

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский национальный исследовательский  
медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

Кафедра биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета

*На правах рукописи*

Колесникова Ирина Максимовна

ОСОБЕННОСТИ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ  
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК КРОВИ И СОДЕРЖАНИЯ НЕЙРОТРОФИНОВ У  
БОЛЬНЫХ С ОЖИРЕНИЕМ

1.5.4 – Биохимия

1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители

д.м.н., профессор  
Шестопапов Александр Вячеславович

д.м.н., профессор, член-корр. РАН  
Румянцев Сергей Александрович

Москва 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Ожирение и кишечный микробиом .....	13
1.2. Бактериальная ДНК крови.....	15
1.3. Иммуногенность бактериальной ДНК крови .....	18
1.4. Поражение нервной системы при ожирении.....	21
1.5. Нейротрофины и их метаболические эффекты .....	23
1.6. Нейротрофины и кишечная микробиота.....	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ. БАКТЕРИАЛЬНАЯ ДНК КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖИРЕНИЕМ .....	42
3.1. Разнообразие микробиома крови .....	42
3.2. Таксономический состав микробной ДНК крови .....	44
3.2.1. Филум <i>Firmicutes</i> .....	59
3.2.2. Филум <i>Proteobacteria</i> .....	60
3.2.3. Филум <i>Bacteroidetes</i> .....	62
3.2.4. Филум <i>Actinobacteria</i> .....	63
3.2.5. Минорные филумы.....	65
3.3. Особенности формирования микробиома крови .....	65
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ. СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОТРОФИНОВ ПРИ ОЖИРЕНИИ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК КАЛА И КРОВИ.....	79
3.1. Содержание нейротрофинов в сыворотке крови.....	79
3.2. Взаимосвязь сывороточной концентрации нейротрофинов и бактериальной ДНК кала.....	81
3.3. Взаимосвязь сывороточной концентрации нейротрофинов и бактериальной ДНК крови .....	87
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	90
5.1. Бактериальная ДНК крови у пациентов с ожирением.....	90

5.2. Содержание BDNF в сыворотке крови при ожирении и его взаимосвязь с бактериальной ДНК кала и крови.....	93
5.3. Содержание NGF в сыворотке крови при ожирении и его взаимосвязь с бактериальной ДНК кала и крови.....	101
ВЫВОДЫ.....	111
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	112
ЛИТЕРАТУРА.....	115

## ВВЕДЕНИЕ

### *Актуальность темы исследования*

Ожирение представляет собой состояние, с одной стороны, снижающее качество жизни пациентов в краткосрочной перспективе и, с другой стороны, значительно повышающее риск развития ряда патологий в долгосрочной перспективе. Сердечно-сосудистые заболевания, метаболический синдром, сахарный диабет II типа (СДII), некоторые виды рака и ряд других заболеваний выявляются при ожирении в несколько раз чаще, что значительно повышает риск инвалидизации и смерти таких пациентов [1,2]. Учитывая, что распространенность ожирения растет с каждым годом, а терапия ожирения и ассоциированных с ним патологий затрачивает миллиарды долларов/евро государственного бюджета, ожирение является социально значимой проблемой [3,4].

Поражение центральной и периферической нервных систем крайне распространено у пациентов с ожирением [5]. В свете негативного влияния ожирения на нервную систему интерес представляют нейротрофины – ростовые факторы, вовлеченные в процессы дифференцировки, функционирования и выживания нейронов, и которые также способны регулировать энергетический гомеостаз [6]. В литературе присутствуют противоречивые данные о содержании нейротрофинов: фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF) и нейротрофического (нейротропного) фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) в крови у пациентов с ожирением и СДII [7–11]. К стимулам, способным регулировать синтез и секрецию нейротрофинов, относятся провоспалительные цитокины, уровень которых может повышаться при ожирении [12,13]. Кроме того, исследования на животных показали, что изменения в кишечном микробиоме также способны оказывать влияние на уровни NGF и BDNF [14–16].

В целом, ожирение представляет собой патологию тесно взаимосвязанную с изменениями кишечного микробиома. Последние десятилетия уделяется пристальное внимание роли кишечной микробиоты в

развитие ожирения и предпринимаются попытки модуляции микробного сообщества кишечника, в рамках терапии ожирения [17]. Значимым компонентом в формировании системного воспаления при ожирении признается усиленная транслокация компонентов бактериальных клеток из кишечника [18]. Одним из таких компонентов является микробная ДНК, формирующая микробиом крови [19]. Транслокация бактериальной ДНК в кровь при ожирении связана с инсулинорезистентностью, поддержанием системного воспаления, а также с развитием и поддержанием местного воспаления в жировой ткани при СДП [20,21].

Однако, наличие вялотекущего системного воспаления и метаболических нарушений характерно не для всех пациентов с ожирением. Инсулинорезистентность, гипергликемия, дислипидемия и активация системного воспаления – отличительные особенности метаболически нездорового фенотипа ожирения (МНЗО) и не характерны для метаболически здорового фенотипа (МЗО) [22]. Кроме того, для пациентов с МНЗО характерен высокий риск развития осложнений, тогда как у лиц с МЗО подобный риск относительно невысок [22].

Исходя из вышесказанного, мы предполагаем, что ожирение разных метаболических фенотипов может по-разному влиять на таксономический состав бактериальной ДНК крови и на содержание нейротрофинов в сыворотке.

### ***Степень разработанности темы***

Впервые бактериальная ДНК была выявлена из крови здоровых доноров Nikkari S. и соавт. (2001) [23]. С тех пор изменения в составе микробиома крови были отмечены для таких патологий как ожирение, СДП, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сердечно-сосудистые заболевания, астма, цирроз печени, острый панкреатит, шизофрения и др. [24–26]. Появляются данные, что микробиом крови и его отдельные таксоны ассоциированы с риском развития ожирения и СДП. Так Jing Qiu и соавт. (2019) обнаружили, что содержание ДНК рода *Bacteroides* в крови ассоциировано со сниженным

риском развития СДП, тогда как содержание *Sediminibacterium* – с повышенным риском СДП [27]. Ghaemi F. и соавт. (2021) показали, что снижение *Akkermansia*, *Faecalibacterium* и *Bifidobacterium* в крови может быть предрасполагающим фактором риска развития СДП [28]. Исследование DESIR за период 9-летнего наблюдения выявило, что у пациентов с исходно высокими уровнями бактериальной ДНК крови выше риск развития абдоминального ожирения и СДП [29]. Другой проект MARK-AGE (2021) показал наличие тесной связи между количеством копий бактериальной ДНК и уровнями лейкоцитов, свободных жирных кислот, глюкозы и инсулина [30]. Также транслокация бактериальной ДНК в кровь при ожирении связана с инсулинорезистентностью и поддержанием системного воспаления, формированием и поддержанием местного воспаления в жировой ткани при СДП [20,21]. При этом, развитие системного воспаления, инсулинорезистентности, гипергликемии и дислипидемии характерно для пациентов с МНЗО, но не с МЗО [22]. На основании этого можно предполагать, что профиль микробиома крови отличается у пациентов с МЗО и МНЗО, однако на сегодняшний день отсутствуют работы демонстрирующие влияния метаболического фенотипа ожирения на таксономический состав бактериальной ДНК крови.

Микробная ДНК представляет собой один из патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), способных стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов [31]. В свою очередь, было показано, что провоспалительные цитокины участвуют в регуляции синтеза и секреции NGF и BDNF [13,32,33]. Наличие пресекающихся сигнальных путей теоретически позволяет рассматривать микробную ДНК крови в качестве медиатора оси «микробиота – кишечник – мозг», а нейротрофины – в качестве индукторов.

Следует отметить, что на сегодняшний день остается открытым вопрос о влиянии ожирения на содержание нейротрофинов в сыворотке. Так ряд работ показал отрицательную корреляцию между BDNF плазмы крови и ожирением,

другие исследования показали, напротив, что у пациентов с ожирением плазменная концентрация BDNF повышается или же корреляция между ожирением и содержанием BDNF вообще отсутствует [34–36]. Повышение уровня NGF в плазме при ожирении отмечен в работах Hristova M. и Aloe L. (2006) и Bulló M. и соавт. (2007) [9,10]. Однако ряд работ выявил снижение концентрации сывороточного NGF на фоне сахарного диабета [7,8]. Учитывая влияние провоспалительных цитокинов на синтез и секрецию нейротрофинов, а также разный «уровень» системного воспаления и риска осложнений у пациентов с МЗО и МНЗО, представляется важным учитывать влияние метаболического фенотипа ожирения при изучении его влияния на содержание NGF и BDNF. Кроме того, так как была описана взаимосвязь бактериальной ДНК крови с воспалением, следует исследовать возможную связь между микробиомом крови и нейротрофинами.

**Целью исследования** является установление особенностей таксономического состава бактериальной ДНК крови и содержания нейротрофинов, а также выявление возможной взаимосвязи между ними у здоровых доноров и пациентов с различными метаболическими фенотипами ожирения.

**Задачи исследования:**

1. Изучить особенности таксономической принадлежности бактериальной ДНК крови у пациентов с различными метаболическими фенотипами ожирения;
2. Установить взаимосвязь между микробиотой кала и бактериальной ДНК крови у пациентов с различными метаболическими фенотипами ожирения;
3. Исследовать содержание нейротрофинов NGF и BDNF в сыворотке крови у пациентов с различными метаболическими фенотипами ожирения;
4. Исследовать взаимосвязь таксономического состава микробиоты кала и содержания NGF и BDNF в сыворотке у здоровых доноров и пациентов

с ожирением, а также влияние метаболического фенотипа ожирения на эту взаимосвязь;

5. Исследовать взаимосвязь таксономического состава бактериальной ДНК крови и содержания NGF и BDNF в сыворотке у здоровых доноров и пациентов с ожирением, а также влияние метаболического фенотипа ожирения на эту взаимосвязь.

### ***Научная новизна***

Впервые подробно описан таксономический состав бактериальной ДНК крови не только у здоровых доноров и пациентов с ожирением, но и у пациентов с МЗО и МНЗО, с выявлением особенностей микробиома каждой из групп.

Впервые продемонстрировано различное влияние разнообразия кишечной микробиоты на разнообразие микробиома крови при разных метаболических фенотипах ожирения. У пациентов с МЗО высокое разнообразие микробиома кишечника ассоциировано с низким разнообразием микробиома крови. Тогда как при МНЗО у пациентов увеличение разнообразия кишечной микробиоты напротив сопровождается увеличением разнообразия бактериальной ДНК крови.

Впервые показано, что содержание BDNF и NGF в сыворотке крови не зависит от метаболического фенотипа ожирения. Снижение сывороточного NGF в целом характерно для пациентов с ожирением, тогда как концентрация BDNF схожа со здоровыми донорами.

Впервые изучены взаимосвязи «микробиом кишечника – нейротрофины» и «бактериальная ДНК крови – нейротрофины» у пациентов с различными метаболическими фенотипам ожирения. Показано, что содержание основных, конститутивных таксонов микробиоты кишечника или микробиома крови не оказывает влияние на содержание нейротрофинов вне зависимости от наличия или отсутствия ожирения. Однако, доли ряда минорных таксонов как микробиома кала, так и микробиома крови коррелируют с содержанием BDNF и NGF. При этом спектр таких таксонов

зависит от наличия или отсутствия ожирения, а также его метаболического фенотипа.

### ***Теоретическая и практическая значимость работы***

Полученные сведения позволяют углубить имеющиеся данные о микробиоме крови и его изменениях при ожирении, а также расширяют наши представления о регуляторной роли бактериальной ДНК крови, включая ее роль в формировании сывороточного пула нейротрофинов.

Проведенное исследование позволило выявить еще один параметр, отличающий метаболически здоровый фенотип ожирения от метаболически нездорового фенотипа – разнообразие микробиома крови.

Так как ожирение сопровождается появлением взаимосвязи «кишечная микробиота – NGF», перспективным представляется модуляция кишечной микробиоты с целью влияния на синтез и секрецию NGF именно у пациентов с ожирением, учитывая сложности с применением рекомбинантного NGF, связанные с активацией ноцицептивной системы.

Кроме того, полученные данные, указывающие на усиление бактериальной транслокации у пациентов с метаболически нездоровым ожирением, могут служить теоретическими предпосылками для разработки новых подходов в диагностике и лечении ожирения.

### ***Методология и методы исследования***

Проведено когортное одномоментное исследование. Сбор данных и образцов проводился в соответствии с протоколом НИР «Создание банка биообразцов сыворотки крови и фекалий от здоровых доноров и пациентов с ожирением, метаболическим синдромом, сахарным диабетом II типа, нарушением мукозального барьера желудочно-кишечного тракта с целью выявления кандидатных видонеспецифических медиаторов системы quorum sensing микробиоты человека, модулирующих эндокринную и метаболическую функцию жировой ткани» (одобрено ЛЭК ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, протокол №186 от 26.06.2019). Лабораторные методы включали в себя спектрофотомерию,

иммуноферментный анализ и полимеразную цепную реакцию. Использованные статистические методы в основном были направлены на выявление различий (сравнительный анализ) и взаимосвязей между изучаемыми параметрами (корреляционный и регрессионный анализы).

### ***Положения выносимые на защиту***

1. Разнообразие бактериальной ДНК крови определяется содержанием таких семейств как *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* и *Prevotellaceae*, которые являются основными таксонами кишечной микробиоты, вне зависимости от наличия или отсутствия ожирения.

2. Метаболически нездоровое ожирением сопровождается увеличением разнообразия микробиома крови, по-видимому, вследствие усиления транслокации бактериальной ДНК из кишечника и внекишечных ареалов, чего не наблюдается при метаболически здоровом фенотипе.

3. Для пациентов с ожирением характерно снижение концентрации NGF сыворотки, тогда как содержание BDNF схоже со здоровыми донорами, при этом уровень нейротрофинов не зависит от разнообразия микробиома крови и его основных таксонов, однако содержание бактериальной ДНК некоторых минорных таксонов ассоциировано с концентрациями NGF и BDNF.

### ***Степень достоверности и апробация работы***

Достоверность полученных результатов обеспечена репрезентативной выборкой исследования, наличием контрольной группы, использованием современных методик, включая полимеразную цепную реакцию с обязательным проведением контроля качества результатов секвенирования, и статистических инструментов, выбор которых зависел от распределения массивов данных и поставленных задач.

Основные результаты настоящей работы были представлены на российских и международных конференциях: 48-я научная сессия ЦНИИ гастроэнтерологии «Детские корни взрослых проблем», 3–4 марта 2022 г.,

Москва, Россия; ICOE 2022: 16. International Conference on Obesity and Endocrinology, April 25-26, 2022, Tokyo, Japan; VIII Российский конгресс лабораторной медицины и Российский диагностический саммит, 6–8 сентября 2022 г., Москва, Россия; IV Национальный конгресс с международным участием Лабораторные Технологии в Репродуктивной Медицине и Неонатологии: «Цифровая трансформация: современный тренд в лабораторной диагностике» (ЛАБРИН2022), 28–30 сентября 2022 г., Москва, Россия; XII Съезд Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, 26–28 октября 2022 г., Москва, Россия.

Апробация результатов диссертационного исследования проведена на заседании кафедры биохимии и молекулярной биологии ЛФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Протокол №4 от 22.11.2022).

### ***Внедрение результатов исследования***

Полученные результаты, характеризующие таксономический состав микробной ДНК крови у здоровых доноров, пациентов с ожирением, в том числе при его различных метаболических фенотипах, внедрены в научно-практическую деятельность лаборатории «Мультимиксные технологии живых систем» Института фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; лаборатории молекулярных механизмов клеточного гомеостаза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук и научно-исследовательские лаборатории Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

### ***Личный вклад автора***

Вклад автора заключается в разработке подхода к анализу массива данных таксономического состава бактериальной ДНК крови, проведение статистического анализа с учетом особенностей полученной выборки, адекватное описание полученных результатов, их интерпретация и формирование выводов, подготовка и публикация статей в научно-практических журналах, представление результатов на научно-практических конференциях.

### ***Публикации по теме диссертации***

По материалам диссертационной работы опубликовано 16 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, их них: 1 статья в журнале, входящем в перечень ВАК, и 3 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science, и 12 тезисов на научно-практических конференциях.

### ***Объем и структура диссертации***

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 2 глав результатов собственных исследований, главы обсуждения результатов, выводов, списка использованных сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 24 таблицами. Список использованной литературы содержит 188 источников, из них 7 русскоязычных и 181 зарубежных.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Во всем мире распространенность ожирения неуклонно растет с каждым годом. По оценкам исследования NCD-RisC практически пятая часть населения планеты – до 18% мужчин и свыше 21% женщин к 2025 г. могут иметь индекс массы тела (ИМТ) свыше 30 кг/м<sup>2</sup> [3]. По данным исследования ЭССЕ-РФ (2021) треть жителей Российской Федерации страдает ожирением (ИМТ  $\geq$  30 кг/м<sup>2</sup>) [37]. Ожирение в несколько раз повышает риск развития таких патологий как СДП, артериальная гипертензия, гастроэзофагеально рефлюксная болезнь, ишемическая болезнь сердца и ряда других, приводя к утрате трудоспособности и инвалидизации пациентов [1].

### 1.1. Ожирение и кишечный микробиом

Ожирение представляет собой патологию, тесно взаимосвязанную с кишечной микробиотой, роли которой в последние десятилетия уделяется пристальное внимание в контексте развития ожирения, метаболического синдрома и СДП [38,39]. С одной стороны, кишечное микробное сообщество претерпевает существенные изменения у пациентов с ожирением, с другой стороны, является непосредственным участником патогенеза в формировании инсулинорезистентности, метаболического синдрома и диабета [40]. При ожирении наблюдается истощение кишечной микробиоты и снижение ее разнообразия по сравнению со здоровыми донорами, а ИМТ отрицательно коррелирует с общим количеством микробной ДНК в кишечнике [41,42]. У пациентов с ожирением сниженное разнообразие кишечной микробиоты ассоциировано с инсулинорезистентностью, дислипидемией и воспалением [43]. В настоящее время совершаются попытки коррекции ожирения и его метаболических нарушений с использованием про- и пребиотиков, однако полученные данные пока еще не убедительны [44]

Представители микробного сообщества кишечника вовлечены в энергетический обмен макроорганизма и в формирование метаболических нарушений при ожирении. В частности, кишечная микробиота участвует в

метаболизме желчных кислот, которые не только осуществляют эмульгирование липидов, но и являются сигнальными молекулами, способными регулировать углеводный и липидный обмены [45]. Под действием кишечной флоры происходит деконъюгация первичных желчных кислот (холевой и хенодезоксихолевой) и их дегидроксилирование по 7-ому положению с образованием вторичных желчных кислот: дезоксихолевой и литохолевой, которые также являются регуляторными молекулами [46]. Основными рецепторами желчных кислот является ядерный рецептор фарнезоида X (farnesoid X receptor, FXR) и мембранный рецептор, ассоциированный с G белком TGR5 [45]. Помимо того, что сигнальные пути этих рецепторов регулируют непосредственно синтез желчных кислот, стимуляция FXR подавляет глюконеогенез, активирует гликогеногенез, повышает чувствительность тканей к инсулину и непосредственно его синтез, что, в целом, улучшает гомеостаз глюкозы и снижает ее концентрацию в плазме, а также усиливает клиренс липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), снижая сывороточные триацилглицериды [47]. Связывание желчных кислот с TGR5 приводит к усилению синтеза и секреции глюкагоноподобного пептида 1 типа (glucagon like peptide 1, GLP1), что повышает чувствительность тканей к инсулину и способствует активации тироксина дейодиназой 2 в мышечных и жировых клетках, усиливая расход энергии [45]. FXR и TGR5 связываются с желчными кислотами с разной аффинностью. Сродство FXR к лиганду уменьшается в порядке: хенодезоксихолевая кислота > дезоксихолевая кислота > холевая кислота > литохолевая кислота, а аффинность TGR5 снижается в ряду: литохолевая кислота > дезоксихолевая кислота > хенодезоксихолевая кислота > холевая кислота [47]. Таким образом, преобразование первичных желчных кислот под действием микрофлоры во вторичные, вносит свой вклад в регуляцию энергетического гомеостаза [39].

Представители кишечной микрофлоры способны переваривать углеводы, не гидролизуемые ферментами человека, и производить из них

короткоцепочечные жирные кислоты (short-chain fatty acids, SCFAs), такие как ацетат, пропионат и бутират. SCFAs покрывают до 10% суточной потребности в энергии и являются одним из основных энергетических субстратов для эпителия толстого кишечника и печени [48]. Помимо энергетической роли SCFAs являются сигнальными молекулами и вовлечены в регуляцию энергетического гомеостаза. SCFAs, взаимодействуя с рецепторами, связанными с G-белком 41 и 43 типов (G-coupled protein receptor 41, G-coupled protein receptor 43, GPR41 и GPR43, соответственно) регулируют выработку гормонов кишечника (GLP1, глюкагоноподобного пептидов 2 типа, пептида YY) [49]. Было показано, что SCFAs способны подавлять липолиз в жировой ткани, усиливать окисление жирных кислот в печени, стимулировать термогенную дифференцировку адипоцитов, а также улучшать чувствительность к инсулину у здоровых лиц, но не у пациентов с метаболическими нарушениями [50]. Кроме того, SCFAs оказывают модулирующее влияние на иммунную систему [49].

Взаимодействие микробиома и иммунной системы не ограничивается SCFAs. Метаболические нарушения, такие как ожирение или сахарный диабет II типа, ассоциированы с увеличением кишечной проницаемости вследствие как «внутренних» (например, гипергликемия), так и «внешних» (изменение микробиома кишечника, присутствие в диете избыточного количества углеводов и/или жиров) причин [51]. Повышение кишечной проницаемости, характерное для ожирения, способствует проникновению бактериальных компонентов под слизистую оболочку кишечника, некоторые из которых представляют собой PAMPs [39,52]. К PAMPs, например, относятся бактериальные липополисахариды (lipopolysaccharides, LPS), которые взаимодействуя с толл-подобными рецепторами 4 типа (toll-like receptor 4, TLR4), способствуют развитию воспаления, а также тесно связаны с увеличением массы тела и формированием инсулинорезистентности [40].

## 1.2. Бактериальная ДНК крови

Одним из микробных компонентов, транслоцируемых из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), является бактериальная ДНК, формирующая микробиом крови.

Для избежания противоречия между «кровь в норме является стерильной» и изучением микробиома крови, следует дать определения терминам «микробиом», «микробиота» и «стерильность». Удивительно, но даже в общей фармакопейной статье 2.1.6.1 Фармакопеи Евразийского Экономического Союза «Стерильность» отсутствует определение данного термина, а приводятся только методы определения стерильности [53]. Другой нормативный документ ГОСТ ISO 11737-2-2011 «Стерилизация медицинских изделий. Микробиологические методы. Часть 2. Испытания на стерильность, проводимые при валидации процессов стерилизации» также не дает определение «стерильность», однако указывает, что стерильная продукция – это продукция, свободная от жизнеспособных микроорганизмов [54]. Таким образом можно заключить, что отсутствие жизнеспособных микроорганизмов – определяющий фактор стерильности. Термины «микробиом» и «микробиота» до последнего времени имели множество трактовок, однако в 2020 году группа международных экспертов в рамках проекта MicrobiomeSupport четко определила и разграничила эти два понятия. Термин «микробиота» подразумевает совокупность микроорганизмов, принадлежащих к разным классам: прокариоты (бактерии и архей) и эукариоты (простейшие, грибы и водоросли) [55]. Микробиом же представлен не только микроорганизмами, но и их «театром активности»: микробными метаболитами (сигнальные молекулы, токсины, органические и неорганические молекулы и т.д.), мобильными генетическими элементами (транспозоны, вирусы, фаги, реликтовая ДНК), условиями окружающей среды и непосредственно отдельными микробными структурными компонентами, включая и микробную ДНК [55].

Наличие микробной ДНК в крови не указывает на наличие жизнеспособных микроорганизмов, хотя еще в 1977 г. было показано, что у

7% здоровых доноров посев лизированной крови на питательную среду приводил к росту бактериальных колоний, тогда как посев нелизированной крови был отрицательным [56]. Это позволило предположить, что в крови человека может присутствовать микробиом, представленный неактивными или некультивируемыми микроорганизмами. Позднее, в гемокультурах были обнаружены развивающиеся микроорганизмы, а с начала XXI века и развития технологии секвенирования появились работы, демонстрирующие наличие бактериальной ДНК, кодирующей 16S рРНК (16S ДНК), в образцах крови как здоровых людей, так и при различных патологиях [23,24,57,58]. Фракционирование цельной крови показало, что большая часть бактериальной ДНК находится в лейкоцитомембранном слое (93,74%) и в меньшей степени в эритроцитах (6,23%) и плазме (0,03%) [59].

Не известно, является ли нахождение бактериальной ДНК в крови автохтонным или аллохтонным [25]. Однако, важным источником микробной ДНК в крови признается ее транслокация из кишечника и, в меньшей степени, из внекишечных микробиомов [24,26]. Транслокация бактериальной ДНК из кишечника в кровь преимущественно происходит через М-клетки, покрывающие Пейеровы бляшки, а также через отростки дендритных клеток между эпителиоцитами кишечника и через поврежденный или воспаленный эпителий при повреждении кишечного барьера [19,60]. Другими источниками бактериальной ДНК в крови служат: микробиота ротовой полости при нарушении плотных контактов или при повреждении десен, микробиота кожи при любом повреждении кожного барьера, микробиота урогенитального тракта и дыхательной системы [26].

Однако, микробиом крови существенно отличается от микробиома кишечника. Несмотря на то, что оба микробиома сформированы преимущественно филами *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*, в кишечнике преобладают *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, тогда как в крови доминантным филумом является *Proteobacteria* [25,26]. Кроме того, таксономический состав микробиома крови претерпевает изменения при таких

патологиях как ожирение, СДП, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сердечно-сосудистые заболевания, астма, цирроз печени, острый панкреатит, шизофрения [24–26].

Было показано, что транслокация бактериальной ДНК в кровь при ожирении связана с инсулинорезистентностью и поддержанием системного воспаления, а также формированием и поддержанием местного воспаления в жировой ткани при СДП [20,21]. Лонгитюдное исследование DESIR (3280 пациентов) показало, что у пациентов с исходно высокими уровнями 16S ДНК спустя 9 лет наблюдения выше риск развития абдоминального ожирения и СДП [29]. Пилотные результаты проекта MARK-AGE (2021), в которых был исследован микробиом крови у 1285 случайно выбранных лиц европейской популяции, показали наличие тесной связи между количеством копий бактериальной ДНК и уровнями лейкоцитов, свободных жирных кислот, глюкозы и инсулина [30]. Кроме того у пациентов с СДП типа микробиом крови отражает нарушения обмена веществ, а также имеет тенденцию к «нормализации» после проведения бариатрической операции [61]. Jing Qiu и соавт. (2019) показали, что содержание ДНК рода *Bacteroides* в крови ассоциировано со сниженным риском развития СДП, тогда как содержание *Sediminibacterium* – с повышенным риском СДП [27]. Исследование микробиома крови у здоровых доноров, пациентов с пред-диабетом (нормальный уровень гликированного гемоглобина и повышенная концентрация глюкозы натощак, но не более 7 ммоль/л) и пациентов с СДП выявило, что снижение *Akkermansia*, *Faecalibacterium* и *Bifidobacterium* в крови может быть предрасполагающим фактором риска развития СДП [28].

### 1.3. Иммуногенность бактериальной ДНК крови

Микробная ДНК представляет собой один из PAMPs, способных стимулировать иммунный ответ через ряд внутриклеточных сенсоров (рис. 1). Иммуногенность бактериальной ДНК обусловлена наличием неметилированных мотивов цитидин-фосфат-гуанозин (Cytidine-phosphate-

Guanosine, CpG), тогда как CpG мотивы млекопитающих в большинстве метилированы [62].

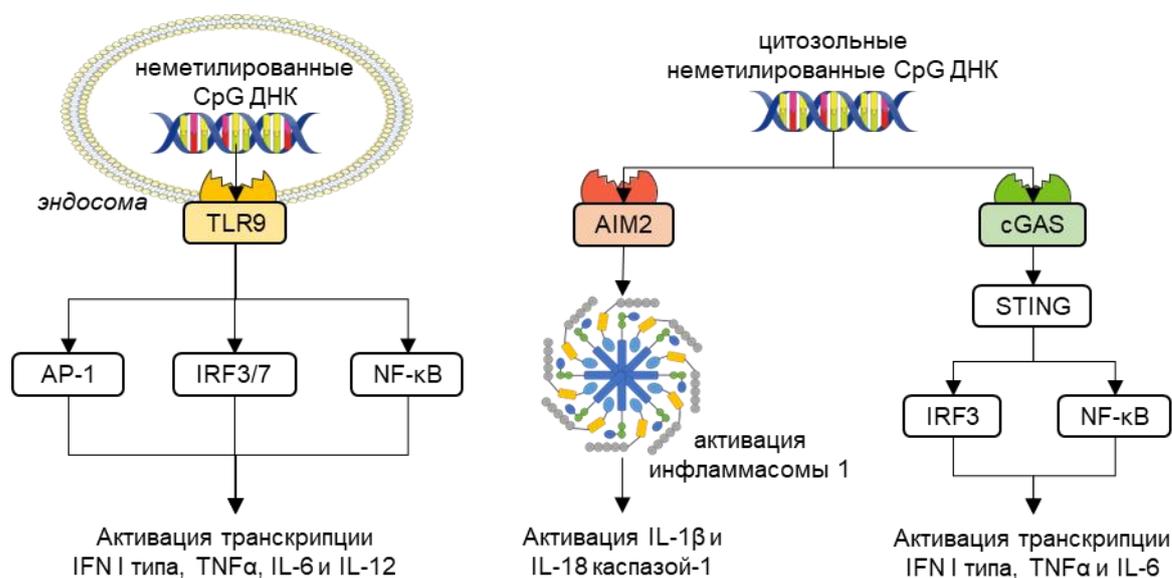


Рис. 1. Основные сигнальные пути бактериальной ДНК [31,62,63]. Здесь и далее: рисунок создан с частичным использованием изображений Servier Medical Art, распространяемых по лицензии Creative Commons Attribution 3.0 Unported License [64].

Основным рецептором распознавания образов (pattern – recognition receptors, PRRs) для бактериальной ДНК является толл-подобный рецептор 9 типа (toll-like receptor 9, TLR9), локализованный на эндосомах и лизосомах [62]. Стимуляция TLR9 приводит к активации ряда транскрипционных факторов: ядерного фактора каппа-В (nuclear factor κB, NF-κB), активирующего белка-1 (activator protein-1, AP-1), регуляторных факторов интерферона 3 и 7 (interferon regulatory factor 3, interferon regulatory factor 7, IRF3 и IRF7, соответственно), что усиливает продукцию фактора некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha, TNFα), интерферона (interferon, IFN) I типа, интерлейкина 6 (interleukin 6, IL6) и интерлейкина 12 (interleukin 12, IL12) [62]. Помимо клеток иммунной системы TLR9 присутствует и в адипоцитах, в которых его стимуляция приводит к парадоксальному противовоспалительному эффекту [65]. Также TLR9 экспрессируется в

нервной ткани микроглией, астроцитами и даже нейронами, что демонстрирует вовлеченность этих рецепторов в формировании нейровоспаления, которое является распространенным осложнением ожирения [66,67].

Внутриклеточное распознавание ДНК не ограничено TLR9 и включает ряд цитозольных сенсоров, такие как путь циклической ГМФ-АМФ синтазы (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS) и белок, отсутствующий при меланоме 2 (absent in melanoma 2, AIM2) [31]. Взаимодействие cGAS с цитозольной ДНК приводит к образованию циклического ГМФ-АМФ и активации стимулятора генов интерферона (stimulator of interferon genes, STING) [68]. В свою очередь, STING, активируя IRF3 и NF-κB, усиливает синтез провоспалительных цитокинов, в частности IL6, TNFα и IFN I типа [68]. Путь cGAS не является только прерогативой иммунных клеток и может вносить свой вклад в патогенез ожирения. Было показано, что ожирение приводит к высвобождению митохондриальной ДНК в цитозоль, что активирует сигнальный каскад cGAS и способствует формированию хронического воспаления в жировой ткани [69]. Также активация этого пути приводит к подавлению термогенеза и уменьшению рассеивания энергии при ожирении [70]. Взаимодействие AIM2 с двухцепочечной ДНК приводит к сборке инфламмосомы, активирует каспазу-1 и запускает процессинг интерлейкина 1β (interleukin 1β, IL1β) и интерлейкина 18 (interleukin 18, IL18) [63]. В контексте ожирения роль AIM2 неоднозначна. Было показано, что IL1β вносит вклад в формирование системного воспаления и инсулинорезистентности при ожирении [71]. С другой стороны, IL18, который также продуцируется инфламмосомой AIM2, стимулирует липолиз и защищает от метаболической дисфункции, что было показано на модели мышей с ожирением [72].

Таким образом, бактериальная ДНК крови может участвовать в формировании воспаления. Для ожирения характерно наличие вялотекущего воспаления, как системного, так и локального, на уровне жировой ткани [73]. Однако «уровень» воспаления не одинаков у разных пациентов с ожирением:

для пациентов с МНЗО характерно наличие вялотекущего системного воспаления, тогда как при МЗО уровень маркеров системного воспаления значительно ниже [74]. Другими особенностями отличающими МЗО от МНЗО являются: отсутствие метаболических нарушений, таких как инсулинорезистентность и дислипидемия, нормальное артериальное давление и функция печени, меньшее количество висцерального жира и больший уровень физической активности [22]. Кроме того, МНЗО ассоциировано с высоким риском развития осложнений, тогда как у пациентов с МЗО этот риск существенно ниже [22].

#### 1.4. Поражение нервной системы при ожирении

Ожирение может приводить к развитию нейровоспаления, при этом нейровоспаление в гипоталамусе является одним из факторов формирования метаболического синдрома на фоне избыточного питания [66]. Следует отметить, что воспалительные процессы в центральной нервной системе (ЦНС) отличаются от событий на периферии за счет наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), затрудняющего миграцию иммунных клеток и в большей степени связаны с активацией микроглии и астроцитов [75]. Thaler и соавт. (2012) обнаружили, что у пациентов с ожирением наблюдается усиление глиоза и активация микроглии в гипоталамусе [76]. Было показано, что активация глиальных клеток может происходить под действием насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, которые через TLR4 запускают путь активации NF-κB и приводят к усилению синтеза провоспалительных цитокинов и образования реактивных форм кислорода [77,78]. Срединное возвышение гипоталамуса не защищено ГЭБ, и характерное для ожирения повышение концентрации свободных жирных кислот в крови способствует быстрому формированию нейровоспаления в гипоталамусе – центре регуляции пищевого поведения [66]. Однако развивающиеся нейровоспаление затрагивает не только гипоталамус, но и другие структуры ЦНС [66]. Кроме того на фоне ожирения усиливается

проницаемость ГЭБ, что также вносит вклад в формирование нейровоспаления [79].

Поражения центральной и периферической нервных систем – распространенные осложнения ожирения (рис. 2), которые снижают качество жизни пациентов и могут являться причинами их инвалидизации [5,80].

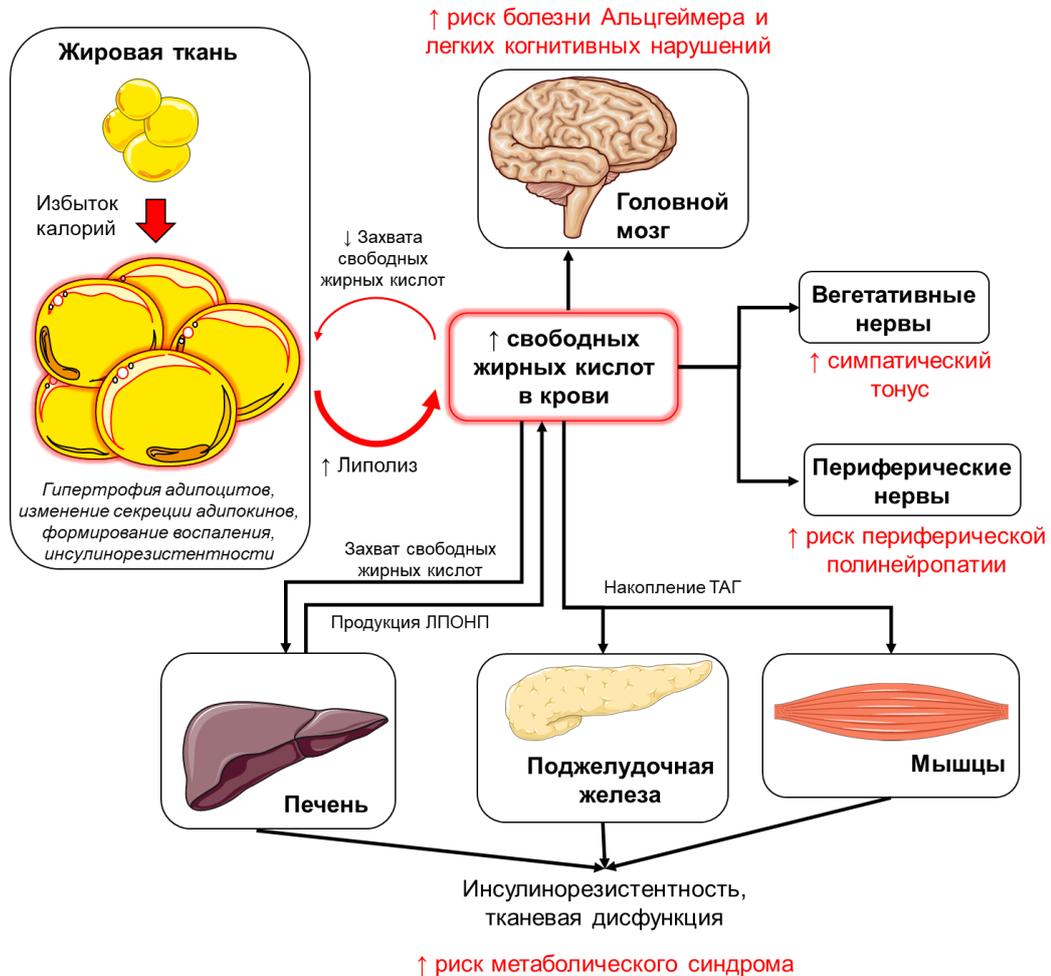


Рис. 2. Основные аспекты патогенеза поражения нервной системы при ожирении [5]. Дислипидемия у пациентов с ожирением сопровождается повышением уровня свободных жирных кислот в крови и их липотоксическим эффектом на центральную и периферическую нервную систему.

Ожирение сопровождается развитием дисбаланса в вегетативной нервной системе – наблюдается гиперактивация симпатического отдела, что стимулирует липолиз, способствует повышению концентрации свободных жирных кислот в крови и усиливает их токсический эффект [81]. Кроме того, усиление симпатического влияния приводит к увеличению частоты сердечных

сокращений, повышению артериального давления и тонуса микроциркуляторного русла, что, предполагается, снижает перфузию и вносит свой вклад в поражение органов и тканей у пациентов с ожирением, в том числе нервной системы [5].

Головной мозг при ожирении подвергается структурным изменениям. Было показано, что повышение ИМТ связано с уменьшением объема мозга, атрофией серого вещества и нарушением целостности белого вещества в головном мозге [82]. У пациентов с ожирением наблюдается в том числе и атрофия гиппокампа – структуры мозга, принимающей непосредственное участие в обучении и формировании памяти [83]. Изменение архитектуры мозга приводит к функциональным нарушениям, проявляющимися в виде легких когнитивных нарушений. Кроме того, на фоне ожирения повышается риск развития старческой деменции и болезни Альцгеймера [82].

Другое поражение нервной системы, ассоциированное с ожирением, – периферическая нейропатия, которая наблюдается у половины пациентов с СДII и может быть причиной инвалидизации таких пациентов [84]. Также и метаболический синдром, одним из компонентов которого является ожирение, связывают с повышенным риском развития хронической сенсорной полинейропатии [85]. Callaghan В.С. и соавт. (2016) показали, что ожирение связано с развитием нейропатии даже при условии нормальной концентрации глюкозы в крови [86]. Ожирение и инсулинорезистентность как совместно, так и независимо друг от друга приводят к активации окислительного стресса, хронического воспаления, накоплению конечных продуктов гликирования, что повреждает микрососудистое русло и периферические нервные волокна [84].

### 1.5. Нейротрофины и их метаболические эффекты

В свете негативного влияния ожирения на нервную систему особый интерес представляют нейротрофины (нейротропные факторы) – белки, способствующие дифференцировке, функционированию и выживанию

нейронов. К нейротрофинам относятся: NGF, BDNF, а также нейротрофин 3 и нейротрофин 4 (также называемый нейротрофин 4/5 или нейротрофин 5) [6].

NGF – первый, открытый еще в 1950 годах Ритой Леви-Монтальчини, нейротрофин. NGF играет важную роль в выживании, регенерации и пластичности нейронов в центральной и периферической нервных системах, а также участвует в высвобождении нейромедиаторов и воспалении в периферической нервной системе [87,88]. Интересно отметить, что действие NGF на нейроны неоднозначно и может стимулировать как их выживание, так и их апоптоз. Образование NGF происходит из более крупного белка-предшественника – proNGF, который также является сигнальной молекулой [89]. NGF и proNGF реализуют свой сигналинг связываясь с рецепторами на поверхности клеточной мембраны, к которым относятся киназа А тропомиозинового рецептора (tropomyosin receptor kinase A, TrkA) и через рецептор нейротрофина p75 (p75 neurotrophin receptor, p75<sup>NTR</sup>) [90]. Стимуляция TrkA стимулирует выживание нейронов, тогда как p75<sup>NTR</sup> – их апоптоз [87]. При этом сродство NGF и proNGF не одинаково к разным типам рецепторов, зрелый NGF проявляет большую аффинность к TrkA, тогда как proNGF – к p75<sup>NTR</sup> [91].

Кроме действия на нервную систему, было показано, что NGF обладает трофическим действием на клетки иммунной системы, эпителиоциты молочной железы и эндотелиальные клетки [92]. Помимо клеток нервной ткани, NGF синтезируется адипоцитами (белыми и бурыми), миоцитами, эпителиоцитами, фибробластами, иммунными клетками и даже бета-клетками поджелудочной железы [33,93–95]. Повышение концентрации глюкозы в крови стимулирует секрецию NGF поджелудочной железой, действие которого на TrkA бета-клеток, усиливает секрецию инсулина, в ответ на гипергликемию [96]. В жировой ткани при охлаждении действие NGF способствует пластичности симпатических нейронов, приводит к «бежевой» трансдифференцировке белых адипоцитов и рассеиванию энергии в виде тепла [97]. Ряд работ продемонстрировал, что для ожирения, метаболического

синдрома и СДII характерно повышение концентрации NGF в плазме крови [9,10]. Однако некоторые работы показали, что при диабете и диабет-ассоциированной полинейропатии наблюдается снижение сывороточного NGF [7,8].

BDNF также образуется из белка предшественника proBDNF под действием внутриклеточных (фурин, регулируемые конвертазы) или внеклеточных (плазмин, матриксные металлопротеиназы 2 и 9) протеаз [98]. Зрелый BDNF связывается с рецептором тирозинкиназы B (tyrosine kinase B receptor, TrkB) и стимулирует антиапоптотическую активность и синаптическую пластичность, усиливает синтез белков цитоскелета, рост и ветвление дендритов [99]. Наравне со зрелой формой регуляторную активность проявляет и proBDNF, который обладает аффинностью к  $p75^{NTR}$  и чей сигналинг может способствовать как выживанию нейронов, так и их апоптозу [99].

BDNF синтезируется не только в ЦНС и периферических нейронах, но и в скелетных мышцах, сердце, печени и жировой ткани, как белой, так и бурой [100,101]. Помимо участия в выживании и поддержании пластичности нервной системы, BDNF играет значимую роль в энергетическом гомеостазе как в мозге, так и в периферических тканях. Среди влияния BDNF на нервную систему можно отметить его роль в регуляции циркадных ритмов, анорексигенный эффект, участие в улучшении когнитивных функций в ответ на бег и кратковременное голодание, а также усиление энергетического обмена в нейронах в том числе связанное с усилением поступления глюкозы в клетки [100]. В гипоталамусе действие BDNF связано с формированием чувства насыщения, в том числе и в рамках реализации анорексигенного эффекта лептина [6]. Однако, следует отметить, что влияние BDNF аппетит неоднозначно: сигналинг TrkB проявляет мощный анорексигенный эффект, тогда как  $p75^{NTR}$ , напротив, стимулирует пищевое поведение после голодания [102]. Стимуляция TrkB бета-клеток поджелудочной железы усиливает секрецию инсулина в ответ на гипергликемию, таким образом роль BDNF в

энергетическом гомеостазе не ограничивается только регуляцией пищевого поведения [103].

Взаимосвязь ожирения и циркулирующего в крови BDNF остается неясной. Так ряд работ показал отрицательную корреляцию между BDNF плазмы крови и ожирением, другие исследования показали, напротив, что у пациентов с ожирением плазменная концентрация BDNF выше или же корреляция между ожирением и концентрацией BDNF вообще отсутствует [34–36]. Проведенный мета-анализ, указав на важность пробоподготовки при исследовании циркулирующего BDNF, оставил открытым вопрос взаимосвязи содержания этого нейротрофина и ожирения [11].

### 1.6. Нейротрофины и кишечная микробиота

Исследования в последние годы показали, что кишечный микробиом модулирует развитие и функционирование центральной и энтеральной нервных систем, включая нейрогенез, миелинизацию, синаптическую обрезку, активность микроглии и астроцитов, проницаемость гематоэнцефалического барьера и т.д. [104,105]. Следует отметить, что эта связь является двусторонней и многочисленные взаимодействия между кишечной микробиотой и нервной системой получили название оси «микробиота – кишечник – мозг». Вегетативная нервная система, в частности *nervus vagus*, и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система регулируют моторику ЖКТ, секрецию жидкости и слизи, кишечную проницаемость, активность местной иммунной системы, а также способны влиять на разнообразие кишечной флоры и на экспрессию ряда генов у представителей кишечного микробиома [106]. Связь микробиоты с мозгом достигается благодаря действию разнообразных микробных метаболитов на иммунную, эндокринную и, непосредственно, на нервную систему [107]. Наиболее изученными сигнальными молекулами в этой системе являются продуцируемые микробиотой нейромедиаторы, такие как гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), норадреналин, дофамин, серотонин и другие

метаболиты триптофана, SCFAs, а также PAMPs, например LPS и пептидогликаны [107,108].

Изменения в кишечном микробиоме взаимосвязаны также с синтезом и секрецией нейротрофинов. Данные о влиянии микробиома на уровень BDNF порой противоречивы. Например, показано, что у мышей-гнотобионтов (Germ-free mice, GF мыши) или у мышей после использования антибиотиков наблюдается увеличение экспрессии BDNF в головном мозге [15,109]. Другие исследования напротив указывают на то, что у GF мышей или у животных после применения противомикробных средств наблюдается снижение экспрессии этого нейротрофина в ЦНС [110–112]. Также снижение экспрессии гена BDNF в гиппокампе наблюдалось у мышей после тотального облучения брюшной полости [113]. Подобные различия могут быть объяснены тем, что BDNF имеет несколько альтернативных стартовых сайтов, которые подвержены разным регуляторным механизмам, а также следует учитывать возможное разнонаправленное влияние на экспрессию BDNF различных штаммов кишечных бактерий [14].

Было показано, что положительное влияние на экспрессию BDNF оказывают как пробиотики, так и пребиотики. Исследование Savignac и соавт. (2013) выявило, что опосредованная пребиотиками пролиферация кишечной микрофлоры увеличивает экспрессию BDNF в головном мозге крыс [114]. O'Sullivan и соавт. (2011) продемонстрировали, что использование *Bifidobacterium breve* 6330 способствовало увеличению экспрессии BDNF в головном мозге крыс, не подвергавшихся действию стрессового фактора в раннем возрасте. [115]. Аналогичное влияние на усиление синтеза BDNF оказало применение *Clostridium butyricum* у крыс с депрессивно-подобным поведением [116]. Работа, проведенная на модели рыбок данио (*Danio rerio*), показала, что использование пробиотика *Lactobacillus rhamnosus* привело к почти двукратному увеличению экспрессии гена BDNF в мозге, однако не повлияло на синтез этого нейротрофина в кишечнике [117]. Причем подобные изменения в экспрессии BDNF были связаны с изменением профиля

метиляции гена данного нейротрофина, что демонстрирует влияние кишечной микробиоты на эпигенетический ландшафт [118]. Недавнее исследование Hwang и соавт. (2019) показало, что у людей использование добавки сои, ферментированной *Lactobacillus plantarum* C29, способствовало улучшению когнитивных функций и увеличению сывороточной концентрации BDNF [119].

Следует отметить, что взаимосвязь «кишечный микробиом – BDNF» является двусторонней. Исследование Li и соавт. (2018) показало, что у BDNF-нокаутных мышей наблюдаются изменения в ультраструктуре толстого кишечника и снижение экспрессии белков плотных контактов в этой части желудочно-кишечного тракта [120]. Таким образом BDNF регулирует барьерную функцию слизистой оболочки кишечника и оказывает влияние на кишечный микробиом [120]. Кроме этого BDNF подавляет апоптоз клеток кишечной глии, что также вносит свой вклад в поддержание кишечного барьера [121].

Синтез и секреция NGF также могут зависеть от представителей кишечной микробиоты. Ряд работ выявил влияние бактерий на образование этого нейротрофина в клеточных моделях [122,123]. При этом Sudo и соавт. (2004) показали, что у GF мышей и мышей, выращенных классическим способом, не различаются уровни NGF в мозге [110]. У пациентов с рассеянным склерозом полугодовой прием пробиотиков не привел к изменению плазменной концентрации NGF, тогда как содержание BDNF в плазме увеличилось [124]. Однако, было показано, что у крыс усиливается экспрессия NGF в ЦНС на фоне применения пробиотиков в модели эпилепсии, стимулированной пентилентетразолом [16].

Регуляция экспрессии нейротрофинов может происходить под действием провоспалительных цитокинов. Было показано, что активация NF-κB способствует усилению выработки NGF В-лимфоцитами и микроглией [125,126]. Кроме того, провоспалительные цитокины IL1β, TNFα и IL6 способны стимулировать синтез NGF в различных типах клеток [33].

Экспрессия BDNF в ЦНС также регулируется IL1 $\beta$  [127]. Наличие этих сигнальных путей позволяет рассматривать микробную ДНК крови как один из медиаторов оси «микробиота – кишечник – мозг», а нейротрофины – в качестве индукторов.

\*\*\*

Таким образом, ожирение сопровождается выраженными изменениями в кишечном микробиоме и повышением проницаемости внешних барьеров, что дает основания предполагать изменения в таксономическом составе бактериальной ДНК крови у таких пациентов. На фоне предпринимаемых попыток коррекции ожирения с использованием пре- и пробиотиков и влияния подобных препаратов на синтез и секрецию нейротрофинов, а также учитывая противоречивые данные о влиянии ожирения на уровень нейротрофинов крови, интерес представляет возможная взаимосвязь микробиомов (кишечника и крови) и содержания NGF и BDNF сыворотки. Также на сегодняшний день не описано влияние метаболического фенотипа ожирения на состав микробиома крови и уровень нейротрофинов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено когортное одномоментное исследование в период 2018-2022 гг. на базе Кафедры внутренних болезней №3 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, Центра цифровой и трансляционной медицины ООО «Центр молекулярного здоровья» и ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол №186 от 26.06.2019) и Локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (протокол № 20/19 от 12.12.2019). Для минимизации влияния климатических условий, характера питания и этнических факторов на кишечный микробиом и, как следствие на микробиом крови, в исследование были включены люди, проживающие на одной территории (Ростовская область и город Ростов-на-Дону) в осенне-летний период.

Всего в исследовании приняли участие 243 человека, обратившихся в медицинское учреждение в рамках профилактического осмотра и диспансеризации. Критериями включения были: возраст старше 18 лет и отсутствие приема антибиотиков, пре- и пробиотиков в течение 3-х месяцев до момента включения в исследование. Каждый участник исследования подписал добровольное информированное согласие. Критериями исключения были: тяжелые соматические заболевания (хроническая почечная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность); любые заболевания ЖКТ, в том числе неспецифический язвенный колит, синдром раздраженного кишечника, болезнь Крона; любое острое заболевание; алкоголизм; беременность; депрессия.

Все участники исследования были разделены на две исследуемые группы: Группу 1 (контрольная группа, контроль) и Группу 2 (пациенты с ожирением). Для стратификации на исследуемые группы были приняты дополнительные критерии (табл. 1). Группу 1 составили 136 здоровых

доноров, а Группу 2 – 107 пациентов с ожирением. Клинико-лабораторная характеристика групп и их сравнение приведено в табл. 2.

Табл. 1. Дополнительные критерии включения в Группу 1 и Группу 2

Критерии включения в Группу 1	Критерии включения в Группу 2
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>18,5 \text{ кг/м}^2 &lt; \text{ИМТ} \leq 24,9 \text{ кг/м}^2</math>;</li> <li>• Отсутствие метаболических нарушений (гипергликемии, дислипидемии, гиперурикемии);</li> <li>• Отсутствие артериальной гипертензии</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\text{ИМТ} \geq 30 \text{ кг/м}^2</math>;</li> <li>• Окружность талии (ОТ): ♂ <math>&gt; 102 \text{ см}</math>, ♀ <math>&gt; 88 \text{ см}^*</math></li> </ul>

Примечание: \* – в соответствии с критериями абдоминального ожирения NСЕР АТРИШ [128].

Табл. 2. Сравнение клинико-лабораторных характеристик исследуемых групп.

Параметр	Группа 1 (n=136)	Группа 2 (n=107)	p
Пол, ♂ / ♀, n (%)	21 (15,4%) / 125 (84,6%)	21 (19,6%) / 86 (80,4%)	0,2692
Возраст, лет	$39,6 \pm 4,2$	$49,8 \pm 3,9$	$<0,001$
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	19,8 [18,5 – 22,0]	33,0 [31,0 – 36,0]	$<0,0001$
ОТ, см	73,0 [68,0 – 74,5]	90,0 [96,0 – 105,0]	$<0,0001$
Sys, мм. рт. ст.	100 [90 – 115]	130 [120 – 145]	$<0,0001$
Dia, мм. рт. ст.	65 [60 – 70]	80 [75 – 90]	$<0,0001$
Глюкоза, ммоль/л	5,06 [4,25 – 5,20]	5,66 [5,04 – 7,29]	0,007
Инсулин, пг/мл	262,0 [133,6 – 418,2]	390,0 [170,0 – 678,8]	0,001
НОМА-IR	1,86 [1,47 – 2,82]	11,70 [5,08 – 19,30]	0,001
ТАГ, ммоль/л	0,83 [0,47 – 1,23]	1,61 [1,25 – 2,50]	0,02
ОХС, ммоль/л	4,63 [4,41 – 5,81]	5,42 [4,56 – 6,23]	0,4
ХС-ЛПВП, ммоль/л	1,94 [1,50 – 2,34]	1,29 [1,15 – 1,44]	0,05
ХС-ЛПНП, ммоль/л	2,70 [2,30 – 3,01]	3,18 [2,39 – 3,73]	0,2

Примечание: здесь и далее Sys – систолическое артериальное давление, Dia – диастолическое артериальное давление, НОМА-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) – индекс инсулинорезистентности (НОМА-IR = (Глюкоза, ммоль/л × Инсулин, мкЕд/мл) / 22,5), ТАГ – триацилглицериды сыворотки, ОХС – общий холестерол сыворотки, ХС-ЛПВП – холестерол липопротеинов высокой плотности, ХС-ЛПНП – холестерол липопротеинов

низкой плотности. Данные возраста представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, остальные – в виде медианы [25 – 75 перцентили].

Пациенты Группы 2 были разделены в зависимости от метаболического фенотипа ожирения на подгруппы с МЗО (n=40) и МНЗО (n=55) в соответствии с критериями NCEP АТРИИ (табл. 3). Клинико-лабораторная характеристика подгрупп и их сравнение приведено в табл. 4. Для ряда пациентов Группы 2 (12 человек) не было получено убедительных данных для включения их в одну из подгрупп, поэтому результаты их исследований не были включены в анализ содержания нейротрофинов и таксономической принадлежности бактериальной ДНК крови при различных метаболических фенотипах ожирения.

Табл. 3. Критерии NCEP-АТР III, использованные для определения метаболического фенотипа ожирения [128].

Критерий	Значение критерия
Окружность талии	
мужчины	> 102 см
женщины	> 88 см
Триглицериды	$\geq 1,7$ ммоль/л (150 мг/дл)
ХС-ЛПВП	
мужчины	< 1,03 ммоль/л (40 мг/дл)
женщины	< 1,29 ммоль/л (50 мг/дл)
Артериальное давление	
систолическое	$\geq 130$ мм. рт. ст.
диастолическое	$\geq 85$ мм. рт. ст.
Глюкоза натощак	$\geq 5,6$ ммоль/л (110 мг/дл)
Метаболически здоровое ожирение	< 3 критериев
Метаболически нездоровое ожирение	$\geq 3$ критериев

Табл. 4. Сравнение клинико-лабораторных характеристик подгрупп пациентов с МЗО и МНЗО.

Параметр	МЗО (n=40)	МНЗО (n=55)	p
Пол, ♂ / ♀, n (%)	6 (15,0%) / 34 (85,0%)	12 (21,8%) / 43 (78,2%)	0,4
Возраст, лет	49,05 $\pm$ 5,10	51,30 $\pm$ 3,60	0,7
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	33,0 [31,0 – 36,0]	33,0 [31,0 – 36,0]	0,6

ОТ, см	100,0 [96,0 – 104,0]	100,0 [93,0 – 102,8]	0,1
Sys, мм. рт. ст.	120 [110 – 125]	145 [136 – 150]	<0,0001
Dia, мм. рт. ст.	75 [70 – 80]	90 [90 – 95]	<0,0001
Глюкоза, ммоль/л	4,89 [4,58 – 5,29]	7,20 [6,14 – 8,62]	<0,0001
Инсулин, пг/мл	285,4 [142,3 – 529,1]	390,0 [221,0 – 722,0]	0,0546
НОМА-IR	7,48 [3,30 – 12,00]	14,40 [7,58 – 27,38]	0,0003
ТАГ, ммоль/л	1,20 [0,91 – 1,47]	2,39 [1,77 – 3,16]	<0,0001
ОХС, ммоль/л	5,08 [4,31 – 6,02]	5,74 [4,57 – 6,50]	0,1
ХС-ЛПВП, ммоль/л	1,30 [1,21 – 1,48]	1,20 [1,09 – 1,45]	0,0249
ХС-ЛПНП, ммоль/л	3,18 [2,79 – 3,53]	3,10 [1,95 – 3,80]	0,3

Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение или в виде медианы [25 – 75 перцентили] в зависимости от характера распределения.

Антропометрические показатели измерялись в утреннее время натощак, в легкой одежде и обуви. Массу тела определяли при помощи электронных настольных весов МИГ ЭНС 818 (Россия) – измеряли вес больного в целых килограммах. Рост обследуемых в метрах определяли при помощи стандартного ростомера медицинского РМ-1 (Россия) со шкалой, имеющей градацию в сантиметрах с точностью до одной десятой. ИМТ рассчитывался по общепринятой формуле:  $ИМТ = \text{масса (кг)} / \text{рост (м)}^2$ . Окружность талии (ОТ) измеряли гибкой мерной лентой на выдохе в положении стоя, руки обследуемого свободно свисали вдоль туловища, ленту держали горизонтально по середине расстояния между вершиной гребня подвздошной кости и нижним боковым краем ребер. Измерение артериального давления проводилось ручным тонометром (Little Doctor LD-60, Little Doctor International (S) Pte. Ltd., Сингапур) по стандартной методике Короткова Н.С. манжетой соответствующего размера. За один час до измерения обследуемые не употребляли кофеин-содержащие напитки (крепкий чай, кофе), не курили и не выполняли физических нагрузок. Артериальное давление измерялось в положении сидя, манжету накладывали на плечо на 2 см выше от локтевой ямки на уровне сердца. Мембрану фонендоскопа устанавливали в область локтевой ямки на точку пульсации плечевой артерии. Измерения проводились

трижды с интервалом 3 – 5 минут. Средние показатели систолического и диастолического артериального давления вычислялся после трех измерений. Диагноз артериальной гипертензии устанавливался согласно клиническим рекомендациям 2020 г. Российского кардиологического общества [129]. Для выявления депрессии и тревоги использовалась шкала HADS [130].

У участников исследования проводили отбор цельной венозной крови, а также образцов фекалий. Лабораторные исследования проводились на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, Центра цифровой и трансляционной медицины ООО «Центр молекулярного здоровья» и ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Выделение бактериальной ДНК из образцов цельной крови проводилось с использованием набора QIAamp BiOstic Bacterimia DNA Kit (QIAGEN GmbH, Германия). Для выделения бактериальной ДНК из образцов фекалий использовали набор QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия). Дальнейшие процедуры были идентичны как для бактериальной ДНК крови, так и бактериальной ДНК кала. Однако следует отметить, что задачей данной работы не являлась характеристика микробиома кала и полученные данные рассматривались в контексте возможной взаимосвязи с микробиомом крови и содержанием нейротрофинов. Контроль качества полученной ДНК проводился методами спектрофотометрии и электрофореза для установления соответствия принятым критериям качества: концентрация ДНК должна составлять не менее 20 нг/мкл; показатель good quality должен составлять не менее 1,7; отчетливая визуализация продуктов разделения ДНК на электрофорезе.

Для выполнения полимеразной цепной реакции (ПЦР) варибельного участка v3-v4 гена 16S рРНК использовали ген-специфичные праймеры с дополнительной последовательностью адаптера (табл. 5). Амплификация проводилась в стандартном режиме с высокоточной полимеразой Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, США). Полученные ПЦР-

продукты детектировали в 1% агарозном геле, после чего проводили очистку реакционных смесей парамагнитными частицами AMPure XP (Beckman Coulter, США) согласно протоколу подготовки библиотек. Последующую амплификацию ПЦР-продуктов осуществляли с использованием индекс-праймеров Nextera XT Index Kit (Illumina, Inc., США) и высокоточной полимеразы Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, США) и повторно очищали парамагнитными частицами AMPure XP (Beckman Coulter, США). Концентрации очищенных библиотек определяли с помощью наборов Qubit HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Полученные библиотеки смешивали в эквимольном соотношении и проводили оценку качества и размера полученного пула на приборе 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., США). При необходимости проводилась дополнительная очистка парамагнитными частицами AMPure XP (Beckman Coulter, США). Готовый пул библиотек разводили и денатурировали с помощью реагентов набора MiSeq Reagent kit v3 (Illumina, Inc., США) и секвенировали на NGS-системе (next generation sequencing, секвенирование нового поколения) MiSeq (Illumina, Inc., США) согласно протоколу производителя.

Табл. 5. Специфичные праймеры к 16S ДНК

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (дополнительная последовательность адаптера выделена курсивом)
337F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'
805R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

Для образцов крови, учитывая более узкое разнообразие и существенно меньшую численность бактериальной ДНК по сравнению с калом, было рассчитано покрытие в районе от 5000 до 20 000 ридов на образец микробиома. Для полученных ридов проводился обязательный контроль качества с помощью программы FastQC (BaseSpace Labs App., Illumina, Inc., США) по

следующим критериям: распределение качества оснований – минимум 90% с качеством > 25%; распределение длины ридов – минимум 90% прочтений достигают длины в 300 нуклеотидов; максимальный процент неопределенных оснований – 1%.

Полученные риды были проанализированы программой QIIME v.1.9.1 (Knight and Caporaso labs., США) с использованием референсной базы данных Greengenes v.13.8 (Second Genome, Inc., США) с 97% порогом сходства между последовательностями. Относительная представленность бактериальных таксонов в общем пуле ридов была получена долями (от 0 до 1), которые рассчитывались на основе количества картированных ридов для каждого таксона. Таким образом, при анализе таксономической принадлежности бактериальной ДНК крови/кала использовались данные, такие как доля отдельных таксонов в общем пуле бактериальной ДНК крови/кала (от 0 до 1), так и частота выделения таксонов у разных исследуемых групп.

Для оценки альфа-разнообразия микробиомов крови и кала были рассчитаны стандартные характеристики:

- общее количество наблюдаемых операционных таксономических единиц (operational taxonomic units, OTUs). Операционная таксономическая единица – абстрактное понятие, суррогатный таксономический уровень, результат кластерного объединения результатов секвенирования 16S ДНК бактерий с 97% идентичностью;
- индекс Chao1 – мера скрытого разнообразия, прогнозирует количество таксонов в выборке путем экстраполяции редких микроорганизмов, которые могли быть упущены из-за недостаточной выборки;
- филогенетическое разнообразие (phylogenetic diversity, PD) – мера разнообразия, основанная на филогении (историческом развитии микроорганизмов), показывает удаленность таксонов на филогенетическом древе, чем больше удалены друг от друга микроорганизмы, тем выше значение PD;

- индекс Shannon – гибридная мера разнообразия и равномерности таксонов в выборке, увеличение разнообразия микроорганизмов и увеличение равномерности их распределения повышают индекс Shannon, а преобладание доминантных видов – снижает;
- индекс Simpson – индекс разнообразия, демонстрирующий вероятность того, что две случайно выбранные особи принадлежат к разным видам, менее чувствителен к редким видам.

Из образцов крови также получали сыворотку, чьи образцы хранились при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ , с последующей однократной разморозкой. В образцах сыворотки крови проводилось исследование концентрации нейротрофинов (BDNF и NGF), глюкозы, инсулина, ТАГ, ОХС, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, а также ряда адипокинов (адипонектин, резистин, лептин, аспросин) и миокинов (ирисин, миостатин-GDF8, фактора роста фибробластов 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21), остеокальцин). Следует отметить, что задачей работы не являлась характеристика всех изучаемых показателей, полученные данные рассматривались в контексте выявления возможных связей с содержанием нейротрофинов.

Концентрации BDNF, NGF, инсулина, адипокинов (кроме аспросина) и миокинов определяли методом мультиплексного иммуноферментного анализа (ИФА) на анализаторе Magpix (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием коммерческих наборов Milliplex: Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1, Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2 и Human Myokine Magnetic Bead Panel (Merck, Германия). Для получения калибровочной кривой, лиофилизированные стандарты и контроли разбавляли в 250 мкл деионизированной воды. Эти растворы хорошо перемешивали и инкубировали в течение 10 минут. Все стадии инкубации проводились либо при комнатной температуре, либо при  $4^{\circ}\text{C}$  (в соответствии с рекомендациями производителя) и в темноте, для защиты микросфер от света. Затем делали несколько последовательных серийных разведений для получения шести различных концентраций стандарта. Стандарты и контроли наносили на

планшет для последующего ИФА. Далее наносили образцы, при необходимости их разводили в «Assay buffer» в соответствии с рекомендациями производителя. После этого магнитные микросферы ресуспендировали в рекомендованном буфере и наносили в каждую лунку 96-луночного планшета. Заполненные планшеты инкубировали в течение 16 часов при 4°C. После инкубации планшеты промывали с использованием промывочной станции Bio-Plex Pro II Wash (Bio-Rad Laboratories, США). Затем в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли раствор «Detection Antibody» и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После чего в лунки добавляли раствор «Streptavidin-Phycoerythrin» и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Затем планшет снова промывали с использованием промывочной станции Bio-Plex Pro II Wash (Bio-Rad Laboratories, США). На последнем этапе пробоподготовки иммунокомплексы ресуспендировали в 100-150 мкл предоставленного буфера для анализа, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Среднюю интенсивность флуоресценции измеряли с использованием системы Magpix и ее программного обеспечения xPONENT (Bio-Rad Laboratories, США). Обработку данных проводили с использованием программы Bio-Plex Manager 4.1 (Bio-Rad Laboratories, США). Определение концентрации BDNF и NGF проводилось в двух повторах с последующим использованием среднего значения в статистическом анализе.

Концентрацию аспросина также определяли методом ИФА при помощи тест-системы ELISA Kit for Asprosin (Cloud-Clone Corp. (CCC), США) и анализатора Magpix (Bio-Rad Laboratories, США). Для построения калибровочной кривой использовались растворы, полученные методом серийных разведений стандартного раствора. В лунки 96-луночного планшета добавляли 100 мкл одного из разведений стандартного раствора или исследуемый образец сыворотки и инкубировали 1 час при 37°C. После аспирации в каждую лунку добавляли по 100 мкл детектирующего реагента А и инкубировали в течение часа при 37°C. Повторно аспирировали, промывали

три раза и добавляли 100 мкл детектирующего реагента В. После 30 минутной инкубации еще раз аспирировали и промывали лунки 5 раз. Перед последней 15 минутной инкубацией добавляли 90 мкл раствора субстрата ТМВ, а после – 50 мкл стоп-раствора. Полученный раствор детектировали при 450 нм.

Концентрацию глюкозы в сыворотке определяли с использованием набора Глюкоза-Ольвекс 005.012 (ООО «Ольвекс Диагностикум», Россия). В основе теста лежит реакция Триндера.  $\beta$ -D-глюкоза под действием фермента глюкозооксидазы окисляется с образованием эквимольного количества перекиси водорода. Образующаяся перекись водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель). Интенсивность светопоглощения была пропорциональна содержанию глюкозы и определялась при длине волны 500 нм на спектрофотометре U-2900 (Hitachi High-Technologies, Япония). После определения концентрации глюкозы и инсулина сыворотки рассчитывался индекс инсулинорезистентности НОМА-IR в соответствии с формулой  $\text{НОМА-IR} = (\text{Глюкоза, ммоль/л} \times \text{Инсулин, мкЕд/мл}) / 22,5$  [131].

На том же оборудовании (U-2900, Hitachi High-Technologies, Япония) проводилось исследование показателей липидного транспорта с использованием соответствующих наборов ООО «Ольвекс Диагностикум» (Россия): ТАГ (набор Триглицериды-1-Ольвекс 017.011), ОХС (набор Холестерин-1-Ольвекс 013.001), ХС-ЛПВП (набор Холестерин-ЛПВП-Ольвекс 013.004) и ХС-ЛПНП (Холестерин-ЛПНП-Ольвекс 013.006). В основе метода определения концентрации триацилглицеридов и общего холестерина также лежит реакция Триндера, однако источником перекиси водорода для образования хинониминного красителя служит ряд других реакций. В случае триацилглицеридов эти реакции катализируются липазой, глицерокиназой (в присутствии АТФ), глицерол-3-фосфатоксидазой и пероксидазой, а при определении общего холестерина – холестеролэстеразой и холестеролоксидазой. Интенсивность окраски реакционной среды при длине

волны 500 нм пропорциональна содержанию ТАГ/ОХС в исследуемом материале. Определение концентраций ХС-ЛПВП и ХС-ЛПНП происходило аналогично определению содержанию общего холестерина, однако требовало дополнительной пробоподготовки. При определении ХС-ЛПВП использовалась фосфорно-вольфрамовая кислота, в присутствии которой происходило осаждение хиломикрон (ХМ), ЛПОНП и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), а в супернатанте определялся ХС-ЛПВП. Напротив, при определении концентрации ХС-ЛПНП осаждают ЛПНП гепарином, а в супернатанте определяют суммарную концентрацию холестерина ХМ, ЛПОНП и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Итоговое значение содержания ХС-ЛПНП в сыворотке определялось по разнице общего холестерина и холестерина полученного супернатанта (т.е. холестерина ХМ, ЛПОНП и ЛПВП).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия). Все полученные массивы данных были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Если распределение носило нормальный характер, то данные были представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, а в случае отсутствия нормального распределения – в виде медианы [25 – 75 перцентили]. Сравнительный анализ одноименных параметров в исследуемых группах в случае нормального распределения данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента (при условии равных дисперсий выборок) и t-критерий Уэлча (при неравных дисперсиях, проверка равенности дисперсий выполнялась автоматически). Когда распределение данных не носило нормальный характер, использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. Для установления достоверности различий в частоте встречаемости одноименных таксонов у разных групп, а также для сравнения гендерного состава исследуемых групп использовался критерия согласия Пирсона (Хи-квадрат). Выявленные различия считались достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Для выявления взаимосвязи

между изучаемыми параметрами использовался метод корреляционного анализа с расчетом коэффициента Спирмена. Коэффициенты корреляции принимались во внимания если они по модулю были более 0,3 (умеренная сила связи в соответствии со шкалой Чеддока) при уровне значимости  $p < 0,05$ . Также в работе использовались методы линейного регрессионного анализа и множественной регрессии для оценки предиктивной значимости отдельных таксонов микробиома крови и характеристик альфа-разнообразия микробиома кала в отношении параметров разнообразия микробиома крови. Введение независимых переменных (X) в модель множественной регрессии проводилось по методу Backward, когда в модель сначала вводятся все переменные, а потом происходит удаление незначимых переменных. Включение X в уравнение множественной регрессии происходило при уровне значимости  $p < 0,05$ . Чтобы выявить, влияет ли разнообразие микробиома кала или микробиома крови на содержание нейротрофинов, каждая из исследуемых групп была разделены на подгруппы в зависимости от величин индексов альфа-разнообразия: с высокими, средними и низкими значениями. Распределение на подгруппы проводилось по квантилям. Для выявления различий между содержанием нейротрофинов в сформированных подгруппах использовался метод однофакторного дисперсионного анализа (analysis of variance, ANOVA), если распределение носило нормальный характер, и критерий Краскела-Уоллиса в случае отсутствия нормального распределения данных.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ. БАКТЕРИАЛЬНАЯ ДНК КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖИРЕНИЕМ

Первой задачей исследования была оценка влияния ожирения и его метаболического фенотипа на микробиом крови. Изучалось влияние ожирения как на разнообразие микробиома крови, так и на его таксономический состав – частоту выделения отдельных таксонов из и долей, приходящейся на эти таксоны в общем пуле микробной ДНК крови.

#### 3.1. Разнообразие микробиома крови

Для характеристики микробиома крови оценивались стандартные параметры альфа-разнообразия микробиома крови: индекс Simpson, индекс Shannon, индекс Chao1, филогенетическое разнообразие (PD) и общее количество наблюдаемых операционных таксономических единиц (OTUs) (табл. 6). Была проведена проверка гипотезы о влиянии пола на разнообразия микробиома крови. После разделения каждой из групп по гендерной принадлежности мы не обнаружили статистически значимых различий в характеристиках альфа-разнообразия между мужчинами и женщинами ни в одной из исследуемых групп ( $p > 0,05$ ).

Табл. 6. Характеристики альфа-разнообразия микробиома крови.

	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
Индекс Simpson	0,975 [0,953 – 0,983]	0,977 [0,964 – 0,984]	0,972 [0,957 – 0,980]	0,980 [0,970 – 0,984]
Индекс Shannon	5,99 [5,27 – 6,71]	6,26 [5,53 – 6,65]	6,08 [5,53 – 6,56]	6,31 [5,81 – 6,83]
Индекс Chao1	168,5 [114,8 – 272,0]	208,88 [133,3 – 279,3]	205,03 [129,6 – 265,2]	220,80 [141,5 – 343,4]
PD	12,06 [8,45 – 17,36]	14,11 [10,61 – 18,47]	13,43 [9,78 – 16,92]	14,95 [11,61 – 19,63]
OTUs	125,0 [79,0 – 202,0]	147,0 [97,5 – 208,3]	140,0 [92,0 – 201,5]	149,0 [109,3 – 233,0]

Данные представлены в виде медианы [25 – 75 перцентили].

Сравнительный анализ показал, что для Группы 2 характерны более высокие значения индекса Chao1 ( $p=0,05$ ) и PD ( $p<0,05$ ), тогда как значения индексов Shannon, Simpson и OTUs не отличались от Группы 1 ( $p>0,05$ ) (рис. 3). Кроме того, у пациентов Группы 2 значения манхэттенского расстояния – характеристики бета разнообразия были статистически значимо выше, чем у Группы 1 ( $p<0,05$ ), что демонстрирует большую «несхожесть» микробиомов кишечника и крови при ожирении.

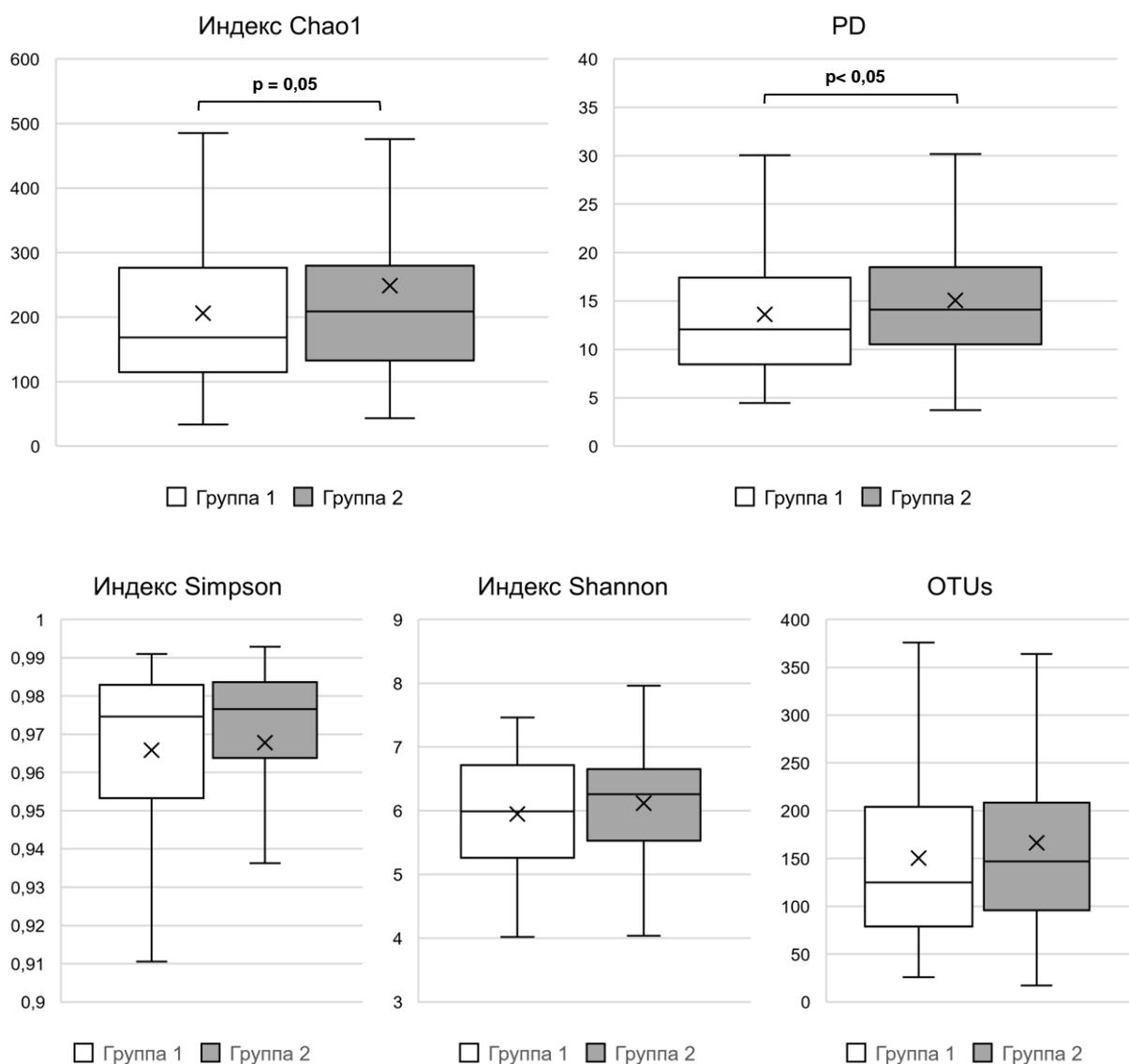


Рис. 3. Сравнение характеристик альфа-разнообразия Группы 1 и Группы 2.

Также, как и для Группы 2 статистически значимые различия с данными Группы 1 были установлены для индекса Chao1 и PD ( $p < 0,05$ ). Однако подобные отличия были характерны только для пациентов с МНЗО, тогда как у пациентов с МЗО значения характеристик альфа-разнообразия не отличались от Группы 1 (рис. 4). Кроме того, для пациентов с МНЗО было отмечено статистически значимое повышение индекса Simpson ( $p < 0,05$ ) и тенденция к повышению OTUs ( $p < 0,1$ ).

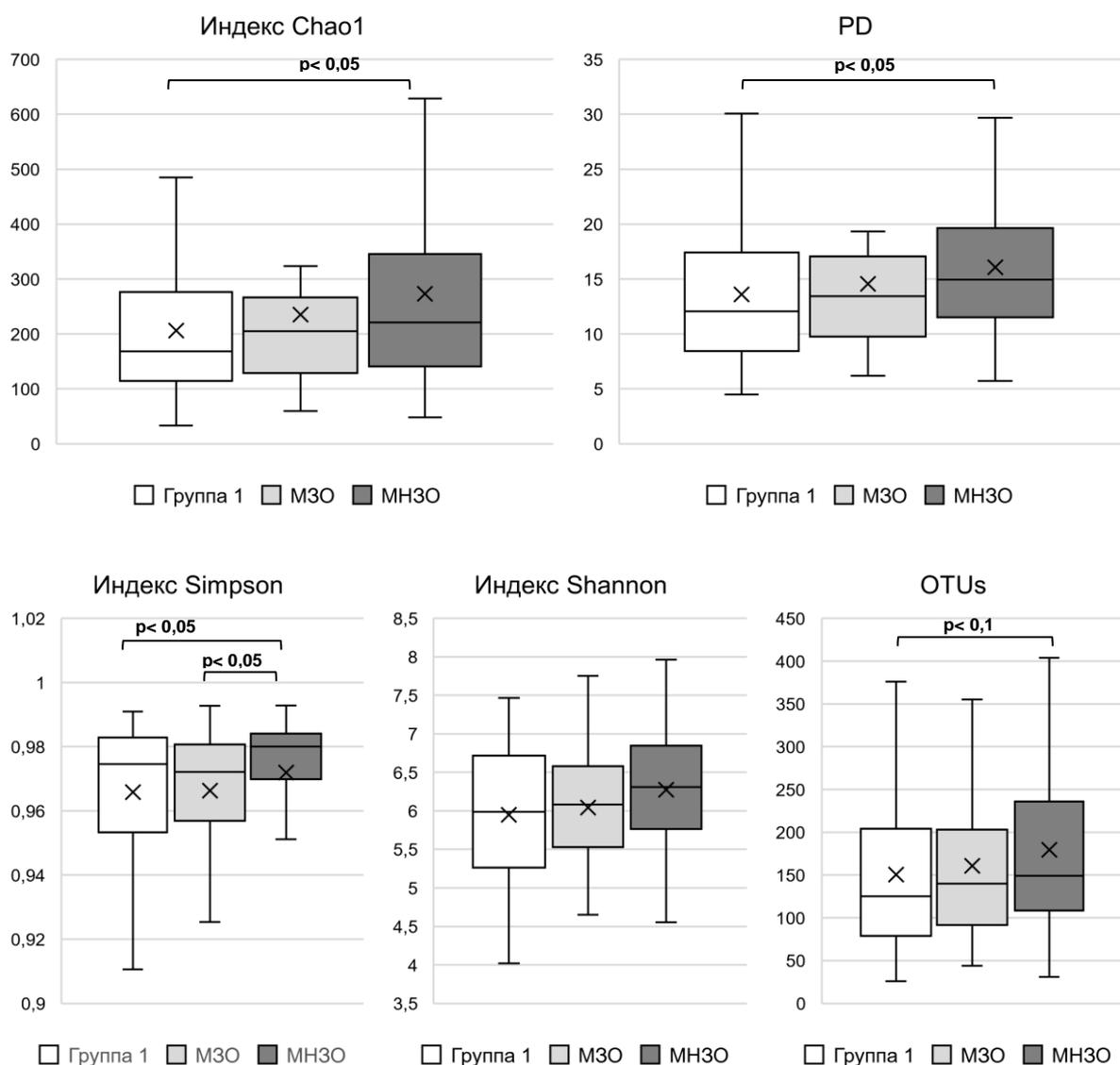


Рис. 4. Сравнение характеристик альфа-разнообразия у Группы 1 и пациентов с МЗО, и с МНЗО.

### 3.2. Таксономический состав микробной ДНК крови

Большая часть выделенной микробной ДНК из образцов крови принадлежала к домену *Bacteria*, кроме этого, из 10,6% всех образцов выделялась ДНК домена *Archaea*. В образцах крови была обнаружена ДНК филумов: *AD3*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Armatimonadetes*, *BHI80-139*, *BRC1*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteres*, *Elusimicrobia*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *GN02*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Nitrospirae*, *OD1*, *OP11*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *SRI*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *TM6*, *TM7*, *Tenericutes*, *Thermotogae*, *Verrucomicrobia*, *WPS-2*, *WS3*, *WS6*, *Thermi*, *Euryarchaeota* (домен *Archaea*), а также неидентифицированные филумы (Unassigned).

Были проанализированы идентифицированные таксоны, выделенные более чем из 25% образцов крови хотя бы одной из исследуемых групп. Между исследуемыми группами сравнивалась как частота выявления отдельных таксонов из образцов крови, так и доля, приходящаяся на эти таксоны в общем пуле бактериальной ДНК крови (табл. 6). Также для удобства последующей визуализации таксономического состава был введен буквенно-числовой код. Основная масса бактериальной ДНК крови приходилась на филумы *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*, которые выделялись из более чем 99,5% образцов. В Группе 1 на долю этих филумов приходилось 0,947 [0,901 – 0,971] и 0,942 [0,905 – 0,966] в Группе 2 ( $p > 0,05$ ). Реже, в 45-60% образцов крови выделялись филумы *Cyanobacteria*, [*Thermi*], *Verrucomicrobia*, *TM7* и неидентифицированные филумы (Unassigned), а *Chloroflexi*, *Tenericutes*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes* и *Gemmatimonadetes* у 16-34%. ДНК остальных филумов присутствовало в крови менее 15% исследуемых лиц.

В целом, состав микробиома крови на уровне филумов был схож между исследуемыми группами (рис. 5). Некоторые различия наблюдались в частоте выявления минорных филумов у пациентов с ожирением, у которых чаще выделялась ДНК *TM-7* и *Acidobacteria* из образцов. ДНК последнего, чаще выделялась у пациентов с МНЗО, но не с МЗО. Кроме того, для пациентов с

МНЗО была отмечена большая частота выделения ДНК *Verrucomicrobia*. Однако, на уровне классов, порядков и семейств наблюдались значительные отличия, зависящие как от наличия или отсутствия ожирения (рис. 6), так и от его метаболического фенотипа (рис. 7).

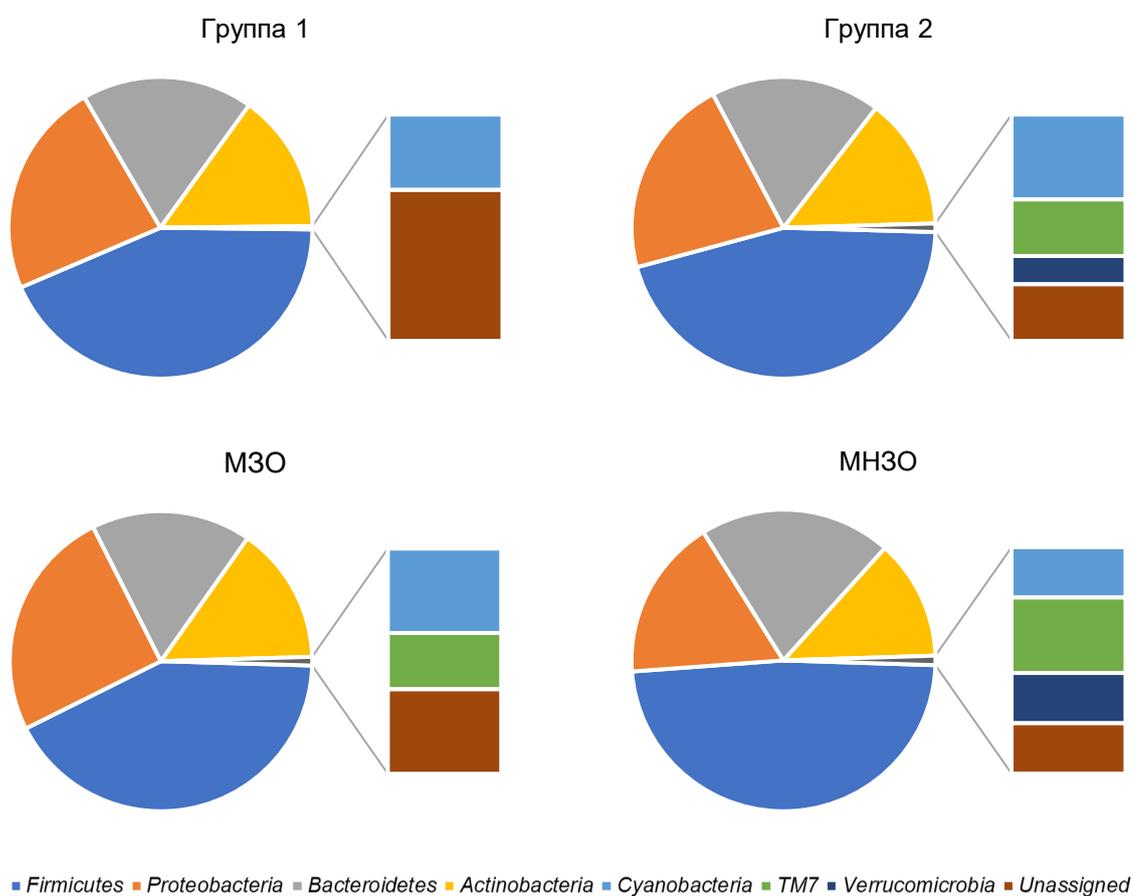


Рис. 5. Состав микробиома крови на уровне филумов

Табл. 6. Сравнение частоты выявления основных таксонов и их доли в метагеноме крови между исследуемыми группами.

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Код	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
<i>Firmicutes</i>					100,00% 0,375 [0,249 – 0,490]	100,00% 0,398 [0,243 – 0,487]	100,00% 0,364 [0,237 – 0,483]	100,00% 0,432 [0,288 – 0,494]
	<i>Bacilli</i>			A	98,28% 0,066 [0,029 – 0,122]	99,01% 0,058 [0,030 – 0,094]	100,00% 0,079 [0,028 – 0,116]	100,00% 0,049 [0,030 – 0,081]
		<i>Bacillales</i>		A1	94,83% 0,032 [0,011 – 0,067]	93,07% 0,027 [0,008 – 0,049]	97,22% 0,029 [0,011 – 0,065]	90,57% <b>0,023 [0,007 – 0,037]*</b>
			<i>Bacillaceae</i>	A1a	30,17% 0,000 [0,000 – 0,002]	35,64% 0,000 [0,000 – 0,002]	25,00% 0,000 [0,000 – 0,001]	43,40% 0,000 [0,000 – 0,003]
			<i>Planococcaceae</i>	A1b	22,41% 0,000 [0,000 – 0,000]	27,72% 0,000 [0,000 – 0,001]	36,11% 0,000 [0,000 – 0,002]	18,87% 0,000 [0,000 – 0,000]
			<i>Staphylococcaceae</i>	A1c	93,97% 0,023 [0,009 – 0,053]	92,08% <b>0,018 [0,004 – 0,033]*</b>	97,22% 0,018 [0,007 – 0,047]	88,68% <b>0,009 [0,004 – 0,027]*†</b>
		<i>Lactobacillales</i>		A2	92,24% 0,023 [0,007 – 0,050]	91,09% 0,020 [0,007 – 0,041]	91,67% 0,020 [0,006 – 0,042]	94,34% 0,020 [0,012 – 0,048]
			<i>Lactobacillaceae</i>	A2a	59,48% 0,002 [0,000 – 0,014]	60,40% 0,003 [0,000 – 0,012]	58,33% 0,002 [0,000 – 0,006]	64,15% 0,003 [0,000 – 0,013]
			<i>Leuconostocaceae</i>	A2b	9,48% 0,000 [0,000 – 0,000]	<b>27,72%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,001]*</b>	<b>27,78%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,001]*</b>	<b>32,08%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,002]*</b>
			<i>Streptococcaceae</i>	A2c	67,24% 0,005 [0,000 – 0,021]	72,28% 0,006 [0,000 – 0,019]	80,56% 0,008 [0,00110 – 0,021]	73,58% 0,005 [0,000 – 0,019]
	<i>Clostridia</i>			B	100,00% 0,269 [0,130 – 0,390]	100,00% 0,307 [0,126 – 0,411]	100,00% 0,271 [0,133 – 0,402]	100,00% <b>0,357 [0,242 – 0,436]*</b>
		<i>Clostridiales</i>		B1	100,00% 0,267 [0,130 – 0,389]	100,00% 0,307 [0,126 – 0,411]	100,00% 0,267 [0,133 – 0,402]	100,00% <b>0,354 [0,242 – 0,436]*†</b>
			<i>Christensenellaceae</i>	B1a	25,00% 0,000 [0,000 – 0,000]	22,77% 0,000 [0,000 – 0,000]	22,22% 0,000 [0,000 – 0,000]	22,64% 0,000 [0,000 – 0,000]
			<i>Clostridiaceae</i>	B1b	51,72%	57,43%	50,00%	64,15%

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Код	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
					0,001 [0,000 – 0,009]	0,001 [0,000 – 0,012]	0,000 [0,000 – 0,012]	0,003 [0,000 – 0,012]
			<i>Lachnospiraceae</i>	B1c	97,41% 0,103 [0,044 – 0,160]	98,02% <b>0,134 [0,050 – 0,207]*</b>	97,22% 0,092 [0,033 – 0,211]	98,11% <b>0,152 [0,092 – 0,207]*</b>
			<i>Ruminococcaceae</i>	B1d	96,55% 0,083 [0,033 – 0,152]	96,04% 0,094 [0,039 – 0,134]	100,00% 0,070 [0,038 – 0,114]	98,11% <b>0,117 [0,059 – 0,139]†</b>
			[ <i>Tissierellaceae</i> ]	B1e	37,07% 0,000 [0,000 – 0,004]	30,69% 0,000 [0,000 – 0,004]	33,33% 0,000 [0,000 – 0,005]	30,19% 0,000 [0,000 – 0,004]
			<i>Veillonellaceae</i>	B1f	59,48% 0,004 [0,000 – 0,015]	60,40% 0,005 [0,000 – 0,018]	61,11% 0,004 [0,000 – 0,015]	60,38% 0,006 [0,000 – 0,019]
	<i>Erysipelotrichi</i>			C	60,34% 0,006 [0,000 – 0,014]	57,43% 0,001 [0,000 – 0,014]	55,56% 0,001 [0,000 – 0,009]	64,15% 0,003 [0,000 – 0,019]
	<i>Erysipelotrichales</i>			C1	60,34% 0,006 [0,000 – 0,014]	57,43% 0,001 [0,000 – 0,014]	55,56% 0,001 [0,000 – 0,009]	64,15% 0,003 [0,000 – 0,019]
			<i>Erysipelotrichaceae</i>	C1a	60,34% 0,006 [0,000 – 0,014]	57,43% 0,001 [0,000 – 0,014]	55,56% 0,001 [0,000 – 0,009]	64,15% 0,003 [0,000 – 0,019]
<i>Proteobacteria</i>						100,00% 0,200 [0,118 – 0,359]	100,00% 0,189 [0,095 – 0,330]	100,00% 0,216 [0,092 – 0,381]
	<i>Alphaproteobacteria</i>			D	95,69% 0,068 [0,036 – 0,125]	98,02% <b>0,036 [0,018 – 0,111]*</b>	94,44% 0,038 [0,020 – 0,189]	100,00% <b>0,034 [0,016 – 0,072]**†</b>
		<i>Caulobacterales</i>		D1	70,69% 0,010 [0,000 – 0,029]	63,37% <b>0,003 [0,000 – 0,016]*</b>	58,33% 0,004 [0,000 – 0,024]	62,26% <b>0,003 [0,000 – 0,012]*</b>
			<i>Caulobacteraceae</i>	D1a	70,69% 0,010 [0,000 – 0,029]	63,37% <b>0,003 [0,000 – 0,016]*</b>	58,33% 0,004 [0,000 – 0,024]	62,26% <b>0,003 [0,000 – 0,012]*</b>
		<i>Rhizobiales</i>		D2	80,17% 0,010 [0,001 – 0,031]	76,24% 0,008 [0,001 – 0,025]	72,22% 0,011 [0,000 – 0,032]	79,25% 0,006 [0,001 – 0,020]
			<i>Bradyrhizobiaceae</i>	D2a	44,83% 0,000 [0,000 – 0,008]	<b>30,69%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,001]*</b>	33,33% 0,000 [0,000 – 0,005]	<b>22,64%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,000]*</b>
			<i>Brucellaceae</i>	D2b	16,38% 0,000 [0,000 – 0,000]	24,75% 0,000 [0,000 – 0,000]	22,22% 0,000 [0,000 – 0,000]	28,30% 0,000 [0,000 – 0,001]

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Код	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
			<i>Hyphomicrobiaceae</i>	D2c	16,38% 0,000 [0,000 – 0,000]	<b>30,69%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,002]*</b>	<b>41,67%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,005]*</b>	24,53% <b>0,000 [0,000 – 0,000]†</b>
			<i>Methylobacteriaceae</i>	D2d	35,34% 0,000 [0,000 – 0,003]	27,72% 0,000 [0,000 – 0,002]	27,78% 0,000 [0,000 – 0,003]	26,42% 0,000 [0,000 – 0,001]
		<i>Rhodobacterales</i>		D3	40,52% 0,000 [0,000 – 0,008]	<b>60,40%*</b> <b>0,004 [0,000 – 0,010]*</b>	58,33% 0,002 [0,000 – 0,012]	<b>64,15%*</b> <b>0,005 [0,000 – 0,011]*</b>
			<i>Rhodobacteraceae</i>	D3a	39,66% 0,000 [0,000 – 0,008]	<b>59,41%*</b> <b>0,003 [0,000 – 0,010]*</b>	<b>55,56%*</b> 0,002 [0,000 – 0,012]	<b>64,15%*</b> <b>0,005 [0,000 – 0,011]*</b>
		<i>Rhodospirillales</i>		D4	16,38% 0,000 [0,000 – 0,000]	22,77% 0,000 [0,000 – 0,000]	27,78% 0,000 [0,000 – 0,003]	15,09% 0,000 [0,000 – 0,000]
		<i>Rickettsiales</i>		D5	32,76% 0,000 [0,000 – 0,002]	29,70% 0,000 [0,000 – 0,002]	30,56% 0,000 [0,000 – 0,002]	30,19% 0,000 [0,000 – 0,001]
		<i>Sphingomonadales</i>		D6	76,72% 0,025 [0,002 – 0,055]	79,21% <b>0,007 [0,001 – 0,037]*</b>	77,78% 0,009 [0,001 – 0,069]	75,47% <b>0,005 [0,001 – 0,015]**†</b>
			<i>Sphingomonadaceae</i>	D6a	75,86% 0,022 [0,002 – 0,052]	78,22% <b>0,006 [0,001 – 0,037]*</b>	75,00% 0,009 [0,000 – 0,060]	75,47% <b>0,005 [0,001 – 0,015]**†</b>
	<i>Betaproteobacteria</i>			E	96,55% 0,036 [0,018 – 0,085]	98,02% 0,034 [0,017 – 0,067]	100,00% 0,033 [0,015 – 0,065]	96,23% 0,030 [0,016 – 0,061]
		<i>Burkholderiales</i>		E1	95,69% 0,029 [0,015 – 0,074]	98,02% 0,030 [0,015 – 0,050]	100,00% 0,028 [0,015 – 0,038]	96,23% 0,026 [0,015 – 0,052]
			<i>Alcaligenaceae</i>	E1a	60,34% 0,004 [0,000 – 0,014]	65,35% 0,003 [0,000 – 0,011]	58,33% 0,003 [0,000 – 0,009]	67,92% 0,003 [0,000 – 0,010]
			<i>Burkholderiaceae</i>	E1b	35,34% 0,000 [0,000 – 0,004]	<b>55,45%*</b> <b>0,001 [0,000 – 0,007]*</b>	<b>55,56%*</b> 0,001 [0,000 – 0,006]	<b>54,72%*</b> 0,001 [0,000 – 0,007]
			<i>Comamonadaceae</i>	E1c	81,03% 0,011 [0,002 – 0,025]	83,17% 0,009 [0,002 – 0,021]	83,33% 0,008 [0,004 – 0,021]	81,13% 0,009 [0,001 – 0,019]
			<i>Oxalobacteraceae</i>	E1d	44,83% 0,000 [0,000 – 0,006]	47,52% 0,000 [0,000 – 0,004]	50,00% 0,000 [0,000 – 0,005]	49,06% 0,000 [0,000 – 0,004]
		<i>Neisseriales</i>		E2	29,31%	26,73%	27,78%	24,53%

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Код	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
					0,000 [0,000 – 0,001]	0,000 [0,000 – 0,001]	0,000 [0,000 – 0,002]	0,000 [0,000 – 0,000]
			<i>Neisseriaceae</i>	E2a	29,31% 0,000 [0,000 – 0,001]	26,73% 0,000 [0,000 – 0,001]	27,78% 0,000 [0,000 – 0,002]	24,53% 0,000 [0,000 – 0,000]
		<i>Gammaproteobacteria</i>		F	100,00% 0,038 [0,019 – 0,086]	100,00% 0,056 [0,027 – 0,094]	100,00% 0,052 [0,027 – 0,096]	100,00% 0,056 [0,024 – 0,091]
		<i>Aeromonadales</i>		F1	19,83% 0,000 [0,000 – 0,000]	27,72% 0,000 [0,000 – 0,001]	22,22% 0,000 [0,000 – 0,000]	32,08% 0,000 [0,000 – 0,002]
			<i>Succinivibrionaceae</i>	F1a	16,38% 0,000 [0,000 – 0,000]	20,79% 0,000 [0,000 – 0,000]	16,67% 0,000 [0,000 – 0,000]	26,42% 0,000 [0,000 – 0,001]
		<i>Enterobacteriales</i>		F2	72,41% 0,008 [0,000 – 0,020]	74,26% 0,005 [0,000 – 0,021]	66,67% 0,006 [0,000 – 0,022]	81,13% 0,005 [0,001 – 0,022]
			<i>Enterobacteriaceae</i>	F2a	72,41% 0,008 [0,000 – 0,020]	74,26% 0,005 [0,000 – 0,021]	66,67% 0,006 [0,000 – 0,022]	81,13% 0,005 [0,001 – 0,022]
		<i>Pseudomonadales</i>		F3	88,79% 0,018 [0,005 – 0,048]	<b>96,04%*</b> 0,024 [0,007 – 0,053]	97,22% 0,022 [0,008 – 0,047]	94,34% 0,024 [0,004 – 0,049]
			<i>Moraxellaceae</i>	F3a	85,34% 0,015 [0,004 – 0,041]	89,11% 0,022 [0,004 – 0,046]	88,89% 0,021 [0,004 – 0,046]	88,68% 0,022 [0,003 – 0,044]
			<i>Pseudomonadaceae</i>	F3b	35,34% 0,000 [0,000 – 0,004]	46,53% 0,000 [0,000 – 0,006]	41,67% 0,000 [0,000 – 0,007]	49,06% 0,000 [0,000 – 0,006]
		<i>Xanthomonadales</i>		F4	35,34% 0,000 [0,000 – 0,004]	<b>51,49%*</b> <b>0,001 [0,000 – 0,009]*</b>	47,22% 0,000 [0,000 – 0,011]	49,06% 0,000 [0,000 – 0,005]
			<i>Xanthomonadaceae</i>	F4a	32,76% 0,000 [0,000 – 0,002]	43,56% 0,000 [0,000 – 0,006]	44,44% 0,000 [0,000 – 0,011]	41,51% 0,000 [0,000 – 0,004]
		<i>Deltaproteobacteria</i>		G	39,66% 0,000 [0,000 – 0,006]	48,51% 0,000 [0,000 – 0,006]	50,00% 0,000 [0,000 – 0,006]	50,94% 0,001 [0,000 – 0,005]
		<i>Desulfovibrionales</i>		G1	31,03% 0,000 [0,000 – 0,002]	23,76% 0,000 [0,000 – 0,000]	22,22% 0,000 [0,000 – 0,000]	26,42% 0,000 [0,000 – 0,001]
			<i>Desulfovibrionaceae</i>	G1a	31,03% 0,000 [0,000 – 0,002]	23,76% 0,000 [0,000 – 0,000]	22,22% 0,000 [0,000 – 0,000]	26,42% 0,000 [0,000 – 0,001]

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Код	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
	<i>Epsilonproteobacteria</i>			H	13,79% 0,000 [0,000 – 0,000]	21,78% 0,000 [0,000 – 0,000]	16,67% 0,000 [0,000 – 0,000]	<b>28,30%*</b> 0,000 [0,000 – 0,001]
	<i>Campylobacterales</i>			H1	13,79% 0,000 [0,000 – 0,000]	21,78% 0,000 [0,000 – 0,000]	16,67% 0,000 [0,000 – 0,000]	<b>28,30%</b> 0,000 [0,000 – 0,001]
		<i>Helicobacteraceae</i>		H1a	12,93% 0,000 [0,000 – 0,000]	20,79% 0,000 [0,000 – 0,000]	16,67% 0,000 [0,000 – 0,000]	<b>26,42%*</b> 0,000 [0,000 – 0,001]
<i>Bacteroidetes</i>					100,00% 0,158 [0,092 – 0,260]	100,00% 0,159 [0,093 – 0,257]	100,00% 0,148 [0,070 – 0,262]	100,00% 0,183 [0,114 – 0,262]
	<i>Bacteroidia</i>			I	99,14% 0,127 [0,059 – 0,237]	97,03% 0,127 [0,067 – 0,241]	100,00% 0,124 [0,052 – 0,243]	98,11% 0,159 [0,088 – 0,254]
	<i>Bacteroidales</i>			I1	99,14% 0,127 [0,059 – 0,237]	97,03% 0,127 [0,067 – 0,241]	100,00% 0,124 [0,052 – 0,243]	98,11% 0,159 [0,088 – 0,254]
		<i>Bacteroidaceae</i>		I1a	85,34% 0,037 [0,008 – 0,097]	92,08% 0,041 [0,012 – 0,066]	<b>97,22%*</b> 0,044 [0,011 – 0,076]	94,34% 0,042 [0,012 – 0,061]
		[ <i>Barnesiellaceae</i> ]		I1b	38,79% 0,000 [0,000 – 0,011]	26,73% <b>0,000 [0,000 – 0,003]*</b>	<b>11,11%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,000]*</b>	<b>35,81%†</b> <b>0,000 [0,000 – 0,009]†</b>
		[ <i>Odoribacteraceae</i> ]		I1c	25,86% 0,000 [0,000 – 0,001]	26,73% 0,000 [0,000 – 0,001]	25,00% 0,000 [0,000 – 0,000]	32,08% 0,000 [0,000 – 0,001]
		[ <i>Paraprevotellaceae</i> ]		I1d	48,28% 0,000 [0,000 – 0,013]	57,43% 0,003 [0,000 – 0,011]	63,89% 0,003 [0,000 – 0,012]	60,28% 0,005 [0,000 – 0,013]
		<i>Porphyromonadaceae</i>		I1e	45,69% 0,000 [0,000 – 0,008]	47,52% 0,000 [0,000 – 0,004]	41,67% 0,000 [0,000 – 0,005]	56,60% 0,001 [0,000 – 0,005]
		<i>Prevotellaceae</i>		I1f	86,21% 0,029 [0,012 – 0,065]	93,07% <b>0,041 [0,017 – 0,11]*</b>	94,44% 0,036 [0,011 – 0,103]	94,34% <b>0,049 [0,025 – 0,115]*</b>
		<i>Rikenellaceae</i>		I1g	50,86% 0,001 [0,000 – 0,017]	45,54% 0,000 [0,000 – 0,009]	41,67% 0,000 [0,000 – 0,008]	50,94% 0,001 [0,000 – 0,013]
		<i>S24-7</i>		I1h	31,90% 0,000 [0,000 – 0,002]	<b>59,41%*</b> <b>0,003 [0,000 – 0,011]*</b>	47,22% <b>0,000 [0,000 – 0,007]*</b>	<b>69,81%*</b> <b>0,005 [0,000 – 0,018]**</b>
	<i>Flavobacteriia</i>			J	46,55%	55,45%	<b>69,44%*</b>	<b>47,17%†</b>

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Код	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
					0,000 [0,000 – 0,009]	0,001 [0,000 – 0,011]	<b>0,004 [0,000 – 0,021]*</b>	<b>0,000 [0,000 – 0,005]†</b>
		<i>Flavobacteriales</i>		J1	46,55% 0,000 [0,000 – 0,009]	55,45% 0,001 [0,000 – 0,011]	<b>64,44%*</b> <b>0,004 [0,000 – 0,021]*</b>	<b>47,17%†</b> <b>0,000 [0,000 – 0,005]†</b>
			<i>Flavobacteriaceae</i>	J1a	25,00% 0,000 [0,000 – 0,000]	34,65% 0,000 [0,000 – 0,002]	<b>52,78%*</b> <b>0,001 [0,000 – 0,014]*</b>	<b>26,42%†</b> <b>0,000 [0,000 – 0,001]†</b>
			[ <i>Weeksellaceae</i> ]	J1b	32,76% 0,000 [0,000 – 0,002]	38,61% 0,000 [0,000 – 0,003]	50,00% 0,000 [0,000 – 0,006]	30,19% 0,000 [0,000 – 0,002]
		[ <i>Saprospirae</i> ]		K	42,24% 0,000 [0,000 – 0,006]	32,67% 0,000 [0,000 – 0,002]	27,78% 0,000 [0,000 – 0,001]	35,85% 0,000 [0,000 – 0,003]
			[ <i>Saprospirales</i> ]	K1	42,24% 0,000 [0,000 – 0,006]	32,67% 0,000 [0,000 – 0,002]	27,78% 0,000 [0,000 – 0,001]	35,85% 0,000 [0,000 – 0,003]
			<i>Chitinophagaceae</i>	K1a	39,66% 0,000 [0,000 – 0,005]	31,68% 0,000 [0,000 – 0,001]	25,00% 0,000 [0,000 – 0,000]	35,85% 0,000 [0,000 – 0,003]
		<i>Sphingobacteriia</i>		L	33,62% 0,000 [0,000 – 0,004]	33,66% 0,000 [0,000 – 0,002]	30,56% 0,000 [0,000 – 0,001]	33,96% 0,000 [0,000 – 0,002]
		<i>Sphingobacteriales</i>		L1	33,62% 0,000 [0,000 – 0,004]	33,66% 0,000 [0,000 – 0,002]	30,56% 0,000 [0,000 – 0,001]	33,96% 0,000 [0,000 – 0,002]
		<i>Cytophagia</i>		M	15,52% 0,000 [0,000 – 0,000]	17,82% 0,000 [0,000 – 0,000]	25,00% 0,000 [0,000 – 0,000]	11,32% 0,000 [0,000 – 0,000]
		<i>Cytophagales</i>		M1	15,52% 0,000 [0,000 – 0,000]	17,82% 0,000 [0,000 – 0,000]	25,00% 0,000 [0,000 – 0,000]	11,32% 0,000 [0,000 – 0,000]
			<i>Cytophagaceae</i>	M1a	15,52% 0,000 [0,000 – 0,000]	17,82% 0,000 [0,000 – 0,000]	25,00% 0,000 [0,000 – 0,000]	11,32% 0,000 [0,000 – 0,000]
		<i>Actinobacteria</i>			99,14% 0,129 [0,074 – 0,206]	100,00% 0,124 [0,070 – 0,226]	100,00% 0,128 [0,065 – 0,235]	100,00% 0,115 [0,064 – 0,214]
		<i>Actinobacteria</i>		N	98,28% 0,111 [0,070 – 0,196]	99,01% 0,109 [0,060 – 0,213]	100,00% 0,109 [0,060 – 0,215]	98,11% 0,096 [0,059 – 0,203]
		<i>Actinomycetales</i>		N1	97,41% 0,101 [0,059 – 0,190]	99,01% 0,105 [0,058 – 0,205]	100,00% 0,106 [0,051 – 0,215]	98,11% 0,079 [0,058 – 0,194]

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Код	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
			<i>Actinomycetaceae</i>	N1a	18,97% 0,000 [0,000 – 0,000]	18,81% 0,000 [0,000 – 0,000]	27,78% 0,000 [0,000 – 0,001]	13,21% 0,000 [0,000 – 0,000]
			<i>Corynebacteriaceae</i>	N1b	87,07% 0,021 [0,007 – 0,045]	95,05% 0,024 [0,010 – 0,047]	97,22% 0,023 [0,013 – 0,046]	94,34% 0,023 [0,009 – 0,045]
			<i>Geodermatophilaceae</i>	N1c	25,00% 0,000 [0,000 – 0,000]	27,72% 0,000 [0,000 – 0,001]	36,11% 0,000 [0,000 – 0,002]	20,75% 0,000 [0,000 – 0,000]
			<i>Intrasporangiaceae</i>	N1d	25,00% 0,000 [0,000 – 0,000]	32,67% 0,000 [0,000 – 0,002]	36,11% 0,000 [0,000 – 0,004]	28,30% 0,000 [0,000 – 0,001]
			<i>Microbacteriaceae</i>	N1e	46,55% 0,000 [0,000 – 0,008]	59,41% 0,001 [0,000 – 0,008]	61,11% 0,002 [0,000 – 0,009]	60,38% 0,002 [0,000 – 0,008]
			<i>Micrococcaceae</i>	N1f	87,07% 0,018 [0,006 – 0,032]	90,10% 0,013 [0,004 – 0,036]	88,89% 0,015 [0,003 – 0,033]	90,57% 0,016 [0,004 – 0,037]
			<i>Nocardiaceae</i>	N1g	35,34% 0,000 [0,000 – 0,006]	<b>50,50%*</b> 0,001 [0,000 – 0,009]	50,00% 0,001 [0,000 – 0,010]	<b>52,83%*</b> 0,001 [0,000 – 0,010]
			<i>Nocardioideaceae</i>	N1h	31,03% 0,000 [0,000 – 0,003]	<b>44,55%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,007]*</b>	<b>50,00%*</b> 0,000 [0,000 – 0,007]	41,55% 0,000 [0,000 – 0,007]
			<i>Propionibacteriaceae</i>	N1i	84,48% 0,010 [0,002 – 0,024]	77,23% 0,004 [0,001 – 0,029]	77,78% 0,007 [0,001 – 0,029]	79,25% 0,004 [0,001 – 0,019]
			<i>Streptomyetaceae</i>	N1j	15,52% 0,000 [0,000 – 0,000]	<b>33,66%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,003]*</b>	<b>33,33%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,005]*</b>	<b>33,96%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,003]*</b>
			<i>Williamsiaceae</i>	N1k	25,86% 0,000 [0,000 – 0,001]	24,75% 0,000 [0,000 – 0,000]	30,56% 0,000 [0,000 – 0,002]	18,87% 0,000 [0,000 – 0,000]
		<i>Bifidobacteriales</i>		N2	49,14% 0,000 [0,000 – 0,011]	55,45% 0,002 [0,000 – 0,009]	52,78% 0,001 [0,000 – 0,012]	58,49% 0,002 [0,000 – 0,010]
		<i>Bifidobacteriaceae</i>		N2a	49,14% 0,000 [0,000 – 0,011]	55,45% 0,002 [0,000 – 0,009]	52,78% 0,001 [0,000 – 0,012]	58,49% 0,002 [0,000 – 0,010]
	<i>Coriobacteriia</i>			O	47,41% 0,000 [0,000 – 0,007]	39,60% 0,000 [0,000 – 0,004]	36,11% 0,000 [0,000 – 0,005]	43,40% 0,000 [0,000 – 0,004]
		<i>Coriobacteriales</i>		O1	47,41%	39,60%	36,11%	43,40%

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Код	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
					0,000 [0,000 – 0,007]	0,000 [0,000 – 0,004]	0,000 [0,000 – 0,005]	0,000 [0,000 – 0,004]
			<i>Coriobacteriaceae</i>	O1a	47,41% 0,000 [0,000 – 0,007]	39,60% 0,000 [0,000 – 0,004]	36,11% 0,000 [0,000 – 0,005]	43,40% 0,000 [0,000 – 0,004]
			<i>Thermoleophilia</i>	P	33,62% 0,000 [0,000 – 0,002]	44,55% 0,000 [0,000 – 0,005]	<b>55,56%*</b> 0,001 [0,000 – 0,012]	<b>33,96%†</b> 0,000 [0,000 – 0,003]
			<i>Gaiellales</i>	P1	17,24% 0,000 [0,000 – 0,000]	27,72% 0,000 [0,000 – 0,001]	30,56% 0,000 [0,000 – 0,003]	20,75 0,000 [0,000 – 0,000]
			<i>Gaiellaceae</i>	P1a	15,52% 0,000 [0,000 – 0,000]	<b>27,72%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,001]*</b>	<b>30,56%*</b> 0,000 [0,000 – 0,002]	20,75% 0,000 [0,000 – 0,000]
			<i>Solirubrobacterales</i>	P2	20,69% 0,000 [0,000 – 0,000]	26,73% 0,000 [0,000 – 0,001]	<b>41,67%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,004]*</b>	<b>16,98%†</b> <b>0,000 [0,000 – 0,000]†</b>
			<i>Acidimicrobiia</i>	Q	18,97% 0,000 [0,000 – 0,000]	<b>30,69%*</b> 0,000 [0,000 – 0,002]	<b>36,11%*</b> 0,000 [0,000 – 0,003]	26,42% 0,000 [0,000 – 0,001]
			<i>Acidimicrobiales</i>	Q1	18,97% 0,000 [0,000 – 0,000]	<b>30,69%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,002]</b>	<b>36,11%*</b> 0,000 [0,000 – 0,003]	26,42% 0,000 [0,000 – 0,001]
			<i>Cyanobacteria</i>		57,76% 0,001 [0,000 – 0,013]	60,40% 0,003 [0,000 – 0,013]	66,67% 0,003 [0,0000 – 0,012]	58,49% 0,002 [0,000 – 0,014]
			<i>4C0d-2</i>	R	19,83% 0,000 [0,000 – 0,000]	23,76% 0,000 [0,000 – 0,000]	27,78% 0,000 [0,000 – 0,001]	24,53% 0,000 [0,000 – 0,000]
			<i>Chloroplast</i>	S	45,69% 0,000 [0,000 – 0,009]	41,58% 0,000 [0,000 – 0,008]	41,67% 0,000 [0,000 – 0,008]	41,51% 0,000 [0,000 – 0,007]
			<i>Streptophyta</i>	S1	41,38% 0,000 [0,000 – 0,007]	38,61% 0,000 [0,000 – 0,006]	38,89% 0,000 [0,000 – 0,006]	37,74% 0,000 [0,000 – 0,005]
			<i>TM7</i>		34,48% 0,000 [0,000 – 0,006]	<b>56,44%*</b> <b>0,002 [0,000 – 0,011]*</b>	<b>61,11%*</b> <b>0,002 [0,000 – 0,011]*</b>	<b>60,38%*</b> <b>0,003 [0,000 – 0,013]*</b>
			<i>TM7-3</i>	T	33,62% 0,000 [0,000 – 0,006]	<b>53,47%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,009]*</b>	<b>58,33%*</b> <b>0,001 [0,000 – 0,011]*</b>	<b>56,60%*</b> <b>0,002 [0,000 – 0,012]*</b>
			<i>EW055</i>	T1	31,90% 0,000 [0,000 – 0,005]	45,54% 0,000 [0,000 – 0,009]	<b>52,78%*</b> 0,001 [0,000 – 0,010]	45,28% 0,000 [0,000 – 0,011]

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Код	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
[Thermi]					43,10% 0,000 [0,000 – 0,005]	31,68% 0,000 [0,000 – 0,003]	38,89% 0,000 [0,000 – 0,007]	28,30% 0,000 [0,000 – 0,002]
	<i>Deinococci</i>			U	43,10% 0,000 [0,000 – 0,005]	31,68% 0,000 [0,000 – 0,003]	38,89% 0,000 [0,000 – 0,007]	28,30% 0,000 [0,000 – 0,002]
		<i>Thermales</i>		U1	31,90% 0,000 [0,000 – 0,002]	<b>19,80%*</b> 0,000 [0,000 – 0,000]	30,56% 0,000 [0,000 – 0,003]	<b>15,09%*</b> 0,000 [0,000 – 0,000]
			<i>Thermaceae</i>	U1a	31,90% 0,000 [0,000 – 0,002]	<b>19,80%*</b> 0,000 [0,000 – 0,000]	30,56% 0,000 [0,000 – 0,003]	<b>15,09%*</b> 0,000 [0,000 – 0,000]
<i>Verrucomicrobia</i>					39,66% 0,000 [0,000 – 0,011]	51,49% 0,001 [0,000 – 0,013]	38,89% 0,000 [0,000 – 0,010]	<b>62,26%*</b> <b>0,002 [0,000 – 0,014]**†</b>
	<i>Verrucomicrobiae</i>			V	33,62% 0,000 [0,000 – 0,005]	35,64% 0,000 [0,000 – 0,004]	<b>16,67%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,000]*</b>	<b>47,17%†</b> <b>0,000 [0,000 – 0,012]†</b>
		<i>Verrucomicrobiales</i>		V1	33,62% 0,000 [0,000 – 0,005]	35,64% 0,000 [0,000 – 0,004]	<b>16,67%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,000]*</b>	<b>47,17%†</b> <b>0,000 [0,000 – 0,012]†</b>
			<i>Verrucomicrobiaceae</i>	V1a	33,62% 0,000 [0,000 – 0,005]	35,64% 0,000 [0,000 – 0,004]	<b>16,67%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,000]*</b>	<b>47,17%†</b> <b>0,000 [0,000 – 0,012]†</b>
<i>Chloroflexi</i>					28,45% 0,000 [0,000 – 0,003]	40,59% 0,000 [0,000 – 0,009]	41,67% 0,000 [0,000 – 0,009]	41,51% 0,000 [0,000 – 0,007]
<i>Acidobacteria</i>					22,41% 0,000 [0,000 – 0,000]	<b>36,63%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,006]*</b>	30,56% 0,000 [0,000 – 0,006]	<b>41,51%*</b> <b>0,000 [0,000 – 0,008]*</b>
<i>Tenericutes</i>					23,28% 0,000 [0,000 – 0,000]	31,68% 0,000 [0,000 – 0,002]	30,56% 0,000 [0,000 – 0,001]	33,96% 0,000 [0,000 – 0,003]
	<i>Mollicutes</i>			W	18,10% 0,000 [0,000 – 0,000]	27,72% 0,000 [0,000 – 0,001]	25,00% 0,000 [0,000 – 0,001]	30,19% 0,000 [0,000 – 0,002]
<i>Planctomycetes</i>					18,10% 0,000 [0,000 – 0,000]	23,76% 0,000 [0,000 – 0,000]	27,78% 0,000 [0,000 – 0,001]	22,64% 0,000 [0,000 – 0,000]
<i>Gemmatimonadetes</i>					14,66% 0,000 [0,000 – 0,000]	18,81% 0,000 [0,000 – 0,000]	25,00% 0,000 [0,000 – 0,002]	11,32% 0,000 [0,000 – 0,000]
Unassigned <sup>1</sup>					58,62%	60,40%	61,11%	62,26%

Филум	Класс	Порядок	Семейство	Код	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
					0,002 [0,000 – 0,012]	0,002 [0,000 – 0,010]	0,003 [0,000 – 0,026]	0,002 [0,000 – 0,00792]

Данные представлены в виде медианы [25 – 75 перцентили], <sup>1</sup> неидентифицированные филумы; \* – различия достоверны, по сравнению с Группой 1; † – различия достоверны, по сравнению с подгруппой пациентов с МЗО. В случае нормального распределения данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение.

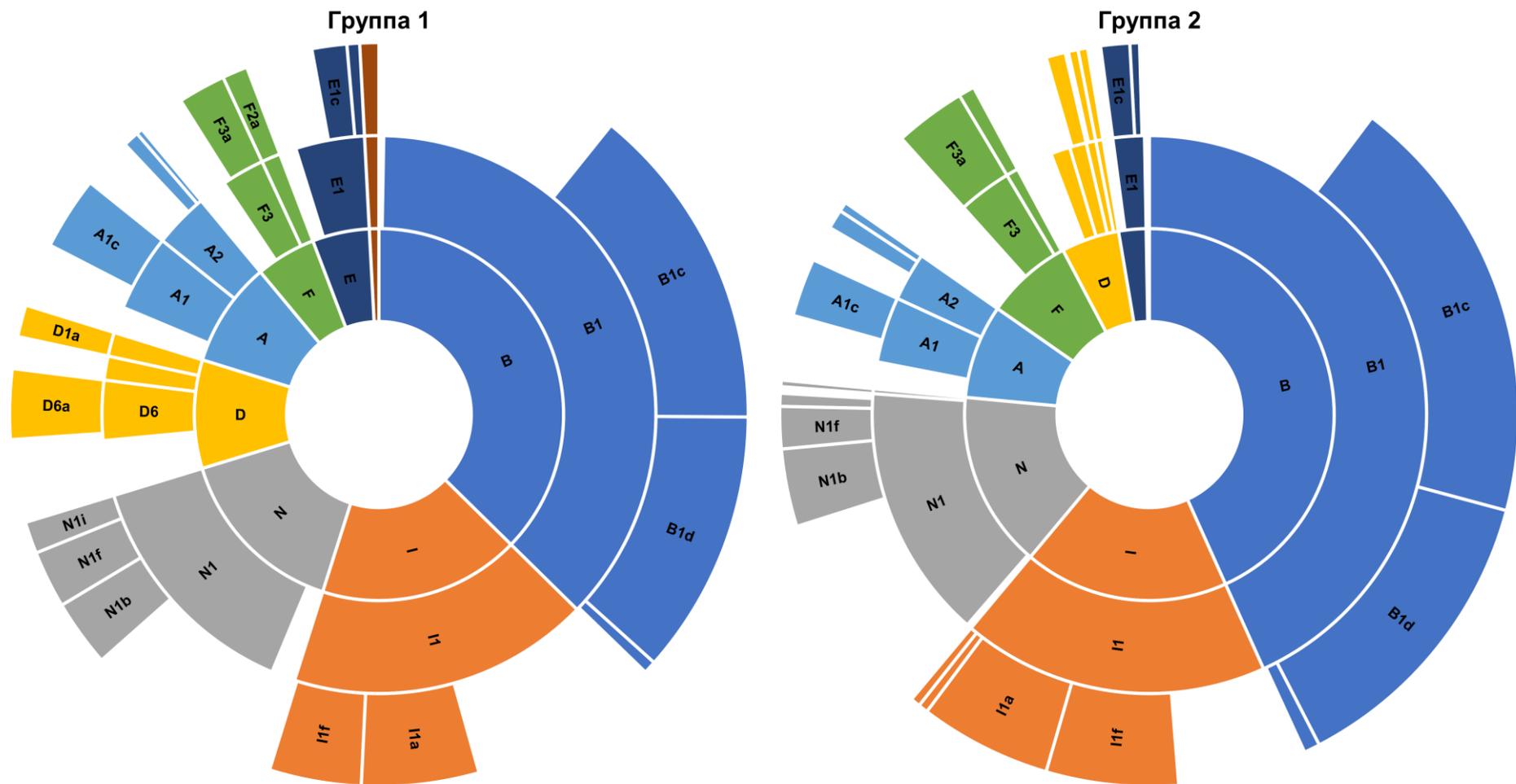


Рис. 6. Основные классы, порядки и семейства, формирующие микробиом крови у Группы 1 и Группы 2.

A – Bacilli (*Firmicutes*), A1 – Bacillales, A1c – Staphylococcaceae, A2 – Lactobacillales, B – Clostridia (*Firmicutes*), B1 – Clostridiales, B1c – Lachnospiraceae, B1d – Ruminococcaceae, D – Alphaproteobacteria, D1a – Caulobacteraceae, D6 – Sphingomonadales, D6a – Sphingomonadaceae, E – Betaproteobacteria, E1 – Burkholderiales, E1c – Comamonadaceae, F – Gammaproteobacteria, F2a – Enterobacteriaceae, F3 – Pseudomonadales, F3a – Moraxellaceae, I – Bacteroidia (*Bacteroidetes*), I1 – Bacteroidales, I1a – Bacteroidaceae, I1f – Prevotellaceae, N – Actinobacteria (*Actinobacteria*), N1 – Actinomycetales, N1b – Intrasporangiaceae, N1f – Micrococcaceae, N1i – Propionibacteriaceae.

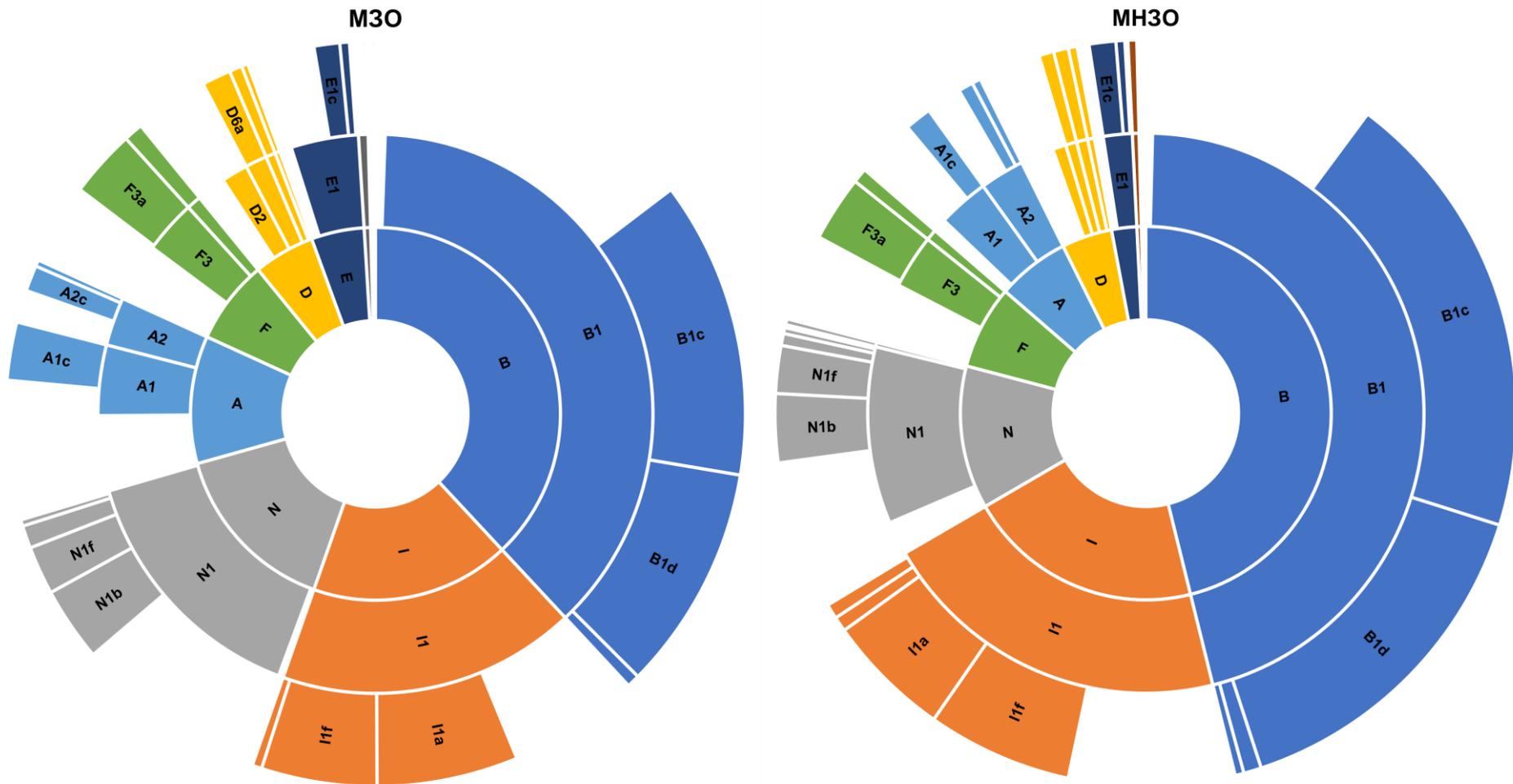


Рис. 6. Основные классы, порядки и семейства, формирующие микробиом крови у Группы 1 и Группы 2.

A – Bacilli (*Firmicutes*), A1 – Bacillales, A1c – Staphylococcaceae, A2 – Lactobacillales, A2c – Streptococcaceae, B – Clostridia (*Firmicutes*), B1 – Clostridiales, B1c – Lachnospiraceae, B1d – Ruminococcaceae, D – Alphaproteobacteria, D2 – Rhizobiales, D6a – Sphingomonadaceae, E – Betaproteobacteria, E1 – Burkholderiales, E1c – Comamonadaceae, F – Gammaproteobacteria, F3 – Pseudomonadales, F3a – Moraxellaceae, I – Bacteroidia (*Bacteroidetes*), I1 – Bacteroidales, I1a – Bacteroidaceae, I1f – Prevotellaceae, N – Actinobacteria (*Actinobacteria*), N1 – Actinomycetales, N1b – Intrasporangiaceae, N1f – Micrococcaceae.

### 3.2.1. Филум *Firmicutes*

ДНК филума *Firmicutes* выделялась из 100% образцов крови вне зависимости от наличия или отсутствия ожирения. Основными классами *Firmicutes*, участвовавшими в формировании микробиома крови были: *Clostridia*, *Bacilli* и *Erysipelotrichi*.

Класс *Clostridia* и его порядок *Clostridiales* представляли основные таксоны микробиома крови, на долю которых приходилось более четверти от всей массы бактериальной ДНК крови. На уровне семейств распространенными таксонами *Clostridiales* были: *Christensenellaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, [*Tissierellaceae*] и *Veillonellaceae*, из которых наибольшее значение имели *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae*.

ДНК класса *Bacilli* принадлежала к порядкам *Bacillales* и *Lactobacillales*, которые определялись в крови более 90% включенных в исследование лиц. Среди семейств *Bacillales* чаще всего выделялась ДНК *Staphylococcaceae*, тогда как *Bacillaceae* и *Planococcaceae* играли меньшую роль в формировании микробиома крови. Основными семействами *Lactobacillales* были *Lactobacillaceae* и *Streptococcaceae*, а также *Leuconostocaceae*

ДНК *Erysipelotrichi* выделялась из образцов крови реже чем *Clostridia* и *Bacilli*, однако практически у 60% обследуемых данный таксон участвовал в формировании микробиома крови. Вся выделенная ДНК *Erysipelotrichi* принадлежала к семейству *Erysipelotrichaceae* порядка *Erysipelotrichales*.

Несмотря на то, что ожирение не повлияло ни на частоту выявления филума *Firmicutes* из образцов, ни на его долю в общем пуле бактериальной ДНК крови, на низ лежащих таксономических уровнях был выявлен ряд различий. Для пациентов Группы 2 было характерно снижение доли ДНК класса *Bacilli* ( $p < 0,05$ ), но не других классов. Уменьшение доли *Bacilli* может объясняться тем, что для пациентов с ожирением было характерно снижению вклада ДНК *Staphylococcaceae* в формирование микробиома крови ( $p < 0,05$ ). При этом у этих пациентов практически в три раза чаще выделялась ДНК

*Leiconostocaceae* по сравнению с Группой 1. Также у пациентов Группы 2 было отмечено статистически значимое увеличение доли *Lachnospiraceae* в метагеноме крови ( $p < 0,05$ ).

МЗО сопровождалось увеличением частоты выделения *Leiconostocaceae* по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ). В подгруппе МНЗО также было выше число пациентов, в крови которых присутствовала ДНК *Leiconostocaceae* по сравнению со здоровыми донорами ( $p < 0,05$ ). Кроме того, МНЗО приводило к снижению доли семейства *Staphylococcaceae* порядка *Bacillales* класса *Bacilli* в общем пуле бактериальной ДНК крови ( $p < 0,05$ ). Уменьшение доли *Staphylococcaceae* не только отличало пациентов с МНЗО от здоровых доноров, но также и от пациентов с МЗО. При этом у пациентов с МНЗО наблюдалось статистически значимое повышение *Lachnospiraceae* по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ) и *Ruminococcaceae* по сравнению с лицами с МЗО ( $p < 0,05$ ), что привело и к повышению содержания вышестоящих таксонов – класса *Clostridia* и порядка *Clostridiales*.

### 3.2.2. Филум *Proteobacteria*

Бактериальная ДНК крови филума *Proteobacteria* принадлежала к классам: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* и *Epsilonproteobacteria*. Наиболее распространенными были классы *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*, их ДНК выделялась из более 96,5% образцов. ДНК *Deltaproteobacteria* в крови выявлена у 43,8% обследованных лиц, а *Epsilonproteobacteria* – только у 17,5%.

Наиболее значимым порядком *Alphaproteobacteria* для формирования микробиома крови был *Sphingomonadales* и его семейство *Sphingomonadaceae*. Также был распространен порядок *Rhizobiales* (78,3% обследованных) и *Caulobacterales* с его семейство *Caulobacteraceae* (67,3% обследованных). ДНК *Rhizobiales* в основном принадлежала к семействам *Bradyrhizobiaceae*, *Brucellaceae*, *Hyphomicrobiaceae* и *Methylobacteriaceae* каждое из которых выделялось из более 20% образцов крови. Менее значимую роль для

формирования микробиома крови играли порядки *Rhodobacterales* (семейство *Rhodobacteraceae*), *Rhodospirillales* и *Rickettsiales*.

Выделенная ДНК класса *Betaproteobacteria* в основном принадлежала к порядку *Burkholderiales* (семейства *Alcaligenaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae*) и в меньшей степени к порядку *Neisseriales* (семейство *Neisseriaceae*). ДНК *Comamonadaceae* была выделена из 82,0% образцов, а *Alcaligenaceae* из 62,7%. Присутствие остальных семейств в микробиоме крови было характерно для менее 50% обследованных лиц.

Класс *Gamma proteobacteria* представлял один из таксонов, ДНК которого выделялась из образцов крови всех обследованных лиц. Основными таксонами, принимавшими участие в формировании пула *Gamma proteobacteria* крови, были: порядок *Aeromonadales* (семейство *Succinivibrionaceae*), порядок *Enterobacteriales* (семейство *Enterobacteriaceae*), порядок *Pseudomonadales* (семейства *Moraxellaceae* и *Pseudomonadaceae*) и порядок *Xanthomonadales* (семейство *Xanthomonadaceae*). На долю семейств *Moraxellaceae* и *Enterobacteriaceae* приходилось более 70% от всей ДНК *Gamma proteobacteria*, тогда как остальные семейства играли минорную роль в формировании микробиома крови.

Основным таксоном *Deltaproteobacteria* был порядок *Desulfovibrionales* и его семейство *Desulfovibrionaceae*, тогда как вся выделенная ДНК *Epsilonproteobacteria* принадлежала к семейству *Helicobacteraceae* (порядок *Campylobacteriales*).

На уровне классов *Proteobacteria* в Группе 2 было выявлено статистически значимое снижение *Alphaproteobacteria* по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ). На уровне порядков и семейств также был выявлен ряд особенностей, характерных для пациентов с ожирением. У пациентов Группы 2 из образцов крови чаще выделялась ДНК *Nyctomicrobiaceae*, *Rhodobacterales* и его семейства *Rhodobacteraceae*, *Burkholderiaceae*, *Pseudomonadales* и *Xanthomonadales* ( $p < 0,05$ ), но реже – ДНК

*Bradyrhizobiaceae*. Также ожирение сопровождалось снижением доли ДНК семейств *Caulobacteraceae* (порядок *Caulobacterales*) и *Sphingomonadaceae* (порядок *Sphingomonadales*) ( $p < 0,05$ ), несмотря на схожую с Группой 1 частоту выявления ДНК данных семейств ( $p > 0,05$ ).

И для пациентов с МЗО, и для пациентов с МНЗО было характерно более высокая частота выявления ДНК *Rhodobacteraceae* и *Burkholderiaceae* из образцов по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ), однако остальные выявленные изменения микробиома крови определялись метаболическим типом ожирения. При МЗО, но не МНЗО, также чаще выделялась ДНК семейства *Huyphomicrobiaceae* из крови ( $p < 0,05$ ). МНЗО привело существенным изменениям *Proteobacteria* уже на уровне классов. У таких пациентов содержание ДНК *Alphaproteobacteria* было статистически значимо ниже, как Группы 1, так и пациентов с МЗО ( $p < 0,05$ ). Меньшая доля *Alphaproteobacteria* в общем пуле бактериальной ДНК крови при МНЗО, по-видимому, связана со снижением вклада семейств *Caulobacteraceae*, *Sphingomonadaceae* и *Bradyrhizobiaceae* в формирование микробиома крови. Снижение доли последнего у пациентов с МНЗО, очевидно, является следствием практически в два раза более низкой частоты выделения *Bradyrhizobiaceae* из образцов крови. Кроме того, для МНЗО была характерна большая частота выделения *Epsilonproteobacteria* и его таксонов (*Campylobacterales*, *Helicobacteraceae*) из образцов ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3. Филум *Bacteroidetes*

Более 88% от выделенной бактериальной ДНК филума *Bacteroidetes* принадлежала классу *Bacteroidia* и его порядку *Bacteroidales*, которые выделялись практически из каждого образца. Другие классы *Bacteroidetes*: *Flavobacteriia*, [*Saprospirae*], *Sphingobacteriia* и *Cytophagia* выделялись реже и играли не столь значимую роль в формировании микробиома крови. Порядок *Bacteroidales* был представлен семействами *Bacteroidaceae*, [*Barnesiellaceae*], [*Odoribacteraceae*], [*Paraprevotellaceae*], *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*,

*Rikenellaceae* и *S24-7*. Из них чаще всего (более 88% образцов) выделялись семейства *Bacteroidaceae* и *Prevotellaceae*.

ДНК класса *Flavobacteriia* и его порядка *Flavobacteriales* была выделена из крови более половины всех обследованных лиц и принадлежала к семействам *Flavobacteriaceae* или [*Weeksellaceae*]. В более трети образцов крови обнаруживалась ДНК порядков *Sphingobacteriales* (класс *Sphingobacteriia*) и [*Saprospirales*] (класс [*Saprospirae*]). Последний был преимущественно представлен семейством *Chitinophagaceae*. Реже всего выделялось ДНК *Cytophagaceae* (порядок *Cytophagales*, класса *Cytophagia*) – только у 16,6% обследованных лиц.

У Группы 2 не наблюдалось статистически значимых изменений на уровнях классов и порядков *Proteobacteria*, однако ожирение привело к смещению баланса в содержании семейств порядка *Bacteroidales*. Доля ДНК *Prevotellaceae* в метагеноме крови у пациентов Группы 2 была практически в полтора раза больше, чем у здоровых доноров Группы 1 ( $p < 0,05$ ), тогда как снизилось содержание ДНК [*Barnesiellaceae*] ( $p < 0,05$ ). Кроме того, у таких пациентов почти в два раза чаще из образцов выделялось ДНК семейства *S24-7*.

При МЗО у пациентов в крови чаще выделялось ДНК *Bacteroidaceae* по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ) и *Flavobacteriaceae* по сравнению с Группой 1 и пациентами с МНЗО ( $p < 0,05$ ). Также МЗО было ассоциировано с практически четырехкратным снижением частоты выявления [*Barnesiellaceae*] из образцов по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ) и трехкратным – по сравнению с подгруппой МНЗО ( $p < 0,05$ ). МНЗО привело к более чем двукратному увеличению частоты выделения *S24-7* в образцах, а также доли, приходящейся на семейство *Prevotellaceae* по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ).

#### 3.2.4. Филум *Actinobacteria*

Более 90% ДНК *Actinobacteria*, четвертого основного филума микробиома крови, принадлежало к классу *Actinobacteria*, который

определялся в крови 98,6% лиц, включенных в исследование. Классы *Thermoleophilia* и *Coriobacteriia* были характерны для 38,7% и 43,8% полученных образцов крови, а класс *Acidimicrobiia* обнаруживался менее чем у четверти всех обследованных лиц. Большая часть ДНК класса *Actinobacteria* принадлежала к порядку *Actinomycetales* и его многочисленным семействам: *Actinomycetaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Nocardiaceae*, *Nocardioideaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Streptomycetaceae* и *Williamsiaceae*, наиболее значимыми из которых были *Corynebacteriaceae*, *Micrococcaceae* и *Propionibacteriaceae*. Кроме того, больше, чем у половины лиц, включенных в исследование, в крови обнаруживалось ДНК семейства *Bifidobacteriaceae* (порядок *Bifidobacteriales*, класс *Actinobacteria*).

Вся выделенная ДНК класса *Coriobacteriia* принадлежала к семейству *Coriobacteriaceae* порядка *Coriobacteriales*, а класса *Acidimicrobiia* – к порядку *Acidimicrobiales*. Пул микробной ДНК крови *Thermoleophilia* формировали два порядка: *Solirubrobacterales* и *Gaiellales* (преимущественно семейство *Gaiellaceae*).

У Группы 2 в образцах крови чаще обнаруживалась ДНК порядка *Acidimicrobiales* и семейств *Nocardiaceae*, *Nocardioideaceae*, *Streptomycetaceae* и *Gaiellaceae* по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ).

ДНК *Streptomycetaceae* чаще определялась в образцах крови у пациентов с ожирением, вне зависимости от его метаболического по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ). У пациентов с МЗО также наблюдалось увеличение частоты выявления *Nocardioideaceae*, *Acidimicrobiales*, *Gaiellaceae* и *Solirubrobacterales* ( $p < 0,05$ ). Особенностью МНЗО был больший процент *Nocardiaceae*-позитивных пациентов по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.5. Минорные филумы

Как отмечено выше, менее значимые филумы микробиома крови были представлены *Cyanobacteria*, *TM7*, [*Thermi*], *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Tenericutes*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* и неидентифицированными филумами (Unassigned). Среди особенностей пациентов с ожирением следует отметить, что них было характерно увеличение частоты выделения класса *TM7-3* (филум *TM7*) и филума *Acidobacteria* по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ). При этом, в Группе 2 у пациентов в полтора раза реже из образцов крови выделялась ДНК семейства *Thermaceae* (порядок *Thermales*, класс *Deinococci*, филум [*Thermi*]) по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ).

Увеличение частоты выделения *TM7-3* (филум *TM7*), отмеченное для общей группы пациентов с ожирением, было характерно как для МЗО, так и МНЗО. При этом повышение количества *Acidobacteria*-позитивных образцов крови и снижение количества *Thermaceae*-позитивных образцов наблюдалось только в группе пациентов с МНЗО ( $p < 0,05$ ), но не с МЗО. У пациентов с МЗО в крови реже обнаруживалось ДНК *Verrucomicrobiaceae* (порядок *Verrucomicrobiales*, класс *Verrucomicrobiae*, филум *Verrucomicrobia*), как по сравнению с Группой 1, так и по сравнению с пациентами с МНЗО ( $p < 0,05$ ). У пациентов с МНЗО, напротив, ДНК филума *Verrucomicrobia* выделялась чаще, чем в Группе 1 ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Особенности формирования микробиома крови

Формирование микробиома крови является результатом транслокации микробной ДНК из различных источников. Позитивная взаимосвязь между долями различных таксонов может указывать на их совместную транслокацию из одних и тех же источников. Был проведен корреляционный анализ по методу Спирмена среди идентифицированных семейств, ДНК которых определялось в крови более 50% обследованных лиц и на долю которых приходилось более 0,005 (т.е. более 0,5% от микробиома крови). Эти условия

были сформулированы исходя из соображений, что, во-первых, если ДНК таксона было выделено более чем из 50% образцов крови, значит его транслокация в кровь является «привычной» из одного или нескольких локусов транслокации. Во-вторых, если на долю таксона приходится более 0,005 это может указывать, что locus / locus транслокации являются значимыми для формирования микробиома крови. Таким условиям соответствовали семейства: *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Micrococcaceae*, *Moraxellaceae*, *Comamonadaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Caulobacteraceae*, *Alcaligenaceae*, *Lactobacillaceae*, *Veillonellaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Clostridiaceae*, *Microbacteriaceae*, [*Paraprevotellaceae*] и *Bifidobacteriaceae*. Следует отметить, что суммарно на долю этих семейств приходилось более  $\frac{2}{3}$  микробиома крови: 0,676 [0,594 – 0,743] в Группе 1, 0,676 [0,597 – 0,752] в Группе 2, 0,669 [0,574 – 0,786] у пациентов с МЗО и 0,704 [0,626 – 0,744] у пациентов с МНЗО ( $p > 0,05$ ). В контексте установления совместной транслокации семейств интерес представляли положительные коэффициенты корреляции. Отрицательные коэффициенты корреляции в данном случае не являются показательными, так как увеличение доли в микробиоме одного из таксонов «математически» приводит к снижению доли остальных таксонов. В каждой из исследуемых групп был получен ряд положительных коэффициентов корреляции, которые формировали сеть взаимосвязей, уникальную для здоровых доноров (рис. 8), пациентов с ожирением (рис. 9), пациентов с МЗО (рис. 10) и пациентов с МНЗО (рис. 11).

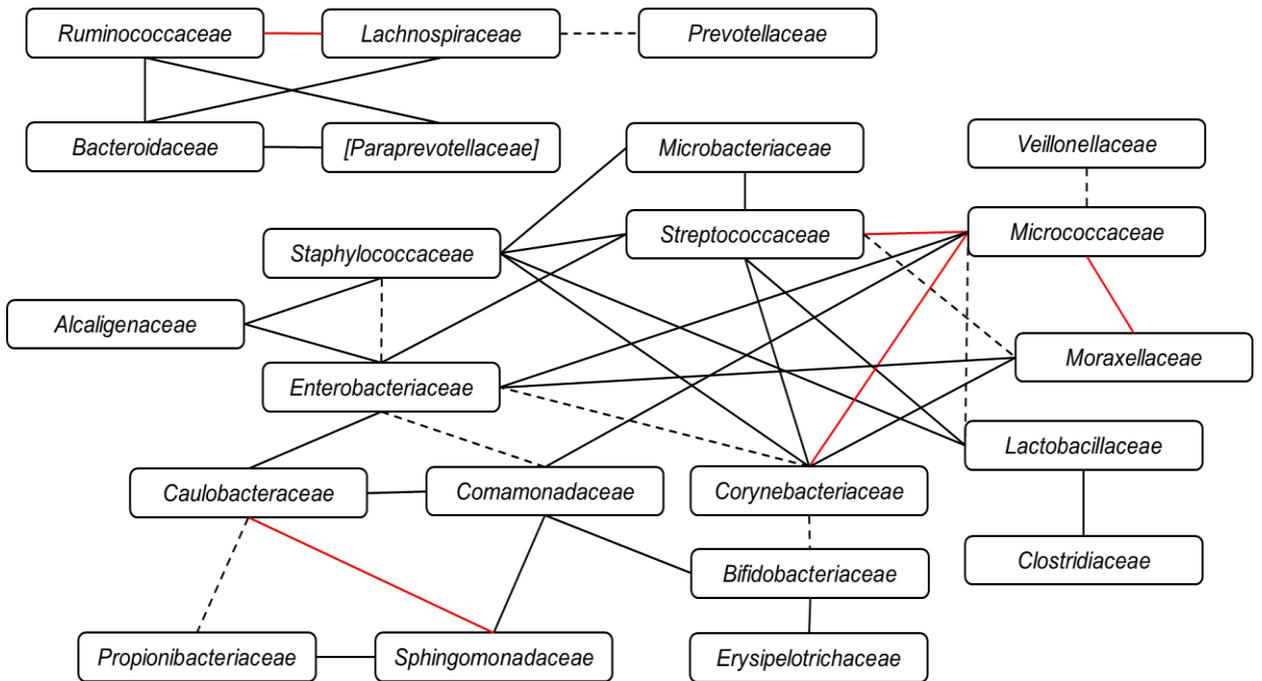


Рис. 8. Позитивные корреляции между долями семейств, характерные для Группы 1. Здесь и далее: красные линии –  $\rho \geq 0,5$  при  $p \leq 0,05$ ; черные линии –  $0,3 \leq \rho < 0,5$  при  $p \leq 0,05$ ; пунктирные линии  $\rho \geq 0,3$  при  $p \leq 0,1$  или  $0,25 \leq \rho < 0,3$  при  $p \leq 0,05$ .

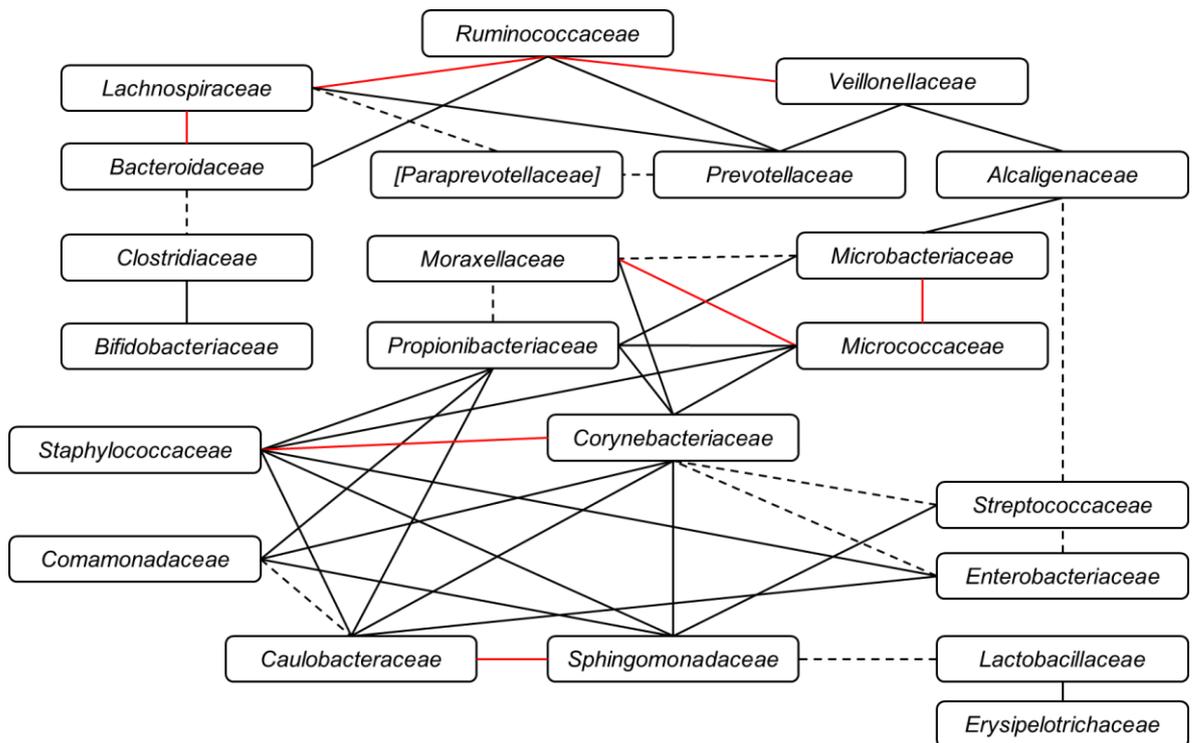


Рис. 9. Позитивные корреляции между долями семейств, характерные для Группы 2.

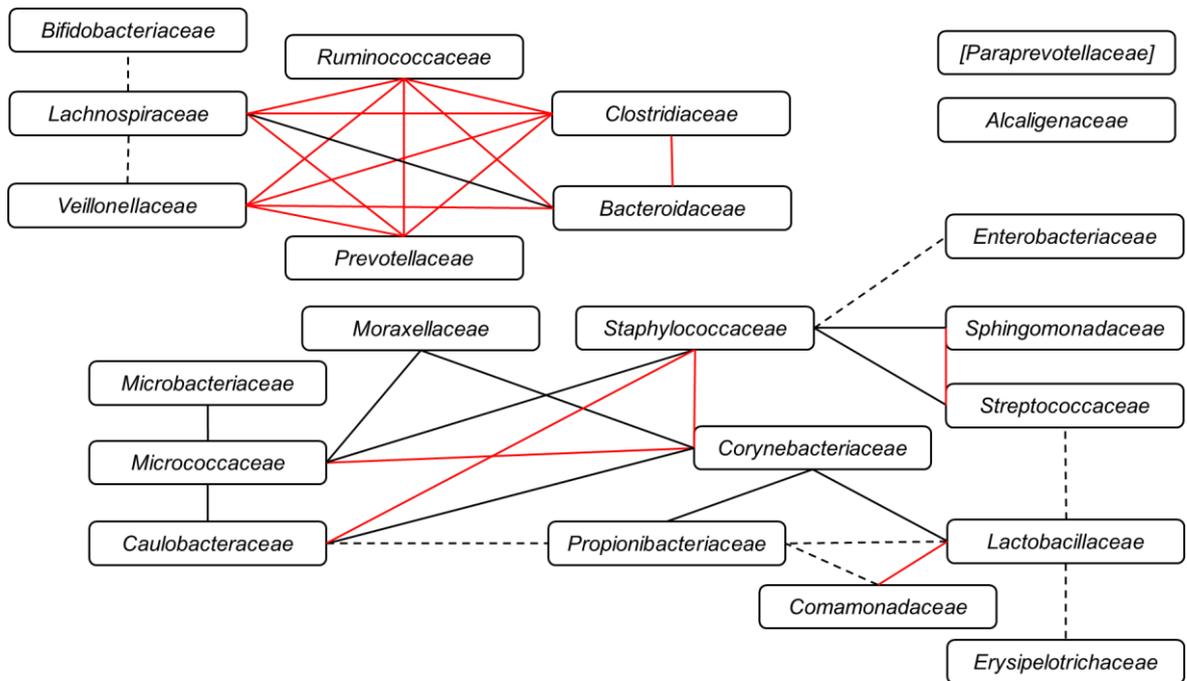


Рис. 10. Позитивные корреляции между долями семейств, характерные для пациентов с МЗО.

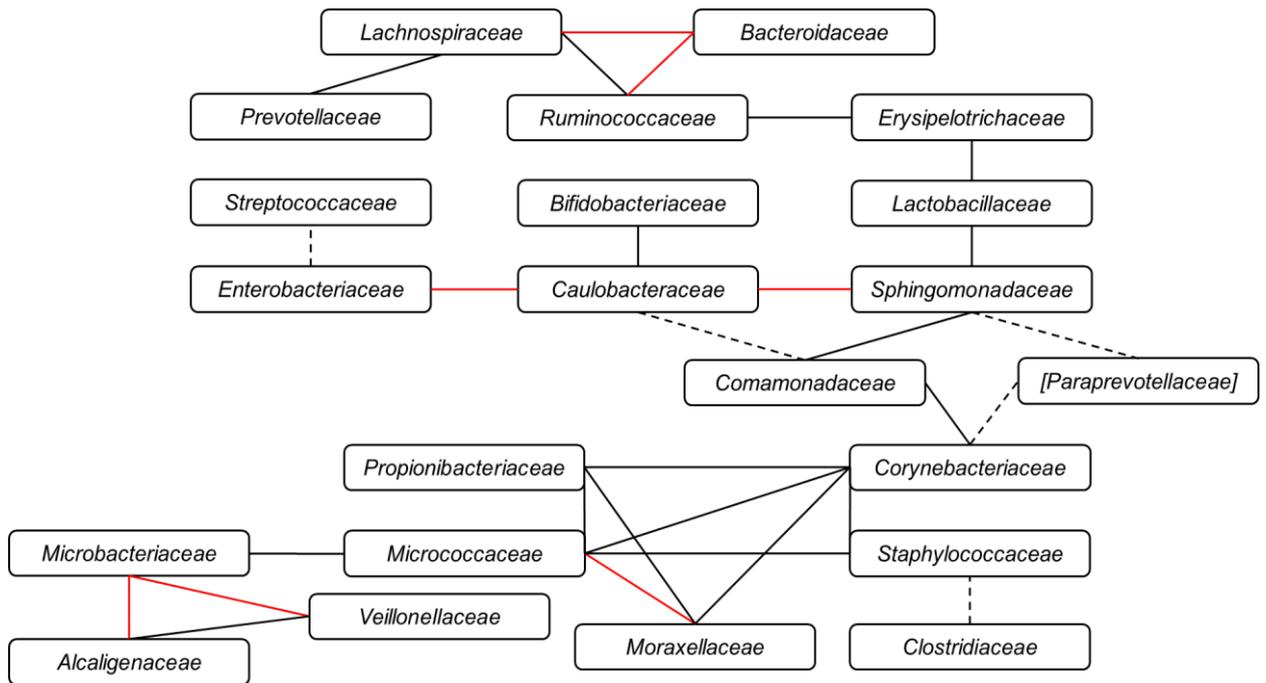


Рис. 11. Позитивные корреляции между долями семейств, характерные для пациентов с МНЗО.

Обращает внимание, что для Группы 1 и пациентов с МЗО были характерны сети взаимодействий с формированием «ядер», где взаимные корреляции наблюдались между тремя и более семействами, предполагающими общий локус / локусы транслокации. У пациентов с МНЗО напротив преобладали парные взаимодействия, тогда как «ядер» было меньше

и с меньшим числом вовлеченных таксонов. Сравнительный анализ подтвердил, что для семейств у пациентов с МНЗО характерно меньше корреляционных связей, чем для Группы 1 ( $p < 0,05$ ), тогда как у пациентов с МЗО не отличался от контрольной группы ( $p > 0,05$ ).

Следующим шагом стала попытка установления транслокация каких таксонов (на уровне семейств) в кровь взаимосвязана разнообразием микробиома крови, для чего также проведен корреляционный анализ по методу Спирмена. Для многих семейств были выявлены отрицательные коэффициенты корреляции, что объясняется тем фактом, что увеличение доли одного из таксонов в микробиоме крови неизбежно приводит к снижению доли других и, как следствие, к «обеднению» микробиома крови. В связи с этим интерес представляли таксоны, для которых были характерны позитивные коэффициенты корреляции с характеристиками альфа-разнообразия микробиома крови в каждой из исследуемых групп (табл. 7). Во всех исследуемых группах все характеристики альфа-разнообразия микробиома крови позитивно коррелировали с семействами *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae*. Также в подавляющем большинстве позитивно с разнообразием микробиома крови были ассоциированы *Prevotellaceae* и *Bacteroidaceae*. Для пациентов с МНЗО, но не для здоровых доноров и пациентов с МЗО, отмечена положительная взаимосвязь «разнообразие микробиома крови – доля S24-7».

Поиск взаимосвязей между долями одноименных таксонов в микробиомах кала и крови не выявил корреляций ни в одной из исследуемых групп.

Табл. 7. Выявленные позитивные корреляции между показателями альфа-разнообразия микробиома крови и долями, приходящейся на семейства этого микробиома.

Таксон	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
Индекс Simpson				
<i>Ruminococcaceae</i>	rho=0,635, n=112 , p<0,0001	rho=0,467, n=97, p<0,0001*	rho=0,488, n=36, p<0,005	rho=0,501, n=52, p<0,0005
<i>Lachnospiraceae</i>	rho=0,572, n=113, p<0,0001	rho=0,477, n=99, p<0,0001	rho=0,360, n=35, p<0,05	rho=0,476, n=52, p<0,0005
<i>Desulfovibrionaceae</i>	rho=0,483, n=36, p<0,005			
<i>Rikenellaceae</i>	rho=0,413, n=59, p<0,005			
[ <i>Paraprevotellaceae</i> ]	rho=0,368, n=56, p<0,01			
<i>Prevotellaceae</i>		rho=0,476, n=94, p<0,0001	rho=0,393, n=34, p<0,05	rho=0,572, n=50, p<0,0001
<i>Erysipelotrichaceae</i>		rho=0,322, n=58, p<0,005		
S24-7		rho=0,220, n=93, p<0,05		rho=0,427, n=37, p<0,01
Индекс Shannon				
<i>Ruminococcaceae</i>	rho=0,676, n=112, p<0,0001	rho=0,470, n=97, p<0,0001**	rho=0,433, n=36, p<0,01*	rho=0,581, n=52, p<0,0001
<i>Lachnospiraceae</i>	rho=0,618, n=113, p<0,0001	rho=0,469, n=99, p<0,0001	rho=0,355, n=35, p<0,05*	rho=0,479, n=52, p<0,0005
<i>Bacteroidaceae</i>	rho=0,336, n=99, p<0,001	rho=0,264, n=93, p<0,05		rho=0,320, n=50, p<0,05
<i>Prevotellaceae</i>	rho=0,275, n=100, p<0,01	rho=0,471, n=94, p<0,0001	rho=0,326, n=34, p=0,06	rho=0,616, n=50, p<0,0001**†
S24-7				rho=0,429, n=37, p<0,01
Индекс Chao1				
<i>Ruminococcaceae</i>	rho=0,569, n=112, p<0,0001	rho=0,462, n=97, p<0,0001	rho=0,299, n=36, p=0,08*	rho=0,587, n=52, p<0,0001

Таксон	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
<i>Lachnospiraceae</i>	rho=0,553, n=113, p<0,0001	rho=0,466, n=99, p<0,0001	rho=0,366, n=35, p<0,05	rho=0,488, n=52, p<0,001
<i>Bacteroidaceae</i>	rho=0,305, n=99, p<0,005	rho=0,208, n=93, p<0,05		rho=0,298, n=50, p<0,05*
<i>Prevotellaceae</i>	rho=0,272, n=100, p<0,01	rho=0,333, n=94, p=0,001		rho=0,496, n=50, p<0,0005
<i>S24-7</i>				rho=0,391, n=37, p<0,05
PD				
<i>Ruminococcaceae</i>	rho=0,546, n=112, p<0,0001	rho=0,469, n=97, p<0,0001		rho=0,592, n=52, p<0,0001
<i>Lachnospiraceae</i>	rho=0,551, n=113, p<0,0001	rho=0,459, n=99, p<0,0001	rho=0,288, n=35, p<0,1	rho=0,441, n=52, p=0,001
<i>Prevotellaceae</i>	rho=0,318, n=100, p=0,001	rho=0,424, n=94, p<0,0001		rho=0,566, n=50, p<0,0001*
<i>S24-7</i>				rho=0,338, n=37, p<0,05
OTUs				
<i>Ruminococcaceae</i>	rho=0,573, n=112, p<0,0001	rho=0,413, n=97, p<0,0001		rho=0,559, n=52, p<0,0001
<i>Lachnospiraceae</i>	rho=0,565, n=113, p<0,0001	rho=0,436, n=99, p<0,0001		rho=0,480, n=52, p<0,0005
<i>Bacteroidaceae</i>	rho=0,305, n=99, p<0,005	rho=0,236, n=93, p<0,05		rho=0,314, n=50, p<0,05
<i>Prevotellaceae</i>	rho=0,278, n=100, p=0,005	rho=0,375, n=97, p<0,0005		rho=0,549, n=50, p<0,001*
<i>S24-7</i>				rho=0,388, n=37, p<0,05

В таблицу внесены позитивные корреляции для таксонов, выделенных более чем у 25% обследованных хотя бы одной из групп, если коэффициент корреляции  $\rho \geq 0,3$  (умеренная сила связи в соответствие со шкалой Чэддока), при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . Также внесены позитивные корреляции с  $0,2 \leq \rho < 0,3$  или при  $p \leq 0,1$  для таксонов, которые продемонстрировали умеренную или заметную силу связи в одной из исследуемых групп. \* – различия коэффициентов корреляции достоверны по сравнению с Группой 1,  $0,05 < p < 0,1$ ; \*\* – различия коэффициентов корреляции достоверны по сравнению с Группой 1,  $p \leq 0,05$ ; † – различия коэффициентов корреляции достоверны по сравнению с подгруппой пациентов с МЗО,  $0,05 < p < 0,1$ .

С целью оценить, обладают ли выявленные таксоны (X) предиктивной силой в отношении разнообразия микробиома крови (Y) был использован метод множественного регрессионного анализа. Был получен ряд уравнений регрессии, описывающих как влияет транслокация отдельных семейств (т.е. их доли в метагеноме крови), на разнообразие микробиома крови (табл. 8). Полученные уравнения множественной регрессии включали такие семейства как *Ruminococcaceae* (R), *Lachnospiraceae* (L), *Prevotellaceae* (P) и *Bacteroidaceae* (B). Таким образом, вне зависимости от наличия или отсутствия ожирения проницаемость внешних барьеров для таких семейств как *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae* и, в меньшей степени, для *Bacteroidaceae* определяет разнообразие микробиома крови.

Табл. 8. Уравнения множественной регрессии, описывающие влияния *Ruminococcaceae* (R), *Lachnospiraceae* (L), *Prevotellaceae* (P) и *Bacteroidaceae* (B) на характеристики альфа-разнообразия микробиома крови.

	Y	Уравнение множественной регрессии	n	r <sup>2</sup>	r	r <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
Группа 1	Simpson	Y=0,946+0,152R+0,057L	110	0,3201	0,566	0,3074
	Shannon	Y=4,989+2,828L+7,209R	110	0,4753	0,689	0,4654
	Chao1	Y=59,262+602,632R+450,527B+1483,949P	85	0,4901	0,700	0,4713
	PD	Y=7,506+41,324R+52,881P	97	0,4492	0,670	0,4375
	OTUs	Y=57,204+474,642R+317,552B+785,008P	85	0,4310	0,657	0,4099
Группа 2	Simpson	Y=0,956+0,107R+0,076P	92	0,1842	0,429	0,1659
	Shannon	Y=5,581+3,278R+4,831P	92	0,3145	0,561	0,2991
	Chao1	Y=103,325+651,869R+1331,062P	92	0,4083	0,639	0,3949
	PD	Y=11,003+18,567R+41,353P	92	0,3442	0,587	0,3295
	OTUs	Y=99,497+308,052R+647,985P	92	0,3259	0,571	0,3108
МЗО	Simpson	Y=0,954+0,152R	36	0,1719	0,415	0,1549
	Shannon	Y=5,787+1854P	34	0,1881	0,434	0,1628
	Chao1	Y=134,449+1669,892P	34	0,4067	0,638	0,3881
	PD	Y=11,708+49,318P	34	0,3119	0,559	0,2904
	OTUs	Y=117,999+743,277P	34	0,2913	0,540	0,2692
МНЗО	Simpson	Y=0,937+0,134R+0,090P+0,088L	49	0,3482	0,590	0,3047
	Shannon	Y=4,818+5,839R+6,061P+2,474L	49	0,6085	0,780	0,5824
	Chao1	Y=23,647+1266,572R+1481,343P	49	0,5170	0,719	0,4960
	PD	Y=7,778+46,060R+46,033P	49	0,5553	0,745	0,5360
	OTUs	Y=42,604+744,214R+759,826P	49	0,5242	0,724	0,4826

Учитывая, что отмеченные выше семейства – облигатные анаэробы и основные обитатели кишечной флоры, полученные данные указывают, что транслокация бактериальной ДНК из кишечника является фактором,

определяющим разнообразие микробиома крови. Следующим шагом стала оценка влияния кишечного микробиома (микробиома кала) на формирование микробиома крови в исследуемых группах. Для выявления предиктивной значимости характеристик альфа-разнообразия микробиоты кала (X) в отношении характеристик альфа-разнообразия микробиома крови (Y) был использован метод линейного регрессионного анализа (табл. 9).

Табл. 9. Регрессионная зависимость показателей характеристик альфа-разнообразия микробиома крови от разнообразия микробиома кала.

Группа	Y (МБ крови)	X (МБ кала)	Уравнение регрессии Y=f(X)	n	r <sup>2</sup>	r	p
Группа 1	Shannon	PD	Y=6,880-0,0217X	112	0,039	0,19	<0,05
	Shannon	Shannon	Y=7,305-0,176X	112	0,028	0,17	<0,1
	Simpson	Shannon	Y=1,004-0,00502X	112	0,028	0,17	<0,1
	PD	PD	Y=20,876-0,168X	112	0,045	0,21	<0,05
	OTUs	PD	Y=250,796-2,314X	112	0,038	0,20	<0,05
Группа 2	Shannon	PD	Y=5,179+0,0238X	100	0,039	0,20	<0,05
	Simpson	Simpson	Y=0,626+0,353X	100	0,106	0,32	0,001
	Simpson	Shannon	Y=0,923+0,00582X	100	0,040	0,20	<0,05
	Simpson	PD	Y=0,923+0,00114X	100	0,084	0,29	<0,005
МЗО	Simpson	Shannon	Y=1,019-0,00649X	36	0,090	0,30	<0,1
	Simpson	Chao1	Y=0,984-0,00000388X	36	0,080	0,28	<0,1
	Simpson	OTUs	Y=0,988-0,00000918X	36	0,085	0,29	<0,1
МНЗО	Shannon	PD	Y=4,685+0,0410X	53	0,126	0,36	<0,01
	Shannon	Shannon	Y=3,578+0,354X	53	0,131	0,36	<0,01
	Shannon	Simpson	Y=-3,163+9,727X	53	0,066	0,26	<0,1
	Shannon	Chao1	Y=5,493+0,000201X	53	0,108	0,33	<0,05
	Shannon	OTUs	Y=5,447+0,000422X	53	0,088	0,30	<0,05
	Simpson	PD	Y=0,923+0,00127X	53	0,156	0,40	<0,005
	Simpson	Shannon	Y=0,877+0,0125X	53	0,210	0,46	0,0005
	Simpson	Simpson	Y=0,647+0,335X	53	0,100	0,32	<0,05
	Simpson	Chao1	Y=0,947+0,00000638X	53	0,140	0,37	<0,01
	Simpson	OTUs	Y=0,943+0,0000147X	53	0,137	0,37	<0,01
	Chao1	Shannon	Y=-103,649+49,477X	53	0,060	0,24	<0,1
	Chao1	Chao1	Y=150,642+0,0316X	53	0,062	0,25	<0,1
	OTUs	Shannon	Y=-19,364+26,107X	53	0,055	0,23	<0,1
	OTUs	Chao1	Y=114,182+0,0168X	53	0,058	0,24	<0,1

МБ крови – микробиом крови, МБ кала – микробиом кала

Полученные регрессионные зависимости показали, что влияние разнообразия микробиоты кишечника на разнообразие микробиома крови различно у Группы 1 и Группы 2. У здоровых доноров Группы 1 показатели альфа-разнообразия микробиома кала обладали негативной предиктивной

силой в отношении характеристик разнообразия микробиома крови (отрицательный угловой коэффициент X), т.е. увеличение разнообразия микробного сообщества кишечника опосредует меньшее разнообразие микробиома крови. У пациентов Группы 2, напротив, характеристики разнообразия микробиома кала, такие как индексы Shannon, Simpson и PD, продемонстрировали позитивное влияние на разнообразие микробиома крови. Анализ наклона графиков регрессии, отражающих связь одноименных показателей разнообразия микробиома кала и крови у Группы 1 и Группы 2 показал достоверные различия между наклонами прямых регрессии ( $p < 0,005$ ) (рис. 12).

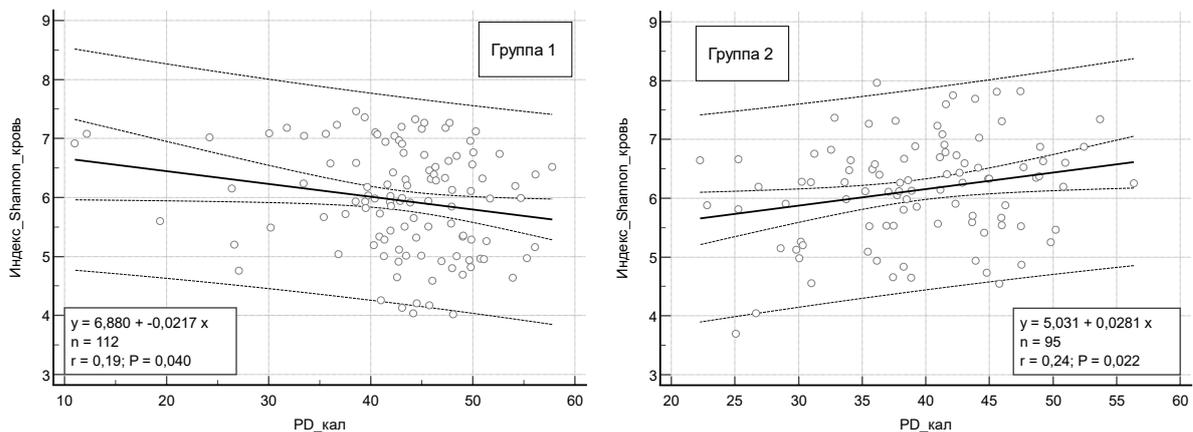


Рис. 12. Регрессионные зависимости индекса Shannon микробиома крови от PD микробиома кала в Группе 1 и Группе 2. Здесь и далее: сплошная линия – линия регрессии; «внутренние» пунктирные линии – 95% доверительный интервал для линии регрессии; «внешние» пунктирные линии – 95% интервал предсказания для линии регрессии.

У пациентов с МЗО, так же, как и в Группе 1, угловые коэффициенты уравнений регрессии были отрицательные, а анализ графиков регрессии не выявил отличий их наклонах ( $p > 0,05$ ) (рис. 13).

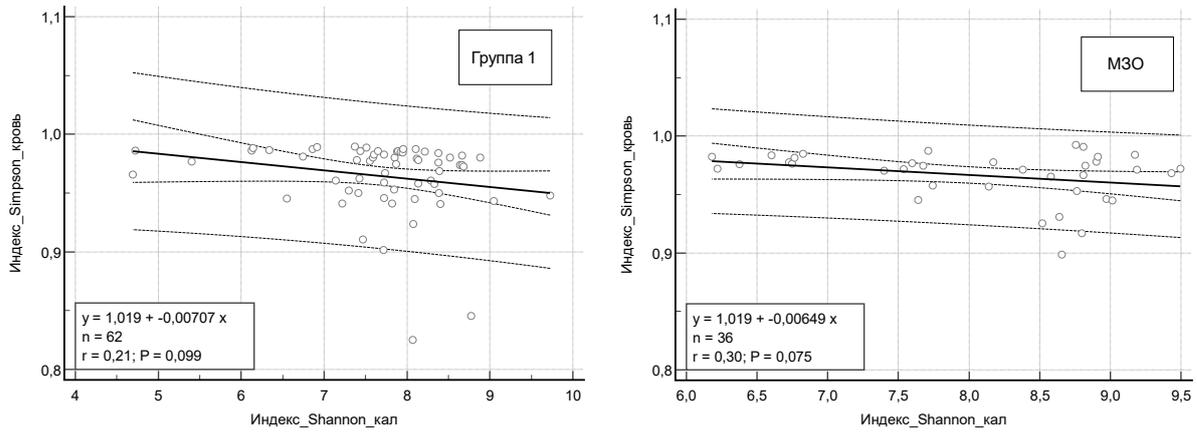


Рис. 13. Регрессионные зависимости индекса Simpson микробиома крови от индекса Shannon микробиома кала у Группы 1 и пациентов с МЗО.

Напротив, у пациентов с МНЗО характеристики разнообразия микробиома кала продемонстрировали негативную регрессионную зависимость от параметров альфа-разнообразия микробиома крови. Большое разнообразие кишечного микробиома у таких пациентов ассоциировано с увеличением разнообразия микробиома крови. Подобная зависимость отличает пациентов с МНЗО как от здоровых доноров ( $p=0,001$ ) (рис. 14), так и от пациентов с МЗО ( $p<0,0005$ ) (рис. 15).

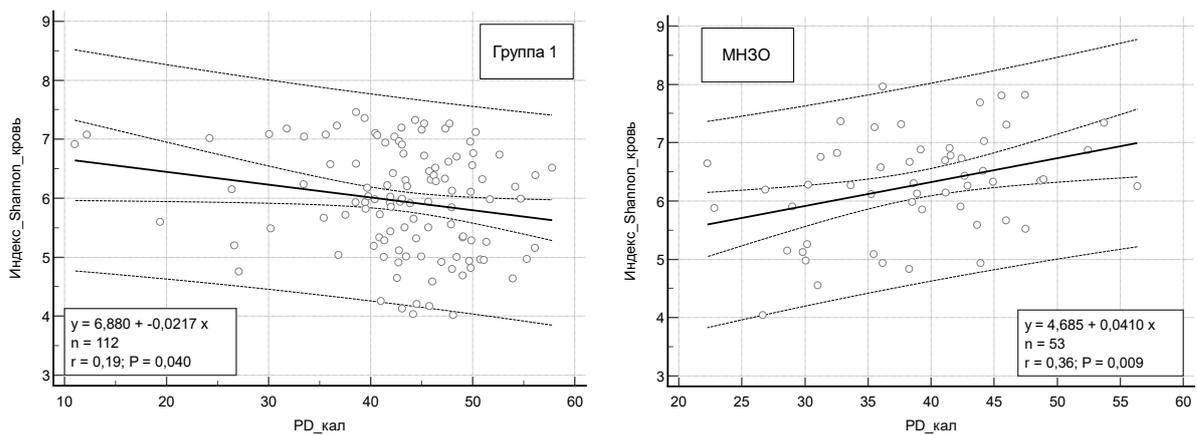


Рис. 14. Регрессионные зависимости индекса Shannon микробиома крови от PD микробиома кала у Группы 1 и пациентов с МНЗО.

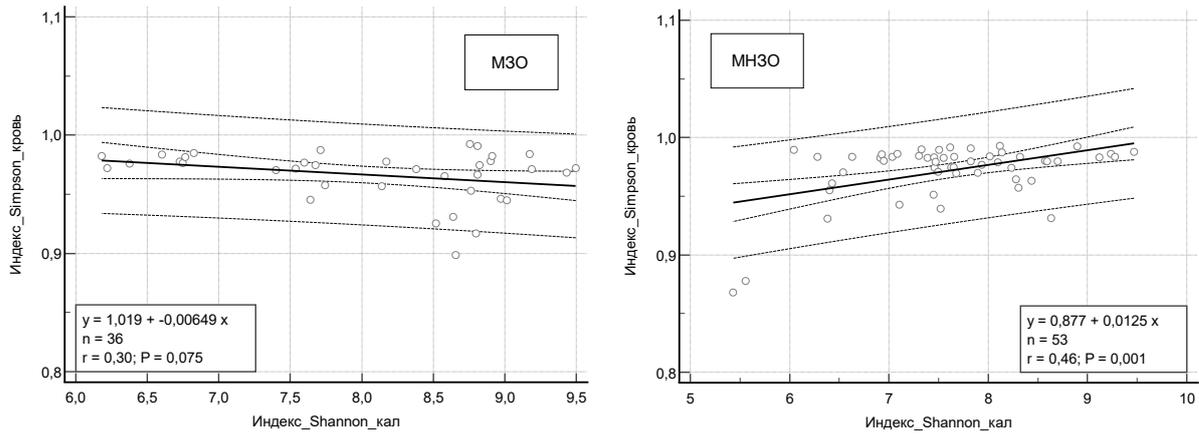


Рис. 15. Регрессионные зависимости индекса Simpson микробиома крови от индекса Shannon микробиома кала у пациентов с МЗО и пациентов с МНЗО.

Также был проведен корреляционный для выявления возможной взаимосвязи между долями отдельных семейств в метагеноме кала и характеристиками альфа-разнообразия микробиома крови (табл. 10). Обращает внимание, что у пациентов с МНЗО было выделено больше взаимосвязей «семейства микробиома кала – разнообразие микробиома крови», чем у Группы 1. Тогда как при МЗО, напротив, только для трех семейств была отмечена корреляция с индексами Simpson и Shannon, и ни одной – с индексом Chao1, PD и OTUs. Основными семействами микробиома кала были *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae* и *Prevotellaceae*. Суммарно на их долю приходилось более 2/3 от метагенома кала ( $0,68 \pm 0,15$  у всех обследованных лиц). Интересно, что в Группе 1, Группе 2 и у пациентов с МЗО не было обнаружено связи между разнообразием микробиома крови и долями этих семейств, тогда как при МНЗО наблюдалась корреляция с *Ruminococcaceae*, причем эта связь носила положительный характер.

Табл. 10. Выявленные корреляционные взаимосвязи между долями, приходящимися на отдельные семейства микробиома кала, и характеристиками альфа-разнообразия микробиома крови.

Группа	Параметр $\alpha$ -разнообразия микробиома крови	Семейство микробиома кала
Группа 1	Индекс Simpson	<i>Eubacteriaceae</i> rho=0,368, n=33, p<0,05 <i>Synergistaceae</i> rho=-0,491, n=25, p<0,05
	Индекс Shannon	<i>Eubacteriaceae</i> rho=0,430, n=33, p<0,05 <i>Synergistaceae</i> rho=-0,473, n=25, p<0,05

	Индекс Chao1	<i>Eubacteriaceae</i> rho=0,353, n=33, p<0,05 <i>Synergistaceae</i> rho=-0,360, n=25, p<0,1
	PD	<i>Eubacteriaceae</i> rho=0,388, n=33, p<0,05 <i>Synergistaceae</i> rho=-0,359, n=25, p<0,1
	OTUs	<i>Eubacteriaceae</i> rho=0,342, n=33, p=0,05 <i>Synergistaceae</i> rho=-0,420, n=25, p<0,05
Группа 2	Индекс Simpson	<i>Anaeroplasmataceae</i> rho=0,392, n=25, p=0,05 [ <i>Cerasicoccaceae</i> ] rho=-0,351, n=33, p=0,05
	Индекс Shannon	<i>Anaeroplasmataceae</i> rho=0,535, n=25, p<0,01
	Индекс Chao1	<i>Anaeroplasmataceae</i> rho=0,466, n=25, p<0,05
	PD	<i>Anaeroplasmataceae</i> rho=0,470, n=25, p<0,05 [ <i>Tissierellaceae</i> ] rho=0,366, n=35, p<0,05
	OTUs	<i>Anaeroplasmataceae</i> rho=0,536, n=25, p<0,01 [ <i>Tissierellaceae</i> ] rho=0,311, n=35, p<0,1
МЗО	Индекс Simpson	[ <i>Cerasicoccaceae</i> ] rho=-0,714, n=13, p<0,01 <i>Enterobacteriaceae</i> rho=-0,362, n=36, p<0,05
	Индекс Shannon	S24-7 rho=0,344, n=33, p=0,05
МНЗО	Индекс Simpson	<i>Anaeroplasmataceae</i> rho=0,696, n=15, p<0,005 <i>Ruminococcaceae</i> rho=0,398, n=53, p<0,005 <i>Clostridiaceae</i> rho=0,417, n=53, p<0,005 <i>Coriobacteriaceae</i> rho=0,325, n=53, p<0,05 <i>Fusobacteriaceae</i> rho=-0,543, n=14, p<0,05
	Индекс Shannon	<i>Anaeroplasmataceae</i> rho=0,679, n=15, p=0,005 <i>Ruminococcaceae</i> rho=0,383, n=53, p<0,005 <i>Clostridiaceae</i> rho=0,376, n=53, p<0,01 <i>Coriobacteriaceae</i> rho=0,337, n=53, p<0,05 <i>Fusobacteriaceae</i> rho=-0,609, n=14, p<0,05 <i>Leuconostocaceae</i> rho=-0,375, n=22, p<0,1
	Индекс Chao1	<i>Anaeroplasmataceae</i> rho=0,804, n=15, p<0,0005 <i>Ruminococcaceae</i> rho=0,270, n=53, p=0,05 <i>Desulfovibrionaceae</i> rho=0,339, n=53, p<0,05 <i>Leuconostocaceae</i> rho=-0,511, n=22, p<0,05
	PD	<i>Anaeroplasmataceae</i> rho=0,750, n=15, p<0,005 <i>Ruminococcaceae</i> rho=0,268, n=53, p=0,05 <i>Desulfovibrionaceae</i> rho=0,280, n=53, p<0,05 <i>Leuconostocaceae</i> rho=-0,467, n=22, p<0,05
	OTUs	<i>Anaeroplasmataceae</i> rho=0,819, n=15, p<0,0005 <i>Ruminococcaceae</i> rho=0,285, n=53, p<0,05 <i>Desulfovibrionaceae</i> rho=0,283, n=53, p<0,05 <i>Leuconostocaceae</i> rho=-0,476, n=22, p<0,05

Также у пациентов с МНЗО была обнаружена позитивная связь между характеристиками разнообразия микробиома крови и такими семействами как *Coriobacteriaceae*, *Clostridiaceae* и *Desulfovibrionaceae*. Несмотря на то, что эти семейства не являлись самыми «массовыми» в микробиоме кишечника, они, тем не менее, входили в top-23 семейств микробиома кала, которые выделялись из образцов более 80% участников исследования и на долю

которых приходилось  $0,90 \pm 0,06$ . Такая распространенность указывает, что данные таксоны входят в «ядро» микробиоты кишечника. Таким образом, при МНЗО наблюдалась позитивная взаимосвязь характеристик альфа-разнообразия микробиома крови и некоторых семейств из «ядра» кишечной микробиоты (*Ruminococcaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Clostridiaceae* и *Desulfovibrionaceae*). При МЗО также были выявлены связи с «ядром» микробиома кишечника – семействами *Enterobacteriaceae* и S24-7. Интересно, что содержание *Enterobacteriaceae* было негативно взаимосвязано с индексом Simpson микробиома крови. У здоровых доноров не было обнаружено влияния «ядра» кишечной микробиоты на разнообразие микробиома крови. Семейства *Eubacteriaceae* и *Synergistaceae*, с которыми были получены корреляционные связи в Группе 1, выделялись из образцов кала менее четверти участников исследования.

Следует отметить, что корреляционный анализ содержания одноименных таксонов в микробиоме кала и крови не выявил значимых взаимосвязей ни в одной из групп.

## ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ. СОДЕРЖАНИЕ НЕЙРОТРОФИНОВ ПРИ ОЖИРЕНИИ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК КАЛА И КРОВИ

### 3.1. Содержание нейротрофинов в сыворотке крови

Одной из задач исследования была оценка содержания нейротрофинов NGF и BDNF у пациентов с различными метаболическими фенотипами ожирения (табл. 11).

Табл. 11. Сывороточные концентрации нейротрофинов у исследуемых групп.

	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
BDNF, нг/мл	7,39 [6,74 – 8,12]	8,13 [7,16 – 8,77]	8,13 [6,90 – 9,01]	8,39 [7,06 – 9,08]
NGF, нг/мл	0,648 [0,520 – 0,906]	0,508 [0,408 – 0,520]	0,473 [0,343 – 0,527]	0,520 [0,414 – 0,656]

Данные представлены в виде медианы [25 – 75 перцентили].

Содержание BDNF в сыворотке крови у Группы 1 и Группы 2 не показало достоверных различий (рис. 16А). Разделение пациентов Группы 2 по метаболическому фенотипу ожирения не привело к появлению различий в концентрации этого нейротрофина между Группой 1, пациентами с МЗО и МНЗО (рис. 16В).

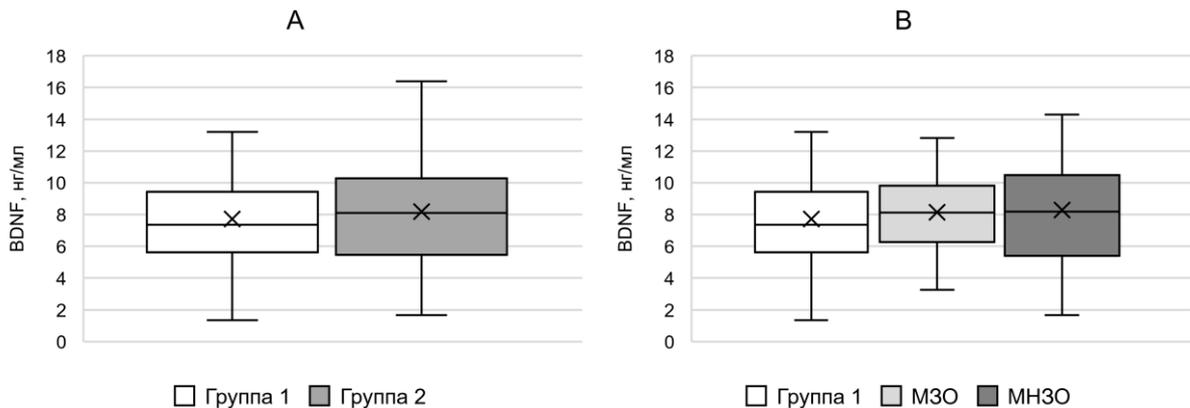


Рис. 16. Сравнение содержания BDNF в сыворотке между исследуемыми группами. А – влияние ожирения на концентрацию BDNF; В – влияние метаболического фенотипа ожирения на концентрацию BDNF.

У здоровых доноров Группы 1 содержание BDNF отрицательно коррелировало с концентрацией FGF21 ( $\rho=-0,471$ ,  $n=47$ ,  $p<0,001$ ) и близко к статистически значимому – с миостатином-GDF8 ( $\rho=-0,339$ ,  $n=30$ ,  $p=0,067$ ). При этом пациентов Группы 2 не было выявлено значимых взаимосвязей ( $\rho\geq 0,3$ ) между BDNF и показателями углеводного/липидного обменов, цитокинами или физикальными параметрами (ИМТ, ОТ). После разделения пациентов Группы 2 на подгруппы в зависимости от метаболического фенотипа ожирения, у пациентов с МЗО была обнаружена единственная корреляционная связь между содержанием BDNF и концентрацией триацилглицеридов сыворотки ( $\rho=0,309$ ,  $n=40$ ,  $p=0,05$ ). Для пациентов с МНЗО было характерно появление позитивной взаимосвязи между BDNF и концентрацией ХС-ЛПВП ( $\rho=0,322$ ,  $n=54$ ,  $p<0,05$ ), и негативной между BDNF и ИМТ ( $\rho=-0,337$ ,  $n=54$ ,  $p<0,05$ ). Кроме того, у таких пациентов наблюдалась слабая связь между BDNF и окружностью талии ( $\rho=-0,288$ ,  $n=54$ ,  $p<0,05$ ).

Несмотря на сходное содержание BDNF, у пациентов Группы 2 наблюдалось статистически значимое снижение концентрации NGF по сравнению с Группой 1 (рис. 17А). Разделение по метаболическому типу ожирения показало, что и для пациентов с МЗО, и для пациентов с МНЗО характерны сниженные концентрации NGF в сыворотке (рис. 17В). При этом при МНЗО содержание NGF было выше, чем при МЗО ( $p<0,1$ ).

Корреляционный анализ показал, что для Группы 1 характерна взаимосвязь между уровнем NGF и остеокином ( $\rho=0,311$ ,  $n=127$ ,  $p<0,05$ ) и миостатином-GDF8 ( $\rho=0,469$ ,  $n=29$ ,  $p<0,05$ ). У пациентов Группы 2 концентрация NGF позитивно коррелировала с уровнем аспросина ( $\rho=0,387$ ,  $n=44$ ,  $p<0,01$ ). При МЗО у пациентов также наблюдалась корреляция между NGF и аспросином ( $\rho=0,455$ ,  $n=19$ ,  $p=0,05$ ), тогда как у лиц с МНЗО подобной связи не наблюдалось. В целом, при МНЗО отсутствовали статистически значимые взаимосвязи между содержанием NGF и цитокинами,

показателями углеводного / липидного обменов или физикальными параметрами.

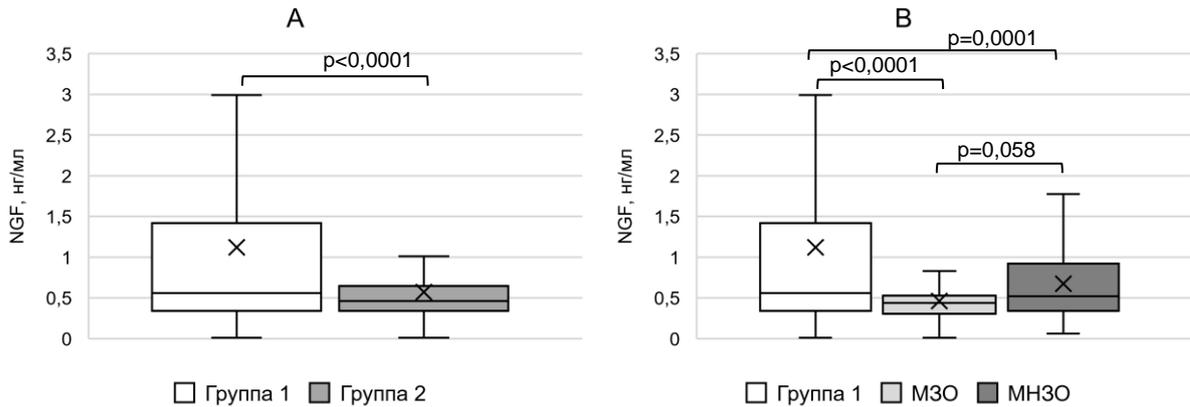


Рис. 17. Сравнение содержания NGF в сыворотке между исследуемыми группами. А – влияние ожирения на концентрацию NGF; В – влияние метаболического фенотипа ожирения на концентрацию NGF.

### 3.2. Взаимосвязь сывороточной концентрации нейротрофинов и бактериальной ДНК кала

В первую очередь, для выявления взаимосвязи между содержанием нейротрофинов и микробиома кала был проведен корреляционный анализ между концентрациями BDNF и NGF и характеристиками альфа-разнообразия микробиома кала в каждой группе. Следует отметить, что характеристики разнообразия микробиома кала значительно различались в исследуемых группах (табл. 12).

Табл. 12. Характеристики альфа-разнообразия микробиома кала

	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
Индекс Simpson	0,974 ± 0,019	0,971 ± 0,02305	0,972 ± 0,02383	0,970 ± 0,023
Индекс Shannon	7,82 [7,38 – 8,25]	7,80 [7,20 – 8,59]	8,28 [7,54 – 8,81]*	7,63 [7,09 – 8,24] †
Индекс Chao1	4014,2 [3146,8 – 4910,4]	4005,2 [3061,8 – 5112,4]	4899,1 [3562,3 – 5645,0]*	3631,8 [2956,8 – 4663,3] †
PD	43,57 [40,34 – 48,03]	41,01 [35,54 – 44,94]*	41,44 [37,48 – 46,10]	38,90 [33,01 – 44,07]*
OTUs	1975,0 [1644,5 – 2333,5]	2008,0 [1629,0 – 2548,0]	2479,0 [1886,0 – 2883,0]*	1930,0 [1551,0 – 2329,8] †

\* – различия достоверны, по сравнению с Группой 1 ( $p < 0,05$ ); † – различия достоверны, по сравнению с подгруппой пациентов с МЗО ( $p < 0,05$ ).

Чтобы выявить, влияет ли разнообразие микробиома кала или микробиома крови на содержание нейротрофинов, исследуемые группы были разделены на подгруппы в зависимости от величин индексов альфа-разнообразия: с высокими, средними и низкими значениями. Распределение на подгруппы проводилось по квантилям. Для выявления различий между содержанием нейротрофинов в сформированных подгруппах использовался метод однофакторного ANOVA или критерий Краскела-Уоллиса в зависимости от типа распределения данных.

Разделение исследуемых групп на подгруппы в зависимости от величины индексов Shannon, PD и количества OTUs не выявило влияния данных показателей альфа-разнообразия на содержание BDNF ни в одной из исследуемых групп. Однако у Группы 1 и пациентов с МЗО концентрация BDNF зависела от величины индекса Simpson, тогда как для Группы 2 и пациентов с МНЗО подобной взаимосвязи выделено не было (рис. 18). При этом в Группе 1 наибольшее содержание BDNF в плазме наблюдалось у лиц со средними значениями индекса Simpson. У пациентов с МЗО напротив, наибольшее содержание BDNF было выявлено среди пациентов с высокими значениями индекса Simpson.

Для пациентов с МНЗО было характерно влияние индекса Chao1 на содержание BDNF в сыворотке крови, тогда как у других исследуемых групп подобного влияния не наблюдалось (рис. 19). При этом, у пациентов с МНЗО с минимальными значениями индекса Chao1 наблюдалось максимальное содержание BDNF, тогда как при высоких значениях индекса Chao1 концентрация BDNF в сыворотке была ниже. Полученные данные подтверждают и результаты корреляционного анализа, которые показали, что только для пациентов с МНЗО было характерно появление негативной взаимосвязи между содержанием BDNF и индексом Chao1 микробиома кала ( $\rho = -0,317$ ,  $n = 53$ ,  $p < 0,05$ ).

Разделение на подгруппы Группы 1 и пациентов с МЗО не привело к появлению статистически значимых различий в содержании NGF. Однако для Группы 2 и пациентов с МНЗО при разделении по величине PD было характерно появление различий между подгруппами (рис. 20).

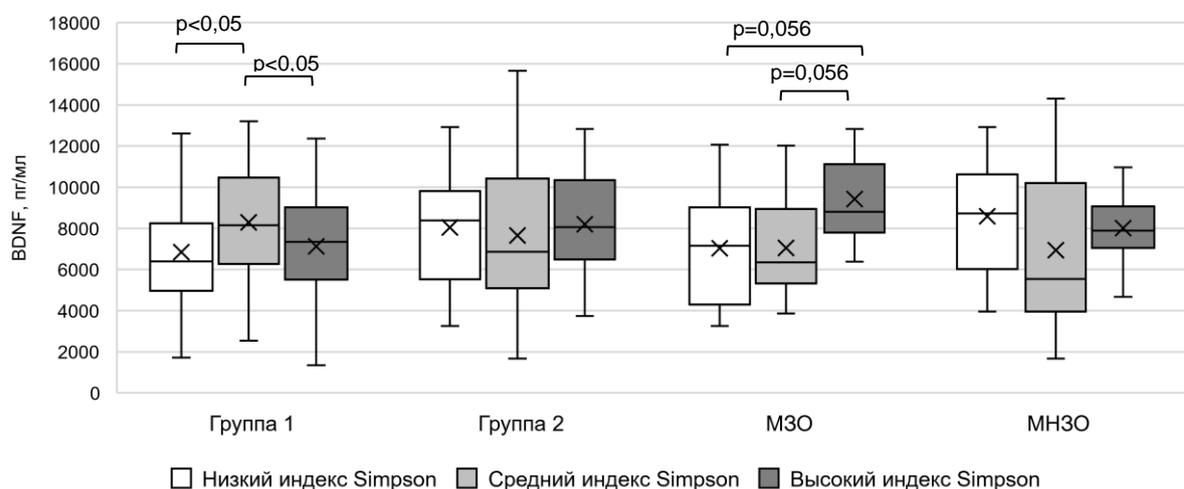


Рис. 18. Содержание BDNF в сыворотке крови у исследуемых групп в зависимости величины индекса Simpson микробиома кала.

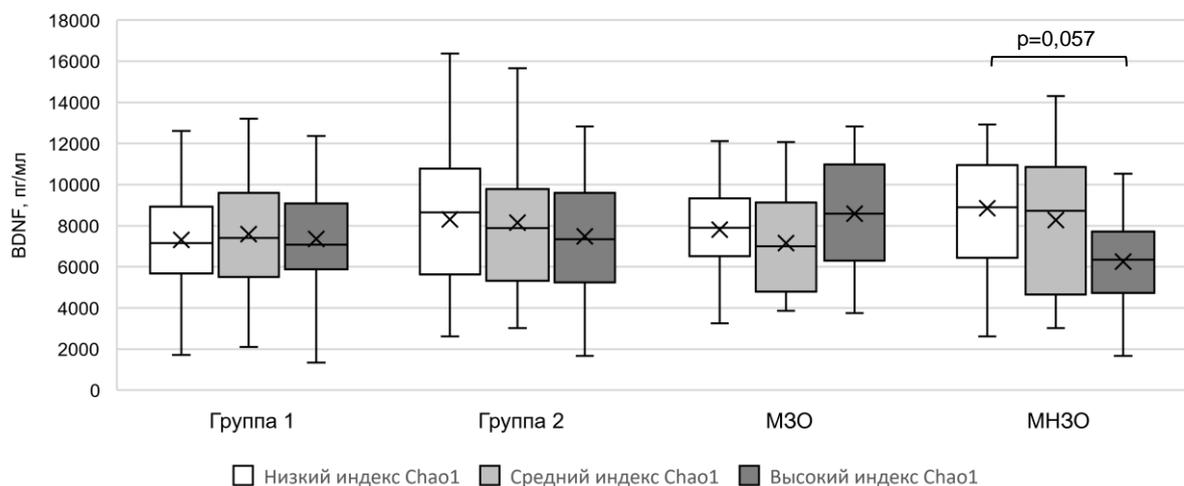


Рис. 19. Содержание BDNF в сыворотке крови у исследуемых групп в зависимости величины индекса Chao1 микробиома кала.

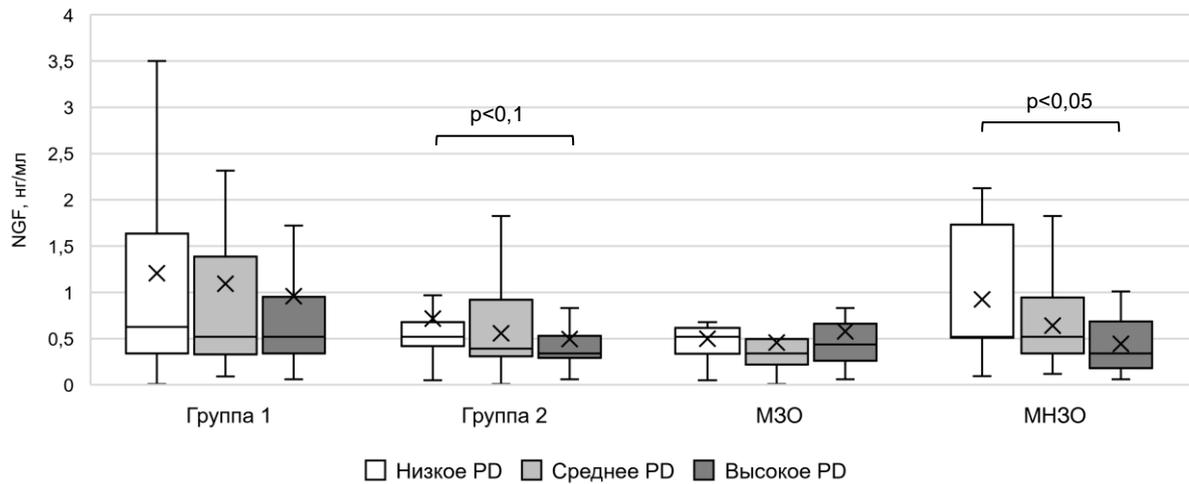


Рис. 20. Содержание NGF в сыворотке крови у исследуемых групп в зависимости величины PD микробиома кала.

Учитывая, что у пациентов с МНЗО была обнаружена зависимость нейротрофинов сыворотки от индекса Chao1 и PD – характеристик, зависящих от присутствия редких таксонов в сообществе, особый интерес представляет взаимосвязь содержания BDNF, NGF и отдельных таксонов микробиома кала. Был проведен корреляционный анализ с расчетом непараметрического критерия Спирмена между содержанием нейротрофинов в сыворотке и долями выделенных таксонов микробиома кала с глубиной до вида. Несмотря на то, что критерий Спирмена – непараметрический критерий, наличие экстремальных выбросов все равно может приводить к появлению ложно-значимых корреляции. В связи с этим, все полученные корреляции были проверены визуально с удалением экстремальных выбросов. Если удаление 1-2 результатов приводило к потере корреляционной связи, то такая связь не рассматривалась. Если же корреляционная связь сохранялась при  $\rho \geq 0,3$  и  $p < 0,05$ , наличие взаимосвязи между долей отдельного таксона в микробиоме кала и концентрацией одного из нейротрофинов принимались во внимание. Как для BDNF, так и для NGF был выделен спектр таксонов, как позитивно, так и негативно коррелировавших с концентрацией нейротрофинов (табл. 13, 14), причем спектр таксонов был уникален для каждой группы.

Табл. 13. Таксоны микробиома кала, коррелировавшие с сывороточной концентрацией BDNF

	Таксоны, позитивно коррелировавшие с сывороточной концентрацией BDNF	Таксоны, негативно коррелировавшие с сывороточной концентрацией BDNF
Группа 1	<i>Peptostreptococcaceae</i> <sup>1</sup> rho=0,408, p<0,05, n=24 <i>S24-7 (Muribaculaceae)</i> <sup>2</sup> rho=0,317, p<0,005, n=86	<i>Parvimonas spp.</i> rho=-0,600, p<0,01, n=18 <i>Succinivibrio spp.</i> rho=-0,408, p=0,01, n=38 <i>Lactococcus garvieae</i> rho=-0,403, p=0,06, n=23 <i>Gemellaceae</i> <sup>9</sup> rho=-0,398, p<0,005, n=25 <i>Prevotella spp.</i> <sup>10</sup> rho=-0,375, p=0,065, n=25 <i>Bacteroides barnesiae</i> rho=-0,371, p<0,05, n=36 <i>Bulleidia spp.</i> <sup>11</sup> rho=-0,365, p=0,0565, n=28
Группа 2	Не выявлено значимых таксонов (rho >0,3)	<i>Coprobacillus spp.</i> rho=-0,337, p<0,05, n=36
МЗО	<i>[Ruminococcus] torques</i> rho=0,618, p<0,05, n=11 <i>Bacteroides spp.</i> <sup>3</sup> rho=0,408, p<0,01, n=40 <i>Rikenellaceae</i> <sup>4</sup> rho=0,407, p<0,01, n=39 <i>Oscillospira spp.</i> rho=0,341, p<0,05, n=40 <i>[Barnesiellaceae]</i> <sup>5</sup> rho=0,325, p<0,05, n=39 <i>Bacteroides ovatus</i> rho=0,311, p=0,06, n=38 <i>Anaerostipes spp.</i> rho=0,307, p=0,06, n=38	<i>Enterococcaceae</i> <sup>12</sup> rho=-0,857, p<0,05, n=7 <i>Blautia obeum</i> rho=-0,833, p=0,01, n=8 <i>Mitsuokella spp.</i> <sup>13</sup> rho=-0,734, p<0,01, n=12 <i>Leuconostocaceae</i> <sup>14</sup> rho=-0,621, p<0,05, n=13
МНЗО	<i>Bifidobacterium spp.</i> <sup>6</sup> rho=0,437, p<0,005, n=45 <i>Collinsella spp.</i> <sup>7</sup> rho=0,432, p<0,05, n=27 <i>Coprococcus spp.</i> <sup>8</sup> rho=0,317, p=0,056, n=37	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> rho=-0,321, p<0,05, n=53

<sup>1</sup> Неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к роду *Peptostreptococcus*; <sup>2</sup> неидентифицированные таксоны семейства; <sup>3</sup> неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *B. acidifaciens*, *B. barnesiae*, *B. caccae*, *B. coprophilus*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. plebeius* и *B. uniformis*; <sup>4</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к роду *Alistipes*; <sup>5</sup> неидентифицированные таксоны семейства; <sup>6</sup> неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* и *B. pseudolongum*; <sup>7</sup> неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *C. aerofaciens* и *C. stercoris*; <sup>8</sup> неидентифицированные виды, не принадлежащие к виду *C. eutactus*; <sup>9</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к роду *Gemella*; <sup>10</sup> неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к видам *P. copri* и *P. stercorea*; <sup>11</sup> неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к виду *B. p-1630-c5*; <sup>12</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Enterococcus* и *Vagococcus*; <sup>13</sup> неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к виду *M. multacida*; <sup>14</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Fructobacillus*, *Leuconostoc* и *Weissella*.

Табл. 14. Таксоны микробиома кала, коррелировавшие с сывороточной концентрацией NGF

	Таксоны, позитивно коррелировавшие с сывороточной концентрацией NGF	Таксоны, негативно коррелировавшие с сывороточной концентрацией NGF
Группа 1	Не выявлено значимых таксонов ( $\rho > 0,3$ )	<i>Mitsuokella spp.</i> <sup>3</sup> $\rho = -0,606$ , $p < 0,05$ , $n = 11$
Группа 2	<i>Fusobacterium spp.</i> $\rho = 0,469$ , $p < 0,05$ , $n = 20$	Не выявлено значимых таксонов ( $\rho > 0,3$ )
МЗО	<i>Peptococcus spp.</i> $\rho = 0,821$ , $p < 0,005$ , $n = 10$ <i>Alcaligenaceae</i> <sup>1</sup> $\rho = 0,806$ , $p < 0,005$ , $n = 11$ <i>Lactobacillus ruminis</i> $\rho = 0,564$ , $p = 0,005$ , $n = 23$ <i>Ruminococcus spp.</i> <sup>2</sup> $\rho = 0,468$ , $p < 0,05$ , $n = 24$ <i>Odoribacter spp.</i> $\rho = 0,338$ , $p = 0,05$ , $n = 34$	<i>Mitsuokella spp.</i> <sup>3</sup> $\rho = -0,632$ , $p = 0,05$ , $n = 10$ <i>Lactococcus spp.</i> <sup>4</sup> $\rho = -0,524$ , $p < 0,05$ , $n = 19$ <i>Haemophilus parainfluenzae</i> $\rho = -0,456$ , $p = 0,01$ , $n = 30$ <i>Erysipelotrichaceae</i> <sup>5</sup> $\rho = -0,403$ , $p < 0,05$ , $n = 32$ <i>Megamonas spp.</i> $\rho = -0,398$ , $p < 0,05$ , $n = 29$ <i>Clostridiaceae</i> <sup>6</sup> $\rho = -0,396$ , $p < 0,05$ , $n = 35$
МНЗО	<i>Fusobacterium spp.</i> $\rho = 0,537$ , $p = 0,06$ , $n = 13$ <i>Slackia spp.</i> $\rho = 0,360$ , $p < 0,05$ , $n = 36$	<i>Streptococcus anginosus</i> $\rho = -0,730$ , $p < 0,005$ , $n = 16$ <i>Gemellaceae</i> <sup>7</sup> $\rho = -0,581$ , $p < 0,05$ , $n = 13$ <i>Alcaligenaceae</i> <sup>1</sup> $\rho = -0,528$ , $p = 0,06$ , $n = 13$ <i>ML615J-28</i> <sup>8</sup> $\rho = -0,404$ , $p < 0,05$ , $n = 37$ <i>Clostridiales</i> <sup>9</sup> $\rho = -0,347$ , $p < 0,05$ , $n = 51$

<sup>1</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Achromobacter* и *Sutterella*; <sup>2</sup> неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к видам *R. bromii*, *R. callidus* и *R. flavefaciens*; <sup>3</sup> неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к виду *M. multacida*; <sup>4</sup> неидентифицированные виды рода, не принадлежащие к виду *L. garvieae*; <sup>5</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам [*Eubacterium*], *Asteroleplasma*, *Bulleidia*, *Catenibacterium*, *cc\_115*, *Clostridium*, *Coprobaillus*, *Holdemania*, *p-75-a5* и *RFN20*; <sup>6</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *02d06*, *Caloramator*, *Clostridium*, *Sarcina* и *SMB53*; <sup>7</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к роду *Gemella*; <sup>8</sup> неидентифицированные таксоны порядка; <sup>9</sup> неидентифицированные таксоны порядка, не принадлежащие к семействам [*Mogibacteriaceae*], [*Tissierellaceae*], *Christensenellaceae*, *Clostridiaceae*, *Dehalobacteriaceae*, *EtOH8*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae* и *Veillonellaceae*.

### 3.3. Взаимосвязь сывороточной концентрации нейротрофинов и бактериальной ДНК крови

Исследование возможной взаимосвязи «нейротрофины – микробиом крови» проводилось по аналогичной схеме, что и изучение взаимосвязи «нейротрофины – микробиом кала». Каждая из групп была разделена на подгруппы в зависимости от величин индексов альфа-разнообразия микробиома крови с последующим сравнительным анализом с использованием одностороннего критерия ANOVA или Краскела-Уоллиса. Подгруппы были сравнимы между собой по сывороточным концентрациям BDNF и NGF. Единственным близким к статистически значимому различием было сниженное содержание BDNF у пациентов с МНЗО и высокими значениями индекса Simpson (рис. 21). Кроме того, только для пациентов с МНЗО была характерна слабая корреляционная связь между содержанием BDNF и индексом Shannon ( $\rho = -0,267$ ,  $n = 52$ ,  $p = 0,055$ ). Других корреляционных связей «разнообразие микробиома крови – нейротрофины» выявлено не было.

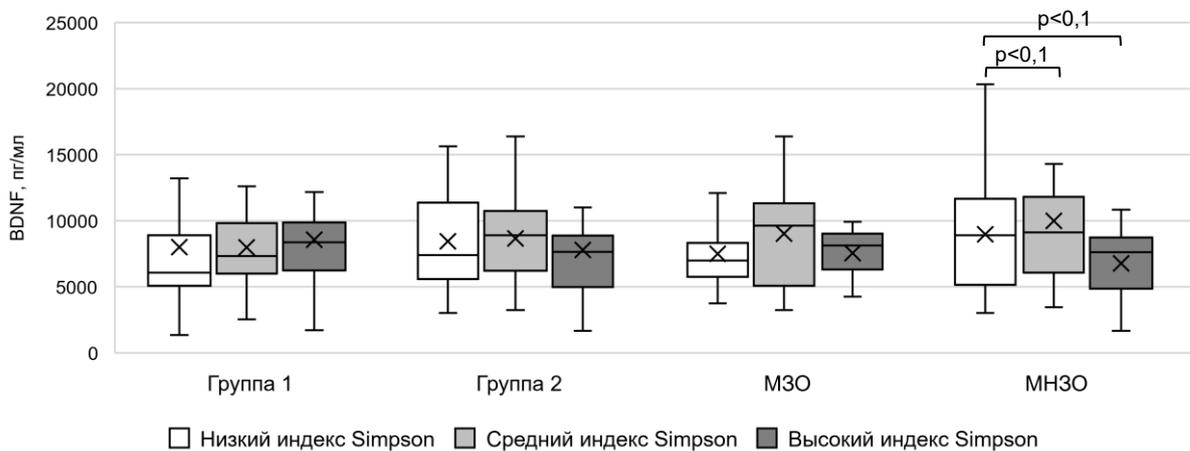


Рис. 21. Содержание BDNF в сыворотке крови у исследуемых групп в зависимости величины индекса Simpson микробиома крови.

Корреляционный анализ с расчетом критерия Спирмена выявил спектр таксонов микробиома крови, как позитивно, так и негативно взаимосвязанных с концентрацией BDNF и NGF (табл. 15, 16).

Табл. 15. Таксоны микробиома крови, коррелировавшие с сывороточной концентрацией BDNF

	Таксоны, позитивно коррелировавшие с сывороточной концентрацией BDNF	Таксоны, негативно коррелировавшие с сывороточной концентрацией BDNF
Группа 1	<i>Micrococcus spp.</i> rho=0,692, p<0,01, n=13 <i>Lactobacillus iners</i> rho=0,551, p<0,005, n=26 <i>Haemophilus parainfluenzae</i> rho=0,463, p=0,05, n=18 <i>Clostridium spp.</i> rho=0,334, p<0,06, n=33 <i>Gemellaceae</i> rho=0,622, p<0,05, n=12	<i>Hymenobacter spp.</i> rho=0,636, p<0,05, n=11 <i>Micrococcaceae</i> <sup>5</sup> rho=-0,441, p<0,01, n=34 <i>Dorea spp.</i> <sup>6</sup> rho=-0,392, p<0,05, n=35 <i>Chryseobacterium spp.</i> rho=-0,366, p<0,05, n=30 <i>Geodermatophilaceae</i> rho=-0,437, p<0,05, n=27
Группа 2	<i>Rickettsiales f. mitochondria</i> rho=0,709, p<0,005, n=16 <i>Rhizobiales</i> <sup>1</sup> rho=0,537, p<0,05, n=17 <i>Coriobacteriaceae</i> <sup>2</sup> rho=0,636, p<0,005, n=20 <i>Providencia spp.</i> rho=0,503, p<0,05, n=18 <i>Nocardioideae</i> rho=0,327, p<0,05, n=42 <i>Rhodococcus spp.</i> rho=0,436, p<0,005, n=48 <i>Paracoccus spp.</i> <sup>3</sup> rho=0,455, p<0,005, n=40 <i>Lachnospira spp.</i> rho=0,369, p<0,05, n=36 <i>Chitinophagaceae</i> <sup>4</sup> rho=0,369, p<0,05, n=36	<i>Microbacterium spp.</i> rho=-0,756, p<0,001, n=16 <i>Thermus spp.</i> rho=-0,608, p<0,01, n=17 <i>Helicobacter pylori</i> rho=-0,587, p<0,05, n=12 <i>Solirubrobacterales</i> <sup>7</sup> rho=-0,523, p<0,05, n=20 <i>Sutterella spp.</i> rho=-0,330, p=0,05, n=35
МЗО	<i>Micrococcus spp.</i> rho=0,457, p<0,05, n=22	<i>Pseudomonas spp.</i> <sup>8</sup> rho=-0,709, p<0,05, n=10 [ <i>Eubacterium</i> ] <i>spp.</i> rho=-0,697, p<0,05, n=10 <i>Bacteroides uniformis</i> rho=-0,566, p=0,05, n=12 <i>Leuconostocaceae</i> rho=-0,624, p=0,05, n=10
МНЗО	<i>Rhodococcus spp.</i> rho=0,499, p<0,01, n=26 <i>Lachnospira spp.</i> rho=0,482, p<0,05, n=23 <i>Providencia spp.</i> rho=0,794, p<0,01, n=10 <i>Streptophyta</i> rho=0,565, p<0,01, n=20 <i>Paracoccus spp.</i> <sup>3</sup> rho=0,509, p<0,05, n=23 <i>Rhizobiales</i> <sup>1</sup> rho=0,721, p<0,05, n=10 <i>Rickettsiales f. mitochondria</i> rho=0,673, p<0,05, n=10 <i>Nocardioideae</i> rho=0,499, p<0,01, n=26	<i>Microbacterium spp.</i> rho=-0,714, p<0,05, n=8 <i>Clostridium spp.</i> rho=-0,521, p<0,05, n=16 <i>Gaiellaceae</i> rho=-0,709, p<0,05, n=10

Примечание: <sup>1</sup> неидентифицированные таксоны порядка, не принадлежащие к семействам *Aurantimonadaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Brucellaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Xanthobacteraceae*;  
<sup>2</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Adlercreutzia*, *Atopobium*, *Collinsella*, *Eggerthella*, *Slackia*;

<sup>3</sup> неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *P. aminovorans*, *P. marcusii*; <sup>4</sup> неидентифицированные таксоны, не принадлежащие к семействам *Chitinophaga*, *Flaviumibacter*, *Flavisolibacter*, *Niabella*, *Sediminibacterium*. <sup>5</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Microbispora*, *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Renibacterium* и *Rothia*; <sup>6</sup> неидентифицированные виды, не принадлежащие к виду *D. formicigenerans*; <sup>7</sup> неидентифицированные таксоны порядка, не принадлежащие к семействам *Conexibacteraceae*, *Patulibacteraceae*, *Solirubrobacteraceae*; <sup>8</sup> неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *P. fragi* и *P. viridiflava*.

Табл. 16. Таксоны микробиома крови, коррелировавшие с сывороточной концентрацией NGF

	Таксоны, позитивно коррелировавшие с сывороточной концентрацией NGF	Таксоны, негативно коррелировавшие с сывороточной концентрацией NGF
Группа 1	<i>Akkermansia muciniphila</i> rho=0,495, p<0,005, n=38 <i>Dorea spp.</i> <sup>1</sup> rho=0,399, p<0,05, n=35 <i>Aerococcus spp.</i> rho=0,661, p<0,05, n=10	<i>Clostridium spp.</i> rho=-0,386, p<0,05, n=35 <i>Oxalobacteraceae</i> <sup>1</sup> rho=-0,409, p<0,05, n=34 <i>Pirellulaceae</i> rho=-0,636, p<0,05, n=11 <i>Chitinophagaceae</i> <sup>2</sup> rho=-0,709, p<0,01, n=13 <i>Nocardioideaceae</i> <sup>3</sup> rho=-0,450, p<0,05, n=21 [ <i>Eubacterium</i> ] <i>spp.</i> rho=-0,297, p<0,05, n=49 <i>Hyphomicrobiaceae</i> rho=-0,548, p<0,05, n=17
Группа 2	<i>Ruminococcus bromii</i> rho=0,640, p<0,01, n=17	
МЗО	[ <i>Prevotella</i> ] <i>spp.</i> rho=0,706, p<0,05, n=9	<i>Christensenellaceae</i> rho=-0,929, p<0,001, n=8
МНЗО	<i>Ruminococcus bromii</i> rho=0,619, p<0,05, n=14	<i>Bacteroides spp.</i> <sup>4</sup> rho=-0,446, p<0,005, n=46 <i>Thermus spp.</i> rho=-0,756, p<0,05, n=8 [ <i>Barnesiellaceae</i> ] rho=-0,492, p<0,05, n=19 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> rho=-0,490, p<0,05, n=19 <i>Roseburia spp.</i> rho=-0,479, p<0,05, n=26 <i>Oxalobacteraceae</i> rho=-0,433, p<0,05, n=26

<sup>1</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Cupriavidus*, *Janthinobacterium*, *Oxalobacter*, *Polynucleobacter*, *Ralstonia*; <sup>2</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Chitinophaga*, *Flaviumibacter*, *Flavisolibacter*, *Niabella*, *Sediminibacterium*; <sup>3</sup> неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Aeromicrobium*, *Friedmanniella*, *Kribbella*, *Nocardioides*, *Pimelobacter*, *Nocardioopsis*; <sup>4</sup> неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *B. acidifaciens*, *B. barnesiae*, *B. caccae*, *B. coprophilus*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. plebeius*, *B. uniformis*.

## ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 5.1. Бактериальная ДНК крови у пациентов с ожирением

Полученные данные свидетельствуют, что ожирение, особенно его метаболически нездоровый тип, ассоциировано с увеличением разнообразия микробиома крови, тогда как метаболически здоровый фенотип не приводит к подобным изменениям. Следует отметить, что наличие метаболических нарушений, в частности гипергликемии, и вялотекущего системного воспаления представляют собой факторы, отличающие метаболически нездоровый фенотип ожирения [22]. В свою очередь, воспаление и метаболические нарушения, в частности гипергликемия, способствующая N-гликированию белков эритроцитов, опосредуют увеличение кишечной проницаемости [51,132]. По-видимому, увеличение разнообразия микробиома крови, характерное для пациентов с МНЗО, в первую очередь связано с усилением транслокации бактериальной ДНК из кишечника.

Подобное предположение косвенно подтверждают и результаты регрессионного анализа по предиктивной значимости микробного разнообразия микробиома кала в отношении разнообразия микробиома крови. У пациентов с МНЗО характеристики альфа-разнообразия микробиома кала обладали положительной предсказательной силой в отношении разнообразия микробиома крови. Увеличение альфа-разнообразия микробиома кала у таких пациентов было ассоциировано с большими значениями разнообразия микробиома крови, что указывает на большую проницаемость кишечной стенки для микробной ДНК. У здоровых доноров и пациентов с МЗО, напротив, увеличение разнообразия микробиома кала имело отрицательную прогностическую значимость для характеристик альфа-разнообразия микробиома крови. То есть увеличение разнообразия кишечного микробиома у таких лиц было связано со сниженными значениями характеристик разнообразия микробиома крови. Следует отметить, что исследование разнообразия микробиома кала показало, что для пациентов с МЗО характерны большее разнообразие кишечного микробиома, чем у здоровых

доноров, при этом у пациентов с МНЗО наблюдается обеднение кишечной микробиоты [41]. Можно предполагать, что большее филонетаболическое ядро кишечника является причиной меньшей проницаемости кишечной стенки и, как следствие, меньшей транслокации бактериальной ДНК и других структурных компонентов микробных клеток, стимулирующих воспалительную реакцию (например, LPS). Таким образом, разнообразный микробиом кишечника является одним из факторов, обеспечивающих нормальную кишечную проницаемость. Богатое разнообразие кишечной микробиоты при МЗО ассоциировано с меньшей проницаемостью стенки кишечника. Напротив, обеднение кишечной микробиоты при МНЗО, по-видимому, является одним из факторов увеличения кишечной проницаемости, наравне с воспалением и метаболическими нарушениями.

Увеличение проницаемости кишечника у пациентов с МНЗО также подтверждает большее содержание в микробиоме крови ДНК семейств *Lachnospiraceae* и *Prevotellaceae* по сравнению с Группой 1 и *Ruminococcaceae* по сравнению с пациентами с МЗО. Представители этих семейств являются облигатными анаэробами и наиболее распространены в кишечнике [133]. Следует отметить, что транслокация в кровь ДНК именно этих таксонов определяла характеристики разнообразия крови у всех исследуемых групп. Таким образом полученные данные подтверждают, что транслокация бактериальной ДНК из кишечника является основным источником, формирующим микробиом крови.

Кроме того, и для пациентов с МЗО, и для пациентов с МНЗО был характерен спектр таксонов, ДНК которых выделялась из образцов крови этих пациентов чаще, чем у контрольной группы. У пациентов с МЗО такой спектр включал: *Leuconostocaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Burkholderiaceae*, *Bacteroidaceae*, *TM7-3*, *Acidimicrobiales*, *Solirubrobacterales*, *Gaiellaceae*, *Streptomyetaceae*, *Nocardioideaceae* и *Flavobacteriaceae*, а у пациентов с МНЗО: *Leuconostocaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Burkholderiaceae*, *Helicobacteraceae*, *Acidobacteria*, *TM7-3*, *Streptomyetaceae*, *Nocardioideaceae* и

S24-7. Интересно, что представители части таксонов, для которых было отмечено увеличение частоты выявления в образцах крови пациентов с МЗО и МНЗО, в основном являются обитателями почв и вод (*Hyphomicrobiaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Burkholderiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Nocardioideaceae*, *Streptomyetaceae*, *Gaiellaceae*, *Solirubrobacterales*, *Nocardiaceae*), а не ЖКТ. Подобная среда обитания предполагает, что транслокация ДНК этих таксонов в кровь происходит с поверхности кожи или дыхательных путей. Ожирение, с одной стороны, приводит к увеличению площади поверхности кожи, с другой стороны, вызывает изменения физиологии кожи – нарушает работу сальных и потовых желез, затрудняет кровотоки и лимфоток в дерме, влияет на формирование коллагена и приводит к повышенной проницаемости кожного барьера [134]. По-видимому, ожирение, вне зависимости от его метаболического фенотипа, сопровождается усилением транслокации бактериальной ДНК с поверхности кожи.

Для пациентов с МНЗО было характерно увеличение частоты выявления ДНК семейства *Helicobacteraceae*. Так как основным представителем этого семейства является *Helicobacter pylori*, можно предполагать, что метаболически нездоровое ожирение также связано с увеличением проницаемости стенки желудка для бактериальной ДНК. Таким образом, для метаболически нездорового фенотипа ожирения, по-видимому, характерно усиление микробной транслокации как из кишечных, так и некишечных источников, что может обуславливаться нарушением барьеров на фоне хронического воспаления.

Предположение о большем количестве мест / локусов транслокации бактериальной ДНК в кровь при МНЗО косвенно подтверждается результатами корреляционного анализа, который показал наличие меньшего количества взаимосвязей между семействами при МНЗО (рис. 8, 9, 10). Если предполагать, что множественные корреляционные связи между группой семейств с формированием некоего «ядра», указывают на совместную транслокацию, то снижение количества «ядер», указывает на более

«размытые» очаги транслокации. По-видимому, в норме у здоровых доноров и пациентов с МЗО проницаемость внешних барьеров, в том числе для бактериальной ДНК, строго контролируется. У таких лиц присутствуют физиологически легитимные локусы транслокации, что подтверждается более «концентрированными» взаимосвязями между долями основных семейств микробиома крови. При МНЗО на фоне повышенной проницаемости внешних барьеров транслокация бактериальной ДНК в кровь идет с большей поверхностью, что может объяснять менее «концентрированные» взаимосвязи между долями отдельных семейств.

## 5.2. Содержание BDNF в сыворотке крови при ожирении и его взаимосвязь с бактериальной ДНК кала и крови

Ожирение, вне зависимости от его метаболического фенотипа не сопровождается изменениями сывороточной концентрации BDNF. У здоровых доноров концентрация BDNF позитивно коррелировала с FGF21, у пациентов с МЗО – с сывороточной концентрацией ТАГ, а при МНЗО – с уровнем ХС-ЛПВП. Циркулирующий FGF21 синтезируется преимущественно в печени и его главный эффект – увеличение чувствительности тканей к инсулину [135]. Основным источником ТАГ сыворотки и ЛПВП также является печень. Таким образом, вне зависимости от наличия или отсутствия ожирения полученные результаты показывают присутствие положительной взаимосвязи «сывороточный BDNF – метаболическая функция печени». Механизм данной связи не ясен, но ее существование не вызывает сомнений – было показано, что уровень циркулирующего BDNF снижается при патологиях печени [136,137]. Возможной причиной такой связи является участие печени в синтезе антипротеаз плазмы. Антипротеазы снижают активность протеаз плазмы и, тем самым, могут тормозить деградацию BDNF, увеличивая его клиренс и, как следствие, концентрацию в крови.

У здоровых доноров, но не у пациентов с ожирением, концентрация BDNF была негативно ассоциирована с уровнем миостатина-GDF8. Учитывая, что BDNF является миокином, который активно синтезируется мышечной тканью при сокращении, а миостатин-GDF8 представляет собой негативный регулятор мышечной массы, появление негативной взаимосвязи между этими белками не является неожиданной [138,139]. Таким образом, можно предполагать, что у здоровых доноров мышцы вносят вклад в формирование пула сывороточного BDNF, чего, однако, не наблюдается при ожирении.

У пациентов с МНЗО, но не у пациентов с МЗО, была выявлена негативная взаимосвязь между BDNF и такими физикальными параметрами как ИМТ и окружность талии. Интересно, что некоторые полиморфизмы гена BDNF взаимосвязаны с ИМТ и их можно рассматривать как генетические детерминанты ожирения [140]. Кроме того, ряд работ показал, что для женщин характерна отрицательная корреляция между концентрацией BDNF и ИМТ [141,142]. По-видимому, появление негативной ассоциации «BDNF – ИМТ» является особенностью МНЗО и не характерно для здоровых доноров или пациентов с МЗО.

Количество таксонов микробиома кала, положительно коррелировавших с уровнем BDNF, было наибольшим у пациентов с МЗО. По-видимому, это связано с большим разнообразием кишечного микробиома, характерного для таких пациентов. Большое количество позитивных корреляций доли таксонов микробиома кала с BDNF может объяснить, почему максимальное содержание BDNF, наблюдалось у пациентов с высокими значениями индекса Simpson. Интересным наблюдением стало, что разные представители одной и той же таксономической группы могут по-разному коррелировать с концентрацией BDNF. У пациентов с МЗО представители рода *Bacteroides* были позитивно ассоциированы с уровнем BDNF, тогда как в Группе 1 *Bacteroides barnesiae*, напротив, демонстрировали негативную корреляцию. Подобное наблюдение подтверждает предположение Stilling R.M. и соавт. (2015), которые высказали гипотезу о разнонаправленном



	<i>S24-7 (Muribaculaceae)</i>	-										
Группа 2												
МЗО	<i>[Ruminococcus] torques</i>	+										
	<i>Bacteroides spp.</i>	-										
	<i>Rikenellaceae</i>	-										
	<i>Oscillospira spp.</i>	+										
	<i>[Barnesiellaceae]</i>	-										
	<i>Bacteroides ovatus</i>	-										
	<i>Anaerostipes spp.</i>	+										
МНЗО	<i>Bifidobacterium spp.</i>	+										
	<i>Collinsella spp.</i>	+										
	<i>Coprococcus spp.</i>	+										

Здесь и далее: нет заливки – нет данных, что фермент характерен для данного таксона, серая заливка – фермент характерен для других видов (родов) данного рода (семейства), черная заливка – фермент характерен для данного таксона; I – ферменты синтеза бутирата, II – фермент синтеза ГАМК, III – ферменты, участвующие в деградации муцина.

Табл. 18. Ферменты, характерные для таксонов микробиома кала, отрицательно коррелировавших с сывороточной концентрацией BDNF.

	Таксон микробиома кала	Окраска по Граму	I		II		III					
			2.8.3.8	2.7.2.7	4.1.1.15	3.2.1.18	3.1.1.53	4.1.3.3	3.2.1.51	3.2.1.96	3.2.1.97	3.1.1.2
Группа 1	<i>Parvimonas spp.</i>	+										
	<i>Succinivibrio spp.</i>	-										
	<i>Lactococcus garvieae</i>	+										
	<i>Gemellaceae</i>	+										
	<i>Prevotella spp.</i>	-										
	<i>Bacteroides barnesiae</i>	-										
	<i>Bulleidia spp.</i>	+										
Группа 2	<i>Coprobacillus spp.</i>	+										
МЗО	<i>Enterococcaceae</i>	+										
	<i>Blautia obeum</i>	+										
	<i>Mitsuokella spp.</i>	-										
	<i>Leuconostocaceae</i>	+										
МНЗО	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	+										

В каждой исследуемой группе были среди таксонов, положительно взаимосвязанных с содержанием BDNF присутствовали микроорганизмы, способные к синтезу бутирата. У здоровых доноров Группы 1 и пациентов с МЗО была также отмечена позитивная ассоциация содержания BDNF с ГАМК-продуцирующими бактериями. При этом, у лиц с МНЗО доля

бактерий-продуцентов ГАМК практически не коррелировала с содержанием BDNF. Также многие из выделенных таксонов, продуцирующих бутират и/или ГАМК, были способны к деградации муцина, что, по-видимому, усиливает влияние продуктов бактериального метаболизма на макроорганизм.

Максимальное количество таксономических единиц с отрицательными корреляциями «BDNF – таксон» наблюдалось у пациентов с МЗО, что также очевидно связано с большим микробным разнообразием кишечника. Большая часть таксонов, негативно ассоциированных с уровнем BDNF, принадлежала к грамположительным бактериям, важным компонентом клеточной стенки которых являются тейхоевые кислоты. Было показано, что липотейхоевые кислоты стимулируют экспрессию рецепторов к белку системы комплемента C5a – C5aR и C5L2 в фибробластах [153]. В свою очередь стимуляция C5L2 приводит к торможению секреции BDNF фибробластами, что позволяет рассматривать липотейхоевую кислоту как негативный регулятор секреции BDNF [153]. Подобный эффект тейхоевых кислот может объяснить негативное влияние грамположительных бактерий на содержание BDNF сыворотки. Возможно, именно различия в спектре антибиотической активности в отношении грамположительной и грамотрицательной флоры позволяют объяснить диаметрально противоположные результаты изменения концентрации BDNF при использовании противомикробных средств [109,111]. Однако остается неясным, с чем связано негативная взаимосвязь ряда грамотрицательных таксонов на уровень сывороточного BDNF. Появление подобной связи подразумевает наличие дополнительных взаимодействий «кишечная микробиота – BDNF».

Корреляционный анализ также показал множественные взаимосвязи между отдельными таксонами микробиома крови и сывороточным содержанием BDNF. Следует отметить, что среди таксонов, ДНК которых было выделено из крови подавляющего большинства участников каждой из групп, не было отмечено корреляции с уровнем нейротрофинов. Таксоны, взаимосвязанные с содержанием нейротрофинов, в основном выделялись не

более чем у трети лиц каждой из исследуемых групп. Подобное наблюдение дает основание предполагать, что стабильное, «конститутивное» ядро микробиома крови на прямую не влияет на синтез и секрецию нейротрофинов в кровь. Однако, среди менее часто выделяемых видов, родов и семейств, присутствовал спектр таксонов как положительно, так и отрицательно коррелировавших с уровнем BDNF. Чтобы установить, почему именно эти таксоны были взаимосвязаны с концентрацией BDNF были проанализированы нормальные среды обитания данных микроорганизмов для предположения возможного источника транслокации бактериальной ДНК в кровь (табл. 19,20).

Табл. 19. Среда обитания таксонов микробиома крови, положительно коррелировавших с сывороточной концентрацией BDNF.

Группа	Таксон микробиома крови	Среда обитания
Группа 1	<i>Micrococcus spp.</i>	Кожа, почва, вода
	<i>Lactobacillus iners</i>	Вагинальная флора
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Ротовая полость, дыхательные пути
	<i>Clostridium spp.</i>	Кишечник, почва, вода
	<i>Gemellaceae</i>	Ротовая полость
Группа 2	<i>Rickettsiales f. mitochondria</i>	Внутриклеточные паразиты
	<i>Rhizobiales</i>	Почва
	<i>Coriobacteriaceae</i>	Ротовая полость, кишечник, половые пути
	<i>Providencia spp.</i>	Вода, кишечник
	<i>Nocardioideae</i>	Почва, вода, кожа
	<i>Rhodococcus spp.</i>	Почва
	<i>Paracoccus spp.</i>	Почва
	<i>Lachnospira spp.</i>	Толстый кишечник
	<i>Chitinophagaceae</i>	Почва, вода, кишечник
МЗО	<i>Micrococcus spp.</i>	Кожа, почва, вода
МНЗО	<i>Rhodococcus spp.</i>	Почва
	<i>Lachnospira spp.</i>	Кишечник
	<i>Providencia spp.</i>	Вода, кишечник
	<i>Streptophyta</i>	Вода
	<i>Paracoccus spp.</i>	Почва
	<i>Rhizobiales</i>	Почва
	<i>Rickettsiales f. mitochondria</i>	Внутриклеточные паразиты
	<i>Nocardioideae</i>	Почва, вода, кожа

Табл. 20. Среда обитания таксонов микробиома крови, отрицательно коррелировавших с сывороточной концентрацией BDNF.

Группа	Таксон микробиома крови	Среда обитания
Группа 1	<i>Hymenobacter spp.</i>	Почва

	<i>Micrococcaceae</i>	Почва, кожа
	<i>Dorea spp.</i>	Кишечник
	<i>Chryseobacterium spp.</i>	Почва, вода, пища
	<i>Geodermatophilaceae</i>	Почва, вода
Группа 2	<i>Microbacterium spp.</i>	Пища
	<i>Thermus spp.</i>	Минеральные источники
	<i>Helicobacter pylori</i>	Желудок
	<i>Solirubrobacterales</i>	Почва, вода
	<i>Sutterella spp.</i>	Кишечник
МЗО	<i>Pseudomonas spp.</i>	Почва, вода, пища
	<i>[Eubacterium] spp.</i>	Кишечник
	<i>Bacteroides uniformis</i>	Кишечник
	<i>Leuconostocaceae</i>	Пища, кишечник
МНЗО	<i>Microbacterium spp.</i>	Пища
	<i>Clostridium spp.</i>	Кишечник, почва, вода
	<i>Gaiellaceae</i>	Почва, вода

Интересно, что среди таксонов, положительно взаимосвязанных с уровнем BDNF у лиц Группы 1, присутствовали обитатели разных микробных сообществ человеческого организма – кишечника, вагинальной флоры, микробиома ротовой полости и кожи. При этом таксоны, отрицательно коррелировавшие с содержанием этого нейротрофина у здоровых доноров, преимущественно принадлежали к представителям микробиомов почвы и воды. Подобная среда обитания предполагает основной путь транслокации микробной ДНК через кожу и слизистые дыхательных путей. По-видимому, у здоровых лиц, не страдающих ожирением, микробная транслокация по этим путям негативно взаимосвязана с сывороточной концентрацией BDNF.

Напротив, у пациентов Группы 2, многие из таксонов, положительно коррелировавшие с уровнем BDNF, являются обитателями почвы и, по-видимому, транслоцируются через кожу и/или дыхательные пути. Подобное наблюдение может быть объяснимо взаимосвязью ожирения и дерматологических патологий [134]. Ожирение повышает риск развития атопического дерматита (АД), который, в свою очередь, ассоциирован с усиленной продукцией BDNF эозинофилами [154,155]. Кроме того, ожирение является одним из факторов риска развития бронхиальной астмы (БА), при которой также наблюдается повышение плазменной концентрации BDNF

[156,157]. Появление положительной взаимосвязи у пациентов с ожирением между BDNF и таксонами, транслоцированными с кожи и из дыхательных путей, является понятной, учитывая, что микробиомы кожи, легких и желудочно-кишечного тракта вовлечены в развитие аллергических заболеваний, включая АД и БА [158].

Остается непонятным, почему транслокация бактериальной ДНК с кожи и слизистых у здоровых доноров отрицательно взаимосвязана с содержанием BDNF, а у пациентов с ожирением – положительно. Возможно, сигнальные пути «бактериальная ДНК крови – BDNF» находятся под влиянием специфических факторов, характерных для пациентов с ожирением, таких как гипергликемия, гиперинсулинемия или гиперлептинемия. Влияние лептина представляется наиболее многообещающим, так как с одной стороны лептин вовлечен в патогенез АД [159] и БА [160], а с другой стороны лептин является одним из факторов, стимулирующих экспрессию BDNF в ЦНС [161].

Среди таксонов, отрицательно коррелировавших с уровнем BDNF в Группе 2, присутствовал *Helicobacter pylori*, представитель патогенной флоры желудка. Вместе с *H. pylori*, негативно с содержанием BDNF были связаны таксоны, характерные для пищевых продуктов – *Microbacterium spp.* и *Thermus spp.* Можно предполагать, что ожирение сопровождается увеличением проницаемости стенки желудка для бактериальной ДНК, на фоне гиперфагии и перерастяжения желудка. Косвенно это подтверждает работа Rohm T. и соавт. (2021), которые отметили, что ожирение ассоциировано с увеличением количества провоспалительных макрофагов в стенке желудка [162]. По-видимому, усиление микробной транслокации из желудка может негативно сказываться на концентрации BDNF сыворотки.

После разделения пациентов Группы 2 на подгруппы по метаболическому типу ожирения было выявлено, что для пациентов с МНЗО, также, как и для общей группы пациентов с ожирением, характерна позитивная связь между таксонами-обитателями почвы и воды и сывороточной концентрацией BDNF. В целом, большее разнообразие

микробиома крови, характерное для пациентов с МНЗО, обуславливает большее количество таксонов, для которых была выявлена связь с содержанием BDNF, по сравнению МЗО. У пациентов с МЗО единственным таксоном, продемонстрировавшим положительную корреляцию с содержанием этого нейротрофина был *Micrococcus spp.* Для пациентов с МЗО, как и для пациентов МНЗО был характерен уникальный спектр таксонов, с отрицательной корреляцией с уровнем BDNF. Преимущественно эти таксоны были представлены обитателями кишечника, а также таксоны, характерные для продуктов питания. Следует отметить, что выделенная негативная взаимосвязь «*Eubacterium* – BDNF» у пациентов с МЗО не является новой, Kim C.S. и соавт. (2021) показали, что содержание *Eubacterium* в микробиоме кишечника также отрицательно коррелирует с содержанием BDNF [163].

### 5.3. Содержание NGF в сыворотке крови при ожирении и его взаимосвязь с бактериальной ДНК кала и крови

Выявленное снижение сывороточной концентрации NGF при ожирении стало неожиданной находкой. Ряд работ показал, что при ожирении отмечается повышение уровня NGF в плазме крови [9,10]. На основании этого M. Hristova и L. Aloe (2006) даже сформулировали нейротрофическую гипотезу метаболического синдрома основанную на нейро-иммунных взаимодействиях, в которой NGF отводилась значительная роль в патогенезе [9]. Согласно этой гипотезе, хронический психоэмоциональный и/или воспалительный стресс сопровождается повышением в крови провоспалительных цитокинов, что приводит к гиперпродукции NGF. Повышение концентрации этого нейротрофина опосредует развитие дисбаланса продукции нейромедиаторов, что приводит к активации вегетативной нервной системы (в частности *n. vagus*), стимуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, еще большей активации иммунной системы и избыточной продукции нейропептида Y. Нарушение регуляции пищевого поведения, гиперинсулинемия, гиперкортизолемиа и

увеличение уровня провоспалительных цитокинов приводят к гиперфагии, ожирению и, в конечном итоге, формированию инсулинорезистентности. Таким образом, согласно гипотезе М. Hristova и L. Aloe, дисбаланс нейромедиаторов вследствие повышенного содержания NGF является одним из ключевых аспектов в формировании инсулинорезистентности и развитии метаболического синдрома [9].

Противоречия с полученными нами данными могут быть объяснены тем, что в вышеупомянутых работах исследование концентрации NGF проводилось в плазме крови, тогда как в нашем исследовании определялась его концентрация в сыворотке. Нейротрофины NGF и BDNF присутствуют в крови не только в плазме, но и захватываются тромбоцитами и хранятся в их гранулах [164]. В 1994 Ordoñez G. и соавт. на мышах показали, что при диабете происходит снижение NGF в сыворотке, что согласуется с полученными нами данными [8]. Еще раньше, в 1990 г. Faradji V. и Sotelo J. выявили, что при диабетической нейропатии снижается концентрация сывороточного NGF [7].

Таким образом, для ожирения характерно, с одной стороны, увеличение концентрации NGF в плазме и снижение его содержания в сыворотке. Причиной таких разнонаправленных изменений может быть нарушение захвата NGF тромбоцитами. На сегодняшний день нет убедительных данных о механизмах захвата NGF тромбоцитами, но можно предположить следующие варианты: поступление NGF через открытую канальцевую систему (ОКС) тромбоцитов или его связывание с TrkA и последующим эндоцитозом. Интернализация TrkA с NGF и образование «сигнальных эндосом» была описана для нейронов, в которых эндосомы могут транспортироваться по отросткам нейрона к телу клетки [165]. TrkA экспрессируется на мегакариоцитах и было показано, что действие NGF через TrkA подавляет мегакариопоэз и стимулирует тромбоцитопоэз [166]. Однако не известно, присутствует ли TrkA на зрелых тромбоцитах. Поступление NGF в тромбоциты через ОКС представляется более вероятным. В своей работе Kniewallner K. и соавт. (2015) показали, что ультразвук способствует более

эффективной «загрузке» гранул тромбоцитов NGF [167]. Несмотря на более чем 50-летнюю историю изучения ОКС тромбоцитов мы до сих пор не знаем, как осуществляется и регулируется захват биологически активных веществ через нее [168]. При ожирении наблюдается изменение функциональной активности сигнальных путей и повышение реактивности тромбоцитов [169]. Скорее всего, дисфункция сигнальных путей – не единственное изменение тромбоцитов при ожирении. Возможно ожирение сказывается и на ОКС тромбоцитов, что приводит к нарушению захвата NGF. Стоит отметить, что гемодинамика и гемореология значительно влияют на функционирование тромбоцитов. Изменение гемореологических характеристик и функциональной активности тромбоцитов наблюдается у пациентов с СДII и метаболическим синдромом и вносит свой негативный вклад в формирование клинической картины при ишемическом инсульте [170]. Ожирение, также, ассоциировано с изменением гемодинамики, а потеря веса – с улучшением гемодинамических показателей [171,172]. Таким образом, изменение гемодинамических и гемореологических показателей при ожирении также может вносить свой вклад в снижение поступления NGF в тромбоциты.

Если принять гипотезу о снижении запасания NGF в тромбоцитах при ожирении, тогда становится понятно, почему сывороточная концентрация NGF гораздо выше у лиц с нормальной массой тела. Ростовые факторы обладают коротким периодом полужизни и быстро подвергаются протеолизу. Запасание NGF в тромбоцитах, по-видимому, защищает нейротрофин от действия пептидаз, тем самым увеличивая его период полужизни и, как следствие, сывороточную концентрацию, что характерно для лиц с нормальной массой тела.

Так как снижение содержание NGF по сравнению с Группой 1 наблюдалось и у пациентов с МЗО и у пациентов с МНЗО, можно предполагать, что вне зависимости от метаболического фенотипа у пациентов с ожирением нарушается «загрузка» тромбоцитов NGF. При этом у пациентов с МНЗО уровень NGF был выше, чем у пациентов МЗО. Подобные отличия

могут быть опосредованы влиянием провоспалительных цитокинов на жировую ткань. Peeraully M.R. и соавт. (2004) показали, что TNF $\alpha$  повышает секрецию NGF белыми адипоцитами [94]. Учитывая, что «уровень» воспаления при МНЗО выше, чем при МЗО, более активная продукция NGF жировой тканью у пациентов с МНЗО представляется логичным следствием [22].

Корреляционный анализ показал, что для Группы 1 характерна позитивная ассоциация NGF с остеокином и миостатином-GDF8. Все эти белки являются миокинами, т.е. синтезируются мышечной тканью [173,174]. Очевидно, у здоровых доноров мышцы вносят значительный вклад в формирование пула NGF сыворотки. У пациентов Группы 2 и пациентов с МЗО, но не с МНЗО, уровень NGF положительно коррелировал с содержанием аспросина. Аспросин – недавно открытый адипокин, обладающий гипергликемическим эффектом, причем ожирение характеризуется более высокими концентрациями этого белка [175]. NGF также может синтезироваться в белой жировой ткани [176]. Появление позитивной связи «NGF – аспросин» указывает, что у пациентов Группы 2 и у пациентов с МЗО жировая ткань вносит значительный вклад в формирование пула NGF сыворотки. Следует отметить, что гипергликемия в норме подавляет секрецию аспросина по механизму отрицательной обратной связи [177]. Учитывая, что для МНЗО, в отличие от МЗО характерны более высокие концентрации глюкозы в крови это может быть причиной утраты взаимосвязи «NGF – аспросин».

Несмотря на более чем полувековую историю изучения NGF и открытия его многочисленных эффектов, относительно немного известно о регуляции синтеза этого нейротрофина. Усиление экспрессии NGF наблюдается в ответ на глутамат, ацетилхолин, под действием глюкокортикоидов и интерлейкина 1 [13,178]. Имеются данные, что бутират также способен усиливать экспрессию NGF [179]. Так как в литературе мы не обнаружили описания влияния других микробных метаболитов на синтез и секрецию NGF, мы проанализировали



<i>Gemellaceae</i>	+									
<i>Alcaligenaceae</i>	-									
<i>ML615J-28</i>										
<i>Clostridiales</i>										

Все таксоны микробиома кала, позитивно коррелировавшие с уровнем NGF были способны к синтезу бутирата и большей частью – к деградации муцина. Разрушение муцинового слоя этими микроорганизмами может увеличивать кишечную проницаемость и облегчать попадание бутирата во внутреннюю среду организма, тем самым приводя к появлению позитивной корреляции с концентрацией NGF. Другим возможным следствием увеличения кишечной проницаемости является лучшая транслокация ряда PAMPs, в частности LPS. В свою очередь, PAMPs взаимодействуя с образ-распознающими рецепторами, такими как TLRs, потенцируют развитие воспаления и секрецию провоспалительных цитокинов, в т.ч. IL1 $\beta$  [180]. Было показано, что IL1 $\beta$  стимулирует секрецию NGF, что может объяснять положительную взаимосвязь между муцин-деградирующими бактериями и содержанием этого нейротрофина [181]. Однако выявление таксонов, отрицательно коррелирующих с содержанием NGF, подразумевает наличие дополнительных взаимодействий «кишечный микробиом – NGF».

Интересно, что у здоровых доноров Группы 1 практически отсутствовали представители, содержание которых в микробиоме было значимо связано с содержанием NGF. По-видимому, это свидетельствует о том, что в условиях нормальной кишечной проницаемости, характерной для здоровых доноров, деятельность кишечного микробиома не является значительным фактором для формирования пула сывороточного NGF.

В общей группе пациентов с ожирением состав кишечного микробиома также практически не был ассоциирован с уровнем NGF. Однако, после разделения по метаболическому типу ожирения обнаружился целый спектр таксонов, коррелировавших с концентрацией этого нейротрофина. Причем эти таксоны были уникальны для каждой из подгрупп (МЗО и МНЗО). Появление более тесной связи «кишечный микробиом – NGF» при ожирении (любого

метаболического фенотипа) может быть следствием увеличения кишечной проницаемости, характерной для лиц с избыточной массой тела [182]. Возможно, подобная связь является одной из причин, почему сывороточная концентрация NGF значительно ниже при ожирении.

У пациентов с МЗО было выявлено значительное количество таксонов, как положительно, так и отрицательно с уровнем NGF. У пациентов с МНЗО, напротив, большая часть корреляций носила отрицательный характер и только *Fusobacterium spp.* и *Slackia spp.* позитивно ассоциировались с содержанием NGF. Учитывая преобладание негативного влияния таксонов кишечного микробиома на уровень NGF у пациентов с МНЗО, становится понятно, почему максимальное содержание данного нейротрофина наблюдалось у пациентов с низкими показателями микробного разнообразия. А поскольку для пациентов с МНЗО характерно более выраженное увеличение кишечной проницаемости по сравнению с МЗО, появление тесной связи «NGF – разнообразие кишечного микробиома» не является удивительным [183].

Так же, как и для BDNF, для NGF были характерны как позитивные, так и негативные ассоциации с некоторыми таксонами микробиома крови. Проанализировав привычную среду обитания этих таксонов (табл. 23, 24), было выявлено, что большая часть взаимосвязанных с NGF таксонов является обитателями кишечной флоры и, очевидно, транслоцируется именно оттуда.

Табл. 23. Среда обитания таксонов микробиома крови, положительно коррелировавших с сывороточной концентрацией NGF.

Группа	Таксон микробиома крови	Среда обитания
Группа 1	<i>Akkermansia muciniphila</i>	Кишечник
	<i>Dorea spp.</i>	Кишечник, почва
	<i>Aerococcus spp.</i>	Кожа, пыль
Группа 2	<i>Ruminococcus bromii</i>	Кишечник
МЗО	[ <i>Prevotella</i> ] <i>spp.</i>	Кишечник
МНЗО	<i>Ruminococcus bromii</i>	Кишечник

Табл. 24. Среда обитания таксонов микробиома крови, отрицательно коррелировавших с сывороточной концентрацией NGF.

Группа	Таксон микробиома крови	Среда обитания
--------	-------------------------	----------------

Группа 1	<i>Clostridium spp.</i>	Кишечник, почва, вода
	<i>Oxalobacteraceae</i>	Кишечник, почва, вода
	<i>Pirellulaceae</i>	Кишечник, почва, вода
	<i>Chitinophagaceae</i>	Кишечник, почва, вода
	<i>Nocardioideaceae</i>	Почва, вода
	<i>[Eubacterium] spp.</i>	Кишечник
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	Почва, вода
МЗО	<i>Christensenellaceae</i>	Кишечник
МНЗО	<i>Bacteroides spp.</i>	Кишечник
	<i>Thermus spp.</i>	Минеральные источники
	<i>[Barnesiellaceae]</i>	Кишечник
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Кишечник
	<i>Roseburia spp.</i>	Кишечник
	<i>Oxalobacteraceae</i>	Кишечник, почва, вода

Анализ взаимосвязи содержания отдельных таксонов микробиома крови и NGF показал, что в Группе 1 одним из основных таксонов, положительно коррелировавших с концентрацией этого нейротрофина был *Akkermansia muciniphila*. В последние годы роли *A. muciniphila* в кишечном микробиоме уделяется пристальное внимание. Являясь облигатным анаэробом *A. muciniphila* обитает непосредственно в толще муцина в отличие от других представителей кишечного микробиома, которые в основном формируют микробный барьер поверх муцинового слоя [184,185]. *A. muciniphila* участвует в поддержании целостности эпителиоцитов кишечника и нормальной толщины слизистого слоя, а также регулирует экспрессию генов в эпителиоцитах кишечника и в иммунокомпетентных клетках [186]. Применение этого микроорганизма в качестве пробиотика представляется перспективным с целью уменьшения проницаемости кишечника и нормализации метаболического гомеостаза у пациентов с ожирением и сахарным диабетом II типа, для которых характерно снижение содержания *A. muciniphila* [187]. Микробная транслокация из кишечника очевидно происходит из муцинового слоя, находящегося непосредственно поверх кишечного эпителия. Можно предполагать, что большее содержание *A. muciniphila* препятствует проникновению других микроорганизмов в слой слизи и их транслокации из просвета кишечника (рис. 22). Появление положительной взаимосвязи «*A. muciniphila* – NGF» у здоровых доноров

свидетельствует о том, что деятельность этого микроорганизма, направленная на поддержание целостности стенки кишечника, ассоциирована с более высокими уровнями NGF. По-видимому, микробная транслокация кишечной флоры негативно сказывается на содержании NGF. Подобное предположение подтверждают многочисленными негативными взаимосвязями между уровнем этого нейротрофина и рядом представителей кишечной флоры, такими как [*Eubacterium*] spp., *Clostridium* spp. и *Oxalobacteraceae*.

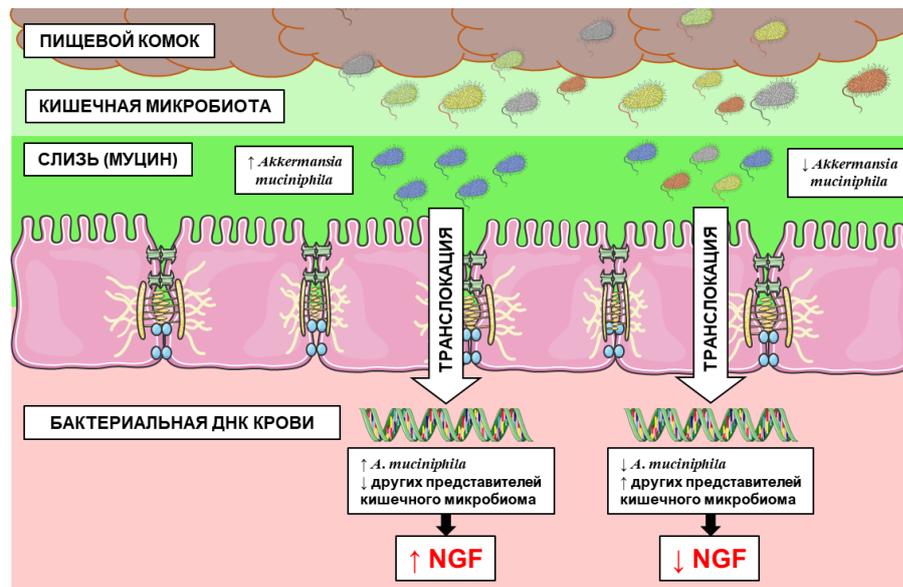


Рис. 22. Возможное влияние *A. muciniphila* на транслокацию других представителей кишечного микробиома и формирование пула NGF сыворотки у Группы 1.

У пациентов с ожирением и, в частности, с МНЗО, единственным таксоном, положительно коррелировавшим с уровнем NGF, был *Ruminococcus bromii*. Следует отметить, что *R. bromii* является одним из основных бутират-продуцирующих бактерий кишечника, который, в свою очередь, способен усиливать экспрессию NGF [179,188]. Возможно, появление связи «*R. bromii* – NGF», обуславливается бутиратом и объяснимо повышенной проницаемостью кишечника, характерной для ожирения, особенно метаболически нездорового типа. У пациентов с МЗО такой связи выявлено не было, что скорее всего связано с более редкой представленностью этого таксона в микробиоме крови. ДНК *R. bromii* было выделено почти у

половины (n=17) пациентов с МНЗО, тогда как в группе лиц с МЗО ДНК данного вида определялось только у 2 пациентов. Также, как и у здоровых доноров, у пациентов с МНЗО был выделен ряд таксонов, характерных для кишечного микробиома, негативно коррелировавших с содержанием NGF. Однако у пациентов с МЗО подобные таксоны практически отсутствовали. Ранее мы высказывали предположение, что более разнообразный кишечный микробиом, характерный для лиц с МЗО обуславливает меньшую проницаемость кишечной стенки для микробной ДНК.

Несмотря на то, что PAMPs и провоспалительные цитокины, такие как  $IL1\beta$ ,  $IL6$  и  $TNF\alpha$ , способствуют продукции NGF [33], полученные нами данные свидетельствуют, что транслокация бактериальной ДНК из кишечника, в целом, негативно взаимосвязана с содержанием NGF в плазме, как у здоровых лиц, так и у пациентов с ожирением. Можно предполагать, что влияние транслокации кишечной микробиоты на уровень NGF не ограничивается потенцированием воспаления, а включает пока не установленные сигнальные молекулы и/или сигнальные пути.

## ВЫВОДЫ

1. Доля семейств *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* и *Prevotellaceae* в общем пуле бактериальной ДНК крови определяет разнообразие микробиома крови, вне зависимости от наличия или отсутствия ожирения. Метаболически нездоровое ожирение ассоциировано с увеличением доли семейств *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* и *Prevotellaceae* в общем пуле бактериальной ДНК крови и увеличением разнообразия микробиома крови, тогда как метаболически здоровое ожирение не приводит к подобным изменениям.

2. У здоровых доноров и пациентов с метаболически здоровым фенотипом ожирения разнообразие микробиома кала негативно ассоциировано с разнообразием бактериальной ДНК крови, а у пациентов с метаболически нездоровым фенотипом ожирения подобная связь носит положительный характер.

3. Ожирение любого метаболического фенотипа сопровождается снижением сывороточной концентрации NGF, тогда как содержание BDNF у пациентов с ожирением схоже со здоровыми донорами.

4. При ожирении наблюдается влияние конститутивных таксонов кишечного микробиома на уровень BDNF, что не характерно для здоровых доноров, у которых отмечено влияние только минорных таксонов. Ожирение любого метаболического фенотипа приводит к появлению взаимосвязи «кишечный микробиом – NGF», тогда как у здоровых доноров такая связь отсутствует.

5. Концентрации сывороточных BDNF и NGF не зависят от содержания основных таксонов микробиома крови, однако для пациентов характерен уникальный спектр минорных таксонов, чье содержание взаимосвязано с уровнями сывороточных нейротрофинов. Причем спектр таких таксонов зависит от наличия или отсутствия ожирения, а также его метаболического фенотипа.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

16S ДНК	– бактериальная ДНК, кодирующая 16S рРНК
AIM2	– absent in melanoma 2, белок, отсутствующий при меланоме 2
ANOVA	– analysis of variance, дисперсионный анализ
AP-1	– activator protein-1, активирующий белок-1
BDNF	– brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический (нейротропный) фактор мозга
cGAS	– cyclic GMP–AMP synthase, циклическая ГМФ-АМФ синтаза
CpG	– Cytidine-phosphate-Guanosine, цитидин-фосфат-гуанозин
Dia	– диастолическое артериальное давление
FGF21	– fibroblast growth factor 21, фактор роста фибробластов 21
FXR	– farnesoid X receptor, рецептор фарнезоида X
GLP1	– glucagon like peptide 1, глюкагоноподобный пептид 1 типа
GPR41	– G-coupled protein receptor 41, рецептор, связанный с G-белком 41 типа
GPR43	– G-coupled protein receptor 43, рецептор, связанный с G-белком 43 типа
GF мыши	– germ-free mice, мыши-гнотобионты
НОМА-IR	– homeostasis model assessment of insulin resistance, индекс инсулинорезистентности
IFN	– interferon, интерферон
IL12	– interleukin 12, интерлейкин 12
IL18	– interleukin 18, интерлейкин 18
IL1 $\beta$	– interleukin 1 $\beta$ , интерлейкин 1 $\beta$
IL6	– interleukin 6, интерлейкин 6
IRF3	– interferon regulatory factor 3, регуляторный фактор интерферона 3

IRF7	– interferon regulatory factor 7, регуляторный фактор интерферона 7
LPS	– lipopolysaccharides, липополисахариды
NF-κB	– nuclear factor κB, ядерный фактор каппа-B
NGF	– nerve growth factor, фактор роста нервов
OTUs	– operational taxonomic units, общее количество наблюдаемых операционных таксономических единиц
p75NTR	– p75 neurotrophin receptor, рецептор нейротрофина p75
PAMPs	– pathogen-associated molecular patterns, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PD	– phylogenetic diversity, филогенетическое разнообразие
PRRs	– pattern-recognition receptors, рецепторы распознавания образов
SCFAs	– short-chain fatty acids, короткоцепочечные жирные кислоты
STING	– stimulator of interferon genes, стимулятор генов интерферона
Sys	– систолическое артериальное давление
TLR4	– toll-like receptor 4, толл-подобные рецепторы 4 типа
TLR9	– toll-like receptor 9, толл-подобные рецепторы 9 типа
TNFα	– tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли альфа
TrkA	– tropomyosin receptor kinase A, киназа A тропомиозинового рецептора
TrkB	– tyrosine kinase B receptor, рецептор тирозинкиназы B
АД	– атопический дерматит
БА	– бронхиальная астма
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИМТ	– индекс массы тела

ИФА	– иммуноферментный анализ
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
МЗО	– метаболически здоровое ожирение
МНЗО	– метаболически нездоровое ожирение
ОКС	– открытая канальцевая система
ОТ	– окружность талии
ОХС	– общий холестерол сыворотки
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СДII	– сахарный диабет II типа
ТАГ	– триацилглицериды сыворотки
ХМ	– хиломикроны
ХС-ЛПВП	– холестерол липопротеинов высокой плотности
ХС-ЛПНП	– холестерол липопротеинов низкой плотности
ЦНС	– центральная нервная система

## ЛИТЕРАТУРА

1. Василевский Д.И. и др. Ожирение - социально значимая проблема современности // Российские биомедицинские исследования. 2019. Vol. 4, № 3. P. 29–33.
2. Piché M., Tchernof A., Després J. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases // *Circ Res*. 2020. Vol. 126, № 11. P. 1477–1500.
3. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants // *Lancet*. NCD Risk Factor Collaboration. Open Access article distributed under the terms of CC BY, 2016. Vol. 387, № 10026. P. 1377–1396.
4. De Lorenzo A. et al. Obesity: A preventable, treatable, but relapsing disease // *Nutrition*. United States, 2020. Vol. 71. P. 110615.
5. O'Brien P. et al. Neurological Consequences of Obesity // *Lancet Neurol*. 2017. Vol. 16, № 6. P. 465–477.
6. Rios M. Neurotrophins and the regulation of energy balance and body weight // *Handb. Exp. Pharmacol*. 2014. Vol. 220. P. 283–307.
7. Faradji V., Sotelo J. Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy. // *Acta Neurol. Scand*. Denmark, 1990. Vol. 81, № 5. P. 402–406.
8. Ordoñez G. et al. Low contents of nerve growth factor in serum and submaxillary gland of diabetic mice. A possible etiological element of diabetic neuropathy // *J. Neurol. Sci*. Netherlands, 1994. Vol. 121, № 2. P. 163–166.
9. Hristova M., Aloe L. Metabolic syndrome - Neurotrophic hypothesis // *Med. Hypotheses*. 2006. Vol. 66, № 3. P. 545–549.
10. Bulló M. et al. Circulating nerve growth factor levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women // *Eur. J. Endocrinol*. 2007. Vol. 157, № 3. P. 303–310.

11. Sandrini L. et al. Association between obesity and circulating brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels: Systematic review of literature and meta-analysis // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 8.
12. Monteiro R., Azevedo I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome // *Mediat. Inflamm.* 2010. Vol. 2010, № 289645. P. 1–10.
13. West A.E., Pruunsild P., Timmusk T. Neurotrophic Factors: Transcription and Translation // *Handbook of experimental pharmacology.* 2014. Vol. 220. 67–100 p.
14. Stilling R.M. et al. Microbes & neurodevelopment - Absence of microbiota during early life increases activity-related transcriptional pathways in the amygdala // *Brain. Behav. Immun.* Elsevier Inc., 2015. Vol. 50. P. 209–220.
15. Schéle E. et al. The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (Gcg) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) in the central nervous system // *Endocrinology.* United States, 2013. Vol. 154, № 10. P. 3643–3651.
16. Aygun H. et al. Electrophysiological, histopathological and biochemical evaluation of the protective effect of probiotic supplementation against PTZ-induced seizures in rats // *Eur. J. Neurol.* England, 2022.
17. Cuevas-Sierra A. et al. Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications // *Adv. Nutr.* Oxford University Press, 2019. Vol. 10, № 9. P. S17–S30.
18. Sanz Y., Moya-Pérez A. Microbiota, inflammation and obesity // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014. Vol. 817. P. 291–317.
19. Potgieter M. et al. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. Vol. 39, № 4. P. 567–591.
20. Ortiz S. et al. Bacterial DNA translocation holds increased insulin resistance and systemic inflammatory levels in morbid obese patients // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014. Vol. 99, № 7. P. 2575–2583.

21. Massier L. et al. Adipose tissue derived bacteria are associated with inflammation in obesity and type 2 diabetes // *Gut*. 2020. Vol. 69, № 10. P. 1796–1806.
22. Iacobini C. et al. Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity // *Metabolism*. Elsevier Inc., 2019. Vol. 92. P. 51–60.
23. Nikkari S. et al. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? // *J. Clin. Microbiol.* 2001. Vol. 39, № 5. P. 1956–1959.
24. Castillo D.J. et al. The healthy human blood microbiome: Fact or fiction? // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019. Vol. 9, № MAY. P. 1–12.
25. Velmurugan G. et al. Blood Microbiota and Circulating Microbial Metabolites in Diabetes and Cardiovascular Disease // *Trends Endocrinol. Metab.* Elsevier Ltd, 2020. Vol. 31, № 11. P. 835–847.
26. Goraya M.U. et al. Human circulating bacteria and dysbiosis in non-infectious diseases // *Front Cell Infect Microbiol.* 2022. Vol. 12, № 932702. P. 1–13.
27. Qiu J. et al. Association between blood microbiome and type 2 diabetes mellitus: A nested case-control study // *J. Clin. Lab. Anal.* 2019. Vol. 33, № 4. P. 1–7.
28. Ghaemi F. et al. Blood microbiota composition in Iranian pre-diabetic and type 2 diabetic patients // *Hum Antibodies*. 2021. Vol. 29, № 4. P. 243–248.
29. Amar J. et al. Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: Evidence for a concept // *Diabetologia*. 2011. Vol. 54, № 12. P. 3055–3061.
30. D'Aquila P. et al. Microbiome in Blood Samples From the General Population Recruited in the MARK-AGE Project: A Pilot Study // *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12, № July. P. 1–9.
31. Cheng Z. et al. The Central Role and Possible Mechanisms of Bacterial DNAs in Sepsis Development // *Mediators Inflamm.* 2020. Vol. 2020. P. 7418342.
32. Papathanassoglou E.D.E., Miltiadous P., Karanikola M.N. May BDNF Be Implicated in the Exercise-Mediated Regulation of Inflammation? *Critical*

Review and Synthesis of Evidence // *Biol. Res. Nurs. United States*, 2015. Vol. 17, № 5. P. 521–539.

33. Minnone G., De Benedetti F., Bracci-Laudiero L. NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 5.

34. Lee I. Te et al. Relationship between body weight and the increment in serum brain-derived neurotrophic factor after oral glucose challenge in men with obesity and metabolic syndrome A prospective study // *Med. (United States)*. 2016. Vol. 95, № 43.

35. Motamedi S., Karimi I., Jafari F. The interrelationship of metabolic syndrome and neurodegenerative diseases with focus on brain-derived neurotrophic factor (BDNF): Kill two birds with one stone // *Metab. Brain Dis. Metabolic Brain Disease*, 2017. Vol. 32, № 3. P. 651–665.

36. Slusher A.L. et al. Brain-derived neurotrophic factor and substrate utilization following acute aerobic exercise in obese individuals // *J. Neuroendocrinol.* 2015. Vol. 27, № 5. P. 370–376.

37. Boytsov S.A. et al. Epidemiology of Cardiovascular Diseases and their Risk Factors in Regions of Russian Federation (ESSE-RF) study. Ten years later // *Cardiovasc. Ther. Prev. (Russian Fed.)* 2021. Vol. 20, № 5. P. 143–152.

38. Tseng C., Wu C. The gut microbiome in obesity // *J. Formos. Med. Assoc. Elsevier Ltd*, 2019. Vol. 118, № Suppl 1. P. S3–S9.

39. Lee C.J., Sears C.L., Maruthur N. Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2020. Vol. 1461, № 1. P. 37–52.

40. Singer-Englar T., Barlow G., Mathur R. Obesity, diabetes, and the gut microbiome: an updated review // *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* Taylor & Francis, 2019. Vol. 13, № 1. P. 3–15.

41. Гапонов А.М. и др. Особенности микробиома толстой кишки у пациентов с ожирением при его различных фенотипах (оригинальная статья) // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2021. Vol. 98, № 2. P. 144–155.

42. Котрова А.Д. и др. Гендерная оценка микробиома кишечника у больных с ожирением // Клиническая гастроэнтерология. 2021. № 10. P. 91–99.
43. Aron-Wisnewsky J. et al. Major microbiota dysbiosis in severe obesity: fate after bariatric surgery // Gut. 2019. Vol. 68, № 1. P. 70–82.
44. Abenavoli L. et al. Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics // Nutrients. 2019. Vol. 11, № 11. P. 2690.
45. González-regueiro J.A. et al. The Role of Bile Acids in Glucose Metabolism and Their Relation with Diabetes // Ann. Hepatol. Elsevier, 2019. Vol. 16, № Suppl. 1. P. S15–S20.
46. Staley C. et al. Interaction of Gut Microbiota with Bile Acid Metabolism and its Influence on Disease States // Appl Microbiol Biotechnol. 2017. Vol. 101, № 1. P. 47–64.
47. Chávez-Talavera O. et al. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia and NAFLD // Gastroenterology. Elsevier Inc., 2017. Vol. 152, № 7. P. 1679–1694.
48. Rosenbaum M., Knight R., Leibel R.L. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity // Trends Endocrinol. Metab. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 26, № 9. P. 493–501.
49. Hu J. et al. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism // Crit Rev Food Sci Nutr. 2018. Vol. 58, № 8. P. 1243–1249.
50. Blaak E.E. et al. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health // Benef. Microbes. 2020. Vol. 11, № 5. P. 411–455.
51. Massier L. et al. Impaired Intestinal Barrier and Tissue Bacteria: Pathomechanisms for Metabolic Diseases // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2021. Vol. 12, № March. P. 1–18.
52. Shen J., Obin M.S., Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance // Mol. Aspects Med. Elsevier Ltd, 2013. Vol. 34, № 1. P. 39–58.
53. Фармакопея Евразийского экономического союза [Electronic resource]. Москва, 2020. URL:

<http://www.eurasiancommission.org/ru/act/tehnreg/deptehreg/LSMI/Pages/pharmacopoeia.aspx>.

54. ГОСТ ISO 11737-2-2011 МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ Стерилизация медицинских изделий МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ Часть 2 Испытания на стерильность, проводимые при валидации процессов стерилизации. 2013.

55. Berg G. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges // *Microbiome*. *Microbiome*, 2020. Vol. 8, № 1. P. 1–22.

56. Domingue G.J., Schlegel J.U. Novel bacterial structures in human blood: culture isolation // *Infect. Immun.* 1977. Vol. 15, № 2. P. 621–627.

57. Tedeschi G.G. et al. Electron microscopical evidence of the evolution of corynebacteria-like microorganisms within human erythrocytes // *Experientia*. 1978. Vol. 34, № 4. P. 458–460.

58. Федоров Н.А. и др. Частота обнаружения бактериальной ДНК в цельной крови доноров // *Доклады академии наук*. 2005. Vol. 402, № 6. P. 841–843.

59. Païssé S. et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing // *Transfusion*. United States, 2016. Vol. 56, № 5. P. 1138–1147.

60. Wiest R., Lawson M., Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis // *J. Hepatol.* European Association for the Study of the Liver, 2014. Vol. 60, № 1. P. 197–209.

61. Chakaroun R.M. et al. Circulating bacterial signature is linked to metabolic disease and shifts with metabolic alleviation after bariatric surgery // *Genome Med.* *Genome Medicine*, 2021. Vol. 13, № 1. P. 1–21.

62. Kumagai Y., Takeuchi O., Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA // *Adv Drug Deliv Rev.* 2008. Vol. 60, № 7. P. 795–804.

63. Kumari P. et al. AIM2 in health and disease: inflammasome and beyond // *Immunol Rev.* 2021. Vol. 297, № 1. P. 83–95.

64. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License [Electronic resource]. URL: <https://smart.servier.com/> (accessed: 06.07.2022).

65. Thomalla M. et al. Evidence of an anti-inflammatory toll-like receptor 9 (TLR 9) pathway in adipocytes // *J. Endocrinol.* 2019. Vol. 240, № 2. P. 325–343.

66. Guillemot-Legris O., Muccioli G.G. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus // *Trends Neurosci.* 2017. Vol. 40, № 4. P. 237–253.

67. Kumar V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation // *J. Neuroimmunol.* 2019. Vol. 332, № February. P. 16–30.

68. Motwani M., Pesiridis S., Fitzgerald K.A. DNA sensing by the cGAS–STING pathway in health and disease // *Nat. Rev. Genet.* Springer US, 2019. Vol. 20, № 11. P. 657–674.

69. Bai J. et al. DsbA-L prevents obesity-induced inflammation and insulin resistance by suppressing the mtDNA release-activated cGAS-cGAMP-STING pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2017. Vol. 114, № 46. P. 12196–12201.

70. Bai J. et al. Mitochondrial stress-activated cGAS-STING pathway inhibits thermogenic program and contributes to overnutrition-induced obesity in mice // *Commun. Biol.* 2020. Vol. 3, № 1. P. 257.

71. Engin A.B. Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity // *Adv. Exp. Med. Biol.* United States, 2017. Vol. 960. P. 327–343.

72. Murphy A.J. et al. IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome // *Cell Metab.* United States, 2016. Vol. 23, № 1. P. 155–164.

73. Kawai T., Autieri M. V, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2021. Vol. 320, № 3. P. C375–C391.

74. Blüher M. Metabolically Healthy Obesity // *Endocr. Rev.* 2020. Vol. 41, № 3.

75. Graeber M.B., Li W., Rodriguez M.L. Role of microglia in CNS inflammation. // *FEBS Lett. England*, 2011. Vol. 585, № 23. P. 3798–3805.

76. Thaler J.P. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans // *J. Clin. Invest.* 2012. Vol. 122, № 1. P. 153–162.

77. Button E.B. et al. Microglial cell activation increases saturated and decreases monounsaturated fatty acid content, but both lipid species are proinflammatory. // *Lipids. United States*, 2014. Vol. 49, № 4. P. 305–316.

78. Wang Z. et al. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- $\kappa$ B signalling. // *Br. J. Nutr. England*, 2012. Vol. 107, № 2. P. 229–241.

79. Van Dyken P., Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood–Brain Barrier // *Front. Neurosci.* 2018. Vol. 12, № December. P. 1–19.

80. Stino A.M., Smith A.G. Peripheral neuropathy in prediabetes and the metabolic syndrome // *J. Diabetes Investig.* 2017. Vol. 8, № 5. P. 646–655.

81. Zeng W. et al. Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis // *Cell. United States*, 2015. Vol. 163, № 1. P. 84–94.

82. Dye L. et al. The relationship between obesity and cognitive health and decline // *Proc. Nutr. Soc.* 2017. Vol. 76, № 4. P. 443–454.

83. Raji C. et al. Brain Structure and Obesity // *Hum Brain Mapp.* 2010. Vol. 31, № 3. P. 353–364.

84. Kazamel M., Stino A.M., Smith A.G. Metabolic syndrome and peripheral neuropathy // *Muscle and Nerve.* 2021. Vol. 63, № 3. P. 285–293.

85. Smith A.G., Singleton J.R. Obesity and hyperlipidemia are risk factors for early diabetic neuropathy // *J. Diabetes Complications.* 2013. Vol. 27, № 5. P. 436–442.

86. Callaghan B.C. et al. Exploring the association between metabolic syndrome components and polyneuropathy in an obese population // *JAMA Neurol.* 2016. Vol. 73, № 12. P. 1468–1476.

87. Rocco M.L. et al. Nerve Growth Factor: Early Studies and Recent Clinical Trials // *Curr. Neuropharmacol.* 2018. Vol. 16, № 10. P. 1455–1465.
88. Ding X.W. et al. Nerve growth factor in metabolic complications and Alzheimer's disease: Physiology and therapeutic potential // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* Elsevier B.V, 2020. Vol. 1866, № 10. P. 165858.
89. Aloe L. et al. Nerve growth factor: From the early discoveries to the potential clinical use // *J. Transl. Med.* 2012. Vol. 10, № 1. P. 1–15.
90. Huang E.J., Reichardt L.F. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function // *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. Vol. 24. P. 677–736.
91. Bruno M.A., Cuello A.C. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103, № 17. P. 6735–6740.
92. Chaldakov G.N. The metabotropic NGF and BDNF: An emerging concept // *Arch. Ital. Biol.* 2011. Vol. 149, № 2. P. 257–263.
93. Nisoli E. et al. Expression of nerve growth factor in brown adipose tissue: implications for thermogenesis and obesity. // *Endocrinology.* United States, 1996. Vol. 137, № 2. P. 495–503.
94. Peeraully M.R., Jenkins J.R., Trayhurn P. NGF gene expression and secretion in white adipose tissue: regulation in 3T3-L1 adipocytes by hormones and inflammatory cytokines. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* United States, 2004. Vol. 287, № 2. P. E331-9.
95. Pingitore A. et al. Fine tuning of insulin secretion by release of nerve growth factor from mouse and human islet  $\beta$ -cells // *Mol. Cell. Endocrinol.* Elsevier Ltd, 2016. Vol. 15, № 436. P. 23–32.
96. Houtz J. et al. Neurotrophin Signaling Is Required for Glucose-Induced Insulin Secretion // *Dev Cell.* 2016. Vol. 39, № 3. P. 329–345.
97. Cao Y., Wang H., Zeng W. Whole-tissue 3D imaging reveals intra-adipose sympathetic plasticity regulated by NGF-TrkA signal in cold-induced beiging // *Protein Cell.* Higher Education Press, 2018. Vol. 9, № 6. P. 527–539.

98. Notaras M., Buuse M. Van Den. Brain-Derived Neurotrophic Factor ( BDNF ): Novel Insights into Regulation and Genetic Variation // *Neurosci.* 2019. Vol. 25, № 5. P. 434–454.

99. Kowiański P. et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2018. Vol. 38, № 3. P. 579–593.

100. Marosi K., Mattson M.P. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges // *Trends Endocrinol. Metab.* Elsevier Ltd, 2014. Vol. 25, № 2. P. 89–98.

101. Camerino C. et al. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and osteocalcin gene relationship in energy regulation, bone homeostasis and reproductive organs analyzed by mrna quantitative evaluation and linear correlation analysis // *Front. Physiol.* 2016. Vol. 7, № OCT. P. 1–9.

102. Podyma B. et al. Metabolic homeostasis via BDNF and its receptors // *Trends Endocrinol Metab.* 2021. Vol. 32, № 7. P. 488–499.

103. Fulgenzi G. et al. Novel metabolic role for BDNF in pancreatic  $\beta$ -cell insulin secretion // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 1950.

104. Heiss C.N., Olofsson L.E. The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system // *J. Neuroendocrinol.* 2019. Vol. 31, № 5. P. 1–11.

105. Sharon G. et al. The Central Nervous System and the Gut Microbiome // *Cell.* Elsevier Inc., 2016. Vol. 167, № 4. P. 915–932.

106. Gupta A., Osadchiy V., Mayer E.A. Brain-gut-microbiome interactions in obesity and food addiction // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020. Vol. 17, № 11. P. 655–672.

107. Margolis K.G., Cryan J.F., Mayer E.A. The Microbiota-Gut-Brain Axis : From Motility to Mood // *Gastroenterology.* 2022. Vol. 160, № 5. P. 1486–1501.

108. Jamar G., Ribeiro D.A., Pisani L.P. High-fat or high-sugar diets as trigger inflammation in the microbiota-gut-brain axis // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Taylor & Francis, 2020. P. 1–19.

109. Bercik P. et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice // *Gastroenterology*. United States, 2011. Vol. 141, № 2. P. 599–609, 609.e1-3.

110. Sudo N. et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice // *J. Physiol.* 2004. Vol. 558, № 1. P. 263–275.

111. Desbonnet L. et al. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour // *Brain. Behav. Immun.* Elsevier Inc., 2015. Vol. 48, № April. P. 165–173.

112. Fröhlich E.E. et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication // *Brain. Behav. Immun.* 2016. Vol. 56. P. 140–155.

113. Cui M. et al. Total abdominal irradiation exposure impairs cognitive function involving miR-34a-5p/BDNF axis // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* Elsevier, 2017. Vol. 1863, № 9. P. 2333–2341.

114. Savignac H.M. et al. Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-d-aspartate receptor subunits and d-serine // *Neurochem. Int.* Elsevier Ltd, 2013. Vol. 63, № 8. P. 756–764.

115. O’Sullivan E. et al. BDNF expression in the hippocampus of maternally separated rats: Does *Bifidobacterium breve* 6330 alter BDNF levels? // *Benef. Microbes.* 2011. Vol. 2, № 3. P. 199–207.

116. Sun J. et al. *Clostridium butyricum* Attenuates Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depressive-Like Behavior in Mice via the Gut-Brain Axis // *J. Agric. Food Chem.* United States, 2018. Vol. 66, № 31. P. 8415–8421.

117. Borrelli L. et al. Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6, № July. P. 1–9.

118. Cuomo M. et al. DNA methylation profiles of Tph1a and BDNF in gut and brain of *L. Rhamnosus*-treated Zebrafish // *Biomolecules*. 2021. Vol. 11, № 2. P. 1–13.

119. Hwang Y.H. et al. Efficacy and safety of *Lactobacillus plantarum* C29-fermented soybean (DW2009) in individuals with mild cognitive impairment: A 12-week, multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial // *Nutrients*. 2019. Vol. 11, № 2.

120. Li C., Cai Y.Y., Yan Z.X. Brain-derived neurotrophic factor preserves intestinal mucosal barrier function and alters gut microbiota in mice // *Kaohsiung J. Med. Sci.* Published by Elsevier Taiwan LLC, 2018. Vol. 34, № 3. P. 134–141.

121. Steinkamp M. et al. Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation // *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2012. Vol. 18, № 4. P. BR117-22.

122. Ma D., Forsythe P., Bienenstock J. Live *Lactobacillus rhamnosus* [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. // *Infect. Immun.* 2004. Vol. 72, № 9. P. 5308–5314.

123. Ju I.G. et al. CCL01, a novel formulation composed of *Cuscuta* seeds and *Lactobacillus paracasei* NK112, enhances memory function via nerve growth factor-mediated neurogenesis. // *Food Funct.* England, 2021. Vol. 12, № 21. P. 10690–10699.

124. Rahimlou M. et al. Effects of long-term administration of Multi-Strain Probiotic on circulating levels of BDNF, NGF, IL-6 and mental health in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Nutr. Neurosci.* Taylor & Francis, 2022. Vol. 25, № 2. P. 411–422.

125. Heese K. et al. NF-kappaB modulates lipopolysaccharide-induced microglial nerve growth factor expression // *Glia.* United States, 1998. Vol. 22, № 4. P. 401–407.

126. Heese K., Inoue N., Sawada T. NF-κB Regulates B-Cell-Derived Nerve Growth Factor Expression // *Cell. Mol. Immunol.* 2006. Vol. 3, № 1. P. 63–66.

127. Rage F., Silhol M., Tapia-Arancibia L. IL-1beta regulation of BDNF expression in rat cultured hypothalamic neurons depends on the presence of glial cells // *Neurochem. Int. England*, 2006. Vol. 49, № 5. P. 433–441.

128. Expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) // *J. Am. Med. Assoc.* 2001. Vol. 285, № 19. P. 2486–2497.

129. Kobalava Z.D. et al. Arterial hypertension in adults. Clinical guidelines 2020 // *Russ. J. Cardiol.* 2020. Vol. 25, № 3. P. 149.

130. Snaith R.P., Zigmond A.S. The hospital anxiety and depression scale // *British medical journal (Clinical research ed.)*. 1986. Vol. 292, № 6516. P. 344.

131. Singh B., Saxena A. Surrogate markers of insulin resistance: A review // *World J. Diabetes.* 2010. Vol. 1, № 2. P. 36–47.

132. Thaiss C.A. et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection // *Science (80-. )*. 2018. Vol. 359, № 6382. P. 1376–1383.

133. Leite G.G.S. et al. Mapping the Segmental Microbiomes in the Human Small Bowel in Comparison with Stool: A REIMAGINE Study // *Dig. Dis. Sci.* Springer US, 2020. Vol. 65, № 9. P. 2595–2604.

134. Hirt P.A. et al. Skin changes in the obese patient // *J. Am. Acad. Dermatol.* Elsevier Inc, 2019. Vol. 81, № 5. P. 1037–1057.

135. Flippo K.H., Potthoff M.J. Metabolic Messengers: FGF21 // *Nat. Metab.* 2021. Vol. 3, № 3. P. 309–317.

136. Shu H.-C. et al. BDNF gene polymorphism and serum level correlate with liver function in patients with hepatitis B-induced cirrhosis. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2019. Vol. 12, № 6. P. 2368–2380.

137. Girard M. et al. BDNF levels and liver stiffness in subjects with alcohol use disorder: Evaluation after alcohol withdrawal // *Am. J. Drug Alcohol Abuse.* Taylor & Francis, 2021. Vol. 47, № 2. P. 191–198.

138. Halievski K. et al. Muscle BDNF improves synaptic and contractile muscle strength in Kennedy's disease mice in a muscle-type specific manner // *J. Physiol.* 2020. Vol. 598, № 13. P. 2719–2739.

139. Lee S.J. Targeting the myostatin signaling pathway to treat muscle loss and metabolic dysfunction // *J. Clin. Invest.* 2021. Vol. 131, № 9. P. 1–9.

140. Akbarian S.-A. et al. Association of Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms with body mass index: A systematic review and meta-analysis // *Advances in medical sciences.* Netherlands, 2018. Vol. 63, № 1. 43–56 p.

141. Pillai A. et al. Plasma BDNF levels vary in relation to body weight in females // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 7. P. e39358.

142. Yang F. et al. Sex difference in the association of body mass index and BDNF levels in Chinese patients with chronic schizophrenia // *Psychopharmacology (Berl).* Germany, 2019. Vol. 236, № 2. P. 753–762.

143. Wu X. et al. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2008. Vol. 11, № 8. P. 1123–1134.

144. Spichak S. et al. Microbially-derived short-chain fatty acids impact astrocyte gene expression in a sex-specific manner // *Brain, Behav. Immun. - Heal.* Elsevier Ltd, 2021. Vol. 16, № June. P. 100318.

145. Fukuchi M. et al. Excitatory GABA induces BDNF transcription via CRT1 and phosphorylated CREB-related pathways in immature cortical cells // *J. Neurochem.* England, 2014. Vol. 131, № 2. P. 134–146.

146. Strandwitz P. et al. GABA Modulating Bacteria of the Human Gut Microbiota // *Nat Microbiol.* 2019. Vol. 4, № 3. P. 396–403.

147. Allam-Ndoul B., Castonguay-Paradis S., Veilleux A. Gut microbiota and intestinal trans-epithelial permeability // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 17. P. 1–14.

148. Yogeswara I.B.A., Maneerat S., Haltrich D. Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria—a key enzyme in Gaba synthesis // *Microorganisms.* 2020. Vol. 8, № 12. P. 1–24.

149. Louis P., Flint H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota // *Env. Microbiol.* 2017. Vol. 19, № 1. P. 29–41.
150. Corfield A.P. et al. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria // *Infect. Immun.* 1992. Vol. 60, № 10. P. 3971–3978.
151. Wright D.P., Rosendale D.I., Robertson A.M. Prevalence of enzymes involved in mucin oligosaccharide degradation and evidence for a small operon of genes expressed during growth on mucin // *FEMS Microbiol. Lett.* 2000. Vol. 190, № 1. P. 73–79.
152. Enzyme Database - BRENDA [Electronic resource]. URL: <https://www.brenda-enzymes.org/index.php> (accessed: 01.12.2022).
153. Chmielewski F., About I., Chung S.H. C5L2 Receptor Represses Brain-Derived Neurotrophic Factor Secretion in Lipoteichoic Acid-Stimulated Pulp Fibroblasts // *J. Dent. Res. United States*, 2017. Vol. 96, № 1. P. 92–99.
154. Son M.J. et al. Association of atopic dermatitis with obesity via a multi-omics approach: A protocol for a case-control study // *Medicine (Baltimore)*. 2019. Vol. 98, № 29. P. e16527.
155. Guseva D. et al. Neuronal branching of sensory neurons is associated with BDNF-positive eosinophils in atopic dermatitis // *Clin. Exp. Allergy. England*, 2020. Vol. 50, № 5. P. 577–584.
156. Sideleva O., Black K., Dixon A. Effects of obesity and weight loss on airway physiology and inflammation in asthma // *Pulm Pharmacol Ther.* 2013. Vol. 26, № 4. P. 455–458.
157. Sreter K.B. et al. Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Concentration and BDNF/TrkB Gene Polymorphisms in Croatian Adults with Asthma // *J. Pers. Med.* 2020. Vol. 10, № 4.
158. Pascal M. et al. Microbiome and Allergic Diseases // *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 1584.

159. Jiménez-Cortegana C. et al. Possible Role of Leptin in Atopic Dermatitis : A Literature Review // *Biomolecules*. 2021. Vol. 11, № 1642. P. 1–11.

160. Zhang L. et al. Association of asthma diagnosis with leptin and adiponectin: a systematic review and meta-analysis. // *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res. England*, 2017. Vol. 65, № 1. P. 57–64.

161. Li C. et al. Leptin regulates exon-specific transcription of the Bdnf gene via epigenetic modifications mediated by an AKT/p300 HAT cascade // *Mol. Psychiatry*. 2021. Vol. 26, № 8. P. 3701–3722.

162. Rohm T. V et al. Obesity in Humans Is Characterized by Gut Inflammation as Shown by Pro-Inflammatory Intestinal Macrophage Accumulation // *Front. Immunol*. 2021. Vol. 12. P. 668654.

163. Kim C.-S. et al. Probiotic Supplementation Improves Cognitive Function and Mood with Changes in Gut Microbiota in Community-Dwelling Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Trial // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci*. 2021. Vol. 76, № 1. P. 32–40.

164. Hochstrasser T., Ehrlich D., Humpel C. Antidepressants and Anti-Inflammatory Drugs Differentially Reduce the Release of NGF and BDNF from Rat Platelets. 2015. Vol. 46, № 1. P. 29–34.

165. Sofroniew M., Howe C., Mobley W. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair // *Annu Rev Neurosci*. 2001. Vol. 24, № 1217–1281. P. 926–932.

166. Kizilyer A. et al. Inhibition of Tropomyosin Receptor Kinase A Signaling Negatively Regulates Megakaryopoiesis and induces Thrombopoiesis // *Sci. Rep. Springer US*, 2019. Vol. 9, № 1. P. 2781.

167. Kniewallner K.M., Grimm N., Humpel C. Platelet-derived nerve growth factor supports the survival of cholinergic neurons in organotypic rat brain slices // *Neurosci Lett*. 2015. Vol. 574. P. 64–69.

168. Selvadurai M. V, Hamilton J.R. Structure and function of the open canalicular system – the platelet’s specialized internal membrane network // *Platelets*. Taylor & Francis, 2018. Vol. 29, № 4. P. 319–325.

169. Barrachina M.N. et al. Phosphoproteomic Analysis of Platelets in Severe Obesity Uncovers Platelet Reactivity and Signaling Pathways Alterations // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* United States, 2021. Vol. 41, № 1. P. 478–490.

170. Танашян М.М. и др. Гемореология и гемостаз у больных с ишемическим инсультом на фоне сахарного диабета 2 типа и метаболического синдрома // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2014. Vol. 8, № 3. P. 14–20.

171. Alpert M.A., Omran J., Bostick B.P. Effects of Obesity on Cardiovascular Hemodynamics, Cardiac Morphology, and Ventricular Function. // *Curr. Obes. Rep.* United States, 2016. Vol. 5, № 4. P. 424–434.

172. Reddy Y.N. V et al. Hemodynamic Effects of Weight Loss in Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. // *JACC. Heart Fail.* 2019. Vol. 7, № 8. P. 678–687.

173. Mancinelli R. et al. Biological aspects of selected myokines in skeletal muscle: Focus on aging // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 16.

174. Zhang X. et al. Osteocrin, a novel myokine, prevents diabetic cardiomyopathy via restoring proteasomal activity // *Cell Death Dis.* Springer US, 2021. Vol. 12, № 7. P. 1–12.

175. Yuan M. et al. Asprosin: A Novel Player in Metabolic Diseases // *Front Endocrinol.* 2020. Vol. 11, № 64. P. 1–7.

176. Chun S.Y. et al. Preparation and Characterization of Human Adipose Tissue-Derived Extracellular Matrix, Growth Factors, and Stem Cells: A Concise Review // *Tissue Eng. Regen. Med.* Springer Singapore, 2019. Vol. 16, № 4. P. 385–393.

177. Romere C. et al. Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone // *Cell.* 2016. Vol. 165, № 3. P. 566–569.

178. Murata K. et al. PGE1 Attenuates IL-1 $\beta$ -induced NGF Expression in Human Intervertebral Disc Cells // *Spine (Phila. Pa. 1976).* United States, 2016. Vol. 41, № 12. P. E710–E716.

179. Long X. et al. Butyrate promotes visceral hypersensitivity in an IBS-like model via enteric glial cell-derived nerve growth factor // *Neurogastroenterol. Motil.* England, 2018. Vol. 30, № 4. P. e13227.

180. Weigt S.S., Palchevskiy V., Belperio J.A. Inflammasomes and IL-1 biology in the pathogenesis of allograft dysfunction // *J. Clin. Invest.* 2017. Vol. 127, № 6. P. 2022–2029.

181. Nagura N. et al. IL-1 $\beta$  mediates NGF and COX-2 expression through transforming growth factor-activating kinase 1 in subacromial bursa cells derived from rotator cuff tear patients // *J. Orthop. Sci. Japan*, 2019. Vol. 24, № 5. P. 925–929.

182. Cox A.J., West N.P., Cripps A.W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota // *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015. Vol. 3, № 3. P. 207–215.

183. Rial S.A. et al. Gut microbiota and metabolic health: The potential beneficial effects of a medium chain triglyceride diet in obese individuals // *Nutrients.* 2016. Vol. 8, № 5. P. 1–19.

184. Geerlings S.Y. et al. *Akkermansia muciniphila* in the human gastrointestinal tract: When, where, and how? // *Microorganisms.* 2018. Vol. 6, № 3. P. 1–26.

185. Portincasa P. et al. Intestinal Barrier and Permeability in Health, Obesity and NAFLD // *Biomedicines.* 2022. Vol. 10, № 1. P. 1–62.

186. Zhang T. et al. *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic // *Microb. Biotechnol.* 2019. Vol. 12, № 6. P. 1109–1125.

187. Xu Y. et al. Function of *Akkermansia muciniphila* in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems // *Front. Microbiol.* 2020. Vol. 11, № February. P. 1–12.

188. Rosés C. et al. Gut Microbiota Bacterial Species Associated with Mediterranean Diet-Related Food Groups in a Northern Spanish Population // *Nutrients.* 2021. Vol. 13, № 2.