

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биологии гена Российской академии наук**

На правах рукописи

Клименко Наталья Сергеевна

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

1.5.8. – математическая биология, биоинформатика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель  
кандидат биологических наук  
Тягт Александр Викторович

Москва – 2023

# Оглавление

<b>Введение</b>	<b>5</b>
Актуальность темы	5
Степень разработанности темы	6
Цели и задачи исследования	6
Научная новизна и практическая значимость работы	7
Выносимые на защиту положения	8
Апробация работы и публикации по теме диссертации	9
Личный вклад автора	9
Структура и объем диссертации	10
<b>Глава 1. Обзор литературы</b>	<b>11</b>
1.1 Микробные сообщества	11
1.2 Кишечные микробные сообщества	11
1.2.1 Основные представители кишечных микробных сообществ	12
1.2.1.1 Отдел Firmicutes	12
1.2.1.2 Отдел Actinobacteria	13
1.2.1.3 Отдел Bacteroidetes	14
1.2.1.4 Отдел Verrucomicrobia	15
1.2.1.5 Царство Archaea	15
1.2.1.6 Отдел Proteobacteria	15
1.2.2 Стратегии выживания в кишечном микробном сообществе	17
1.2.3 Межиндивидуальная вариация состава микробиоты: энтеротипы	18
1.2.4 Внутрииндивидуальная вариация состава микробиоты	19
1.3 Микробиота и здоровье хозяина	22
1.3.1 Механизмы влияния кишечной микробиоты на организм хозяина	22
1.3.1.1 Короткоцепочечные жирные кислоты	24
1.3.1.2 Другие вещества, вырабатываемые кишечными бактериями: антимикробные пептиды, производные аминокислот, ТМА	25
1.3.1.3 Взаимодействие кишечного сообщества и эндокринной системы	26
1.3.1.4 Взаимодействие кишечного сообщества и иммунной системы	27
1.3.2 Потенциальные микробиотные биомаркеры здоровья	30
1.4 Модуляция состава микробиоты	31
1.4.1 Факторы, влияющие на состав микробиоты	31
1.4.2 Связь кишечной микробиоты и питания	35
1.4.2.1 Белки	37
1.4.2.2 Жиры	37
1.4.2.3 Углеводы	38
1.4.2.4 Другие питательные вещества	40

1.4.2.5 Утилизация водорода	41
1.4.3 Влияние на состав микробного сообщества бактерий извне; пробиотики	41
1.4.4 Пересадка микробиоты	42
1.4.5 Степень изменения микробиоты в ответ на интервенции	43
1.5 Методы анализа микробиоты кишечника	47
<b>Глава 2. Межиндивидуальная вариабельность состава микробиоты городского населения и ее связь с рационом и другими характеристиками</b>	<b>50</b>
2.1 Методы	50
2.1.1 Описание исследуемых групп	50
2.1.2 Сбор и подготовка образцов микробиоты	50
2.1.3 Определение таксономического состава образцов	51
2.1.4 Статистический анализ	52
2.2 Результаты	54
2.2.1 Анализ таксономического состава микробиоты участников исследования	54
2.2.2 Сопредставленные группы бактерий в исследуемых группах	55
Ассоциации между составом микробиоты, антропометрическими факторами, долговременным рационом питания и характеристиками стула	57
2.3 Обсуждение	62
<b>Глава 3. Влияние кратковременных диетических интервенций на состав микробиоты</b>	<b>66</b>
3.1 Методы	66
3.1.1 Описание исследуемых групп	66
3.1.2 Статистический анализ	67
3.2 Результаты	68
3.2.1 Вариабельность состава кишечной микробиоты	68
3.2.2 Влияние диеты, богатой волокнами	70
3.2.3 Влияние приема обогащенного кисломолочного продукта	74
3.3 Обсуждение	77
<b>Глава 4. Вариабельность ответа микробного сообщества на диетическое вмешательство</b>	<b>80</b>
4.1 Методы	80
4.1.1 Поиск ассоциаций между степенью изменения микробиоты и факторами метаданных измеренными в первой временной точке	80
4.1.2 Поиск ассоциаций между степенью изменения микробиоты и микробиотными параметрами в первой временной точке	80
4.1.3 Построение модели предсказывающей степень изменения микробиома по его составу в первой временной точке	81
4.1.4 Оценка потенциала изменения микробиома	83
4.1.5 Валидация зависимостей между потенциалом изменения микробиома и микробиотными параметрами на независимой когорте	84
4.2 Результаты	86
4.2.1 Вариабельность изменений состава микробного сообщества в результате диетических	

интервенций	86
4.2.2 Потенциал изменения микробиома и его зависимость от состава микробиома	90
4.2.3 Валидация закономерностей между потенциалом изменения микробиома и его составом на независимой когорте	94
4.3 Обсуждение	101
<b>Выводы</b>	<b>103</b>
Список используемых обозначений и сокращений	103
Список использованной литературы	105
<b>Приложения</b>	<b>126</b>

# Введение

## Актуальность темы

Организм человека находится в тесной связи с населяющими его микробными сообществами. При этом кишечное микробное сообщество примечательно тем, что принимает непосредственное участие в усвоении человеком питательных веществ и оказывает существенное влияние на работу различных систем органов. Для ряда заболеваний – таких, как сердечно-сосудистые заболевания [1,2], ожирение [3,4], онкологические [5,6] и аллергические [7] заболевания – обнаружены ассоциации со специфическими изменениями в составе микробиома.

Среди всех микробных сообществ, населяющих тело человека, микробиота толстого кишечника уникальна относительной устойчивостью своего видового состава во времени, и в то же время способностью существенно меняться при воздействии определенных факторов, в частности, при изменении питания. Анализ временных серий образцов микробиоты от отдельных индивидов показал, что в целом межиндивидуальная вариабельность состава микробиоты превышает внутрииндивидуальную вариабельность во времени [8]. При этом кратковременные изменения рациона, прием лекарственных средств и пробиотических продуктов, а также заболевания могут приводить к существенным изменениям состава микробиоты в достаточно короткие сроки [8]. Для отдельных интервенций продемонстрирован их воспроизводимый и устойчивый эффект на состав микробиома. Между тем, накапливается все больше свидетельств того, что степень изменения микробиома в ответ на определенную интервенцию существенно варьирует от индивида к индивиду [9–11]. Данные наблюдения имели место для различных типов диетических интервенций, таких как прием пробиотиков и пребиотиков, употребление определенных продуктов и изменение характера питания в целом [12–14]. На настоящий момент неизвестны биологические механизмы, которые определяют межиндивидуальную вариабельность ответа на интервенцию. Понимание их позволило бы не только углубить существующие знания об экологии кишечного микробиома, но и прогнозировать эффективность той или иной интервенции для конкретного индивида [11,15,16]. Таким образом, исследование межиндивидуальной вариабельности изменений состава кишечной микробиоты является важной и перспективной темой для изучения, как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

## **Степень разработанности темы**

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

## **Цели и задачи исследования**

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

### **Задачи**

- 1) Оценить состав и корреляционную структуру кишечной микробиоты городского населения в двух независимых группах;
- 2) Проанализировать ассоциации между составом кишечной микробиоты и значениями внутренних и внешних факторов - рационом питания и антропометрическими данными участников, а также копрологическими параметрами образцов микробиоты;
- 3) Выявить изменения состава микробиоты в результате двух диетических интервенций - приема обогащенного кисломолочного продукта и следования диете, богатой пищевыми волокнами;

- 4) Оценить межиндивидуальную вариабельность изменения состава микробиоты при каждой из исследуемых интервенций;
- 5) Проанализировать зависимость степени изменения состава микробиоты от ее изначального состава и значений других факторов на момент начала интервенции;
- 6) Сопоставить найденные признаки, ассоциированные с высокой степенью изменения, между двумя интервенциями;
- 7) В случае обнаружения универсальных признаков, ассоциированных со степенью изменения микробиоты независимо от типа интервенции, валидировать их используя внешние данные;
- 8) Проанализировать возможность прогнозирования степени изменения микробиома по его составу непосредственно перед интервенцией.

## **Научная новизна и практическая значимость работы**

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

Впервые была предложена модель, позволяющая с использованием метода машинного обучения по составу микробиома в первой временной точке оценить степень его изменения в результате интервенции. Было оценено качество работы модели и определены микробные таксоны, которые вносят наибольший вклад в предсказание и воспроизводятся при кросс-валидации для каждой из интервенций.

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

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

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

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

### **Выносимые на защиту положения**

- 1) Степень изменения микробиоты кишечника человека в результате краткосрочных диетических интервенций превышает внутрииндивидуальную вариацию в отсутствие изменения рациона, но не превышает межиндивидуальную вариацию.
- 2) Степень изменения микробиома кишечника человека в результате краткосрочных диетических интервенций зависит от изначального состава микробиома.
- 3) Существуют микробиомные признаки, определяющие степень изменения сообщества, общие между интервенциями различного типа.
- 4) Степень изменения микробиома в результате краткосрочных диетических интервенций прямо коррелирует с отношением *Bacteroidetes:Firmicutes* (B:F) сообщества до интервенции.
- 5) Степень изменения микробиома в ходе диетических интервенций обратно коррелирует со средним взвешенным предсказанным количеством генов на микроорганизм в сообществе до интервенции.
- 6) Степень изменения микробного сообщества, рассчитанная с использованием мер бета-разнообразия, имеет вычислительную зависимость от значения альфа разнообразия данного сообщества.
- 7) Разработан и валидирован способ предварительной оценки степени изменения микробиома по его составу путем оценки расстояния до множества других образцов крупной выборки, содержащей по одному образцу микробиоты на индивида.



## **Апробация работы и публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах. Результаты работы были представлены на международной конференции Nutrients (Барселона, 2019) и международном конгрессе “Биотехнология: состояние и перспективы развития” (Москва, 2019).

Статьи в рецензируемых научных журналах:

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

Тезисы конференций:

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

## **Личный вклад автора**

Автор диссертации внесла значительный вклад в проведение изложенных ниже исследований. Основной объем биоинформатической работы был выполнен ею самостоятельно: первичный анализ микробиомных данных секвенирования, работа с публичными базами данных, а также статистический анализ микробиомных данных (а именно определение сопредставленных групп

бактерий, анализ ассоциаций между составом микробиома и различными факторами, анализ изменений состава микробиома). Также автором был самостоятельно разработан подход к предсказанию степени изменений на основе изначального состава микробиоты. Автор принимала непосредственное участие в планировании экспериментов, обсуждении результатов и написании научных публикаций по результатам. Интерпретация результатов была выполнена совместно с коллабораторами. Коллабораторами были выполнены организация исследования (набор участников, подготовка метаданных, контроль за ходом исследования), сбор биоматериала и экспериментальная работа с ним вплоть до получения данных секвенирования.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 138 страницах. Она состоит из 4 глав: “Обзор литературы”, “Межиндивидуальная вариабельность состава микробиоты городского населения и ее связь с рационом питания и другими характеристиками”, “Влияние кратковременных диетических интервенций на состав микробиоты”, “Вариабельность ответа микробного сообщества на диетическое вмешательство”. Работа содержит 33 рисунка и 6 таблиц. Приложение содержит 2 таблицы.

# **Глава 1. Обзор литературы**

## **1.1 Микробные сообщества**

Микробиотой называется сообщество микроорганизмов, которые делят определенную нишу. Между участниками сообщества образуются сложные метаболические связи, позволяющие им эффективно утилизировать питательные вещества, присутствующие в среде их обитания. Термин “микробиота” подразумевает под собой все микроскопические организмы рассматриваемой ниши: бактерии, археи, грибы и простейшие. Однако данная работа фокусируется на изучении роли бактерий и архей в микробном сообществе. Микробные сообщества высших животных играют важнейшую роль в работе организма хозяина: участвуют в формировании и регуляции активности иммунной системы, являются звеньями пищеварительной системы, а также защищают организм хозяина от инфекций. В рамках нескольких крупных проектов (таких как Human Microbiome Project [17]) в последние годы активно изучается микробиота, обитающая на различных частях тела человека: микробиота кожи, кишечника, ротовой полости, органов слуха, мочеполовой системы. Каждый орган характеризуется собственными типичными представителями и структурой сообщества, его временной динамикой и механизмами влияния на организм хозяина. Одним из наиболее разнообразных и значимых для здоровья человека микробных сообществ является кишечная микробиота.

## **1.2 Кишечные микробные сообщества**

По имеющимся на сегодняшний день данным, кишечное микробное сообщество человека насчитывает порядка 1000 видов микроорганизмов [18,19]. При этом кишечная микробиота значительно расширяет возможности пищеварительной системы хозяина. К примеру, в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) организма человека вырабатывается около 17 ферментов, расщепляющих углеводы, в то время как кишечная микробиота увеличивает их число до 200 [20]. Одна из важнейших функций микробиоты для организма хозяина - участие в метаболизме поступающих питательных веществ. Микробиота также задействована в таких важных процессах, как регуляция работы иммунной, гормональной и нервной систем, синтез витаминов и

короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), биотрансформация ксенобиотиков [21] и защита от патогенов [22].

### 1.2.1 Основные представители кишечных микробных сообществ

В норме кишечная микробиота в основном представлена облигатными анаэробами, количество клеток которых на 2-3 порядка превышает представленность факультативных анаэробов [23]. Подавляющая часть микробов кишечного сообщества относится к одному из трех отделов: *Firmicutes* (64%), *Actinobacteria* (22%) и *Bacteroidetes* (8%) (данные по выборке 1135 человек из [24]). Чуть в меньших количествах встречаются представители *Verrucomicrobia* (3%), а также *Archaea* (2%) и *Proteobacteria* (1%) [24]. Представители других отделов (к примеру, *Synergistes*), встречаются редко и при этом составляют не более 0.1% здорового микробиома. Фенотипы кишечных микроорганизмов очень сильно варьируют внутри отделов, например, один отдел может включать одновременно комменсальные и патогенные виды, однако каждому отделу можно дать обобщенную характеристику.

#### 1.2.1.1 Отдел *Firmicutes*

В целом, представителей отдела *Firmicutes* можно охарактеризовать как бактерий-специалистов, имеющих сравнительно небольшие геномы. В данную группу входят, как бактерии устойчивые к кислороду, так и облигатные анаэробы. Среди анаэробов примечательны две наиболее значимые группы производителей масляной кислоты в кишечнике человека - *Eubacterium rectale/Roseburia* и *Faecalibacterium prausnitzii* [25]. Масляная кислота является одной из короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), вырабатываемых микробиотой кишечника человека, и при этом одним из важнейших веществ необходимых для его здоровья (см. раздел Механизмы влияния кишечной микробиоты на метаболизм хозяина). В тесной связи с производителями масляной кислоты находятся бактерии, которые осуществляют первичное расщепление растительных полисахаридов. Они предоставляют субстрат, который в дальнейшем используется для производства масляной кислоты. Среди *Firmicutes* первичное расщепление полисахаридов могут осуществлять некоторые виды *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Roseburia* [26]. Кроме того, масляная кислота может быть произведена из лактата такими *Firmicutes*, как *Eubacterium* и *Anaerostipes* [27]. В таком случае, субстрат для них получается в результате метаболизма лактозы, например, бактериями *Lactobacillus* и *Streptococcus*, которые также относятся к *Firmicutes*, или представителями других

отделов, такими, как *Bifidobacterium* из отдела *Actinobacteria*. Большинство *Firmicutes* устойчивы к низким значениям pH. Благодаря этому производство масляной и других КЖК, приводящих к закислению среды, в свою очередь способствует последующему размножению *Firmicutes* [20,25,28]. В целом высокая представленность производителей масляной кислоты в кишечнике человека является одним из показателей здоровой микробиоты.

К отряду *Firmicutes* также относятся виды, к которым принадлежат многие из известных пробиотических штаммов - микроорганизмов, способных оказывать благотворное влияние на здоровье человека при поступлении извне. Наиболее широко известны различные виды рода *Lactobacillus*: *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei* и другие [29]. Было показано, что прием пробиотиков из рода *Lactobacillus* способствует улучшению состояния здоровья при пищевых аллергиях [30], атопическом дерматите [31] воспалительных заболеваниях кишечника [32] и других заболеваниях [29].

Однако среди кишечных представителей *Firmicutes* есть и некоторые бактерии ассоциированные с неблагоприятным состоянием организма хозяина. Например, детекция в кале бактерий *Veillonella*, характерных для верхних отделов ЖКТ, может говорить о нарушениях пищеварения [33,34]. Для некоторых бактерий может наблюдаться достаточно сильная вариация фенотипа даже в пределах рода. Так, рода *Enterococcus* и *Streptococcus* включают как виды с пробиотическими штаммами [35,36], так и виды, ассоциированные с воспалительными заболеваниями кишечника и критическими состояниями [37–39].

#### 1.2.1.2 Отдел *Actinobacteria*

Подобно *Firmicutes*, представители отдела *Actinobacteria* обладают устойчивостью к низкому pH [20]. В большинстве своем данный отдел представлен *Bifidobacterium*, доминирующими в микробиоте кишечника младенцев, что обусловлено специализацией *Bifidobacterium* на расщеплении олигосахаридов, поступающих с материнским молоком. В организме взрослого человека представители *Bifidobacterium* метаболизируют олигосахариды молока и муцина (основного вещества слизи, вырабатываемой энтероцитами), а также крахмал, производя лактат и ацетат [20]. Среди представителей рода *Bifidobacterium* много видов, включающих пробиотические штаммы (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. animalis* и другие) [40]. Было показано, что прием пробиотических штаммов *Bifidobacterium* улучшает клинический статус при таких заболеваниях, как диарея, связанная с антибиотиками [41,42], некротический энтероколит [43], хронические вздутия [44],

аллергические заболевания, включающие атопическую экзему [45,46] аллергический ринит [47] и аллергическую диарею [48]. Как уже было упомянуто, представители отдела *Actinobacteria* способны вступать в отношения кросс-финдинга с *Firmicutes*, производящими масляную кислоту из лактата [49,50]. Помимо рода *Bifidobacterium* в кишечнике человека встречаются и другие представители типа *Actinobacteria*, например, бактерии семейства *Coriobacteriaceae*.

### 1.2.1.3 Отдел *Bacteroidetes*

Отдел *Bacteroidetes* включает в себя грамотрицательные бактерии с относительно большими геномами. Благодаря большому количеству генов они способны метаболизировать разнообразные субстраты, в основном представленные полисахаридами и белками [51]. В кишечнике человека бактерии данного отдела в основном представлены родами *Bacteroides*, *Prevotella* и *Porphyromonas*. Причем наблюдается обратная корреляция между представленностью бактерий *Bacteroides* и *Prevotella* в метагеномах: ряд исследований показал, что отношение представленности данных родов объясняет наибольший процент вариации в данных [52]. Предполагается, что между представителями данных родов существует конкуренция за ресурс или антагонизм [53].

Род *Bacteroides* был ассоциирован с рационом, характеризующимся высоким содержанием животных жиров и белков и низким содержанием пищевых волокон (так называемая “западная диета”) [54,55]. Некоторые представители данного рода, также как и *Firmicutes*, способны производить масляную кислоту. Однако, наиболее благоприятной для *Bacteroides* является среда, уровень pH которой более близок к нейтральному относительно *Firmicutes* [20]. Таким образом, рост этих бактерий замедляется при высоком содержании короткоцепочечных жирных кислот в среде. В связи с этим считается, что наиболее предпочтительным для них является протеолитический тип питания [20,51].

Род *Prevotella* в кишечнике в основном представлен видом *Prevotella copri* и превалирует в популяциях земледельцев и традиционных охотников-собирателей [56,57]. В связи с этим, ее изначально ассоциировали с рационом богатым волокнами, характерным для этих популяций. Однако, последние исследования указывают на то, что данная роль бактерии не характерна для западной популяции [20,58]. В западной популяции *P. copri* ассоциирована с повышенным потреблением сахаров [20]. Такое различие в функциях может быть следствием внутривидовой вариации *P. copri* [58,59].

#### 1.2.1.4 Отдел *Verrucomicrobia*

В более низкой доле в кишечной микробиоте встречаются представители отдела *Verrucomicrobia*. Однако их роль в кишечном сообществе не менее важна. Отдел представлен в кишечнике видом *Akkermansia muciniphila*, в среднем представленность бактерии составляет около 1% [60]. Основным питательным веществом для данной бактерии является муцин, вырабатываемый энтероцитами. Данная особенность *Akkermansia* придает ей уникальные свойства: она способна поддерживать нормальное функционирование сообщества в периоды истощения питательного субстрата, а также стимулировать барьерную функцию кишечника. В результате расщепления муцина образуются молекулы фукозы, галактозы, N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина, сиаловых кислот и сульфатов, а также ди- и олигосахаридов, которые могут метаболизированы другими бактериями [60]. Представленность данной бактерии отрицательно ассоциирована с рядом заболеваний (в частности, с метаболическими расстройствами и воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК)), а также с ожирением и повышенным уровнем глюкозы в крови [60]. Небольшое количество интервенционных исследований, в которых проводилась фекальная трансплантация или оральный прием живых клеток *Akkermansia*, а также ее изолированного белка, индуцирующего секрецию глюкагоноподобного пептида-1, указывает на потенциал использования бактерии при лечении метаболических расстройств [60,61].

#### 1.2.1.5 Царство *Archaea*

Среди *Archaea* наиболее представлен в кишечных сообществах вид *Methanobrevibacter smithii*. Эта архея относится к одной из трех групп микроорганизмов, специализирующихся на утилизации  $H_2$  - метаногенам. Утилизация  $H_2$  является важным процессом, так как накопление водорода ингибирует эффективность ферментации полисахаридов [26]. Кроме *Methanobrevibacter*,  $H_2$  может быть утилизирован ацетогенами и сульфат-редуцирующими бактериями [62].

#### 1.2.1.6 Отдел *Proteobacteria*

Протеобактерии являются грамотрицательными бактериями. Среди представителей данного отдела достаточно много оппортунистических патогенов (например, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*). Липополисахариды (ЛПС) стенок этих бактерий оказывают воздействие на иммунную систему хозяина. ЛПС бактерий данного отдела являются более иммуногенными в сравнении с ЛПС бактерий из отдела *Bacteroidetes* [20]. Таким образом повышение относительной

представленности бактерий-оппортунистов, принадлежащих данному отделу, ассоциировано с воспалительными заболеваниями кишечника [63]. Для бактерий данного отдела было установлено неспецифическое повышение представленности при различных заболеваниях ЖКТ [39]. Один из механизмов, лежащих в основе данной ассоциации, может быть пониженная относительно других представителей кишечного сообщества чувствительность данных бактерий к средесниженному рН и повышенной концентрации кислорода.

В данном типе присутствуют также сульфат-редуцирующие бактерии, которые наряду с вышеописанной археей *Methanobrevibacter*, утилизируют  $H_2$ , образующийся в результате ферментации полисахаридов. Сульфат-редуцирующие бактерии используют  $H_2$  для производства сероводорода  $H_2S$ . Одним из наиболее распространенных представителей этой группы в кишечнике человека является *Desulfovibrio piger* [62]. Данный способ утилизации водорода требует наличия в среде свободного сульфата  $SO_4^{2-}$ , который может быть получен путем метаболизма белков животного происхождения, а также муцина (Рисунок 1) [26].



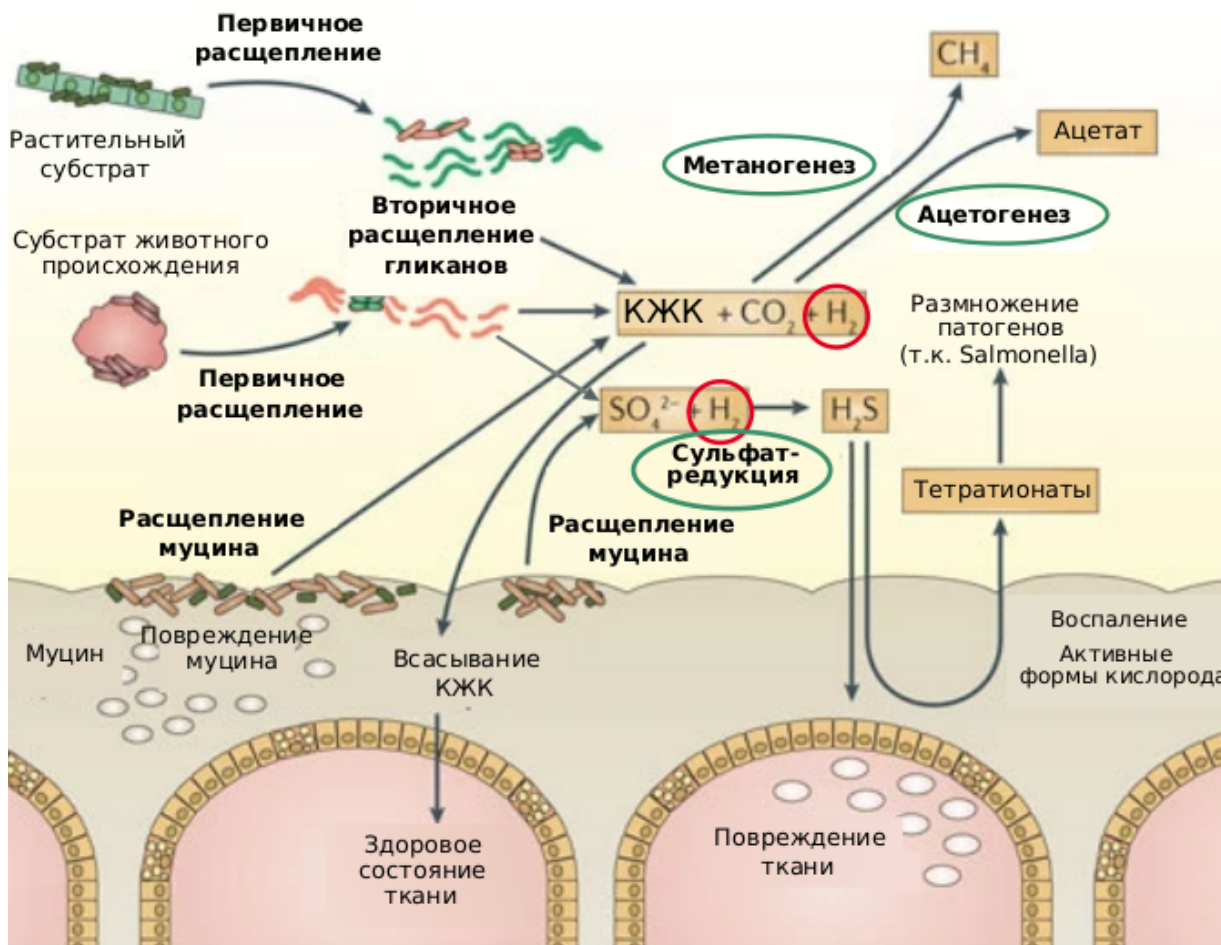


Рисунок 1 - Метаболические пути, приводящие к образованию водорода и его утилизации в кишечном микробном сообществе (адаптировано из [26]).

### 1.2.2 Стратегии выживания в кишечном микробном сообществе

В целом, кишечное микробное сообщество составляют факультативные и облигатные анаэробы. Некоторые из них специфичны только для кишечника (например, *Bacteroides*, *Clostridia*), другие встречаются также в ротовой полости и пищеводе (например, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Gemella*, *Veillonella*) [64]. Некоторые из последних могут быть транзитными микроорганизмами, которые проходят сквозь кишечник без колонизации. Напротив, специфичные для кишечника микроорганизмы колонизируют его, что означает, что они размножаются в кишечнике со скоростью, которая равна скорости их физической элиминации или гибели [65]. Для различных микроорганизмов характерны разные стратегии питания и выживания в кишечной среде: некоторые из них способны метаболизировать большое количество разнообразных субстратов (например, *Bacteroides*), другие специализируются на определенном субстрате (например, многие

*Firmicutes*). При этом практически все представители сообщества связаны между собой в тесную метаболическую сеть, и изменение представленности одного из них может повлечь за собой перестройку всего сообщества.

### 1.2.3 Межиндивидуальная вариация состава микробиоты: энтеротипы

Для крупномасштабного описания набора микроорганизмов, преобладающих в отдельно взятой микробиоте кишечника, может быть использована концепция энтеротипов [66]. Данный метод анализа кишечных сообществ основан на кластеризации множества индивидуальных микробиотных профилей в многомерном пространстве представленности таксонов с целью снижения размерности пространства анализа. Несмотря на некоторые различия при анализе разных популяций, в большей части исследований было детектировано три-четыре кластера, которые по преобладающим в них родам были названы как *Bacteroides* (тип *Bacteroidetes*), *Prevotella* (тип *Bacteroidetes*) и *Ruminococcaceae-Lachnospiraceae* (тип *Firmicutes*) энтеротипы. Недавние исследования говорят о том, что корректнее говорить о градиентах представленности преобладающих таксонов (так называемые “драйверы”, англ. drivers), нежели о четких кластерах [52,67]. Тем не менее, концепция энтеротипов позволила рассмотреть микробиоту в новом ключе и выявить интересные ассоциации, например, с рационом и предрасположенностью к различным способам модуляции микробиоты [54,68].

*Bacteroides* энтеротип, по аналогии с доминирующим в нем родом, ассоциирован с рационом, характеризующимся низким уровнем клетчатки и превалированием калорийной пищи с низкой биологической ценностью [52]. Применение усовершенствованных подходов к энтеротипированию позволило выявить два подкластера в *Bacteroides* энтеротипе. Один из них (Bact2), характеризующийся сниженным разнообразием, ассоциирован с системным воспалением и повышенным индексом массы тела (ИМТ) [69,70]. Для *Prevotella*-энтеротипа, также как и для рода *Prevotella*, наблюдаемые ассоциации варьируют от исследования к исследованию в зависимости от популяции. В западной популяции энтеротип ассоциирован с метаболизмом простых сахаров, а в таких изолированных популяциях, как общества охотников-собирателей - с пищей, богатой волокнами [20,58]. Интересным образом, в западной популяции энтеротип характеризуется достаточно низким разнообразием, у его носителей вектор представленности видов является особенно разреженным [52]. В свою очередь, *Ruminococcaceae-Lachnospiraceae* энтеротип считается маркером рациона, богатого волокнами [20,55].

Энтеротипы представляют собой варианты нормы, они ассоциированы с различными диетическими привычками и разным образом жизни, однако нельзя однозначно сказать, что определенный энтеротип является менее предпочтительным (возможно, за исключением провоспалительного подкластера Vact2 из *Bacteroides* энтеротипа). Более того, есть наблюдения, что кишечные сообщества с разным таксономическим составом в норме не сильно отличаются между собой по функциональному составу [71,72]. Существуют некоторый функциональный гомеостаз, и микроорганизмы могут перестраивать собственный метаболизм - к примеру, на уровне регуляции транскрипции - так, что сообщество в целом будет способно осуществлять все необходимые функции при разном таксономическом составе [73].

#### **1.2.4 Внутрииндивидуальная вариация состава микробиоты**

В ряде исследований было показано, что в отсутствие внешних воздействий состав кишечного микробного сообщества обладает относительной устойчивостью во времени. В общем случае межиндивидуальная вариабельность состава микробиоты превышает внутрииндивидуальную вариабельность на сроках порядка месяцев [8] (Рисунок 2). Это наблюдение позволило ввести концепцию устойчивого состояния кишечного сообщества. Внешние вмешательства, в том числе изменение питания, прием пробиотиков и пребиотиков, а также прием лекарственных препаратов способны вызывать отклонения, достаточные для перехода в новое устойчивое состояние [74]. При этом новое состояние может характеризоваться как особенностями взаимодействия с организмом хозяина, ассоциированными со здоровьем последнего, так и, напротив, с негативным влиянием на здоровье. Примерами последних могут служить воспалительные заболевания кишечника [75] и рецидивирующая инфекция *Clostridium difficile* [76].

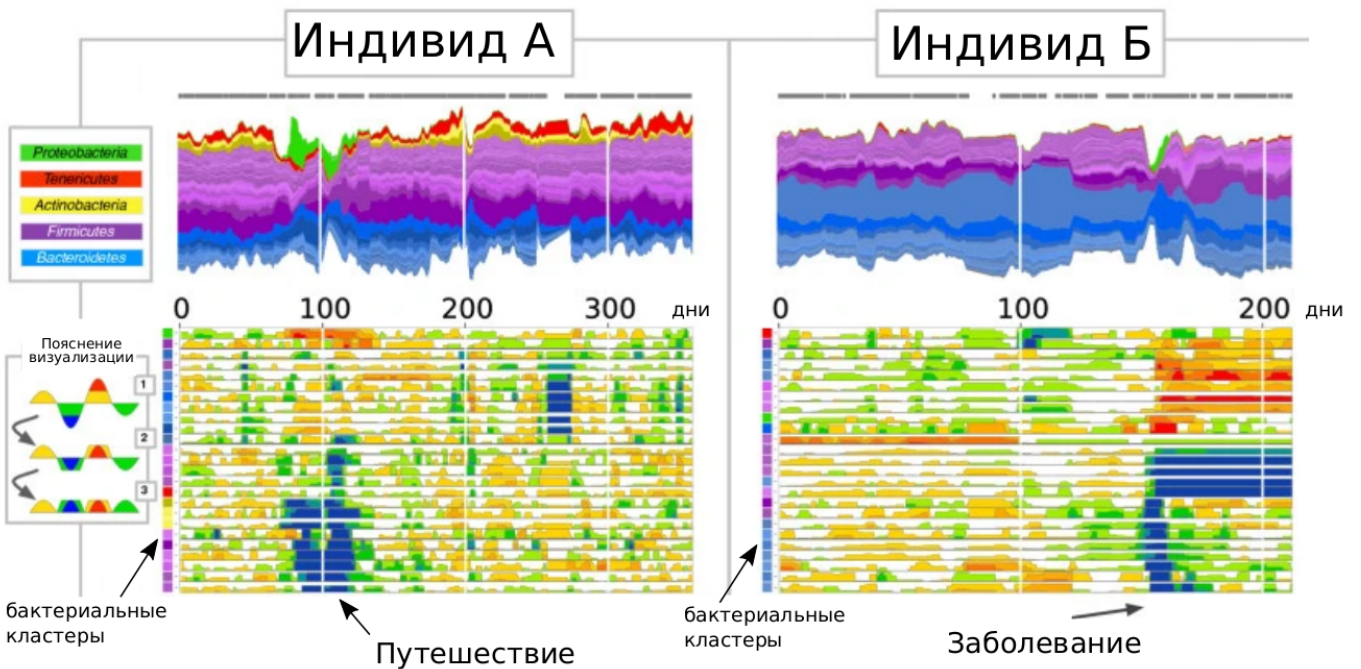


Рисунок 2 - Изменение таксономического состава кишечной микробиоты двух человек в течение года. По оси x представлено время (дни), цветом обозначен состав. На верхних графиках различными цветами обозначены пропорции различных отделов микроорганизмов, на нижних - микробных кооперативов. Около 100-го дня исследования, индивид А совершил дальнейшее путешествие; видно, что представленность некоторых таксонов изменилась достаточно сильно, но через некоторое время вернулась к изначальным показателям. Индивид В около 150 дня исследования перенес инфекционное заболевание ЖКТ (антибиотики при этом не применялись); видно, что это вызвало переход микробиома в новое стабильное состояние (адаптировано из [8]).

Внутрииндивидуальную вариацию микробного сообщества можно рассмотреть не только во временной, но и в пространственной шкале. В фиксированный момент состав микробиоты кишечника варьирует как вдоль (от двенадцатиперстной кишки к прямой), так и поперек (от середины просвета кишечника к глубине слизистого слоя).

Кишечный эпителий покрыт слизистой оболочкой, которая облегчает прохождение пищи по ЖКТ, и в то же время защищает эпителий кишечника от механических повреждений и инвазии микроорганизмов. Слизь секретируется бокаловидными клетками, и в основном состоит из высокогликозилированных белков - муцинов. В слизистой оболочке выделяют два слоя: рыхлый внешний и плотный внутренний. Некоторые микробы могут прилипнуть к внешнему слою благодаря микробной адгезии через лектины и гликозидазы. При этом в норме микроорганизмы обнаруживаются только во внешнем слое [23]. Как уже было сказано выше, муцин является

основным источником питательных веществ для некоторых кишечных бактерий, таких как *Akkermansia muciniphila*, некоторых виды родов *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Prevotella* и *Ruminococcus* [77]. Несмотря на градиент микробного состава, который наблюдается от просвета к глубине слоя муцина, было показано, что просвет кишечника и слизистую оболочку следует рассматривать не как отдельные компартменты, а как компоненты частично смешанного биореактора [78].

Вдоль желудочно-кишечного тракта микробная нагрузка меняется следующим образом: в желудке содержится около  $10^1$  клеток микроорганизмов на мл содержимого, в двенадцатиперстной кишке -  $10^3$ , в тощей кишке -  $10^4$ , в тонком -  $10^7$  клеток на мл и в толстом кишечнике - до  $10^{12}$  [23]. Кроме того, меняется и состав сообщества. Это связано как с изменениями условий среды (таких как кислотность, толщина слоя муцина, концентрация антимикробных веществ и кислорода), так и с изменениями доступности и состава питательных веществ. Микроорганизмы тонкого кишечника - это в основном быстро растущие факультативные анаэробы, устойчивые к антимикробным веществам хозяина и питающиеся простыми углеводами и аминокислотами, которые еще доступны в этой части кишечника [79]. Основными представителями являются *Clostridium*, *Streptococcus* и *Escherichia* [80,81]. В отличие от микробиоты толстого кишечника, которая, как было написано ранее, достаточно стабильна во времени, состав микробного сообщества тонкого кишечника изменяется достаточно сильно даже в течение дня [80].

В толстом кишечнике скорость движения пищи меньше, а кислотность выше, чем в тонком. Здесь в качестве источника углерода микроорганизмам доступны сложные сахара, не перевариваемые человеком. Именно в проксимальном отделе толстого кишечника расщепляется большая часть сложных углеводов с последующим производством КЖК [20]. Это приводит к локальному повышению кислотности среды. Основными представителями сообщества здесь являются *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae* [79], а также представители рода *Bifidobacterium*. По мере продвижения к дистальному отделу толстого кишечника доступность сложных углеводов уменьшается, а pH среды снижается. В микробном сообществе, в зависимости от типа питания, здесь преобладают представители *Bacteroidetes*, *Firmicutes* или *Proteobacteria*. В дистальном отделе толстого кишечника большая часть сложных углеводов уже утилизирована и начинает преобладать протеолитический тип питания, ассоциированный с высокой представленностью *Bacteroidetes* [20].

### **1.3 Микробиота и здоровье хозяина**

Симбиотические микроорганизмы кишечника необходимы для нормального функционирования организма хозяина, и изменения представленности отдельных таксонов ассоциированы с заболеваниями различной этиологии. Среди этих заболеваний язвенный колит и болезнь Крона [34,82–84], колоректальный рак [5,6], сахарный диабет второго типа [85,86] и ожирение [3,4]. Кроме заболеваний, прямо или опосредованно связанных с работой ЖКТ и питанием, наблюдались ассоциации с заболеваниями, затрагивающими нервную систему - такими как болезнь Паркинсона [87] и аутизм [88], а также с сердечно-сосудистыми заболеваниями [1,2] и аллергиями [7]. При этом, список заболеваний, для которых установлена связь с микробиотой, продолжает расширяться. Их разнообразие указывает на то, что связи между организмом хозяина и кишечной микробиотой достаточно сложны и многогранны.

Ассоциативные исследования являются первым шагом на пути понимания взаимосвязей между микробиотой и организмом хозяина; для определения же их направления и механизмов необходимы лонгитюдные и интервенционные исследования. Частично, найденные ассоциации находят подтверждение в экспериментах по пересадке микробных сообществ [22,76,89]. По аналогии с постулатами Роберта Коха в доказательной медицине, позволяющими установить, что некоторый микроорганизм является причиной заболевания, был предложен вариант постулатов для определения симбиотических организмов кишечной микробиоты:

- 1 - Комменсальный штамм, ассоциированный со здоровым состоянием организма, встречается чаще в микробиоте здоровых хозяев и реже - в микробиоте больных.
- 2 - Комменсальный штамм может быть изолирован в качестве чистой культуры и выращен в лаборатории.
- 3 - Комменсальный штамм улучшает течение или смягчает симптомы заболевания при пересадке новому хозяину.
- 4 - Комменсальный штамм может быть детектирован в организме нового хозяина после улучшения состояния его здоровья [90].

#### **1.3.1 Механизмы влияния кишечной микробиоты на организм хозяина**

Одним из основных механизмов влияния микробиоты на организм хозяина является выработка определенных метаболитов. Наиболее изученные классы веществ, вырабатываемые

комменсальными кишечными микроорганизмами и оказывающие влияние на состояние организма хозяина, приведены на рисунке 3. Другим возможным путем влияния является взаимодействие микроорганизмов с рецепторами клеток кишечной стенки. В частности, было показано, что полезные свойства некоторых бактерий, проявляющиеся при приеме внутрь, обусловлены взаимодействием рецепторов стенки кишечника с определенным мембранным белком бактерии, и не исчезают, а, напротив, усиливаются, при приеме не живых, а пастеризованных бактерий [91,92].

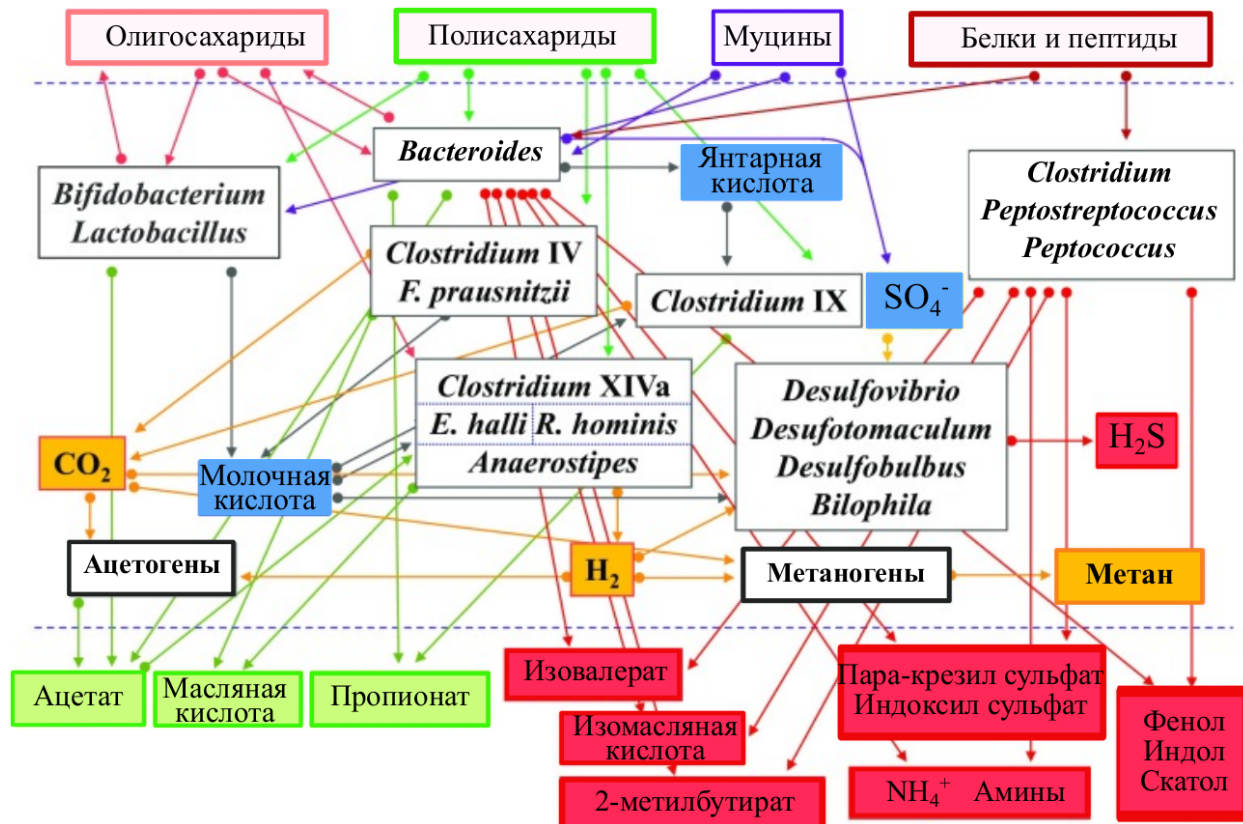


Рисунок 3 - Основные продукты метаболизма кишечных микроорганизмов и пути их получения. Зеленым отмечены продукты, характеризующиеся в большей степени положительным влиянием на организм хозяина, красным - в большей степени отрицательным. Желтым цветом помечены газообразные продукты, а синим - наиболее важные промежуточные метаболиты (адаптировано из [93]).

Кроме комменсальных микроорганизмов, которые могут положительно или негативно влиять на здоровье, существуют и микробы с выраженными патогенными свойствами, такими как способность к инвазии или выработке токсичных веществ. Примером может служить адгезивно-инвазивная *Escherichia coli* (англ. adherent-invasive *Escherichia coli*), которой отводят

большую роль в патогенезе болезни Крона и язвенного колита [94]. Изучение механизмов влияния патогенных микроорганизмов на здоровье выходит за пределы данного обзора. В данной главе будут рассмотрены некоторые наиболее изученные механизмы как положительного, так и отрицательного влияния комменсальных членов микробного сообщества на состояние организма хозяина.

### *1.3.1.1 Короткоцепочечные жирные кислоты*

Одними из наиболее изученных соединений, вырабатываемых кишечной микробиотой, являются уже упомянутые выше КЖК. Они, в основном, образуются в результате расщепления микроорганизмами полисахаридов, которые не усваиваются человеком, в проксимальном отделе толстого кишечника. Среди них наиболее высоко представлены уксусная кислота (ацетат), пропионовая кислота (пропионат) и масляная кислота (бутират). Примерное соотношение их концентраций в просвете кишечника составляет 60:20:20 [95]. КЖК частично всасываются в кровь и усваиваются энтероцитами. Пропионат и ацетат подвергаются частичному всасыванию и используются в печени для производства холестерина [95–97]. Ацетат также поступает в периферические ткани, где служит источником энергии. Масляная кислота в основном потребляется самими клетками кишечника в качестве источника энергии. Таким образом, благодаря кишечной микробиоте, организм хозяина может получить энергию из неперевариваемых с помощью собственных ферментов полисахаридов. Доля калорий, которую человек получает благодаря расщеплению микроорганизмами полисахаридов, составляет от 5 до 15% [95].

Масляной кислоте, кроме функции питания энтероцитов, также свойственно противовоспалительное действие, промотирование барьерной функции кишечника, способность подавлять канцерогенез, оказывать влияние на чувство сытости [95,98,99] и снижать окислительный стресс [95,100,101]. Масляную кислоту в кишечнике могут производить представители практически всех отделов, представленных в кишечном сообществе (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Thermotogae*), однако наибольшее количество ее производителей относятся к типу *Firmicutes* [102]. Противовоспалительное действие масляной кислоты напрямую связано с питанием энтероцитов. Ее недостаток приводит к дефициту питательных веществ клеток кишечного эпителия, что в свою очередь вызывает истончение слизистого слоя [95]. Таким образом, нарушается естественный защитный барьер между внутренней средой организма хозяина и микробиотой. В организме



запускается воспалительный процесс, призванный защитить внутреннюю среду от проникновения микробов сквозь стенку кишечника. Кроме того, противовоспалительный эффект масляной кислоты связывают с ингибированием деацетилазы гистонов (англ. HDAC) [95]. Ряд интервенционных исследований показал, что терапевтическое повышение концентрации масляной кислоты в просвете кишечника (как с помощью клизм, так и путем приема таблеток) может способствовать снижению симптомов заболеваний, сопровождающихся хроническим воспалением - язвенного колита и болезни Крона [95,103,104]. Также в кишечнике был обнаружен рецептор к масляной кислоте - GPR109A - в результате активации которого запускается ряд реакций со стороны иммунной системы, направленных на снижение воспаления [105].

Исследования влияния масляной кислоты на канцерогенез были мотивированы наблюдениями, что высокое содержание пищевых волокон в рационе снижает риск колоректального рака [106]. Подавление канцерогенеза предположительно связано с уже упомянутой способностью масляной кислоты влиять на экспрессию генов путем ингибирования HDAC, что приводит к гиперацетилированию гистонов и повышению доступности ДНК для транскрипционных факторов. Причем подавление процессов роста и пролиферации клеток за счет ингибирования деацетилазы происходит преимущественно в опухолевых клетках кишечника [95,96]. Данный эффект (butyrate paradox [96,107]) связывают с тем, что для энтероцитов предпочтительным источником энергии является именно масляная кислота, в то время как для опухолевых клеток - глюкоза. За счет этого в энтероцитах масляная кислота быстро мнотаболизируется, а в опухолевых клетках - накапливается и выступает как активный ингибитор HDAC [95,96].

#### *1.3.1.2 Другие вещества, вырабатываемые кишечными бактериями: антимикробные пептиды, производные аминокислот, ТМА*

Помимо хорошо изученных КЖК, кишечная микробиота вырабатывает ряд других малых молекул, способных оказывать влияние на состояние организма хозяина. Среди данных веществ есть пептиды: бактериоцины и микроцины, которые в основном обладают противомикробной активностью, направленной на близкородственные микроорганизмы, способные конкурировать за ресурс с представителем сообщества, вырабатывающим пептид. Данные вещества, вырабатываемые микроорганизмами-комменсалами, защищают хозяина от размножения родственных им патогенов (например, ruminococin-A бактерии *Ruminococcus gnavus*) [108].

Также влияние на организм хозяина могут оказывать продукты метаболизма аминокислот. Для осуществления метаболизма в анаэробных условиях, микроорганизмы нуждаются в акцепторе электронов или в анаэробной цепи транспорта электронов. Часто в качестве акцептора электронов используются аминокислоты [109]. В результате этого микробное сообщество производит большое разнообразие продуктов метаболизма аминокислот, причем одна и та же аминокислота может служить источником различных продуктов в зависимости от состава сообщества. Продукты распада аминокислот могут проникать сквозь кишечную стенку, оказывая большое влияние на функционирование организма хозяина. Примером таких веществ может служить индол - продукт метаболизма триптофана, который может проявлять токсические свойства [108]. Выработка данных метаболитов происходит при преобладании протеолитического типа питания бактерий, который чаще всего наблюдается в дистальной части пищеварительного тракта [95].

Примером вещества, синтезируемого микробным сообществом и негативно влияющего на здоровье, является триметиламин (ТМА). Было показано, что определенные таксоны могут синтезировать ТМА из холина [110]. Холин является необходимым человеку питательным веществом, он всасывается в тонком кишечнике и перерабатывается в печени. Некоторое количество холина может достигать толстого кишечника, где микроорганизмы преобразуют его в ТМА. ТМА, в свою очередь, преобразуется в печени в триметиламин-N-оксид (ТМАО) [111]. Однако для производства ТМА количество потребляемого холина должно достигать определенного порога [112]. Кроме холина, ТМА может синтезироваться бактериями из L-карнитина и лецитина. Многочисленные исследования указывают на ассоциации между уровнем ТМАО в плазме и риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [110,112–114]. Механизмы, лежащие в основе наблюдаемых ассоциаций, пока до конца не ясны, предполагается, что это изменения в процессах обратного транспорта холестерина, метаболизма холестерина и стеролов, а также желчных кислот [110,115].

### *1.3.1.3 Взаимодействие кишечного сообщества и эндокринной системы*

Связь между микробиотой и эндокринной системой хозяина является обоюдной. Гормоны, вырабатываемые хозяином, оказывают влияние на состав микробиоты и экспрессию бактериями определенных генов (например, изменение вирулентности бактерий под действием эстрола или катехоламинов) [116–118]. В свою очередь, микроорганизмы напрямую (путем выработки

гормонов) или косвенно (путем влияния на функцию эндокринных желез) влияют на гуморальную систему хозяина [118].

Влияние бактерий на уровень определенных гормонов хозяина - один из механизмов, составляющих так называемую ось “кишечник-мозг” (англ. gut-brain axis) - связь между кишечным микробным сообществом и мозгом хозяина. Выделяют две группы гормонов, которые вовлечены в связь между микробиотой кишечника и поведением хозяина - это нейрого르몬ы (серотонин и катехоламины: дофамин, эпинефрин, норэпинефрин) и “гормоны стресса” (кортизол, кортикостерон, адренкортикостерон и кортикотропин) [118]. Серотонин является одним из основных нейротрансмиттеров, и около 90% серотонина вырабатывается клетками кишечника. Известно, что некоторые бактерии могут синтезировать серотонин, например, *Streptococcus*, *Escherichia* и *Enterococcus* [119]. Было показано, что безмикробные мыши имеют сниженный уровень серотонина в плазме [120]. Дофамин также может вырабатываться некоторыми кишечными бактериями, например, *Bacillus* и *Serratia* [119]. С влиянием микробиоты на уровень дофамина связан один из предполагаемых механизмов ассоциации между составом микробиоты и болезнью Паркинсона [87,118]. Что касается “гормонов стресса”, ряд исследований показывает, что нормальное кишечное микробное сообщество способствует снижению их уровня [118,121].

Помимо этого, многочисленные исследования обнаруживают ассоциации между составом микробиоты и экспрессией половых гормонов, гормонов, регулирующих аппетит и метаболизм сахаров, а также развитие организма [118].

#### *1.3.1.4 Взаимодействие кишечного сообщества и иммунной системы*

Микробиота также оказывает влияние на формирование и функционирование иммунной системы. В кишечнике находится один из важнейших вторичных лимфатических органов - кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань (КАЛТ, англ. gut-associated lymphoid tissue, GALT). Структуры КАЛТ - брыжеечные лимфатические узлы, Пейеровы бляшки и лимфоидные фолликулы - формируются пренатально, а созревание этих структур зависят от постнатальной микробной колонизации. В исследованиях на модельных животных было показано, что у безмикробных мышей структуры КАЛТ остаются недоразвитыми, в то время как колонизация стерильной мыши микробиотой в раннем возрасте может нормализовать количество иммунных клеток [23,122].

Задача кишечной иммунной системы - с одной стороны, быть толерантной к большей части микроорганизмов, которые сосуществуют в симбиозе с хозяином; с другой - обеспечить защиту от проникновения микробов сквозь химический и физиологический барьеры (такие, как секретируемый растворимый иммуноглобулин А, антимикробные пептиды, слизистый и эпителиальный слой), защищать от избыточного бактериального роста и колонизации патогенными бактериями [23]. Ранее предполагалось, что иммунная система не способна распознавать нормофлору. Однако позже было обнаружено, что существенная часть комменсальных кишечных бактерий покрыта иммуноглобулинами А (IgA) [123]. Также иммунная система содержит эффекторные Т-клетки, способные распознавать эти микроорганизмы, которые, в свою очередь, контролируются регуляторными Т-клетками [124]. Толерантность к комменсальным микроорганизмам реализуется за счет локализации иммунного ответа на их присутствие в кишечнике в пределах КАЛТ (дендритные клетки после захвата антигена не уходят далее брыжеечных лимфатических узлов), без подключения системного иммунного ответа [125]. Иммунный ответ в данном случае включает образование регуляторных Т клеток (Treg), вырабатывающих цитокин интерлейкин 10 (IL-10), подавляющий воспаление, и продукцию IgA. Таким образом, толерантность по отношению к комменсальным бактериям является компартиментализованной; при обнаружении их за пределами просвета ЖКТ, в других тканях организма, будет запущен системный иммунный ответ [126].

Существует множество механизмов влияния бактерий на иммунный ответ. Один из них был уже описан выше: в разделе “Короткоцепочечные жирные кислоты” упоминалось, что взаимодействие масляной кислоты с рецепторами GPR109A стимулируют выработку цитокина IL-10, тем самым снижая воспаление [105]. Также влияние оказывают полисахариды, производимые бактериями. Одним из примеров является полисахарид А бактерии *Bacteroides fragilis*, который взаимодействует с элементами врожденной иммунной системы хозяина, в частности, с Толл-подобными рецепторами 2 (англ. Toll-like receptors 2), что, в свою очередь, стимулирует клетки иммунной системы хозяина к выработке цитокина IL-10 [108].

Примеры, рассмотренные выше, описывают механизмы, способствующие снижению воспаления. Однако, как было сказано в начале раздела, иммунный ответ на микробиоту балансирует на границе толерантности и воспаления. Существуют также механизмы, стимулирующие иммунный ответ на присутствие бактерий. В то время как подавление воспаления связано с работой регуляторных Т клеток и выработкой IL-10, его стимуляция связана с

Т-хелперами 17 типа (англ, T helper type 17, Th17) [127], которые производят цитокины IL-17, IL-22 и IL-23, привлекают нейтрофилы и способствуют развитию воспаления. Th17 и Treg клетки образуются из общего предка - недифференцированных Т-хелперов типа 0 (Th0), путь развития определяется наличием в среде определенных цитокинов (Рисунок 4).

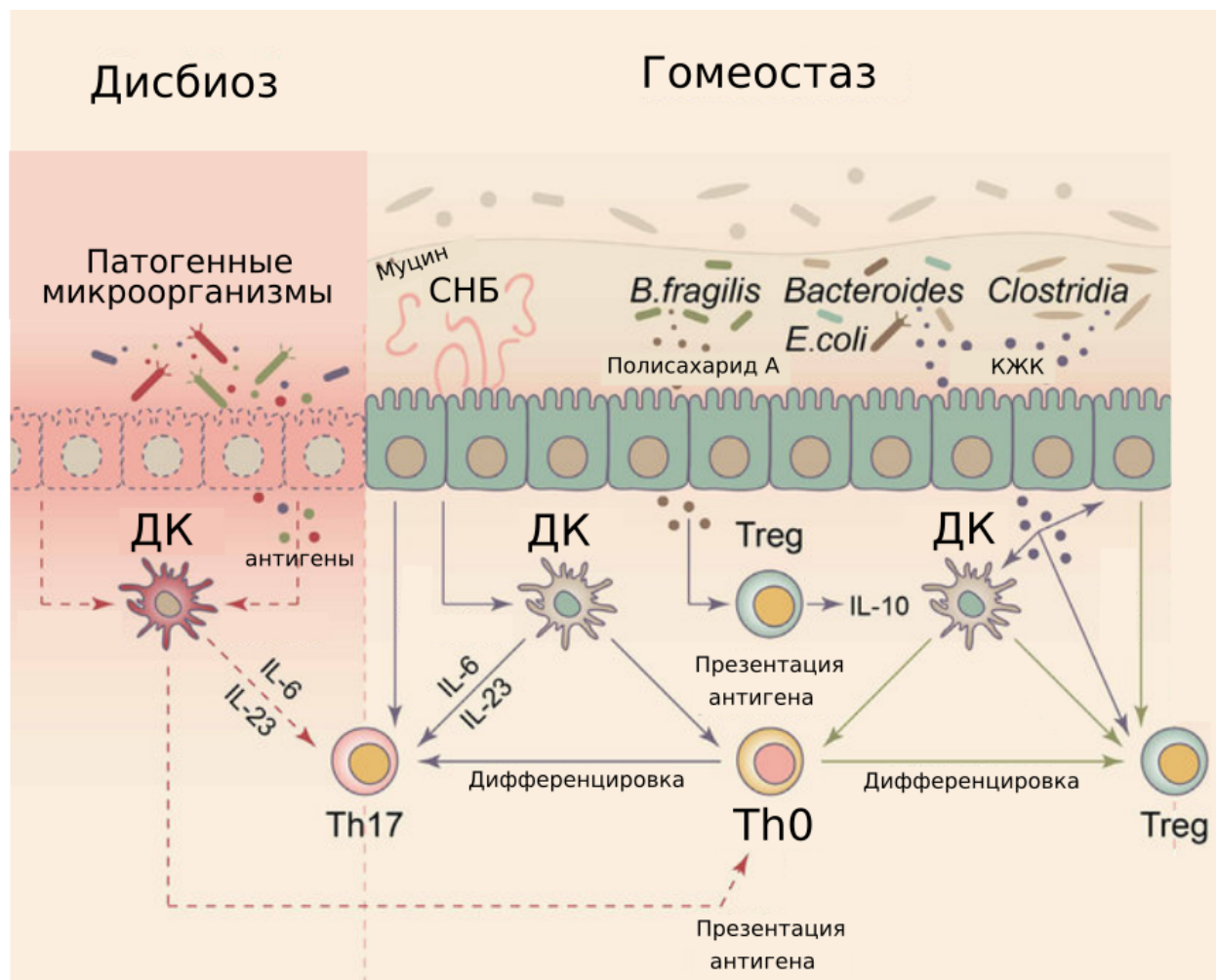


Рисунок 4 - Механизмы взаимодействия кишечного микробного сообщества и иммунной системы (адаптировано из [128]).

Примером бактерий, стимулирующих дифференцировку Th0 клеток в Th17 являются сегментированные нитчатые бактерии, СНБ (segmented filamentous bacteria, SFB) [129–131]. Одна из особенностей этих бактерий - их способность прикрепляться к клеткам эпителия тонкого кишечника, в частности, к Пейеровым бляшкам - в отличие от большей части кишечных бактерий, которые обитают в слизистом пристеночном слое или просвете и не имеют физического контакта с

эпителием [132]. Антигены СНБ доставляются с помощью дендритных клеток к местам созревания Th0 и способствуют их дифференцировке в Th17 (Рисунок 4).

Нарушение состава кишечного сообщества приводит к смещению соотношения Th17/Treg клеток, что может являться причинным фактором возникновения таких заболеваний с аутоиммунной или аллергической компонентой, как ВЗК, ревматоидный артрит и рассеянный склероз [127]. Изменение баланса кишечной иммунной системы в сторону снижения толерантности по отношению к кишечным бактериям приводит к возникновению воспалительных заболеваний [93,127]. Напротив, чрезмерное отклонение в сторону толерантности к микроорганизмам может вызвать риск размножения патогенов, а также эндотоксемию, то есть проникновение бактерий и компонентов бактериальных клеток (липополисахаридов, пептидогликанов, флагеллина и бактериальной ДНК) сквозь защитные барьеры в кровь. Эндотоксемию связывают с увеличением массы тела и развитием инсулинорезистентности [133], диабета второго типа, ожирения и почечной недостаточности [134–136].

### 1.3.2 Потенциальные микробиотные биомаркеры здоровья

Наиболее часто ассоциации со здоровьем хозяина наблюдаются для следующих микробиотных показателей: разнообразие сообщества, представленность основных бактерий-производителей масляной кислоты (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia*, *Eubacterium hallii*), представленность других бактериальных таксонов, как положительно (например, *Akkermansia muciniphila*, *Christensenella minuta*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*), так и отрицательно (например, *Citrobacter*, *Enterobacter*) ассоциированных со здоровьем, относительная представленность генов, кодирующих факторы патогенности и вирулентности.

Разнообразие сообщества, или альфа разнообразие, - это параметр, отражающий таксономическое богатство сообщества и, в то же время, равномерность распределения представленности таксонов в нем. Различные меры альфа разнообразия в разной степени отражают оба этих свойства. Например, широко используемая мера  $chaol$  является оценкой богатства сообщества. Она позволяет оценить богатство сообщества (количество таксонов в нем) по количеству таксонов, детектированных в конкретном образце. При этом вводится поправка, рассчитанная с использованием числа редких таксонов:

$$D=S_0 + a_1(a_1-1)/(2a_2+1),$$

где  $D$  - разнообразие сообщества по этике  $chaol$ ;  $S_0$  - наблюдаемое в образце количество уникальных таксонов;  $a_1$  - количество таксонов, наблюдаемых единожды в образце;  $a_2$  - количество таксонов, наблюдаемых дважды. Примером меры, учитывающей также равномерность распределения таксонов, может служить индекс Шеннона:

$$D = -\sum p_i \cdot \ln(p_i),$$

где  $D$  - разнообразие сообщества по индексу Шеннона;  $p_i$  - пропорции таксонов в образце.

Разнообразие сообщества отражает его экологическую стабильность и гибкость: в целом, чем более богато сообщество, тем менее разрушительны для него будут воздействия внешних факторов. При анализе кишечных микробных сообществ было неоднократно замечено, что сниженное альфа разнообразие ассоциировано с рядом заболеваний, таких как воспалительные заболевания кишечника, ожирение и диабет 2 типа [137]. Кроме того, негативные внешние факторы, такие как прием антибиотиков или кишечная инфекция, также способны приводить к снижению разнообразия сообщества. Однако, несмотря на то что альфа разнообразие является удобным параметром оценки состояния микробного сообщества, его значения следует интерпретировать с осторожностью. Совершенно разные микробные сообщества могут иметь одинаковые значения разнообразия. Поэтому необходимо также оценивать, какие именно микробы наиболее представлены в сообществе.

## **1.4 Модуляция состава микробиоты**

Как было сказано выше, состав сообщества конкретного индивида достаточно стабилен во времени, однако он может меняться при воздействии определенных факторов, таких как смена рациона, употребление пищевых добавок или лекарств, введение в сообщество новых микроорганизмов тем или иным способом. В данном разделе будут рассмотрены факторы, которые могут оказывать влияние на состав сообщества, и механизмы направленного изменения состава микробиоты.

### **1.4.1 Факторы, влияющие на состав микробиоты**

В первом приближении, факторы, влияющие на состав микробиоты, можно разделить на имеющие отношение к организму хозяина и факторы окружающей среды (Рисунок 5). При этом первую группу, в свою очередь, можно разделить на внутренние (например, возраст, генетика) и внешние (например, питание, образ жизни) факторы [138]. В настоящее время существуют несколько

научно-исследовательских консорциумов, обладающих данными биомедицинских анализов по крупным выборкам населения, собранных, в том числе, для изучения ассоциаций состава микробиоты с различными факторами, например, LifeLines-DEEP [24] и Flemish Gut Flora Project [139]. Эти исследования выявили одну интересную особенность микробиотных данных: как внешние так и внутренние группы факторов объясняют достаточно малый процент вариации состава сообщества (процент объясненной вариации для наиболее значимых факторов не превышает 15%, для всех факторов совместно - 30%). Это может объясняться большим количеством ковариат, наличием неучтенных ковариат, ассоциацией ковариат в большей степени с отдельными таксонами, чем с составом микробиоты в целом, наличием внутренних корреляций и композиционных эффектов, сильным влиянием случайных процессов и флуктуаций, а также собственной экологической динамикой микробного сообщества [138]. Кроме того, низкий процент объясненной вариации может отражать уже упомянутый выше факт, что существует несколько вариантов здоровой микробиоты, а один и тот же фактор может оказывать разное влияние на сообщества, находящиеся в различных устойчивых состояниях.



Рисунок 5 - Факторы, оказывающие влияние на состав микробного сообщества (на основе [138]).



Оценить влияние факторов окружающей среды на микробиоту достаточно сложно, так как имеет место множество корреляций между ними. Например, определение географических закономерностей затруднено тем, что географически удаленные местности часто различаются рационом и стилем жизни обитателей [138].

Среди внутренних факторов, имеющих отношение к организму хозяина, можно выделить возраст, пол, врожденные особенности пищеварительной и иммунной систем, а также особенности метаболизма веществ, поступающих с пищей. Влияние возраста особенно заметно проявляется при анализе микробиоты младенцев. В первые несколько лет жизни состав микробиоты претерпевает значительные изменения, становясь постепенно схожим с составом микробиоты взрослого человека. Интересно, что изначальный состав в значительной степени определяется типом родоразрешения: при кесаревом сечении в микробиоте первые недели будут преобладать кожные микробы (такие, как *Staphylococcus*), а при естественном - микробы, характерные для вагинальной микробиоты (*Lactobacillus*) [140]. Также были детектированы различия при сравнении микробиоты людей среднего и пожилого возрастов. Например, у пожилых снижается альфа разнообразие, уменьшается относительная представленность *Bifidobacterium* и увеличивается - *Enterobacteriaceae* [141]. Эффекты, которые наблюдаются при сравнении микробиоты женщин и мужчин, по-видимому, обусловлены различиями в функционировании желудочно-кишечной системы. В целом у женщин наблюдается более твердый стул, более долгое время транзита пищи по кишечнику, и они чаще страдают запорами по сравнению с мужчинами. Данные факторы, в свою очередь, отражаются на разнообразии сообщества и представленности таксонов, оцениваемых по образцу стула [142].

В ряде mGWAS исследований (полнометагеномных ассоциативных исследованиях, англ. microbiome genome-wide association studies) [143–146]) на больших когортах был произведен поиск ассоциаций между полиморфизмами генома человека и представленностью различных микроорганизмов или их функций в метагеномах. Было установлено, что отдельные геномные локусы могут влиять как на структуру сообщества в целом (бета разнообразие между образцами), так и на представленность бактерий и их функций. В основном это локусы, ассоциированные с врожденным иммунитетом, рецепторами витамина D, диетическими предпочтениями и метаболизмом сахаров [147,148]. Процент вариации в микробиомных данных, объясненный генетикой, в исследованиях на различных популяциях, варьирует от 2 до 10 % [146,149,150], при

этом в ряде исследований ассоциация между генетикой и составом микробиоты не являлась статистически значимой [149]. Классические исследования на близнецах позволили оценить, насколько отдельные таксоны связаны с генетикой [143,144,146,149–151]. В подобных исследованиях проводят сравнение схожести микробиоты однояйцевых и двуяйцевых близнецов. Несмотря на то, что некоторые находки были реплицированы на нескольких независимых когортах - например, высокая оценка наследуемости (heritability), присущая семейству *Christensenellaceae* и роду *Methanobrevibacter* [143,152] - в ряде более поздних исследований значимой наследуемости отдельных таксонов обнаружено не было [149,150].

В то время как вопрос о наследуемости микробиома остается открытым, тезис о том что внешние факторы превалируют над генетикой в вопросе влияния на состав микробиома, можно считать общепризнанным [149,153]. К таким факторам относятся питание, образ жизни, прием лекарств. Они представляют особый интерес, в том числе потому, что человек имеет возможность регулировать данные факторы, например, поменять рацион. Таким образом, данные факторы представляют собой потенциальные “рычаги” направленной модуляции микробиома. Среди всех изученных факторов, наиболее сильное влияние на состав сообщества оказывает прием лекарственных препаратов, в частности, антибиотиков, причем могут иметь место как краткосрочные, так и долгосрочные эффекты [139]. Некоторые микробные таксоны, будучи утраченными в результате приема антибиотиков, не восстанавливают свою представленность в дальнейшем. Кроме антимикробных веществ, накапливаются данные о других лекарственных препаратах, изменяющих состав микробиоты. Среди них ингибиторы протонной помпы [154], метформин [86] и нейролептики [155]. В некоторых случаях лечебное действие препарата обусловлено именно микробиотой (например, в случае метформина) [156]. Другим широко исследуемым фактором данной группы является питание. Связь микробиоты и питания исследуется как в описательных, так и в интервенционных исследованиях [14,24,54,55]. На данный момент установлено множество ассоциаций между составом кишечного сообщества и рационом [24,54], также установлена способность микробиома значимо меняться в относительно короткие сроки при смене рациона или добавлении в рацион определенных питательных веществ [14,55]. Так как данная работа посвящена изучению динамики микробиоты при изменении питания, связь между микробиотой и данным фактором рассмотрена более подробно в следующей главе.

## 1.4.2 Связь кишечной микробиоты и питания

Вариация состава микробиоты, объясняемая рационом, может составлять до 10% [22]. Существует несколько механизмов влияния рациона на состав микробного сообщества. Наиболее очевидный - это предоставление субстратов для специфического подмножества членов сообщества. Однако рацион также оказывает влияние на некоторые физиологические процессы организма хозяина, которые, в свою очередь, отражаются на составе микробиоты (см Таблица 1 [22]). Например, прием пищевых волокон не только предоставляет субстрат для бактерий, но и увеличивает время транзита пищи по ЖКТ.

Таблица 1. Механизмы влияния питания на состав микробного сообщества (адаптировано из [22]).

Способ действия	Механизм
Изменение существующего микробного сообщества	<ul style="list-style-type: none"><li>- Предоставление субстрата, например, при приеме пребиотиков</li><li>- Влияние на время транзита</li><li>- Влияние на pH</li><li>- Влияние на выработку хозяином желчи, муцина, пищеварительных ферментов</li><li>- Влияние на экспрессию генов хозяина</li></ul>
Введение новых бактерий в микробное сообщество	<ul style="list-style-type: none"><li>- Предоставление живых бактерий в форме пробиотиков, ферментированных продуктов, и других продуктов, содержащих бактерии</li></ul>

Влияние времени транзита на состав сообщества достаточно мало изучено. Установленные на данный момент ассоциации включают положительную корреляцию времени транзита с производством метана археями [22,157] и отрицательную - с представленностью *Bacteroidetes* [22,142,158]. Значение pH просвета кишечника, как было сказано выше, в значительной степени определяется содержанием волокон в рационе, что опосредовано производством из них КЖК [22,159]. Слабокислый pH предоставляет конкурентное преимущество *Firmicutes* по сравнению с *Bacteroides* [20,160].

Еще одним из мощных факторов регуляции состава кишечного сообщества, связанным с питанием, является количество и состав выделяемой желчи. Желчные кислоты, являющиеся основным компонентом желчи, представляют собой производные холестерина и играют важную

роль в переваривании и всасывании жиров, а также в выведении из организма некоторых продуктов метаболизма. Количество и состав желчи зависят в том числе и от потребляемой пищи, например, выработка желчи усиливается при потреблении жирной пищи. Около 10% вырабатываемой желчи достигает толстого кишечника [108]. При этом желчные кислоты ввиду своей амфипатической природы являются токсичными по отношению к бактериям. Они играют центральную роль в регуляции бактериальной нагрузки, при этом бактерии характеризуются различной устойчивостью по отношению к ним [22,161].

Толщина слоя муцина, который является субстратом и средой обитания бактерий, в значительной степени зависит от особенностей питания. Было показано, что рацион, богатый животным белком и жирами и бедный пищевыми волокнами, способствует истончению слоя муцина [133,162–165]. Помимо прямых эффектов такого истончения на микробиоту, оно способствует повышению уровня эндотоксемии [162,166], что в свою очередь также отражается на составе сообщества.

Что касается влияния питания на микробиом путем предоставления микроорганизмам определенного субстрата, метаболизм диетических макроэлементов кишечным сообществом можно условно разделить на три уровня: первичное расщепление макроэлементов, ферментация и утилизация водорода [22]. Соотношение макроэлементов в рационе определяет, какие микроорганизмы получают конкурентное преимущество на каждом из уровней. Метаболическая способность таксона к расщеплению определенного субстрата не является ни достаточным, ни необходимым условием роста таксона при потреблении субстрата хозяином. Для роста также необходимы способность выживать в измененных в результате метаболизма субстрата условиях и “извлекать выгоду” из продуктов расщепления субстрата [167]. Например, представленность бактерий рода *Bacteroides* не увеличивается при употреблении волокон - несмотря на то, что они имеют достаточно широкий спектр ферментов для расщепления полисахаридов [55]. Наиболее вероятным лимитирующим фактором в этом случае является неблагоприятное для роста *Bacteroides* повышение pH среды в результате ферментации [20]. С другой стороны, таксон, обладающий ферментами для расщепления субстрата, может повышаться в представленности при употреблении данного субстрата благодаря симбиозу с другими бактериями.

#### 1.4.2.1 Белки

С точки зрения соотношения макроэлементов, наиболее сильное влияние на состав сообщества оказывает соотношение белков и углеводов в рационе [20]. Питание человека во многом определяет баланс между протеолитической и сахаролитической ферментацией, которую осуществляют кишечные микроорганизмы. Предпочтительным субстратом для большинства бактерий являются сложные и простые углеводы, они перерабатываются микроорганизмами в первую очередь, а расщепление белков происходит при истощении углеводов. Таким образом, в организме человека, употребляющего достаточное количество растительной пищи, протеолитический тип метаболизма у бактерий превалирует только в прямой кишке, в то время как у человека, питающегося преимущественно мясом, оно может наблюдаться и выше в толстом кишечнике [20].

Белки, не подвергнутые расщеплению и всасыванию в верхних отделах ЖКТ, расщепляются в основном представителями родов *Bacteroides*, *Alistipes* и *Parabacteroides*. При этом наибольший вклад, по всей видимости, вносят бактерии рода *Bacteroides*. Для данных бактерий была показана связь с рационом богатым животным белком в описательных [54] и интервенционных исследованиях [55]; преимущественный рост данных бактерий на белковом субстрате был показан в экспериментах *in vitro* [168]. Протеолитический тип питания бактерий приводит к повышению pH просвета кишечника, что дает преимущество представителям *Bacteroides* [28]. При этом образуются такие соединения, как жирные кислоты с разветвленной цепью (англ. branched-chain fatty acids), аммиак, фенольные и индольные соединения [20,169].

В основном исследования метаболизма белков кишечным сообществом касаются животного белка, в то время как влияние растительного белка изучено слабее. Однако имеющиеся исследования указывают на то, что животный и растительный белок оказывают различный эффект на микробиоту [20,24].

#### 1.4.2.2 Жиры

Большая часть жиров, поступающих с пищей, у здорового человека расщепляются и всасываются в тонком кишечнике, и только малая часть достигает толстого. Таким образом, микробиота кишечника человека слабо взаимодействует с пищевыми жирами. В основном влияние жиров на состав микробиоты происходит посредством изменений в выработке желчи и в уровне эндотоксемии [22]. Были выявлены ассоциации между уровнем жиров в рационе и

представленностью ряда микроорганизмов в стуле - например, отрицательная ассоциация с представленностью *Bifidobacterium* и *Eubacterium rectale*, а также *Bacteroides* [134].

#### 1.4.2.3 Углеводы

Говоря о влиянии углеводов на состав кишечного сообщества, необходимо разделить простые сахара - такие, как глюкоза - и сложные сахара, в частности, пищевые волокна, так как оказываемое ими влияние на состав микробного сообщества сильно различается. Простые сахара редко достигают толстого кишечника, в основном их всасывание происходит в тонком кишечнике. Поэтому они в большей степени оказывают влияние на состав сообщества тонкого кишечника, предоставляя конкурентное преимущество быстро растущим бактериям [80]. При высоком уровне простых сахаров в рационе, в стуле наблюдается повышенное содержание типичных представителей тонкого кишечника: *Prevotella copri* (определенные подвиды), *Streptococcus u Veillonella* [20,24].

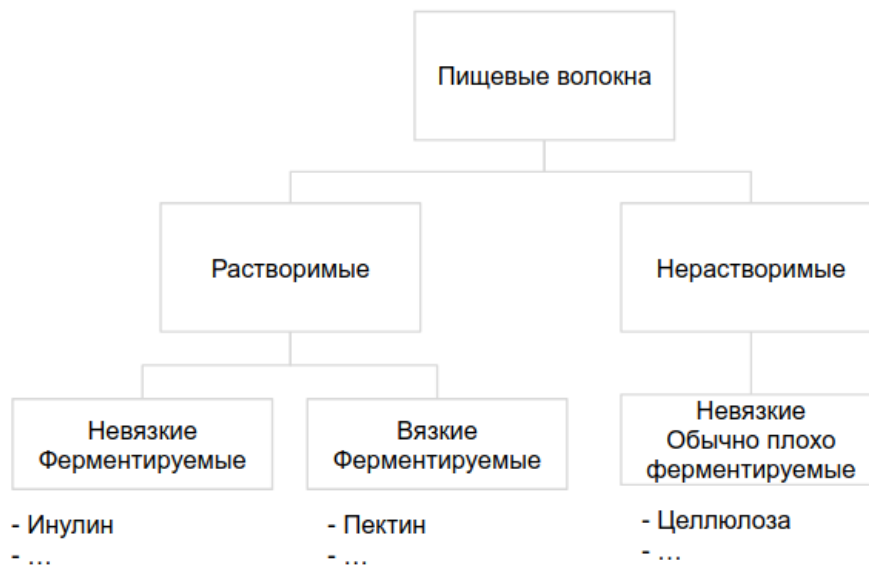


Рисунок 6 - Классификация пищевых волокон (на основе [170]).

Сложные углеводы (олигосахариды и полисахариды) лишь частично расщепляются и усваиваются в тонком кишечнике человека. Не перевариваемые человеком сложные углеводы называются пищевыми волокнами. Прием достаточного количества пищевых волокон ассоциирован с положительными физиологическими эффектами, такими как улучшение перистальтики, стимуляция чувства сытости, снижение артериального давления и концентрации

холестерина в крови [171–175]. Традиционно волокна классифицировались по растворимости, которую связывали с преимущественным физиологическим действием волокон (Рисунок 6). Считалось, что растворимые волокна оказывают положительное влияние на липидный профиль, а нерастворимые - на перистальтику. Однако, на настоящий момент выявлено достаточно много исключений [175]. Помимо растворимости, волокна характеризуются вязкостью и ферментируемостью. Нерастворимые волокна, такие как целлюлоза, обычно плохо ферментируются микробами кишечника, но они способствуют увеличению скорости прохождения пищи через кишечник [176,177]. Считается, что волокна с высокой ферментируемостью, растворимостью и вязкостью, такие как пектин [176], оказывают воздействие как сами по себе (путем замедления всасывания глюкозы и связывания желчных кислот), так и путем воздействия на кишечную микробиоту [178]. Невязкие растворимые волокна, которые легко ферментируются микробным сообществом, включают инулин, устойчивый крахмал и различные олигосахариды (фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды).

Симбиотические отношения между кишечной микробиотой и человеком формировались в условиях превалирования пищевых волокон в рационе человека. По оценкам, в каменном веке содержание волокон в рационе человека в 4 раза превышало текущие рекомендации всемирной организации здравоохранения и в 6 раз - содержание в рационе среднестатистического представителя современного западного мира [20,179]. Пищевые волокна служат основным источником питания микробного сообщества. В основном их ферментация происходит в верхних и средних отделах толстого кишечника, так как они являются предпочтительным субстратом для большей части микроорганизмов [20]. Продукты расщепления сложных углеводов создают в данных отделах кишечника среду с относительно низким рН, тем самым способствуя росту бактерий, устойчивых к кислой среде, таких как *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae* [20]. Рост этих бактерий наблюдается у людей, придерживающихся растительной диеты, как в описательных исследованиях [24,54], так и в интервенционных [55].

Некоторые пищевые волокна являются пребиотиками. Пищевое волокно может быть классифицировано как пребиотик, если имеются научные подтверждения того, что:

- Волокно является резистентным по отношению к кислой среде желудка, гидролизу ферментами пищеварительного тракта человека и всасыванию в верхних отделах пищеварительного тракта;
- Волокно может быть катаболизировано кишечным микробным сообществом;

- Волокно оказывает влияние на рост и активность кишечных бактерий, ассоциированных с полезными физиологическими эффектами [175,176].

На настоящий момент, данные о влиянии пребиотиков на микробное сообщество достаточно разрознены. Исследования отличаются друг от друга протоколами, дозами и продолжительностью приема волокон, методами исследования состава микробиоты. Однако ряд результатов консистентен между исследованиями. Было установлено, что олигосахариды в основном повышают представленность *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* [20,180,181]. Что касается устойчивого крахмала, было показано, что его влияние на микробиом различается не только для разных типов устойчивого крахмала, но и для разных структур одного типа [182,183]. Однако в основном его прием ассоциирован с увеличением представленности *Eubacterium* и *Ruminococcus*, а также бактерий, использующих продукты расщепления устойчивого крахмала для производства масляной кислоты (*Bifidobacterium adolescentis*, *Eubacterium rectale*) [20,167]. Для более глубокого понимания влияния пребиотиков на состав микробного сообщества *in vivo* необходимо проведение плацебо-контролируемых интервенционных исследований по приему отдельных типов волокон на выборках достаточного размера для определения соответствующих биологических эффектов.

#### 1.4.2.4 Другие питательные вещества

Помимо соотношения макроэлементов и различных видов углеводов в рационе, существует ряд других веществ, для которых было показано значительное влияние на состав микробиоты [97]. В частности интересны эффекты, оказываемые различными полифенолами (флавоноидами, изофлавонами, ресвератролом). Существуют исследования, указывающие на то, что флавоноиды оказывают влияние на кишечную проницаемость и на представленность *Akkermansia muciniphila* [97,184]. Изофлавоны не активны в первичной форме, однако они могут быть метаболизированы в активные компоненты кишечными бактериями, например, в эквол. Ключевыми бактериями, способными к превращению изофлавоноидов в эквол, являются представители семейства *Coriobacteriaceae* [97,185]. На модельных животных было показано, что ресвератрол может оказывать положительное влияние на микробное сообщество, состав которого был нарушен питанием, богатым животными жирами. В частности, под действием данного вещества, наблюдался рост *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* и снижение представленности *Enterococcus faecalis* [97,186]. Помимо полифенолов, накапливаются сведения о микробиотно-опосредованном влиянии



на организм хозяина омега-3- и омега-6-ненасыщенных жирных кислот, куркумина, берберина, ряда аминокислот и других веществ [97].

#### 1.4.2.5 Утилизация водорода

Водород, образующийся в результате ферментации бактериями различных субстратов в кишечнике, может быть метаболизирован тремя группами микроорганизмов: метаногенными археями (например, *Methanobrevibacter smithii*), сульфат-редуцирующими бактериями (например, *Desulfovibrio*) и ацетогенными бактериями (например, *Blautia*) [22]. Среди данных бактериальных групп основной и наиболее разнообразной является группа ацетогенов [187]. Что касается метаногенов и сульфат-редуцирующих бактерий, фактором, определяющим преимущество одной из групп по отношению к другой, является наличие сульфата для производства сероводорода, так как энергетически образование сероводорода является более благоприятной реакцией, чем метаногенез [187]. Хотя присутствие двух данных групп бактерий не является взаимоисключающим, было показано, что в кишечнике отдельного человека обычно превалирует одна из них [188].

#### 1.4.3 Влияние на состав микробного сообщества бактерий извне; пробиотики

Бактерии, попадающие в организм извне с пищей или в виде пробиотиков, могут также оказывать влияние на кишечную микробиоту. Наиболее ярко это проявляется у детей, кишечное микробное сообщество которых еще не устоялось: бактерии, поступающие с молоком матери, становятся устойчивыми членами кишечного микробного сообщества [189]. Микробиота взрослых людей в норме достаточно устойчива и обладает низкой восприимчивостью к принесенным извне микроорганизмам [22]. Хотя бактерии из ферментированных продуктов и пробиотиков могут детектироваться в образцах микробиоты человека после употребления, этот эффект, по-видимому, ограничивается периодом приема продукта (за которым обычно следует вымывание) [55,190,191]. Тем не менее, даже являясь транзитными, данные бактерии могут оказывать существенное и стойкое влияние на состав микробиома [22,192,193]. В качестве механизмов влияния может выступать конкуренция за ресурс, производство транзитной бактерией бактериоцинов, влияние на иммунную систему хозяина, кросс-фидинг, изменение свойств среды (например, снижение pH) [192]. Данные механизмы не являются независимыми, но часто тесно переплетены между собой. Так, молочная и уксусная кислоты, производимые такими пробиотическими организмами, как

*Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, способствуют снижению pH, что в свою очередь замедляет рост патогенов и способствует росту *Firmicutes*. Лактат и ацетат при этом также могут служить субстратом для производства масляной кислоты [194,195]. Другим примером является непатогенный штамм *Escherichia coli* Nissle 1917, способный влиять на иммунитет хозяина и одновременно защищать слизистый слой кишечника от адгезии и инвазии патогенных микробов (*Salmonella*, *Shigella*) [196].

Изменение состава микробного сообщества является лишь одним из механизмов влияния пробиотиков на организм хозяина. Среди других механизмов - регуляция иммунитета, нормализация скорости транзита пищи, снижение кишечной проницаемости, производство органических кислот, защита от колонизации патогенами, производство низкомолекулярных соединений, оказывающих систематические эффекты на организм (таких как кортизол, гамма-аминомасляная кислота, гормоны), а также ферментов (гидролазы солей желчных кислот, лактазы) [192]. Согласно определению Всемирной организации здравоохранения, пробиотики - это живые микроорганизмы, которые будучи доставлены в адекватных количествах в организм хозяина, способны оказывать благотворное влияние на его здоровье [197]. Исследования показывают что прием пробиотиков может облегчить течение антибиотик-ассоциированной диареи [41,42], заболеваний почек [198], повысить способность иммунной системы сопротивляться инфекциям [199], снизить симптомы аллергий [47,200]. На сегодняшний день большая часть пробиотиков представляет собой штаммы *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и других кисломолочных бактерий, таких как *Lactococcus*, *Enterococcus* и *Streptococcus*. Реже встречаются представители родов *Bacillus* и *Escherichia* [196]. Помимо бактерий, в качестве пробиотиков могут быть использованы и другие живые микроскопические организмы, один из примеров - дрожжи *Saccharomyces* (*S. boulardii*) [201].

#### **1.4.4 Пересадка микробиоты**

Еще одним способом повлиять на состав микробного сообщества является пересадка фекальной микробиоты (англ. fecal microbiota transplantation). Метод заключается в сборе соответствующего биоматериала от здорового донора и подсаживании его больному реципиенту. Было показано, что при пересадке микробиоты, в отличие от приема пробиотических бактерий, штаммы бактерий донора и реципиента продолжают сосуществовать в микробиоте реципиента длительное время после пересадки - как минимум несколько месяцев [202]. Возможно, это связано с тем, что при

пересадке к реципиенту попадает целое сообщество с установившимися экологическими связями, которое имеет больше шансов удержаться, чем отдельная бактерия-пробиотик. Наибольшее распространение метод получил как эффективное средство борьбы с инфекцией *Clostridium difficile* [203–205]. Кроме того, проводятся исследования применимости метода при воспалительных заболеваниях кишечника [206,207], метаболическом синдроме [89], психоневрологических [208] и аутоиммунных заболеваниях [209].

Несмотря на то, что данный метод продемонстрировал высокий потенциал в лечении ряда заболеваний, его сложно стандартизировать и регулировать, а механизмы, лежащие в его основе, изучены недостаточно. Кроме того, не отработаны методики, которые бы позволили исключить возможные побочные эффекты метода, такие как заражение инфекцией [210], привнесение потенциально опасного резистентного микроба [211] или загрязнение материала микроорганизмами из окружающей среды при пересадке [212]. В связи с этим, ведутся работы по очистке сообщества с созданием полусинтетических аналогов, а также выделению отдельных “живых бактерий-лекарств” (англ. live therapeutics), которые, в отличие от пробиотиков, будут являться средством лечения заболеваний, а не пищевой добавкой.

#### **1.4.5 Степень изменения микробиоты в ответ на интервенции**

В настоящее время накапливаются подтверждения того, что микробиота разных людей в разной степени подвержена изменениям при интервенциях, или, другими словами обладает различной устойчивостью по отношению к ним. Степень изменения микробиоты может быть измерена различными способами, например, как изменение состава микробиоты в целом, изменение представленности определенных видов, альфа разнообразия, уровней микробных метаболитов. При диетических воздействиях с помощью пребиотиков одной из часто используемых мер является изменение уровня масляной кислоты [213] или представленности ее производителей. При воздействиях с использованием пробиотиков или при пересадке микробиоты, степень изменения часто измеряется путем оценки представленности привнесенных таксонов после окончания процедуры [13,202].

Вопрос механизмов наблюдаемой вариации степени изменения микробиоты интересен как с фундаментальной, так и с практической точки зрения. Его исследование может пролить свет на экологические механизмы, лежащие в основе функционирования микробного сообщества [214]; и, с другой стороны, может помочь подобрать оптимальный тип вмешательства для конкретного

человека, направленный на улучшение его здоровья [11,15,16]. В ряде исследований устойчивость микробиоты при внешних воздействиях зависела от особенностей привычного рациона хозяина [14,215,216]. Однако в других исследованиях связи с рационом не наблюдалось [217–219]. Среди факторов, которые также исследовались на предмет связи с устойчивостью при внешних воздействиях - пол, возраст, концентрации определенных метаболитов, а также состав самого микробного сообщества на момент до вмешательства [218,220,221]. В таблице 2 приведены исследования, в которых наблюдалась зависимость устойчивости микробиоты от параметров состава микробиоты до внешнего воздействия. Среди них - альфа разнообразие, представленность специфических таксонов и микробных метаболических путей. В некоторых исследованиях удалось получить классификаторы, которые, основываясь на данных о составе микробиоты до вмешательства, позволяли предсказать степень ее изменения [217,222]. Кроме того, в ряде исследований полученные ассоциации были подтверждены в экспериментах на модельных животных: пересадка микробиоты, обладающей признаками не устойчивой, способствовала более сильным изменениям микробиоты в ходе последующего внешнего воздействия [13,53].

Существующие исследования существенно разнятся в подходах к измерению устойчивости и типах внешних воздействий, что затрудняет сопоставление сделанных в них наблюдений. Однако некоторые ассоциации воспроизводятся в большей части исследований, например, положительная зависимость между устойчивостью и альфа разнообразием [217,221,223–227].

Таблица 2 - Исследования, в которых была обнаружена связь вариации ответа на диетические вмешательства и состава микробиоты до вмешательства

\* в скобках указано направление корреляции со степенью ответа

Исследование	Интервенция	Оценка ответа на интервенцию	Обнаруженные маркеры устойчивости*	
			Микробиомные	Не микробиомные
[223]	10 или 40 г пищевых волокон в течение 5 дней (N=19)	Мера расстояния Jensen Shannon на уровне рода между микробиомом стула до и после интервенции	Разнообразие (-) Представленность <i>Prevotella</i> (-), <i>Coprococcus</i> (-), <i>Dorea</i> (-), <i>Bacteroides</i> (+)	валерат, капроат (-)
[216]	Пребиотик (фруктаны типа инулина) в течение трех недель (N=34)	Мера расстояния невзвешенный UniFrac на уровне ОТЕ между микробиомом стула до и после интервенции	Не исследовались	Не найдено

		Изменение представленности <i>Bifidobacteria</i> в микробиоме стула	Представленность <i>Bifidobacterium</i> (-)	Прием волокон до интервенции (+)
[217]	Диета, обогащенная устойчивым крахмалом, и диета, обогащенная некрахмальными углеводами, в течение 3 недель (N=14)	Корреляция Пирсона между микробным профилем стула до и после интервенции	Разнообразие (-)	Не найдено
[12]	Мета-анализ исследований влияния на микробиоту увеличения приема волокон у людей с метаболическим синдромом и ожирением (или лишним весом) (N=78) [228–230]	Корреляция Пирсона между микробным профилем стула до и после интервенции	Представленность <i>E. ruminantium</i> и <i>C. felsineum</i> (нелинейно)	Не исследовалось
		Изменение представленности <i>Bifidobacterium</i> в микробиоме стула	Представленность <i>Bifidobacterium</i> (-)	Не исследовалось
[14]	На модельных животных (N=20), которым пересадили микробиоту доноров которые придерживаются AMER рациона (типичный американский), исследовали влияние CRON диеты (обогащенной волокнами) в течении 69 дней (часть исследования). До интервенции, часть животных приобрела новые бактерии путем сожительства с животными, которым пересадили микробиоту доноров, которые придерживались CRON рациона.	“community indicator value” (CIV) (показывает насколько сильно микробиота похожа на ассоциированную с AMER и CRON диетами	Изменения CIV в сторону характерного для CRON диеты произошли сильнее в животных, которое приобрели новые бактерии, чем в контрольных животных. Приобретенные бактерии включали 27 OTE (в том числе из родов <i>Bacteroides</i> , <i>Paraprevotella</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Odoribacter</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Lachnoclostridium</i> , <i>Butyricimonas</i> , <i>Bilophila</i> , <i>Barnesiella</i> ).	В исследовании делается вывод о влиянии долговременной диеты на ответ на интервенцию, однако, так как для людей с разными долговременными паттернами питания применялись различные интервенции, то сложно сделать однозначный вывод.

[221]	Высокопротеиновая диета с ограничением калорий (6 недель) и диета для удержания веса (6 недель). Исследовались люди с лишним весом и ожирением (N=49).	Изменение генетического разнообразия микробиоты	Генетическое разнообразие (-) Представленность <i>Clostridium</i> , <i>Clostridiaceae unclassified</i> (-), <i>Ruminococcaceae</i> (-), <i>Pseudoflavonifractor</i> (-), <i>Oxalobacter</i> (-), <i>Odoribacter</i> (-).	Повышенный уровень приема фруктов, овощей и рыбы до интервенции (+). Сниженные показатели инсулинорезистентности, уровня триглицеридов в плазме натощак, липопротеинов низкой плотности и маркеров воспаления (+)
[231]	Прием продукта, содержащего галактоолигосахариды в течение 3х недель (исследовалось несколько различных доз) (N=18).	Изменение представленности <i>Bifidobacterium</i> в микробиоме стула	Представленность <i>Bifidobacterium</i> (-)	Не исследовалось
[232]	Шоколадный напиток, содержащий плацебо (мальтодекстрин) или инулин в день в течение 2 недель (N=30)	Изменение представленности <i>Bifidobacterium</i> в микробиоме стула	Представленность <i>Bifidobacterium</i> (-)	Не исследовалось
[233]	Добавление в рацион одного из 7 различных неперевариваемых углеводов или плацебо (8 групп испытуемых) в течение 1 недели (N=64).	Изменение представленности <i>Bifidobacterium</i> в микробиоме стула	Представленность <i>Bifidobacterium</i> (-)	Не исследовалось
[13]	Добавление в рацион препарата включающего 11 пробиотических штаммов или плацебо (N=15) в течение 4 недель. С последующей проверкой находок, путем пересадки микробиоты респондеров и не респондеров	Изменение представленности <i>Bifidobacterium</i> в микробиоме слизистой	Представленность <i>Bifidobacterium</i> (-) в слизистой нижних отделов ЖКТ	Сниженная экспрессия в клетках стенки желудка генов, связанных с врожденным иммунитетом, активацией Т клеток, и дифференцировкой (+). В стенке тонкого кишечника - снижена экспрессия генов связанных с иммунной системой, и

	МОДЕЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ.			снижена - связанных с метаболизмом ксенобиотиков и пищеварением (+)
[225]	Прием пробиотика <i>Bifidobacterium lactis V9</i> в течение 4 недель (N=59)	Увеличение количества живых <i>Bifidobacterium lactis V9</i> в стуле	Разнообразие (-) Представленность <i>Anaerobacterium</i> (+), <i>Paraprevotella</i> (+), <i>Erysipelatoclostridium</i> (+), <i>Bifidobacterium</i> (-), <i>Flavonifractor</i> (-), <i>Olsenella</i> (-), <i>Butyricoccus</i> (-), <i>Acetanaerobacterium</i> (-), <i>Asaccharobacter</i> (-), <i>Lachnoclostridium</i> (-), <i>Blautia</i> (-) и <i>Lachnospira</i> (-).	Не исследовалось
[224]	Прием пробиотического штамма <i>B. longum</i> или плацебо в течение 2 недель (N=23)	Детекция генов штамма <i>B. longum</i> в микробиоте примерно через 200 дней после окончания интервенции	Разнообразие (-) Представленностью <i>Coriobacteriaceae</i> (-), <i>Collinsella</i> (-), <i>C. aerofaciens</i> (-), <i>B. longum</i> (-), <i>Eggerthella</i> (+) и <i>E. lenta</i> (+). Специфический профиль генов <i>B. longum</i> .	Не исследовалось
[226]	Исследовалось шесть диет различных по типу источника белка - из красного мяса, белого мяса и бобовых и превалированию насыщенных или ненасыщенных жиров в течение 4 недель (N=109)	Бета разнообразие между микробиомами до и после интервенции	Разнообразие (-)	Не исследовалось

## 1.5 Методы анализа микробиоты кишечника

К анализу микробных сообществ можно подойти с нескольких сторон. Во-первых, может стоять задача получения таксономического состава сообщества. Так как микроорганизмы обладают достаточно высокой степенью внутривидовой генетической вариации, отдельной задачей является получение представления о функциях сообщества путем определения его метаболического потенциала, то есть всей совокупности генов. И наконец, для понимания особенностей функционирования сообщества в определенных условиях, необходимо получить информацию об экспрессируемых генах и вырабатываемых метаболитах. Существующие методы анализа

микробиома в разной степени отвечают на обозначенные выше вопросы. В этом разделе будут рассмотрены основные методы анализа таксономического состава микробных сообществ.

К традиционным методам определения таксономического состава микробных сообществ относится выращивание бактерий на селективной среде с последующим морфологическим описанием и биохимическим анализом полученных колоний. Данный метод позволил описать морфологию и биохимические свойства отдельных бактерий. Однако не для всех микроорганизмов известны условия культивирования на селективных средах, кроме того, метод разрушает экологические взаимосвязи между организмами. Он также трудоемок, что делает его непригодным для анализа сложных микробных сообществ.

В дополнение к культивированию развивались другие методы, позволяющие оценить представленность многих видов одновременно. Ряд методов основывался на различиях в нуклеотидной последовательности ДНК представителей сообщества. Например, метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (англ. terminal-restriction fragment length polymorphism, T-RFLP), методы денатурированного и температурного градиентного гель-электрофореза (англ. DGGE, TGGE), полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Однако лишь с появлением методов ДНК секвенирования для анализа микробных сообществ стало очевидно, насколько разнообразие кишечной микробиоты было недооценено [234]. А с появлением методов высокопроизводительного секвенирования стали возможны масштабные исследования включающие сотни и тысячи образцов [17]. Данные методы позволили обнаружить прежде неизвестные таксоны, которые при этом играют ключевые функции в кишечном микробиоме.

В настоящее время наиболее распространенные методы секвенирования можно разделить на два типа: ампликонные и полногеномные. Первый тип методов использует различие в нуклеотидной последовательности определенного участка геномов представителей сообществ, некоторые регионы которого обладают высокой вариативностью между различными видами, другие же консервативны для большинства представителей царства. Такая структура региона позволяет подобрать праймер на основе консервативной части, а затем, нарастив вариативную, и амплифицировав полный участок в ходе реакции ПЦР, секвенировать его с последующим установлением видовой принадлежности. Для бактерий в качестве такого участка наиболее часто выбирают один или несколько регионов гена, кодирующего малую субъединицу рибосом бактерий - 16S рРНК [235]. Полногеномные методы (англ. WGS, whole genome sequencing) основаны на



фракционировании совокупности ДНК сообщества с их последующим секвенированием. Далее путем сравнения с референсными базами можно установить не только таксономический состав, но и метаболический потенциал сообщества, включая гены, содержащиеся в плазидах бактерий, например, гены антибиотикорезистентности. Однако данный метод распространен чуть меньше чем ампликонное секвенирование ввиду своей высокой стоимости.

Наряду с методами, использующими информацию о последовательности ДНК, существуют методы идентификации микроорганизмов по специфическим белкам-маркерам. Один из них - метод спектрофотометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ, англ. MALDI-TOF MS) [236].

Интересным образом культивирование и методы основанные на анализе последовательности ДНК микроорганизмов объединились в подходе называемом культуромика [237]. Метод позволяет получить колонии одновременно в множестве (порядка сотен) условий культивирования и затем использовать времяпролетный спектрофотометр МАЛДИ для идентификации видов микроорганизмов. При этом микроорганизмы, которые не могут быть определены методом спектрофотометрии, идентифицируются методом секвенирования.

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

### **2.1 Методы**

#### **2.1.1 Описание исследуемых групп**

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

Первая группа включала 206 человек; биоматериал (образцы кала) участников был собран в период апрель-июнь 2017 года, всего было две временные точки забора образцов. В исследование вошли здоровые люди старше 18 лет европеоидной расы, развернутые критерии включения и невключения приведены в приложении 1. Для большей части участников данного исследования (170 человек) до забора первого образца микробиоты была собрана информация о поле, возрасте, индексе массы тела, факте приема антибиотиков в течение 3 месяцев, предшествовавших исследованию, частоте употребления пищевых продуктов. Впоследствии на данной группе было проведено исследование влияния на микробиоту диеты, богатой пищевыми волокнами (ДБВ), в связи с чем далее она обозначена как группа исследования ДБВ.

Вторая группа включала 130 человека, биоматериал (образцы кала) был собран в 2017 году. В исследование вошли здоровые люди от 18 до 40 лет европеоидной расы, развернутые критерии включения и невключения приведены в приложении 2. Для 94 участников исследования до забора первого образца была собрана информация о поле, возрасте, индексе массы тела, частоте стула; по образцам кала, собранным у участников, был получена копрограмма и оценен показатель консистенции по Бристольской шкале. Впоследствии на данной группе было проведено исследование влияния на микробиоту приема обогащенного пробиотическими бактериями кисломолочного продукта (ОКП), в связи с этим далее она обозначена как группа исследования ОКП.

#### **2.1.2 Сбор и подготовка образцов микробиоты**

Исследования были одобрены локальными этическими комитетами: исследование ДБВ - ООО “Медицинский Центр Атлас”, исследование ОКП - комитетом ООО “Альянс Биомедикал - Русская

Группа”. Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании. Информация о составе микробиоты была оценена по образцам кала участников. Забор образцов осуществлялся участниками исследований самостоятельно в домашних условиях, участники были проинструктированы о необходимости поместить собранный образец в морозильную камеру бытового холодильника непосредственно после забора. Доставка образца в лабораторию осуществлялась на льду и длилась не более двух часов. Пробоподготовка образцов осуществлялась коллабораторами и подробно описана в публикациях по результатам диссертации. Вкратце, состав микробиома оценивался с помощью секвенирования переменного участка V4 гена 16 рНК (праймеры 515 F (5' - GTGBCAGCMGCCGCGGTAA - 3') [238] и Pro-mod-805 R (5'-GACTACNVGGGTTMTCTAATCC - 3') [239]). Секвенирование производилось на приборе MiSeq (Illumina, США). После обрезания по баллу качества, объединение парных ридов проводилось с помощью пакета SeqPrep.

### **2.1.3 Определение таксономического состава образцов**

Получение таксономического состава образцов микробиоты осуществлялось в среде QIIME v.1.9.2 [240]. Таксономический анализ был проведен путем сопоставления ридов с референсной базой последовательностей гена 16S рНК кишечных микроорганизмов человека HITdb 1.0 [241] по операционным таксономическим единицам (ОТЕ, англ. OTU – operational taxonomic unit) на уровне 97% сходства последовательностей с помощью алгоритма vsearch [242]. База HITdb 1.0 была предварительно подготовлена для работы с ридами заданной длины (252 пн). Последовательности данной базы были обрезаны по используемым праймерам (F515-R806) с помощью программы TaxMan [243]. Последовательности, схожие более чем на 97% после обрезания, были объединены с помощью программы CD-HIT v. 4.8.1 [244]. В случае, если два или более исходных ОТЕ с различной таксономической аннотацией объединялись в один кластер, то есть не могли быть таксономически различены по данному генному фрагменту, таксономия записывалась через символ “/” (например, на уровне рода - “*Escherichia/Shigella*”). После картирования на референсную базу было проведено случайное прореживание ридов в образцах до уровня 5 тысяч классифицированных ридов на образец.

Оценка разнообразия микробного сообщества для каждого образца (альфа разнообразия) была проведена на уровне ОТЕ с помощью меры Шеннона. Бета разнообразие (мера попарного различия между видовыми составами образцов) было оценено на уровне ОТЕ по мере взвешенный

UniFrac. Филогенетическое дерево для модифицированной базы HITdb было получено путем применения программы MUSCLE [245] для множественного выравнивания и ClustalW для последующего построения дерева [246]. Дополнительно была вычислена матрица расстояний по мере Брея-Кертиса для использования в анализах, где было необходимо оценить различие без учета филогенетической близости таксонов.

Относительная представленность микробных ОТЕ, видов, родов и семейств была оценена путем суммирования ридов, приходящихся на ОТЕ (или на ОТЕ, входящие в соответствующий таксон). На каждом уровне таксономии проводилась нормализация вектора признаков к сумме 1 путем деления на суммарное значение ридов на образец. Во всех анализах, кроме поиска сопредставленных групп бактерий, использовались прореженные и нормализованные данные.

#### **2.1.4 Статистический анализ**

Статистический анализ данных проводился в среде R версии 3.6.3 [247]. Для анализа корреляционной структуры микробиотных данных был проведен поиск сопредставленных групп бактерий на уровне родов с помощью алгоритма SPIEC-EASI v. 1.0.6 [248]. Алгоритм применялся для каждой из исследуемых групп в отдельности. На вход данного алгоритма подавались непрореженные и ненормализованные данные. Только рода с представленностью более 20 ридов в более чем 20 образцах были учтены в анализе. Среди методов определения корреляционных связей, реализованных в алгоритме SPIEC-EASI, был выбран метод Meinshausen-Bühlmann. Алгоритм StARS был использован для выбора параметра разреженности лямбда (количество подвыборок - 50, количества лямбда итераций - 10, минимальное значение лямбда 0.2). После установления связей, кластеры со-представленных бактерий были определены с помощью метода Лувейна [249]. Представленность данных кластеров бактерий в образцах микробиоты была использована на дальнейших этапах анализа, таких как анализ ассоциаций между факторами и составом микробиоты, наравне с представленностью бактерий на различных таксономических уровнях.

Перед исследованием связи между микробиотными показателями и внешними факторами, значения непрерывных факторов были логарифмированы в случаях, когда характер распределения значений фактора был отличен от нормального согласно критерию Шапиро-Уилка. Информация о частоте употребления продуктов была преобразована путем объединения продуктов в обобщенные

категории, такие как овощи, сладкое, крахмал, молочные продукты, мясо, фрукты, злаки, жиры, алкоголь.

Оценка вариации состава микробиоты, объясненной внешними факторами, проводилась с помощью алгоритма PERMANOVA для категориальных факторов и dbRDA - для непрерывных факторов (функция `adonis` пакета `vegan` в R), при этом расстояние между образцами оценивалось по мере взвешенный UniFrac. Поправка на множественное сравнение проводилась с помощью метода Бенджамини-Хохберга, позволяющего контролировать ошибку первого рода (false discovery rate, FDR). Анализ проводился для каждой из исследуемых групп в отдельности (N1=170, N2=94) для всех факторов, кроме индекса массы тела (ИМТ), пола и возраста, данные по которым имелись для обеих групп. Для последних факторов анализ проводился по всем доступным образцам (N=264) с поправкой на группу.

Анализ ассоциаций между относительной представленностью бактерий на различных таксономических уровнях и значениями факторов проводился с использованием линейных моделей. Только таксоны, имеющие представленность более 0,2% не менее чем в 15 образцах, были учтены в данном анализе. При этом значения представленности бактерий были предварительно преобразованы путем вычисления арксинуса с последующим извлечением квадратного корня, что позволило приблизить распределения этих значений к нормальному. Для факторов, собранных в каждой из исследуемых групп (ИМТ, пол, возраст), анализ ассоциаций проводился сквозь исследуемые группы на полном наборе образцов (N=264) с поправкой на группу. Также проводилась поправка на пол при анализе ассоциаций с возрастом, и на пол и возраст - при анализе ассоциаций с ИМТ. Данный порядок включения поправок соответствовал порядку уменьшения доли дисперсии, объясненной каждым фактором. Для остальных факторов анализ проводился в каждой из исследуемых групп в отдельности, при этом в группе исследования ДБВ модель была включена поправка на пол, возраст, ИМТ и факт приема антибиотиков в течении трех месяцев до исследования, а в группе исследования ОКП - на пол, возраст и ИМТ (факт приема антибиотиков являлся критерием исключения в исследовании ОКП). В анализе использовались уровни представленности бактерий на разных таксономических уровнях, от типа до вида, а также на уровне со-представленных групп бактерий. Поправка на множественное сравнение проводилась с помощью метода Бенджамини-Хохберга отдельно на каждом из таксономических уровней.

Анализ ассоциаций между альфа разнообразием (индексом Шеннона) и факторами проводился по сходной схеме, за исключением арксинус-преобразования с извлечением

квадратного корня. В случае анализа альфа разнообразия подобное преобразования не проводилось, так как характер распределения данной величины был близок к нормальному.

## 2.2 Результаты

### 2.2.1 Анализ таксономического состава микробиоты участников исследования

Таксономический состав микробиоты участников исследования был достаточно разнообразен и в общих чертах соответствовал ранее описанному составу кишечных метагеномов населения Российской Федерации, полученных с помощью полногеномного секвенирования микробиома [250]. Преобладающие таксоны - на уровне родов - для двух проанализированных групп (группы исследования ДБВ и ОКП) приведены на рисунке 7.

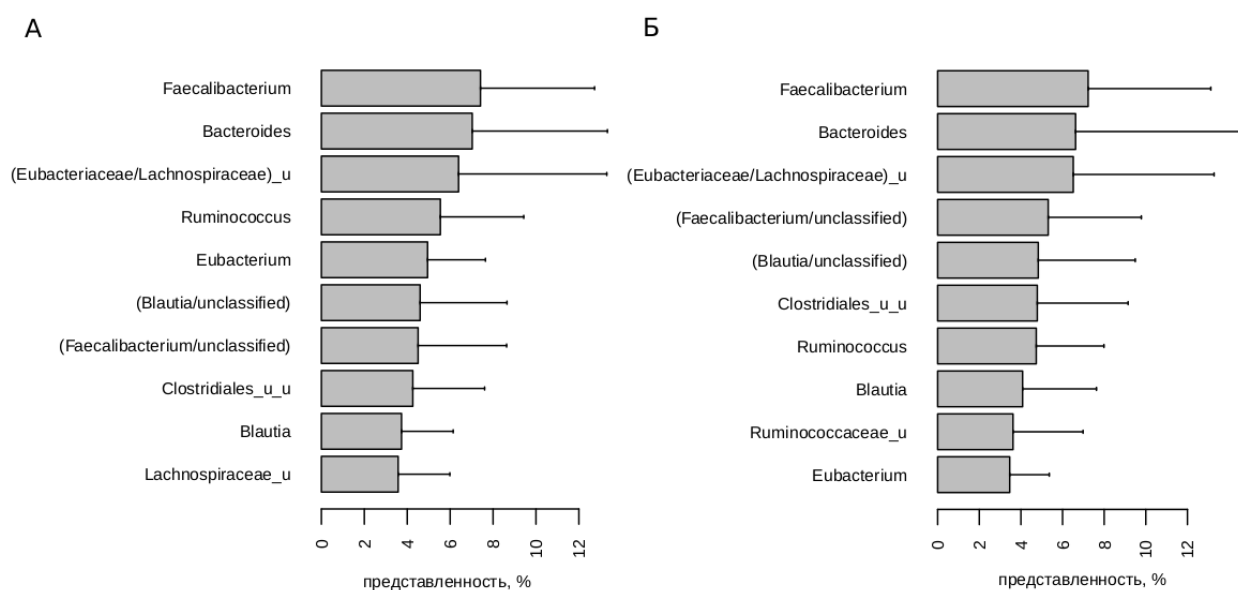


Рисунок 7 - Преобладающие рода в группах исследования ДБВ (А) и ОКП (Б). Суффикс “\_u” или обозначение “unclassified” используется здесь и далее для обозначения таксонов, не классифицируемых на рассматриваемом таксономическом уровне. Разделитель “/” между двумя и более наименованиями таксонов используется здесь и далее для обозначения таксонов, не различимых на рассматриваемом таксономическом уровне вследствие неуникальности последовательности региона V4 гена 16S. В этом случае, в отличие от первого, возможно указать конечный список таксонов из использованной базы с неразличимыми регионами (см. Методы).

Как видно из данного рисунка, множества преобладающих таксонов достаточно сильно пересекались между двумя исследуемыми выборками. Анализ, проведенный с помощью метода главных координат (англ. PCoA), также показал, что в целом выборки достаточно схожи по таксономическому составу (Рисунок 8). Несмотря на то, что визуально два облака данных в первых

главных координатах перекрываются, статистический анализ показал, что вторая и третья главные координаты, объясняющие 10.5% и 7.2% дисперсии, значимо ассоциированы с выборкой (критерий Манна-Уитни,  $p = 0.0004$  и  $0.0041$ , соответственно). Критерий PERMANOVA, показал, состав микробиоты в целом значимо различается между группами ( $p = 0.026$ ) и доля дисперсии, объясненная этим фактором, составляет 0.93%. В связи со значимыми различиями между группами, дальнейшие статистические процедуры, в которых группы были объединены, были проведены с поправкой на группу.

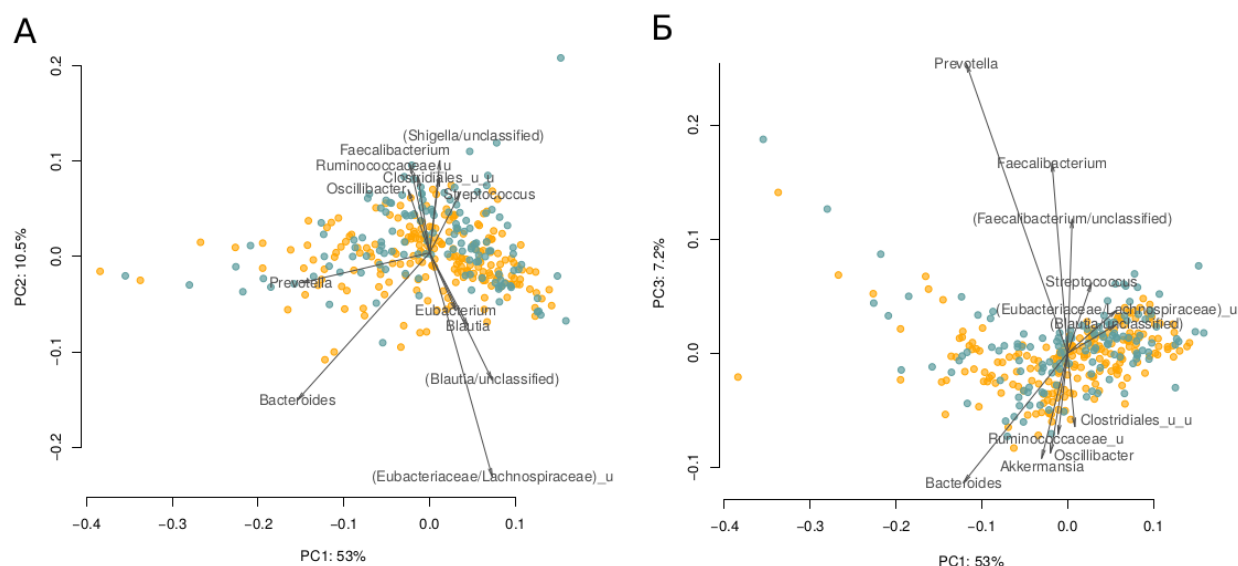


Рисунок 8 - Разброс таксономического состава образцов из исследований ДВБ (красный цвет, N=206) и ОКП (синий цвет, N=130), изображенные в пространстве первых главных координат с помощью метода главных координат (PCoA) по мере взвешенный UniFrac: А - первая (PC1) и вторая (PC2) главные координаты, Б - первая и третья (PC3) главные координаты.

### 2.2.2 Сопредставленные группы бактерий в исследуемых группах

Группы бактериальных родов, между представленностью которых наблюдалась прямая зависимость, были определены путем корреляционного анализа. Анализ проводился в каждой из исследуемых групп в отдельности. С помощью алгоритма SPIEC-EASI были получены пары сопредставленных таксонов, на основе чего был построен граф, отражающий все найденные связи. На основании кластерного анализа графов сопредставленности, для каждой из групп были получены микробные кооперативы - группы бактериальных родов, встречающихся вместе (Рисунок 9). Устойчивость полученных кооперативов была подтверждена воспроизводимостью их состава

при повторных запусках алгоритма построения графа (алгоритм SPIEC-EASI обладает стохастическими свойствами).

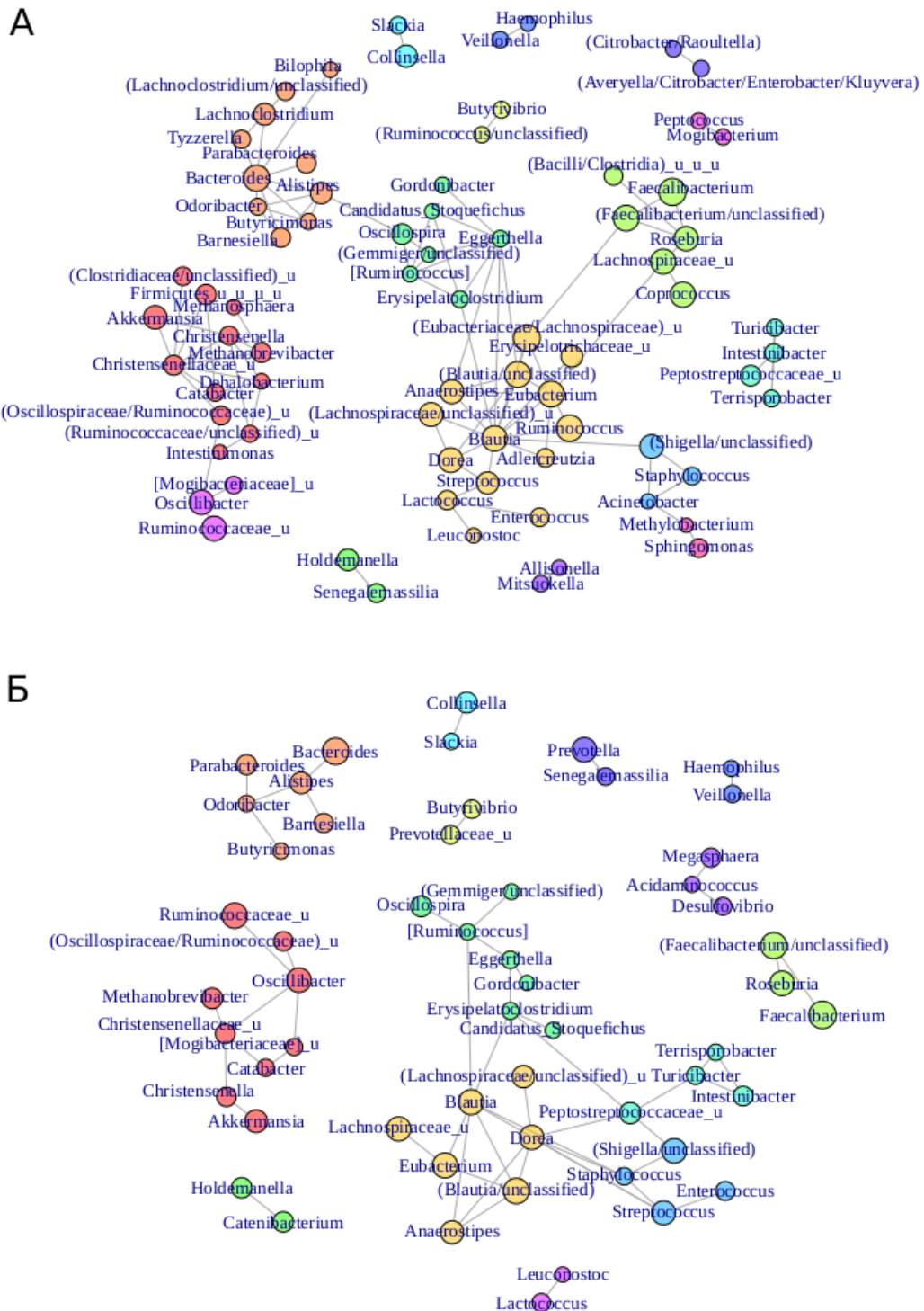


Рисунок 9 - Сопредставленные группы бактерий в исследовании ДБВ (А) и ОКП (Б). Цветом обозначены различные кооперативы. Кооперативы, схожие между двумя группами, обозначены одинаковым цветом на рисунках А и Б. На рисунке показаны только кооперативы содержащие более одного микроорганизма.



Интересным образом, наблюдалась консистентность парных связей между микроорганизмами в двух независимых группах. В обеих группах был обнаружен кооператив, образованный связями бактерий *Akkermansia*, *Methanobrevibacter*, *Catabacter*, *Christensenella*, а также неклассифицированными родами из семейства Ruminococcaceae и некоторыми другими таксонами. Кооператив, в котором доминирует род *Bacteroides*, также прослеживается в каждой из двух исследуемых групп. Его основу составили бактерии, ассоциированные с рационом, богатым животным белком - *Alistipes*, *Bacteroides*, *Odoribacter* и *Parabacteroides* [54,55,159]. В каждой из групп присутствует кооператив, включающий рода *Faecalibacterium* и *Roseburia* - основных продуцентов масляной кислоты в кишечнике человека, специализирующихся на расщеплении пищевых волокон [20,96,251]. Это не единственный кооператив, общий между группами, где присутствуют производители масляной кислоты. Кооператив, в котором доминирует род *Blautia*, также содержит в себе рода *Anaerostipes* и *Eubacterium*, способных к синтезу масляной кислоты из уксусной и молочной [25,27,50]. Для краткости в тексте ниже кооперативы обозначены согласно наиболее представленному в кооперативе таксону (например, *Akkermansia*-кооператив).

*Ассоциации между составом микробиоты, антропометрическими факторами, долговременным рационом питания и характеристиками стула*

Как описано выше, большинство собранных внешних факторов, различалось в двух исследованиях. Для большей части участников исследования ДБВ (170 человек) была собрана информация о частоте употребления различных продуктов, поле, возрасте, индексе массы тела, факте приема антибиотиков в течение 3 месяцев, предшествовавших исследованию. Распределение значений данных признаков в выборке показано на рисунке 10.

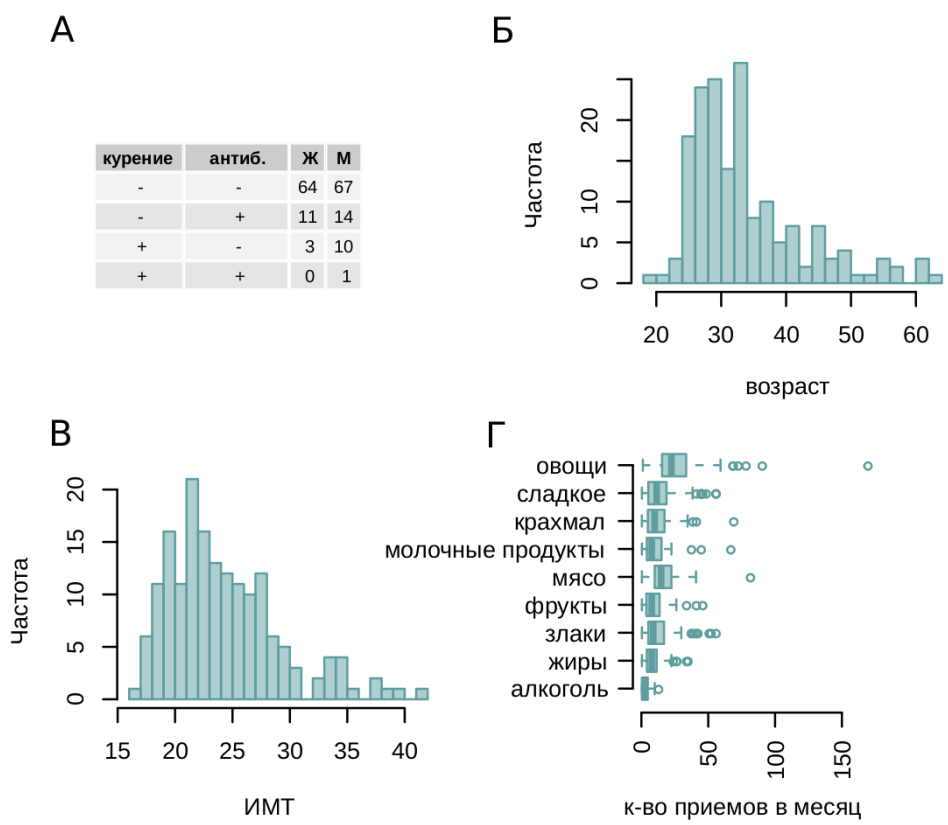


Рисунок 10 - Статистика метаданных в первой временной точке для участников исследования ДБВ: А - распределение участников по полу (М - мужской, Ж - женский), факту приема антибиотиков менее чем за три месяца до исследования (антиб.) и текущему статусу курения. Б - распределение участников по возрасту, В - индексу массы тела, Г - частоте употребления различных групп продуктов.

Для 94 участников исследования ОКП была собрана информация о поле, возрасте, индексе массы тела, частоте стула; по образцам кала, собранным у участников, была получена копрограмма и оценен показатель консистенции по Бристольской шкале. Распределение данных признаков в выборке показано на рисунке 11.

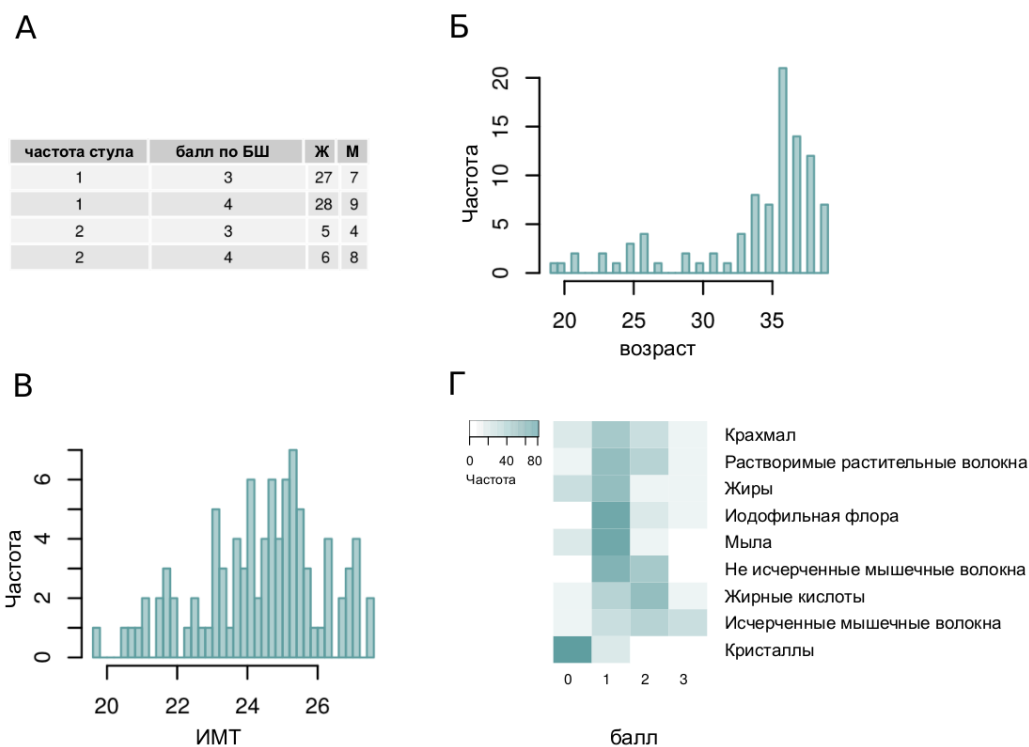


Рисунок 11 - Статистика метаданных в первой временной точке для участников исследования ОКП. А - распределение участников по полу (М - мужской, Ж - женский), частоте стула и баллу по Бристольской шкале кала (БШ). Б - распределение участников по возрасту, В - индексу массы тела, Г - баллам по показателям анализа Копрограмма.

Как видно, в обоих исследованиях была собрана информация о антропометрических показателях участников (пол, возраст, ИМТ). Поэтому ассоциации с составом микробиоты антропометрических показателей были проанализированы на объединенном наборе данных (N=264). Анализ вариации, объясненной антропометрическими показателями, не дал значимых результатов (PERMANOVA FDR > 0.05). Также не было найдено ассоциаций между данными факторами и альфа разнообразием (FDR > 0.05). При анализе ассоциаций на уровне отдельных таксонов были найдены значимые корреляции между полом участников исследований и представленностью кооператива *Bacteroides* (FDR 0.0718, N=264): данный кооператив характеризовался более высокой относительной представленностью у женщин. При этом у женщин была снижена представленность вида, близкородственного *Roseburia hominis* (FDR 0.0636, N=264) (близкородственный вид согласно структуре базы HITdb представляет собой ближайший культивируемый вид, установленный на основе сходства последовательностей). Индекс массы тела был положительно ассоциирован с представленностью вида, близкородственного *Eubacterium*

*desmolans* (FDR 0.0636, N=264), а отрицательно - с представленностью *Bacteroides cellulosilyticus/timonensis* (FDR 0.0924, N=264).

Анализ ассоциаций между микробиотой и факторами, собранными в исследовании ДБВ (информация о рационе питания) (N=170), с поправкой на антропометрические факторы и факт приема антибиотиков менее чем за 3 месяца до исследования выявил значимые ассоциации для альфа разнообразия и представленности отдельных таксонов. Альфа разнообразие было положительно ассоциировано с частотой употребления овощей, фруктов и мяса (N=170 человек, FDR 0.0192, 0.0324, 0.0324 соответственно, Рисунок 12). Факт приема антибиотиков был отрицательно ассоциирован с альфа разнообразием (N=170, FDR 0.0324, в данном случае поправка осуществлялась только на пол, возраст и ИМТ).

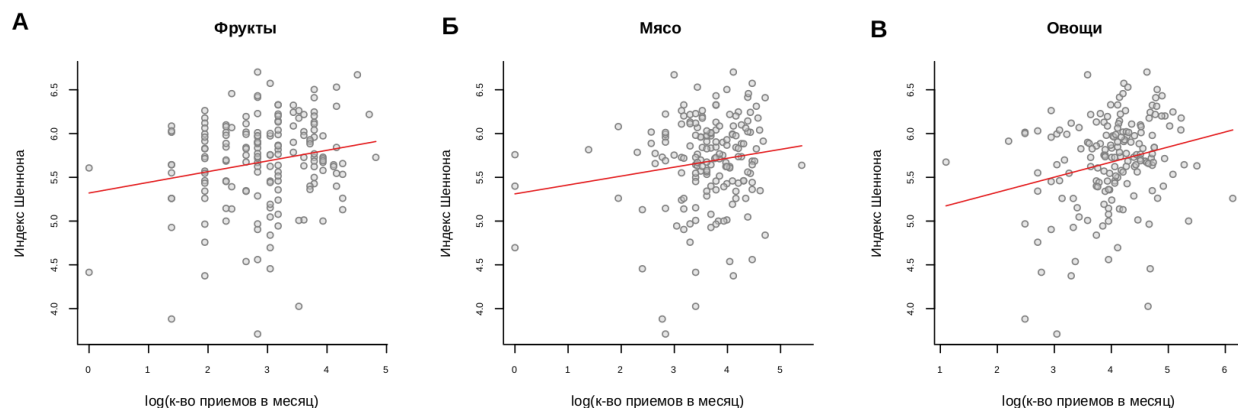


Рисунок 12 - Значимые зависимости между рационом и альфа разнообразием (индекс Шеннона) кишечного сообщества (N=170).

Также были найдены значимые ассоциации между представленностью отдельных таксонов и рационом, результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Значимые ассоциации между представленностью бактерий и рационом, полученные с помощью линейной регрессии (колонка Фактор означает продукт, частота приема которого в месяц была проанализирована).

Фактор	Таксон	Уровень	Коэффициент	P value	FDR
Молочные продукты	<i>Bacilli</i>	класс	0.0187	0.00002	0.00369
	<i>OTU1254 NN=Streptococcus_vestibularis_AY188353 D=96.7/Streptococcus_salivarius/Streptococcus_thermophilus*</i>	вид	0.0191	0.00000	0.00530

Молочные продукты

	<i>Streptococcaceae</i>	семейство	0.0181	0.00003	0.007823
	<i>Lactobacillales</i>	порядок	0.0181	0.00006	0.008801
	<i>Streptococcus</i>	род	0.0173	0.00003	0.016836
Фрукты	<i>OTU525 NN=Clostridium_clariflavum_NR_102987.1 D=78.1</i>	вид	0.0104	0.00003	0.021204
Мясо	<i>Coriobacteriales</i>	порядок	0.0156	0.00085	0.065420

\* - Обозначение близкородственного вида в базе HITdb (NN - ближайший сосед (nearest neighbour), D - мера сходства последовательностей при глобальном выравнивании)

Поиск ассоциаций между составом микробиоты и характеристиками образца стула на группе ОКП также показал наличие некоторых интересных зависимостей. Для альфа разнообразия значимых ассоциаций не было обнаружено. На границе значимости находилась отрицательная ассоциация с показателем копрограммы “растворимые растительные волокна” (N=94, FDR 0.0644, Рисунок 13). Данный показатель характеризуют присутствие в стуле остатков пищи, которая в норме должна быть переварена. Появление перевариваемой клетчатки наблюдается в основном при ускоренной эвакуации пищи из кишечника и также при нарушениях функции поджелудочной железы, оба фактора могут оказывать влияние на состав поступающих к микробному сообществу питательных веществ.

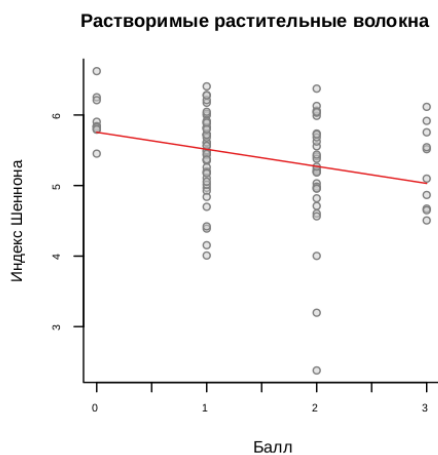


Рисунок 13 - Зависимость между баллом копрограммы по показателю “растворимые растительные волокна” и альфа разнообразием (индекс Шеннона) кишечного сообщества (N=94).

Ассоциации между характеристиками стула и относительной представленностью бактерий приведены в таблице 4.

Таблица 4 - значимые ассоциации между представленностью бактерий и характеристиками стула, полученные с помощью линейной регрессии (N=94).

Фактор	Таксон	Уровень	Коэффициент	P value	FDR
Йодофильная флора	Кооператив <i>Akkermansia</i>	кооператив	-0.0585	0.0010	0.0752
	<i>Oscillospira</i>	род	-0.0128	0.0001	0.0232
Мыла	<i>Intestinibacter</i>	род	0.0168	0.0001	0.0232
	Кооператив <i>Peptostreptococcaceae</i>	кооператив	0.0197	0.0010	0.0752
	<i>Erysipelotrichia</i>	класс	0.0399	0.0001	0.0032
	<i>Erysipelotrichales</i>	порядок	0.0400	0.0000	0.0038
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	семейство	0.0400	0.0000	0.0072

## 2.3 Обсуждение

В данном разделе работы были проанализированы составы микробиоты участников двух интервенционных исследований до начала интервенции. Были проведены сравнения состава двух исследуемых групп и корреляционный анализ структуры родового состава каждой из них. Кроме того, были оценены связи между составом микробиоты и рационом питания, характеристиками стула и антропометрическими данными.

Группы исследований ДБВ и ОКП значительно различались между собой по составу микробиоты, несмотря на идентичность протоколов сбора образцов и пробоподготовки, а также то, что их представители принадлежали к одной популяции. Причинами данных различий могут быть небольшие различия в критериях включения и исключения (см. Приложения 1, 2), а также различия в нерегламентированных технических особенностях проведения экспериментов в разных лабораториях. Однако данные различия не затронули доминирующие таксоны; кроме того, в группах прослеживалась схожая корреляционная структура между таксонами. Наблюдаемые в группах кооперативы могут отражать симбиотические связи между микроорганизмами, представлять собой сообщества занимающие одну экологическую нишу, или схожим образом регулируемые внешними факторами. Некоторые из наблюдаемых корреляций могут быть

интерпретированы с использованием концепции кросс-финдинга. Например, в *Akkermansia*-кооперативе может иметь место кросс-финдинг между бактериями, разлагающими сложные полисахариды растительного (*Ruminococcaceae*) и эндогенного (мукус, *Akkermansia*) происхождения с образованием водорода, и метаногенными археями (*Methanobrevibacter*), которые используют водород для производства метана [18,25]. Для некоторых бактерий данного кооператива связи наблюдались и в предыдущих исследованиях: в исследовании Goodrich et. al. *Christensenella* являлась центром кластера наследуемых микробов, ассоциированных с низким ИМТ, одним из которых был *Methanobrevibacter*. Представленность другого члена кооператива - *Akkermansia* - также была неоднократно ассоциирована с нормальным ИМТ [60]. После публикации результатов данной работы, наблюдаемая сопредставленность *Christensenella* и *Methanobrevibacter* была подтверждена в экспериментах *in vitro* со ссылкой на данную работу [252]. В группе исследования ОКП кооператив также включает в себя бактерию *Oscillibacter*, которая также ранее была отрицательно ассоциирована с ожирением [253,254]. В группе исследования ДБВ *Oscillibacter* с некоторыми неклассифицированными *Ruminococcaceae* и *Mogibacteriaceae* выделились в отдельный кооператив.

Другой возможный пример кросс-финдинга представляет собой кооператив в котором доминирует *Blautia*. Он включал в себя бактерии производящие масляную кислоту из ацетата и лактата: *Anaerostipes* и *Eubacterium* [25,27,50]. Ацетат, в свою очередь, является продуктом метаболизма *Blautia* [255]. Интересным образом, в одной из групп данный кооператив содержал также и бактерии, производящие лактат - *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*.

Другой кооператив, содержащий продуцентов масляной кислоты, *Faecalibacterium* и *Roseburia*, можно рассматривать как пример корреляции между бактериями, занимающими сходную нишу. Данные микроорганизмы производят масляную кислоту из полисахаридов растительного происхождения [20,96,251]. В группе ДБВ, данный кооператив включает в себя *Coprococcus*, который также известен своей способностью к производству масляной кислоты [5,251].

*Bacteroides*-кооператив предположительно также представляет собой группу бактерий, занимающих одну нишу. Он включает ряд бактерий ассоциированных с рационом богатым продуктами животного происхождения: *Alistipes*, *Bacteroides*, *Odoribacter* и *Parabacteroides* [54,55,159]. Кроме того, представители типа *Bacteroidetes*, к которому принадлежит большинство бактерий данного кооператива, увеличивались в представленности при моделировании *in vitro*

рациона, богатого белком [168]. Сам же род *Bacteroides* считается одним из основных протеолитических таксонов кишечника человека [20].

В обеих группах наблюдается кооператив бактерий *Slackia* и *Collinsella*. Известно, что *Slackia* участвует в метаболизме изофлавонов [256,257]. Имеются данные о том, что уровень *Collinsella* также повышался при рационе, богатом соевыми изофлавонами [258].

Два кооператива из реплицированных в исследуемых группах, содержат бактерии ассоциированные с нарушениями работы ЖКТ. Микроорганизмы *Veillonella* и *Haemophilus*, составляющие один из кооперативов, характерны скорее для верхних отделов пищеварительного тракта - ротовой полости, пищевода и тонкого кишечника [20,259,260]. Обнаружение в кале бактерий характерных для верхних отделов пищеварительного тракта ассоциировано с рационом, богатым простыми сахарами [20]. В предыдущих исследованиях также наблюдалась со-представленность данных микробов, как в микробиоте ротовой полости, так и кишечника, а также их ассоциация с воспалительными заболеваниями кишечника [34,261] и циррозом печени [262].

Также в обеих группах представлен кооператив, содержащий (*Shigella/unclassified Enterobacteriaceae*) и *Staphylococcus*. Обычно в результате определения таксономии по данным секвенирования региона V4 гена 16S рНК к роду (*Shigella/(unclassified Enterobacteriaceae)*) относятся в том числе прочтения, пришедшие от *Escherichia coli* [263]. Высокая представленность этих микробов - один из признаков дисбаланса в кишечном сообществе [39]. Так как данные микроорганизмы являются факультативными анаэробами, в отличие от большинства членов комменсального микробного сообщества, они менее чувствительны к окислительному стрессу и воспалению.

Анализ ассоциаций состава микробного сообщества с антропометрическими данными, рационом и характеристиками стула выявил некоторые ранее не известные зависимости, а также подтвердил и углубил некоторые, найденные ранее. Связь между представленностью *Bacteroides* и полом резонирует с наблюдениями сделанными *Vanderputte* с соавторами [142]. Авторами было показано, что *Bacteroides* характеризуется большей относительной представленностью в более твердом стуле по сравнению с *Prevotella*. При этом более твердый стул наблюдался у женщин чаще, чем у мужчин [142].

При анализе рациона больше всего ассоциаций найдено для частоты употребления молочных продуктов. Данная характеристика была ассоциирована с повышенной



представленностью бактерий *Streptococcus*, предположительно *Streptococcus thermophilus*, и отражена на различных таксономических уровнях от вида (*Streptococcus salivarius/thermophilus*/(близкородственный *vestibularis*)) до класса *Bacilli*. *Streptococcus thermophilus* является бактерией, часто используемой в качестве компонента заквасок в молочной промышленности. Также было показано, что данная бактерия способна выживать в пищеварительном тракте человека, в том числе достигая толстого кишечника [190]. Были найдены ассоциации между частотой употребления фруктов и представленностью бактерии, близкородственной *Clostridium clariflavum*, которая известна способностью расщеплять не перевариваемые человеком сложные углеводы [264]. Частота употребления мяса положительно коррелировала с представленностью порядка *Coriobacteriales*.

Среди характеристик стула, значимые ассоциации были обнаружены для параметра “иодофильная флора”, а также “мыла”. Наиболее интересной представляется корреляция между мылами в кале и представленностью таксонов *Erysipelotrichaceae* и *Intestinibacter*. Мыла - это видоизмененные остатки неусвоенных жиров. Мыла могут быть детектированы в кале при нарушениях расщепления жиров в результате недостатка пищеварительных ферментов и желчи. В данный момент накапливаются доказательства роли бактерий семейства *Erysipelotrichaceae* в метаболизме жиров: повышенная представленность бактерии ассоциирована с неблагоприятным липидным профилем хозяина [265]. Интересно, что детектирование мылов в кале также является отражением нарушения метаболизма липидов хозяином.

Полученные в данном разделе результаты позволяют расширить понимание взаимосвязи различных бактерий между собой в кишечном сообществе, а также зависимость их представленности от внешних факторов.

## Глава 3. Влияние кратковременных диетических интервенций на состав микробиоты

### 3.1 Методы

#### 3.1.1 Описание исследуемых групп

В данном разделе работы было проанализировано влияние кратковременных диетических интервенций на кишечный микробиом в двух описанных выше группах. В рамках исследования влияния диеты богатой волокнами (ДБВ) 206 человек в течение двух недель изменили свое питание увеличив в нем количество пищевых волокон. Рекомендации по увеличению частоты приема определенных продуктов, богатых волокнами, были выработаны диетологом на основе анализа индивидуальных результатов опроса по питанию, который заполняли участники. В рамках исследования влияния обогащенного кисломолочного продукта (ОКП) 130 человека в течение месяца ежедневно употребляли 250 мл кисломолочного продукта, обогащенного культурой *Bifidobacterium animalis* подвида *lactis* штамма ВВ-12 в количестве  $10^7$  КОЕ/г. Используемый штамм *Bifidobacterium animalis* считается пробиотическим, было показано, что его прием подавляет размножение патогенов, улучшает барьерную функцию кишечника и состояние иммунной системы [266].

Для обеих групп были собраны образцы микробиоты (стул) непосредственно перед началом и по завершении интервенций. Сбор, подготовка и биоинформатический анализ для образцов в первой временной точке описаны в главе 2. Сбор, подготовка и получение таксономического профиля для образцов во второй временной точке проводились теми же методами, что и для образцов в первой временной точке. Эффект интервенций на состав кишечного сообщества был оценен путем парного сравнения профилей микробиома до и после интервенции. Подробное описание статистических процедур для осуществления данного сравнения приведено ниже.

Для корректной оценки изменений происходящих в ходе интервенции необходимо иметь представление о внутрииндивидуальных колебаниях микробиома без изменения рациона, о межиндивидуальных различиях, а также искажениях, которые могут быть внесены при обработке образцов. Для оценки данных значений в период апрель-июнь 2017 года были собраны образцы от дополнительных групп участников. 10 образцов от 5 человек были собраны одновременно для оценки вариабельности вносимой на этапе подготовки образцов. 10 образцов от одного человека

были собраны с временными промежутками в три дня для оценки изменений, происходящих в микробиоме без изменения рациона. Для той же цели были собраны 17 образцов от 7 человек, однако в данном случае был выбран больший временной промежуток, две недели. Сбор, подготовка и получение таксономического профиля образцов проводились методами аналогичными описанным в главе 2.

### **3.1.2 Статистический анализ**

Статистический анализ данных проводился в среде R версии 3.6.3. Оценка изменения состава микробиоты в целом в ходе интервенции проводилась с помощью алгоритма PERMANOVA (функция `adonis` пакета `vegan` в R), расстояние между образцами оценивалось по мере взвешенный UniFrac. При этом пермутации проводились со стратификацией по номеру участника исследования (перемешивались метки до и после, однако образцы разных участников не перемешивались). Анализ проводился для каждой из исследуемых групп в отдельности ( $N_1=206 \times 2$ ,  $N_2=130 \times 2$ ).

Анализ изменения представленности различных таксонов в ходе интервенции проводился с использованием обобщенной линейной модели, при этом номер участника использовался в качестве случайного эффекта. Только бактерии, имеющие представленность более 0.2% более чем в 15 образцах, были учтены в данном анализе. При этом значения представленности бактерий были предварительно преобразованы путем вычислений арксинуса с последующим извлечением квадратного корня, что позволило в некоторой степени приблизить распределения этих значений к нормальному. Анализ проводился для каждой из исследуемых групп в отдельности ( $N_1=206 \times 2$ ,  $N_2=130 \times 2$ ). В анализе использовались представленности бактерий на разных таксономических уровнях, от типа до вида, а также на уровне со-представленных групп бактерий. Поправка на множественное сравнение проводилась с помощью метода Бенджамини-Хохберга отдельно на каждом из таксономических уровней (вычисление ошибки второго рода, FDR). Значимыми считались ассоциации с  $FDR < 0.05$  для исследования ДБВ и 0.1 для исследования ОКП (разница обусловлена различием в размере выборки в двух исследованиях).

Анализ изменения альфа разнообразия в ходе интервенции (индекса Шеннона) проводился с помощью обобщенной линейной модели с использованием номера участника в качестве случайного эффекта.

## 3.2 Результаты

### 3.2.1 Вариабельность состава кишечной микробиоты

Как было сказано выше, состав микробного сообщества достаточно стабилен во времени и, в общем случае, различия между видовым составом сообщества двух разных индивидов более выражены, чем различия между двумя образцами одного индивида, собранными с небольшим временным промежутком [8]. Кроме того, существует ряд факторов, которые влияют на результат секвенирования и, таким образом, на наблюдаемый состав микробиома. Таким образом, для корректной интерпретации изменений, произошедших в результате диетических вмешательств, необходимо оценить вариабельность, возникающую на этапе подготовки образцов, между образцами одного индивида без изменения питания и между разными индивидами.

Для этого анализа были сформированы дополнительные группы участников и образцов, позволившие оценить вариабельность между:

- техническими репликами на этапе транспортировки образца от добровольца в лабораторию (были использованы 10 образцов от 5 человек, на Рисунке 14 обозначение “техн.репл.”);
- образцами, собранными от одного индивида с промежутком в 3 дня (10 образцов от двух человек, “внутриинд.3”);
- образцами, собранными от одного индивида с промежутком в 2 недели без изменения им пищевого поведения (17 образцов от 7 человек, по 2-3 временные точки, “внутриинд.14”).

Было проведено сравнение полученных значений вариабельности с различиями, полученными в результате диетических интервенций:

- между образцами, собранными от одного индивида с промежутком в 2 недели в исследовании ДБВ (412 образцов от 206 человек, “внутриинд.ДБВ”);
- между образцами, собранными от одного индивида с промежутком в 2 недели в исследовании ОКП (260 образцов от 130 человек, “внутриинд.ОКП”).

Также было проведено сравнение с межиндивидуальными различиями:

- между образцами индивидов в каждой из исследуемых групп ДБВ и ОКП в точке до диетического вмешательства (130 и 206 образцов, “межинд.внутригрупп.”);
- между образцами индивидов из разных групп ДБВ и ОКП до диетического вмешательства (130 и 206 образцов) (на Рисунке 1 обозначение “межинд.межгрупп.”).

Результаты сравнения приведены на рисунке 14.

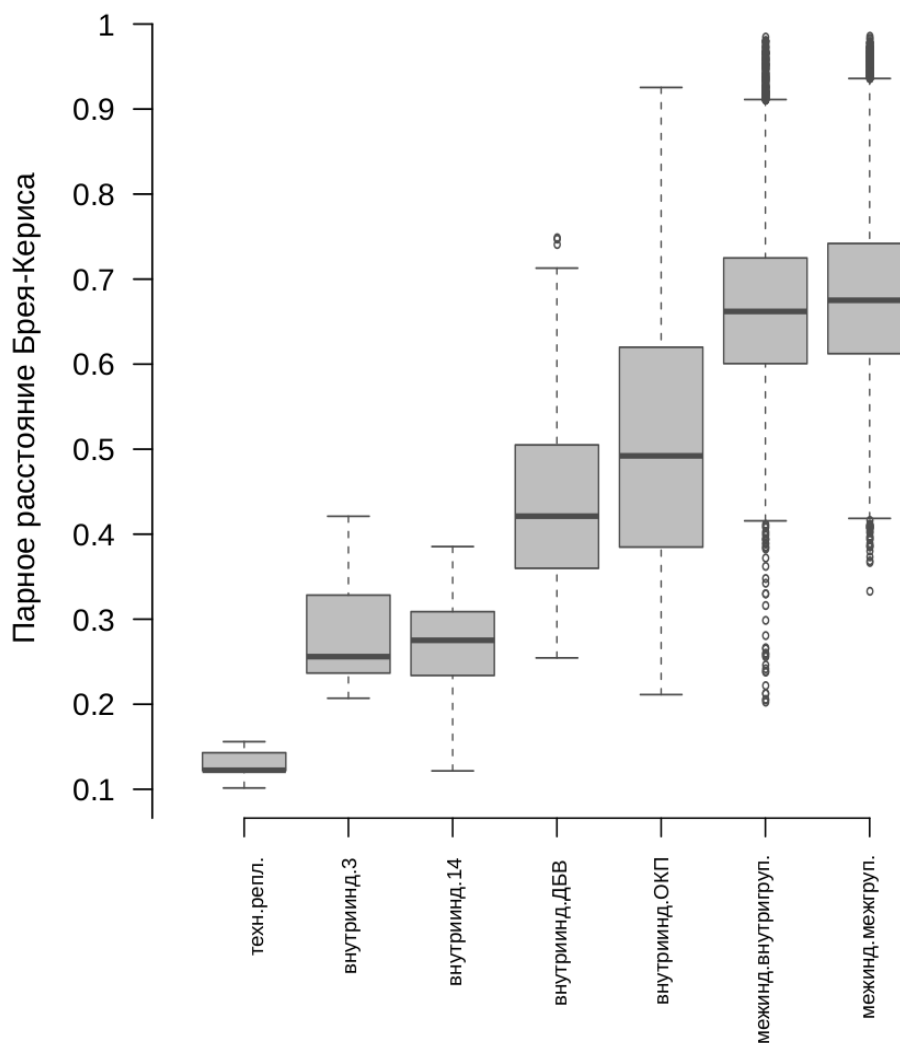


Рисунок 14 - Вклад экспериментальных факторов в профили состава микробиоты. Показаны распределения попарных расстояний внутри подгруппы (мера расстояния Брея-Кертиса).

Наименьшая вариабельность наблюдалась для технических реплик - образцов, взятых в один момент времени у одного индивида (“техн.репл.”). Далее на графике можно наблюдать три скачка значений попарных расстояний. Первый скачок отражает тот факт, что парное расстояние между образцами увеличивается при заборе материала у одного индивида в два разнесенных момента (“внутриинд.3”, “внутриинд.14”) по сравнению с забором в один момент (“техн.репл.”). При этом разница между результатами, полученными для трехдневного и двухнедельного временного промежутка, не столь заметна.

Второй скачок наблюдается при добавлении к временному промежутку (“внутриинд.3”, “внутриинд.14”) факта изменения рациона (“внутриинд.ДБВ”). При этом, опять же, разница между двухнедельным (“внутриинд.ДБВ”) и месячным (“внутриинд.ОКП”) диетическим вмешательством

менее выражена по сравнению с попарными расстояниями между образцами при отсутствии диетического вмешательства (“внутриинд.3”, “внутриинд.14”).

Третий скачок значения попарных расстояний наблюдается, когда включаются в рассмотрение расстояния между образцами от различных индивидов (“межинд.внутригрупп.”, “межинд.межгрупп.”).

### 3.2.2 Влияние диеты, богатой волокнами

Как уже было сказано выше, в исследовании влияния диеты, богатой волокнами, участники получили рекомендации диетолога подобранные с целью коррекции недостатков рациона, оцененного с помощью опросника. Последующий анализ отдельных наборов рекомендаций выявил, что, ввиду существенного сходства недостатков питания, все участники исследования получили советы, сводящиеся к увеличению потребления пищевых волокон и избеганию “западной диеты” (см. Глава 1). Распределение частоты рекомендаций по участникам исследования для 20 наиболее распространенных рекомендаций отражено на рисунке 15.

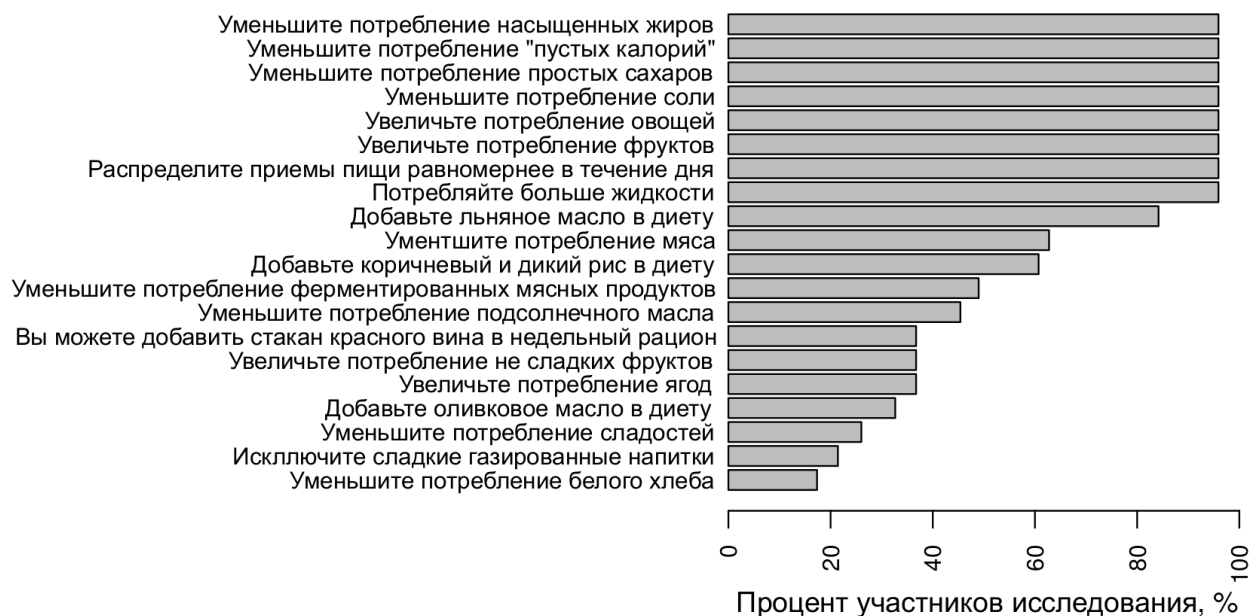


Рисунок 15 - Распределение диетических рекомендаций между участниками исследования для двадцати наиболее распространенных рекомендаций.

Состав микробиоты участников в целом значительно и однонаправленно изменился в результате интервенции, при этом доля дисперсии, объясненная временной точкой, составила 4.56% (парный критерий PERMANOVA,  $n = 412$  парных образцов,  $p = 0.0002$ , мера расстояния - взвешенный

UniFrac). Расположение образцов в редуцированном пространстве бактерий до и после интервенции отражено на рисунке 16, полученном с помощью метода РСоА.

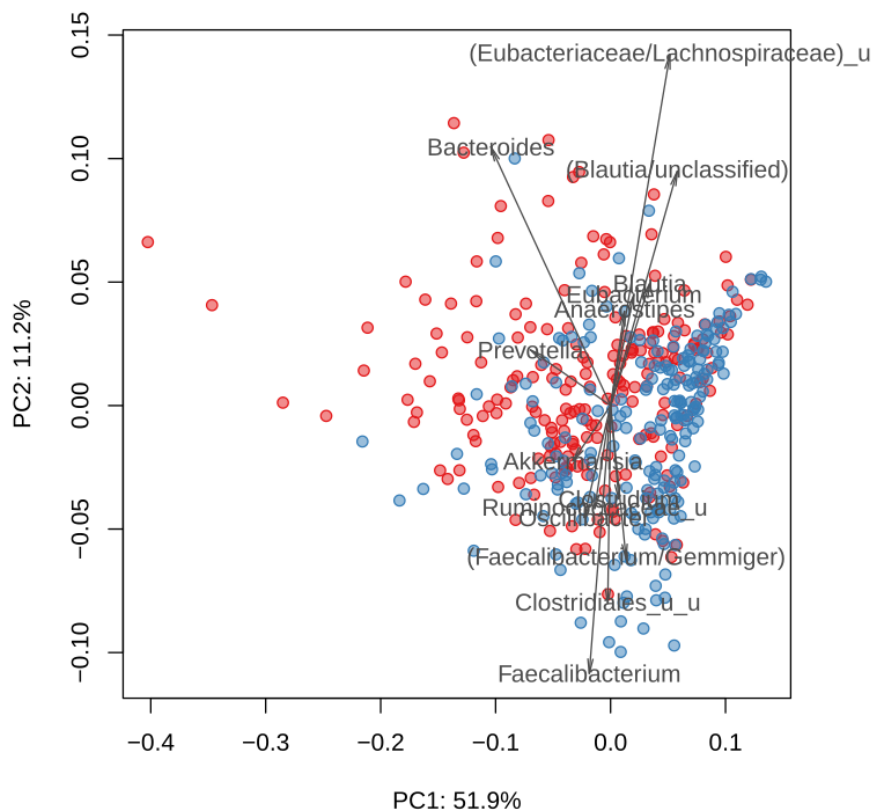


Рисунок 16 - Изменение таксономического состава микробиоты в целом после следования диете богатой волокнами. График отражает расположение образцов в двух главных координатах, полученных с помощью метода РСоА с использованием расстояния взвешенный UniFrac. Образцы до и после вмешательства показаны красным и синим цветом, соответственно. Стрелками обозначений таксоны, объясняющие наибольшую долю вариации в выбранных координатах, при этом длина стрелки пропорциональна вариации, объясненной бактерией. Угол стрелки отражает распределение объясненной вариации между координатами.

На индивидуальном уровне сдвиги были довольно значительными (индекс Брея-Кертиса  $0.4212 \pm 0.1051$  между парными метагеномами  $s=206$  человек,  $n=412$  сравнений), в разы превышая технические ( $0.1224 \pm 0.021$ ,  $n=10$  образцов,  $s=5$  сравнений), но будучи ниже, чем групповая вариабельность ( $0.6620 \pm 0.0937$  между всеми образцами в первой временной точке,  $s=206$  человек,  $n=2115$  сравнений). Для членов контрольной группы, которые не меняли рацион в течение 2 недель, эти изменения были значительно менее выражены (индекс Брея-Кертиса  $0.2752 \pm 0.0845$ ,  $s = 7$  человек,  $n=7$  сравнений).

Интересно, что у участников исследования наблюдалось небольшое, но значимое уменьшение альфа разнообразия ( $p=6 \cdot 10^{-8}$ , критерий Уэлча) (Рисунок 17).

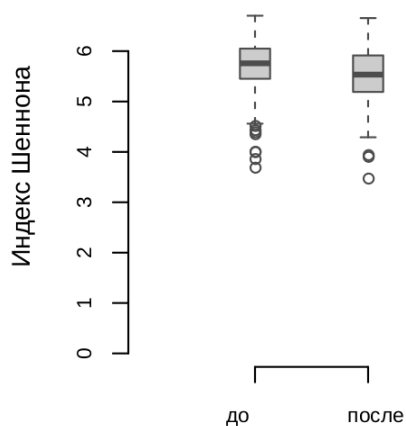


Рисунок 17 - Сравнение альфа разнообразия (индекс Шеннона) до и после диетического вмешательства ( $n = 412$ ).

Изменения относительной представленности микробных таксонов, произошедшие в результате интервенции, были проанализированы на различных таксономических уровнях, от типов до видов. Изменения на уровне типов и семейств показаны на рисунке 18, все значимые изменения приведены в приложении 3.



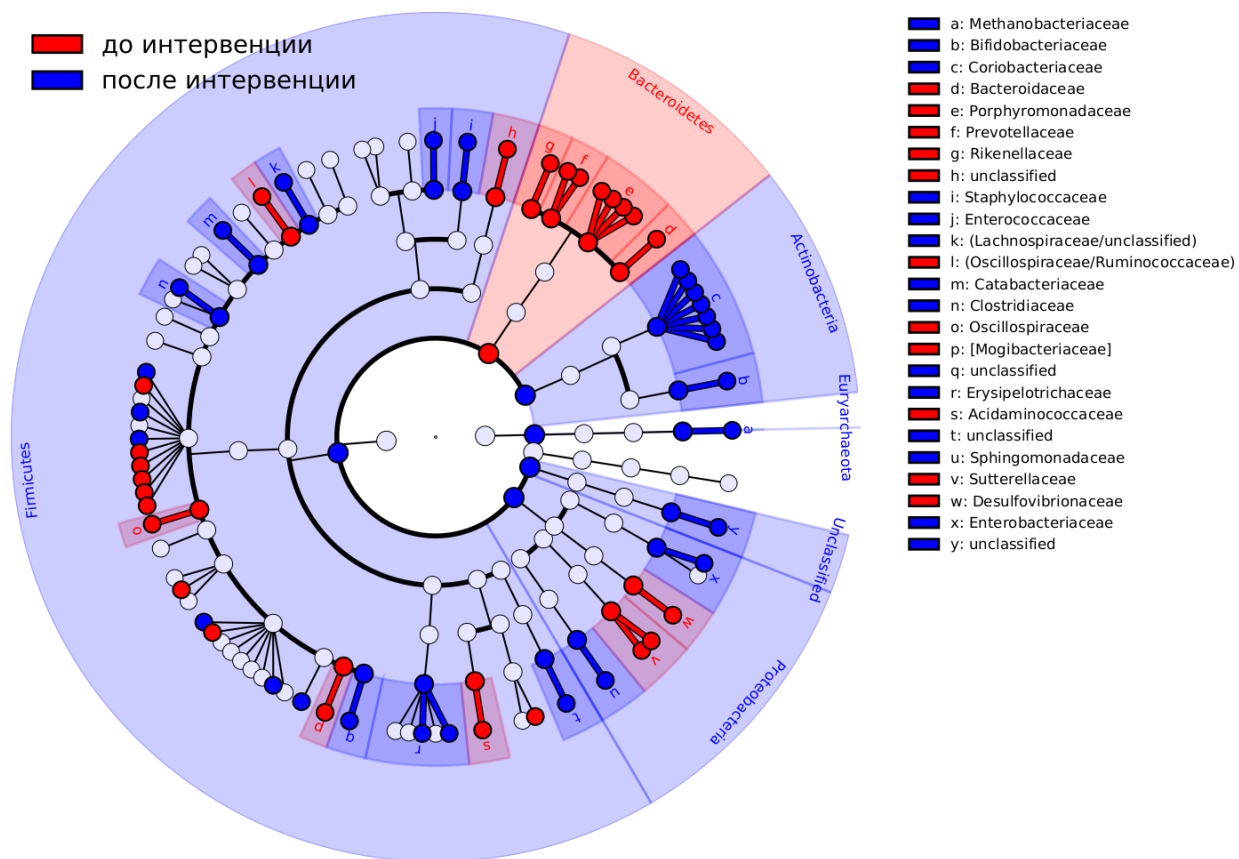


Рисунок 18 - Изменения в структуре кишечного сообщества на уровне семейств и типов, произошедшие после соблюдения диетических рекомендаций в ходе исследования ДБВ. Красные ветви кладограммы обозначают таксоны, которые уменьшились в представленности, а синие - таксоны, которые увеличились (n = 412 парных образцов).

В целом изменения в сообществе характеризовались смещением соотношения *Bacteroidetes:Firmicutes* в сторону уменьшения (с  $0,14 \pm 0,2$  до  $0,03 \pm 0,09$ , парный критерий Вилкоксона  $p < 0,0001$ , n = 412 парных образцов). Произошло снижение относительной представленности многих родов из типа *Bacteroidetes*: *Bacteroides*, *Alistipes*, *Barnesiella*, *Prevotella* (обобщенная линейная модель, FDR < 0.05, здесь и для перечисленных далее таксонов). При этом наблюдалось повышение относительной представленности *Firmicutes*, производящих масляную кислоту - *Ruminococcus* и *Eubacterium* [267,268]. Кроме того, наблюдалось повышение относительной представленности бактерий типа *Actinobacteria*, в частности, *Bifidobacterium*, а также археи *Methanobrevibacter*. Интересным образом, повысилась также относительная представленность бактерий *Staphylococcus* и *Enterobacteriaceae*, предположительно являющихся патобионтами и ауксотрофами [269,270].

### 3.2.3 Влияние приема обогащенного кисломолочного продукта

В рамках исследования влияния на состав микробного сообщества продукта, обогащенного пробиотиком, 130 добровольца в течение 30 дней добавляли в свой рацион 250 мл ОКП. Продукт был обогащен пробиотическим штаммом *Bifidobacterium animalis* подвида *lactis* BB-12. Участники принимали 125 мл продукта утром и 125 - вечером. Кроме того, участники в неконтролируемых условиях придерживались диеты Певзнера (стол №15), не употребляли лекарств и биологически активных добавок.

Сравнение общей структуры микробного сообщества до и после потребления ОКП показало изменение состава кишечной микробиоты участников на границе значимости (парный критерий PERMANOVA,  $n = 260$  парных образцов,  $p = 0.0808$ , мера расстояния взвешенный UniFrac). Интересным образом, при среднем значении попарного расстояния между образцами выше (индекс Брея-Кертиса  $0.4922 \pm 0.1536$ ), чем при исследовании ДБВ (индекс Брея-Кертиса  $0.4212 \pm 0.1051$ ), доля дисперсии, объясненная временной точкой, была ниже в исследовании ОКП (0.56%), чем в исследовании ДБВ (4.56%). Данное наблюдение говорит о том, что состав микробиоты участников изменился относительно сильно после месяца приема ОКП, однако эти изменения были более разнонаправленными по сравнению с изменениями, произошедшими в исследовании ДБВ.

Расположение образцов в редуцированном пространстве бактерий до и после интервенции отражено на рисунке 19, полученном с помощью метода РСоА. На рисунке также видно, что, по сравнению с подобной визуализацией, выполненной для ДБВ (Рисунок 16), для исследования ОКП не наблюдается однонаправленных изменений состава сообщества.

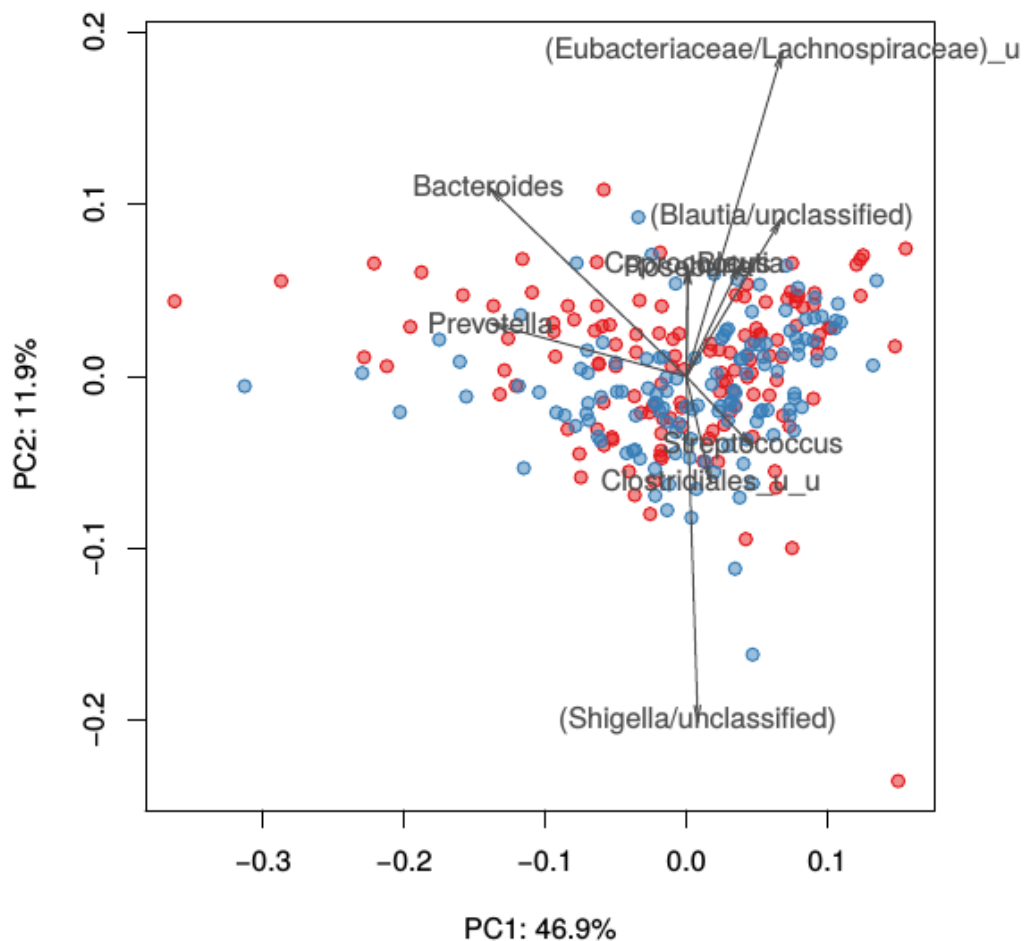


Рисунок 19 - Изменение таксономического состава микробиоты в целом после курса приема продукта, обогащенного пробиотиком. График отражает расположение образцов в двух главных координатах, полученных с помощью метода PCoA с использованием расстояния взвешенный UniFrac. Образцы до и после вмешательства показаны красным и синим соответственно.

Анализ динамики богатства микробных сообществ для каждого добровольца показал, что значительных изменений в результате приема ОКП не произошло (индекс Шеннона,  $p > 0.1$ , критерий Уэлча).

Изменения относительной представленности микробных таксонов, произошедшие в результате интервенции, были проанализированы на различных таксономических уровнях, от типов до видов. Изменения на уровне типов и семейств показаны на рисунке 20, все значимые изменения приведены в приложении 4.

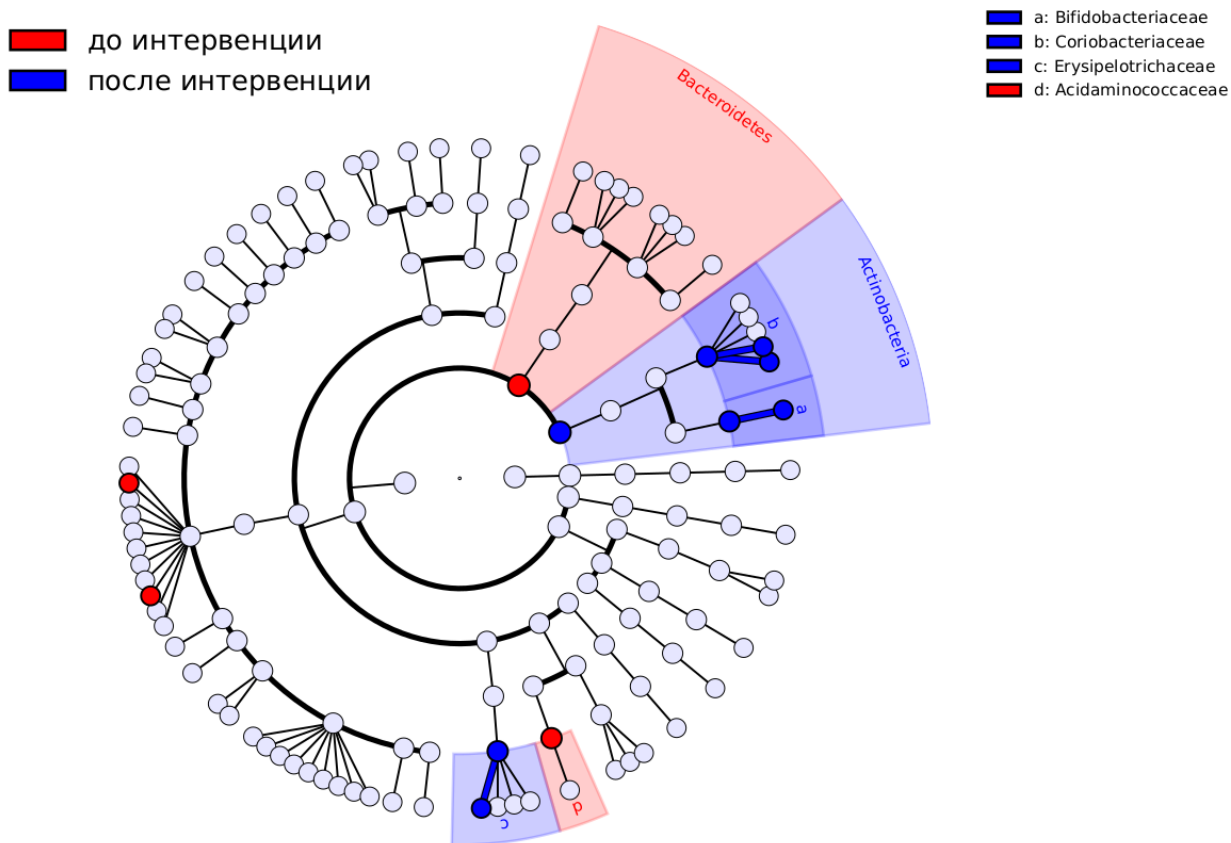


Рисунок 20 - Изменения в структуре кишечного сообщества на уровне семейств и типов, произошедшие после курса приема продукта, обогащенного пробиотиком. Красные ветви кладограммы обозначают таксоны, которые были уменьшились в представленности, а синие - таксоны, которые увеличились (n = 260 парных образцов).

На уровне семейств наблюдалось увеличение представленности *Coriobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae* а также *Erysipelotrichaceae* (обобщенная линейная модель. FDR<0.1, здесь и для перечисленных далее таксонов). Кроме того, в список значительно повысившихся в доле родов и видов входят *Bifidobacterium* (*B. animalis*, *B. bifidum*, *B. longum*), *Adlercreutzia* (*A. equolifaciens*), *Collinsella* (*C. aerofaciens*), *Catenibacterium* (*C. mitsuokai*) и другие таксоны. Произошло повышение представленности *Slackia*-кооператива. Уменьшение представленности наблюдалось для двух родов - (*Lachnoclostridium/unclassified*) и *Roseburia*, а также семейства *Acidaminococcaceae* и типа *Bacteroidetes*.

Также было проанализировано, как изменились в ходе интервенции значения факторов, которые были измерены в двух временных точках. Такие факторы присутствовали только в одном из двух исследований - исследовании ОКП, это были параметры Копрограммы, частота стула и

показатель по Бристольской шкале формы кала. Небольшое, но значимое изменение наблюдалось для показателя по Бристольской шкале - от  $3.5 \pm 0.5$  до  $3.7 \pm 0.5$  (FDR 0.0026, критерий Уилкоксона для связанных выборок). Таким образом, в результате интервенции значение показателя приблизилось к оптимальному, которое составляет 4 балла.

### 3.3 Обсуждение

Было установлено, что степень изменения состава микробиома при исследуемых интервенциях превысила степень изменения в отсутствии интервенций на том же промежутке времени, а также техническую вариабельность состава микробиома. При этом она была ниже межиндивидуальной вариабельности состава. Это наблюдение отражает описанный ранее факт (см. Глава 1), что состав микробиоты является достаточно стабильной характеристикой и состав сообществ между двумя индивидами в целом различается сильнее, чем состав сообщества каждого из них в двух разнесенных временных точках [8,193]. Также это указывает на то что изменения при исследуемых диетических интервенциях превышают флуктуации состава микробиоты во времени.

Для исследования ДБВ было установлено небольшое но значимое снижение альфа разнообразия микробного сообщества. Этот эффект на первый взгляд вступает в некоторое противоречие с положительной корреляцией между разнообразием и долгосрочным потреблением овощей, наблюдаемой в данной группе в первой точке и описанной в главе 2. Сниженное альфа разнообразия в целом является показателем дисбаланса кишечного сообщества и ассоциирован с метаболическими нарушениями, а также с приемом антибиотиков [137]. С другой стороны, некоторые исследования показывают, что двухнедельной диетической интервенции с высоким содержанием клетчатки может быть недостаточно для оказания эффекта на альфа разнообразие [54,55]. Таким образом, небольшое снижение альфа разнообразия, полученное в текущем исследовании, может отражать “шоковый эффект” в результате относительно быстрого изменения набора поступающих питательных веществ, которые могут временно нарушить экологию кишечного сообщества.

Многие микробы, представленность которых снизилась в результате следования ДБВ (*Bacteroides*, *Alistipes*, *Barnesiella*, кооператив *Bacteroides*), являются устойчивыми по отношению к желчи, а также были положительно ассоциированы с рационом питания богатым животным белком и насыщенными жирами [55,271,272]. Род *Prevotella*, представленность которого снизилась, в западной популяции ассоциирован с приемом простых сахаров [20]. Уменьшение потребления

простых сахаров также могло привести и к снижению представленности *Veilonella*-кооператива, представители которого более характерны для микробиоты верхних отделов ЖКТ [20]. По-видимому, из-за связанного с вмешательством увеличения потребления клетчатки и снижении употребления насыщенных жиров и простых сахаров, данные бактерии были частично вытеснены бактериями, специализирующимися на расщеплении сложных углеводов. В пользу данного предположения свидетельствует наличие среди повысившихся в представленности бактерий *Ruminococcus* и *Eubacterium*, производящих масляную кислоту из полисахаридов растительного происхождения [267,268]. Кроме того, наблюдалось повышение относительной представленности бактерий типа *Actinobacteria*, в частности, *Bifidobacterium*, а также археи *Methanobrevibacter* и *Akkermansia*-кооператива, что может являться следствием явления кроссфидинга между данными бактериями и представителями *Firmicutes*, производящими масляную кислоту [26,49,50]. Интересным образом, для двух кооперативов, содержащих таксоны, производящие масляную кислоту, наблюдались разнонаправленные изменения: снижение *Faecalibacterium*-кооператива, и повышение *Blautia*-кооператива.

Повысилась также относительная представленность бактерий *Staphylococcus* и *Enterobacteriaceae*, а также *Staphylococcus*-кооператива. Данные бактерии являются патобионтами и ауксотрофами [269,270], и повышение их представленности может быть отражением реакции сообщества на резкое изменение набора поступающих питательных веществ, также как и описанное выше снижение альфа разнообразия. По-видимому, в то время как полезные микробы, ассоциированные с высоким содержанием клетчатки, после 2х-недельной интервенции начали завоевывать свои ниши, нарушение экологической сети привело к росту этих провоспалительных таксонов. Для установления, является ли повышение данных таксонов, наряду со снижением альфа разнообразия, временным эффектом, который нивелируется при дальнейшем следовании диете, необходимо исследование более долгосрочного диетического вмешательства.

В исследовании влияния ОКП изменения альфа разнообразия не наблюдалось. Среди изменившихся в представленности таксонов интересно увеличение доли *Bifidobacterium*. Многие представители этого рода являются пробиотическими микроорганизмами; имеются исследования, подтверждающие их роль в противовоспалительной активности, защите от патогенных микроорганизмов и выработке витаминов [175]. Следует отметить, что в дополнение к увеличению доли *B. animalis*, который входил в состав ОКП, также наблюдалось значительное увеличение доли других бифидобактерий - *B. bifidum*, *B. longum* - которые не были включены в обогащенный

продукт. Это указывает на то, что потребление ОКП не только приводит к увеличению представленности *B. animalis* из-за его непосредственного введения, но также потенциально влияет на экологию микробного сообщества, поддерживая и другие виды *Bifidobacterium*.

Интересным образом, в обоих исследованиях наблюдалось повышение представленности нескольких представителей семейства *Coriobacteriaceae* (вида *Adlercreutzia equolifaciens*, *Collinsella aerofaciens*, *Slackia*-кооператива). Некоторые представители данного семейства обладают специфическими метаболическими функциями, которые потенциально связаны с пользой для здоровья человека. В частности, *Adlercreutzia*, *Slackia* и *Collinsella* являются активными участниками метаболизма изофлавонов, будучи способными метаболизировать дайдзеин в эквол [257,258]. Эквол - это изофлавандиол, обладающий фитоэстрогенной активностью с потенциально положительным влиянием на здоровье человека, включающим гормональные и сердечно-сосудистые функции [273] и противоопухолевую активность [274]. Основываясь на этих фактах, можно сделать вывод, что наблюдаемое увеличение *Adlercreutzia equolifaciens* и *Collinsella* после интервенций может повышать потенциал микробиоты вырабатывать вещества, связанные с пользой для здоровья, из пищи богатой изофлавонами.

## **Глава 4. Вариабельность ответа микробного сообщества на диетическое вмешательство**

### **4.1 Методы**

#### **4.1.1 Поиск ассоциаций между степенью изменения микробиоты и факторами метаданных измеренными в первой временной точке**

Оценка ответа микробного сообщества на диетические вмешательства, или, другими словами, степени изменения микробиома, проводилась путем расчета расстояний между парными составами микробиоты каждого участника - до и после интервенции. При этом по умолчанию использовалась мера расстояния взвешенный UniFrac. Другие меры расстояний были дополнительно включены в ряд анализов для подтверждения зависимостей, найденных по мере взвешенный UniFrac.

Был проведен анализ ассоциаций между степенью изменения микробиома и метаданными, собранными в первой временной точке (рационом питания, конкретными рекомендациями по изменению рациона (для исследования ДБВ), показателями копрограммы (для исследования ОКП), полом, возрастом, ИМТ). Данный анализ проводился для групп исследования ДБВ и ОКП по отдельности (N1=170, N2=94) путем построения линейных моделей, где факторы метаданных выступали в качестве предикторов (одна модель - один фактор). Поправка на множественное сравнение проводилась с помощью метода Бенджамини-Хохберга.

#### **4.1.2 Поиск ассоциаций между степенью изменения микробиоты и микробиотными параметрами в первой временной точке**

Анализ ассоциаций между степенью изменения микробиома и его параметрами в первой временной точке включал:

- анализ альфа разнообразия;
- анализ соотношения *Bacteroidetes:Firmicutes*;
- анализ среднего взвешенного числа генов в сообществе;
- построение модели, предсказывающей степень изменения по таксономическому составу и оценку важности и воспроизводимости таксонов-предикторов.

Ассоциации степени изменения с альфа разнообразием, соотношением *Bacteroidetes:Firmicutes* и средним взвешенным количеством генов в сообществе были оценены путем расчета частичных



корреляций Пирсона между каждой парой данных параметров с поправкой на все остальные, с последующей оценкой значимости коэффициентов корреляции.

Для оценки альфа разнообразия по умолчанию использовался индекс Шеннона. Среднее взвешенное количество генов было оценено с использованием информации из базы NCBI о сборках геномов прокариот (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/>). Оценка происходила по матрицам представленности на уровне видов. Для всех видов, таксономическая принадлежность которых была разрешена (принадлежность определена до конкретного вида), было рассчитано среднее количество генов в сборках базы NCBI соответствующих данному виду. Для видов, таксономически разрешенных только на уровне рода (например *Bacteroides unclassified*), усреднение происходило по всем сборкам принадлежащим данному роду. Таксоны, разрешенные на уровне семейств и крупнее не были учтены в данном анализе. Таксоны, для которых не было найдено соответствия в базе NCBI, также не были учтены в анализе. Далее было рассчитано среднее взвешенное количество генов на образец путем умножения количества генов, определенного для каждого учтенного таксона на его представленность (в количестве прочтений), и деления на общее количество прочтений принадлежащих всем таксонам данного образца, которые были учтены в анализе.

Среди значимых ассоциаций полученных для микробиотных параметров были выделены общие для двух интервенций.

#### **4.1.3 Построение модели предсказывающей степень изменения микробиома по его составу в первой временной точке**

Построение модели, предсказывающей степень изменения по таксономическому составу было реализовано с помощью алгоритма XGBoost для каждой из исследуемых интервенций. В качестве предикторов использовались относительные представленности таксонов в первой временной точке на уровне видов. Матрицы представленности перед передачей в модель были нормализованы путем применения  $\arcsin \sqrt{\text{}}$  преобразования. В модели использовались следующие параметры: глубина деревьев 15, количество деревьев 1000, скорость обучения (размер шага) 0.3. Для оценки качества модели выборка была разделена случайным образом на обучающую и тестовую 50 раз в соотношении 2:1. На каждом шаге по обучающей выборке производилась фильтрация и выбор предикторов (Рисунок 21). Фильтрация предикторов заключалась в выборе таксонов, имеющих ненулевую представленность более чем в 30% образцов обучающей выборки. Выбор предикторов,

осуществлялся путем обучения 10 дополнительных моделей XGBoost на обучающей выборке данной итерации с последующей оценкой важности предикторов. Эти дополнительные модели по параметрам и структуре были аналогичны основной, за исключением количества деревьев (300). Важность (англ. importance, тип Gain) предикторов после обучения оценивалась как относительный вклад предиктора в улучшение предсказания в каждом из деревьев массива. 30 наиболее важных предикторов были выбраны для обучения основной модели данной итерации. Таким образом, в каждой из 50 итераций кросс-валидации происходил независимый выбор предикторов по обучающей выборке. Это позволило по завершению кросс-валидации выбрать стабильно важные предикторы для каждого из исследований - те таксоны, которые были выбраны для обучения основной модели не менее чем в 20 % итераций кросс-валидации. Стабильно важные предикторы были использованы для построения финальной модели XGBoost, обученной на полной выборке. Направление влияния представленности стабильно важных предикторов на результат регрессии было изучено по финальной модели с помощью графиков частичной зависимости (англ. partial dependence plots, PDP). Среди стабильно важных предикторов были выделены общие для двух интервенций.

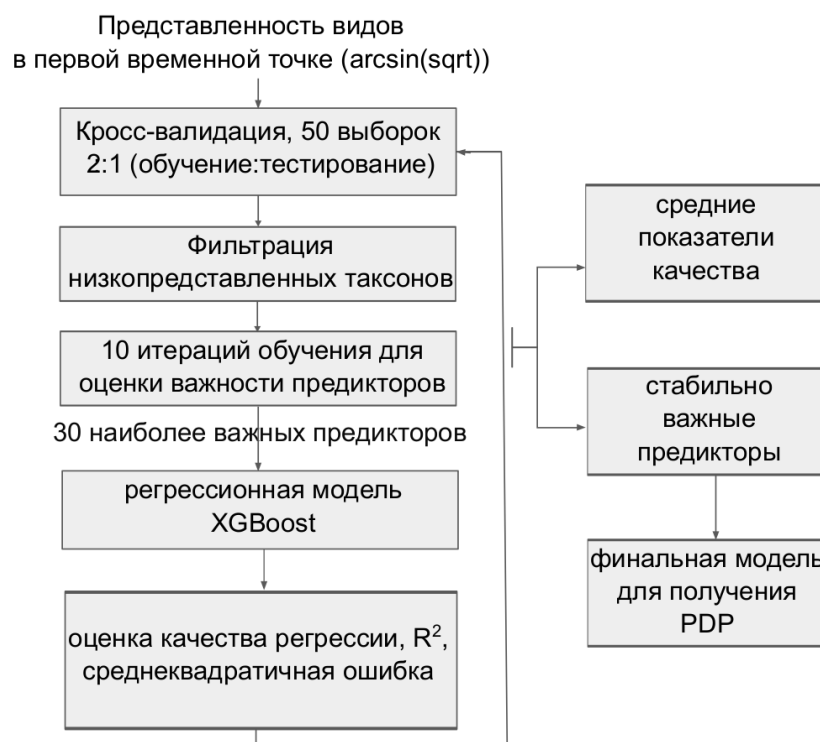


Рисунок 21 - Схема оценки показателей качества регрессионной модели Аббревиатура: PDP - partial dependence plots (графики частичной зависимости).

Для оценки качества регрессии основной модели на каждой итерации рассчитывались:

- значения  $R^2$  для регрессии между истинными значениями степени изменения в тестовой выборке и предсказанными моделью;

- значения  $R^2$ , рассчитанные методом, предложенным в пакете caret [275], и представляющие собой квадрат коэффициента Пирсона между истинными значениями степени изменения в тестовой выборке и значениями, предсказанными моделью;

- среднеквадратичная ошибка между истинными значениями степени изменения в тестовой выборке и значениями, предсказанными моделью.

По завершению кросс-валидации для каждого исследования были вычислены средние значения данных показателей качества. Для сравнения показателей качества с соответствующими от случайной классификации, кросс-валидация была также проведена по матрице представленности на уровне видов, индексы образцов в которой были перемешаны случайным образом.

#### **4.1.4 Оценка потенциала изменения микробиома**

Для исследования универсальности предикторов устойчивости микробиома, мы ввели определение потенциала изменения микробиоты, и оценили его значение для каждого образца собранного в первой временной точке (подробнее см. “Результаты. Потенциал изменения микробиома и его зависимость от состава микробиома”). Значение было вычислено как среднее бета разнообразие (взвешенный UniFrac) между анализируемым образцом и образцами остальных индивидов в первой временной точке в каждом из исследований. Зависимость между потенциалом изменения и степенью изменения была установлена путем расчета корреляции Пирсона. Также мы включили потенциал изменения в граф частичных корреляций Пирсона, построенный для степени изменения и микробиомных признаков в первой временной точке: отношения V:F, среднего взвешенного количества генов и альфа разнообразия. Как и ранее, при расчете корреляций между двумя признаками производилась поправка на все остальные. Также мы проанализировали, как изменится качество регрессионной модели XGBoost [276], описанной в предыдущем разделе, при обучении на информации о степени изменения и тестировании на информации о потенциале изменения. Было произведено 50 итераций кросс-валидации, при этом на каждой итерации из всех образцов с соответствующими значениями степени изменения  $\frac{2}{3}$  образцов использовались для обучения и

оставшаяся  $\frac{1}{3}$  - для тестирования. Параметры моделей и алгоритм обучения были идентичны описанным в предыдущем разделе.

#### **4.1.5 Валидация зависимостей между потенциалом изменения микробиома и микробиотными параметрами на независимой когорте**

Введение понятия потенциала изменения и подтверждение его корреляции со степенью изменения при интервенциях позволили нам валидировать зависимости, найденные между устойчивостью микробиоты и другими ее признаками на независимой крупной когорте, включающей только одну временную точку на образец. Для валидации была выбрана когорта TwinsUK [277], включающая образцы кала от 977 участников, среди которых большая часть являются парами близнецов. Путем выбора уникального идентификатора семей было отобрано по одному образцу от каждой пары близнецов. В данном исследовании для оценки состава микробиома стула использовалось секвенирование региона V4 гена 16S рРНК на секвенаторе Illumina MiSeq, как и в исследованиях ДБВ и ОКП. Данные были выгружены в виде fastq файлов из открытого репозитория ENA (European Nucleotide Archive, проекты ERP006339 и ERP006342) и обработаны по тому же алгоритму, что и данные ДБВ и ОКП. Единственным отличием являлась глубина прореживания: составы были прорежены до минимального по выборке количества ридов на образец (13773 ридов). После выбора уникальных идентификаторов семей и фильтрации низкопокрытых образцов количество образцов составило 528.

Ассоциации между потенциалом изменения в когорте TwinsUK и параметрами микробиоты были изучены с помощью частичных корреляций, по аналогии с подобным анализом для степени изменения, описанным выше. Мы расширили данный анализ, используя 4 различные меры бета разнообразия (расстояние Эйтчтисона, Брея-Кертиса, взвешенный UniFrac и обобщенный UniFrac) и две - альфа разнообразия (Шеннона и  $cha_1$ ). При расчете расстояния Эйтчтисона использовались ненормализованные и непрореженные данные, при этом нулевые представленности были заменены на малые значения с помощью Байесовского мультипликативного метода [278].

Зависимость между альфа разнообразием и потенциалом изменения была дополнительно исследована на наличие математической составляющей (сугубо аналитической, не имеющей отношения к с микробной экологии). Это связано с тем, что обе меры зависят от профиля распределения представленности таксонов в образце. Низкое разнообразие характерно для

образцов с наиболее неравномерным распределением представленности таксонов и с высокой разреженностью. Бета разнообразие также зависит от разреженности матрицы представленности и равномерности распределения таксонов в образце, причем направление зависимости отличается для разных мер. Например, в случае меры Эйтчитсона, где нулевые представленности заменяются на малые значения [278], пара образцов с относительно низким альфа разнообразием в среднем будут иметь меньшее бета разнообразие, чем пара образцов с относительно высоким альфа разнообразием. Напротив, меры Брея-Кертиса и UniFrac прямо зависят от количества общих таксонов - которое будет в среднем возрастать с совокупным альфа разнообразием пары образцов. Для количественного описания данной зависимости была проведена следующая процедура. Названия таксонов в каждом образце были перемешаны случайным образом, независимо от других образцов. Так, для каждого образца сохранилось его значения альфа-разнообразия, однако данные значения более не были привязаны к определенному таксономическому составу. По таким пермутированным составам были рассчитаны значения потенциала изменения. Между значениями потенциала изменения после пермутаций и альфа разнообразием была построена линейная регрессия и оценена значимость коэффициента.

Для оценки того, имеет ли место, наряду с математической составляющей, биологическая составляющая зависимости между потенциалом изменения и альфа разнообразием, мы ввели поправку, используя полученную выше линейную регрессию. Результат предсказания модели, в которой предиктором служило альфа разнообразие, а предсказываемой переменной - потенциал изменения после пермутаций, был вычтен из истинных значений потенциала изменения. Мы исследовали, как изменятся зависимости между потенциалом изменения и микробиомными параметрами после поправки, пересчитав частные корреляции Пирсона с использованием поправленного потенциала изменения.

Для визуализации зависимости между микробиомными параметрами, ассоциированными со степенью изменения, и распределением образцов в пространстве таксономических составов был использован метод UMAP [279]. На вход алгоритма визуализации поступали матрицы относительной представленности на уровне видов. В алгоритме UMAP использовались следующие параметры: количество соседей 15, минимальное расстояние 0.1.

## 4.2 Результаты

### 4.2.1 Вариабельность изменений состава микробного сообщества в результате диетических интервенций

Примечательно, в обоих исследованиях степень изменения микробиоты существенно варьировала от участника к участнику (ДБВ: 0.03-0.30, ОКП: 0.05-0.54 - превышая уровень технической вариабельности  $0.06 \pm 0.02$ ; взвешенный UniFrac). Степень изменения была оценена путем расчета бета разнообразия между микробными сообществами до и после интервенции для каждого индивида. Степень изменения микробиоты не была значимо связана ни с одним из факторов метаданных, измеренных в первой временной точке ( $FDR > 0.1$ ). Однако была найдена ее связь с исходными характеристиками микробиома.

В первую очередь мы исследовали ассоциацию степени изменения с тремя крупномасштабными параметрами микробиома - альфа-разнообразием, отношением *Bacteroidetes:Firmicutes* (В:Ф) и средним взвешенным предсказанным количеством генов на бактерию в сообществе (далее для краткости - СКГ; см. Методы). Так как данные величины значимо коррелируют между собой, был применен метод подсчета частичных корреляций между ними (см. Методы). Согласно данному анализу, степень изменения прямо коррелировала с отношением В:Ф в обоих исследованиях, и обратно коррелировала с альфа-разнообразием и СКГ в исследовании ОКП ( $p < 0.05$ , Рисунки 22-23).

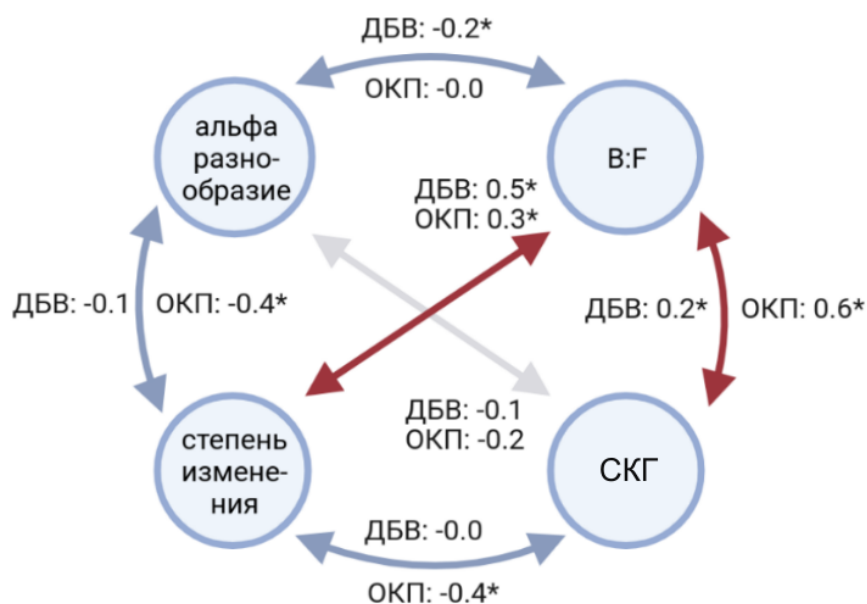


Рисунок 22 - Частичные корреляции Пирсона для степени изменения микробиома и его параметров в первой временной точке. При расчете корреляции между каждой парой переменных производилась поправка на все другие переменные. Рядом со стрелками приведены частичные корреляции, полученные для каждой из интервенций. Символом “\*” помечены частичные корреляции с уровнем значимости  $p < 0.05$ . Красные стрелки соответствуют положительным ассоциациям, а синие - отрицательным.

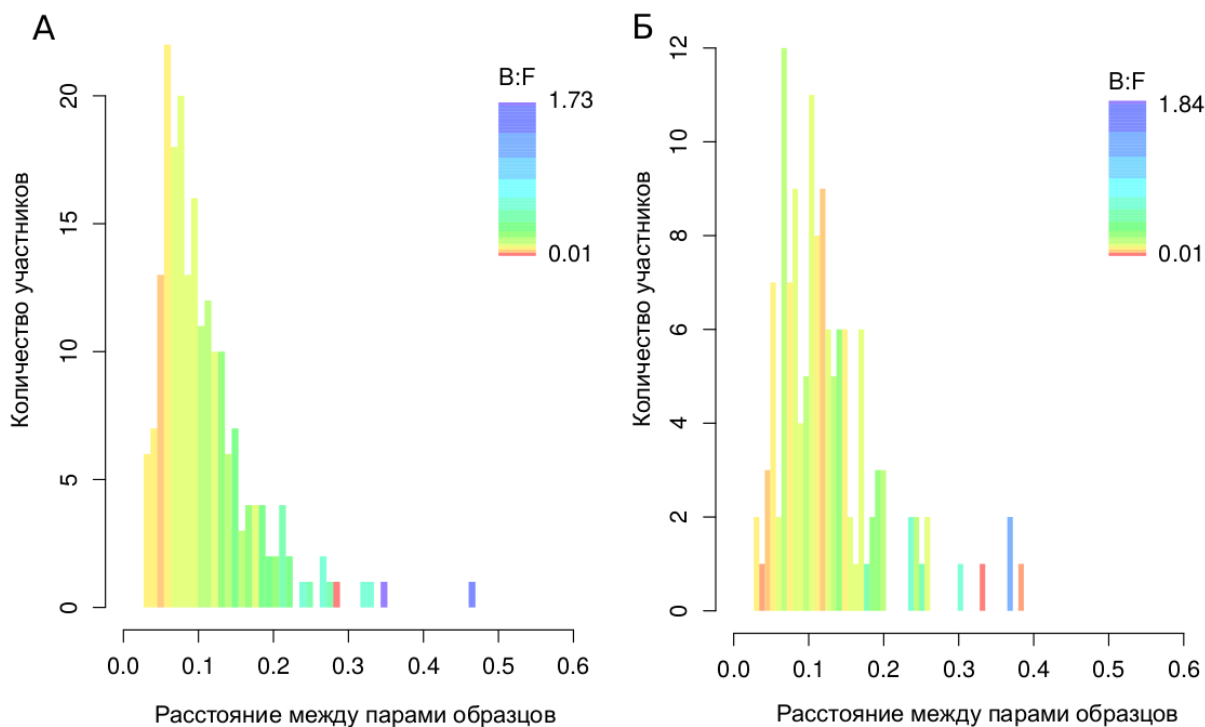


Рисунок 23 - Зависимость степени изменения от соотношения в микробиоте отделов Bacteroides:Firmicutes. На рисунках А (исследование ДБВ) и Б (исследование ОКП) показано распределение расстояний между составами микробиоты до и после интервенции (мера взвешенный UniFrac). Цвет столбцов гистограммы обозначает среднее отношение Bacteroides:Firmicutes.

Для более детального исследования зависимости степени изменения микробиома от его начального состава для каждой из интервенций были построены регрессионные модели с помощью алгоритма машинного обучения XGBoost (см. Методы). Модели предсказывали степень изменений по видовому составу микробиома в первой временной точке. По результатам кросс-валидации качество предсказания моделей существенно отличалось от качества случайного предсказания (см. Методы, Рисунок 24, Таблица 5).

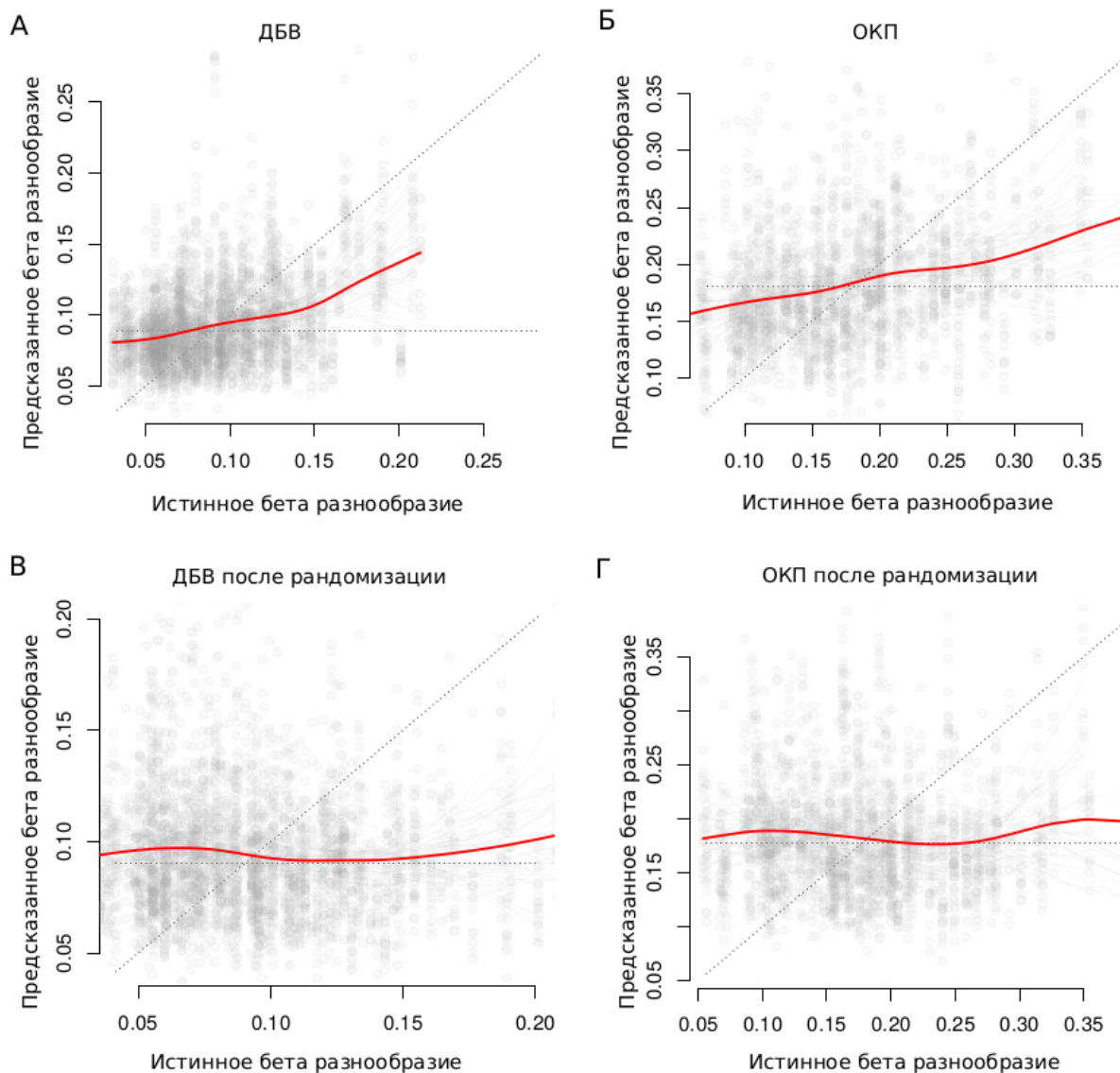


Рисунок 24 - Результат тестирования регрессионной модели на тестовых выборках в ходе кросс валидации для исследований ДБВ (А) и ОКП (Б), а также для этих же исследований после случайного перемешивания индексов (В, Г) (данные модели соответствуют случайному предсказанию). Серые точки соответствуют образцам тестовой выборки на каждой из итераций, а красная линия показывает среднюю зависимость между истинными и предсказанными значениями изменений.

Таблица 5 - Средние значения показателей качества моделей, полученные в ходе кросс-валидации

Исследование	$R^2$ регрессии	$R^2$ (caret)*	Среднеквадратичная ошибка
ДБВ	0.1207	0.1335	0.0015



ОКП	0.0896	0.1111	0.0052
ДБВ индексы перемешаны случайным образом	-0.0043**	0.0059	0.0021
ОКП индексы перемешаны случайным образом	-0.0043**	0.0060	0.0073

\* -  $R^2$  (caret) рассчитан методом, предложенным в пакете caret [275], и представляет собой квадрат коэффициента Пирсона между истинными значениями степени изменения в тестовой выборке и значениями, предсказанными моделью.

\*\* - отрицательные значения  $R^2$  регрессии по тестовой выборке возможны в случае, когда среднее лучше объясняет данные, чем модель.

Путем итеративной кросс-валидации были выявлены таксоны, которые внесли наибольший вклад в предсказание, и при этом обладали высокой воспроизводимостью (стабильно важные предикторы, см Методы). Было получено 10 стабильно важных предиктора для ДБВ исследования и 10 - для ОКП. Четыре из них были общими между интервенциями: *Prevotella copri*, *Bifidobacterium adolescentis*, а также неклассифицированные виды родов [*Ruminococcus*] (род из семейства *Lachnospiraceae*) и *Streptococcus*. Для всех общих таксонов наблюдался восходящий тренд зависимости степени изменения от представленности, как видно по графикам частичной зависимости (Рисунок 25). Интересно, что характер зависимостей был схож между исследованиями для одних и тех же таксонов.

Стабильно важными предикторами, специфичными для исследования ДБВ, являлись:

- неклассифицированные представители родов *Bacteroides* и *Paraprevotella* (восходящий тренд);
- неклассифицированные представители семейств *Enterobacteriaceae* и (*unclassified/Clostridiaceae/Lachnospiraceae*), класса *Clostridiales*, а также *Blautia obeum* (немонотонный тренд).

Для исследований ОКП, специфичными стабильно важными предикторами являлись:

- *Ruminococcus (bromii/unclassified)*, неклассифицированные представители родов *Lachnospira*, (*Faecalibacterium/unclassified*) и семейства *Ruminococcaceae* (нисходящий тренд);

- неклассифицированные представители семейств *Erysipelotrichaceae* и *Peptostreptococcaceae* (восходящий тренд).

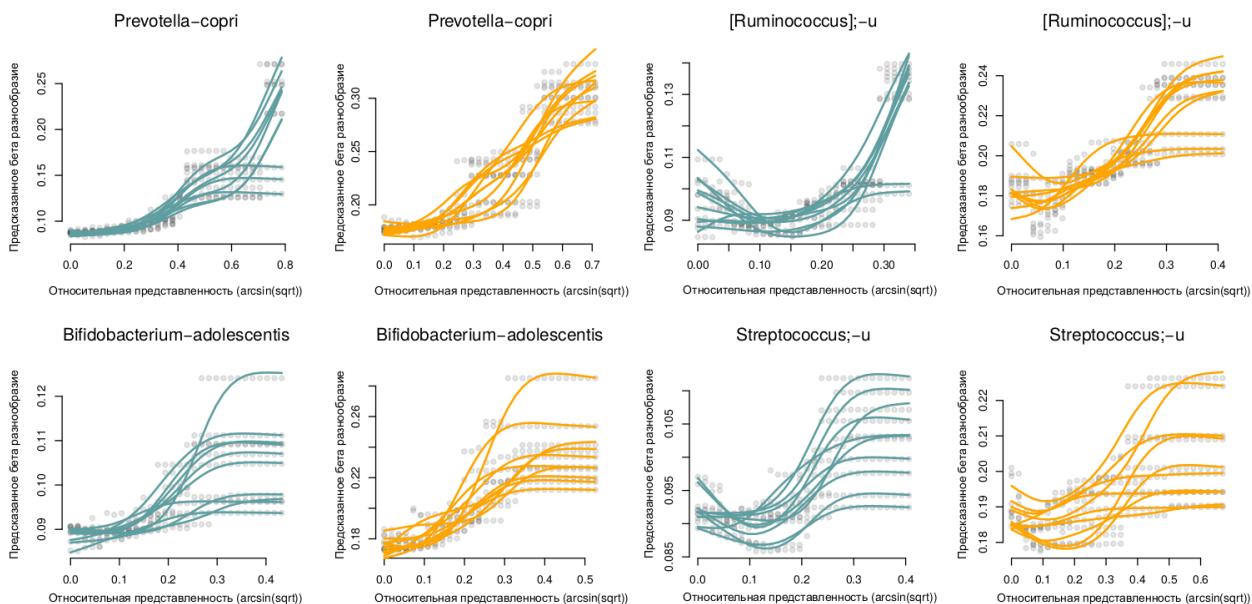


Рисунок 25 - Графики частичной зависимости (англ. partial dependence plots) для стабильных предикторов, общих между двумя исследованиями: бирюзовым цветом обозначены зависимости для исследования ДБВ, а оранжевым - для исследования ОКП.

#### 4.2.2 Потенциал изменения микробиома и его зависимость от состава микробиома

Полученные результаты показывают, что многие из микробиотных параметров, ассоциированные со степенью изменения, являются общими между двумя интервенциями ДБВ и ОКП. На основании этого был выдвинут ряд предположений и определений.

**Предположение 1:** Существуют микробиотные признаки, частично предопределяющие степень изменения микробиома априори независимо от типа предполагаемой интервенции.

**Определение 1:** Назовем потенциалом изменения образца составляющую степени изменения состава образца, которая определяется исключительно его внутренними микробиотными признаками.

Таким образом, степень изменения микробиома, наблюдаемая при интервенции, складывается из потенциала изменения и составляющей, специфичной для конкретной интервенции.

**Определение 2:** Ландшафт потенциала изменения - распределение потенциала изменения в многомерном пространстве представленности таксонов.

**Предположение 2:** Области ландшафта с низким потенциалом изменения будут характеризоваться повышенной плотностью образцов при исследовании достаточно больших выборок.

Данное предположение опирается на свойство эргодичности состава микробиома кишечника, которое применяется при анализе экологических систем [280]. Мы будем понимать его в том смысле, что в течение жизни человека его микробиом может с определенной вероятностью принимать конфигурацию, достаточно близкую к практически любой из наблюдаемых в кишечнике людей. Тогда такое свойство эргодических систем, как “среднее по времени равно среднему по ансамблю”, можно сформулировать, как возможность априори оценить устойчивость отдельно взятого сообщества на основе его положения относительно микробиомов других людей в достаточно крупной выборке, что и приводит нас к Предположению 2. Исходя из Предположения 2, потенциал изменения образца можно оценить по его положению относительно образцов других индивидов выборки в многомерном пространстве представленности таксонов. Один из способов такой оценки - расчет среднего бета разнообразия между данным образцом и образцами остальных индивидов.

В соответствии с описанными введенными выше предположениями и определениями, мы оценили ландшафт потенциала изменений для двух исследуемых интервенций, рассчитав среднее бета-разнообразие между каждым микробиомом и всеми другими микробиомами данного исследования в первой временной точке. Между потенциалом изменения и степенью изменения, наблюдаемой при интервенциях, действительно наблюдалась значимая корреляция (Рисунок 26, коэффициент корреляции Пирсона 0.56 для ДБВ и 0.53 для ОКП,  $p < 10^{-10}$ ). Данное наблюдение свидетельствует в пользу сделанных выше предположений. Однако из графиков (Рисунок 26) видно, что зависимость наблюдается лишь для образцов, степень изменения которых превысила определенный порог (около 0.15 по мере взвешенный UniFrac).

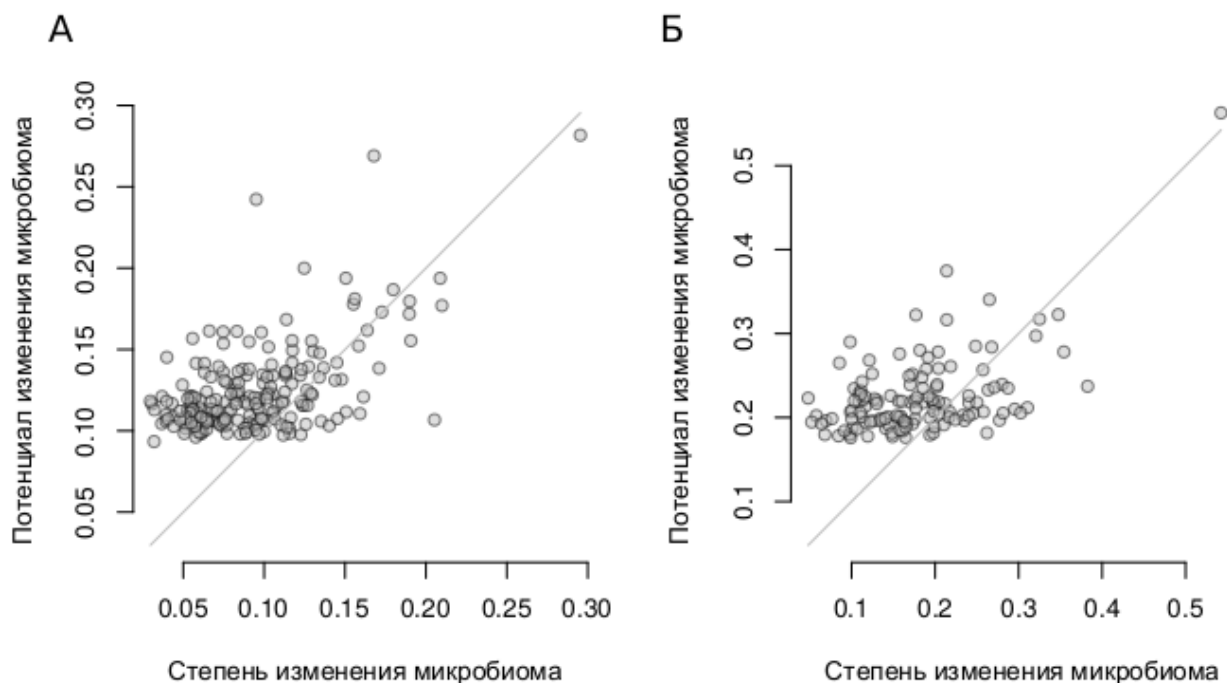


Рисунок 26 - Сравнение потенциала изменения микробиома, согласно введенному нами определению (среднее бета разнообразие между образцом и всеми другими образцами до интервенции), и истинного изменения, произошедшего в результате интервенции (бета разнообразия между парными образцами), с использованием меры взвешенный UniFrac в исследованиях ДБВ (А) и ОКП (Б).

Включив потенциал изменения в анализ частичных корреляций в качестве ковариаты, мы показали, что полученные выше ассоциации степени изменения с альфа разнообразием, отношением В:Ф и количеством генов на бактерию являлись отчасти наведенными связью потенциала изменения со степенью изменения (Рисунок 27). В то время как для потенциала изменения эти частичные корреляции были значимы в обоих исследованиях, для степени изменения единственной значимой корреляцией была связь с СКГ в исследовании ДБВ ( $p < 0.05$ ). Корреляция между степенью изменения и потенциалом изменения осталась значимой после поправки на микробиомные параметры ( $p < 0.0016$ ).

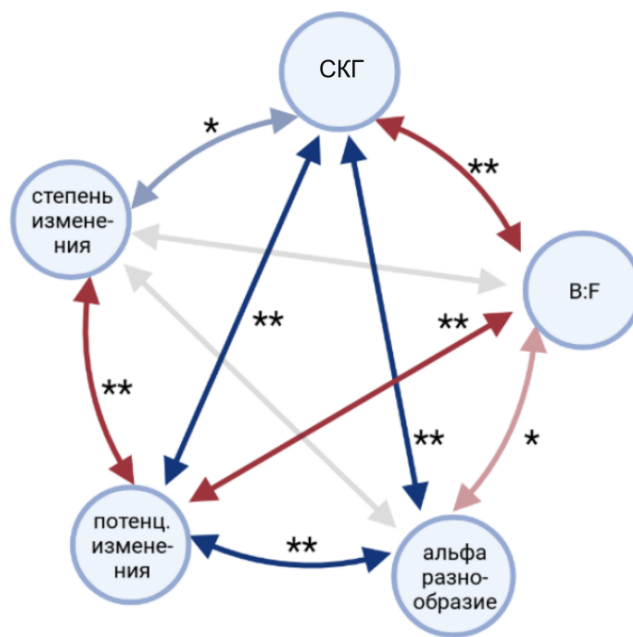


Рисунок 27 - Частичные корреляции Пирсона для степени изменения микробиома, потенциала изменения микробиома и параметров микробиома в первой временной точке. При расчете корреляции между каждой парой переменных производилась поправка на все другие переменные. Рядом со стрелками приведены “\*” в случае значимой корреляции ( $p < 0.05$ ) в одном исследовании, и “\*\*” - в двух исследованиях. Красные стрелки соответствуют положительным ассоциациям, а синие - отрицательным.

Схожий эффект наблюдался и при использовании потенциала изменения для тестирования модели XGBoost. Мы повторили кросс-валидацию, заменив только в тестовых выборках значения степени изменения на потенциал изменения. При таком перекрестном тестировании показатели качества модели улучшились - среднеквадратичная ошибка снизилась, а значения  $R^2$  повысились (Таблица 6, Рисунок 28).

Таблица 6 - Средние значения показателей качества моделей, полученные по результатам тестирования в ходе кросс-валидации. При тестировании использовались значения потенциала изменения, а при обучении - значения степени изменения.

Исследование	$R^2$ регрессии между истинными и предсказанными значениями	$R^2$ (caret)	Среднеквадратичная ошибка
ДБВ	0.2890	0.2995	0.0014
ОКП	0.2831	0.3001	0.0039

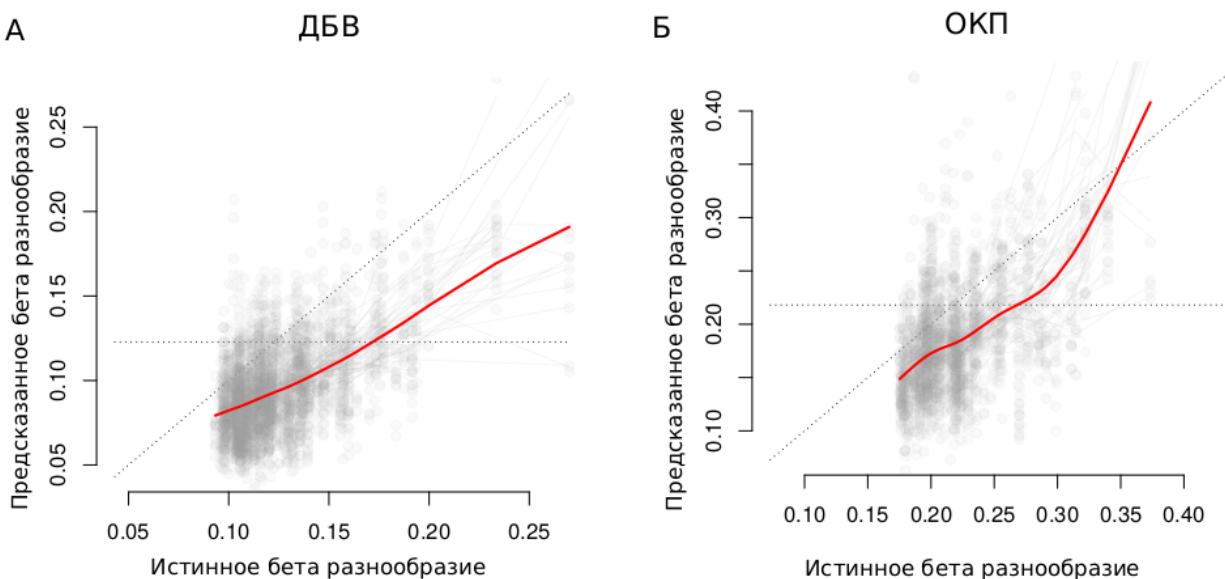


Рисунок 28 - Результат тестирования регрессионной модели на тестовых выборках в ходе кросс валидации для исследований ДБВ (А) и ОКП (Б), при тестировании использовались значения потенциала изменения, а при обучении - значения истинных изменений. Серые точки соответствуют образцам тестовой выборки на каждой из итераций, а красная линия показывает среднюю зависимость между истинными и предсказанными значениями потенциала изменения.

#### 4.2.3 Валидация закономерностей между потенциалом изменения микробиома и его составом на независимой когорте

Таким образом, зависимости, найденные для степени изменения при интервенциях, воспроизводятся при исследовании потенциала изменения. При этом потенциал изменения, согласно введенному нами определению, не зависит от типа и наличия интервенции, и может быть рассчитан по данным в одной временной точке. Для подтверждения универсальности найденных зависимостей мы провели их валидацию на когорте TwinsUK [277]. TwinsUK - исследование, включающее данные секвенирования образцов кала от 977 участников преимущественно в одной временной точке, среди которых большая часть являются парами близнецов. Во избежание искажений, для целей нашего исследования было выбрано по одному образцу от каждой пары близнецов (после фильтрации мы получили 548 образцов). Были исследованы:

- ассоциация потенциала изменения с отношением В:F;
- ассоциация потенциала изменения с альфа разнообразием;

- ассоциация потенциала изменения со средним взвешенным количеством генов в сообществе.

Мы рассчитали частичные корреляции между потенциалом изменения и вышеуказанными микробиомными параметрами, используя 4 различные меры бета разнообразия для расчета потенциала изменения (расстояние Эйтчитсона, Брея-Кертиса, взвешенный UniFrac и обобщенный UniFrac) и две меры альфа разнообразия (Шеннона и chao1). Большинство зависимостей были значимыми при использовании подавляющего количества сочетаний мер (Рисунок 29). Для всех значимых частичных корреляций с потенциалом изменения, зависимости были одинаково направлены при использовании разных мер. Исключение составила зависимость с альфа разнообразием - она была положительна для всех сочетаний мер, кроме случая использования расстояний Эйтчитсона для расчета потенциала изменения (Рисунок 29 А).

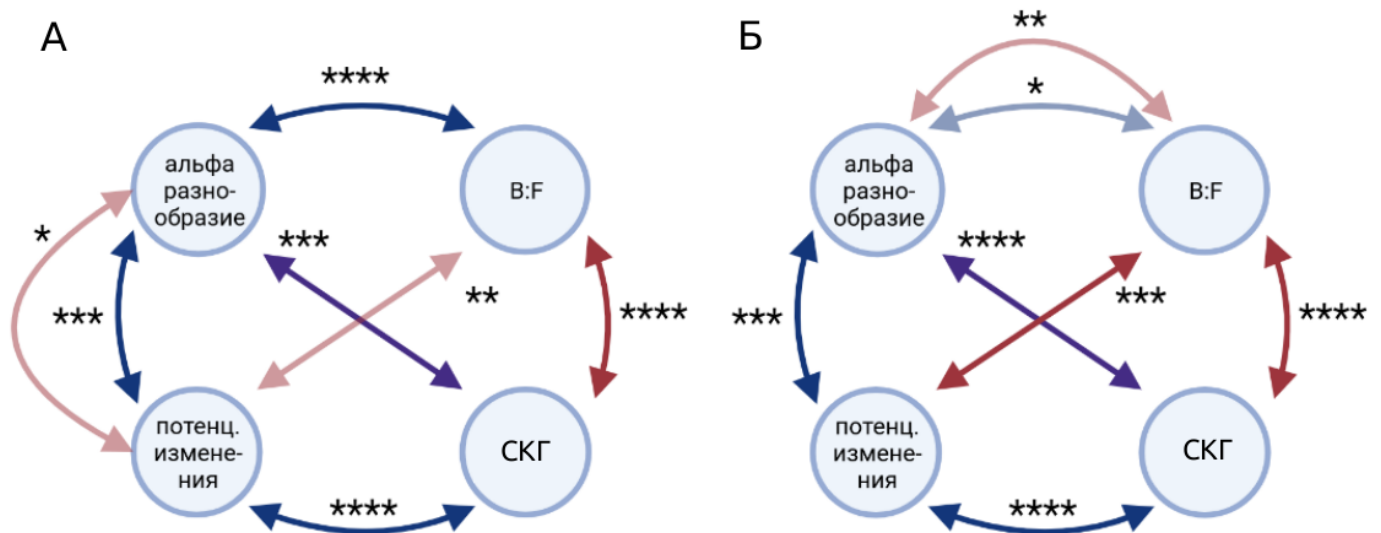


Рисунок 29 - Частичные корреляции Пирсона для потенциала изменения микробиома и параметров микробиома по когорте TwinsUK при использовании в качестве меры альфа разнообразия индекса Шеннона (А) и индекса chao1 (Б). При расчете корреляции между каждой парой переменных производилась поправка на все другие переменные. Рядом со стрелками приведены символы “\*” в случае значимой корреляции ( $p < 0.05$ ). Количество звездочек отражает количество мер бета разнообразия (0 - 4), для которых наблюдалась значимая корреляция соответствующего направления. Красные стрелки соответствуют положительным ассоциациям, а синие - отрицательным.

Данная неконсистентность побудила нас к дополнительному поиску математической составляющей в зависимости между потенциалом изменения и альфа разнообразием. Математическая составляющая может иметь место, так как и потенциал изменения, и альфа

разнообразие зависят от профиля распределения представленности таксонов в образцах, в частности, от разреженности данных. Например, в случае использования для расчета потенциала изменения бета разнообразия Эйтчитсона, все таксоны с нулевой представленностью заменяют на псевдоотсчет или оценку представленности (в нашем случае), что может сближать образцы с низким разнообразием. Для поиска данной составляющей, названия таксонов в каждом образце были перемутированы независимо от других образцов. При этом остался неизменным профиль распределения представленности таксонов в образце, а, следовательно, и его альфа разнообразие. Однако биологическая связь между разнообразием и определенным таксономическим составом была нивелирована. Пересчитав значения потенциала изменений по перемутированным данным, мы все еще наблюдали значимую его ассоциацию с альфа-разнообразием для всех сочетаний мер ( $p < 1 \cdot 10^{-17}$ , Рисунок 30 А, Б). Таким образом, в зависимости между потенциалом изменения и альфа разнообразием действительно имеет место математическая составляющая, которая оказывает влияние независимо от таксономического состава образца. Для того, чтобы оценить, имеет ли место наряду с этим и биологическая составляющая, то есть действительно ли образцы с таксономическим составом, соответствующим высокому альфа разнообразия, имеют меньший потенциал изменения, мы ввели поправку на найденную математическую составляющую (см. Методы, Рисунки 30 А, Б).



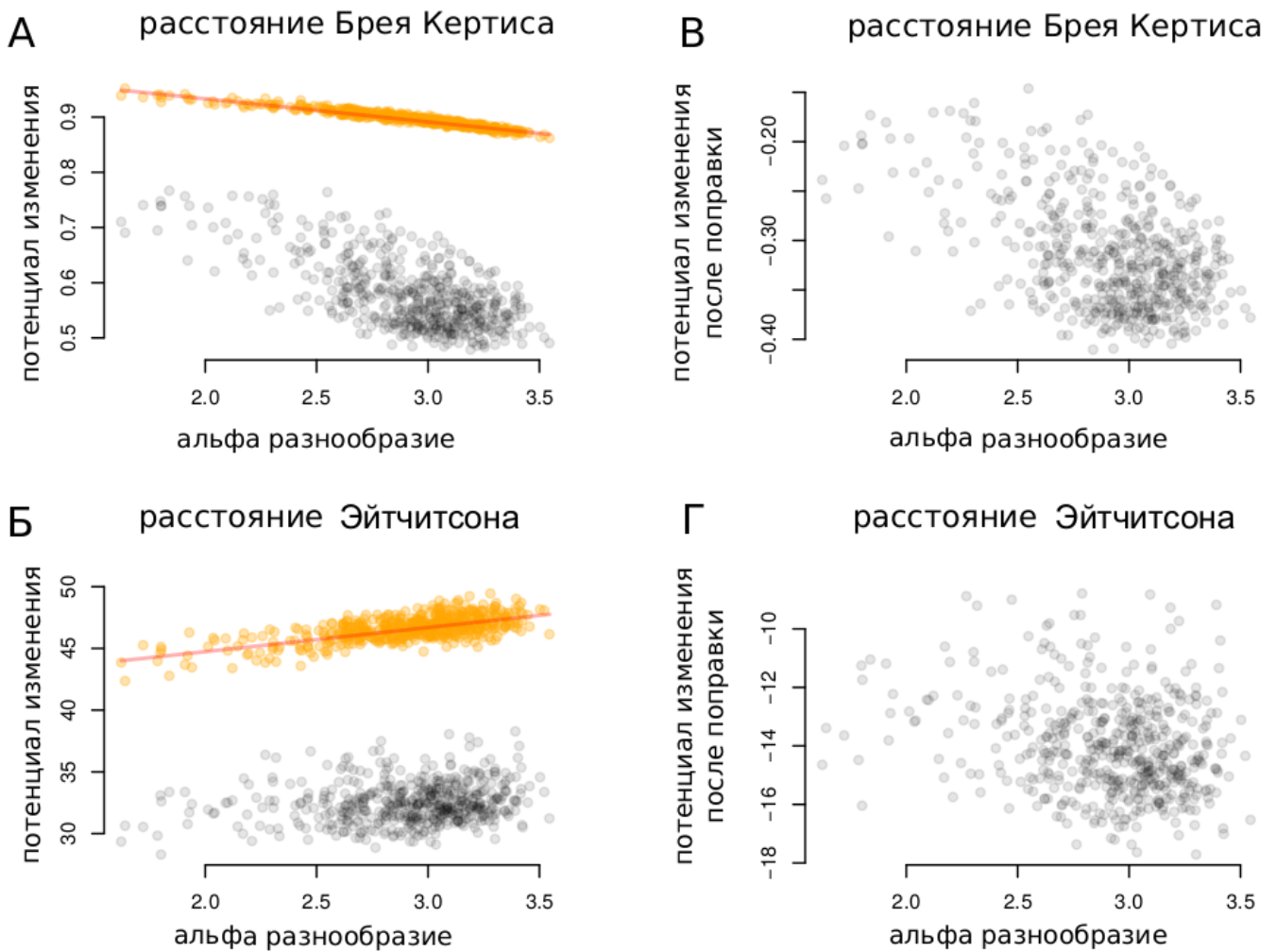


Рисунок 30 - Результат введения поправки на математическую составляющую (пример для двух мер бета разнообразия - Брея-Кертиса (А, В) и Эйтчитсона (Б, Г) и альфа разнообразия по Шеннону). А, Б - исходные зависимости от альфа разнообразия потенциала изменения (черный) и потенциала изменения, полученного после пермутаций (оранжевый). Для потенциала изменения после пермутаций построена предсказательная модель (оранжевая прямая). В, Г - зависимость от альфа разнообразия потенциала изменения микробиома после введения поправки.

После введения поправки, зависимость между потенциалом изменения и альфа разнообразием стала консистентна между мерами по направлению (отрицательна, то есть для меры Эйтчитсона зависимость поменяла знак) и значима для всех сочетаний мер (Рисунки 30 В, Г, 31).

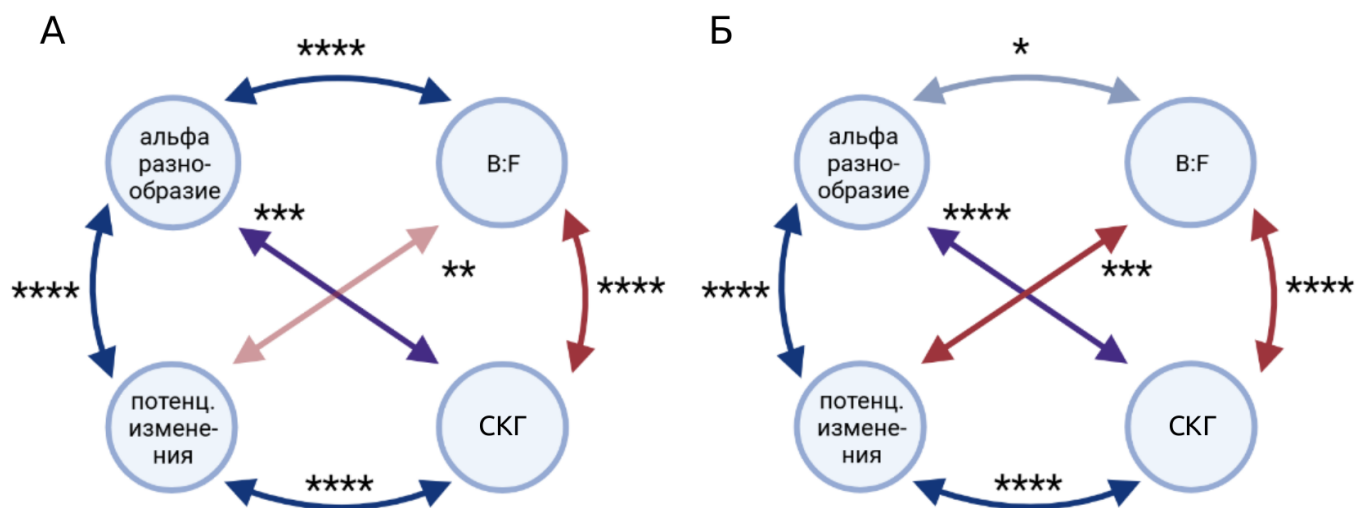


Рисунок 31 - Частичные корреляции Пирсона для потенциала изменения микробиома и параметров микробиома по когорте TwinsUK при использовании в качестве меры альфа разнообразия индекса Шеннона (А) и индекса chao1 (Б) после поправки на математическую составляющую зависимости между потенциалом изменения и альфа разнообразием. Обозначения - как для Рисунка 29.

Как видно, введение поправки не оказало влияния на ассоциации между потенциалом изменения и другими параметрами, кроме альфа разнообразия. Это логично, так как в процессе расчета частичных корреляций с данными параметрами производилась поправка на альфа разнообразие. Из вышеописанного следует, что отрицательная зависимость между потенциалом изменения и альфа разнообразием, а также потенциалом изменения и СКГ были валидированы на независимой когорте с использованием различных мер альфа и бета разнообразия. Положительная ассоциация между потенциалом изменения и отношением В:F также прослеживалась, но для меньшего количества сочетаний мер.

Наглядно ассоциация между потенциалом изменения и альфа разнообразием видна на UMAP-визуализации образцов в пространстве таксонов [279] (Рисунок 32 А). Образцы с бóльшим разнообразием локализуются в центре, и, соответственно, характеризуются меньшим средним расстоянием до остальных образцов, а следовательно, меньшим потенциалом изменения. Для СКГ и отношения В:F такой характер распределения на визуализациях UMAP не прослеживается (Рисунок 32 Б, В).

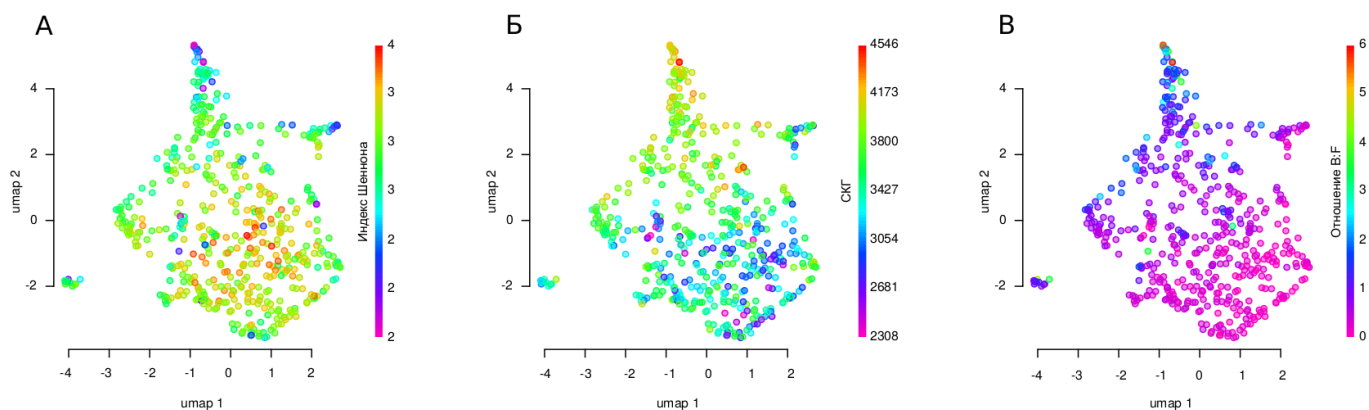


Рисунок 32 - Визуализация образцов в пространстве видов выполненная при помощи алгоритма UMAP [279]. Цвета образцов соответствует значениям альфа разнообразия (А), среднего взвешенного количества генов на бактерию в образце (Б) и отношения В:F (В).

Интересным образом, ассоциации потенциала изменения с альфа разнообразием и СКГ сонаправлены (отрицательны), при этом между самими величинами наблюдается зависимость того же направления (отрицательная) (Рисунки 31, 33). На первый взгляд данное наблюдение может показаться контринтуитивным, однако оно лишь подчеркивает тот факт, что альфа разнообразие и СКГ, будучи связанными между собой, вносят вклад в предсказание потенциала изменений независимо друг от друга. Действительно, вариация, объясненная линейной моделью, где поправленный потенциал изменения - предсказываемая переменная, а альфа разнообразие - предиктор ( $R^2$  поправленный = 0.07), а также моделью, где предиктором выступает СКГ ( $R^2$  поправленный = 0.25), существенно ниже вариации, объясненной моделью, включающей оба параметра в качестве предикторов ( $R^2$  поправленный = 0.52).

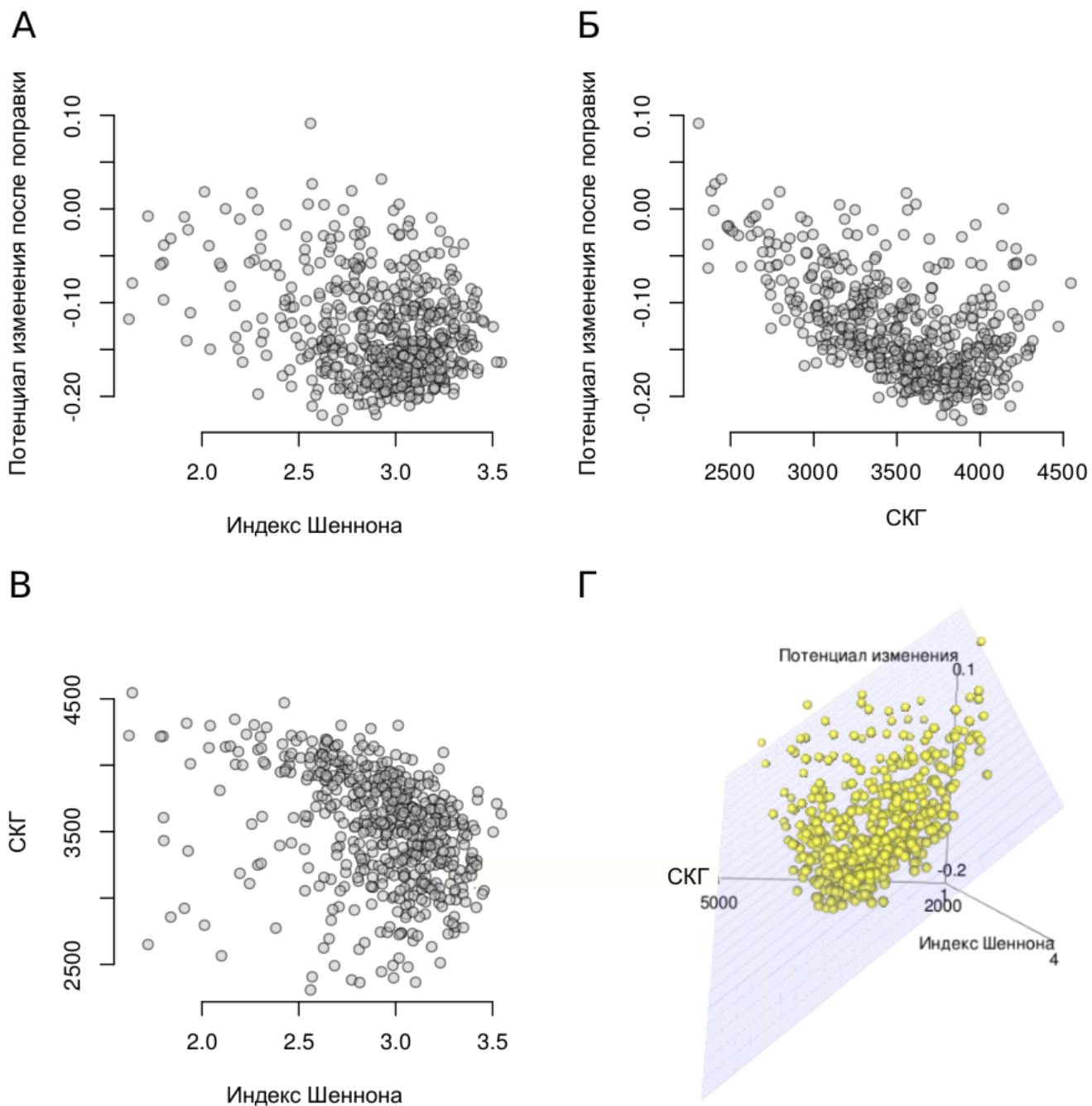


Рисунок 33 - Зависимости между потенциалом изменения после введения поправки, альфа разнообразием и средним взвешенным количеством генов на бактерию. А-В - попарные зависимости. Г - зависимости, визуализированные в трехмерном пространстве. График иллюстрирует, что СКГ и индекс Шеннона вносят соизмеримый вклад в предсказание потенциала изменения.

### 4.3 Обсуждение

В каждой из исследуемых интервенций наблюдалась значимая зависимость между степенью изменения микробиома и различными параметрами его начального состава. Мы поставили задачу исследовать микробиомные параметры, ассоциированные с вариацией степени изменения, в частности то, насколько они универсальны. Для этой цели, вдобавок к истинным изменениям в двух интервенциях, мы исследовали на когорте TwinsUK вариацию потенциала изменения микробиоты - величины, коррелирующей с истинными изменениями, которую при этом можно оценить по одной временной точке. Данный метод исследования устойчивости состава микробиома по выборкам, содержащим одну временную точку, был впервые предложен нами в настоящей работе.

Одним из универсальных микробиотных параметров, ассоциированных как со степенью изменения микробиома в результате интервенций, так и с потенциалом изменения, было альфа разнообразие сообщества. Отрицательная зависимость между степенью изменения микробиома и альфа разнообразием наблюдались и ранее (Таблица 2) [217,221,223–227,281]. При этом интервенции, для которых наблюдалась зависимость, включали очень разные стратегии модуляции микробиоты, например, смену диетических паттернов, добавление определенных пребиотиков или пробиотиков в рацион (Таблица 2). Различались и способы измерения степени изменения микробиома: бета разнообразие, изменение альфа разнообразия, изменение представленности пробиотических штаммов и ключевых для интервенции таксонов. Прямая зависимость между разнообразием и устойчивостью макро- и микробиомов является одним из краеугольных камней теоретической экологии, в частности, это явление было описано для кишечных сообществ [74]. В нашей работе в ходе исследования зависимости, мы обнаружили, что при использовании бета разнообразия в качестве меры изменения имеет место математическая составляющая зависимости от альфа разнообразия. Введение поправки на данную составляющую позволило обнаружить отрицательную зависимость между потенциалом изменения микробиома и альфа разнообразием для всех исследованных мер бета разнообразия. Однако, для однозначного утверждения о наличии и направлении зависимости между альфа разнообразием и изменениями микробиома необходимо более детальное исследование способов учета математической составляющей. Как показал анализ литературы, ранее вопрос о математической составляющей поднимался в работах из области

теоретической экологии [282], однако она крайне редко учитывалась при анализе микробных сообществ.

Зависимость степени изменения микробиома от представленности определенных таксонов также часто наблюдалась при различных интервенциях (Таблица 2). В некоторых работах связь была подтверждена построением классификаторов с их проверкой на независимых когортах [12,222] и экспериментами на модельных животных [13,14,53]. Как видно по Таблице 1, таксономические маркеры степени изменения микробиома достаточно специфичны для различных интервенций. В нашем исследовании мы установили положительную корреляцию между степенью изменения и отношением *Bacteroidetes:Firmicutes* для большей части использованных мер. Интересным образом, в одном из исследований устойчивости микробиома на коротких промежутках времени (в среднем - 17 дней) наблюдалась отрицательная зависимость между отношением *Bacteroidetes:Firmicutes* и степенью изменения - то есть наблюдение, обратное нашему [281]. При этом зависимость от альфа разнообразия в том же исследовании была консистентна с нашими наблюдениями. Это может быть связано с тем, что на показатель В:Ф в значительной степени оказывает влияние выбор протокола пробоподготовки образцов [283].

Кроме того, было показано, что степень изменения микробного сообщества может зависеть от преобладающих экологических ролей его членов. К примеру, преобладание таксонов-генералистов, обладающих широким метаболическим потенциалом, над таксонами-специалистами способствует устойчивости сообщества [284]. Экологическая роль бактерии в кишечном микробиоме может быть косвенно оценена по количеству генов в ней, или же размеру ее генома [214]. Для оценки преобладающих экологических ролей микроорганизмов в исследуемых образцах, мы оценили среднее взвешенное количество генов на бактерию (СКГ) в каждом сообществе. Найденная величина отрицательно коррелировала с альфа разнообразием сообщества, что соответствует литературным данным, указывающим, что бактерии-генералисты преобладают в менее разнообразных сообществах [285]. Также СКГ отрицательно коррелировало с потенциалом изменения микробиома в обоих исследуемых выборках и в независимой когорте, что консистентно с наблюдениями о повышенной устойчивости сообществ, в которых преобладают бактерии-генералисты [284]. Однако, в случае исследования степени изменений при интервенциях, подобная зависимость наблюдалась только для исследования ОКП. Интересно, что альфа разнообразие и среднее взвешенное количество генов на бактерию внесли независимый сильный вклад в предсказание потенциала изменения согласно линейной модели. Эффект от каждой из

данных величин наблюдался, несмотря на их взаимную отрицательную корреляцию (Рисунок 33). Данные величины на двух разных уровнях совместно определяют богатство метаболического потенциала сообщества в целом и его функциональную избыточность. Действительно, именно функциональное разнообразие и избыточность считаются в теоретической экологии величинами, напрямую ассоциированными с устойчивостью [286].

## **Выводы**

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

## **Список используемых обозначений и сокращений**

ДБВ - диета, богатая пищевыми волокнами

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ИМТ - индекс массы тела

КАЛТ - кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань

КЖК - короткоцепочечные жирные кислоты

ЛПС - липополисахариды

МАЛДИ - метод спектрофотометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

мг - миллиграмм

мл - миллилитр

мм - миллиметр

об - обороты

ОКП - обогащенный пробиотическими бактериями кисломолочный продукт

ООО - общество с ограниченной ответственностью

ОТЕ - операционная таксономическая единица

пн - пары нуклеотидов

ПЦР - полимеразно цепная реакция

рРНК - рибосомальная рибонуклеиновая кислота

РНКаза - рибонуклеаза

СКГ - среднее взвешенное количество генов на бактерию в сообществе

СНБ - сегментированные нитчатые бактерии

V:F - отношение *Bacteroidetes:Firmicutes*

DGGE - денатурирующий градиентный гель-электрофорез

FDR - ошибка первого рода

FODMAP - ферментируемые олигосахариды, дисахариды, моносахариды и полиолы

HDAC - деацетилаза гистонов

IgA - иммуноглобулин А

IL - интерлейкин

mGWAS - полнометагеномные ассоциативные исследования

NN - ближайший сосед

PCoA - метод главных координат

PDP - графики частичной зависимости

T-RFLP - метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

TGGE - температурный градиентный гель электрофорез

Th0 - Т-хелперы типа 0

Th17 - Т-хелперы 17 типа

ТМА - триметиламин

ТМАО - триметиламин-N-оксид



Treg - регуляторные Т клетки

WGS - полногеномное секвенирование

## Список использованной литературы

1. Jie Z, Xia H, Zhong S-L, Feng Q, Li S, Liang S, et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Commun.* 2017;8: 845.
2. Cui L, Zhao T, Hu H, Zhang W, Hua X. Association Study of Gut Flora in Coronary Heart Disease through High-Throughput Sequencing. *Biomed Res Int.* 2017;2017: 3796359.
3. de la Cuesta-Zuluaga J, Corrales-Agudelo V, Carmona JA, Abad JM, Escobar JS. Body size phenotypes comprehensively assess cardiometabolic risk and refine the association between obesity and gut microbiota. *Int J Obes.* 2018;42: 424–432.
4. Yun Y, Kim H-N, Kim SE, Heo SG, Chang Y, Ryu S, et al. Comparative analysis of gut microbiota associated with body mass index in a large Korean cohort. *BMC Microbiol.* 2017;17: 151.
5. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12: 661–672.
6. Zeller G, Tap J, Voigt AY, Sunagawa S, Kultima JR, Costea PI, et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol Syst Biol.* 2014;10: 766.
7. Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut.* 2002;51: 51–55.
8. David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, et al. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol.* 2014;15: R89.
9. Biesiekierski JR, Jalanka J, Staudacher HM. Can Gut Microbiota Composition Predict Response to Dietary Treatments? *Nutrients.* 2019;11. doi:10.3390/nu11051134
10. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Elinav E. Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17: 742–753.
11. Mills S, Lane JA, Smith GJ, Grimaldi KA, Ross RP, Stanton C. Precision Nutrition and the Microbiome Part II: Potential Opportunities and Pathways to Commercialisation. *Nutrients.* 2019;11. doi:10.3390/nu11071468
12. Korpela K, Flint HJ, Johnstone AM, Lappi J, Poutanen K, Dewulf E, et al. Gut microbiota signatures predict host and microbiota responses to dietary interventions in obese individuals. *PLoS One.* 2014;9: e90702.
13. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, et al. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell.* 2018;174: 1388–1405.e21.

14. Griffin NW, Ahern PP, Cheng J, Heath AC, Ilkayeva O, Newgard CB, et al. Prior Dietary Practices and Connections to a Human Gut Microbial Metacommunity Alter Responses to Diet Interventions. *Cell Host Microbe*. 2017;21: 84–96.
15. Liu Z, de Vries B, Gerritsen J, Smidt H, Zoetendal EG. Microbiome-based stratification to guide dietary interventions to improve human health. *Nutr Res*. 2020;82: 1–10.
16. Lampe JW, Navarro SL, Hullar MAJ, Shojaie A. Inter-individual differences in response to dietary intervention: integrating omics platforms towards personalised dietary recommendations. *Proc Nutr Soc*. 2013;72: 207–218.
17. Proctor LM. The Human Microbiome Project in 2011 and beyond. *Cell Host Microbe*. 2011;10: 287–291.
18. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489: 220–230.
19. Hildebrand F, Gossmann TI, Frioux C, Özkurt E, Myers PN, Ferretti P, et al. Dispersal strategies shape persistence and evolution of human gut bacteria. *Cell Host Microbe*. 2021;29: 1167–1176.e9.
20. Korpela K. Diet, Microbiota, and Metabolic Health: Trade-Off Between Saccharolytic and Proteolytic Fermentation. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2018;9: 65–84.
21. Koppel N, Maini Rekdal V, Balskus EP. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*. 2017;356. doi:10.1126/science.aag2770
22. Salonen A, de Vos WM. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2014;5: 239–262.
23. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11: 227.
24. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, Tigchelaar EF, Schirmer M, Vatanen T, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*. 2016;352: 565–569.
25. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;294: 1–8.
26. Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10: 323–335.
27. Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70: 5810–5817.
28. Walker AW, Duncan SH, McWilliam Leitch EC, Child MW, Flint HJ. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71: 3692–3700.

29. Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol*. 2015;52: 7577–7587.
30. Vonk RJ, Reckman GAR, Harmsen HJM, Priebe MG. Probiotics and lactose intolerance. *Intech*. 2012;7: 149–160.
31. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen KF, Jeppesen DL, Valerius NH, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111: 389–395.
32. Jonkers D, Penders J, Masclee A, Pierik M. Probiotics in the Management of Inflammatory Bowel Disease. *Drugs*. 2012;72: 803–823.
33. Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*. 2014;513: 59–64.
34. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn’s disease. *Cell Host Microbe*. 2014;15: 382–392.
35. Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol*. 2011;151: 125–140.
36. Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Prakash S. Modification of the gut microbiota to promote human health. *Clinical Insights: Probiotics, Prebiotics and Gut Health*. 2014. pp. 15–34. doi:10.2217/ebo.13.501
37. Steck N, Hoffmann M, Sava IG, Kim SC, Hahne H, Tonkonogy SL, et al. Enterococcus faecalis metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2011;141: 959–971.
38. Iapichino G, Callegari ML, Marzorati S, Cigada M, Corbella D, Ferrari S, et al. Impact of antibiotics on the gut microbiota of critically ill patients. *J Med Microbiol*. 2008;57: 1007–1014.
39. Duvallat C, Gibbons SM, Gurry T, Irizarry RA, Alm EJ. Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses. *Nat Commun*. 2017;8: 1784.
40. Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol*. 2011;149: 88–105.
41. Orrhage K, Brismar B, Nord CE. Effect of Supplements with *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the Intestinal Microbiota during Administration of Clindamycin. *Microb Ecol Health Dis*. 1994;7: 17–25.
42. Plummer S, Weaver MA, Harris JC, Dee P, Hunter J. Clostridium difficile pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of C. difficile diarrhoea. *Int Microbiol*. 2004;7: 59–62.
43. Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky B, Caplan M, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr*. 2005;147: 192–196.

44. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2000. pp. 305–309. doi:10.1053/gast.2000.9370
45. Isolauri E, Arvola T, Sütas Y, Moilanen E, Salminen S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy*. 2000;30: 1604–1610.
46. Kim JY, Kwon JH, Ahn SH, Lee SI, Han YS, Choi YO, et al. Effect of probiotic mix (Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus acidophilus) in the primary prevention of eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21: e386–93.
47. Singh A, Hacini-Rachinel F, Gosoni ML, Bourdeau T, Holvoet S, Doucet-Ladeveze R, et al. Immune-modulatory effect of probiotic Bifidobacterium lactis NCC2818 in individuals suffering from seasonal allergic rhinitis to grass pollen: an exploratory, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67: 161–167.
48. Wang J-H, Fan S-W, Zhu W-Y. Development of Gut Microbiota in a Mouse Model of Ovalbumin-induced Allergic Diarrhea under Sub-barrier System. *Asian-australas J Anim Sci*. 2013;26: 545–551.
49. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol*. 2016;7: 979.
50. Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, et al. Two routes of metabolic cross-feeding between Bifidobacterium adolescentis and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72: 3593–3599.
51. Johnson EL, Heaver SL, Walters WA, Ley RE. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *J Mol Med* . 2017;95: 1–8.
52. Gorvitovskaia A, Holmes SP, Huse SM. Interpreting Prevotella and Bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome*. 2016;4: 15.
53. Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, Lee YS, De Vadder F, Arora T, et al. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of Prevotella. *Cell Metab*. 2015;22: 971–982.
54. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011;334: 105–108.
55. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505: 559–563.
56. Schaan AP, Sarquis D, Cavalcante GC, Magalhães L, Sacuena ERP, Costa J, et al. The structure of Brazilian Amazonian gut microbiomes in the process of urbanisation. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2021;7: 65.

57. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107: 14691–14696.
58. De Filippis F, Pasolli E, Tett A, Tarallo S, Naccarati A, De Angelis M, et al. Distinct Genetic and Functional Traits of Human Intestinal *Prevotella* copri Strains Are Associated with Different Habitual Diets. *Cell Host Microbe*. 2019. doi:10.1016/j.chom.2019.01.004
59. Ley RE. Gut microbiota in 2015: *Prevotella* in the gut: choose carefully. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13: 69–70.
60. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog*. 2017;106: 171–181.
61. Yoon HS, Cho CH, Yun MS, Jang SJ, You HJ, Kim J-H, et al. *Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice. *Nat Microbiol*. 2021;6: 563–573.
62. Hansen EE, Lozupone CA, Rey FE, Wu M, Guruge JL, Narra A, et al. Pan-genome of the dominant human gut-associated archaeon, *Methanobrevibacter smithii*, studied in twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1: 4599–4606.
63. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of *Enterobacteriaceae*. *Cell Host Microbe*. 2007;2: 204.
64. Robinson CJ, Bohannon BJM, Young VB. From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74: 453–476.
65. Freter R. Factors affecting the microecology of the gut. In: Fuller R, editor. *Probiotics: The scientific basis*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1992. pp. 111–144.
66. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473: 174–180.
67. Knights D, Ward TL, McKinlay CE, Miller H, Gonzalez A, McDonald D, et al. Rethinking “Enterotypes.” *Cell Host Microbe*. 2014;16: 433–437.
68. Christensen L, Roager HM, Astrup A, Hjorth MF. Microbial enterotypes in personalized nutrition and obesity management. *Am J Clin Nutr*. 2018;108: 645–651.
69. Vieira-Silva S, Falony G, Belda E, Nielsen T, Aron-Wisnewsky J, Chakaroun R, et al. Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature*. 2020;581: 310–315.
70. Holmes I, Harris K, Quince C. Dirichlet multinomial mixtures: generative models for microbial metagenomics. *PLoS One*. 2012;7: e30126.
71. Eng A, Borenstein E. Taxa-function robustness in microbial communities. *Microbiome*. 2018;6: 45.

72. Franzosa EA, Morgan XC, Segata N, Waldron L, Reyes J, Earl AM, et al. Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111: E2329–38.
73. Goyal A, Dubinkina V, Maslov S. Multiple stable states in microbial communities explained by the stable marriage problem. *ISME J*. 2018;12: 2823–2834.
74. Fassarella M, Blaak EE, Penders J, Nauta A, Smidt H, Zoetendal EG. Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health. *Gut*. 2021;70: 595–605.
75. Moustafa A, Li W, Anderson EL, Wong EHM, Dulai PS, Sandborn WJ, et al. Genetic risk, dysbiosis, and treatment stratification using host genome and gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018;9: e132.
76. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2013;368: 407–415.
77. Derrien M, van Passel MW, van de Bovenkamp JH, Schipper RG, de Vos WM, Dekker J. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*. 2010;1: 254–268.
78. Welch JLM, Hasegawa Y, McNulty NP. Spatial organization of a model 15-member human gut microbiota established in gnotobiotic mice. *Proceedings of the*. 2017. Available: <https://www.pnas.org/content/114/43/E9105.short>
79. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14: 20–32.
80. Zoetendal EG, Raes J, van den Bogert B, Arumugam M, Booijink CCGM, Troost FJ, et al. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J*. 2012;6: 1415–1426.
81. Tuohy K, Del Rio D. *Diet-Microbe Interactions in the Gut: Effects on Human Health and Disease*. Academic Press; 2014.
82. Zhou Y, Xu ZZ, He Y, Yang Y, Liu L, Lin Q, et al. Gut Microbiota Offers Universal Biomarkers across Ethnicity in Inflammatory Bowel Disease Diagnosis and Infliximab Response Prediction. *mSystems*. 2018;3. doi:10.1128/mSystems.00188-17
83. Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, et al. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*. 2017;2: 17004.
84. Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, Casellas F, Campos D, Santiago A, et al. A microbial signature for Crohn’s disease. *Gut*. 2017;66: 813–822.
85. Wang Y, Luo X, Mao X, Tao Y, Ran X, Zhao H, et al. Gut microbiome analysis of type 2 diabetic patients from the Chinese minority ethnic groups the Uygurs and Kazaks. *PLoS One*. 2017;12:

e0172774.

86. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 2015;528: 262–266.
87. Petrov VA, Saltykova IV, Zhukova IA, Alifirova VM, Zhukova NG, Dorofeeva YB, et al. Analysis of Gut Microbiota in Patients with Parkinson’s Disease. *Bull Exp Biol Med*. 2017;162: 734–737.
88. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazzanetti DI, et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One*. 2013;8: e76993.
89. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012;143: 913–6.e7.
90. Neville BA, Forster SC, Lawley TD. Commensal Koch’s postulates: establishing causation in human microbiota research. *Curr Opin Microbiol*. 2018;42: 47–52.
91. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med*. 2017;23: 107–113.
92. Lauté-Caly DL, Raftis EJ, Cowie P, Hennessy E, Holt A, Panzica DA, et al. The flagellin of candidate live biotherapeutic *Enterococcus gallinarum* MRx0518 is a potent immunostimulant. *Sci Rep*. 2019;9: 801.
93. Mohajeri MH, Brummer RJM, Rastall RA, Weersma RK, Harmsen HJM, Faas M, et al. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *Eur J Nutr*. 2018;57: 1–14.
94. Rolhion N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13: 1277–1283.
95. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer R-J. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27: 104–119.
96. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016;165: 1332–1345.
97. Catinean A, Neag MA, Muntean DM, Bocsan IC, Buzoianu AD. An overview on the interplay between nutraceuticals and gut microbiota. *PeerJ*. 2018;6: e4465.
98. Zhou J, Hegsted M, McCutcheon KL, Keenan MJ, Xi X, Raggio AM, et al. Peptide YY and Proglucagon mRNA Expression Patterns and Regulation in the Gut\*. *Obesity* . 2006;14: 683–689.
99. Longo WE, Ballantyne GH, Savoca PE, Adrian TE, Bilchik AJ, Modlin IM. Short-Chain Fatty Acid

- Release of Peptide YY in the Isolated Rabbit Distal Colon. *Scand J Gastroenterol.* 1991;26: 442–448.
100. Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Spinuzzi F, Agea E, Pelli MA, et al. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis.* 2001;22: 1675–1680.
  101. van der Kamp JW. *Dietary Fibre: New Frontiers for Food and Health.* Wageningen Academic Pub; 2010.
  102. Vital M, Howe AC, Tiedje JM. Revealing the Bacterial Butyrate Synthesis Pathways by Analyzing (Meta)genomic Data. *mBio.* 2014. doi:10.1128/mbio.00889-14
  103. Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli G-M, Bartram P, Christl S, et al. Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1992;103: 51–56.
  104. Sabatino ADI, Di Sabatino A, Morera R, Ciccocioppo R, Cazzola P, Gotti S, et al. Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn’s disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22: 789–794.
  105. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity.* 2014;40: 128–139.
  106. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet.* 2003;361: 1496–1501.
  107. Lupton JR. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr.* 2004;134: 479–482.
  108. Donia MS, Fischbach MA. HUMAN MICROBIOTA. Small molecules from the human microbiota. *Science.* 2015;349: 1254766.
  109. Beloborodova NV, Sarshor YN, Bedova AY, Chernevskaya EA, Pautova AK. Involvement of Aromatic Metabolites in the Pathogenesis of Septic Shock. *Shock.* 2018;50: 273–279.
  110. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19: 576–585.
  111. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science.* 2012;336: 1262–1267.
  112. Ufnal M, Zadlo A, Ostaszewski R. TMAO: A small molecule of great expectations. *Nutrition.* 2015;31: 1317–1323.
  113. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2013;368: 1575–1584.



114. Trøseid M, Ueland T, Hov JR, Svardal A, Gregersen I, Dahl CP, et al. Microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide is associated with disease severity and survival of patients with chronic heart failure. *J Intern Med.* 2015;277: 717–726.
115. Ghazalpour A, Cespedes I, Bennett BJ, Allayee H. Expanding role of gut microbiota in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27: 141–147.
116. Beury-Cirou A, Tannières M, Minard C, Soullère L, Rasamiravaka T, Dodd RH, et al. At a supra-physiological concentration, human sexual hormones act as quorum-sensing inhibitors. *PLoS One.* 2013;8: e83564.
117. Hegde M, Wood TK, Jayaraman A. The neuroendocrine hormone norepinephrine increases *Pseudomonas aeruginosa* PA14 virulence through the las quorum-sensing pathway. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;84: 763–776.
118. Neuman H, Debelius JW, Knight R, Koren O. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiol Rev.* 2015;39: 509–521.
119. Roshchina VV. Evolutionary Considerations of Neurotransmitters in Microbial, Plant, and Animal Cells. In: Lyte M, Freestone PPE, editors. *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health.* New York, NY: Springer New York; 2010. pp. 17–52.
120. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106: 3698–3703.
121. Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejd A, et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr.* 2011;105: 755–764.
122. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science.* 2012;336: 489–493.
123. Crabbé PA, Bazin H, Eyssen H, Heremans JF. The Normal Microbial Flora as a Major Stimulus for Proliferation of Plasma Cells Synthesizing IgA in the Gut. *Int Arch Allergy Immunol.* 1968;34: 362–375.
124. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol.* 1993;5: 1461–1471.
125. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* 2004;303: 1662–1665.
126. Mowat AM. To respond or not to respond — a personal perspective of intestinal tolerance. *Nature Reviews Immunology.* 2018. pp. 405–415. doi:10.1038/s41577-018-0002-x
127. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2018;19.

128. Song X. Intestinal microbiota mining: a Th17/Treg cell perspective. *European Journal of BioMedical Research*. 2015;1: 28–35.
129. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009;139: 485–498.
130. Jonsson H, Hugerth LW, Sundh J, Lundin E, Andersson AF. Genome sequence of segmented filamentous bacteria present in the human intestine. *Commun Biol*. 2020;3: 485.
131. Caselli M, Tosini D, Gafà R, Gasbarrini A, Lanza G. Segmented filamentous bacteria-like organisms in histological slides of ileo-cecal valves in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2013;108: 860–861.
132. Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol*. 2010;10: 735–744.
133. Moreira APB, Texeira TFS, Ferreira AB, Peluzio M do CG, Alfenas R de CG. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*. 2012;108: 801–809.
134. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56: 1761–1772.
135. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2011;35: 14S–20S.
136. Anders H-J, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney International*. 2013. pp. 1010–1016. doi:10.1038/ki.2012.440
137. Mosca A, Leclerc M, Hugot JP. Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Frontiers in Microbiology*. 2016. doi:10.3389/fmicb.2016.00455
138. Schmidt TSB, Raes J, Bork P. The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell*. 2018;172: 1198–1215.
139. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016;352: 560–564.
140. Dominguez-Bello MG, Costello EK. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the*. 2010. Available: <https://www.pnas.org/content/107/26/11971.abstract>
141. An R, Wilms E, Masclee AAM, Smidt H, Zoetendal EG, Jonkers D. Age-dependent changes in GI physiology and microbiota: time to reconsider? *Gut*. 2018;67: 2213–2222.
142. Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J. Stool consistency is strongly

- associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut*. 2016;65: 57–62.
143. Goodrich JK, Davenport ER, Beaumont M, Jackson MA, Knight R, Ober C, et al. Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe*. 2016;19: 731–743.
  144. Turpin W, Espin-Garcia O, Xu W, Silverberg MS, Kevans D, Smith MI, et al. Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nat Genet*. 2016;48: 1413–1417.
  145. Bonder MJ, Kurilshikov A, Tigchelaar EF, Mujagic Z, Imhann F, Vila AV, et al. The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nat Genet*. 2016;48: 1407–1412.
  146. Wang J, Thingholm LB, Skieceviciene J, Rausch P, Kummén M, Hov JR, et al. Genome-wide association analysis identifies variation in vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota. *Nat Genet*. 2016;48: 1396–1406.
  147. Kurilshikov A, Wijmenga C, Fu J, Zhernakova A. Host Genetics and Gut Microbiome: Challenges and Perspectives. *Trends Immunol*. 2017;38: 633–647.
  148. Hall AB, Tolonen AC, Xavier RJ. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nat Rev Genet*. 2017;18: 690–699.
  149. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*. 2018;555: 210–215.
  150. Ishida S, Kato K, Tanaka M, Odamaki T, Kubo R, Mitsuyama E, et al. Genome-wide association studies and heritability analysis reveal the involvement of host genetics in the Japanese gut microbiota. *Commun Biol*. 2020;3: 686.
  151. Xie H, Guo R, Zhong H, Feng Q, Lan Z, Qin B, et al. Shotgun Metagenomics of 250 Adult Twins Reveals Genetic and Environmental Impacts on the Gut Microbiome. *Cell Syst*. 2016;3: 572–584.e3.
  152. Lim MY, You HJ, Yoon HS, Kwon B, Lee JY, Lee S, et al. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut*. 2017;66: 1031–1038.
  153. Douglas GM, Bielawski JP, Langille MGI. Re-evaluating the relationship between missing heritability and the microbiome. *Microbiome*. 2020;8: 87.
  154. Imhann F, Bonder MJ, Vila AV, Fu J, Mujagic Z, Vork L, et al. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut*. 2016. pp. 740–748. doi:10.1136/gutjnl-2015-310376
  155. Bahr SM, Tyler BC, Wooldridge N, Butcher BD, Burns TL, Teesch LM, et al. Use of the second-generation antipsychotic, risperidone, and secondary weight gain are associated with an altered gut microbiota in children. *Transl Psychiatry*. 2015;5: e652.
  156. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60: 1577–1585.

157. Kunkel D, Basseri RJ, Makhani MD, Chong K, Chang C, Pimentel M. Methane on breath testing is associated with constipation: a systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci.* 2011;56: 1612–1618.
158. Kashyap PC, Marcobal A, Ursell LK, Larauche M, Duboc H, Earle KA, et al. Complex interactions among diet, gastrointestinal transit, and gut microbiota in humanized mice. *Gastroenterology.* 2013;144: 967–977.
159. Zimmer J, Lange B, Frick J-S, Sauer H, Zimmermann K, Schwiertz A, et al. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur J Clin Nutr.* 2011;66: 53.
160. Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* 2009;11: 2112–2122.
161. Molinero N, Ruiz L, Sánchez B, Margolles A, Delgado S. Intestinal Bacteria Interplay With Bile and Cholesterol Metabolism: Implications on Host Physiology. *Front Physiol.* 2019;10: 185.
162. Toden S, Bird AR, Topping DL, Conlon MA. Resistant starch attenuates colonic DNA damage induced by higher dietary protein in rats. *Nutr Cancer.* 2005;51: 45–51.
163. Hussain M, Umair Ijaz M, Ahmad MI, Khan IA, Brohi SA, Shah AU, et al. Meat proteins in a high-fat diet have a substantial impact on intestinal barriers through mucus layer and tight junction protein suppression in C57BL/6J mice. *Food Funct.* 2019;10: 6903–6914.
164. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell.* 2016;167: 1339–1353.e21.
165. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol.* 2016;16: 341–352.
166. Conlon M, Bird A. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients.* 2014. pp. 17–44. doi:10.3390/nu7010017
167. Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe.* 2018;23: 705–715.
168. Aguirre M, Eck A, Koenen ME, Savelkoul PHM, Budding AE, Venema K. Diet drives quick changes in the metabolic activity and composition of human gut microbiota in a validated in vitro gut model. *Res Microbiol.* 2016;167: 114–125.
169. Rios-Covian D, González S, Nogacka AM, Arboleya S, Salazar N, Gueimonde M, et al. An Overview on Fecal Branched Short-Chain Fatty Acids Along Human Life and as Related With Body Mass Index: Associated Dietary and Anthropometric Factors. *Front Microbiol.* 2020;11: 973.
170. Arranz S, Medina-Remón A, M. R, Estruch R. Effects of Dietary Fiber Intake on Cardiovascular Risk Factors. *Recent Advances in Cardiovascular Risk Factors.* 2012. doi:10.5772/32271

171. Committee ADFT, Others. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*. 2001;46: 112.
172. Slavin J, Green H. Dietary fibre and satiety. *Nutr Bull*. 2007;32: 32–42.
173. Guérin-Deremaux L, Pochat M, Reifer C, Wils D, Cho S, Miller LE. The soluble fiber NUTRIOSE induces a dose-dependent beneficial impact on satiety over time in humans. *Nutr Res*. 2011;31: 665–672.
174. Howlett JF, Betteridge VA, Champ M. The definition of dietary fiber—discussions at the Ninth Vahouny Fiber Symposium: building scientific agreement. *Food Nutr Res*. 2010. Available: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3402/fnr.v54i0.5750>
175. Slavin J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 2013;5: 1417–1435.
176. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*. 2017;8: 172–184.
177. McRorie JW. Psyllium is not fermented in the human gut. *Neurogastroenterology & Motility*. 2015. pp. 1681–1682. doi:10.1111/nmo.12649
178. Wang Y, Ames NP, Tun HM, Tosh SM, Jones PJ, Khafipour E. High Molecular Weight Barley  $\beta$ -Glucan Alters Gut Microbiota Toward Reduced Cardiovascular Disease Risk. *Front Microbiol*. 2016;7: 129.
179. Jew S, AbuMweis SS, Jones PJH. Evolution of the human diet: linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention. *J Med Food*. 2009;12: 925–934.
180. Davis LMG, Martínez I, Walter J, Goin C, Hutkins RW. Barcoded pyrosequencing reveals that consumption of galactooligosaccharides results in a highly specific bifidogenic response in humans. *PLoS One*. 2011;6: e25200.
181. Vandenplas Y, Zakharova I, Dmitrieva Y. Oligosaccharides in infant formula: more evidence to validate the role of prebiotics. *Br J Nutr*. 2015;113: 1339–1344.
182. Martínez I, Kim J, Duffy PR, Schlegel VL, Walter J. Resistant starches types 2 and 4 have differential effects on the composition of the fecal microbiota in human subjects. *PLoS One*. 2010;5: e15046.
183. Deehan EC, Yang C, Perez-Muñoz ME, Nguyen NK, Cheng CC, Triador L, et al. Precision Microbiome Modulation with Discrete Dietary Fiber Structures Directs Short-Chain Fatty Acid Production. *Cell Host Microbe*. 2020;27: 389–404.e6.
184. Cassidy A, Minihane A-M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr*. 2017;105: 10–22.
185. Guadamuro L, Dohrmann AB, Tebbe CC, Mayo B, Delgado S. Bacterial communities and metabolic activity of faecal cultures from equol producer and non-producer menopausal women under treatment with soy isoflavones. *BMC Microbiol*. 2017;17: 93.

186. Qiao Y, Sun J, Xia S, Tang X, Shi Y, Le G. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. *Food Funct.* 2014;5: 1241–1249.
187. Hylemon PB, Harris SC, Ridlon JM. Metabolism of hydrogen gases and bile acids in the gut microbiome. *FEBS Lett.* 2018;592: 2070–2082.
188. Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT, Allison C, Segal I, Vorster HH, et al. Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut.* 1990;31: 679–683.
189. Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, Rodríguez-Baños M, Campo RD, Fernández L, et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact.* 2012;28: 36–44.
190. Elli M, Callegari ML, Ferrari S, Bessi E, Cattivelli D, Soldi S, et al. Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72: 5113–5117.
191. Lahti L, Salonen A, Kekkonen RA, Salojärvi J, Jalanka-Tuovinen J, Palva A, et al. Associations between the human intestinal microbiota, *Lactobacillus rhamnosus* GG and serum lipids indicated by integrated analysis of high-throughput profiling data. *PeerJ.* 2013;1: e32.
192. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16: 605–616.
193. Leeming ER, Johnson AJ, Spector TD, Le Roy CI. Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients.* 2019;11. doi:10.3390/nu11122862
194. Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J.* 2016;10: 742–750.
195. Gargari G, Taverniti V, Balzaretto S, Ferrario C, Gardana C, Simonetti P, et al. Consumption of a *Bifidobacterium bifidum* Strain for 4 Weeks Modulates Dominant Intestinal Bacterial Taxa and Fecal Butyrate in Healthy Adults. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82: 5850–5859.
196. Azad MAK, Sarker M, Li T, Yin J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *Biomed Res Int.* 2018;2018: 9478630.
197. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11: 506–514.
198. Xue L, He J, Gao N, Lu X, Li M, Wu X, et al. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. *Sci Rep.* 2017;7: 45176.
199. Cervantes-Barragan L, Chai JN, Tianero MD, Di Luccia B, Ahern PP, Merriman J, et al. *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4 CD8 $\alpha\alpha$  T cells. *Science.* 2017. pp. 806–810. doi:10.1126/science.aah5825

200. Wickens K, Black PN, Stanley TV, Mitchell E, Fitzharris P, Tannock GW, et al. A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122: 788–794.
201. Yu L, Zhao X-K, Cheng M-L, Yang G-Z, Wang B, Liu H-J, et al. *Saccharomyces boulardii* Administration Changes Gut Microbiota and Attenuates D-Galactosamine-Induced Liver Injury. *Sci Rep*. 2017;7: 1359.
202. Li SS, Zhu A, Benes V, Costea PI, Hercog R, Hildebrand F, et al. Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science*. 2016;352: 586–589.
203. Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*. 2011;53: 994–1002.
204. Lübbert C, John E, von Müller L. *Clostridium difficile* infection: guideline-based diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111: 723–731.
205. Lee STM, Kahn SA, Delmont TO, Shaiber A, Esen ÖC, Hubert NA, et al. Tracking microbial colonization in fecal microbiota transplantation experiments via genome-resolved metagenomics. *Microbiome*. 2017;5: 50.
206. Anderson JL, Edney RJ, Whelan K. Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;36: 503–516.
207. Knox NC, Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. The Gut Microbiome as a Target for IBD Treatment: Are We There Yet? *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2019;17: 115–126.
208. Evrensel A, Ceylan ME. Fecal Microbiota Transplantation and Its Usage in Neuropsychiatric Disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2016;14: 231–237.
209. Xu M-Q, Cao H-L, Wang W-Q, Wang S, Cao X-C, Yan F, et al. Fecal microbiota transplantation broadening its application beyond intestinal disorders. *World J Gastroenterol*. 2015;21: 102–111.
210. Chehoud C, Dryga A, Hwang Y, Nagy-Szakal D, Hollister EB, Luna RA, et al. Transfer of Viral Communities between Human Individuals during Fecal Microbiota Transplantation. *MBio*. 2016;7: e00322.
211. DeFilipp Z, Bloom PP, Torres Soto M, Mansour MK, Sater MRA, Huntley MH, et al. Drug-Resistant *E. coli* Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant. *N Engl J Med*. 2019;381: 2043–2050.
212. Bihl F, Castelli D, Marincola F, Dodd RY, Brander C. Transfusion-transmitted infections. *J Transl Med*. 2007;5: 25.
213. Venkataraman A, Sieber JR, Schmidt AW, Waldron C, Theis KR, Schmidt TM. Variable responses of human microbiomes to dietary supplementation with resistant starch. *Microbiome*. 2016;4: 33.
214. Walter J, Ley R. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev*

- Microbiol. 2011;65: 411–429.
215. Wu GD, Compher C, Chen EZ, Smith SA, Shah RD, Bittinger K, et al. Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut*. 2016;65: 63–72.
  216. Healey G, Murphy R, Butts C, Brough L, Whelan K, Coad J. Habitual dietary fibre intake influences gut microbiota response to an inulin-type fructan prebiotic: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over, human intervention study. *Br J Nutr*. 2018;119: 176–189.
  217. Salonen A, Lahti L, Salojärvi J, Holtrop G, Korpela K, Duncan SH, et al. Impact of diet and individual variation on intestinal microbiota composition and fermentation products in obese men. *ISME J*. 2014;8: 2218–2230.
  218. Kong LC, Wuillemin P-H, Bastard J-P, Sokolovska N, Gougis S, Fellahi S, et al. Insulin resistance and inflammation predict kinetic body weight changes in response to dietary weight loss and maintenance in overweight and obese subjects by using a Bayesian network approach. *Am J Clin Nutr*. 2013;98: 1385–1394.
  219. Chumpitazi BP, Cope JL, Hollister EB, Tsai CM, McMeans AR, Luna RA, et al. Randomised clinical trial: gut microbiome biomarkers are associated with clinical response to a low FODMAP diet in children with the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;42: 418–427.
  220. Chumpitazi BP, Hollister EB, Oezguen N, Tsai CM, McMeans AR, Luna RA, et al. Gut microbiota influences low fermentable substrate diet efficacy in children with irritable bowel syndrome. *Gut Microbes*. 2014;5: 165–175.
  221. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013;500: 585–588.
  222. Zeevi D, Korem T, Zmora N, Israeli D, Rothschild D, Weinberger A, et al. Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell*. 2015;163: 1079–1094.
  223. Tap J, Furet J-P, Bensaada M, Philippe C, Roth H, Rabot S, et al. Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults. *Environ Microbiol*. 2015;17: 4954–4964.
  224. Maldonado-Gómez MX, Martínez I, Bottacini F, O’Callaghan A, Ventura M, van Sinderen D, et al. Stable Engraftment of *Bifidobacterium longum* AH1206 in the Human Gut Depends on Individualized Features of the Resident Microbiome. *Cell Host Microbe*. 2016;20: 515–526.
  225. Ma C, Huo D, You Z, Peng Q, Jiang S, Chang H, et al. Differential pattern of indigenous microbiome responses to probiotic *Bifidobacterium lactis* V9 consumption across subjects. *Food Res Int*. 2020;136: 109496.
  226. Lang JM, Pan C, Cantor RM, Tang WHW, Garcia-Garcia JC, Kurtz I, et al. Impact of Individual Traits, Saturated Fat, and Protein Source on the Gut Microbiome. *MBio*. 2018;9. doi:10.1128/mBio.01604-18



227. Flores GE, Caporaso JG, Henley JB, Rideout JR, Domogala D, Chase J, et al. Temporal variability is a personalized feature of the human microbiome. *Genome Biol.* 2014;15: 531.
228. Lappi J, Salojärvi J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K, de Vos WM, et al. Intake of Whole-Grain and Fiber-Rich Rye Bread Versus Refined Wheat Bread Does Not Differentiate Intestinal Microbiota Composition in Finnish Adults with Metabolic Syndrome. *The Journal of Nutrition.* 2013. pp. 648–655. doi:10.3945/jn.112.172668
229. Dewulf EM, Cani PD, Claus SP, Fuentes S, Puylaert PGB, Neyrinck AM, et al. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut.* 2013;62: 1112–1121.
230. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* 2011;5: 220–230.
231. Davis LMG, Martínez I, Walter J, Hutkins R. A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults. *Int J Food Microbiol.* 2010;144: 285–292.
232. Kolida S, Meyer D, Gibson GR. A double-blind placebo-controlled study to establish the bifidogenic dose of inulin in healthy humans. *Eur J Clin Nutr.* 2007;61: 1189–1195.
233. Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Vicaut E, Neut C, Flourié B, et al. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *Am J Clin Nutr.* 2004;80: 1658–1664.
234. Eckburg PB. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science.* 2005. pp. 1635–1638. doi:10.1126/science.1110591
235. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74: 5088–5090.
236. Prod'homme G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol.* 2010;48: 1481–1483.
237. Lagier J-C, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18: 1185–1193.
238. Hugerth LW, Wefer HA, Lundin S, Jakobsson HE, Lindberg M, Rodin S, et al. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80: 5116–5123.
239. Merkel AY, Yu. Merkel A, Yu. Tarnovetskii I, Podosokorskaya OA, Toshchakov SV. Analysis of 16S rRNA Primer Systems for Profiling of Thermophilic Microbial Communities. *Microbiology.* 2019. pp. 671–680. doi:10.1134/s0026261719060110
240. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME

- allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7: 335–336.
241. Ritari J, Salojärvi J, Lahti L, de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics*. 2015;16: 1056.
  242. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016;4: e2584.
  243. Brandt BW, Bonder MJ, Huse SM, Zaura E. TaxMan: a server to trim rRNA reference databases and inspect taxonomic coverage. *Nucleic Acids Res*. 2012;40: W82–7.
  244. Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 2012;28: 3150–3152.
  245. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32: 1792–1797.
  246. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22: 4673–4680.
  247. Core Team R, Others. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna. 2013.
  248. Kurtz ZD, Müller CL, Miraldi ER, Littman DR, Blaser MJ, Bonneau RA. Sparse and compositionally robust inference of microbial ecological networks. *PLoS Comput Biol*. 2015;11: e1004226.
  249. Blondel VD, Guillaume J-L, Lambiotte R, Lefebvre E. Fast unfolding of communities in large networks. *J Stat Mech: Theory Exp*. 2008;2008: P10008.
  250. Tyakht AV, Kostyukova ES, Popenko AS, Belenikin MS, Pavlenko AV, Larin AK, et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat Commun*. 2013;4: 2469.
  251. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;217: 133–139.
  252. Ruaud A, Esquivel-Elizondo S, de la Cuesta-Zuluaga J, Waters JL, Angenent LT, Youngblut ND, et al. Syntrophy via Interspecies H<sub>2</sub> Transfer between *Christensenella* and *Methanobrevibacter* Underlies Their Global Cooccurrence in the Human Gut. *MBio*. 2020;11. doi:10.1128/mBio.03235-19
  253. Hu H-J, Park S-G, Jang HB, Choi M-K, Park K-H, Kang JH, et al. Obesity Alters the Microbial Community Profile in Korean Adolescents. *PLoS One*. 2015;10: e0134333.
  254. Tims S, Derom C, Jonkers DM, Vlietinck R, Saris WH, Kleerebezem M, et al. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J*. 2013;7: 707–717.

255. Bik EM, Ugalde JA, Cousins J, Goddard AD, Richman J, Apte ZS. Microbial biotransformations in the human distal gut. *Br J Pharmacol.* 2018;175: 4404–4414.
256. Setchell KDR, Clerici C. Equol: history, chemistry, and formation. *J Nutr.* 2010;140: 1355S–62S.
257. Matthies A, Blaut M, Braune A. Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75: 1740–1744.
258. Nakatsu CH, Armstrong A, Clavijo AP, Martin BR, Barnes S, Weaver CM. Fecal bacterial community changes associated with isoflavone metabolites in postmenopausal women after soy bar consumption. *PLoS One.* 2014;9: e108924.
259. Hungate RE. Bacterial ecology in the small intestine. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1978. pp. S125–S127. doi:10.1093/ajcn/31.10.s125
260. Borewicz KA. Human gastrointestinal microbiota modulation with dietary prebiotics: an intimate interaction throughout life. Wageningen University. 2018. Available: <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/448525>
261. Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, et al. Dysbiosis of salivary microbiota in inflammatory bowel disease and its association with oral immunological biomarkers. *DNA Res.* 2014;21: 15–25.
262. Dubinkina VB, Tyakht AV, Odintsova VY, Yarygin KS, Kovarsky BA, Pavlenko AV, et al. Links of gut microbiota composition with alcohol dependence syndrome and alcoholic liver disease. *Microbiome.* 2017;5: 141.
263. Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O’Keefe S, Mitchel T, et al. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Front Microbiol.* 2016;7: 459.
264. Leitch ECM, Walker AW, Duncan SH, Holtrop G, Flint HJ. Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria. *Environ Microbiol.* 2007;9: 667–679.
265. Kaakoush NO. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5: 84.
266. Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12(®). *Microorganisms.* 2014;2: 92–110.
267. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* 2017;19: 29–41.
268. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes.* 2016;7: 189–200.
269. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13: R79.

270. Claassen-Weitz S, Shittu AO, Ngwarai MR, Thabane L, Nicol MP, Kaba M. Fecal Carriage of *Staphylococcus aureus* in the Hospital and Community Setting: A Systematic Review. *Front Microbiol.* 2016;7: 449.
271. Liu T, Hougen H, Vollmer AC, Hiebert SM. Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids. *Anaerobe.* 2012;18: 331–337.
272. Silvi S, Nardi M, Sulpizio R, Orpianesi C, Caggiano M, Carnevali O, et al. Effect of the addition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* on the gut microbiota composition and contribution to the well-being of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Microbial Ecology in Health and Disease.* 2008. pp. 53–59. doi:10.1080/08910600701876020
273. Joy S, Siow RCM, Rowlands DJ, Becker M. The Isoflavone Equol Mediates Rapid Vascular Relaxation Ca<sup>2+</sup>-independent activation of endothelial nitric-oxide synthase/hsp90 involving erk1/2 and akt .... *Journal of Biological.* 2006. Available: <http://www.jbc.org/content/281/37/27335.short>
274. Itsumi M, Shiota M, Takeuchi A, Kashiwagi E. Equol inhibits prostate cancer growth through degradation of androgen receptor by S-phase kinase-associated protein 2. *Cancer.* 2016. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cas.12948>
275. Kuhn M, Others. Predictive Modeling with R and the caret Package. Google Scholar. 2013. Available: <http://www.math.chalmers.se/Stat/Grundutb/GU/MSA220/S17/caret-slides.pdf>
276. Chen T, Guestrin C. XGBoost: A Scalable Tree Boosting System. *Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining.* New York, NY, USA: Association for Computing Machinery; 2016. pp. 785–794.
277. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell.* 2014;159: 789–799.
278. Martín-Fernández J-A, Hron K, Templ M, Filzmoser P, Palarea-Albaladejo J. Bayesian-multiplicative treatment of count zeros in compositional data sets. *Stat Modelling.* 2015;15: 134–158.
279. McInnes L, Healy J, Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. *arXiv [stat.ML].* 2018. Available: <http://arxiv.org/abs/1802.03426>
280. Olesen JM, Dupont YL, O’Gorman E, Ings TC, Layer K, Melián CJ, et al. Chapter 1 - From Broadstone to Zackenberg: Space, Time and Hierarchies in Ecological Networks. In: Woodward G, editor. *Advances in Ecological Research.* Academic Press; 2010. pp. 1–69.
281. Byrd AL, Liu M, Fujimura KE, Lyalina S, Nagarkar DR, Charbit B, et al. Gut microbiome stability and dynamics in healthy donors and patients with non-gastrointestinal cancers. *J Exp Med.* 2021;218. doi:10.1084/jem.20200606
282. Chase JM, Kraft NJB, Smith KG, Vellend M, Inouye BD. Using null models to disentangle variation in community dissimilarity from variation in  $\alpha$ -diversity. *Ecosphere.* 2011;2: art24.
283. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, et al. The

Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*. 2020;12. doi:10.3390/nu12051474

284. Matias MG, Combe M, Barbera C, Mouquet N. Ecological strategies shape the insurance potential of biodiversity. *Front Microbiol*. 2012;3: 432.
285. Bello MD, Lee H, Goyal A, Gore J. Resource–diversity relationships in bacterial communities reflect the network structure of microbial metabolism. *Nature Ecology & Evolution*. 2021. pp. 1424–1434. doi:10.1038/s41559-021-01535-8
286. McCann KS. The diversity-stability debate. *Nature*. 2000;405: 228–233.

## Приложения

### Приложение 1. Критерии включения и невключения для исследования ДБВ.

#### Критерии включения:

1. Наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании.
2. Здоровые добровольцы, мужчины и женщины в возрасте от 18 лет европеоидной расы.
3. Для женщин - отрицательный тест на беременность.
4. Способность придерживаться плана исследования, установленного исследователем.

#### Критерии невключения:

1. Беременность или лактация.
2. Наличие онкологических заболеваний.
3. Перенесенные хирургические вмешательства менее чем за 3 месяца до начала исследования.
4. Злоупотребление алкоголем или наркотиками.
5. Непереносимость лактозы.
6. Непереносимость глютена.

### Приложение 2. Критерии включения и невключения для исследования ОКП.

#### Критерии включения:

1. Наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании.
2. Здоровые добровольцы, мужчины и женщины в возрасте от 18 до 40 лет европеоидной расы.
3. Верифицированный диагноз “здоров” согласно стандартным клиническим, лабораторным и инструментальным тестам.
4. Способность придерживаться плана исследования, установленного исследователем.
5. Соглашение не принимать другие ферментированные молочные продукты, кроме исследуемого, а также про- и пребиотики в течение всего периода исследования.
6. Для женщин - отрицательный тест на беременность и соглашение о соблюдении контрацепции в течение всего периода исследования.

Критерии невключения:

1. Индивидуальная непереносимость и/или пищевая аллергия на компоненты исследуемого продукта.
2. Беременность или лактация.
3. Курение.
4. Участие в других исследованиях продуктов или лекарств менее чем за 3 месяца до начала данного исследования.
5. Перенесенные хирургические вмешательства на пищеварительном тракте (кроме удаления аппендикса).
6. Хронические заболевания пищеварительного тракта, сердечнососудистой, мочеполовой, дыхательной и нейроэндокринной систем, а также системы крови.
7. Острые инфекционные, неинфекционные или аллергические заболевания, перенесенные менее чем за 4 недели до начала исследования.
8. Использование антибиотиков менее чем за 4 недели до начала исследования.
9. Систолическое артериальное давление измеренное в положении сидя менее чем 120 мм рт. ст. или более чем 140 мм. рт. ст. и / или диастолическое артериальное давление менее чем 80 мм рт. ст. или более чем 90 мм. рт. ст. На момент скрининга.
10. Пульс менее 60 ударов в минуту или более чем 90 ударов в минуту на момент скрининга.
11. Регулярное использование рецептурных и безрецептурных препаратов менее чем за 4 недели до начала исследования; прием биологически активных добавок, специализированных диетических (профилактических и лечебных) продуктов менее чем за 2 недели до начала исследования.
12. Употребление более 10 ЕД алкоголя в неделю (1 ЕД алкоголя эквивалентна ½ л пива, 200 мл вина или 50 мл спиртных напитков) или анамнестические данные об алкоголизме и / или наркомании.

Приложение 3 - Таксоны, значимо изменившиеся в представленности в исследовании ДБВ. Положительный коэффициент линейной модели соответствует повысившемуся в представленности таксону, а отрицательный - понизившемуся.

Таксон	Уровень	Коэффициент линейной модели	p	FDR	Размер эффекта согласно LDA
--------	---------	-----------------------------	---	-----	-----------------------------

Bacteroides-кооператив	кооператив	-0.1160	0.0000	0.0000	4.4531
Staphylococcus-кооператив	кооператив	0.0412	0.0000	0.0000	3.8020
Sphingomonas-кооператив	кооператив	0.0171	0.0000	0.0000	3.5628
Blautia-кооператив	кооператив	0.0499	0.0000	0.0000	4.3584
Slackia-кооператив	кооператив	0.0174	0.0000	0.0000	3.4576
Faecalibacterium-кооператив	кооператив	-0.0385	0.0001	0.0002	4.1481
Holdemanela-кооператив	кооператив	0.0120	0.0006	0.0013	3.2452
Oscillibacter-кооператив	кооператив	-0.0185	0.0013	0.0026	3.5529
Veillonella-кооператив	кооператив	-0.0046	0.0102	0.0182	3.1291
Akkermansia-кооператив	кооператив	0.0168	0.0120	0.0191	3.2772
Bacteroidetes	тип	-0.1330	0.0000	0.0000	4.5580
Proteobacteria	тип	0.0339	0.0000	0.0000	3.8079
Firmicutes	тип	0.0513	0.0000	0.0000	4.3276
Actinobacteria	тип	0.0336	0.0000	0.0000	3.9208
Euryarchaeota	тип	0.0096	0.0000	0.0001	3.2475
Unclassified	тип	0.0046	0.0008	0.0010	3.0923
Bacteroidia	класс	-0.1331	0.0000	0.0000	4.5444
Betaproteobacteria	класс	-0.0151	0.0000	0.0000	3.2231
Gammaproteobacteria	класс	0.0368	0.0000	0.0000	3.7797
(Bacilli/Clostridia)	класс	-0.0133	0.0000	0.0000	3.1614
Actinobacteria	класс	0.0336	0.0000	0.0000	3.8675
Deltaproteobacteria	класс	-0.0073	0.0000	0.0000	2.9606
Negativicutes	класс	-0.0270	0.0000	0.0000	3.4500
Clostridia	класс	0.0412	0.0000	0.0001	4.2674
Methanobacteria	класс	0.0096	0.0000	0.0001	3.0182
Alphaproteobacteria	класс	0.0140	0.0001	0.0001	3.1206
Erysipelotrichia	класс	0.0174	0.0001	0.0001	3.4433
Unclassified;unclassified	класс	0.0046	0.0008	0.0011	2.8477
Bacilli	класс	0.0172	0.0080	0.0092	3.3746



Firmicutes;unclassified	класс	0.0070	0.0169	0.0182	2.9622
Bacteroidales	порядок	-0.1331	0.0000	0.0000	4.5308
Burkholderiales	порядок	-0.0152	0.0000	0.0000	3.1994
Enterobacteriales	порядок	0.0384	0.0000	0.0000	3.7399
Coriobacteriales	порядок	0.0262	0.0000	0.0000	3.6391
Acidaminococcales	порядок	-0.0236	0.0000	0.0000	3.3058
(Bacilli/Clostridia);unclassified	порядок	-0.0133	0.0000	0.0000	3.1121
Sphingomonadales	порядок	0.0168	0.0000	0.0000	3.1998
Desulfovibrionales	порядок	-0.0073	0.0000	0.0000	2.9477
Clostridiales	порядок	0.0412	0.0000	0.0001	4.2327
Methanobacteriales	порядок	0.0096	0.0000	0.0001	3.0196
Erysipelotrichales	порядок	0.0174	0.0001	0.0001	3.4478
Unclassified;unclassified;unclassified	порядок	0.0046	0.0008	0.0012	2.7261
Bifidobacteriales	порядок	0.0191	0.0025	0.0032	3.5076
Firmicutes;unclassified;unclassified	порядок	0.0070	0.0169	0.0203	2.8215
Bacillales	порядок	0.0198	0.0000	0.0000	3.2955
Staphylococcaceae	семейство	0.0197	0.0000	0.0000	3.2679
Porphyromonadaceae	семейство	-0.0377	0.0000	0.0000	3.4799
Bacteroidaceae	семейство	-0.1009	0.0000	0.0000	4.3279
Rikenellaceae	семейство	-0.0312	0.0000	0.0000	3.4494
Sutterellaceae	семейство	-0.0164	0.0000	0.0000	2.9089
Enterobacteriaceae	семейство	0.0384	0.0000	0.0000	3.7467
Coriobacteriaceae	семейство	0.0262	0.0000	0.0000	3.5952
Acidaminococcaceae	семейство	-0.0236	0.0000	0.0000	3.2638
(Bacilli/Clostridia);unclassified;unclassified	семейство	-0.0133	0.0000	0.0000	2.8892
(Oscillospiraceae/Ruminococcaceae)	семейство	-0.0081	0.0000	0.0000	2.7744
Sphingomonadaceae	семейство	0.0168	0.0000	0.0000	3.0798
Desulfovibrionaceae	семейство	-0.0073	0.0000	0.0000	2.5838
Prevotellaceae	семейство	-0.0417	0.0000	0.0000	3.8705

(Lachnospiraceae/unclassified)	семейство	0.0199	0.0000	0.0000	3.4487
Oscillospiraceae	семейство	-0.0217	0.0000	0.0000	3.4589
Methanobacteriaceae	семейство	0.0096	0.0000	0.0001	2.9554
Catabacteriaceae	семейство	0.0046	0.0001	0.0001	2.6875
Erysipelotrichaceae	семейство	0.0174	0.0001	0.0002	3.4064
Clostridiales;unclassified	семейство	0.0199	0.0003	0.0005	3.6739
Unclassified;unclassified;unclassified;unclassified	семейство	0.0046	0.0008	0.0017	2.4578
Clostridiaceae	семейство	0.0176	0.0013	0.0024	3.6035
Bifidobacteriaceae	семейство	0.0191	0.0025	0.0046	3.5120
Enterococcaceae	семейство	0.0089	0.0090	0.0157	2.7685
Firmicutes;unclassified;unclassified;unclassified	семейство	0.0070	0.0169	0.0282	2.8263
[Mogibacteriaceae]	семейство	-0.0029	0.0297	0.0475	2.7589
Staphylococcus	род	0.0197	0.0000	0.0000	3.1680
Odoribacter	род	-0.0140	0.0000	0.0000	2.9636
Bacteroides	род	-0.1009	0.0000	0.0000	4.3133
Alistipes	род	-0.0312	0.0000	0.0000	3.4626
(Lachnoclostridium/unclassified)	род	-0.0162	0.0000	0.0000	2.9014
Parabacteroides	род	-0.0200	0.0000	0.0000	2.9994
Roseburia	род	-0.0456	0.0000	0.0000	3.8485
(Shigella/unclassified)	род	0.0379	0.0000	0.0000	3.7382
Barnesiella	род	-0.0175	0.0000	0.0000	2.9499
Lachnoclostridium	род	-0.0232	0.0000	0.0000	3.2780
(Faecalibacterium/Gemmiger)	род	0.0349	0.0000	0.0000	3.7833
Porphyromonadaceae;unclassified	род	-0.0129	0.0000	0.0000	2.9357
Tyzzrella	род	-0.0114	0.0000	0.0000	2.6920
Subdoligranulum	род	0.0137	0.0000	0.0000	3.1292
Phascolarctobacterium	род	-0.0223	0.0000	0.0000	3.2716
(Bacilli/Clostridia);unclassified;unclassified;unclassified	род	-0.0133	0.0000	0.0000	2.8851

Parasutterella	род	-0.0088	0.0000	0.0000	2.6888
(Oscillospiraceae/Ruminococcaceae);unclassified	род	-0.0081	0.0000	0.0000	2.7435
Sphingomonas	род	0.0168	0.0000	0.0000	3.0362
Paraprevotella	род	-0.0097	0.0000	0.0000	2.6204
(Lachnospiraceae/unclassified);unclassified	род	0.0199	0.0000	0.0000	3.4401
Oscillibacter	род	-0.0217	0.0000	0.0000	3.4810
Erysipelotrichaceae;unclassified	род	0.0131	0.0000	0.0000	3.0191
Prevotella	род	-0.0382	0.0000	0.0000	3.9140
Collinsella	род	0.0170	0.0000	0.0001	3.3815
Lachnospira	род	-0.0062	0.0000	0.0001	2.4329
Senegalemassilia	род	0.0065	0.0000	0.0001	2.5667
Methanobrevibacter	род	0.0093	0.0001	0.0001	2.8961
Catabacter	род	0.0046	0.0001	0.0002	2.5898
Sutterellaceae;unclassified	род	-0.0042	0.0001	0.0002	2.4016
Clostridiales;unclassified;unclassified	род	0.0199	0.0003	0.0007	3.7027
Dorea	род	0.0153	0.0003	0.0007	3.4050
Howardella	род	0.0037	0.0004	0.0009	2.4177
Adlercreutzia	род	0.0054	0.0005	0.0011	2.4445
(Blautia/unclassified)	род	0.0218	0.0005	0.0011	3.7883
Blautia	род	0.0162	0.0005	0.0012	3.5611
Olsenella	род	0.0040	0.0007	0.0016	2.4658
Unclassified;unclassified;unclassified;unclassified; unclassified	род	0.0046	0.0008	0.0018	2.3505
Bifidobacterium	род	0.0191	0.0025	0.0052	3.5290
Clostridium	род	0.0157	0.0027	0.0054	3.5051
Desulfovibrio	род	-0.0036	0.0045	0.0087	2.4371
Coriobacteriaceae;unclassified	род	0.0083	0.0057	0.0109	2.8021
(Faecalibacterium/unclassified)	род	-0.0175	0.0059	0.0111	3.4109
Holdemanella	род	0.0091	0.0071	0.0128	3.1896

Enterococcus	род	0.0089	0.0090	0.0160	2.7429
Firmicutes;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified	род	0.0070	0.0169	0.0295	2.6772
Lachnospiraceae;unclassified	род	-0.0096	0.0207	0.0352	3.1460
Eggerthella	род	0.0026	0.0255	0.0424	2.4915
Veillonella	род	-0.0035	0.0263	0.0430	2.2901
Slackia	род	0.0027	0.0291	0.0466	2.2407
[Mogibacteriaceae];unclassified	род	-0.0029	0.0297	0.0466	2.5101
Terrisporobacter	род	-0.0047	0.0308	0.0474	2.6289
Staphylococcus_sciuri	вид	0.0180	0.0000	0.0000	2.9253
Odoribacter_splanchnicus	вид	-0.0138	0.0000	0.0000	2.6911
OTU1000 NN=Bacteroides_vulgatus_BNRRR16SA D=96.9	вид	-0.0630	0.0000	0.0000	3.9257
(Lachnoclostridium/unclassified);unclassified	вид	-0.0162	0.0000	0.0000	2.8280
Bacteroides_uniformis	вид	-0.0385	0.0000	0.0000	3.5679
OTU2 NN=Clostridium_bolteae_AJ508452 D=94	вид	-0.0158	0.0000	0.0000	2.8364
OTU686 NN=Alistipes_senegalensis_JF824804 D=96.4	вид	-0.0120	0.0000	0.0000	2.6912
Alistipes_putredinis	вид	-0.0181	0.0000	0.0000	3.0195
(Shigella/unclassified);unclassified	вид	0.0379	0.0000	0.0000	3.7460
Barnesiella_intestinihominis	вид	-0.0147	0.0000	0.0000	2.8134
OTU20 NN=Bacteroides_xylanisolvens_AB510713 D=96.4	вид	-0.0164	0.0000	0.0000	2.9151
(OTU1556 NN=Bacteroides_thetaiotaomicron_BNRRR16SB D=95.9/OTU534 NN=Bacteroides_thetaiotaomicron_BNRRR16SB D=96.7)	вид	-0.0171	0.0000	0.0000	2.9361
Parabacteroides_merdae	вид	-0.0152	0.0000	0.0000	2.8437
OTU507 NN=Bacteroides_xylanisolvens_AB510713 D=97	вид	-0.0149	0.0000	0.0000	2.8277
(Faecalibacterium/Gemmiger);unclassified	вид	0.0349	0.0000	0.0000	3.7895
Porphyromonadaceae;unclassified;unclassified	вид	-0.0129	0.0000	0.0000	2.8161
(OTU1015 NN=Oscillibacter_valericigenes_AB238598 D=95.4/OTU156 NN=Oscillibacter_valericigenes_AB238598 D=95.3)	вид	-0.0097	0.0000	0.0000	2.6541
(OTU1217 NN=Roseburia_inulinivorans_AJ27047	вид	-0.0224	0.0000	0.0000	3.3340

4 D=96.6/Roseburia_inulinivorans)					
Paraprevotella_clara	вид	-0.0105	0.0000	0.0000	2.7140
(Roseburia_faecis/OTU1173 NN=Roseburia_faecis_AY804149 D=94.9)	вид	-0.0253	0.0000	0.0000	3.4605
OTU178 NN=Oscillibacter_valericigenes_AB238598 D=92.5	вид	-0.0168	0.0000	0.0000	3.1280
(OTU559 NN=Alistipes_senegalensis_JF824804 D=96/OTU845 NN=Alistipes_onderdonkii_AB554231 D=96.7)	вид	-0.0119	0.0000	0.0000	2.7711
Subdoligranulum_variabile	вид	0.0137	0.0000	0.0000	3.1192
Firmicutes;(Bacilli/Clostridia);unclassified;unclassified;unclassified;unclassified	вид	-0.0133	0.0000	0.0000	2.8792
OTU975 NN=Bacteroides_fluxus_AB547642 D=96.1	вид	-0.0140	0.0000	0.0000	2.9897
Parasutterella_excrementihominis	вид	-0.0088	0.0000	0.0000	2.5731
(Oscillospiraceae/Ruminococcaceae);unclassified;unclassified	вид	-0.0081	0.0000	0.0000	2.6436
(OTU353 NN=Oscillibacter_valericigenes_AB238598 D=93.8/OTU798 NN=Oscillibacter_valericigenes_AB238598 D=90.1)	вид	-0.0093	0.0000	0.0000	2.7709
OTU169 NN=Faecalibacterium_prausnitzii_X85022 D=96.7	вид	-0.0141	0.0000	0.0000	2.8257
OTU1640 NN=Sphingomonas_paucimobilis_HF558376 D=96	вид	0.0098	0.0000	0.0000	2.8265
(OTU1481 NN=Lactobacillus_rogosae_GU269544 D=96.7/OTU483 NN=Lactobacillus_rogosae_GU269544 D=95.9)	вид	-0.0075	0.0000	0.0000	2.4328
OTU1329 NN=Sphingomonas_panni_AJ575818 D=96.6	вид	0.0104	0.0000	0.0000	2.7763
OTU265 NN=Sphingomonas_panni_AJ575818 D=96.5	вид	0.0087	0.0000	0.0000	2.6236
(Lachnospiraceae/unclassified);unclassified;unclassified	вид	0.0199	0.0000	0.0000	3.4740
(OTU1731 NN=Roseburia_intestinalis_AB661435 D=97/Roseburia_intestinalis)	вид	-0.0169	0.0000	0.0000	3.1117
(Bacteroides_cellulosilyticus/Bacteroides_timonensis)	вид	-0.0104	0.0000	0.0000	2.5232
Bacteroides_massiliensis	вид	-0.0152	0.0000	0.0000	3.0667
OTU1424 NN=Dorea_formicigenerans_EUBRRDP D=96.7	вид	0.0114	0.0000	0.0000	3.0677
(OTU260 NN=Clostridium_clostridioforme_AY169422 D=94.1/OTU739 NN=Clostridium_clostridioforme_AY169422 D=94.6)	вид	-0.0095	0.0000	0.0000	2.4557

OTU434 NN=Clostridium_lactatifermentans_AY033434 D=95.2	вид	-0.0072	0.0000	0.0000	2.4803
OTU504 NN=Clostridium_bolteae_AJ508452 D=92.7	вид	-0.0078	0.0000	0.0001	2.5572
Erysipelotrichaceae;unclassified;unclassified	вид	0.0131	0.0000	0.0001	2.9988
Ruminococcus_callidus	вид	-0.0085	0.0000	0.0001	2.7109
Eubacterium_eligens	вид	-0.0164	0.0000	0.0001	3.1075
(OTU1221 NN=Coprococcus[Bacteroides]_galacturonicus_DQ497994 D=95.5/OTU628 NN=Eubacterium_eligens_EUBRRDAA D=92.4/OTU651 NN=Lactobacillus_rogosae_GU269544 D=95.3)	вид	-0.0062	0.0000	0.0001	2.4097
Collinsella_aerofaciens	вид	0.0164	0.0000	0.0001	3.3558
Phascolarctobacterium_faecium	вид	-0.0147	0.0000	0.0001	3.0562
OTU379 NN=Dialister_succinatiphilus_AB370249 D=96.3	вид	-0.0127	0.0000	0.0001	3.0566
Methanobrevibacter_smithii_U55233.1	вид	0.0092	0.0001	0.0002	2.9255
(OTU513 NN=Blautia_glucerasea_AB588023 D=95.4/OTU661 NN=Blautia_wexlerae_EF036467 D=94.9)	вид	0.0130	0.0001	0.0003	3.1393
Sutterellaceae;unclassified;unclassified	вид	-0.0042	0.0001	0.0003	2.4477
Senegalemassilia_anaerobia	вид	0.0057	0.0001	0.0003	2.4613
OTU395 NN=Clostridium_bolteae_AJ508452 D=93.5	вид	-0.0074	0.0001	0.0003	2.4715
OTU1262 NN=Catabacter_hongkongensis_AB671763 D=84.1	вид	0.0035	0.0001	0.0003	2.4156
(OTU1529 NN=Ruminococcus_torques_AB910746 D=95.8/OTU411 NN=Ruminococcus_torques_AB910746 D=95.9/OTU512 NN=Ruminococcus_torques_AB910746 D=97)	вид	-0.0092	0.0002	0.0006	2.6651
OTU302 NN=Faecalibacterium_prausnitzii_X85022 D=94.1	вид	-0.0174	0.0002	0.0007	3.0718
OTU673 NN=Ruminococcus_callidus_X85100 D=93.8	вид	-0.0069	0.0002	0.0008	2.6510
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;unclassified;unclassified;unclassified	вид	0.0199	0.0003	0.0008	3.7496
Bacteroides_caccae	вид	-0.0137	0.0003	0.0010	2.9198
Howardella_ureilytica	вид	0.0037	0.0004	0.0011	2.3949
Adlercreutzia_equolifaciens	вид	0.0053	0.0005	0.0014	2.3892
(Blautia/unclassified);unclassified	вид	0.0218	0.0005	0.0014	3.7463

(OTU497 NN=Prevotella_copri_AB064923 D=94.1 OTU516 NN=Prevotella_copri_AB064923 D=96.6 Prevotella_copri)	вид	-0.0242	0.0008	0.0022	3.6975
Unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified	вид	0.0046	0.0008	0.0023	2.1884
Bacteroides_eggerthii	вид	-0.0062	0.0010	0.0026	2.7128
OTU565 NN=Clostridium_clariflavum_NR_102987.1 D=77.9	вид	0.0051	0.0015	0.0039	2.4559
Bacteroides_plebeius	вид	-0.0077	0.0018	0.0046	2.6899
OTU1029 NN=Eubacterium_hallii_EUBRRDR D=96.7	вид	0.0094	0.0023	0.0059	3.0334
Roseburia_hominis	вид	-0.0080	0.0024	0.0062	2.4549
OTU1008 NN=Faecalibacterium_prausnitzii_X85022 D=94.9	вид	-0.0172	0.0028	0.0070	3.4252
OTU1049 NN=Eubacterium_hallii_EUBRRDR D=95.9	вид	0.0045	0.0029	0.0071	2.5007
Bifidobacterium_adolescentis	вид	0.0147	0.0032	0.0079	3.3037
OTU1268 NN=Prevotella_copri_AB064923 D=96.5	вид	-0.0102	0.0040	0.0095	3.1503
OTU80 NN=Eubacterium_desmolans_EUBRRDO D=94.1	вид	-0.0041	0.0042	0.0100	2.2656
OTU1536 NN=Eubacterium_ventriosum_EUBRRDAB D=95.6	вид	-0.0055	0.0050	0.0116	2.4771
Streptococcus_parasanguinis	вид	0.0042	0.0057	0.0131	2.1029
Coriobacteriaceae;unclassified;unclassified	вид	0.0083	0.0057	0.0131	2.7833
(Faecalibacterium/unclassified);unclassified	вид	-0.0175	0.0059	0.0133	3.4480
(Bifidobacterium_catenulatum/Bifidobacterium_gallicum/Bifidobacterium_kashiwanohense/Bifidobacterium_pseudocatenulatum)	вид	0.0060	0.0062	0.0136	2.6797
Bacteroides_clarus	вид	-0.0036	0.0062	0.0136	2.5360
OTU333 NN=Faecalibacterium_prausnitzii_X85022 D=88.3	вид	0.0117	0.0071	0.0152	3.4833
Phascolarctobacterium_succinatutens	вид	-0.0072	0.0084	0.0179	2.7156
(Enterococcus_dispar/Enterococcus_durans/Enterococcus_faecalis/Enterococcus_hirae/OTU221 NN=Enterococcus_hirae_KC731419 D=96.3)	вид	0.0087	0.0098	0.0207	2.7974
Dorea_longicatena	вид	0.0098	0.0100	0.0209	3.0196
(OTU197 NN=Ruminococcus_albus_AY445596 D=93.7 OTU223 NN=Ruminococcus_albus_AY445596 D=94.1)	вид	-0.0084	0.0101	0.0209	2.8622

OTU214 NN=Holdemanella_biforme_JF298897 D=96.8	вид	0.0074	0.0120	0.0244	3.0127
OTU996 NN=Blautia_glucerasea_AB588023 D=91.7	вид	0.0035	0.0123	0.0248	2.1394
Bacteroides_coprocola	вид	-0.0046	0.0141	0.0281	2.3372
Firmicutes;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified	вид	0.0070	0.0169	0.0333	2.7496
(OTU1367 NN=Prevotella_copri_AB064923 D=96.7/OTU1459 NN=Prevotella_copri_AB064923 D=92.4)	вид	-0.0040	0.0183	0.0352	2.4353
OTU910 NN=Olsenella_uli_AY005814 D=92.1	вид	0.0020	0.0183	0.0352	2.4152
OTU1535 NN=Eubacterium_hallii_EUBRRDR D=96.5	вид	0.0048	0.0202	0.0384	2.6742
Lachnospiraceae;unclassified;unclassified	вид	-0.0096	0.0207	0.0390	3.1775
(OTU1383 NN=Blautia_glucerasea_AB588023 D=93.2/OTU1528 NN=Blautia_wexlerae_EF036467 D=93.1/OTU819 NN=Blautia_glucerasea_AB588023 D=95.3)	вид	0.0100	0.0217	0.0405	3.2679
OTU193 NN=Barnesiella_intestinihominis_AB370251 D=85.1	вид	-0.0027	0.0242	0.0446	2.2900
Eggerthella_lenta	вид	0.0026	0.0255	0.0464	2.2925
OTU93 NN=Ruminococcus_bromii_DQ882649 D=96.3	вид	0.0101	0.0277	0.0499	2.9510

Приложение 4 - Таксоны, значимо изменившиеся в представленности в исследовании ОКП. Положительный коэффициент линейной модели соответствует повысившемуся в представленности таксону, а отрицательный - понизившемуся.

Таксон	Уровень	Коэффициент линейной модели	p	FDR	Размер эффекта согласно LDA
Slackia-кооператив	кооператив	0.0155	0.0005	0.0066	3.4891
Actinobacteria	тип	0.0337	0.0002	0.0013	3.8894
Bacteroidetes	тип	-0.0388	0.0251	0.0754	4.0886
Actinobacteria	класс	0.0337	0.0002	0.0028	3.8683
Erysipelotrichia	класс	0.0209	0.0036	0.0235	3.5081
Coriobacteriales	порядок	0.0200	0.0001	0.0014	3.3985
Erysipelotrichales	порядок	0.0209	0.0036	0.0234	3.5012
Bifidobacteriales	порядок	0.0265	0.0044	0.0234	3.6794



Acidaminococcales	порядок	-0.0142	0.0107	0.0426	3.0832
Bacillales	порядок	0.0041	0.0144	0.0461	2.7219
Bacteroidales	порядок	-0.0388	0.0251	0.0670	4.0844
Firmicutes;unclassified;unclassified	порядок	0.0124	0.0310	0.0708	3.1797
Coriobacteriaceae	семейство	0.0200	0.0001	0.0032	3.3774
Erysipelotrichaceae	семейство	0.0209	0.0036	0.0539	3.4617
Bifidobacteriaceae	семейство	0.0265	0.0044	0.0539	3.7132
Acidaminococcaceae	семейство	-0.0142	0.0107	0.0987	2.9758
(Lachnoclostridium/unclassified)	род	-0.0093	0.0000	0.0021	2.9100
Roseburia	род	-0.0248	0.0004	0.0149	3.5684
Collinsella	род	0.0146	0.0007	0.0149	3.1032
Catenibacterium	род	0.0144	0.0008	0.0149	3.1366
Adlercreutzia	род	0.0052	0.0017	0.0248	2.7023
Bifidobacterium	род	0.0265	0.0044	0.0536	3.6939
OTU1054 NN=Roseburia_faecis_AY804149 D=95.8	вид	-0.0125	0.0000	0.0001	2.7736
(Lachnoclostridium/unclassified);unclassified	вид	-0.0093	0.0000	0.0026	2.5206
Bifidobacterium_bifidum	вид	0.0081	0.0003	0.0133	2.5576
Dialister_succinatiphilus	вид	0.0336	0.0003	0.0133	3.6985
Blautia_stercoris	вид	-0.0058	0.0007	0.0232	2.1694
Catenibacterium_mitsuokai	вид	0.0145	0.0008	0.0232	3.0701
Ruminococcus_callidus	вид	-0.0080	0.0010	0.0240	2.5120
Collinsella_aerofaciens	вид	0.0139	0.0011	0.0240	3.0464
(OTU1556 NN=Bacteroides_thetaiotaomicron_BNRRR16SB D=95.9/OTU534 NN=Bacteroides_thetaiotaomicron_BNRRR16SB D=96.7)	вид	-0.0086	0.0015	0.0280	2.6256
Adlercreutzia_equolifaciens	вид	0.0053	0.0016	0.0280	2.3669
Phascolarctobacterium_faecium	вид	-0.0120	0.0018	0.0281	2.9715
OTU255 NN=Anoxystipes_fissicatena_NR_10480.0.1 D=94.9	вид	-0.0113	0.0026	0.0380	2.8117
Bifidobacterium_animalis	вид	0.0075	0.0038	0.0509	2.1519

Bifidobacterium_longum	вид	0.0123	0.0047	0.0562	3.1620
(Roseburia_faecis/OTU1173 NN=Roseburia_faecis_AY804149 D=94.9)	вид	-0.0157	0.0049	0.0562	3.2614
OTU60 NN=Ruminococcus_bromii_DQ882649 D=89.6	вид	0.0042	0.0059	0.0562	2.1655
Clostridium_disporicum	вид	0.0115	0.0063	0.0562	3.0131
Bacteroides_uniformis	вид	-0.0153	0.0063	0.0562	3.1404
OTU395 NN=Clostridium_bolteae_AJ508452 D=93.5	вид	0.0089	0.0064	0.0562	2.8215
(OTU1731 NN=Roseburia_intestinalis_AB661435 D=97/Roseburia_intestinalis)	вид	-0.0119	0.0065	0.0562	2.9108
Parabacteroides_merdae	вид	-0.0097	0.0083	0.0689	2.8915
(OTU1284 NN=Ruminococcus_faecis_FJ611794.2 D=96.9/OTU148 NN=Ruminococcus_faecis_FJ611794.2 D=95.1/OTU1526 NN=Ruminococcus_faecis_FJ611794.2 D=95/OTU420 NN=Ruminococcus_faecis_FJ611794.2 D=95.3/OTU985 NN=Ruminococcus_faecis_FJ611794.2 D=94.9)	вид	0.0139	0.0092	0.0724	3.2854
OTU61 NN=Ruminococcus_faecis_FJ611794.2 D=96.8	вид	-0.0043	0.0131	0.0973	2.2847
OTU20 NN=Bacteroides_xylanisolvens_AB510713 D=96.4	вид	-0.0094	0.0134	0.0973	2.6903