

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-194-10-91-99>



Гендерная оценка микробиома кишечника у больных с ожирением

Котрова А. Д.¹, Шишкин А. Н.¹, Воропаева Л. С.², Лавренова Н. С.², Слепых Л. А.¹, Лукашенко М. В.¹, Ермоленко Е. И.²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская наб., д. 7–9, Санкт-Петербург, Россия, 199034.

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, Россия, 197376

Для цитирования: Котрова А. Д., Шишкин А. Н., Воропаева Л. С., Лавренова Н. С., Слепых Л. А., Лукашенко М. В., Ермоленко Е. И. Гендерная оценка микробиома кишечника у больных с ожирением. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021;194(10): 91–99. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-194-10-91-99

Котрова Анна Дмитриевна, младший научный сотрудник, аспирант кафедры факультетской терапии

Шишкин Александр Николаевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской терапии

Ермоленко Елена Игоревна, д.м.н., профессор кафедры медицинской микробиологии; заведующая лабораторией биомедицинской микробиологии отдела молекулярной микробиологии

Слепых Людмила Алексеевна, к.м.н., доцент кафедры факультетской терапии

Воропаева Любовь Сергеевна, аспирант, лаборант исследователь отдела молекулярной микробиологии

Лаврёнова Надежда Сергеевна, младший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии

Лукашенко Мария Владиславовна, студент 6 курса медицинского факультета

✉ Для переписки:

Котрова Анна Дмитриевна
st072505@student.spbu.ru

Резюме

Цель исследования. Оценить связь индекса массы тела (ИМТ) и бактерий кишечника у мужчин и женщин с ожирением.

Материалы и методы. В исследование было включено 56 больных с ожирением, разделенных на 2 группы. Первую группу составили 27 женщин (средний возраст составил $62 \pm 2,2$ года), вторую группу — 29 мужчин (средний возраст — 55 ± 9 лет). Всем пациентам рассчитывался индекс Кетле ($\text{кг}/\text{м}^2$). Для исследования микробиоты кишечника использовался метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и метагеномное секвенирование. ДНК из фекалий выделяли с помощью набора для выделения ДНК «Экспресс-ДНК-Био» («АлкорБио», Россия). Для проведения ПЦР-РВ использовался набор реагентов «Колонофлор-16» (ООО «Альфалаб», Россия). Для секвенирования микробиома библиотеки ДНК были подготовлены с использованием набора для подготовки образцов Illumina Nextera с праймерами ДНК, соответствующими участкам V3 — V4 гена 16S рРНК. Исследование образцов фекалий проведено с помощью секвенирования генов 16S рРНК на платформе Illumina (секвенатор MiSeq).

Результаты. Выявлено статистически значимо чаще встречающееся у женщин, чем у мужчин большее общее количество бактерий, повышенное содержание *Bacteroides fragilis* group и *Faecalibacterium prausnitzii*. Обнаружены сильные отрицательные корреляционные связи между ИМТ и общей бактериальной массой, между ИМТ и количеством *Bacteroides fragilis* group среди женщин с ожирением I степени. У мужчин с избыточной массой тела выявлена корреляция между ИМТ и соотношением *Bacteroides fragilis* group/*Faecalibacterium prausnitzii*.

Выводы. Общее количество бактерий, содержание *Bacteroides fragilis* group и *Faecalibacterium prausnitzii* в кишечнике больных имеют статистически значимые связи с ИМТ, и вероятно, могут влиять на формирование метаболических нарушений в большей степени у женщин, чем у мужчин. Для уточнения выявленных тенденций и закономерностей при данном пилотном исследовании требуется дальнейшее изучение микробиома с большим числом пациентов и дополнительными анализами метагенома (16S рРНК) и метаболома, транскриптома, позволяющего контролировать экспрессию ключевых метаболических ферментов, во многом связанных с особенностями состава кишечного микробиоценоза.

Ключевые слова: микробиота, метаболический синдром, индекс массы тела, ожирение, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, пол

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-194-10-91-99>

Gender assessment of the gut microbiome in obese patients

A. D. Kotrova¹, A. N. Shishkin¹, L. S. Voropaeva², N. S. Lavrenova², L. A. Slepikh¹, M. V. Lukashenko¹, E. I. Ermolenko²

¹ Saint-Petersburg State University, Universitetskaya Emb., 7/9

² Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Academica Pavlov street, 12

For citation: Kotrova A. D., Shishkin A. N., Voropaeva L. S., Lavrenova N. S., Slepikh L. A., Lukashenko M. V., Ermolenko E. I. Gender assessment of the gut microbiome in obese patients. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;194(10): 91–99. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-194-10-91-99

✉ **Corresponding author:**

Anna D. Kotrova

st072505@student.spbu.ru

Anna D. Kotrova, MD, PhD Student, Department of Internal Diseases; ORCID: 0000-0002-9430-6339

Alexandr N. Shishkin, MD, PhD, DSc, Professor, Head, Department of Internal Diseases; ORCID: 0000-0001-5111-2131

Elena I. Ermolenko, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of biomedical microecology; ORCID: 0000-0002-2569-6660

Lyudmila A. Slepikh, MD, PhD, Assistant Professor, Department of Internal Diseases; ORCID: 0000-0002-9091-6244

Lyubov S. Voropaeva, MD, PhD student, laboratory assistant, Department of molecular microbiology; ORCID: 0000-0002-0052-0896

Nadezhda S. Lavrenova, Junior Researcher; ORCID: 0000-0003-0029-0741

Mariia V. Lukashenko, Student; ORCID: 0000-0001-9997-4865

Summary

The aim. To assess the relationship between body mass index (BMI) and gut bacteria in men and women with obesity.

Materials and methods. The study included 56 overweight patients, divided into 2 groups. The first group consisted of 27 women (the average age was 62 ± 2.2 years), the second group — 29 men (the average age was 55 ± 9 years). The Quetelet index (kg / m^2) was calculated for all patients. To study the gut microbiome, the method of polymerase chain reaction in real time (RT-PCR) and metagenomic sequencing were used. DNA from feces was isolated using the Express-DNA-Bio DNA isolation kit (AlkorBio, Russia). To carry out RT-PCR, a set of reagents “Colonoflor-16” (“Alfalab”, Russia) was used. For microbiome sequencing, DNA libraries were prepared using the Illumina Nextera Sample Preparation Kit with DNA primers corresponding to the V3 — V4 regions of the 16S rRNA gene. The study of fecal samples was carried out using 16S rRNA gene sequencing on the Illumina platform (MiSeq sequencer).

Results. It was revealed that a higher total number of bacteria, an increased content of *Bacteroides fragilis* group and *Faecalibacterium prausnitzii*, is statistically significantly more common in women than in men. Strong negative correlations were found between BMI and total bacterial mass, between BMI and the number of *Bacteroides fragilis* group among women with grade I obesity. In overweight men, a correlation was found between BMI and the *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii* ratio.

Conclusions. The total number of bacteria, the content of *Bacteroides fragilis* group and *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut of patients have statistically significant associations with BMI, and probably can affect the formation of metabolic disorders to a greater extent in women than in men. To clarify the identified trends and patterns in this pilot study, further study of the microbiome with a large number of patients and additional analyzes of the metagenome (16S rRNA) and metabolome, a transcriptome, allowing to control the expression of key metabolic enzymes, largely associated with the compositional features of the gut microbiocenosis, is required.

Keywords: microbiota, metabolic syndrome, body mass index, obesity, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, gender

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

Все больше и больше исследований указывают на роль кишечной микробиоты человека в развитии широкого спектра заболеваний как у женщин, так и мужчин [1–7]. Половые различия обуславливают особенности течения болезней, что также ассоциировано с отлича-

ющимся составом бактерий кишечника у лиц разного пола [8–12]. Ряд последних исследований подтверждает гендерные особенности микробиоты кишечника, что может определять предрасположенность мужчин и женщин к тем или иным патологиям [13, 14, 15].

В контексте влияния микробиоты на течение заболеваний особого внимания заслуживает изучение столь социально значимой проблемы современного здравоохранения, как ожирение, являющегося важным триггером развития онкологических заболеваний и сердечно-сосудистых осложнений. Его формирование связано с развитием малого системного воспаления, возникающего в том числе под влиянием структурных компонентов и метаболитов бактерий кишечника, поступающих в системный кровоток. В ряде исследований получены данные, доказывающие различия в формировании метаболических нарушений при ожирении у мужчин и женщин, а также различия в бактериальном составе толстой кишки у них. Так, при сравнении характеристик метаболического синдрома у лиц, проживающих на севере, было установлено, что у мужчин чаще, чем у женщин формируется абдоминальный тип ожирения и артериальная гипертензия, у женщин же чаще встречается гиперлептинемия [16]. При сравнении рисков развития метаболических расстройств у лиц репродуктивного возраста Белоруссии был выявлен повышенный риск развития гипертензии у молодых мужчин с нормальной массой тела в сравнении с молодыми женщинами [17]. При

сравнении бактериального состава кишечника при избыточной массе тела и ожирении мужчин и женщин в исследовании 2016 года обнаружено меньшее количество бактерий рода *Bacteroides* у мужчин при ИМТ > 33, отмечена отрицательная корреляция ИМТ и *Bacteroides* у мужчин, в отличие от женщин [13]. Возможно, это связано с гендерными особенностями микробиоты.

В одном из последних исследований, оценивающих состав бактерий кишечника у мужчин и женщин при наличии ожирения также выявлены различия, а именно большее количество представителей родов *Faecalibacterium* и *Prevotella* у мужчин, чем у женщин. Кроме того, после соблюдения диеты с низким содержанием жира у мужчин наблюдалось более высокое содержание родов *Roseburia*, *Desulfovibrio* и *Holdemania*, чем у женщин, что также подтверждает связь микробиоты с питанием и полом [15]. Однако, данные таких работ, посвященных изучению микробиоты кишечника при ожирении у лиц разного пола, немногочисленны и неоднозначны, что требует проведения дальнейших исследований.

Цель настоящего исследования – оценка состава кишечной микробиоты и его связь с ИМТ у мужчин и женщин с ожирением.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе эндокринологического отделения СПб ГБУЗ «Городская Александровская больница», отделения медицинской профилактики СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 32» и ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Для работы были отобраны 56 человек. Первую группу (n=27) составили пациенты женского пола с ожирением (ИМТ ≥ 30) или избыточной массой тела (25 < ИМТ < 30). Средний возраст женщин составил 62 ± 2,2 года. Вторую группу (n=29) составили пациенты мужского пола с ожирением (ИМТ ≥ 30) или избыточной массой тела (25 < ИМТ < 30). Средний возраст мужчин – 55 ± 9 лет.

Критериями исключения из исследования было наличие у пациентов таких патологий и состояний, как инфекционные и онкологические заболевания, тиреотоксикоз или гипотиреоз, хроническая болезнь почек 3b стадии и более, беременность и лактация, а также заболевания, требующие приема глюкокортикостероидов, антибактериальных препаратов, пробиотиков, синбиотиков за последние 30 дней до сбора проб.

Всем пациентам рассчитывался индекс Кетле (кг/м²), проводилось исследование микробиоты толстой кишки в фекалиях с помощью ПЦР-РВ кала и метагеномного секвенирования.

Для проведения ПЦР-РВ кала проводилось выделение ДНК из фекалий. Для выделения ДНК использовался набор ДНК-ЭКСПРЕСС Био («Алкор био», Россия). Выделенную ДНК из фекалий использовали для проведения ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. Пробирки с ДНК хранились при температуре –20°C.

Для проведения ПЦР-РВ использовались специфические олигонуклеотидные праймеры и меченые олигонуклеотидные зонды Taqman. В присутствии фермента Taq-полимеразы происходит гибридизация олигонуклеотидов и зонда с комплементарным участком ДНК-мишени. Образование специфического продукта амплификации сопровождается отщеплением флуоресцентной метки (благодаря наличию у Taq-полимеразы 5' – экзонуклеазной активности) и появлению детектируемого флуоресцентного сигнала, регистрация которого проводится в режиме реального времени. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству специфических продуктов амплификации и, следовательно, нарастает с каждым последующим циклом.

Для выявления ДНК облигатных представителей кишечной микробиоты и условно-патогенных микроорганизмов таких, как: *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Bacteroides spp.*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli enteropathogenic*, *Enterococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Staphylococcus aureus*, *Candida spp.*, – использовался набор реагентов «Колонофлор-16», включающий в себя смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для всех бактерий (общая бактериальная масса) и смеси для амплификации, специфичные для каждого выявляемого вида (или группы) бактерий. Для интерпретации результатов анализов, полученных с применением набора реагентов

«Колонофлор-16», использовалось программное обеспечение от производителя набора.

Исследование образцов фекалий проведено с помощью секвенирования генов 16S rPHK на платформе Illumina (секвенатор *MiSeq*). Приложение FastQC использовалось для оценки качества необработанных чтений. Для поиска таксономических единиц (OTU) использовалась программа CDHIT-OTU-Miseq, CD-HIT-OTU-Miseq позволяет извлекать OTU из парных операций чтения без объединения парных последовательностей путем сопоставления результатов кластеризации для чтений R1 и R2. CD-HIT-OTU-Miseq использует только высококачественные области чтения для кластеризации. Кластеризация была выполнена с использованием следующих параметров: длины высококачественных областей чтения R1 и R2 200 и 180 п.н. соответственно, 97% сходство чтения для отсечки кластеризации и 0,00001 для отсека изобилия. OTU были аннотированы с использованием базы данных Greengenes версии 13.5 [18]. Для секвенирования микробиома библиотеки ДНК были подготовлены с использованием набора для подготовки образцов Illumina Nextera с праймерами ДНК, соответствующими участкам V3 – V4 гена 16S rPHK.

Статистическая обработка результатов проводилась методами параметрической и непараметрической статистики с использованием стандартных функций ПО Microsoft Excel, а также программы IBM SPSS Statistics 26. Нормальность распределения проверялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для анализа количественных данных применялись: значения средней арифметической (M) и стандартной ошибки (m) для описания нормально распределённых признаков, а также значения медианы (Me) и процентилей (25%; 75%) для характеристики не нормально распределённых признаков; непараметрический критерий Манна-Уитни и параметрический Т-критерий для независимых выборок – для оценки значимости различий между количественными показателями; критерий корреляции Спирмена – для анализа корреляции ИМТ и количества бактерий. Для описания качественных данных применялся точный критерий Фишера – для оценки значимости различий частоты кишечного дисбиоза и распределения пациентов по ИМТ. Корреляционные связи оценивались как сильные при значении $r \geq 0,7$, средней силы – $0,4 < r < 0,69$, слабые – $0,2 < r < 0,4$. Статистически значимыми считались различия между показателями при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Пациенты в обеих группах были сопоставимы по возрасту, весу ($p=0,555$), ИМТ($p=0,095$). Распределение обследованных пациентов по ИМТ представлено в таблице 1 и на рисунках 1, 2.

Несмотря на случайную рандомизацию пациентов на группы, группы отличались по ИМТ и степени ожирения. У женщин большая доля пациентов были с более выраженными вариантами ожирения. Так, менее выраженное ожирение (избыточная масса тела и ожирения I степени) было обнаружено у 52% женщин и 83% мужчин.

Таблица 1.
Распределение обследованных пациентов по ИМТ, определённому по индексу Кетле

ИМТ, кг/м²	1 группа, (женщины) (n=27)	2 группа, (мужчины) (n=29)
Избыточная масса тела, (25 < ИМТ < 30), чел.	7(26%)	11(38%)
Ожирение I степени (30 ≤ ИМТ < 35), чел.	7(26%)	13(44,8%)
Ожирение II степени (35 ≤ ИМТ < 40), чел.	8(29,5%)	5(17,2%)
Ожирение III степени (ИМТ ≥ 40), чел.	5(18,5%)	0

Рисунок 1.
Распределение женщин по индексу массы тела.

Figure 1.
Distribution of women by body mass index.





Рисунок 2.
Распределение мужчин по индексу массы тела.

Figure 2.
Distribution of men by body mass index.

Результаты ПЦР-РВ

Расчет критерия хи-квадрат между пациентами двух групп позволил выявить статистически значимое более высокое содержание общей бактериальной массы, *Bacteroides fragilis group* и *Faecalibacterium prausnitzii* у лиц женского пола по сравнению с мужским ($p < 0,05$). Достоверных различий между пациентами мужского и женского пола по количеству *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Candida spp.*, *Clostridioides difficile*, *Clostridium perfringens*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* / *Citrobacter spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Shigella spp.*, *Bacteroides fragilis group* / *Faecalibacterium prausnitzii* получено не было ($p > 0,05$) (табл. 2).

Проведение корреляционного анализа по критерию Спирмена в группе женщин позволило выявить отрицательную корреляционную связь средней силы между величиной ИМТ и количеством

общей бактериальной массы и *Faecalibacterium prausnitzii* ($r = -0,430$, $p < 0,01$ и $r = -0,502$, $p < 0,01$ соответственно). Среди женщин с ожирением I степени также подтвердилась сильная отрицательная корреляционная связь между ИМТ и общей бактериальной массы, между ИМТ и количеством *Bacteroides fragilis group* ($r = -1,000$, $p < 0,01$ и $r = -1,000$, $p < 0,01$ соответственно) (рис. 3 и 4).

Также в группе женщин получена слабая положительная корреляционная связь ($r = 0,395$, $p < 0,05$) между величиной ИМТ и количеством *Candida spp.*

В свою очередь корреляционный анализ по критерию Спирмена в группе мужчин позволил выявить отрицательную корреляционную связь средней силы ($r = -0,425$, $p < 0,05$) между величиной ИМТ и количеством *Bacteroides fragilis group*. Среди мужчин с избыточной массой тела выявилась сильная отрицательная корреляционная связь ($r = -0,878$,

Показатель	Женский (n=27)	Мужской (n=29)
Общая бактериальная масса $>10^{12}$	13 (48,1%)*	5 (17,2%)*
<i>Lactobacillus spp.</i> $<10^7$	21 (77,8%)	18 (62,1%)
<i>Bifidobacterium spp.</i> $<10^9$	5 (18,5%)	11 (37,9%)
<i>Bifidobacterium spp.</i> $>10^{10}$	7 (25,9%)	3 (10,3%)
<i>Escherichia coli</i> $>10^8$	7 (25,9%)	13 (44,8%)
<i>Escherichia coli</i> $<10^7$	13 (48,1%)	12 (41,4%)
<i>Bacteroides fragilis group</i> $>10^{12}$	14 (51,9%)*	6 (20,7%)*
<i>Bacteroides fragilis group</i> $<10^9$	1 (3,1%)	3 (10,3%)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> $>10^{11}$	8 (29,6%)*	2 (6,9%)*
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> $<10^8$	2 (7,4%)	2 (6,9%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> $>10^4$	1 (3,1%)	2 (6,9%)
<i>Klebsiella oxytoca</i> $>10^4$	1 (3,1%)	0
<i>Staphylococcus aureus</i> $>10^4$	3 (11,1%)	1 (3,4%)
<i>Candida spp.</i> $>10^4$	2 (7,4%)	1 (3,4%)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> $<10^9$	19 (70,4%)	22 (75,9%)
<i>Clostridium difficile</i> > 0	1 (3,1%)	1 (3,4%)
<i>Clostridium perfringens</i> > 0	1 (3,1%)	3 (10,3%)
<i>Proteus spp.</i> $>10^4$	1 (3,1%)	1 (3,4%)
<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Citrobacter spp.</i> $>10^4$	17 (63%)	23 (79,3%)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> > 0	1 (3,1%)	1 (3,4%)
<i>Parvimonas micra</i> > 0	1 (3,1%)	5 (17,2%)
<i>Shigella spp.</i> > 0	1 (3,1%)	0
<i>Bacteroides fragilis group</i> / <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> > 100	10 (37%)	4 (13,8%)
<i>Bacteroides fragilis group</i> / <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> < 0	0	3 (10,3%)

Таблица 2.
Сравнительная характеристика микробиоты толстой кишки у исследуемых пациентов

Примечание:
* – обозначены статистически значимые различия между группами ($p < 0,05$).

Рисунок 3.
Связь ИМТ и общей бактериальной массы с ожирением I степени.

Figure 3.
The link between BMI and total bacterial mass with grade I obesity.

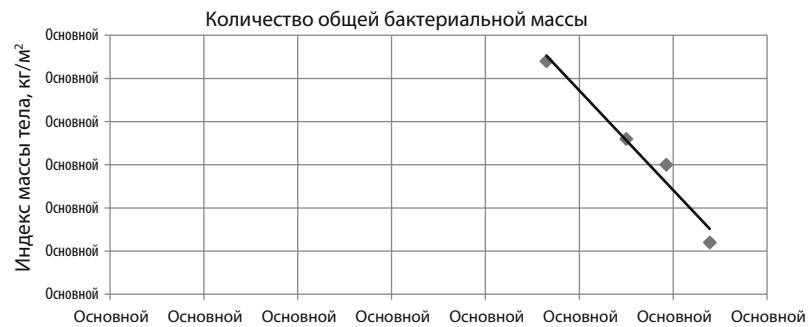
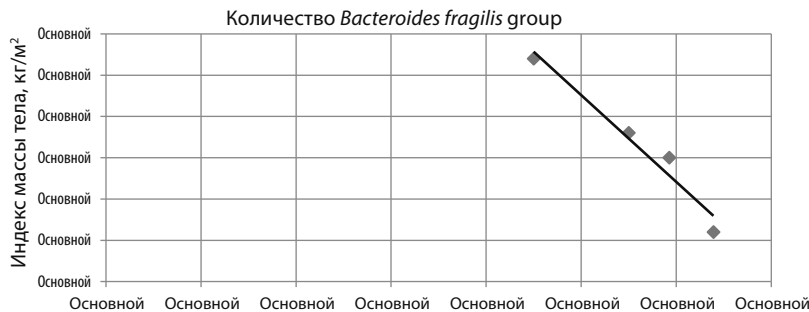


Рисунок 4.
Связь ИМТ и Bacteroides fragilis group у женщин с ожирением I степени.

Figure 4.
The link between BMI and Bacteroides fragilis group in women with grade I obesity.



$p<0,01$) между величиной ИМТ и соотношением *Bacteroides fragilis group*/*Faecalibacterium prausnitzii*. Кроме того, проведение корреляционного анализа по критерию Спирмена среди мужчин

с ожирением II и III степени позволило выявить сильную положительную корреляционную связь ($r = 1,000$, $p<0,01$) между величиной ИМТ и количеством *Escherichia coli* (*E.coli*).

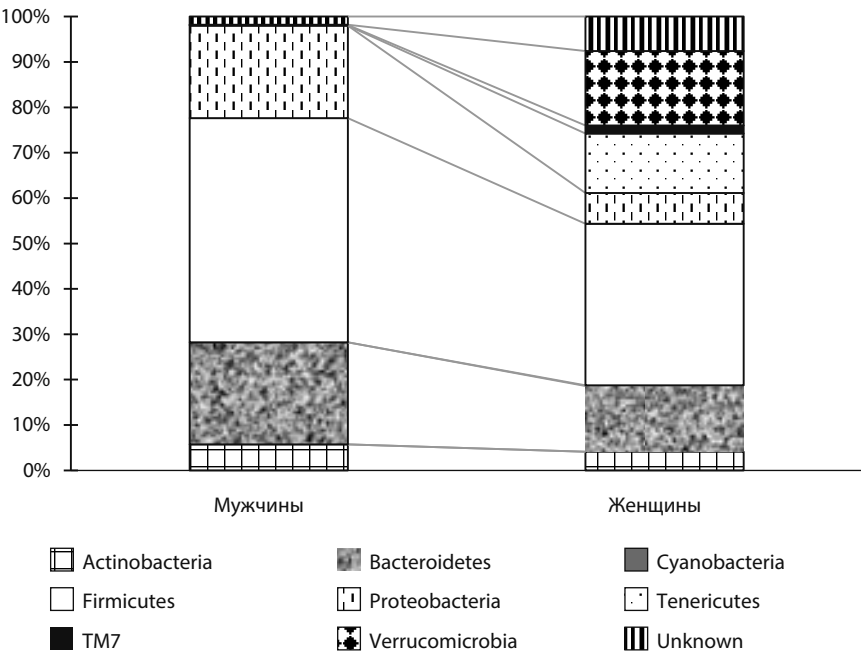
Результаты метагеномного анализа

Метагеномный анализ (секвенирование генов 16S рРНК) проводился на ограниченном количестве проб фекалий пациентов, страдающих МС (по 6 проб на каждую группу). При этом только на уровне на уровне филов обнаружены следующие тенденции: 1) меньшее представительство *Firmicutes*,

Bacteroidetes, *Proteobacteria*, 2) большее представительство Verrucomicrobia и TM7, называемых в настоящее время Saccharibacteria, у женщин, чем у мужчин [19]. Стоит отметить, что у женщин при МС в кишечном микробиоме выявлено большее количество филов бактерий, чем у мужчин (рисунок 5).

Рисунок 5.
Среднее процентное содержание филов бактерий в фекалиях мужчин и женщин с ожирением.

Figure 5.
Average percentage of bacterial phyla in feces of obese men and women.



Обсуждение результатов

Цель данного исследования заключалась в оценке состава кишечной микробиоты и его связь с ИМТ у мужчин и женщин с ожирением.

Основными задачами исследования являлись: 1. рассмотреть и сравнить бактериальный состав кишечника мужчин и женщин с ожирением; 2. оценить связь ИМТ и бактерий кишечника у мужчин и у женщин при ожирении.

В работе проведена сравнительная оценка состава бактерий кишечника двух исследуемых групп, в основном, относящихся к людям среднего возраста по классификации ВОЗ. Первую группу составили пациенты женского пола с ожирением (ИМТ \geq 30) или избыточной массой тела (25 < ИМТ < 30). Средний возраст в группе женщин – 62 \pm 2,2 года. Вторую группу (n=29) составили пациенты мужского пола с ожирением (ИМТ \geq 30) или избыточной массой тела (25 < ИМТ < 30). Средний возраст мужчин – 55 \pm 9 лет.

Среди женщин достоверно чаще были выше общее количество бактерий, популяции *Bacteroides fragilis group* и *Faecalibacterium prausnitzii*.

Полученные различия по количеству *Bacteroides fragilis group* подтверждают закономерности, описанные испанскими исследователями в 2016 году, отражающие гендерные различия [13]. Авторами показано, что при сравнении микробиоты кишечника у 36 женщин в менопаузе и 39 мужчин представители рода *Bacteroides* (к которым относится *Bacteroides fragilis group*) определялись в меньшем количестве у мужчин, нежели у женщин. В более крупном исследовании на Украине (2301 участник) здоровых лиц, наоборот, обнаружено меньшее количество представителей фила *Bacteroidetes* у здоровых женщин, нежели у мужчин [14].

Интересно, что при сравнении полученных нами результатов оценки микробиома кишечника женщин и мужчин с ожирением с работами зарубежных авторов, проводящих сравнение здоровых волонтеров обоих полов, можно только косвенно говорить о важности гендерных различий состава микробиоценозов кишечника при оценке отклонений и подходов в терапии соматической патологии. Наши исследования несмотря на то, что они были проведены на сравнительно небольшом контингенте больных с МС, диктуют необходимость продолжения и открывают новые перспективы в изучении механизмов влияния половых гормонов и морфофункциональных факторов при формировании МС. Об этом отчасти свидетельствуют и результаты, полученные нами и другими авторами при поиске корреляционной связи между количеством отдельных представителей микробиоты и ожирением.

При проведении корреляционного анализа по критерию Спирмена в основной и контрольной группах у женщин выявлена отрицательная корреляционная связь средней силы между ИМТ и общей бактериальной массой ($r = -0,430$, $p < 0,01$), между ИМТ и количеством *Faecalibacterium prausnitzii* ($r = -0,502$, $p < 0,01$). Полученная связь с *Faecalibacterium* также находит свое отражение в американском исследовании 2020 года при оценке

влияния вегетарианской диеты на микробиоту кишечника, вес тела и чувствительность к инсулину [20]. При оценке микробиоты 168 участников обнаружена отрицательная корреляция *Faecalibacterium prausnitzii*, а также *Bacteroides fragilis* с жировой массой, висцеральным ожирением и индексом чувствительности к инсулину. Положительная связь *Faecalibacterium prausnitzii* с модификацией образа жизни (низкожировая гипокалорийная диета, умеренная физическая активность) установлена в крупном (1065 человек) мексиканском исследовании [21]. Полученные данные подтверждают взаимосвязь данной бактерии с внешними факторами формирования ожирения. Среди женщин с ожирением I степени получена сильная связь ИМТ и общей бактериальной массы (коэффициент корреляции равный –1) (рис. 2).

Также в подтверждение имеющимся данным о связи *Candida spp.* с метаболическими нарушениями [22] получена положительная корреляционная связь ($r = 0,395$, $p < 0,05$) между величиной ИМТ и количеством *Candida spp.*.

В свою очередь у мужчин выявлена отрицательная корреляционная связь средней силы между величиной ИМТ и количеством *Bacteroides fragilis group*, что в совокупности с вышеописанными данными наводит на мысль о роли в развитии метаболических нарушений как женщин, так и мужчин, таких бактерий, как *Faecalibacterium prausnitzii* и *Bacteroides fragilis group*. Данные выводы подтверждаются сильной отрицательной корреляцией между величиной ИМТ и соотношением *Bacteroides fragilis group*/*Faecalibacterium prausnitzii* среди мужчин с избыточной массой тела, а также связью между ИМТ и количеством *Bacteroides fragilis group* с коэффициентом корреляции равном –1 среди женщин с ожирением I степени. Полученные данные подтверждаются результатами одного из последних исследований, посвященного оценке связи микробиоты кишечника с ИМТ среди жителей Украины [14]. У лиц с ожирением выявлено меньшее количество представителей фила *Bacteroidetes* (к которому относится *Bacteroides fragilis group*) в сравнении с людьми с нормальной массой тела и отрицательная корреляция данного типа бактерий с ИМТ. При этом в условиях модификации образа жизни (низкокалорийная диета с пониженным содержанием жиров и повышенная физическая активность) отмечалось увеличение числа *Bacteroides* и *Faecalibacterium*, что приводило к снижению ИМТ, уменьшению объема талии и снижению АД [21]. Однако, в исследовании на мышах [23] *Bacteroides fragilis* был ассоциирован с более тяжелым нарушением толерантности к глюкозе и снижению эффективности метформина. В фекалиях пациентов с сахарным диабетом 2 типа определялась обратная связь между *Bacteroides fragilis* и гликоурсодезоксихолевой кислотой, являющейся антагонистом фарнезоидного рецептора (FXR). Соответственно, при снижении количества *Bacteroides fragilis* отмечалась большая активация FXR, что приводило к улучшению углеводного и липидного обменов. Также при оценке связи

ИМТ у детей с избыточной массой тела и ожирением [24] получено большее количество *Bacteroides fragilis* group при избыточной массе, нежели при нормальной массе тела, а также получена положительная корреляция между ИМТ и количеством *Bacteroides fragilis* в фекалиях детей. В связи с представленными нами данными связь *Bacteroides fragilis* с формированием ожирения и метаболических нарушений пока остается неоднозначной и требует дальнейшего изучения.

Кроме того, среди мужчин с ожирением II и III степени выявлена полная взаимосвязь между величиной ИМТ и количеством *E. coli*. Последние исследования подтверждают возможную связь *Escherichia coli* с компонентами метаболического синдрома. В иранском исследовании 2020 года [25] в группе больных с сахарным диабетом отмечалось большее количество *E. coli*, чем в группе здоровых. При изучении микробиоты кишечника у китайских детей с ожирением [26] также отмечалось большее количество *E. coli* в фекалиях, чем у детей с нормальной массой тела. Также экспериментальным путем на мышах Kunming без специфических патогенов (SPF) установлено, что назначение *E. coli* при высокожировой диете усиливало накопление висцерального жира, воспалительную реакцию и нарушение состава микробиоты кишечника [27]. Однако, в более раннем исследовании связи ИМТ с кишечными бактериями при ожирении (134 человека), избыточной массе тела (38 человек) и у худых людей (76 человек) получена отрицательная корреляция между количеством эшерихий и ИМТ [28],

что требует дальнейших исследований и уточнения видовой принадлежности *Escherichia coli*.

Нельзя исключить, что особенности корреляций, выявленных у женщин, могут быть связаны с более выраженным вариантом нарушения жирового обмена в данной группе.

Полученные результаты метагеномного секвенирования соотносятся с данными немногочисленных исследований, посвященных сравнению микробиоты кишечника мужчин и женщин. В голландском исследовании 2017 года [29] при сравнении кишечного микробиома при избыточной массе тела и ожирении у женщин так же, как и в нашей работе, выявлено меньшее представительство *Bacteroidetes* в фекалиях, чем у мужчин. При этом, что интересно, 12-недельное употребление полифенолов (ресвератрола и эпигаллокатехин-3-галлата), доказано положительно влияющих на окисление липидов, формирование системного воспаления и инсулинорезистентность [30], приводило к снижению числа *Bacteroidetes* у мужчин, но не у женщин. Ранее экспериментальным путем методом 16S рРНК секвенирования на C57BL/6 мышах с мутацией гена лептина (ob/ob фенотип) была установлена взаимосвязь меньшего представительства *Bacteroidetes* с ожирением у мышей [31]. Таким образом, полученные в нашей работе результаты метагеномного анализа о меньшей представленности *Bacteroidetes* у женщин, чем у мужчин, соотносятся с выраженностью избытка массы тела у женщин и указывают на вероятную связь представительства *Bacteroidetes* и ИМТ.

Заключение

Полученные сильные отрицательные корреляционные связи между ИМТ и общей бактериальной массой, между ИМТ и количеством *Bacteroides fragilis* group среди женщин с ожирением I степени, между величиной ИМТ и соотношением *Bacteroides fragilis* group/*Faecalibacterium prausnitzii* среди мужчин с избыточной массой тела позволяют установить влияние микробиоты кишечника на выраженность метаболических нарушений как у женщин, так и у мужчин.

Значение общего количества бактерий, количество *Bacteroides fragilis* group и *Faecalibacterium prausnitzii* имеют статистически значимые связи с ИМТ, и вероятно, могут влиять на формирование метаболических нарушений при ожирении в большей степени у женщин, чем у мужчин. Полученные данные могут способствовать разработке персонализированного подхода к лечению ожирения с учетом гендерных особенностей состава кишечной микробиоты.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–315–90106.

Funding: The reported study was funded by RFBR, project number 20–315–90106

Литература | References

1. Nishiwaki H., Ito M., Ishida T., et al. Meta-Analysis of Gut Dysbiosis in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2020 Sep; 35(9):1626–1635. doi: 10.1002/mds.28119.
2. Milosevic I., Vujovic A., Barac A., et al. Gut-Liver Axis, Gut Microbiota, and Its Modulation in the Management of Liver Diseases: A Review of the Literature. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan 17; 20(2):395. doi: 10.3390/ijms20020395.
3. Prosberg M., Bendtsen F., Vind I., et al. The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *Scand J Gastroenterol.* 2016 Dec; 51(12):1407–1415. doi: 10.1080/00365521.2016.1216587.
4. Kotrova A. D., Shishkin A. N., Ermolenko E. I., Saraykina D. A., Volovnikova V. A. Gut microbiota and hypertension. «Arterial'naya Gipertenziya» («Arterial Hypertension»). 2020;26(6):620–628. (In Russ.) doi: 10.18705/1607-419X-2020-26-6-620-628.
5. Ge X., Zheng L., Zhuang R., et al. The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Hypertension Risk: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. *Adv Nutr.* 2020 Jan 1;11(1):66–76. doi: 10.1093/advances/nmz064.

6. Ozaki D., Kubota R., Maeno T., et al. Association between gut microbiota, bone metabolism, and fracture risk in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int.* 2021 Jan;32(1):145–156. doi: 10.1007/s00198-020-05728-y.
7. Kotrova A. D., Shishkin A. N., Semienova O. I., Slepikh L. A. The role of gut microbiota in the development of metabolic syndrome. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2019; 172(12): 101–108. (In Russ.) doi: 10.31146/1682–8658-ecg-172–12–101–108.
Котрова А. Д., Шишкин А. Н., Семенова О. И., Слепых Л. А. Роль кишечной микробиоты в развитии метаболического синдрома. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2019;172(12): 101–108. doi: 10.31146/1682–8658-ecg-172–12–101–108.
8. Razavi A.C., Potts K.S., Kelly T.N., Bazzano L. A. Sex, gut microbiome, and cardiovascular disease risk. *Biol Sex Differ.* 2019 Jun 10;10(1):29. doi: 10.1186/s13293–019–0240-z.
9. Min Y., Ma X., Sankaran K., Ru Y., et al. Sex-specific association between gut microbiome and fat distribution. *Nat Commun.* 2019 Jun 3;10(1):2408. doi: 10.1038/s41467–019–10440–5.
10. Hao, Xia, Pan, Jiao, Gao, Xiumei, Zhang, Shiyu and Li, Yue. “Gut microbiota on gender bias in autism spectrum disorder” *Reviews in the Neurosciences.* 2021; 32(1): 69–77. doi: 10.1515/revneuro-2020–0042.
11. Chulkov V.S., Lenets E. A., Chulkov V.S., Gavrilova E. S., Minina E. E., Zhdanova O. V. Gender characteristics of the pathogenesis, prevention and treatment of metabolic syndrome. “Arterial'naya Gipertenziya” (“Arterial Hypertension”). 2020;26(4):371–382. (In Russ.) doi: 10.18705/1607–419X-2020–26–4–371–382.
Чулков В. С., Ленец Е. А., Чулков В. С. и соавт. Гендерные особенности патогенеза, профилактики и лечения метаболического синдрома. *Артериальная гипертензия.* 2020;26(4):371–382. doi: 10.18705/1607–419X-2020–26–4–371–382.
12. Most J., Goossens G. H., Reijnders D., et al. Gut microbiota composition strongly correlates to peripheral insulin sensitivity in obese men but not in women. *Benef Microbes.* 2017 Aug 24;8(4):557–562. doi: 10.3920/BM2016.0189.
13. Haro C., Rangel-Zúñiga O.A., Alcalá-Díaz J.F., et al. Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. *PLoS One.* 2016 May 26; 11(5): e0154090. doi: 10.1371/journal.pone.0154090.
14. Koliada A., Moseiko V., Romanenko M., et al. Sex differences in the phylum-level human gut microbiota composition. *BMC Microbiol.* 2021 Apr 30; 21(1):131. doi: 10.1186/s12866–021–02198-y.
15. Santos-Marcos J.A., Haro C., Vega-Rojas A., et al. Sex Differences in the Gut Microbiota as Potential Determinants of Gender Predisposition to Disease. *Mol Nutr Food Res.* 2019 Apr; 63(7): e1800870. doi: 10.1002/mnfr.201800870.
16. Ginsar E.A., Selyatitskaya V.G. Comparative characteristic of metabolic syndrome in man and women in the north. *Journal of New Medical Technologies.* 2009. XVI (3), 77–78. (in Russ.)
Гинсар Е. А., Селятицкая В. Г. Сравнительная характеристика метаболического синдрома у женщин и мужчин на Севере. *Вестник новых медицинских технологий.* 2009. XVI (3), 77–78.
17. Mityukova T. A., Kohan S. B., Luzina E. B., Polulyach O. E. Development of metabolic syndrome at persons of reproductive age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series.* 2018;15(1):76–83. (In Russ.) doi: 10.29235/1814–6023–2018–15–1–76–83.
Митюкова Т. А., Кохан С. Б., Лузина Е. Б., Полулях О. Е. Развитие метаболического синдрома у лиц репродуктивного возраста. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук.* 2018;15(1):76–83. doi: 10.29235/1814–6023–2018–15–1–76–83.
18. DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(7): 5069–72. doi: 10.1128/AEM.03006–05.
19. Bor B., Bedree J.K., Shi W., et al. Saccharibacteria (TM7) in the Human Oral Microbiome. *J Dent Res.* 2019 May; 98(5):500–509. doi: 10.1177/0022034519831671.
20. Kahleova H., Rembert E., Alwarth J., et al. Effects of a Low-Fat Vegan Diet on Gut Microbiota in Overweight Individuals and Relationships with Body Weight, Body Composition, and Insulin Sensitivity. A Randomized Clinical Trial. *Nutrients.* 2020 Sep 24; 12(10):2917. doi: 10.3390/nu12102917.
21. Guevara-Cruz M., Flores-López A.G., Aguilar-López M., et al. Improvement of Lipoprotein Profile and Metabolic Endotoxemia by a Lifestyle Intervention That Modifies the Gut Microbiota in Subjects With Metabolic Syndrome. *J Am Heart Assoc.* 2019 Sep 3; 8(17): e012401. doi: 10.1161/JAHA.119.012401.
22. Gosiewski T., Salamon D., Szopa M., et al. Quantitative evaluation of fungi of the genus *Candida* in the feces of adult patients with type 1 and 2 diabetes – a pilot study. *Gut Pathog.* 2014 Oct 15; 6(1):43. doi: 10.1186/s13099–014–0043-z.
23. Sun L., Xie C., Wang G., et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med.* 2018 Dec; 24(12):1919–1929. doi: 10.1038/s41591–018–0222–4.
24. Ignacio A., Fernandes M. R., Rodrigues V. A., et al. Correlation between body mass index and faecal microbiota from children. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Mar; 22(3):258. e1–8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.031.
25. Ejtahed H.S., Hoseini-Tavassol Z., Khatami S., et al. Main gut bacterial composition differs between patients with type 1 and type 2 diabetes and non-diabetic adults. *J Diabetes Metab Disord.* 2020 Feb 8; 19(1):265–271. doi: 10.1007/s40200–020–00502–7.
26. Gao X., Jia R., Xie L., et al. Obesity in school-aged children and its correlation with gut *E.coli* and *Bifidobacteria*: a case-control study. *BMC Pediatr.* 2015 May 30; 15(64). doi: 10.1186/s12887–015–0384-x.
27. Sun Q., Zhang S., Liu X., et al. Effects of a probiotic intervention on *Escherichia coli* and high-fat diet-induced intestinal microbiota imbalance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Feb; 104(3):1243–1257. doi: 10.1007/s00253–019–10304–4.
28. Million M., Angelakis E., Maraninchi M., et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes (Lond).* 2013 Nov; 37(11):1460–6. doi: 10.1038/ijo.2013.20.
29. Most J., Penders J., Lucchesi M., et al. Gut microbiota composition in relation to the metabolic response to 12-week combined polyphenol supplementation in overweight men and women. *Eur J Clin Nutr.* 2017 Sep;71(9):1040–1045. doi: 10.1038/ejcn.2017.89.
30. Bogdanski P., Suliburska J., Szulinska M., et al. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutr Res.* 2012 Jun; 32(6):421–7. doi: 10.1016/j.nutres.2012.05.007.
31. Ley R.E., Bäckhed F., Turnbaugh P., et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 2; 102(31):11070–5. doi: 10.1073/pnas.0504978102.