожирением и без. Метагеномный анализ в формате оценки разнообразия последовательностей гена 16S рРНК в суммарном образце ДНК осуществляли согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Таксономический состав образцов был оценен путем классификации по базе данных последовательностей гена 16S рРНК Greengenes v. 13.5 с помощью классификатора RDP.

Результаты. Доминирующие бактерии всего состава оказались представителями двух доминирующих отделов — Bacteroidetes (15,1±11,1%) и Firmicutes (68,2±11,9%). Относительная представленность Firmicutes меньше у пациентов с абдоминальным ожирением. С абдоминальным ожирением достоверно и положительно ассо-

циировалась представленность родов *Serratia*, *Blautia*, *Prevotella*, отрицательно — *Oscillospira*, *Thermodesulfovibrio*, *Caloramator*, *Petrotoga*, *Caldilinea*, *Sphingobacterium*, *Thermovenabulum*, *Johnsonella*. С ИМТ достоверно и положительно коррелировала представленность родов *Serratia*, *Prevotella*, отрицательно — *Oscillospira*, *Alkaliphilus*, *Caloramator*, *Petrotoga*. После разделения пациентов на три группы по ИМТ, в клиническом ряду — нормальная, избыточная масса тела и общее ожирение — с показателем ИМТ достоверно и положительно коррелировала представленность родов *Serratia*, *Heliorestis*, отрицательно — *Oscillospira*, *Alkaliphilus*, *Caloramator*.

Выводы. Более значимо из всех бактерий с общим и абдоминальным ожирением ассоциирован род *Oscillospira*, в связи с чем он может стать маркером ожирения.

Ключевые слова: микробиота кишечника, 16S рРНК, метагеном, избыточная масса тела, ожирение, *Serratia*, *Prevotella*, *Oscillospira*, *Caloramator*.

Gut Microbiota Composition in Patients with Different Body Weight

L.V. Egshatyan^{1,2}, O.N. Tkacheva³, D.G. Alexeev⁴, A.V. Tyakht⁴,
A.S. Popenko⁴, E.S. Kostyukova^{4,5}, V.V. Babenko⁴, M.T. Vakhitova⁵, S.A. Boytsov⁶

¹ Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

² Moscow State Medical and Dentistry University named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine, Moscow, Russia

⁵ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

⁶ National Research Center for Preventive Medicine, Moscow, Russia

Objective. To characterize gut microbiota composition in patients with different body weight.

Material and Methods. A total of 92 patients (mean age: 52.8 years) with different *body mass index* (BMI), with or without abdominal obesity were enrolled in the study. A metagenomic analysis as an assessment of 16S rRNA gene diversity in a total DNA sample was performed according to 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation protocol. Taxonomic composition of the samples was evaluated using 16S rRNA gene sequences database Greengenes v. 13.5 and RDP classifier.

Results. The most predominant bacteria belonged to two predominant phyla – Bacteroidetes (15.1±11.1%) and Firmicutes (68.2±11.9%). Patients with abdominal obesity had gut flora with a lower percentage of Firmicutes. Abdominal obesity was significantly and positively associated with the prevalence of the genus *Serratia*, *Blautia*, *Prevotella*, while negatively associated with the prevalence of the genus *Oscillospira*, *Thermodesulfobrio*,

Caloramator, *Petrogoga*, *Caldilinea*, *Sphingobacterium*, *Thermovenabulum*, *Johnsonella*. BMI had significant positive correlation with the prevalence of genus *Serratia*, *Prevotella*, and negative correlation with the prevalence of the genus *Oscillospira*, *Alkaliphilus*, *Caloramator*, *Petrogoga*. Division of the patients into three groups by BMI (corresponding to normal weight, overweight, and general obesity) showed significant and positive correlation of BMI with the prevalence of the genus *Serratia*, *Heliobacterium*, and negative correlation of BMI with the genus *Oscillospira*, *Alkaliphilus*, *Caloramator*.

Conclusions. Among all of the bacteria identified, the genus *Oscillospira* was more significantly associated with general and abdominal obesity and, therefore, might be considered as an obesity marker.

Key words: gut microbiota, 16S rRNA, metagenome, overweight, obesity, *Serratia*, *Prevotella*, *Oscillospira*, *Caloramator*.

Введение

Проблема ожирения актуальна не только в развитых, но и развивающихся странах. За последние несколько десятилетий распространенность избыточной массы тела в мире возросла на 27,5% и составляет 2,1 млрд человек. По данным Всемирной организации здравоохранения 65% населения мира проживают в странах, где избыточная масса тела и ожирение приводят к смерти большее число людей, чем пониженная. Распространенность избыточной массы тела в Российской Федерации составляет 59,2%, а ожирения – 24,1%, в США – 67,4 и 33,3%, в Великобритании – 63,6 и 25,8% соответственно [1, 2].

На сегодняшний день объем исследований, касающихся избыточной массы тела, лавинообразно увеличивается, что обусловлено ее пандемией. Одним из факторов, ассоциированных с ней, считается *микробиота кишечника* (МК). Микробиота – это, скорее всего, наша самая тесная связь с окружающей средой. У здоровых людей в толстой кишке и фекалиях определяется четыре отдела бактерий: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria

и Proteobacteria, в свою очередь состоящие из многих групп, классов и видов микроорганизмов [3]. МК предотвращает колонизацию патогенами [4], стимулирует пролиферацию эпителия кишечника и перистальтику [5], синтезирует витамины, гормоны, биогенные амины, а также регулирует накопление жира [6]. Качественное и количественное изменения МК связаны с различными клиническими состояниями, такими как ожирение [7], *сахарный диабет 2-го типа* (СД2) [8,9], рак [10] и др.

Выявлено, что рацион питания меняет МК, повышая ее метаболическую активность с образованием энергии от съеденной пищи, способствуя усвоению питательных веществ и удлинению времени хранения в жировой ткани через разнообразные механизмы [11–13]. Тем не менее, нет единого мнения о том, что из себя представляет «типичная» МК при ожирении. Ограничения связаны с географическим и этническим происхождением обследуемых, их образом жизни, питанием, генетикой, возрастом, количеством выборки, также методом исследования МК, продолжительностью периода голодания до взятия анализа и т. д. Ограниченное

представление о МК зависит еще от того, что большинство клинических исследований проводилось среди американцев и европейцев [3, 14–20] и лишь немногие — в других популяциях [21–24]. Тем не менее, установлено, что генетика и географическое происхождение являются одними из важных факторов, влияющих на МК [25–27].

Экспериментальные данные показали, что животные с ожирением имеют меньше Bacteroidetes и больше Firmicutes, чем худые [28,29]. В отличие от животных, у человека данные неоднозначны, что объясняется влиянием многочисленных генетических и экологических факторов [28, 30].

Связь между разнообразием видов МК и ожирением выявлена в работах E. Le Chatelier с соавт. и A. Cotillard с соавт. [31, 32]. В исследовании E. Le Chatelier с соавт. [31] показано, что «бедная» МК (у 23% пациентов) отличалась от «богатой» совокупным числом генов, сводящимся к различию в нескольких маркерных видах. Пациенты с «бедной» МК имели избыточную массу тела, дислипидемию, инсулинорезистентность, признаки хронического системного воспаления. Кроме того, они быстрее набирали массу тела, чем пациенты с «богатой» МК. В исследовании A. Cotillard с соавт. [32] «бедная» МК была у 40%. После диетотерапии, направленной на обогащение МК, по мере увеличения разнообразия МК масса тела участников снижалась, и для них менее действенна была лечебная диета.

Цель настоящего исследования — изучить особенности состава микробиоты кишечника у пациентов с различной массой тела.

Материал и методы

В одномоментное исследование были включены пациенты с различной массой тела в возрасте 25–75 лет, прошедшие амбулаторное обследование в ФГБУ «ГНИЦПМ» в 2012–2013 гг.

Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывался по формуле: $ИМТ = кг/м^2$, где $кг$ — масса тела в килограммах, $м$ — рост в метрах.

Абдоминальное ожирение диагностировалось при **окружности талии (ОТ)** у мужчин ≥ 94 ; у женщин — ≥ 80 см.

Исходя из массы тела, все пациенты были разделены на три группы:

1-я: пациенты без избыточной массы тела, ИМТ < 25 ;

2-я: пациенты с избыточной массой тела, но без ожирения, ИМТ 25–29,9;

3-я: пациенты с ожирением, ИМТ ≥ 30 .

Исходя из окружности талии, все пациенты разделены на две группы:

1-я: пациенты без абдоминального ожирения;

2-я: пациенты с абдоминальным ожирением.

Критерии исключения: все эндокринные заболевания, кроме впервые выявленного СД2 с длительностью заболевания не более 12 месяцев после установки диагноза; регулярный прием любых препаратов; наличие сердечно-сосудистых заболеваний — хроническая сердечная недостаточность II–IV классов (NYHA); хроническая печеночная и почечная недостаточность; онкологические заболевания; беременность; период лактации; анемия средней и тяжелой степени тяжести; инфекционные заболевания; заболевания желудочно-кишечного тракта в стадии обострения; операции на органах брюшной полости; диагностированная лактозная непереносимость; диагностированная аллергическая реакция любого типа на пищевые продукты; трансплантация органов в анамнезе; заболевания ротовой полости и зубочелюстной системы; отказ от участия в исследовании.

Этические аспекты. Всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «ГНИЦПМ» Минздрава России. Протокол заседания ЛЭК № 8 от 29 ноября 2011 г. Конфиденциальность данных пациента была обеспечена использованием кодовых идентификационных номеров, чтобы соотнести пациента с записями в компьютерных файлах.

Скрининг пациентов. На этапе скрининга всем пациентам проводилось стандартное клиническое обследование: сбор анамнеза, клинический осмотр, в том числе измерение массы тела и роста с расчетом ИМТ, измерение артериального давления. Участникам проводили забор крови и мочи для лабораторных анализов (клинический и биохимический), регистрацию ЭКГ. Лица с отклонениями в анализах крови и данных ЭКГ считались не соответствовавшими критериям включения в исследование.

Из 858 пациентов, прошедших скрининг, 92 соответствовали критериям включения. У всех пациентов, отвечающих критериям включения/исключения, выполнена оценка углеводного обмена, характера питания, таксономического состава микробиоты кишечника.

Оценка углеводного обмена. Для оценки углеводного обмена исследовали концентрацию глюкозы плазмы глюкозооксидазным методом на анализаторе SAPHIRE-400 с использованием диагностических наборов DiaSys. Содержание HbA1c методом жидкостной хроматографии на анализаторе Sapphire 400 (Niigata Mechatronics, Япония) проводилось по стандартной методике производителя.

ПГТТ проводили с использованием 75 г глюкозы с определением уровня глюкозы крови до приема глюкозы и через 2 часа.

Изучение характера питания. Характер питания изучался методом количественной оценки потребленных продуктов при помощи стандартизированной компьютерной программы «Анализ состояния питания человека» (версия 1.2.4 ГУ НИИ питания РАМН 2003–2006). Оценивался качественный состав и объем потребляемых продуктов, общая калорийность рациона, его химический состав.

Выделение ДНК. Образцы кала, хранящиеся при температуре -20°C , помещали в контейнер со льдом для разморозки в течение 30 минут. Стерильным шпателем отбирали навеску образца массой 150 мг и помещали в пластиковые пробирки с закручивающимися крышками объемом 2 мл (SARSTEDT, Германия). Взвешивание образца осуществляли с точностью до второго знака после запятой. К навеске образца добавляли смесь бусин ZIRCONIA/SILICA диаметром 0,1 мм (BioSpec, США) в количестве 300 мг, ZIRCONIA/SILICA диаметром 0,5 мм (BioSpec, США) в количестве 100 мг и 1,2 мл лизирующего буфера (500 мМ NaCl; 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 50 мМ EDTA; 4% SDS). Непосредственно перед добавлением лизирующий буфер прогревали в течение 10 минут при 37°C в водяной бане. После добавления лизирующего буфера крышки пробирок плотно закручивали и пробирки вортиксовали до перехода содержимого в гомогенное состояние.

Далее образцы гомогенизировали с помощью механического гомогенизатора типа BeadBeater (Mini BeadBeater 16, BioSpec, США) в течение 3 минут в режиме максимальной интенсивности встряхивания. Полученные образцы инкубировали при 70°C в течение 15 минут, периодически перемешивая содержимое на вортексе, после чего центрифугировали при 14000 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и хранили во льду, к осадку добавляли теплый лизирующий раствор в количестве 1200 мкл, после чего повторяли процедуру гомогенизации с использованием Mini BeadBeater 16. Полученные фракции надосадочной жидкости объединяли, ДНК осаждали добавлением двух объемов этилового спирта и $\frac{1}{10}$ объема 3М ацетата натрия в течение 1 часа при -20°C . Образцы центрифугировали при 14000 об/мин в течение 20 минут, после чего отбрасывали надосадочную жидкость, осадок промывали 1000 мкл 80% этилового спирта, подсушивали при комнатной температуре в течение 30 минут и суспендировали в 400 мкл TE-буфера.

Растворенные образцы ДНК дополнительно центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 минут, надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку, добавляя 1 мкл раствора РНКазы А (5 мг/мл) и инкубируя при 37°C в течение 1 часа. Полученные образцы ДНК замораживали и хранили при -20°C . Количество ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США). Качество ДНК оценивали посредством гель-электрофореза в 1% агарозном геле с окраской этидия бромидом. В лунки геля вносили 6 мкл образца в смеси с 6X буфером для нанесения образцов, содержащего лидирующий краситель бром-феноловый синий (5 мкл образца ДНК и 1 мкл 6X буфера). Гель-электрофорез проводили при напряженности электрического поля 5 В/см. Критерием качества выделяемого образца является сохранность ДНК в области высоких диапазонов масс (свыше 10000 пар нуклеотидов относительно маркера GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, Литва).

Подготовка библиотек и секвенирование. Метагеномный анализ в формате оценки разнообразия последовательностей гена 16S рРНК в суммарном образце ДНК осуществляли согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part#15044223 Rev. B), рекомендованному Illumina для секвенатора MiSeq.

Образцы ДНК, выделенной из кала, разводили в 500 раз. Первый раунд амплификации переменных участков V3-V4 гена 16S рРНК осуществляли с использованием специфических праймеров А (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG) и Б (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC); программа амплификации (амплификатор DNA Engine Tetrad[®] 2, Bio Rad):

- 1) 95°C — 3 мин
- 2) 25 циклов: 95°C — 30 с
 55°C — 30 с
 72°C — 30 с
- 3) 72°C — 5 мин
- 4) охлаждение — при 4°C .

Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием бусин Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) в соответствии с протоколом.

Второй раунд амплификации для двойного индексирования образцов осуществляли с использованием комбинации специфических праймеров. Программа амплификации (амплификатор DNA Engine Tetrad[®] 2, Bio Rad):

Таблица 1. Характеристики пациентов, исходя из ИМТ

Показатель	Нормальный вес (n=31)	Избыточный вес (n=33)	Ожирение (n=28)	P (тест Манна-Уитни)
ИМТ	22,25 (18,67–24,91) [21,65–23,4]	27,26 (25,0–29,74) [26,2–28,34]	34,66 (30,3–43,0) [32,76–38,82]	0
Возраст, лет	49 (25–70) [35–60]	55 (29–75) [49–64]	54 (32–73) [47,5–62]	0,0023
Энергия, ккал	2135 (1139,6–3340,8) [1837,4–2348,7]	2083,7 (1115,6–3269) [1766,8–2370,9]	2238 (1113,2–4994,8) [1610,8–2344,8]	>0,05
Жиры, г	100,5 (50,6–198,9) [81,6–114,3]	99,2 (41,6–162,9) [87,6–113,7]	100,2 (19,3–255,4) [79,2–104,4]	>0,05
Белки, г	70,9 (41,4–134,4) [57,5–84,4]	77,5 (39,4–117,8) [63,7–89,1]	80,5 (28,6–149,1) [64,0–92,8]	>0,05
Углеводы, г	205,6 (69,2–756,8) [142,4–248,7]	196,3 (102,2–325,7) [143,5–232,1]	224,0 (76,9–756,8) [142,3–277]	>0,05
Клетчатка, г	8,0 (2,9–17,5) [5,4–9,5]	8,4 (3,3–21) [6,3–9,9]	8,8 (2,2–27) [6,2–9,9]	>0,05
HbA1c	5,2 (4,0–6,9) [4,8–6,2]	5,7 (4,1–7,6) [5,0–6,3]	6,6 (5,2–9,0) [5,5–6,9]	0,02
Пациенты СД2	n=6	n=5	n=10	

Таблица 2. Характеристики пациентов, исходя из объема талии (ОТ)

Показатель	С абдоминальным ожирением (n=53)	Без абдоминального ожирения (n=39)	P (тест Манна-Уитни)
ОТ, см	97,95 (80–127,0) [94,6–117,5]	77,2 (62,0–93,0) [72,1–85,43]	0
Возраст, лет	56 (29–75) [46–62]	48 (25–69) [34–59]	0,0001

Таблица 3. Статистика секвенирования

Показатель секвенирования	Результат секвенирования
Количество секвенированных ридов	118213±45814
Количество высококачественных ридов	102581 ± 39210 (87,1±2,2% от числа секвенированных)
Доля классифицированных ридов из числа высококачественных	87,4±7,4%

- 1) 95 °C – 3 мин
- 2) 8 циклов: 95 °C – 30 с
55 °C – 30 с
72 °C – 30 с
- 3) 72 °C – 5 мин
- 4) охлаждение – 4 °C.

Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием бусин Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) в соответствии с протоколом.

Концентрацию полученных библиотек 16S в растворе определяли с помощью флуориметра Qubit® (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. Очищенные ампликоны смешивали эквимольно в соответствии с полученными концентрациями. Качество приготовленной для секвенса библиотеки оценивали на

приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent) с использованием набора Agilent DNA 1000 Kit.

Дальнейшая подготовка образца к секвенированию и секвенирование пулированного образца осуществляли с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов) и прибора MiSeq (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя.

Биоинформатическая обработка. Фильтрация ридов по качеству и таксономическая классификация проводилась с использованием программного комплекса QIIME [33]. Таксономический состав образцов был оценен путем классификации по базе данных последовательностей гена 16S рРНК Greengenes v. 13.5 [34] с помощью классификатора RDP. Результатом классификации для каждого метагенома являлся вектор из чисел ридов, иденти-

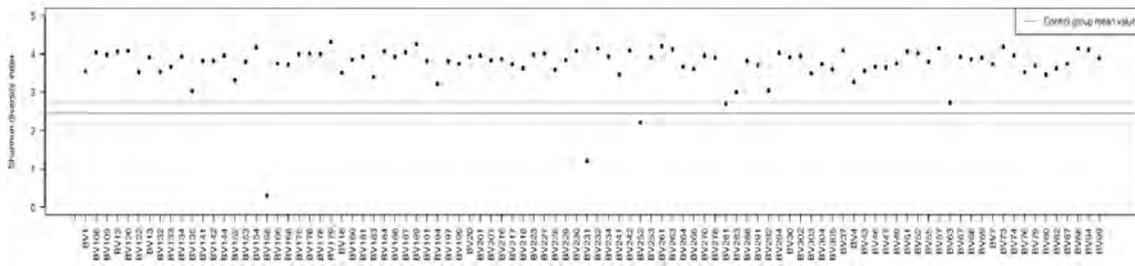


Рис. 1. Богатство микробиоты по индексу альфа-разнообразия

Примечание. * Красная линия – среднее альфа-разнообразие ± стандартное отклонение для образцов из исследования Р. Turnbaugh и соавт. [37].

Таблица 4. Сравнительная характеристика состава доминирующих бактерий в наших образцах и представленных в литературе. Адаптировано по J. Escobar и соавт. [38]

Отдел бактерий	Колумбия	Европа	Япония	Сев. Корея	США	Россия
Actinobacteria	0,001±0,002	0,008±0,023	0,182±0,238	0,000±0,000	0,000±0,000	0,052±0,033
Bacteroidetes	0,166±0,119	0,306±0,161	0,179±0,171	0,262±0,180	0,287±0,141	0,151±0,111
Firmicutes	0,787±0,128	0,589±0,173	0,626±0,211	0,689±0,213	0,696±0,144	0,682±0,119
Proteobacteria	0,020±0,033	0,013±0,011	0,012±0,013	0,015±0,012	0,010±0,010	0,077±0,033
Tenericutes	0,004±0,005	0,016±0,049	0,000±0,000	0,006±0,008	0,001±0,005	0,007±0,007
Verrucomicrobia	0,012±0,042	0,012±0,026	0,000±0,001	0,000±0,000	0,001±0,002	0,008±0,026

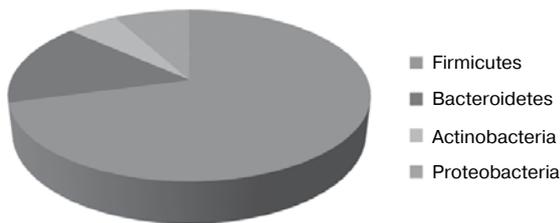


Рис. 2. Представленность основных отделов бактерий

фицированных как та или иная операционная таксономическая единица (OTU). Вектор относительной представленности был нормирован до 100% на каждый образец.

Весь статистический анализ был выполнен на языке программирования R, версия 3.1.0. Статистический анализ групп образцов, включавший сравнение относительной представленности для каждого бактериального таксона, был выполнен с использованием критерия Манна–Уитни (поправка на множественное сравнение методом Бенджамини–Хохберга) и построения обобщенных линейных моделей (библиотека glm2 [35]).

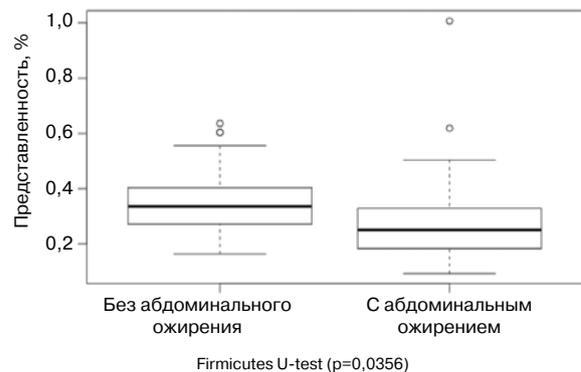


Рис. 3. Представленность Firmicutes у пациентов без и с абдоминальным ожирением

При построении графиков многомерного шкалирования в качестве меры попарного различия таксономического состава образцов была использована UniFrac во взвешенном варианте [36]. Для построения иллюстраций был использован пакет ggplot.

На графиках «ящики с усами» горизонтальной чертой отмечены медианы, нижняя и верхняя грань прямоугольника отвечают первой и третьей квар-

Таблица 5. Соотношение Bacteroidetes/Firmicutes у пациентов с СД2 и различным ИМТ

Соотношение	Нормальный вес (n=5)	Избыточный вес (n=8)	Ожирение (n=10)	P (тест Манна–Уитни)
Bacteroidetes/Firmicutes	0,03 (0,001–0,06) [0,014–0,05]	0,11 (0,04–0,4) [0,04–0,12]	0,17 (0,03–0,35) [0,07–0,2]	0,02

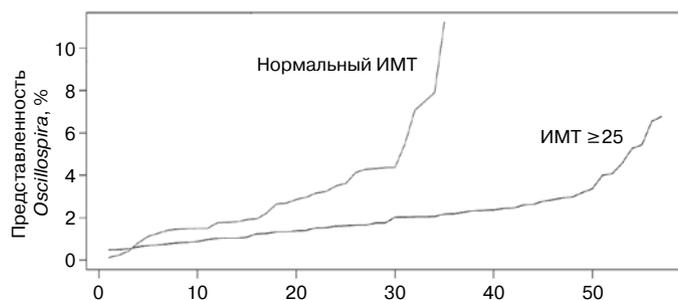
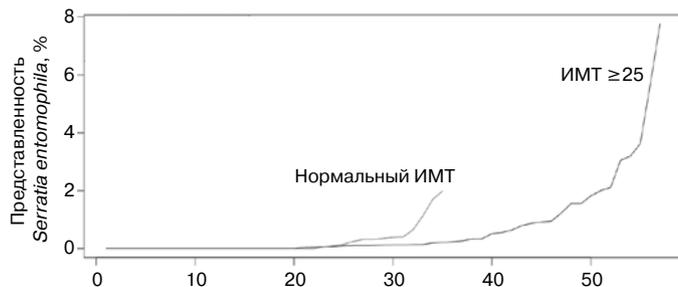
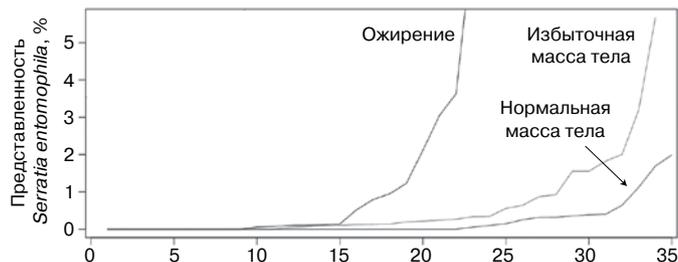
Таблица 6. Обобщенные линейные модели вида: OTU~ИМТ

Род бактерий	Оценка регрессии	Станд. ошибка	z	Pr(> z)
<i>Oscillospira</i>	-0,48	0,13	-3,6	0,02
<i>Serratia entomophila</i>	1,23	0,37	3,29	0,04

тили соответственно, «усы» соответствуют расстоянию между квантилями, помноженному на 1,5. Значения, выходящие за пределы «усов», считаются выбросами и отмечаются точками.

Результаты исследования

В исследование включены 92 пациента (26 мужчины и 66 женщин). Средний возраст всех пациентов — 52,8 лет (25–75) [46–63]. Пациенты разделены на группы по вышеописанным критериям. Характеристики пациентов представлены в табл. 1 и 2.

Рис. 4. Обобщенная линейная модель вида: OTU (*Oscillospira*) ~ ИМТРис. 5. Обобщенная линейная модель вида: OTU (*Serratia entomophila*) ~ ИМТРис. 6. Обобщенная линейная модель вида: OTU (*Serratia entomophila*) ~ ИМТ

Секвенирование. После секвенирования образцов кала было получено 118213 ± 45814 ридов на образец (табл. 3). Результатом классификации ридов стала таблица представленности операционных таксономических единиц OTU (англ. operational taxonomic units) — условная таксономическая единица, соответствующая виду или штамму и выделяемая по гомологии 16S рРНК гена (97% порог) [36].

Индекс альфа-разнообразия Шеннона. Для оценки видового разнообразия сообществ (богатства микробиоты) мы использовали индекс альфа-разнообразия Шеннона. В нашем исследовании, в отличие от данных литературы [37], он оказался достаточно высоким и составил $3,71 \pm 0,56$ (рис. 1). Индекс Шеннона не различался между образцами пациентов с общим и абдоминальным ожирением.

Доминирующие отделы (филумы). Доминирующие бактерии всего состава образцов оказались представителями двух основных филумов (рис. 2, табл. 4) — Bacteroidetes ($15,1 \pm 11,1\%$) и Firmicutes ($68,2 \pm 11,9\%$), как описано в литературе [3,38].

Анализ взаимосвязей между представленностью основных отделов бактерий и ожирением (общее и абдоминальное) показал, что единственной группой, где были выявлены различия относительной представленности Firmicutes, оказались пациенты с и без абдоминального ожирения: тест Манна–Уитни представленностей OTU, поправка False Discovery Rate (FDR) (рис. 3).

Ассоциация с представленностью Bacteroidetes и показателем ИМТ была выявлена только у пациентов с нормальной массой тела ($R_s 0,38$, $p=0,019$), однако при наличии избыточной массы тела и абдоминального ожирения достоверность терялась.

Соотношение этих доминирующих отделов — Bacteroidetes/Firmicutes — достоверно не различается между образцами пациентов всех исследуемых групп.

Несмотря на то что состав МК при СД2 отличается от состава здоровых людей, в нашем исследовании он не влиял на различия между группами. Пациенты с СД2 были во всех группах, но встречаемость была больше в группе

Таблица 7. Построение обобщенных линейных моделей вида: род бактерий ~ ИМТ

Род бактерий	Оценка регрессии	Станд. ошибка	z	Pr(> z)
<i>Prevotella</i>	0,56	0,123	4,54	0,000319
<i>Oscillospira</i>	-0,383	0,114	-3,37	0,014
<i>Alkaliphilus</i>	-0,386	0,117	-3,29	0,014
<i>Serratia</i>	1,169	0,344	3,4	0,014
<i>Caloramator</i>	-0,958	0,313	-3,062	0,0246
<i>Petrotoga</i>	-1,44	0,492	-2,928	0,032

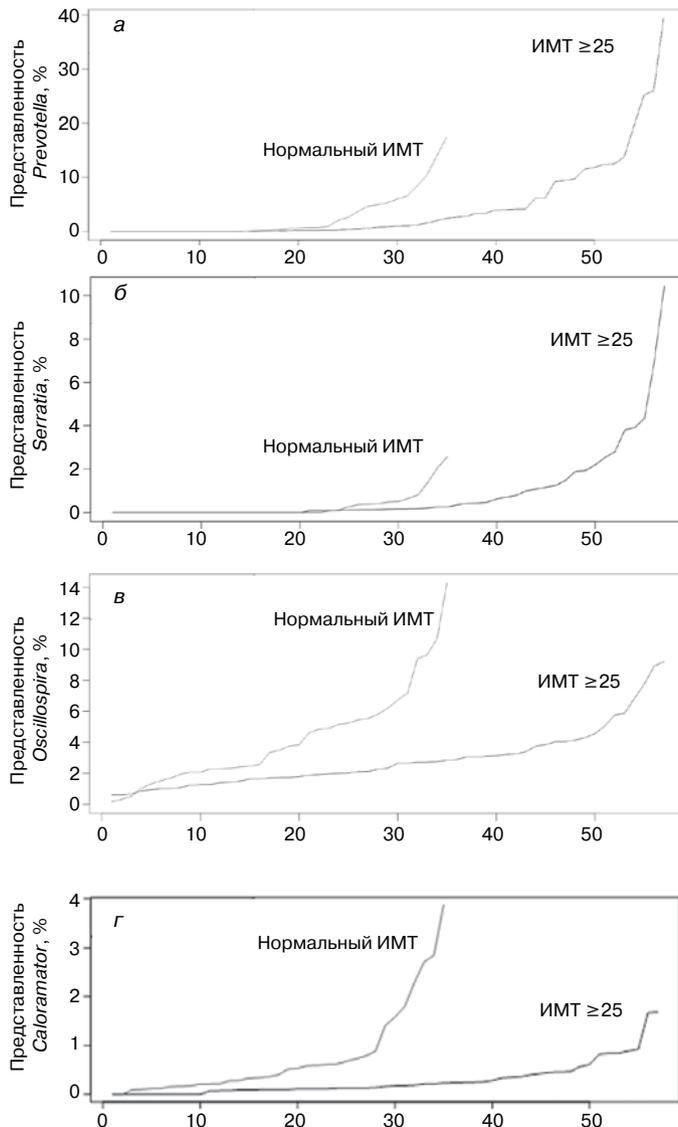


Рис. 7. Обобщенная линейная модель вида: род *Prevotella* (а), *Serratia* (б), *Oscillospira* (в), *Caloramator* (г) ~ ИМТ

пациентов с ожирением. Отсутствие влияния СД2 можно объяснить тем, что диабет был впервые выявленный и изменения состава МК при ожирении и СД2 в целом схожи. Однако при анализе толь-

ко пациентов с СД2 выявлено, что у пациентов с СД2 соотношение Bacteroidetes/Firmicutes растет по мере увеличения массы тела (табл. 5).

При анализе рациона питания ассоциации с доминирующими отделами были выявлены только между суточным потреблением клетчатки и представленностью Bacteroidetes ($r=0,32$, $p=0,0004$).

Бактерии, ассоциированные с избыточной массой тела и общим ожирением

1. С целью выявления зависимости представленности отдельных родов от метаданных, вне зависимости от их количества, построены обобщенные линейные модели вида OTU (условная таксономическая единица, соответствующая виду или штамму) ~ИМТ.

При сравнении пациентов с нормальной массой тела и ИМТ ≥ 25 (избыточная масса тела и ожирение) выявлено, что с показателем ИМТ положительно коррелирует *Serratia entomophila*, отрицательно — *Oscillospira* (табл. 6, рис. 4, 5).

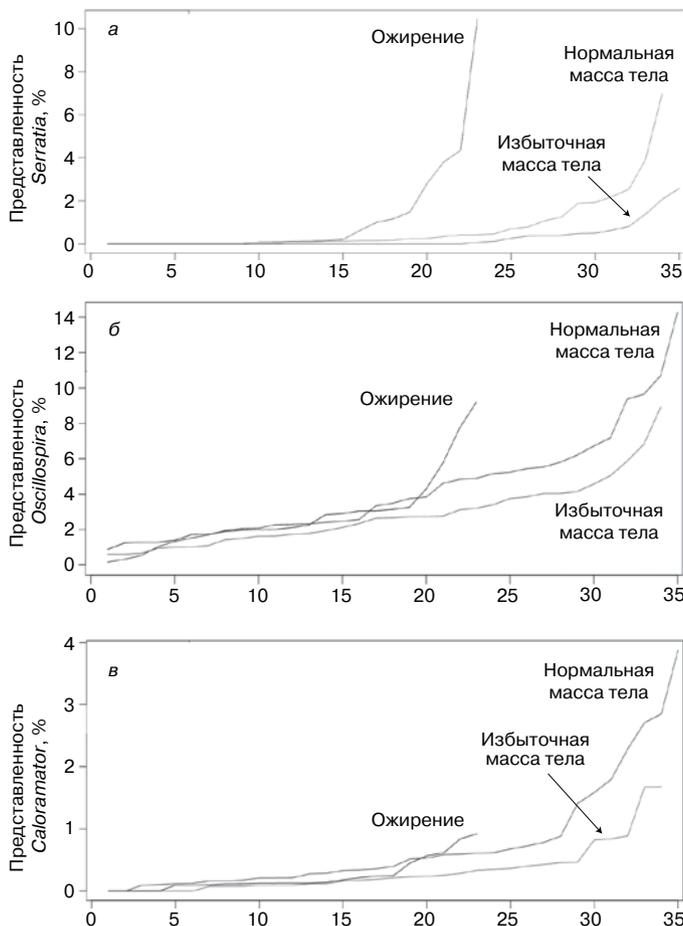
После разделения пациентов на три группы, исходя из ИМТ, в клиническом ряду нормальная масса тела, избыточная масса тела и ожирение с показателем ИМТ положительно коррелирует *Serratia entomophila* ($p=0,046$, рис. 6).

2. Для детекции более значимых отличий и с целью ограничения возможности появления случайных результатов аналогичный анализ был сделан по родовому составу микробиоты (в анализ вошли только те рода, чья средняя представленность составляет 95% от суммарной по всем образцам и отделам, которые имеют ненулевую представленность хотя бы в половине образцов).

После построения обобщенных линейных моделей вида род бактерий ~ ИМТ, при сравнении пациентов с нормальной массой тела и ИМТ ≥ 25 (избыточная масса тела и общее ожирение) выявлено, что с показателем ИМТ положительно коррелирует

Таблица 8. Построение обобщенных линейных моделей вида: род бактерий ~ ИМТ

Род бактерий	Оценка регрессии	Станд. ошибка	z	Pr(> z)
<i>Oscillospira</i>	-0,213	0,075	-2,86	0,047
<i>Alkaliphilus</i>	-0,23	0,07751	-2,94	0,047
<i>Serratia</i>	0,64	0,17	3,85	0,0034
<i>Heliorestis</i>	0,47	0,17	2,8	0,047
<i>Caloramator</i>	-0,656	0,22	-2,93	0,047

Рис. 8. Обобщенная линейная модель вида: род *Serratia* (а); *Oscillospira* (б); *Caloramator* (в) ~ ИМТ

лирует представленность бактерий родов *Serratia*, *Prevotella*, отрицательно — *Oscillospira*, *Alkaliphilus*, *Caloramator*, *Petrotoga* (табл. 7). На рис. 7 представлены только те, которые часто возникают в разных зависимостях.

После разделения пациентов на три группы в клиническом ряду — нормальная, избыточная масса тела и общее ожирение — с показателем ИМТ положительно коррелирует представленность родов *Serratia*, *Heliorestis*, отрицательно — *Oscillospira*, *Alkaliphilus*, *Caloramator* (табл. 8). На рис. 8 представлены только те, которые часто возникают в разных зависимостях.

Бактерии, ассоциированные с абдоминальным ожирением

После построения обобщенных линейных моделей вида: род бактерий ~ абдоминальное ожирение выявлено, что с абдоминальным ожирением положительно коррелирует представленность родов *Serratia*, *Blautia*, *Prevotella*, отрицательно — *Oscillospira*, *Thermodesulfovibrio*, *Caloramator*, *Petrotoga*, *Caldilinea*, *Sphingobacterium*, *Thermovenabulum*, *Johnsonella* (табл. 9). На рис. 9 представлены только те, которые часто возникают в разных зависимостях.

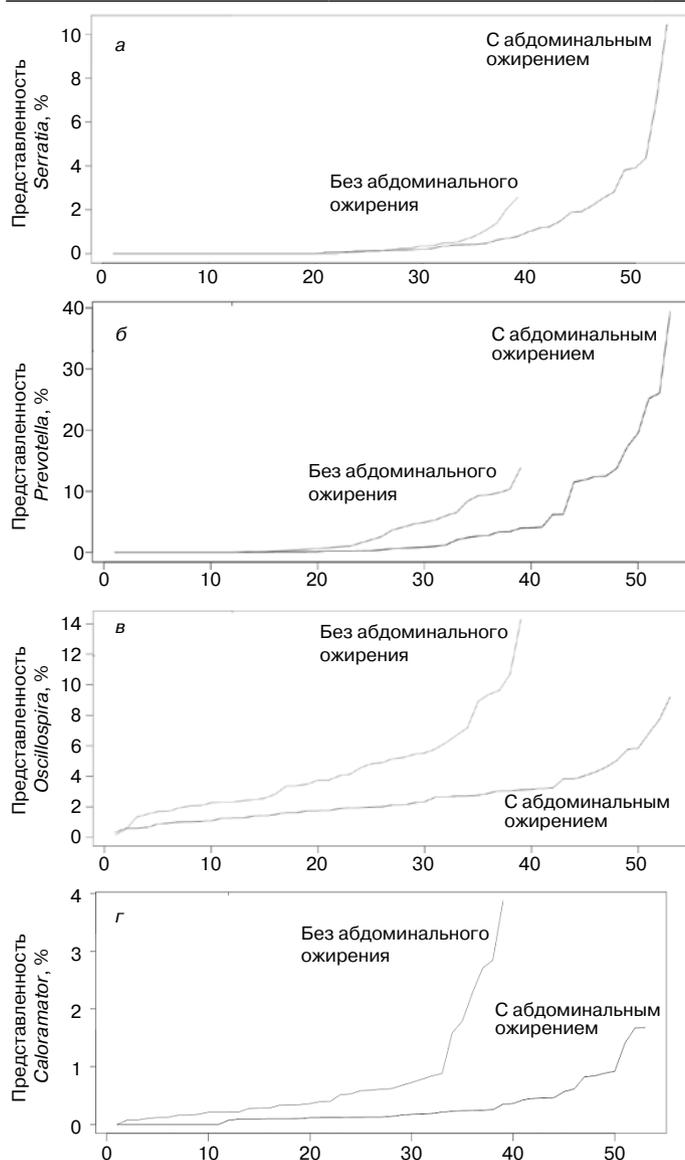
Поиск бактерий, по которым различаются группы образцов, проводился еще и тестом Манна-Уитни представленностей OTU, поправка на множественные сравнения проводилась с помощью FDR-контроля. Единственными группами, где этим методом были выявлены различия, оказались пациенты без и с абдоминальным ожирением. У пациентов с абдоминальным ожирением оказалась меньше представленность *Bacteria* ($p=0,037$), *Caldilinea tarbelica* ($p=0,016$), *Desulfonauticus autotrophicus* ($p=0,026$), *Oscillospira* ($p=0,032$) (рис. 10), *Thermodesulfovibrio tiophilus* ($p=0,016$).

Учитывая, что OTU — достаточно чувствительная и вариабельная величина, аналогичный анализ был сделан по родовому составу. Проведен поиск возможных корреляций между доступной информацией о пациентах, включающий в себя ряд биохимических параметров, сведения о рационе питания и составе их микробиоты. В первом приближении был использован тест Манна-Уитни, который выявил различия только по признаку абдоминального ожирения в представленности 5 родов: *Caldilinea* ($p=0,0868$), *Desulfonauticus* ($p=0,011$), *Oscillospira* ($p=0,012$) (рис. 11), *Thermodesulfovibrio* ($p=0,008$) и *Caloramator* ($p=0,0086$).

Таким образом, из вышенаписанного видно, что с ожирением (общим и абдоминальным) ассоциированы различные бактерии, но часто в разных зависи-

Таблица 9. Построение обобщенных линейных моделей вида: род бактерий ~ абдоминальное ожирение

Род бактерий	Оценка регрессии	Станд. ошибка	z	Pr(> z)
<i>Blautia</i>	0,139	0,05	2,79	0,037
<i>Prevotella</i>	0,48692	0,12	4,1896	0,000804
<i>Oscillospira</i>	-0,51	0,114	-4,44	0,00051
<i>Thermodesulfovibrio</i>	-0,66	0,217	-3,05	0,0255
<i>Caldilinea</i>	-0,63	0,242	-2,6	0,047
<i>Serratia</i>	1,2	0,327	3,675	0,0045
<i>Sphingobacterium</i>	-1,002	0,312	-3,214	0,018
<i>Caloramator</i>	-0,848	0,316	-2,69	0,043
<i>Thermovenabulum</i>	-1,154	0,433	-2,67	0,043
<i>Petrotoga</i>	-1,527	0,527	-2,905	0,034
<i>Johnsonella</i>	-1,7578	0,631	-2,786	0,037

Рис. 9. Обобщенная линейная модель вида: род *Serratia* (а), *Prevotella* (б), *Oscillospira* (в), *Caloramator* (г) ~ абдоминальное ожирение

мостях выявляется представленность нескольких родов — *Serratia*, *Prevotella* (положительно) и *Oscillospira*, *Caloramator* (отрицательно). Более значимо из них ассоциируется представленность рода *Oscillospira*, что дает основание полагать, что он тесно связан с ожирением.

Обсуждение результатов

Чтобы расширить представления о микробиоте кишечника при ожирении, мы впервые в российской популяции проанализировали данные пациентов с различным ИМТ и сравнили с данными литературы. В этих работах были представлены данные микробиоты кишечника, антропометрические показатели (табл. 10) и рацион питания пациентов [38].

Исходя из данных, представленных в табл. 10, можно сделать вывод, что люди с избыточной массой тела относятся чаще всего к старшей возрастной группе, чем худые, несмотря на то что тенденция не является существенной и наблюдается не во всех группах. В нашей группе пациентов данная тенденция была существенной (использован тест Манна–Уитни), как и у японцев.

В нашем исследовании состав МК, в отличие от результатов международного проекта «Микробиом человека» (Human microbiome project), когда самым представленным бактериальным родом в метабеномах кала был *Bacteroidetes*, и он был схож с составом МК стран, обсуждаемых нами (см. табл. 4). Во всех этих образцах преобладали представители филума *Firmicutes* по сравнению с *Bacteroidetes*. *Firmicutes*, является крупнейшим бактериальным отделом, включает в себя более 200 видов, преимущественно грамположительных бактерий. Отдел *Bacteroidetes* представлен грамо-

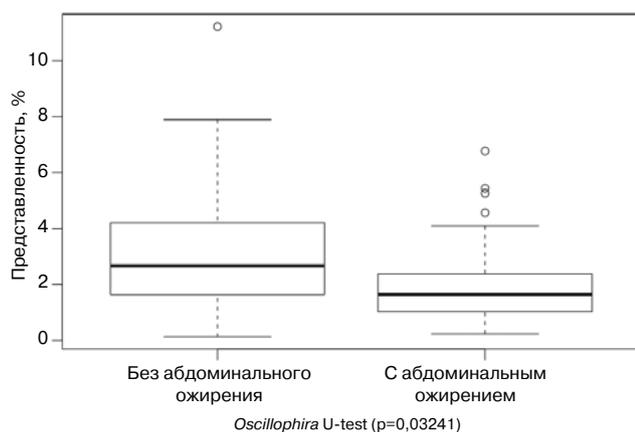


Рис. 10. Боксплот представленности OUT *Oscillospira* у пациентов без и с абдоминальным ожирением

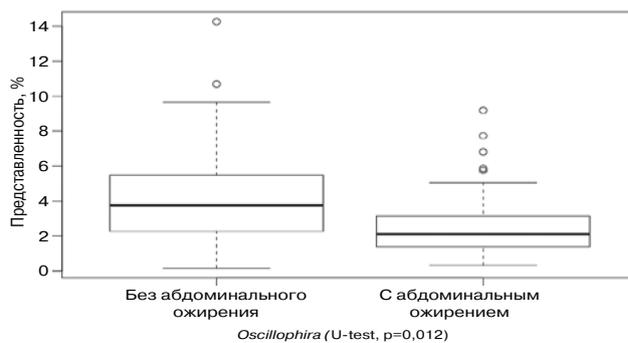


Рис. 11. Боксплот представленности рода *Oscillospira* у пациентов без и с абдоминальным ожирением

Таблица 10. Сравнительная характеристика наших пациентов с данными литературы. Адаптировано по J. Escobar и соавт [38]

Показатель	Нормальный вес	Избыточный вес	Ожирение	P
		Колумбия		
Возраст, лет	33±11	39±9	43±12	0,10
ИМТ	22,6±1,7	27,1±1,3	32,6±2,3	<0,0001
		Европа		
Возраст, лет	56±9	56±9	59±6	0,78
ИМТ	22,5±1,2	28,4±0,8	32,8±1,7	<0,0001
		Япония		
Возраст, лет	21±1	33	–	<0,0001
ИМТ	20,3±0,8	28,0	–	<0,0001
		Северная Корея		
Возраст, лет	43±16	58±13	–	0,09
ИМТ	22,5±1,2	28,5±0,6	–	<0,0001
		США		
Возраст, лет	26±2	26±3	26±3	0,73
ИМТ	21,3±1,0	28,3±0,6	41,7±7,8	<0,0001
		Россия		
Возраст, лет	49±13,1	55±9,94	54±9,67	0,0023
ИМТ	22,25±4,1	27,26±5,0	34,66±5,7	0

трицательными бактериями. В отличие от состава МК представленных стран, в наших, как и в японских образцах, представительным оказался отдел Actinobacteria [38]. Отдел Actinobacteria состоит из грамположительных бактерий, важнейшими представителями которого являются бифидумбактерии. Есть мнение, что снижение Bacteroidetes сопровождается увеличением Actinobacteria. Представленность отдела Proteobacteria также была больше в образцах наших пациентов.

Недавнее исследование с включением 1020 человек из 23 различных мест мира показало, что у обитателей, проживающих в высоких географических широтах (удалённых от экватора), как правило, наблюдается более высокие показатели ИМТ и представленности Firmicutes, и низкие — Bacteroidetes, в отличие от населения низких широт [39].

До настоящего времени остается предметом дискуссий связь ожирения с изменением соотноше-

ния основных бактериальных отделов. В основном обсуждаются «типичные» изменения — увеличение количества бактерий отдела Firmicutes и уменьшение количества бактерий отдела Bacteroidetes. Следует подчеркнуть, что не все исследователи находили такие изменения КМ при ожирении. В одном из самых влиятельных исследований на сегодняшний день, анализирующих МК у лиц с различным ИМТ с помощью полногеномного секвенирования, обнаружено снижение представленности Bacteroidetes при избыточном весе, однако никаких ассоциаций бактерий отдела Firmicutes с ИМТ не было выявлено [40]. В другом исследовании при анализе меньшего количества образцов ($n=49$) и другой техники (количественная ПЦР) M. Armoçom и соавт. [41] обнаружили схожие результаты. В отличие от этих исследований, другие авторы описали противоположные изменения: высокую долю Bacteroidetes [42,43] и низкую — Firmicutes [44] у лиц с избыточной массой тела по сравнению с нормальной. Также есть исследования, где выявляли увеличение двух филумов при увеличении ИМТ [45] или, наоборот, никакие ассоциации не были обнаружены [3, 22, 46, 47].

Из обсуждаемых нами стран у колумбийцев представленность Firmicutes отрицательно коррелировала с ИМТ ($p=0,05$, $r=-0,36$), различий по Bacteroidetes не было. Аналогичные результаты получены у американцев (Firmicutes: $p=0,02$, $r=-0,30$; Bacteroidetes: $p=0,45$, $r=-0,23$). В Европейской популяции любые взаимосвязи отсутствовали [38].

В нашем исследовании мы также не выявили ассоциаций между показателями ИМТ и представленностью бактерий Bacteroidetes или Firmicutes. Единственной группой, где были выявлены различия, оказались пациенты с и без абдоминального ожирения. При абдоминальном ожирении представленность Firmicutes была ниже, чем без него.

Проблема взаимосвязей между избыточным весом и составом КМ существенно осложняется влиянием характера питания на различные микроорганизмы желудочно-кишечного тракта. Поэтому особый интерес представляют данные о влиянии пищи, особенно обогащенной жирами, на состав КМ. Учитывая особенности характера питания в разных странах мира, мы сравнили наши данные с литературными [38]. Суточный калораж у пациентов в нашем исследовании (2144 ккал) оказался ближе к калоражу у американцев (2278 ккал) и европейцев (2281 ккал) и был намного выше, чем у корейцев (1806 ккал), колумбийцев (1869 ккал) и японцев (1945 ккал). Он был сформирован высоким содержанием жиров (Россия —

99,9 г, Европа — 95,3 г, США — 82,9 г, Япония — 59,3 г, Колумбия — 49,0 г, Корея — 37,1 г), белков (Европа — 98,9 г, США — 87,3 г, Россия — 75,8 г, Япония — 69,6 г, Корея — 66,4 г, Колумбия — 59,0 г) и низким содержанием углеводов (Россия — 205,6 г, Европа — 229,8 г, Япония — 263,6 г, США — 279,5 г, Колумбия — 290,7 г, Корея — 301,7 г). Потребление клетчатки также оказалось меньше в нашем исследовании (8,4 г), чем у японцев (15,0 г), американцев (15,1 г), колумбийцев (18,2 г) и корейцев (19,8 г). И в нашем исследовании с потреблением клетчатки положительно ассоциировалась представленность Bacteroidetes ($p=0,0004$), которая была представлена меньше в отличие от отдела Firmicutes. Однако нужно отметить, что Bacteroidetes относятся к протеолитическим микроорганизмам, расщепляющим белки до азотистых соединений.

Ни по суточному калоражу, ни по отдельным компонентам (белки, жиры, углеводы) пациенты с различными показателями ИМТ в нашем исследовании между собой не различались. Несмотря на важную роль характера питания на различные микроорганизмы, экспериментально установлено, что у животных, выращенных в стерильных условиях, высококалорийная диета самостоятельно не приводит к ожирению [48].

Проблема причинно-следственной связи качественных и количественных изменений состава КМ и ожирения остается нерешенной. Однако влияние КМ на метаболические процессы несомненно, что, скорее всего, зависит от социокультурных особенностей в стране проживания, образа жизни, рациона питания и генетической предрасположенности.

В нашем исследовании с ожирением (общим и абдоминальным) более тесно были ассоциированы представители родов *Serratia*, *Prevotella* (положительно) и *Oscillospira*, *Caloramator* (отрицательно).

Представители рода *Serratia* и *Prevotella* (семейство Prevotellaceae) относятся к грамотрицательным факультативным анаэробам (отдел Bacteroidetes), условно патогенным и могут инициировать метаболическую эндотоксемию за счет содержания эндотоксина — липополисахарида [49, 50]. Липополисахарид проникает через слизистую кишечника в кровь, где распознается иммунокомпетентными клетками и вызывает неспецифический иммунный ответ, активирует альтернативный путь комплемента, взаимодействует с рецепторами на макрофагах, стимулирует выработку острофазных цитокинов, таких как ФНО- α , интерлейкин-1, интерлейкин-6, ингибитор активатора плазминогена 1-го типа и др.

В настоящее время убедительно показано, что индуцируемый цитокинами острофазный ответ свя-

зан с дислипидемией, инсулинорезистентностью, атеросклерозом, ожирением и т. д. [51].

В исследовании J.P. Furet и соавт. [50] показано, что у людей с избыточным весом больше представленности рода *Prevotella*, чем в контрольной группе. В другом исследовании [52] представленность рода *Prevotellaceae* была выше при ожирении, также показано, что специфичное для ожирения семейство бактерий *Prevotellaceae* является углеводо- и белок-ферментирующим, также ацетат- и H₂-продуцирующим [53].

Представители родов *Oscillospira*, *Caloramator* относятся к грамположительным анаэробным бактериям филума Firmicutes [54, 55]. Выявлено, что *Caloramator* участвует в брожении углеводов (глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы, галактозы и др.) [54], а *Oscillospira* расщепляет пищевые волокна [38]. В нашем исследовании более значимая связь с общим и абдоминальным ожирением была выявлена с представленностью *Oscillospira*, что дает основание полагать, что она точно ассоциирована с избыточным весом.

Наши результаты совпадают с представленными в литературе. В 2013 г выявлено, что представленность *Oscillospira* находится в обратной корре-

ляционной зависимости от ИМТ [55]. Такие же данные были получены у колумбийцев, сниженная представленность родов *Oscillospira*, *Akkermansia*, *Dialister*, а также Ruminococcaceae и Clostridiales были выявлены у людей с ожирением [38].

Заключение

При всей сложности вопроса о причинно-следственной связи изменений КМ и ожирения совокупность полученных данных обосновывает положение, что качественные и количественные изменения КМ могут способствовать развитию ожирения. С другой стороны, безусловно ожирение влияет на состав микробиоты. В нашем исследовании состав МК сильно не отличается от других стран, где преобладали представители отдела Firmicutes по сравнению с Bacteroidetes. В отличие от состава МК представленных стран, в наших образцах представленность Actinobacteria и Proteobacteria была больше. Наблюдаемые нами взаимосвязи между ожирением и отдельными микробными маркерами были выявлены также и в других исследованиях, что указывает на возможность их применения в мировом масштабе.

Литература

- Ng M., Fleming T., Robinson M. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2014; 384:766-81.
- World Health Organization Media Centre. Obesity and overweight. Fact sheet no Geneva; 2013.
- The Human Microbiome Project Consortium Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486:207-4.
- Guarner F., Malagelada J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361:512-9.
- Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005; 122:107-18.
- Backhed F., Ding H., Wang T., et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:15718-23.
- Ley R.E. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26:5-11.
- Qin J., Li Y., Cai Z., et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490:55-60.
- Larsen N., Vogensen F., van den Berg F.W., et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010; 5: e9085.
- Mai V., Colbert L.H., Perkins S.N., Schatzkin A., Hursting S.D. Intestinal microbiota: a potential diet-responsive prevention target in ApcMin mice. *Mol Carcinog* 2007; 46:42-8.
- Clarke S.F., Murphy E.F., Nilaweera K., Ross P.R., Shanahan F., O'Toole P.W., Cotter P.D. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut Microbes* 2012; 3:186-202.
- Scott K.P., Gratz S.W., Sheridan P.O., Flint H.J., Duncan S.H. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res* 2013; 69(1):52-60.
- Cox L.M., Blaser M.J. Pathways in microbe-induced obesity. *Cell Metab* 2013; 17:883-94.
- Duncan S.H., Lobeley G.E., Holtrop G., et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes* 2008; 32:1720-4.
- Schwiertz A., Taras D., Schafer K., et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* 2010; 18:190-5.
- Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenko T., et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457:480-7.
- Walker A., Ince J., Duncan S., et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* 2011; 5:220-30.
- Armougom F., Henry M., Vialettes B., Raccach D., Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS One* 2009; 4: e7125.
- Santacruz A., Collado M., Garcia-Valdes L., et al. Gut microbiota composition is associated with body weight,

- weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr* 2010; 104:83-92.
20. Zupancic M.L., Cantarel B.L., Liu Z., et al. Analysis of the gut microbiota in the old order Amish and its relation to the metabolic syndrome. *PLoS One* 2012; 7: e43052.
 21. Ismail N., Ragab S., ElBaky A., et al. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Archives of Med Sci* 2011; 7:501-7.
 22. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473:174-80.
 23. Schnorr S., Candela M., Rampelli S., et al. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun* 2014; 5:3654.
 24. Mai V, McCrary QM, Sinha R, Gleib M. Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutritional J* 2009; 8:49.
 25. Tims S., Derom C., Jonkers D.M., et al. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J* 2012; 7:707-17.
 26. Suzuki T.A., Worobey M. Geographical variation of human gut microbial composition. *Biol Lett* 2014; 10:1013-37.
 27. Yatsunencko T., Rey F.E., Manary M.J., et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012; 486:222-7.
 28. Turnbaugh P., Ley R., Mahowald M., et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444:1027-31.
 29. Murphy E.F., Cotter P.D., Healy S., et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut* 2010; 59:1635-42.
 30. Everard A., Belzer C., Geurts L., et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:9066-71.
 31. Le Chatelier E., Nielsen T., Qin J., et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013; 500:541-6.
 32. Cotillard A., Kennedy S.P. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 2013; 500:585-8.
 33. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 2010; 7:335-6.
 34. http://greengenes.secondgenome.com/downloads/database/13_5
 35. Marschner I. glm2: Fitting Generalized Linear Models 2014. R package version 1.1.2.
 36. Lozupone C., Hamady M., Knight R. UniFrac – an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* 2006; 7:371
 37. Turnbaugh P., Hamady M., Yatsunencko T., et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457:480-4.
 38. Escobar J.S., Klotz B., Valdes B.E., Agudelo G.M. The gut microbiota of Colombians differs from that of Americans, Europeans and Asians. *BMC Microbiol* 2014; 14:311.
 39. Suzuki T.A., Worobey M. Geographical variation of human gut microbial composition. *Biol Lett* 2014; 10:20131037.
 40. Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunencko T., et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457:480-7.
 41. Armougom F., Henry M., Vialettes B., Raccach D., Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One* 2009;4: e7125.
 42. Collado M., Isolauri E., Laitinen K., Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:894-9.
 43. Schwartz A., Taras D., Schafer K., et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* 2010; 18:190-5.
 44. Tims S., Derom C., Jonkers D.M., et al. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J* 2012; 7:707-17.
 45. Ismail N.A., Ragab S.H., ElBaky A.A., et al. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Archives of Med Sci* 2011; 7:501-7.
 46. Duncan S., Belenguer A., Holtrop G., Johnstone A., Flint H., Lobley G. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:1073-8.
 47. Zhang H., DiBaise J., Zuccolo A., et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:2365-70.
 48. Backhed F., Manchester J.K., Semenkovich C.F., Gordon J.I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:979-84.
 49. Guentzel M.N. *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. Medical Microbiology 4th edition, S. Baron, Editor. 1996: Galveston.
 50. Furet J.P., Kong L.C., Tap J., et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 2010; 59: 3049-57.
 51. Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A., et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1761-72.
 52. Zhang H., DiBaise J.K., Zuccolo A., et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:2365-70.
 53. Marounek M., Duskova D. Metabolism of pectin in rumen bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29:429-33.
 54. Ogg C.D., Patel B.K. *Caloramator mitchellensis* sp. nov., a thermoanaerobe isolated from the geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia, and emended description of the genus *Caloramator*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011; 61:644-53.
 55. Tims S., Derom C., Jonkers D., et al. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *The ISME Journal* 2013; 7:707-17.