

АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ МОСКВЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Д. А. Каштанова^{1,2}✉, Н. С. Клименко³, И. Д. Стражеско¹, О. Н. Ткачева¹, Е. В. Старикова⁴, О. Е. Глущенко⁴, Д. А. Гудков⁴, Е. Н. Ильина⁴

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Центр стратегического планирования Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

³ Институт биологии гена, Москва, Россия

⁴ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Старение населения ставит перед медицинским обществом задачу изучения здорового долголетия, предрасполагающих к нему биомаркеров и характерных особенностей. В настоящей работе рассмотрен один из таких факторов — микробиота кишечника. Целью исследования было изучить состав микробиоты кишечника долгожителей и провести сравнительный анализ с группой относительно здоровых более молодых лиц, проживающих на территории г. Москвы. В одномоментное исследование были включены 20 человек в возрасте 97–100 лет, средний возраст 98 ± 1 год, в качестве группы сравнения была выбрана группа из 92 человек 53 ± 13 лет. Для участников исследования обеих групп проводили секвенирование V3–V4 варибельных участков гена 16S рРНК микробиоты кишечника. Для первичного анализа, фильтрации ридов и идентификации операционных таксономических единиц использовали QIIME 1.9, для реконструкции метаболических путей — алгоритм PICRUSt. Статистический анализ проводили с использованием языка Python v. 3.2. При межгрупповом сравнении были обнаружены значимые различия в микробиоте долгожителей и относительно здоровых лиц: в составе микробиоты первых были достоверно более представлены *Bifidobacterium* ($p = 0,026$) и *Coprococcus eutactus* ($p = 0,026$), в то время как у относительно здоровых лиц выявлено больше *Bacteroides* ($p = 0,003$) и *Prevotella* ($p = 0,002$). Потенциал синтеза масляной кислоты был выше в группе долгожителей ($p = 0,048$). Состав микробиоты кишечника долгожителей оказался неожиданно благоприятным, с большей представленностью полезных бактерий. Кроме того, можно говорить о возможном наличии у долгожителей более выраженного «противовоспалительного» потенциала микробиоты кишечника ввиду лучшей способности микробиоты синтезировать масляную кислоту.

Ключевые слова: микробиота кишечника, долголетие, масляная кислота, старение, системное вялотекущее воспаление

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 19-34-80033

Вклад авторов: Д. А. Каштанова — дизайн исследования, набор пациентов, интерпретация данных, написание статьи; Н. С. Клименко — биоинформатический анализ, интерпретация данных, написание статьи; И. Д. Стражеско — концептуализация исследования, редактирование статьи; О. Н. Ткачева — концептуализация и дизайн исследования; Е. В. Старикова — анализ микробиоты кишечника, редактирование статьи; О. Е. Глущенко, Д. А. Гудков — анализ микробиоты кишечника; Е. Н. Ильина — финальное редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 2 от 18 марта 2016 г.). Все участники подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Дарья Андреевна Каштанова
ул. 1-я Леонова, д. 16, г. Москва, 129226; dr.kashtanova@gmail.com

Статья получена: 01.07.2020 **Статья принята к печати:** 15.07.2020 **Опубликована онлайн:** 26.07.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.044

GUT MICROBIOTA ASSESSMENT IN MOSCOW LONG-LIVERS USING NEXT GENERATION SEQUENCING

Kashtanova DA^{1,2}✉, Klimentko NS³, Strazhesko ID¹, Tkacheva ON¹, Starikova EV⁴, Glushchenko OE⁴, Gudkov DA⁴, Iliina EN⁴

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Center for Strategic Planning of FMBA, Moscow, Russia

³ Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

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

Demographic aging poses a challenge to the medical community, pressing for research into the biological factors promoting longevity and its features. Below, we look at the gut microbiota as one of such factors. The aim of this non-longitudinal study was to profile the gut microbiota of centenarians and to compare it with that of relatively healthy, younger Moscow residents. The study recruited 20 people aged 97–100 years (mean age 98 ± 1 year); the control group consisted of 92 individuals aged 53 ± 13 years. For each stool sample, the variable V3–V4 regions of the microbial 16S rRNA gene were sequenced. Primary analysis, read filtering and taxonomic identification were conducted in the QIIME 1.9 environment; reconstruction of metabolic pathways was aided by PICRUSt. Statistical analysis was performed by means of Python v. 3.2. A few differences were detected between the gut microbiota of centenarians and younger individuals: *Bifidobacterium* ($p = 0.026$) and *Coprococcus eutactus* ($p = 0.026$) were more abundant in centenarians, whereas *Bacteroides* ($p = 0.003$) and *Prevotella* ($p = 0.002$) were better represented in younger participants. The potential for butyric acid synthesis was higher in the group of centenarians ($p = 0.048$). Surprisingly, the gut microbiota of centenarians was more diverse and surprisingly beneficial for advanced age. Besides, the gut microbiota of centenarians might have more pronounced anti-inflammatory potential due to its ability to better synthesize butyric acid.

Keywords: gut microbiota, longevity, butyric acid, aging, systemic low-grade inflammation

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant 19-34-80033).

Author contribution: Kashtanova DA — study design, participant recruitment, data interpretation, manuscript preparation; Klimentko NS — bioinformatic analysis, data interpretation, manuscript preparation; Strazhesko ID — study concept, manuscript revision; Tkacheva ON — study concept and design; Starikova EV — gut microbiota profiling, manuscript revision; Glushchenko OE, Gudkov DA — gut microbiota profiling; Iliina EN — final revision of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 2 dated March 18, 2016). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Daria A. Kashtanova
1-ya Leonova, 16, Moscow, 129226; dr.kashtanova@gmail.com

Received: 01.07.2020 **Accepted:** 15.07.2020 **Published online:** 26.07.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.044

Микробиота кишечника вносит существенный вклад в функционирование организма человека в норме и патологии. Считается, что микробиота участвует и в процессах, ассоциированных со старением: влияет на метаболизм глюкозы [1], на процессы атерогенеза и сердечно-сосудистое здоровье [2]. Была обнаружена взаимосвязь микробиоты с неблагоприятными исходами старения, в том числе с синдромом хрупкости и различными гериатрическими патологиями [3]. Предполагают также, что микробиота кишечника «стареет» вместе с человеком: по мере накопления возраст-ассоциированных заболеваний в кишечнике снижается разнообразие микроорганизмов, растет представленность условных патогенов, таких как *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Escherichia coli*, и уменьшается представленность «положительных» бактерий, таких как *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, а также бутиратпродуцентов, играющих важную роль в снижении уровня воспаления [4]. Повышаются уровни эндотоксинов, уменьшается количество масляной кислоты [5]. Таким образом, стареющая микробиота может стимулировать вялотекущее воспаление, лежащее в основе возрастных патологий.

Но есть особая «модель» старения — это долгожители. Они максимально эффективно реализуют свой потенциал, у них значительно отодвинуто во времени развитие возраст-ассоциированных заболеваний. В микробиоте кишечника долгожителей детектируются высокие уровни полезных бактерий, достаточные уровни разнообразия [6, 7]. Несмотря на преклонный возраст доноров, в микробиоте этих людей сохраняется про- и противовоспалительный потенциал. Возможно, это один из антифакторов риска старения, поиском которых озадачена современная наука. На территории России до недавнего времени работ, посвященных изучению состава микробиоты кишечника долгожителей с использованием методов секвенирования нового поколения, не было. Целью настоящей работы стало изучение состава микробиоты кишечника долгожителей и проведение сравнительного анализа с группой более молодых лиц, не имеющих хронических заболеваний, проживающих на территории г. Москвы, а также долгожителей других стран.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В одномоментное исследование были включены 20 человек. Критерии включения: возраст 97–100 лет (средний возраст 98 ± 1 год). Критерий исключения: прием антибактериальных, химиотерапевтических, пробиотических препаратов за три месяца до забора образца стула. Для всех членов этой группы провели физикальный осмотр, комплексную гериатрическую оценку, собрали подробный анамнез. В рамках гериатрической оценки изучали адекватность питания всех участников с помощью краткой шкалы оценки питания (mini nutritional assessment, MNA). В качестве сравнения была выбрана группа из 92 человек 25–76 лет, не имеющих на момент включения в исследование тяжелых соматических патологий; клинические показатели членов этой группы описаны ранее [8].

Для участников исследования в обеих группах было проведено секвенирование V3–V4 переменных участков гена 16S рРНК микробиоты кишечника по соответствующему протоколу на секвенаторе MiSeq Illumina (Illumina; США) согласно рекомендациям производителя. Подготовку библиотек проводили согласно протоколу производителя (16S Metagenomic Sequencing Library

Preparation) с использованием Nextera XT Index Kit (Illumina). В анализе применяли платформу Komics-biota [9]. Первичный анализ, фильтрацию ридов и идентификацию операционных таксономических единиц проводили с использованием QIIME 1.9 [10], реконструкцию метаболических путей — с использованием алгоритма PICRUSt [11]. Для статистической обработки применяли язык Python v. 3.2. Все результаты исследования представляли с поправкой на множественное сравнение и пол в группе долгожителей (тест MaAsLin) [12], с поправкой на множественное сравнение, возраст и пол при межгрупповом сравнении. Все вошедшие в анализ образцы ($n = 112$) соответствовали критериям качества по количеству картированных видов $>70\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Состав микробиоты кишечника у членов группы долгожителей

При изучении микробиоты долгожителей было обнаружено, что наиболее представленными микроорганизмами оказались симбиотические бактерии, многие из которых являются производителями масляной кислоты — семейств *Christensenellaceae*, *Ruminococcaceae*, и рода *Ruminococcus*. Все образцы близки к энтеротипу *Ruminococcus* [13]. Условно их можно разделить на кластеры, но с низкой силуэтной шириной. Фактически все образцы оказались относительно схожими между собой. Среднее значение показателя альфа-разнообразия микробиоты (индекс Шеннона) составило $6,3 \pm 0,59$. При этом интересным представляется распределение бактерий по филумам. В группе долгожителей относительно низким оказалось содержание бактерий филума *Bacteroidetes*, средняя представленность которых составила всего 7,8% при среднем значении *Firmicutes*, равном 78,7% (рис. 1). Клиническая характеристика изучаемой когорты долгожителей представлена в табл. 1.

Сравнение состава микробиоты кишечника долгожителей с таковым у лиц более молодого возраста

Состав микробиоты кишечника в группе относительно здоровых лиц младшего возраста представлял собой нормальный состав микробиоты кишечника здоровых людей. По результатам использования QIIME 1.9, средняя представленность *Bacteroidetes* в группе составила

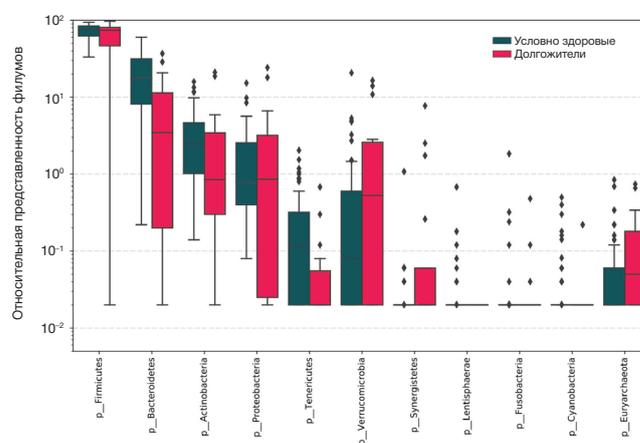


Рис. 1. Распределение микроорганизмов по филумам в группах долгожителей и более молодых условно здоровых участников

Таблица 1. Клинические характеристики группы долгожителей

Фактор	Медиана	МКР
Индекс массы тела, кг/м ²	25,10	5,66
Гериатрическая шкала «Возраст не помеха» (0–7 баллов)	3,00	1,25
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	155,00	32,50
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	78,00	9,00
ЧСС, уд./мин	69,00	9,00
Гериатрическая шкала депрессии	6,00	7,25
IADL	16,00	9,25
MNA	22,75	7,00
ТИМ сонных артерий, мм	1,31	0,25
Гликированный гемоглобин, %	5,79	0,50
вЧСРБ, мг/л	2,06	3,91
Триглицериды, ммоль/л	1,04	0,34
Липопротеины высокой плотности, ммоль/л	1,43	0,48
Липопротеины низкой плотности, ммоль/л	3,55	1,18
Сила сжатия кисти, кг	17,00	6,38
МОСА	11,50	18,00
MMSE	23,00	25,00

Примечание: вЧСРБ — высокочувствительный С-реактивный белок; ТИМ — толщина интима-медиа; МКР — межквартильный размах; ЧСС — частота сердечных сокращений; IADL — шкала повседневной инструментальной активности (Instrumental activities of daily living); MMSE — краткая шкала оценки психического статуса (Mini-mental state examination); MNA — краткая шкала оценки питания (Mini nutritional assessment); МОСА — монреальская шкала когнитивной оценки (Montreal cognitive assessment).

20,23%, *Firmicutes* — 73,4% (см. рис. 1). При сравнении групп различия в представленности *Bacteroidetes* были значимыми (*adj. p* < 0,002; MaAsLin тест).

Показатель альфа-разнообразия микробиоты группы лиц более молодого возраста был представлен на уровне $7,56 \pm 0,49$, что выше, чем в группе долгожителей, однако значимости различие не достигло (*p* = 0,10).

Примечательными представляются находки, полученные в ходе сравнения микробиоты кишечника двух групп на уровне родов и видов. Уже с помощью PCoA (Principal Coordinate Analysis) можно увидеть, что образцы долгожителей и образцы более молодых условно здоровых участников исследования различаются (рис. 2).

После более подробного анализа были найдены различия микробиоты долгожителей, в составе которой оказалось значительно больше положительных бактерий, таких как *Bifidobacterium* и *Coprococcus* (табл. 2).

Различия, видимые на графике многомерного шкалирования, подтвердились в анализе MaAsLin. В микробиоте условно здоровых более молодых участников исследования в большем количестве были представлены бактерии первых двух энтеротипов — *Bacteroides* и *Prevotella* (табл. 3).

Реконструкция метаболических путей в группах

При анализе метаболических путей микробиоты было обнаружено, что один из путей синтеза масляной кислоты через трансформацию ацетилкоэнзима А был выше у долгожителей (*adj. p* = 0,048; *lda* = 3,35), тогда как другие пути синтеза бутирата значимо не различались между группами (рис. 3).

В группе долгожителей была также проанализирована ассоциация состава микробиоты и потенциала синтеза

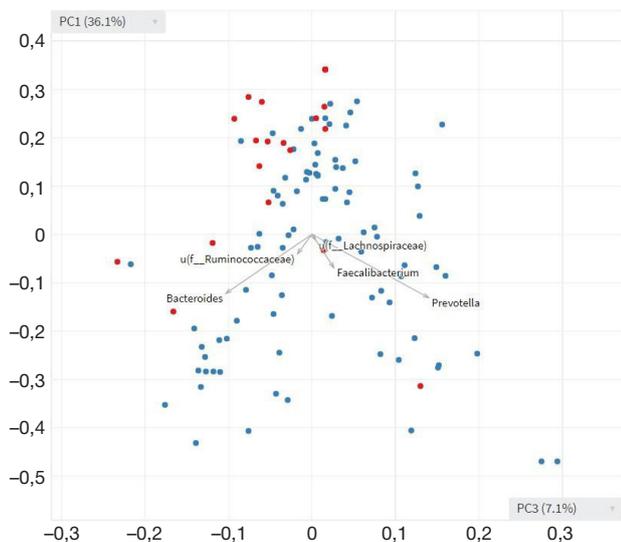


Рис. 2. График многомерного шкалирования образцов микробиоты долгожителей (красные точки) и условно здоровых участников исследования (синие точки)

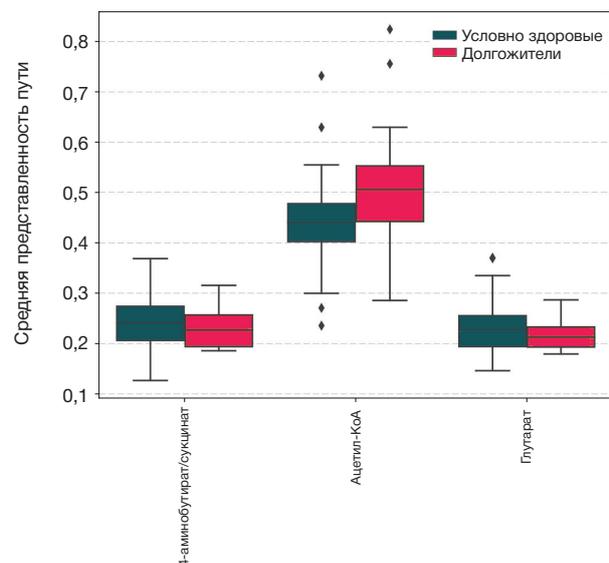


Рис. 3. Сравнение метаболических путей синтеза масляной кислоты в группах (по вертикальной оси показана средняя представленность путей)

Таблица 2. Микроорганизмы, более представленные в микробиоте долгожителей

	Условно здоровые М, %	Условно здоровые МКР	Долгожители М, %	Долгожители МКР	<i>p</i>	<i>adj. p</i>
<i>Bifidobacterium</i>	1,904	2,598	2,278	4,724	0,013	0,026
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,472	0,887	0,779	2,041	0,021	0,043
<i>Coprococcus eutactus</i>	0,211	0,326	0,610	1,457	0,012	0,026

Таблица 3. Микроорганизмы, более представленные в микробиоте условно здоровых участников исследования

	Условно здоровые М, %	Условно здоровые МКР	Долгожители М, %	Долгожители МКР	<i>p</i>	<i>adj. p</i>
<i>Bacteroides</i>	9,917	10,418	3,999	6,011	0,001	0,003
<i>Prevotella</i>	6,505	10,129	1,811	6,352	0,001	0,002
<i>Dialister</i>	2,104	3,066	0,129	0,392	< 0,001	0,001

Таблица 4. Микроорганизмы, более представленные в микробиоте условно здоровых участников исследования

Пути синтеза витаминов	Коэффициент	<i>adj. p</i>	<i>p</i>
B ₁₂	0,002048	0,009	0,001
B ₇	0,000681	0,043	0,015
B ₁	0,000588	0,048	0,024

различных метаболитов с показателем полноценности питания в пожилом возрасте. В результате обнаружена взаимосвязь с представленностью метаболических путей. Балл по краткой шкале оценки питания оказался ассоциирован с потенциальным синтезом некоторых витаминов группы В, особенно витамина В12. Чем выше был балл, тем выше оказалась потенциальная активность ряда метаболических путей согласно тесту MaAsLin (табл. 4).

Таким образом, в работе были обнаружены ряд особенностей состава микробиоты долгожителей, а также способность микробиоты долгожителей более эффективно производить бутират путем трансформации ацетилкоэнзима А.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сегодня никто не станет отрицать, что микроорганизмы играют огромную роль в нашей жизни. Однако мы крайне мало знаем о населяющих нас жителях. Большинство известных микроорганизмов было обнаружено не так давно благодаря развитию секвенирования нового поколения, и возможные пути их влияния на организм человека остаются малоизученными. Исследования с участием людей, как и представленная работа, по-прежнему достаточно немногочисленны, и чаще являются одноментными. Тем не менее обнаружение специфических особенностей микробиоты представителей успешного долголетия может помочь в последующей профилактике состояний, ассоциированных с микробиотой кишечника, в том числе и возрастных изменений. Основным результатом данного исследования стало описание микробиоты кишечника долгожителей, состав которой оказался более чем благополучным для столь преклонного возраста. Так, большинство работ, изучающих старение микробиоты, демонстрируют увеличение с возрастом количества условных патогенов и снижение полезных бактерий в кишечнике пожилых людей [4]. Но эта закономерность не подтверждена в группах благополучного старения.

До настоящего времени подобные исследования проводили за рубежом. Так, в одной из работ был зафиксирован более высокий уровень *Bifidobacterium* в группе долгожителей старше 105 лет по сравнению с людьми среднего возраста, однако этот тренд наблюдали именно в этой группе сверхдолгожителей, но не долгожителей более молодого возраста [6].

Примечательно, что, по данным той же работы, представленность таких полезных для человека бактерий, как *Akkermansia* и *Christensenellaceae*, также была выше у долгожителей. Эти результаты привели авторов к выводу, что сохранение здоровой микробиоты может вносить вклад и в долголетие участников исследования.

В составе микробиоты долгожителей были мало представлены патогены и условные патогены — разницы с более молодой когортой по таким бактериям выявлено не было. Более того, уровень бактерий, чрезмерная представленность которых может иметь негативное влияние, таких как *Bacteroides* и филума *Bacteroidetes*, был достоверно ниже в микробиоте долгожителей. Например, в исследовании японских авторов подобной зависимости обнаружено не было [7], и уровень выше упомянутых бактерий возрастал в группе глубоко пожилых лиц.

Микробиота кишечника изучаемой когорты долгожителей оказалась благополучной не только по своему составу. На доступном сегодня уровне реконструкции метаболизма были зафиксированы возможные механизмы влияния микробиоты на скорость старения изучаемой группы. Научно привлекательным представляется обнаружение более высокого потенциала синтеза бутирата среди долгожителей. Масляная кислота является противовоспалительным агентом [14, 15], и сохранение ее синтеза микробиотой может обуславливать замедленные темпы старения у долгожителей. В недавнем эксперименте введение мышам бутирата сопровождалось повышением плейотропного фактора роста фибробластов 21, что коррелировало с активацией AMPK и SIRT-1 и снижением активности сигнального пути mTOR [16], т. е. имело в некотором роде «омолаживающий эффект». Продолжение экспериментальных работ позволит сделать более конкретные выводы и установить причинно-следственные связи, но и к настоящему времени можно предположить, что в данной находке имеют отражение основные тенденции здорового старения. При этом выявление высокой метаболической активности микробиоты, проявляющейся в синтезе витаминов, у долгожителей, получивших высокие баллы по краткой шкале оценки питания, стоит интерпретировать с осторожностью. Несмотря на то что были обнаружены транспортеры витаминов в толстой кишке [17], все еще не до конца ясно, насколько принципиален для поддержания

уровня витаминов в крови их синтез микробиотой кишечника.

ВЫВОДЫ

Благодаря высокопроизводительному секвенированию мы имеем возможность многое узнать о состоянии «внутреннего мира» человека. По результатам настоящей

работы было показано сохранение нормального профиля микробиоты у долгожителей 97 лет и старше. Поддержание уровней симбиотических бактерий и высокого потенциала синтеза масляной кислоты может вносить вклад в сохранение здоровья долгожителей за счет поддержания нормального соотношения про- и противовоспалительного потенциала микробиоты кишечника.

Литература

1. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut*. 2014; 63: 1513–21.
2. Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res*. 2017; 120 (7): 1183–96.
3. Gemikonakli G, Mach J, Hilmer SN. Interactions between the aging gut microbiome and common geriatric giants: polypharmacy, frailty and dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020; Feb 17: glaa047. DOI: 10.1093/gerona/glaa047. Epub ahead of print. PMID: 32064521.
4. Nagpal R, Mainali R, Ahmadi S, Wang S, Singh R, Kavanagh K, et al. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging*. 2018; 4 (4): 267–85.
5. Aleman FDD, Valenzano DR. Microbiome evolution during host aging. *PLoS Pathog*. 2019 Jul 25; 15 (7): e1007727.
6. Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, Severgnini M, Ostan R, Turroni S, et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol*. 2016; 26 (11): 1480–5.
7. Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol*. 2016; 16: 90.
8. Kashtanova DA, Tkacheva ON, Doudinskaya EN, Strazhesko ID, Kotovskaya YV, Popenko AS, et al. Gut Microbiota in Patients with Different Metabolic Statuses: Moscow Study. *Microorganisms*. 2018; 6 (4): 98.
9. Efimova D, Tyakht A, Popenko A, Vasilyev A, Altukhov I, Dovidchenko N, et al. Knomics-Biota — a system for exploratory analysis of human gut microbiota data. *BioData Min*. 2018; 11: 25.
10. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010; 7 (5): 335–6.
11. Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*. 2013; 31 (9): 814–21.
12. Mallick H, Ma S, Franzosa EA, Vatanen T, Morgan XC, Huttenhower C. Experimental design and quantitative analysis of microbial community multiomics. *Genome Biol*. 2017; 18 (1): 228.
13. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473 (7346): 174–80.
14. Mishiro T, Kusunoki R, Otani A, Ansary MM, Tongu M, Harashima N, et al. Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF factor 8. *Lab Invest*. 2013; 93 (7): 834–43.
15. Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb*. 2017; 24 (7): 660–72.
16. Kundu P, Lee HU, Garcia-Perez I, Tay EXY, Kim H, Faylon LE, et al. Neurogenesis and longevity signaling in young germ-free mice transplanted with the gut microbiota of old mice. *Sci Transl Med*. 2019; 11 (518): eaau4760.
17. Said HM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J*. 2011; 437 (3): 357–72.

References

1. Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut*. 2014; 63: 1513–21.
2. Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res*. 2017; 120 (7): 1183–96.
3. Gemikonakli G, Mach J, Hilmer SN. Interactions between the aging gut microbiome and common geriatric giants: polypharmacy, frailty and dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020; Feb 17: glaa047. DOI: 10.1093/gerona/glaa047. Epub ahead of print. PMID: 32064521.
4. Nagpal R, Mainali R, Ahmadi S, Wang S, Singh R, Kavanagh K, et al. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging*. 2018; 4 (4): 267–85.
5. Aleman FDD, Valenzano DR. Microbiome evolution during host aging. *PLoS Pathog*. 2019 Jul 25; 15 (7): e1007727.
6. Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, Severgnini M, Ostan R, Turroni S, et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol*. 2016; 26 (11): 1480–5.
7. Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, et al. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol*. 2016; 16: 90.
8. Kashtanova DA, Tkacheva ON, Doudinskaya EN, Strazhesko ID, Kotovskaya YV, Popenko AS, et al. Gut Microbiota in Patients with Different Metabolic Statuses: Moscow Study. *Microorganisms*. 2018; 6 (4): 98.
9. Efimova D, Tyakht A, Popenko A, Vasilyev A, Altukhov I, Dovidchenko N, et al. Knomics-Biota — a system for exploratory analysis of human gut microbiota data. *BioData Min*. 2018; 11: 25.
10. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010; 7 (5): 335–6.
11. Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*. 2013; 31 (9): 814–21.
12. Mallick H, Ma S, Franzosa EA, Vatanen T, Morgan XC, Huttenhower C. Experimental design and quantitative analysis of microbial community multiomics. *Genome Biol*. 2017; 18 (1): 228.
13. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473 (7346): 174–80.
14. Mishiro T, Kusunoki R, Otani A, Ansary MM, Tongu M, Harashima N, et al. Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF factor 8. *Lab Invest*. 2013; 93 (7): 834–43.
15. Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb*. 2017; 24 (7): 660–72.
16. Kundu P, Lee HU, Garcia-Perez I, Tay EXY, Kim H, Faylon LE, et al. Neurogenesis and longevity signaling in young germ-free mice transplanted with the gut microbiota of old mice. *Sci Transl Med*. 2019; 11 (518): eaau4760.
17. Said HM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J*. 2011; 437 (3): 357–72.