

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-172-12-51-60

«Маркерные» изменения состава микробиоты кишечника у пациентов с нарушениями углеводного обмена*

Егшатын Л. В.^{1,2}, Ткачева О. Н.³, Каштанова Д. А.³, Дудинская Е. Н.³, Бойцов С. А.⁴

¹ ГБУЗ Московский Клинический Научный Центр им. А. С. Логинова ДЗМ, Москва, Россия

² ГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова», Москва, Россия.

³ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова МЗ РФ, «Российский геронтологический научно-клинический центр», Москва, Россия

⁴ ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

"Marker" changes in the composition of gut microbiota in patients with disorders of carbohydrate metabolism*

L.V. Egshatyan^{1,2}, O.N. Tkacheva³, D.A. Kashtanova³, E.N. Doudinskaya³, S.A. Boytsov⁴

¹ A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow, Russia

² A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation. Russian Gerontology Clinical Research Center, Moscow, Russia

⁴ FSBI National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Health, Moscow, Russia

Для цитирования: Егшатын Л. В., Ткачева О. Н., Каштанова Д. А., Дудинская Е. Н., Бойцов С. А. «Маркерные» изменения состава микробиоты кишечника у пациентов с нарушениями углеводного обмена. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019;172(12): 51–60.
DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-172-12-51-60

For citation: Egshatyan L.V., Tkacheva O.N., Kashtanova D.A., Doudinskaya E.N., Boytsov S.A. "Marker" changes in the composition of gut microbiota in patients with disorders of carbohydrate metabolism. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;172(12): 51–60. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-172-12-51-60

Егшатын Лилит Ваниковна, к.м.н.

Ткачева Ольга Николаевна, д.м.н., профессор

Каштанова Дарья Андреевна, к.м.н.

Дудинская Екатерина Наильевна, к.м.н.

Бойцов Сергей Анатольевич, академик РАН, профессор, д.м.н.

Lilit V. Egshatyan, MD, PhD; ORCID: 0000-0001-8817-1901, eLibrary SPIN: 4552-5340

Olga N. Tkacheva, professor, MD, PhD; ORCID: 0000-0002-4193-688X

Daria A. Kashtanova, MD, PhD; ORCID: 0000-0001-8977-4384, eLibrary SPIN: 8513-0512

Ekaterina N. Dudinskaya, MD, PhD; ORCID: 0000-0001-7891-6850

Sergey A. Boytsov, Academician of RAS; ORCID: 0000-0001-6998-8406

✉ Corresponding author:

Егшатын Лилит Ваниковна

Lilit V. Egshatyan

lilit.egshatyan@yandex.ru

Резюме

Цель: выявить «маркерные» изменения состава микробиоты кишечника у пациентов с нарушениями углеводного обмена.

Методы: в исследование включены 92 пациента в возрасте в среднем 52,8 лет: с нормальной толерантностью к глюкозе (n=48), предиабетом (преСД2, n=24) и впервые диагностированным СД2 (n=20). Метагеномный анализ в формате оценки разнообразия последовательностей гена 16S рНК осуществлен согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation.

Результаты: доминирующими бактериальными типами оказались Bacteroidetes (15,1±11,1%) и Firmicutes (68,2±11,9%). Индекс Шеннона был высоким во всей выборке (3,71±0,56), независимо от статуса углеводного обмена и массы тела пациентов. Представленность Firmicutes оказалась больше (p=0,007), а Bacteroidetes — меньше (p=0,01) у пациентов СД2. Во всей выборке доминировал род Blautia, с которым ассоциировался СД2 (p=0,006). Наблюдалась динамика увеличения количества бактерий рода Blautia и Serratia (p=0,002) в клиническом ряду: нормальный углеводный обмен, преСД2 и СД2 (p=0,0006). Данная тенденция для Blautia усиливалась при наличии у пациента абдоминального ожирения (p=0,003). С маркерами воспаления положительно ассоциировались рода Serratia и Paraprevotella (p<0,007). После стратифицировании пациентов по рациону питания, с нарушениями углеводного обмена ассоциировались рода Blautia, Serratia и отдел Verrucomicrobia. Таксономический анализ выявил два фекотипа со средней силуэтной величиной 0,22. Различий по полу и возрасту пациентов в фекотипах не выявлено, однако обнаружена высокая встречаемость СД2 (p=0,016) в фекотипе, где индекс альфа-разнообразия (p=8.089e-05) и представленность ферментов, преобразующих бутирил-коА в бутират были низкими. Также обнаружены различия в фекотипах

* Иллюстрации к статье – на цветной вклейке в журнал.

* Illustrations to the article are on the colored inset of the Journal.

по проценту путей синтеза витаминов (B9, B2, B6, K, B12). В 1-м феко типе доминировали Prevotella, Oscillospira, Flavobacterium, Sphingobacterium, Parabacteroides, во 2-м — Ruminococcus, Peptoniphilus, Thiothrix, Legionella ($p < 0,004$).

Заключение: получены дополнительные свидетельства об участии микробиоты кишечника в патогенезе СД2.

Ключевые слова: Микробиота кишечника 1; микробиом 2; сахарный диабет 2 типа 3; предиабет 4; энтеротип 5; 16S рРНК секвенирование 6

Summary

Aims: to identify the “marker” changes in the composition of intestinal microbiota in patients with disorders of carbohydrate metabolism.

Materials and methods: to investigate the gut microbiota composition in association with the glucose tolerance analyzed 92 patients (Me 52,8 years): with normal glucose tolerance ($n=48$), prediabetes ($n=24$) and T2D ($n=20$). Metagenomic analysis was performed using 16SrRNA sequencing.

Results: Firmicutes ($68,2 \pm 11,9\%$) predominantly represented microbiota, in a less degree by Bacteroidetes ($15,1 \pm 11,1\%$). Shannon diversity index was higher ($3,71 \pm 0,56$) regardless of the presence or absence of impaired carbohydrate metabolism. The representation of Firmicutes was higher ($p=0,007$), Bacteroidetes ($p=0,01$) was lower in T2D. Blautia was a dominant genus in all samples. The representation of Blautia, Serratia was lower in prediabetes than in T2D, and even lower in normal glucose tolerance. C-reactive protein and Interleukin-6 were associated with higher representation of Serratia and Paraprevotella ($p < 0,007$). Taxonomic analysis of the faecal metagenomes revealed two fecotypes with an average silhouette value of 0.22. Subjects in each fecotype did't differ according to sex distribution and age but differ according to high incidence of T2D ($p=0,016$) in fecotype where there was low index of alpha diversity ($p=8,089e-05$) and the representation of the enzymes that converts butyryl-CoA to butyrate. In clusters found differences according to the percentage of vitamin (B9, B2, B6, K, B12) synthesis pathway. Fecotype 1st is dominated Prevotella, Oscillospira, Flavobacterium, Sphingobacterium, Parabacteroides, while fecotype 2 by Ruminococcus, Peptoniphilus, Thiothrix, Legionella ($p < 0,004$).

Conclusions: study provides the further evidence concerning the structural modulation of the microbiota in the T2D pathogenesis.

Keywords: Gut microbiota 1; microbiome 2; type 2 diabetes 3; prediabetes 4; enterotypes 5; 16S rRNA sequencing 6

Введение

Сахарный диабет 2 типа (СД2) – прогрессирующее и тяжелое заболевание, клинические проявления и осложнения которого обусловлены хронической гипергликемией [1]. Число больных диабетом неуклонно увеличивается в результате роста численности населения, увеличения среднего возраста населения, а также роста распространенности диабета в каждой возрастной группе. На сегодняшний день 425 млн человек во всем мире страдает СД. Эксперты Международной диабетической федерации к 2045 г. прогнозируют увеличение до 629 млн человек [2]. Российская федерация входит в десятку стран, в которых наибольшее число людей страдают СД. Рост популяции больных СД, прежде всего СД2 и частоты его хронических осложнений – одна из самых актуальных проблем здравоохранения, с которой сегодня сталкивается мировое сообщество [2, 3]. За последние несколько лет введены существенные изменения в профилактике и лечении СД2, изучены новые патофизиологические механизмы развития заболевания. В дополнение к хорошо известным факторам риска, таким как генетическая предрасположенность, низкая физическая активность, ожирение, инкретиновая недостаточность, появился новый кандидат – измененная микробиота кишечника (МК) [4]. Выявленные генетические варианты, связанные с диабетом и статистические

модели, которые сочетают в себе известные факторы риска, незначительно улучшили прогнозирование СД2 [5]. Оказалось, что в отличие от них, социально-демографические и экологические факторы в большей степени влияют на риск развития СД2.

Необычайный всплеск научного интереса к МК связан с появлением новой генерации некультуральных методов определения состава микробиоты. Наиболее значимыми из них являются методы метагеномного анализа, основанные на высокопроизводительном секвенировании библиотек тотальной геномной ДНК или библиотек фрагментов генов рибосомальных РНК (рРНК) [6]. Истинная численность микроорганизмов, населяющих организм человека выяснилась только после открытия в 1990-х гг метода секвенирования 16S рРНК. Обнаружено, что в просвете желудочно-кишечного тракта у здорового человека обитает более 10^{14} бактериальных клеток с общим весом примерно 1,5 кг, что на порядок превосходит общее число клеток человеческого организма [7]. МК характеризуется определенным стабильным составом (до 40%), который называется ядром [8], остальная ее часть меняется под влиянием физиологических, диетических, климатогеографических факторов [9].

Максимальная концентрация микроорганизмов наблюдается в кишечнике, поэтому микробиота

кишечника считается важным «органом», участвующим в не только в процессах пищеварения, но и в регуляции иммунной, эндокринной и нервной систем [10, 11]. Сахаролитические бактерии при гидролизе нерастворимых углеводов синтезируют короткоцепочечные жирные кислоты, с которыми связаны практически все жизненно важные процессы в организме человека. Короткоцепочечные жирные кислоты являются основным источником энергии для клеток слизистой толстой кишки, стимулируют их рост и обновление, влияют на образование слизи, увеличивают всасывание воды и различных ионов, регулируют кислотно-щелочной баланс, влияют на перистальтику, поддерживают микробное разнообразие состава, участвуют в процессах глюконеогенеза, липогенеза и т.д. Обнаружено, что гнотобиотическим (лишенным МК) грызунам, приходится потреблять на 30% больше пищи для сохранения массы тела [12].

В конце 2000-х годов были сформированы крупные научные консорциумы, MetaHIT (Metagenome of Human Intestinal Tract, Европа), созданный для изучения МК человека, и HMP (Human Microbiome Project, США) – изучения всего микробного сообщества, населяющего человеческий организм. По результатам проекта MetaHIT были выделены 3 энтеротипа или «фекотипа», или бактериальные «кластеры», которые отличались между собой относительно большим содержанием 1) *Bacteroides*, 2) *Prevotella* и 3) *Ruminococcus* [13]. Однако позднее выделение энтеротипов подверглось критике со стороны научного сообщества, поскольку вариаций состава МК

оказалось намного больше, и отнести МК конкретного человека к одному энтеротипу зачастую представляется сложным. Несмотря на большое разнообразие МК, в ее составе преобладают представители двух основных типов – *Bacteroidetes* и *Firmicutes* (около 90% всего состава), также в меньших пропорциях представлены бактерии *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Cyanobacteria*. Представители *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*, как правило, присутствуют в меньшем количестве в здоровой МК, но они имеют значительный потенциал влияния на состояние здоровья. Кроме того, в кишечнике присутствуют и археи, в основном – род *Methanobrevibacter* [14,15].

В настоящее время изменение состава МК считается одним из ключевых факторов, который приводит к формированию различных заболеваний, таких как рак [16], атеросклероз [17], СД2 и метаболические нарушения [18–20] и т.д. Несмотря на то, что большинство клинических исследований носят описательный характер, исследователи выявляли специфические маркеры заболеваний, как на таксономическом, так и на функциональном уровне. Однако данные, объясняющие механизмы влияния МК на риск развития этих заболеваний часто оказываются противоречивыми. Связано ли это с относительно маленьким числом пациентов, приемом лекарственных средств, техническими причинами или расовыми различиями, остается открытым вопросом.

Настоящая статья основана на исследовании, материалы которого впервые были опубликованы в *Endocrine Connections* в 2016 г. [21].

Материалы и методы

Дизайн исследования

В одномоментное исследование включены пациенты в возрасте 25–76 лет. В зависимости от статуса углеводного обмена они были разделены на три группы: 1) пациенты без нарушений углеводного

обмена, 2) с предиабетом и 3) с СД2 (уровень HbA1c от 6,5% до 9,0% и длительность заболевания не более 12 месяцев после установки диагноза).

Критерии исключения

Эндокринные заболевания (кроме СД2); регулярный прием лекарственных средств; хроническая сердечная, печеночная и/или почечная недостаточность; онкологические заболевания; беременность и период лактации; анемия (кроме легкой степени тяжести); инфекционные заболевания;

заболевания пищеварительного тракта в стадии обострения; трансплантация органов и операции на органах брюшной полости; лактозная непереносимость; аллергическая реакция на пищевые продукты; заболевания ротовой полости и зубочелюстной системы; отказ от участия в исследовании.

Этические аспекты

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был одобрен локальным этическим

комитетом ФГБУ «ГНИЦ ПМ» МЗРФ. Протокол заседания ЛЭК № 8 от 29 ноября 2011 г.

Скрининг пациентов

Из 858 пациентов, прошедших скрининг, 92 соответствовали критериям включения. У всех пациентов, включенных в исследование выполнена оценка

углеводного обмена, хронического системного воспаления, характера питания, таксономического состава МК.

Оценка углеводного обмена

Только в 1-й и 2-й группах проведен пероральный глюкозотолерантный тест. Концентрацию глюкозы плазмы исследовали глюкозооксидазным методом на анализаторе SAPPHIRE-400 с использованием

диагностических наборов DiaSys. Оценка HbA1c проводилась методом жидкостной хроматографии на анализаторе Sapphire 400 (Niigata Mechatronics, Япония) по стандартной методике производителя.

Оценка хронического субклинического воспаления

Для оценки хронического субклинического воспаления исследовали концентрацию высокочувствительного С-РБ (вчС-РБ), Интерлейкина 6 (ИЛ-6)

иммуноферментным методом на анализаторе Sapphire 400 (Niigata Mechatronics, Япония)

Изучение характера питания

Характер питания (качественный состав, объем потребляемых продуктов, общая калорийность рациона, химический состав) изучался при помощи

стандартизированной компьютерной программы «анализ состояния питания человека» (версия 1.2.4 ГУ НИИ питания РАМН 2003–2006).

Оценка состояния микробиоты кишечника

После выделения тотальной ДНК из собранных у участников образцов кала, подготовки библиотек, выполнено секвенирование переменных

участков V3-V4 гена 16S рРНК с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов) и прибора MiSeq (Illumina, США).

Биоинформатическая обработка

Фильтрация ридов по качеству и таксономическая классификация всех образцов производилась с использованием программного комплекса ПО QIIME [22]. Таксономический состав всех образцов оценен путем классификации по базе данных последовательностей гена 16S рРНК Greengenes v. 13.5 [23] с помощью классификатора RDP. Результатом классификации являлось для каждого метагенома вектор из чисел ридов, идентифицированных как та или иная операционная таксономическая единица (т.н. OTU). Вектор относительной представленности был нормирован до 100% на каждый образец.

Статистический анализ результатов был выполнен на языке программирования R (версия 3.1.0). Сравнение относительной представленности каждого бактериального таксона в образцах кала

выполнен при помощи критерия Манна-Уитни (поправка на множественное сравнение методом Бенджамини-Хохберга) и построение обобщенных линейных моделей (библиотека glm2 [24]). При построении графиков многомерного шкалирования в качестве меры попарного различия таксономического состава образцов использована UniFrac во взвешенном варианте [25]. Для построения иллюстраций был использован пакет ggplot.

На графиках «ящички с усами» горизонтальной чертой отмечены медианы, нижняя и верхняя грань прямоугольника отвечают первой и третьей квартили, соответственно, «усы» соответствуют расстоянию между квартилями помноженному на 1,5. Значения, выходящие за пределы «усов», считаются выбросами и отмечаются точками.

Результаты

Объекты (участники) исследования

В исследовании включено 92 человека в возрасте от 25 лет до 76 лет (средний возраст составил $52,8 \pm 13$ лет). Доля мужчин 28% ($n = 26$), женщин – 72% ($n = 66$). Пациенты разделены на 3 группы: с нормальной толерантностью к глюкозе ($n=48$), предиабетом (преСД2, $n=24$) и в впервые диагностированным СД2 ($n=20$). В среднем длительность преСД2 составила $0,22 \pm 0,031$ лет, а СД2 – $0,78 \pm 0,069$ лет. Из таблицы 1 видно, что средние показатели возраста, индекса массы тела (ИМТ), отношения объема талии к объему бедер (ОТ/ОБ), вчС-РБ, гликемии натощак и HbA1c

у пациентов с нарушенным углеводным обменом достоверно выше, чем у здоровых лиц. Пациенты с различной толерантностью к глюкозе между собой не различались по энергетической ценности суточного рациона и количеству употребляемых белков, жиров и углеводов. Пациенты с нарушениями углеводного обмена между собой различались по уровню гликемии натощак, HbA1c и ОТ/ОБ (выше у пациентов с СД2), также по энергетической ценности суточного рациона и количеству употребляемых углеводов (меньше у пациентов с СД2).

Секвенирование

В результате секвенирования переменных участков V3-V4 16S рРНК в среднем получено 102582 ± 46284 ридов на каждый образец. В анализе задействованы 102581 ± 39210 высококачественных ридов, что составляет $87\% \pm 2\%$ от их изначального количества. Классифицированы из них $87,40 \pm 7,4\%$, в среднем с точностью до рода – $97,41 \pm 0,9\%$. Результаты секвенирования

удовлетворяют критериям качества. Результатом классификации ридов стала таблица представленности операционных таксономических единиц OTU (на англ. operational taxonomic units) – условная таксономическая единица, соответствующая роду, виду или штамму и выделяемая по гомологии 16S рРНК гена [25]. Тепловая карта относительной представленности OTU представлена на рисунке 1.

Индекс альфа-разнообразия Шеннона

Оценка видового разнообразия (богатства) микробиоты проводилась с помощью индекса альфа-разнообразия Шеннона. В нашем исследовании, в отличие от сопоставимой группы образцов, включенных в исследование P. Turnbaugh и соавт.

[26] (Калифорнийский университет), где были применены те же методы анализа, индекс Шеннона оказался достаточно высоким и составил $3,71 \pm 0,56$ (рисунок 2). При этом он был высоким во всей выборке. Индекс альфа-разнообразия не различался

между образцами здоровых в сравнении с образцами пациентов с различными нарушениями углеводного обмена, пациентов с ожирением и без, также пациентов разных возрастных групп.

Доминирующие типы (филумы) микроорганизмов

Доминирующие бактерии всего состава оказались представителями двух основных типов бактерий: Bacteroidetes, среднее содержание которых

составил $12,7 \pm 9,86\%$, и Firmicutes со средним содержанием $57,09 \pm 13,6\%$, что согласуется с литературными данными [13].

Бактериальные типы, ассоциированные с нарушениями углеводного обмена

С целью оценки взаимосвязи между углеводным обменом и представленностью бактерий типов Bacteroidetes и Firmicutes использовался однофакторный дисперсионный анализ. При наличии значимых различий, с помощью множественных попарных сравнений по критерию Тьюки, оценивался за счет разницы между какими группами возникают эти различия. Обнаружено, что у пациентов

с СД2 представленность бактерий Firmicutes значительно больше ($p=0,007$), а Bacteroidetes – меньше ($p=0,01$), чем у здоровых и пациентов с преСД2. Образцы от здоровых и пациентов с преСД2 значительно не различались между собой, однако при преСД2 наблюдалась тенденция, характерная для СД2 (таблица 2). Соотношение Firmicutes/Bacteroidetes было значительно выше в группе пациентов с СД2.

Параметр	Здоровые	ПреСД2	СД2	p норма/преСД2-СД2
Возраст (лет)	48.31 ± 14.137	55 ± 9.92	58.35 ± 8.77	0.01/ 0.28
ИМТ (кг/м ²)	25.13 ± 3.93	29 ± 5.88	30.5 ± 5.72	0.0002/ 0.48
ОТ/ОБ (см)	0.81 ± 0.07	0.78 ± 0.38	0.94 ± 0.09	4.7e-05/ 0.003
Глюкоза натощак	4.92 ± 0.41	5.69 ± 1.18	7.76 ± 1.78	1.3e-08/ 6.4e-05
HbA1c (%)	4.92 ± 0.809	5.44 ± 0.81	6.5 ± 1.58	6.4e-06/ 0.004
вЧС-РБ (мг/л)	2.48 ± 1.605	3.48 ± 3.78	5.98 ± 7.71	0.03/ 0.08
ИЛ-6 (пг/мл)	9.06 ± 5.05	9.12 ± 5.8	9.98 ± 5.62	0.08/ 0.09
Нутриенты				
Энергия (ккал)	2172.6 ± 463.7	2325 ± 809.5	1984.4 ± 834.9	0.25/ 0.02
Углеводы (г)	205.1 ± 59.3	248 ± 135.5	168.1 ± 75	0.64/ 0.02
Белки (г)	75.1 ± 20.7	81.8 ± 21.5	73.8 ± 28.7	0.72/ 0.08
Жиры (г)	101.9 ± 27.9	100.4 ± 27.1	102.1 ± 51.1	0.45/ 0.3

Таблица 1.

Обобщенные характеристики пациентов и потребляемых ими нутриентов.

Table 1.

Summarized characteristics of patients and the nutrients they consumed.

Представленность Bacteroidetes			Представленность Firmicutes		
Здоровые	преСД2	СД2	Здоровые	преСД2	СД2
13,57±10,2%	11,8±9,73%	9,07±7,87%	55,79±13,96%	58,92±11,2%	63,78±9,77%

Таблица 2.

Представленность типов Bacteroidetes и Firmicutes в обследуемых группах.

Примечание:

* преСД2 – предиабет; СД2 – сахарный диабет 2 типа.

Table 2.

The abundance of Bacteroidetes and Firmicutes in study groups.

Note:

* healthy; preT2D – prediabetes; T2D – type 2 diabetes.

Доминирующие рода микроорганизмов

В среднем 50% всего таксономического состава пришлось на пять родов: Blautia, Bacteroides, Prevotella, Faecalibacterium, Clostridium. Для визуального контроля возможной кластеризации образцов на группы и выявления образцов – 52 выбросов, получившихся по техническим или иным причинам, проведено многомерное шкалирование

для снижения размерности анализа и визуализации. На Рисунке 3 приведен график многомерного шкалирования для исследуемых образцов, с отображением преимущественной представленности этих родов. Из рисунка видно, что наиболее представленным оказался род Blautia, а в частности, Blautia coccoides.

Бактериальные рода, ассоциированные с нарушениями углеводного обмена

Регрессионный анализ показал, что с нарушениями углеводного обмена из всей представленности родов ассоциированы только рода Blautia и Serratia.

1. Род Blautia

Род Blautia coccoides относится к классу Clostridia, крупнейшему из типа грамположительных Firmicutes. Наличие СД2 было ассоциировано с большим количеством бактерий рода Blautia ($p=0,006$) (рисунок 4).

Также наблюдалась достоверная динамика увеличения количества этих бактерий в клиниче-

ском ряду пациентов с нормальным углеводным обменом, преСД2 и СД2 ($p=0,0006$) (рисунок 5). Описанная тенденция увеличения количества Blautia оказалась более выраженной при наличии у пациентов абдоминального ожирения ($p=0,0002$) (рисунок 6).

2. Род Serratia

Род Serratia относится к типу грамотрицательных Proteobacteria (факультативные, условно-патогенные анаэробы). Регрессионный анализ показал, что в клиническом ряду пациентов с нормальным

углеводным обменом, преСД2 и СД2 достоверная динамика повышения представленности наблюдалась и для рода Serratia ($p=0,002$) (рисунок 7).

Бактерии, ассоциированные с рационом питания и нарушениями углеводного обмена

С помощью регрессионного анализа был произведен поиск корреляций между составом микробиоты и особенностями питания. В целом медиана среднесуточного потребления углеводов составила $207 \pm 89,7$ гр., жиров $101,78 \pm 29,4$ гр., калорий $2009 \pm 648,7$ ккал. Их количество отдельно по группам представлено в таблице 1.

1. Род *Blautia*

При потреблении одинаково количества углеводов в день (менее 200 гр.), представленность *Blautia* достоверно выше у пациентов с СД2 по сравнению со здоровыми ($p=0,0004$). Его представленность также остается доминирующей у всех пациентов с нарушениями углеводного обмена (преСД2 + СД2) при потреблении менее 200 гр. углеводов по сравнению со здоровыми, потреблявшим более 200 гр. в день ($p=0,005$).

2. Род *Serratia*

С количеством потребления калорий и углеводов в день ассоциирован также род *Serratia*. Обнаружено, что при потреблении одинаково количества углеводов (более 200 гр., $p=0,003$)

После стратифицировании выборок по рациону питания обнаружено, что с нарушениями углеводного обмена из всей представленности бактерий, ассоциированы рода *Blautia* и *Serratia*, также отдел *Verrucomicrobia*.

Представленность рода *Blautia* выше в метагеномах пациентов с СД2, потреблявших менее 100 гр. жиров в день по сравнению со здоровыми, потреблявших более 100 гр. ($p=0,0008$).

Таким образом, высокая представленность рода *Blautia* ассоциирована с нарушениями углеводного обмена, даже при потреблении меньшего количества углеводов и жиров по сравнению со здоровыми.

3. Отдел *Verrucomicrobia*

Отдел *Verrucomicrobia* в составе образцов представлен в меньшей степени, но он также ассоциирован с нарушениями углеводного обмена. При анализе пищевого рациона только здоровых обнаружено, что его представленность возрастала с увеличением количества потребляемого жиров ($p=0,0001$) и калорий ($p=0,001$). Его представленность оставалась высокой у здоровых по сравнению с пациентами с нарушенным углеводным обменом при потреблении как одинакового (более 2000 ккал,

и калорий (более 2000 ккал, $p=0,002$) представленность его выше в метагеномах пациентов с нарушениями углеводного обмена по сравнению со здоровыми.

$p=0,0005$), так и различного (здоровые более 2000, пациенты с нарушенным углеводным обменом менее 2000 ккал, $p=0,008$) количества калорий в день.

Интересно, что количество *Verrucomicrobia* оказался выше и у здоровых лиц в возрасте старше 60 по сравнению с пациентами с нарушениями углеводного обмена в возрасте до 60 лет ($p=0,0005$). Таким образом, сниженное количество представленности отдела *Verrucomicrobia* ассоциировано с нарушениями углеводного обмена.

Таксономическая кластеризация микробиоты кишечника

Кластерный анализ образцов был основан на кластеризации по k -средним. В результате весь метагеном образцов был разделен только на 2 кластера (фекотипа или энтеротипа): 52 образца в первом кластере и 40 – во втором (рисунок 7). Однако средняя силуэтная величина разделения составила 0,22, что указывает на сложность однозначного разделения на фекотипы. Несмотря на это, условно выделенные фекотипы достоверно различались по представленности 9 бактериальных родов. В первом фекотипе доминировали представители бактерий таких родов как: *Prevotella*, *Oscillospira*, *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*, *Parabacteroides*, а во втором – *Ruminococcus*, *Peptoniphilus*, *Thiothrix*, *Legionella* ($p<0,004$).

Различий по полу и возрасту пациентов в фекотипах не было обнаружено, однако выявлена высокая встречаемость пациентов с СД2 во втором фекотипе (32,5% против 13,5% в первом, $p=0,016$). При этом, во втором фекотипе индекс альфа-разнообразия (индекс Шэннона) ($p=8.089e-05$) и представленность ферментов, которые преобразуют бутирил-коА в короткоцепочечную жирную кислоту – бутират, были значительно меньше, чем в первом фекотипе. Во втором фекотипе по сравнению с первым, значительно меньше был представлен также процент путей синтеза витаминов В9, В2, В6 и К, а процент путей синтеза витамина В12, наоборот, – больше.

Бактерии, ассоциированные с хроническим субклиническим воспалением (вЧС-РБ, ИЛ-6) и нарушениями углеводного обмена

Из всей представленности бактерий исследуемой выборки с уровнем вЧС-РБ положительно ассоциировались рода *Serratia* ($p=0,0001$) и *Paraprevotella* ($p=0,002$). *Paraprevotella* положительно ассоциировалась также с ИЛ-6 ($p=0,008$).

В целом ассоциации между представленностью родов микробиоты кишечника и маркерами

хронического субклинического воспаления у пациентов с пре- и СД2 не выявлены. Однако при анализе только в группе пациентов с уровнем ИЛ-6 <10 пг/мл обнаружено, что представленность рода *Serratia* выше у пациентов с нарушенным углеводным обменом по сравнению со здоровыми ($p=0,0002$).

Обсуждение

Предпосылкой к изучению взаимосвязи между МК и различными заболеваниями, в том числе и с метаболическими нарушениями, стало развитие технологий высокопроизводительного секвенирования. С позиций сегодняшнего дня известно, что МК может вносить огромный вклад в патогенез СД2. Растет интерес к точкам воздействия на МК с целью коррекции метаболических нарушений, в том числе интерес к фекальной трансплантации. Однако необходимо отметить, что понимание нормы и патологии остается по сей день дискуссионным вопросом. Целью настоящего исследования стал поиск взаимосвязей между углеводным обменом и составом МК. Результаты нашего исследования во многом пересекаются с работами зарубежных авторов, однако есть и результаты, отличающиеся от литературных. В образцах наших пациентов преобладали представители двух типов бактерий – Firmicutes и Bacteroidetes, что признано является основой состава МК человека [14]. Соотношение этих типов может меняться под воздействием различных внешних факторов (образ жизни и питания, прием антибиотиков и т.д.), с чем и связывают его неодинаковость у людей из различных регионов. Следовательно, не всегда результаты исследований можно экстраполировать на жителей других стран и регионов. На сегодняшний день наиболее полные работы по выявлению метагеномных маркеров у пациентов с СД2 сделаны в Китае [18] и Швеции [27]. Понимая, что помимо инфекционных и хронических заболеваний, практически любая проводимая терапия может повлиять на состав МК, мы включили в исследование «чистую» выборку – пациентов без хронических заболеваний (кроме впервые выявленного нарушения углеводного обмена с длительностью заболевания не более 12 месяцев после установки диагноза) и не принимающих какие-либо лекарственных препараты, способных повлиять на достоверность результатов. В опубликованных зарубежных исследованиях мало информации о принимаемых пациентами препаратах, что затрудняет их анализ и оценку выводов. Например, в шведском исследовании показано, что пациенты, получавшие метформин, имели повышенный уровень Enterobacteriaceae и низкий – Clostridium и Eubacterium [27].

По литературным данным самыми представленными бактериальными родами в метагеномах кала являются Bacteroides, Prevotella или некоторые представители филума Firmicutes, например, Faecalibacterium или Ruminococcus [28]. В среднем 50% всего состава наших образцов пришлось на 5 родов: Blautia, Bacteroides, Prevotella, Faecalibacterium, Clostridium. Другой отличительной чертой нашего исследования можно считать богатое разнообразие состава микробиоты у всех пациентов ($3,71 \pm 0,56$) по сравнению с данными Turnbaugh и соавт. ($2,46 \pm 0,29$) [26], где также применялся метод 16S рРНК секвенирования кала, но взятого у здоровых людей. Богатое разнообразие указывает на стабильность и устойчивость МК к внешним воздействиям, также на относительное

«благополучие» в кишечнике. Необходимо отметить, что ни шведское, ни китайское исследование не подтвердили связь СД2 с более низким разнообразием МК, в отличие от исследований, где оно было связано с ожирением [29]. Мы не выявили различий по разнообразию состава между здоровыми и пациентами с нарушениями углеводного обмена, между пациентами с ожирением и без него, также между пациентами разных возрастных групп.

В нашем исследовании численность бактерий типа Firmicutes оказалось больше ($57,09 \pm 13,6\%$) по сравнению с Bacteroidetes ($12,7 \pm 9,86\%$). По литературным данным соотношение Firmicutes/Bacteroidetes выше у людей с метаболическим синдромом и пациентов с СД2 [30], что подтвердилось и в нашем исследовании. Количество бактерий типа Bacteroidetes оказалось достоверно выше, а Firmicutes – ниже у лиц без нарушений углеводного обмена. Известно, что бутират-продуцирующие бактерии конкурируют с грамотрицательными, сохраняют равновесие состава МК, тормозят рост и размножение патогенных штаммов, которые в большинстве своем обладают протеолитическим метаболизмом. Несмотря на то, что основными продуцентами бутирата являются представители Firmicutes, ассоциацию бактерий из типа Firmicutes с СД2 можно объяснить тем, что не все представители данного типа продуцируют бутират. Некоторые зарубежные авторы указывают на связь ожирения и нарушений метаболизма глюкозы с уменьшением представленности Bacteroidetes и увеличением Firmicutes [31,32]. У наших пациентов, в чьих метагеномах доминировали представители Firmicutes, включающего род Blautia, достоверно чаще встречался СД2. Род Blautia, в частности Blautia coccoides, оказался самым представленным в исследуемой выборке, и только он из всего типа Firmicutes достоверно ассоциировался со многими метаболическими нарушениями. Обнаружено увеличение значимости связи Blautia с нарушениями углеводного обмена в клиническом ряду норма-предиабет-СД2 при наличии абдоминального ожирения у пациентов ($p=0,003$). Blautia coccoides не продуцирует бутират и гидролизует некоторые олигосахариды, моносахариды (которые практически не доходят до толстой кишки), но не ферментирует сложные углеводы [33]. Род Blautia относится к классу Clostridia, крупнейшему из Firmicutes. После филогенетического анализа Clostridium coccoides были переименованы в Blautia coccoides [34]. По данным Tuovinen и соавт. [35], Blautia, особенно Blautia coccoides активируют секрецию фактора некроза опухоли альфа и цитокинов, особенно ИЛ-8, в большей степени, чем эндотоксин грамотрицательных бактерий – липополисахарид. Однако в ряде исследований обсуждается роль группы Eubacterium rectale-Blautia coccoides как группы, оказывающей положительное влияние на метаболизм, ферментирующей олигосахариды и продуцирующей бутират [36, 37]. По всей видимости, эти функции в большей степени выполняют Eubacterium rectale, т.к. Blautia coccoides не продуцирует бутират и, как

ранее было указано, не ферментирует крахмальные углеводы. Таким образом, можно сделать предположение, что наблюдаемая картина в отношении бактерий типа Firmicutes обусловлена высоким содержанием рода Blautia, поскольку в этом типе множество и потенциально «положительных» бактерий, но представленных в существенно меньшем количестве – лактобактерий, или, например, род Oscillospira, который по нашим данным оказался в обратной взаимосвязи с абдоминальным ожирением [38].

В нашем исследовании с нарушением углеводного обмена прямая связь была обнаружена также для бактерий рода Serratia. По литературным данным количество бактерий семейства Enterobacteriaceae, к которому принадлежит род Serratia, существенно выше у пациентов с СД2 и ожирением [39]. Кроме того, за последнее время были описаны случаи развития у пациентов с СД2 тяжелых инфекций, вызванных именно бактериями Serratia [40, 41]. Данная ассоциация объясняется тем, что Serratia относится к грамотрицательным факультативным анаэробам, является условно-патогенным и может инициировать эндотоксемию за счет содержания эндотоксина [42]. Концентрацию эндотоксина в данном исследовании мы не определяли, однако обнаружили связь между провоспалительным ИЛ-6 и острофазным вЧС-РБ именно с грамотрицательными бактериями. Из всей представленности бактерий исследуемой выборки с уровнем вЧСР-Б положительная ассоциация была выявлена для Serratia и Paraprevotella, а с ИЛ-6 – для Paraprevotella.

Несмотря на то, что высококалорийное и высокоуглеводное питание может влиять на метаболизм глюкозы, по нашим данным высокая представленность рода Blautia ассоциировалась с нарушением

углеводного обмена, даже при потреблении незначительного количества углеводов и жиров, а род Serratia – при потреблении одинаково количества углеводов и калорий по сравнению со здоровыми пациентами. Независимо от калорийности принимаемой пищи, с нарушенным углеводным обменом ассоциировалась низкая представленность бактерий из отдела Verrucomicrobia. Количество Verrucomicrobia также оказалось выше и у здоровых лиц в возрасте старше 60 по сравнению с пациентами с нарушениями углеводного обмена в возрасте до 60 лет. Есть данные, что с активностью L-клеток кишечника, секретирующих глюкагон-подобный пептид-1, связаны бактерии Akkermansia muciniphila из отдела Verrucomicrobia, которые составляют всего 3–5% общей численности МК. Они образуют тесное симбиотическое сообщество с клетками, выстилающими внутреннюю поверхность кишечника, укрепляют кишечный барьер, уменьшая его проницаемость [43, 44].

Кластерный анализ метагенома кала мы провели по алгоритму, которым были выделены энтеротипы в работе Agumugam и соавт. (консорциума Metahit) [13]. Несмотря на отсутствие высокодостоверной таксономической кластеризации, мы получили различия в кластерах (феко-типах) по метаболической активности бактерий, индексу альфа-разнообразия и встречаемости СД2. Необходимо отметить, что встречаемость СД2 была выше в кластере, где индекс альфа-разнообразия и представленность ферментов, преобразующих бутирил-коА в бутират, были меньше. Как было уже сказано, высокое разнообразие состава и синтез бутирата характеризуют микробиоту как потенциально более «здоровую» и устойчивую к внешнему воздействию.

Заключение

Какими бы убедительными и привлекательными не были гипотезы, объясняющие развитие ожирения, СД2 под влиянием определенных бактерий, какими бы специфическими не оказались маркеры заболеваний на таксономическом и функциональном уровне, все-таки существуют ограничения (технические, количество пациентов, прием препаратов, расовые различия и т.д.), которые являются причиной противоречивых результатов исследований. Для исключения влияния внешних факторов, наше исследование было тщательно запланировано. В отличие от литературных, особенностью наших данных оказалась повышенная представленность бактерий типа Firmicutes и рода Blautia. Род Blautia, в частности Blautia coxoides, оказался самым представленным в исследуемой выборке, и только он из всего типа Firmicutes достоверно ассоциировался с нарушениями углеводного обмена. Такие же ассоциации были выявлены для рода Serratia из условно-патогенных бактерий. Мы не обнаружили

различий по разнообразию состава МК между здоровыми и пациентами с нарушениями углеводного обмена, ожирением, между разными возрастными группами. Провоспалительные маркеры были ассоциированы с грамотрицательными бактериями, что согласуется с литературными данными. После разделения метагенома на феко-типы, несмотря на невысокое значение средней силуэтной величины, получены различия в энтеротипах по метаболической активности бактерий, индексу альфа-разнообразия и встречаемости СД2.

Таким образом, наше исследование дает дополнительные свидетельства о наличии взаимосвязей между составом микробиоты кишечника и углеводным обменом. Представляются интересными проведение больших проспективных клинических исследований, оценивающих эффекты различных сахароснижающих препаратов на состав микробиоты кишечника у пациентов с СД2, в том числе и в российской популяции.

Литература | References

1. Buse JB. Progressive use medical therapies in Type 2 diabetes. *Diabetes spectrum*. 2000; Vol 13, no 4, pp. 211–228
2. Atlas Diabetes 8th Edition, Brussels. International Diabetes Federation. 2017. Available at: <https://diabetesatlas.org/>
3. American Diabetes Association. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2012. *Diabetes Care* 2013; Vol 36, no 4, pp. 1033–1046. Doi: 10.2337/dc12–2625.
4. Grarup N, Sandholt C, Hansen T & Pedersen O. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: from genome-wide association studies to rare variants and beyond. *Diabetologia* 2014. Vol. 57. pp. 1528–1541. Doi: 10.1007/s00125–014–3270–4.
5. Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, et al. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008. Vol. 359: pp. 2220–2232, doi: 10.1056/NEJMoa0801869
6. Blottiere H, de Vos W, Ehrlich S, et al. Human intestinal metagenomics: state of the art and future. *Curr Opin Microbiol*. 2013; Vol 16, no 3, pp. 232–9. Doi: 10.1016/j.mib.2013.06.006.
7. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010, Vol. 464: pp. 59–65. doi: 10.1038/nature08821.
8. Zoetendal E, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*. 2008; Vol 57, no 11, pp. 1605–1615. doi: 10.1136/gut.2007.133603.
9. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT. Characterization of bacterial communities in faeces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using realtime PCR and effects of antibiotic treatment on the faecal microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 2004; Vol 70, no 6, pp. 3575–358135
10. LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013. Vol 24, no 2, pp. 160–168. doi: 10.1016/j.copbio.2012.08.005.
11. Gibson Glenn R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements*. 2004. Vol 1, no 2, pp. 25–31
12. Sears Cynthia L. A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe*. 2005. Vol 11, no 5, pp. 247–251
13. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011. Vol. 473, no 7346. pp. 174–80. Doi: 10.1038/nature09944.
14. Eckburg P, Bik E, Bernstein C. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; Vol. 308: pp. 16358
15. Ley R. E., Peterson D. A., Gordon J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006. Vol. 124, no 4. pp. 837–848
16. Vipperla K., O'Keefe S. J. The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. *NCP*. 2012. Vol. 27. pp. 624–635. Doi: 10.1177/0884533612452012
17. Karlsson F.H. et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat. comm*. 2012. Vol. 3. pp. 1245. Doi: 10.1038 / ncomms2266.
18. Qin J. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012. Vol. 490. pp. 55–60, Doi:10.1038/nature11450.
19. Furlow B. Gut microbe composition and metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013. Vol. 1. pp. 4–5. Doi: 10.1016 / S2213–8587(13)70128–1.
20. Wu X. et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Current microbiology*. 2010. vol 61. pp. 69–78. Doi: 10.1007/s00284–010–9582–9
21. L.Egshatyan, D. Kashtanova, A. Popenko, O. Tkacheva, et al. Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance. *Endocrine Connections*. 2016. vol 5, no 1. pp. 1–9. DOI:10.1530/EC-15–0094
22. Caporaso J.G., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010. Vol 7, no 5, pp. 335–336. Doi: 10.1038/nmeth.f.303.
23. http://greengenes.secondgenome.com/downloads/database/13_5
24. Ian Marschner. 2014. glm2: Fitting Generalized Linear Models. R package version 1.1.2
25. Lozupone C., Hamady M., Knight R. UniFrac – An Online Tool for Comparing Microbial Community Diversity in a Phylogenetic Context. *BMC Bioinformatics*. 2006. Vol. 7. pp. 371
26. Turnbaugh P, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel B, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009. vol 457, pp. 480–484. doi: 10.1038 / nature07540.
27. Karlsson F, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 2013. Vol. 498. pp. 99–103. doi: 10.1038/nature12198.
28. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012. vol 486, no 7402, pp. 207–214. doi: 10.1038/nature11234.
29. Le C, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013. Vol. 500. pp. 541–546. doi:10.1038/nature12506.
30. Remely M., Aumueller E., Jahn D., Hippe B. Microbiota and epigenetic regulation of inflammatory mediators in type 2 diabetes and obesity // *Benef Microbes*. 2014. Vol. 5, no 1. pp. 33–43. doi: 10.3920/BM2013.006
31. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S & Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006. Vol. 444. P. 1022–1023. doi:10.1038/4441022a.
32. Turnbaugh P, Ley R, Mahowald M, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006. Vol. 444. pp. 1027–1031.
33. Rampelli S, Candela M, Turroni S. Et al. Functional metagenomic profiling of intestinal microbiome in extreme ageing. *Aging*. 2013. vol 5, no 12, pp. 902–912
34. Liu C, Finegold, S.M., Song, Y. Lawson P.A. Reclassification of *Clostridium coccooides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccooides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008. Vol 58, no 8, pp. 1896–902. doi: 10.1099 / ijs.0.65208–0
35. Tuovinen E; Joni Keto; Janne Nikkila; Jaana Matto; et al. Cytokine response of human mononuclear cells induced by intestinal *Clostridium* species. *Anaerobe*, 2013. Vol. 19: pp. 70–6. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.11.002
36. Barcenilla, A., Pryde SE, Martin JC, Duncan SH et al. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol*, 2000. vol 66, no 4, pp. 1654–61.

37. *Simunek J, Brandysova V, Koppova I, Simunek J Jr.* The antimicrobial action of chitosan, low molar mass chitosan, and chitooligosaccharides on human colonic bacteria. *Folia Microbiol*, 2012. Vol 57, no 4: pp. 341–5. doi: 10.1007/s12223-012-0138-1.
38. *Egshatyan L.V., Tkacheva O. N., Alexeev D. G., et al.* Osobennosti mikrobioty` kishechnika u pacientov s razlichnoj massoj tela. [A Gut Microbiota Composition in Patients with Different Body Weight]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya ximioterapiya – Clinical Microbiology and antimicrobial chemotherapy*, 2016. Vol 18, no 3. pp. 212–225.
39. *Lambeth S. M., Carson T., Lowe J., et al.* Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *J Diabetes Obes*. 2015. Vol. 2, no 3. pp. 1–7. doi: 10.15436/2376-0949.15.031
40. *Hadid H., Usman M., Thapa S.* Severe Osteomyelitis and Septic Arthritis due to *Serratia marcescens* in an Immunocompetent Patient. *Case Rep Infect Dis*. 2015. Vol. 2015. P e347652. doi.org/10.1155/2015/347652
41. *Hawkey S., Choy A.* *Serratia marcescens*: A Rare Cause of Recurrent Implantable Cardioverter Defibrillator Site Infection // *Case Rep Cardiol*. 2015. Vol. 2015. pp. e641297. doi.org/10.1155/2015/641297
42. *Guentzel MN.* *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. *Medical Microbiology* 4th edition, S. Baron, Editor. 1996: Galveston.
43. *Belzer C, de Vos WM.* Microbes inside – from diversity to function: The case of Akkermansia. *ISME J*. 2012. Vol 6, no 8, pp. 1449–1458. doi: 10.1038/ismej.2012.6.
44. *Cani PD, S Possemiers, T Van de Wiele, et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009. Vol 58, no 8, pp. 1091–1103 doi: 10.1136/gut.2008.165886

К статье

«Маркерные» изменения состава микробиоты кишечника у пациентов с нарушениями углеводного обмена (стр. 51–60)

To article

“Marker” changes in the composition of gut microbiota in patients with disorders of carbohydrate metabolism (p. 51–60)

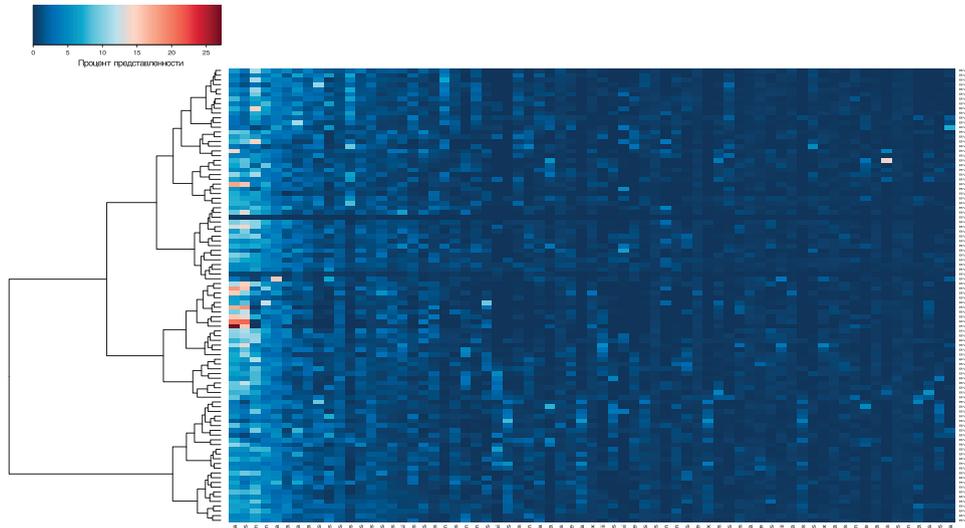


Рисунок 1. Тепловая карта относительной представленности операционной таксономической единицы в образцах (в процентах, составляющих 85% суммарной представленности).

Figure 1. Heat map of the relative representation of the operational taxonomic unit in samples (percentages representing 85% of the total representation).

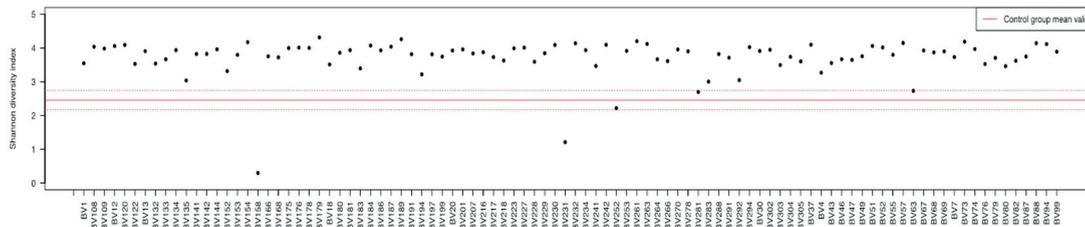


Рисунок 2. Разнообразие микробиоты кишечника по индексу альфа-разнообразия в сравнении данными P. Turnbaugh и соавт.

Figure 2. The richness of the gut microbiome: alpha diversity index.

Примечание:

* красная линия среднее альфа-разнообразие ± стандартное отклонение для образцов из исследования Turnbaugh и соавт. [26], черные точки – для образцов нашего исследования.

Note:

* The line shows the average alpha diversity ± standard deviation for the Turnbaugh et al. study samples [26]. The black circle – samples in our study



Рисунок 3.

График многомерного шкалирования образцов пациентов.

Примечание:

* указаны рода, на которых приходится 50% представленности. Чем ближе образец к роду, тем больше содержание этого рода в данном образце.

Figure 3.

Samples multidimensional scaling chart.

Note:

* the genera, which account for 50% of the representation, are shown. The closer the sample to the genus, the more the representation of this genus is in the sample.

