

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ И СОДЕРЖАНИЕ ТРЕФОИЛОВЫХ ФАКТОРОВ У ВЗРОСЛЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ ФЕНОТИПАМИ ОЖИРЕНИЯ

© 2024 г. И. М. Колесникова^{a, b, *}, Л. А. Ганенко^c, И. Ю. Васильев^d, Т. В. Григорьева^d, Н. И. Волкова^c, С. А. Румянцев^{a, b, e}, А. В. Шестопапов^{a, b, e, f}

^aРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

^bНациональный медицинский исследовательский центр эндокринологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117292 Россия

^cРостовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, 344022 Россия

^dКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

^eЦентр молекулярного здоровья, Москва, 117437 Россия

^fНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

*e-mail: ir.max.kolesnikova@gmail.com

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 09.01.2024 г.

Принята к публикации 09.01.2024 г.

Ожирение ассоциировано с изменением состава кишечной микробиоты, а также с увеличением проницаемости кишечной стенки. У 130 здоровых волонтеров, 57 пациентов с метаболически здоровым ожирением (МЗО) и 76 пациентов с метаболически нездоровым ожирением (МНЗО) из образцов фекалий выделяли бактериальную ДНК с дальнейшим секвенированием гена 16S рРНК. Метаболический профиль микробиоты, предсказанный с использованием программного обеспечения PICRUSt2 (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/picrust/>), был более изменен у пациентов с МНЗО, чем с МЗО. Ожирение, особенно МНЗО, сопровождалось увеличением способности кишечной микробиоты к катаболизму энергетических субстратов и продукции энергии в общих путях катаболизма, синтезу водорастворимых витаминов (В1, В6, В7), нуклеотидов, гема, ароматических аминокислот и ряда защитных структурных компонентов клеток. Подобные изменения могут быть следствием адаптации микробиоты к условиям, специфическим для МНЗО. По-видимому, таким образом формируется порочный круг, когда МНЗО способствуют истощению кишечного микробиома, а дальнейшее перерождение последнего вносит вклад в патогенез формирования метаболических нарушений. В сыворотке крови участников исследования определяли концентрацию треофиловых факторов, которая может отражать состояние мукозального барьера. У пациентов с МЗО и МНЗО было повышено содержание треофиловых факторов 2 и 3 типов, но значимых ассоциаций их уровня с метаболическим профилем кишечной микробиоты не зарегистрировано.

Ключевые слова: метаболически здоровое ожирение, метаболически нездоровое ожирение, кишечная микробиота, метаболический профиль микробиоты, TFF2, TFF3, PICRUSt2

DOI: 10.31857/S0026898424040105, EDN: IMMUOM

В последние десятилетия во многих исследованиях продемонстрирована тесная взаимосвязь между кишечной микробиотой и ожирением (см. обзоры [1, 2]). Большинство работ сосредоточено

на таксономическом составе кишечного микробиома, его изменениях при ожирении и взаимосвязи с метаболическими нарушениями и клинической картиной. Не так давно появились новые инструменты в изучении кишечного микробиома — методы реконструкции метаболического профиля микробного сообщества на основании результатов секвенирования гена 16S рРНК. Один из таких инструментов — программное обеспечение PICRUSt2 (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/picrust/>), позволяющее прогнозировать функциональный

Сокращения: SCFAs (short-chain fatty acids) — короткоцепочечные жирные кислоты; TFF (trefoil factor family) — треофиловые факторы; TFF2/3 (trefoil factor family member 2/3) — треофиловый пептид типа 2/3; МЗО — метаболически здоровое ожирение; МНЗО — метаболически нездоровое ожирение; ЦТК — цикл трикарбоновых кислот.

потенциал микробного сообщества [3]. В ряде работ продемонстрировано влияние ожирения, его тяжести и сопутствующих метаболических нарушений на прогнозируемый функциональный профиль кишечной микробиоты [4–6]. Однако эти исследования проведены в основном на популяции жителей Китая. Но назрела необходимость выявления общих паттернов изменения метаболического профиля при ожирении – вне зависимости от особенностей диеты, этнических и географических факторов.

Кишечный микробиом не только тесно связан с метаболическими нарушениями при ожирении, но и влияет на состояние мукозального барьера, модулируя иммунную систему [7]. Ожирение негативно сказывается на состоянии стенки кишечника, приводя к увеличению проницаемости и всасывания патогенассоциированных молекулярных паттернов, что может усиливать провоспалительный статус пациентов с ожирением [8]. В связи с этим интерес представляет изучение уровня трефоиловых факторов (trefoil factor family, TFF) у пациентов с ожирением. Представители TFF секретируются железистым эпителием пищеварительной, респираторной и мочеполовой систем вместе с муцином и участвуют в процессах защиты и регенерации слизистых [9]. TFF усиливают миграцию и дифференцировку клеток, модулируют их апоптоз, а также регулируют синтез белков плотных контактов, что в том числе способствует поддержанию целостности стенки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [10]. Синтез трефоилового пептида типа 2 (trefoil factor family member 2, TFF2) происходит в основном в желудке и двенадцатиперстной кишке, а трефоилового пептида типа 3 (TFF3) – в тонкой и толстой кишке [9, 11, 12]. Кроме участия в репарации кишечной стенки, TFF2 проявляет противовоспалительную активность, снижая продукцию провоспалительных цитокинов [13]. Таким образом, по уровню TFF можно судить о состоянии мукозального барьера. Следует отметить, что уровень системного воспаления, метаболических нарушений и изменений в кишечном микробиоме зависит от метаболического фенотипа ожирения [14–16].

Целью работы было изучение метаболического профиля кишечной микробиоты и его влияния на состояние мукозального барьера, что оценивали по уровню TFF у пациентов с разными метаболическими фенотипами ожирения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Группы исследования. В 2019–2022 гг. было проведено когортное одномоментное исследование на базе ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, ООО “Центр молекулярного здоровья” и ФГАОУ ВО “Казанский (Приволжский) федеральный

университет”. Участниками исследования стали 263 человека старше 18 лет. Критериями включения в исследование были: отсутствие приема анти-/пре-/пробиотических препаратов в течение полугода до момента включения в исследование и подписанное добровольное информированное согласие. Критериями не включения были: тяжелые соматические заболевания (хроническая почечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность), заболевания ЖКТ, алкоголизм, беременность, депрессия, а также любое заболевание в острой форме.

Контрольную группу составили 130 здоровых волонтеров без ожирения (индекс массы тела (ИМТ) 18.5–24.9 кг/м²), без признаков метаболических нарушений и артериальной гипертензии. Пациенты с ожирением (n = 133): ИМТ > 30 кг/м² и окружность талии >102 см у мужчин и >88 см у женщин, – в зависимости от метаболического фенотипа ожирения по критериям NCEP-АТР III, были разделены на подгруппы с метаболически здоровым ожирением (МЗО) и с метаболически нездоровым ожирением (МНЗО) [17]. Ожирение считалось метаболически нездоровым, если для пациента были характерны два и более критериев: 1) триглицериды сыворотки ≥ 1.7 ммоль/л; 2) холестерин липопротеинов высокой плотности у мужчин <1.03 ммоль/л, у женщин <1.29 ммоль/л; 3) артериальное давление sys ≥ 130, dia ≥ 85 мм рт.ст.; 4) глюкоза натощак ≥ 6.1 ммоль/л. В подгруппу пациентов с МЗО вошло 57, а в подгруппу с МНЗО – 76 пациентов. В исследование были включены пациенты, проживающие на одной территории (Ростовская область и город Ростов-на-Дону) в летнее-осенний период, с целью минимизации влияния климатических условий, характера питания и этнических факторов на кишечный микробиом.

Клинические образцы. У пациентов собирали образцы фекалий и венозной крови, из которой впоследствии получали сыворотку.

Иммуноферментный анализ (ИФА). В образцах сыворотки определяли концентрацию TFF2 и TFF3 методом ИФА с использованием соответствующих наборов: ELISA Kit for Trefoil Factor 2 и ELISA Kit for Trefoil Factor 3 (“Cloud-Clone Corp.”, США) – по протоколу производителя.

Выделение бактериальной ДНК, амплификация и секвенирование генов 16S рРНК. Выделение бактериальной ДНК из образцов фекалий проводили с применением наборов QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (“QIAGEN GmbH”, Германия). Подготовку библиотек для секвенирования проводили согласно протоколу производителя: “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” (“Illumina, Inc.”, США). Бактериальную ДНК амплифицировали с использованием праймеров, специфичных к варибельному участку v3–v4 гена

16S рРНК, и набора с высокоточной полимеразой Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (“NEB”, США) в стандартном режиме: 1) 30 с при 98°C; 2) 25 циклов: 30 с при 98°C, 20 с при 55°C, 20 с при 72°C; 3) 2 мин при 72°C; 4) длительно при 4°C. После очистки смеси от свободных праймеров и их димеров парамагнитными частицами AMPure XP (“Beckman Coulter”, США) ПЦР-продукты индексируют с использованием индекс-праймеров Nextera XT Index Kit (“Illumina, Inc.”). Повторно выполняли очистку смеси парамагнитными частицами, и сформированные библиотеки секвенировали на платформе MiSeq (“Illumina, Inc.”) по протоколу производителя. Полученные прочтения анализировали с использованием программы QIIME2 v.2020.8 [18] и референсной базы данных последовательностей генов 16S рРНК SILVA v.138 [19] с 97%-ным порогом кластеризации близких последовательностей.

Биоинформатический анализ. Для предсказания метаболических функций кишечной микробиоты использовано программное обеспечение PICRUSt2 [3], позволившее оценить представленность метаболических путей, нормализованную на число копий прочтений 16S рРНК.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения MedCalc v.20.210 (“MedCalc Software Ltd.”, Бельгия). Все полученные массивы данных были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Ввиду преобладания ненормального распределения данные были представлены в качестве медианы и квартилей (Me [Q1; Q3]). Сравнительный анализ выполняли с использованием непараметрического критерия Краскела-Уоллиса. При получении различий с уровнем значимости $p < 0.05$ автоматически выполнялся

апостериорный тест по методу Conover для попарного сравнения групп. После получения результатов сравнительного анализа проводили контроль ложных открытий в соответствии с процедурой Бенджамини-Хохберга при частоте ложных открытий 5%. Кроме того, при необходимости сравнения частоты предсказания метаболических путей в кишечном микробиоме использовали анализ χ^2 . Выявленные различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0.05$. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена с последующей поправкой на множественную проверку гипотез процедурой Бенджамини-Хохберга при частоте ложных открытий 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трефоилловые факторы

При исследовании уровня TFF в сыворотке крови выявлено, что у пациентов с МЗО и МНЗО, в сравнении с группой здоровых доноров, концентрация как TFF2, так и TFF3 повышена (рис. 1а). Высокий уровень TFF2 может быть связан с особенностями питания этих пациентов, так как пища с высоким содержанием жиров активирует экспрессию гена *TFF2* [20, 21]. У пациентов с ожирением вследствие избыточного питания также может происходить чрезмерное растяжение кишечника и увеличение площади его поверхности, что вносит вклад в избыточную продукцию TFF. Кроме того, повышенный уровень TFF может быть результатом повреждения стенки кишечника или формирования воспалительного отека слизистой оболочки у пациентов с ожирением – вне зависимости от метаболического фенотипа. Интересно, что при исследовании содержания TFF у детей с ожирением и с нормальным ИМТ различий не было выявлено [22]. Возможно, подобные различия обусловлены

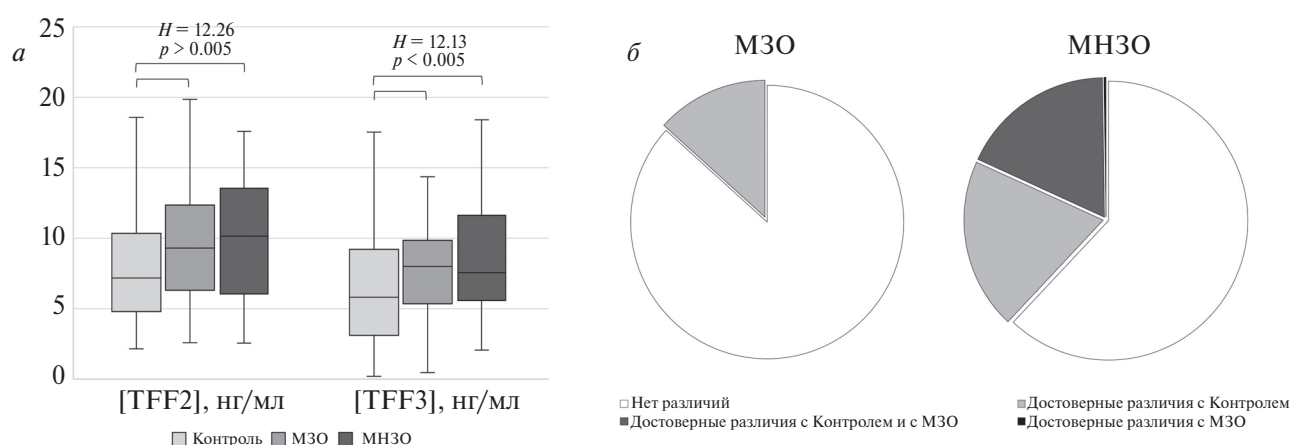


Рис. 1. Анализ концентрации трефоилловых факторов в сыворотке крови (а) и метаболического профиля кишечной микробиоты (б) у пациентов с МЗО и МНЗО. Здесь и далее: H – значение H -критерия Краскела-Уоллиса, p – уровень значимости H -критерия Краскела-Уоллиса. Горизонтальные планки показывают различия между группами, выявленные с использованием апостериорного теста по методу Conover ($p < 0.05$).

тем, что детское ожирение в большинстве случаев обратимо [23], а увеличение содержания TFF у взрослых можно рассматривать как маркер “не-обратимого” или прогрессирующего ожирения.

Метаболический профиль кишечного микробиома

Корреляционный анализ не выявил достоверных взаимосвязей между уровнем TFF в сыворотке и представленностью метаболических путей кишечного микробиома. По результатам биоинформатического анализа, в кишечном микробиоме пациентов, участвовавших в исследованиях, было предсказано 429 метаболических путей. Сравнительный анализ по методу Краскела–Уоллиса выявил, что изменение представленности при ожирении затронуло 163 метаболические пути. Как и ожидалось, наибольшее число изменений зарегистрировали у пациентов с МНЗО — 38% метаболических путей, тогда как при МЗО только у 13.30% (рис. 1б).

Для удобства описания и анализа метаболические пути были сгруппированы по видам обмена, в которых они принимают участие: энергетический обмен, синтез водорастворимых витаминов, синтез терпенов и хинонов, обмен нуклеотидов и процессинг нуклеиновых кислот, обмен железа и гема, обмен аминокислот, деградация ароматических соединений и синтез структурных компонентов клеток.

Энергетический обмен. И метаболически здоровый, и метаболически нездоровый фенотипы ожирения приводили к изменению в метаболических профилях распространенности путей, вовлеченных в энергетический обмен кишечной микробиоты (рис. 2). Большинство таких изменений регистрировали у пациентов с МНЗО, хотя снижение гликолиза V (*Pyrococcus*), характерного для архей, детектировали и у пациентов с МЗО.

Метаболически нездоровый фенотип ожирения сопровождался увеличением распространенности путей деградации различных энергетических субстратов: сульфоглюкозы, кетоглюконата, манна-на, жирных кислот, этиленгликоля, глutarовой кислоты, гексита, глюкаратов и галакторатов — в метаболических профилях микробиоты. Кроме того, у таких пациентов наблюдали повышение различных вариантов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) — одного из основных метаболических путей, поставляющих восстановленные коферменты для окислительного фосфорилирования и, следовательно, для продукции АТФ. Эти результаты согласуются с данными Y. Wan и др. [24], которые показали, что увеличение концентрации интермедиатов ЦТК характерно для пациентов с ожирением. Кроме того, Hu J. с соавт. [4] обнаружили, что способность микробиоты к ЦТК VII ассоциирована с тяжестью ожирения. По-видимому, при

МНЗО микробиота более интенсивно деградирует энергетические субстраты, что способствует ее выживанию в условиях, специфичных для этого фенотипа ожирения.

Изменения метаболических профилей микробиоты при МНЗО затрагивают и процессы биосинтеза короткоцепочечных жирных кислот (SCFAs): ацетата, пропионата и бутирата. SCFAs, с одной стороны, значимые энергетические субстраты для организма хозяина, а с другой — медиаторы в системе взаимоотношений “микробиота–макроорганизм” [25–27]. В исследованиях по содержанию SCFAs в фекалиях показано, что ожирение ассоциировано с увеличением концентрации ацетата, пропионата и бутирата [28, 29]. Это может быть, с одной стороны, результатом диеты [30], а с другой — изменения метаболических возможностей микробиоты. Так, ацетат образуется в клетке на разных стадиях множества биохимических процессов, поэтому фактически невозможно отследить все метаболические пути его образования. Однако микробиота пациентов с МНЗО может активнее, чем микробиота пациентов с МЗО или лиц без ожирения, образовывать ацетат при окислении жирных кислот (β -окисление жирных кислот I) в ЦТК VII при деградации глутарил-КоА и N-ацетилнейрамата, а также образовывать бутират из пировата и при деградации 4-аминобутаноата (γ -аминомасляной кислоты).

Синтез водорастворимых витаминов. Одна из ключевых функций микробиоты во взаимоотношениях с организмом-хозяином — продукция водорастворимых витаминов. У пациентов с ожирением в кишечной микробиоте чаще присутствовали таксоны, способные к продукции NAD из триптофана (биосинтез NAD II): 40.4% пациентов с МЗО, 44.7% пациентов с МНЗО против 26.2% здоровых доноров ($p < 0.05$). Мы обнаружили, что метаболически нездоровый фенотип ожирения ассоциирован с изменением в метаболических профилях микробиоты распространенности путей синтеза ряда водорастворимых витаминов группы B (рис. 3).

Нами выявлено, что при МНЗО происходит интенсификация метаболических путей синтеза активных форм витаминов B1, B6 и B7. Эти результаты согласуются с данными M. Kim с соавт. [5] и M. Duan с соавт. [6], сообщавшими о повышенной продукции витаминов B1, B2, B5, B6, B9 и их активных форм в микробиоте пациентов с ожирением. Учитывая роль витаминов B1 и B7 в ЦТК, усиление их синтеза микробиотой согласуется с полученными данными по усилению энергетического обмена при МНЗО.

Ранее показано, что ожирение и связанные с ним метаболические нарушения могут быть ассоциированы с недостаточным или неоптимальным уровнем витаминов в сыворотке крови [31]. На этом фоне сохранение и увеличение

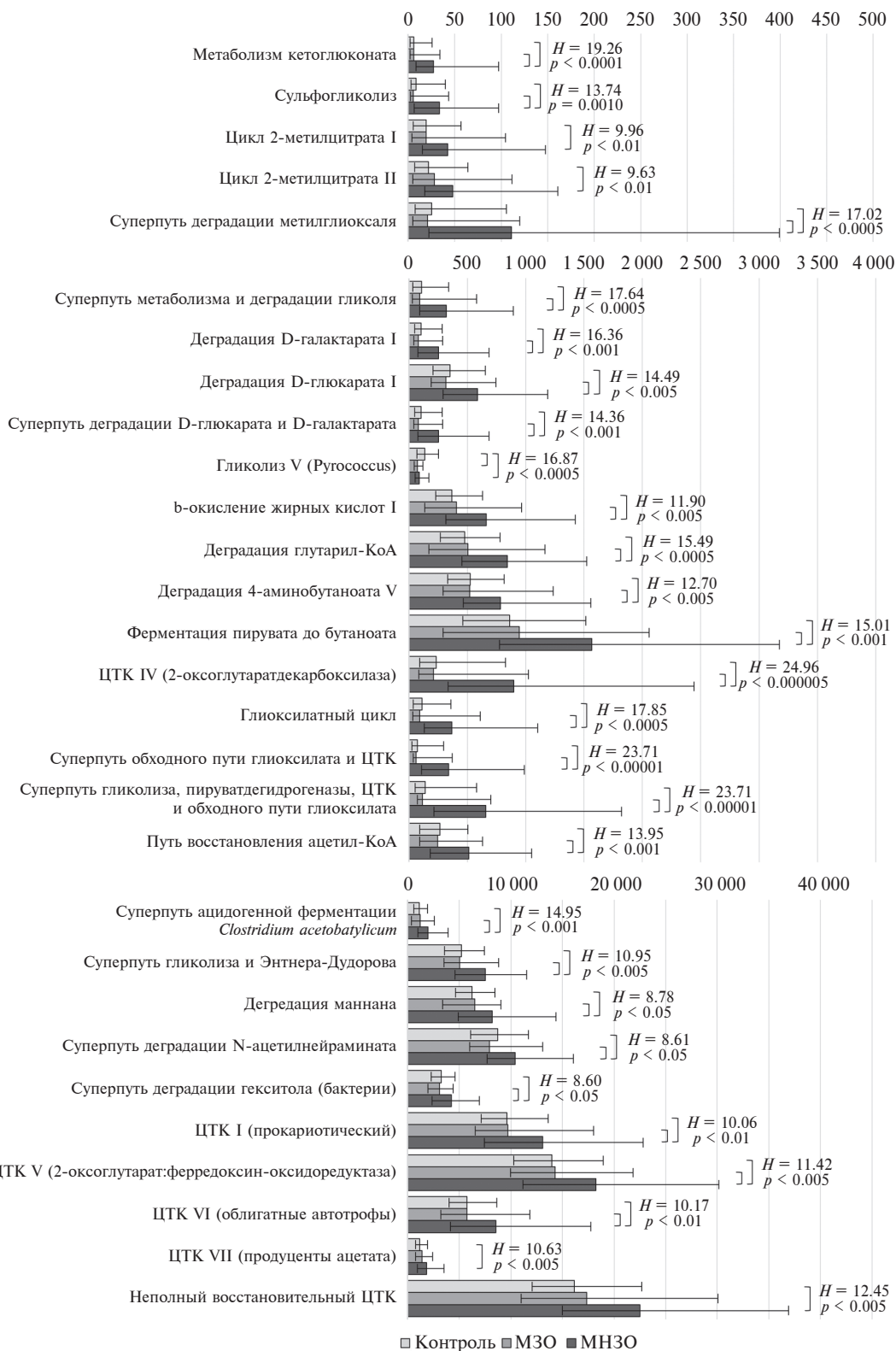


Рис. 2. Анализ путей энергетического обмена в метаболических профилях микробиома пациентов с МЗО и МНЗО. Здесь и далее: графики построены на основании медиан соответствующих метаболических процессов; в планках погрешностей – 25 и 75 перцентилей. ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; КоА – коэнзим А. Здесь и далее: вертикальные планки показывают различия между группами, выявленные с использованием апостериорного теста по методу Conover ($p < 0.05$).

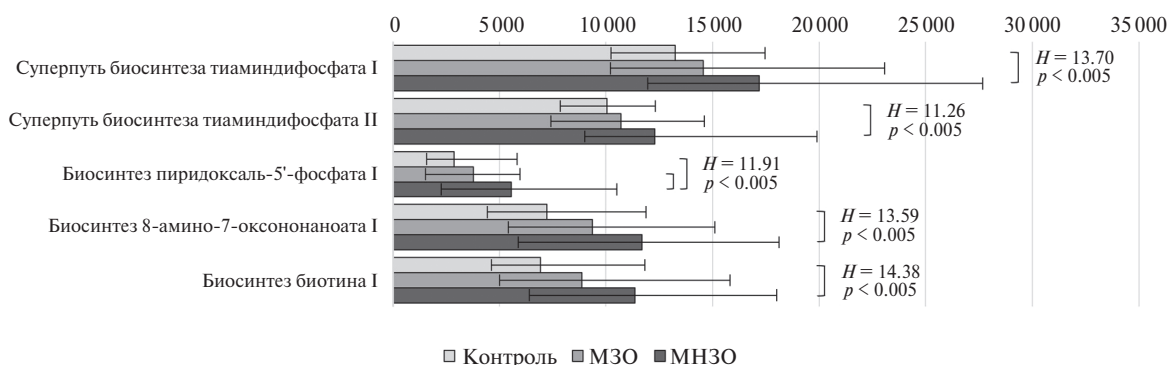


Рис. 3. Анализ путей синтеза водорастворимых витаминов в метаболических профилях микробиома пациентов с МЗО и МНЗО.

распространенности путей синтеза водорастворимых витаминов микробиотой при ожирении, особенно при МНЗО, может носить позитивный характер для организма-хозяина. Кроме того, подобные изменения могут быть результатом разобщенности макроорганизма и микробиома, то есть потенциальными биомаркерами нарушения “метаболического симбиоза”.

Интересно, что ожирение, вне зависимости от метаболического фенотипа, сопровождалось увеличением частоты выявления в образцах фекалий таксонов, способных к биосинтезу *a*, *c*-диамида кобириновой II кислоты и аденозилкобаламина с поздним включением кобальта, т.е. продуцирующих витамин В12. По результатам биоинформатического анализа, наличие таких метаболических путей в кишечном микробиоме предсказано у 40.4% пациентов с МЗО, у 43.4% с МНЗО и только у 26.9% здоровых доноров без ожирения ($p < 0.05$).

Синтез терпенов и хинонов. У пациентов с ожирением зарегистрирована активация в метаболических профилях микробиоты путей образования хинонов и их предшественников терпенов – наравне с витаминами они вовлечены в энергетический обмен и продукцию АТР (рис. 4).

Убихиноны (коэнзим Q), менахиноны и деметилменахинон служат промежуточными акцепторами электронов в электронтранспортных цепях и, следовательно, участвуют в генерации АТР у бактерий [32, 33]. Микробиота пациентов с МЗО и МНЗО характеризуется активацией путей синтеза менахинонов и деметилменахинона. Метаболически нездоровый фенотип ожирения ассоциирован и с увеличением распространенности путей синтеза убихинонов в метаболических профилях микробиоты. Менахиноны и деметилменахинон преимущественно участвуют в анаэробном дыхании бактерий, тогда как убихиноны — в аэробном [33]. Кроме того, менахиноны, известные как витамин К2, абсорбируются организмом-хозяином и используются в реакциях γ -карбоксилирования [32].

Метаболические профили обоих фенотипов ожирения характеризуются увеличением путей синтеза филлохинона и менахинонов, а МНЗО еще и путей синтеза убихинонов. В целом, полученные результаты согласуются с данными M. Duan с соавт. [6], которые продемонстрировали большую представленность путей синтеза хинонов при ожирении. Эти изменения могут быть связаны с увеличенной потребностью микробиоты пациентов с ожирением, особенно с МНЗО, в переносчиках электронов и косвенно с повышенной активностью электронтранспортных цепей и продукции АТР.

По сравнению со здоровыми донорами, у пациентов с МНЗО прогнозируется повышенная активность путей синтеза предшественников хинонов и терпенов: изопренов и таксациенов. Ранее J. Hu с соавт. [4] тоже сообщали об изменении пути биосинтеза таксациенов (инженерный) у пациентов с ожирением. Значение таксациена для микробиоты на сегодняшний день остается неясным, хотя этот дитерпен используют для синтеза противоопухолевых препаратов [34].

Обмен нуклеотидов и процессинг нуклеиновых кислот. Изменения метаболического профиля микробиоты у пациентов с ожирением затронули и обмен нуклеотидов (рис. 5). У пациентов с МЗО этот паттерн не отличался значительно от здоровых доноров, в то время как при МНЗО регистрировали активацию путей обмена нуклеотидов. Кроме того, при МНЗО увеличивалась продукция уратов – логичное следствие повышенной продукции пуринов. Полученные данные согласуются с результатами M. Kim с соавт. [5], которые показали, что при МНЗО увеличена представленность путей синтеза нуклеотидов.

Кроме того, у пациентов с ожирением (и МЗО, и МНЗО) полностью отсутствовал суперпуть деградации пиримидиновых нуклеотидов, тогда как в когорте здоровых доноров он составлял 7.69% ($p < 0.05$).

Нуклеотиды – ключевые компоненты процессов репликации, репарации, транскрипции

и трансляции, то есть основных механизмов функционирования клетки и ее деления [35]. Доступность нуклеотидов способствует увеличению разнообразия кишечной флоры, что было показано на модели мышей, склонных к ускоренному старению — Senescent Accelerated Mouse-Prone 8 (SAMP8) [36]. По-видимому, активация путей синтеза и реутилизации нуклеотидов в микробиоте пациентов с МНЗО способствует выживанию микроорганизмов в условиях, способствующих истощению кишечной флоры [5, 37].

Изменения метаболических возможностей микробиоты при ожирении затронули и ряд метаболических процессов, вовлеченных в процессинг нуклеиновых кислот (рис. 6).

У пациентов с ожирением зарегистрирована активация пути синтеза кевозина и его предшественника ргеQ0. Заметим, что продукция кевозина в микробиоте возрастала в следующем ряду: здоровые доноры → пациенты с МЗО → пациенты с МНЗО. Обогащение кишечной микробиоты кевозинпродуцирующими бактериями ранее обнаружили

у мышей с ожирением [38]. Кевозин — производное гуанозина, которое эукариоты не синтезируют самостоятельно, а получают либо с пищей, либо благодаря синтезу кишечной микробиотой. Модификации кевозином подвергаются тРНК аспарагиновой кислоты, аспарагина, тирозина и гистидина, защищая их от действия РНКаз [39]. Таким образом, доступность кевозина контролирует скорость трансляции белков в клетках эукариот, а его дефицит сопровождается дисфолдингом и развитием стресса эндоплазматического ретикулума [40].

Кроме того, в кишечном микробиоме пациентов и с МЗО, и с МНЗО выявлено увеличение представленности путей синтеза (p)ppGpp. Подобное влияние ожирения на синтез ppGpp было также продемонстрировано X. Nie с соавт. [41]. Синтез и накопление алармона (p)ppGpp — высоконсервативная реакция на стресс, которая способствует выживанию бактерий [42]. Таким образом, сохранение в кишечном микробиоме ppGpp-продуцирующих организмов может отражать агрессивные

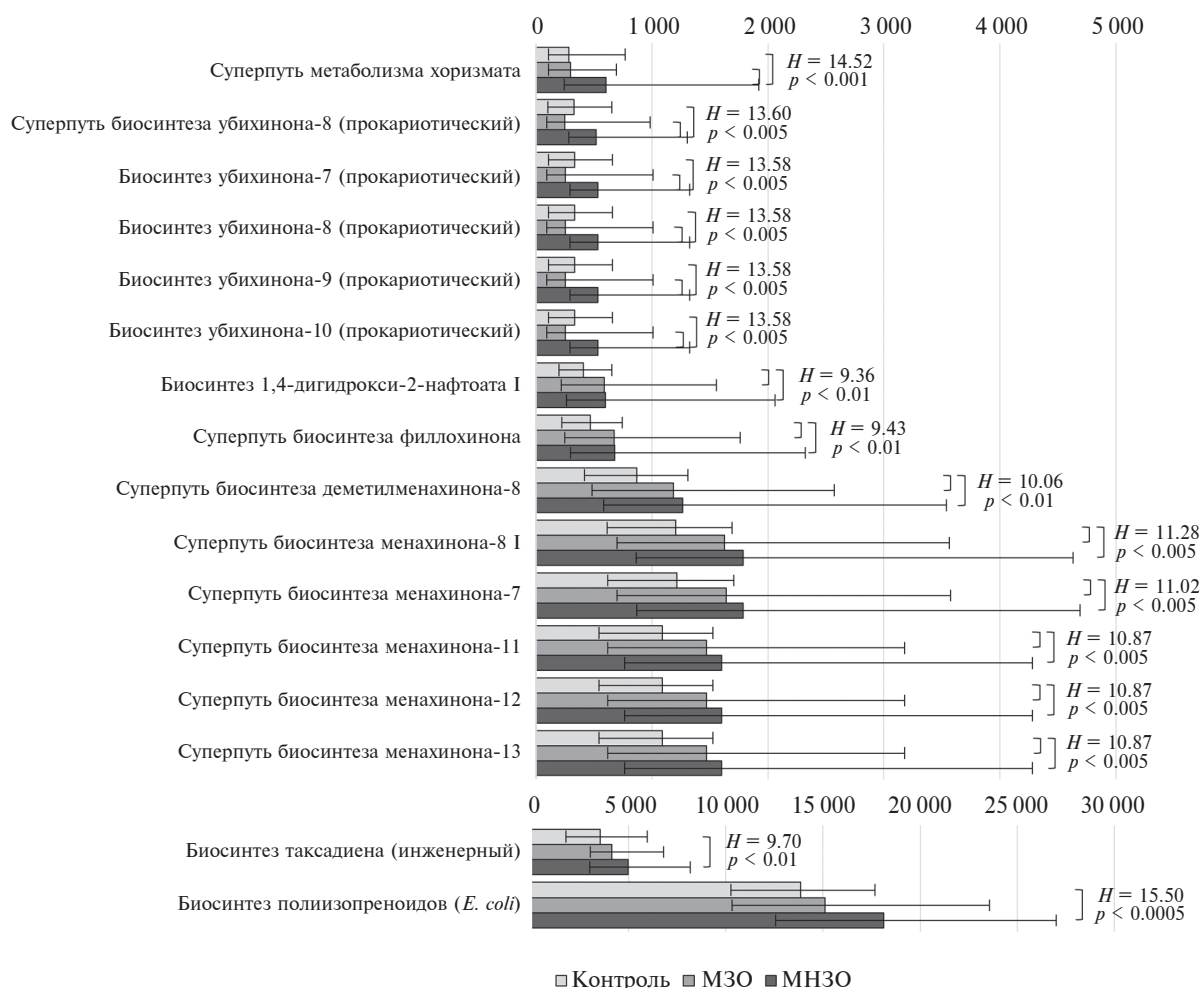


Рис. 4. Анализ путей биосинтеза терпенов и хинонов в метаболических профилях микробиома пациентов с МЗО и МНЗО.

условия, в которых находится микробиота кишечника при ожирении.

Также особенностью кишечного микробиома при МНЗО была бóльшая представленность пути процессинга тРНК по сравнению со здоровыми донорами и пациентами с МЗО. Следует отметить, что именно этот метаболический путь был выделен среди процессов, отличающих микробиом пациентов с сахарным диабетом II типа [43]. Подобное перерождение микробиоты может вносить свой вклад в формирование вялотекущего системного воспаления у пациентов с МНЗО. Бактерии способны продуцировать внеклеточные везикулы, содержащие в том числе и тРНК, которые могут участвовать в индукции воспаления [44, 45].

Обмен железа и гема. МЗО и МНЗО сопровождалось изменением в метаболических профилях микробиоты доли путей синтеза гема, а также аэробактина и энтеробактина — белков, способствующих захвату железа (рис. 7). Оба фенотипа ожирения приводили к увеличению метаболических путей синтеза гема, однако при МНЗО такие изменения были более выражены. Вместе с тем синтез аэробактина и энтеробактина был усилен только у пациентов с МНЗО.

Активизация метаболических путей биосинтеза гема в кишечном микробиоме может быть связана с повышенной активностью цепи переноса электронов в микробиоме при ожирении и, как следствие, с повышением потребности в геме. Как отмечено выше, об усилении процессов общего пути катаболизма и окислительного фосфорилирования при ожирении (особенно при МНЗО) можно судить по увеличению прогнозируемой представленности синтеза убихинонов и менахинонов — транспортеров цепи переноса электронов, — а также ЦТК.

Усиление синтеза гема может негативно сказываться на микробном сообществе. Ранее показано, что добавление гема в рацион мышей приводит к сокращению разнообразия кишечного микробиома и усугубляет течение колита за счет модуляции кишечной микробиоты [46]. Кроме того, гем вызывает повреждение эпителия, что повышает риск развития колоректального рака [47].

Обмен аминокислот. У пациентов с МНЗО наблюдалось изменение представленности ряда метаболических процессов обмена аминокислот (рис. 8), в то время как при МЗО это было менее выражено. В кишечной микробиоте пациентов с МЗО была повышена представленность пути

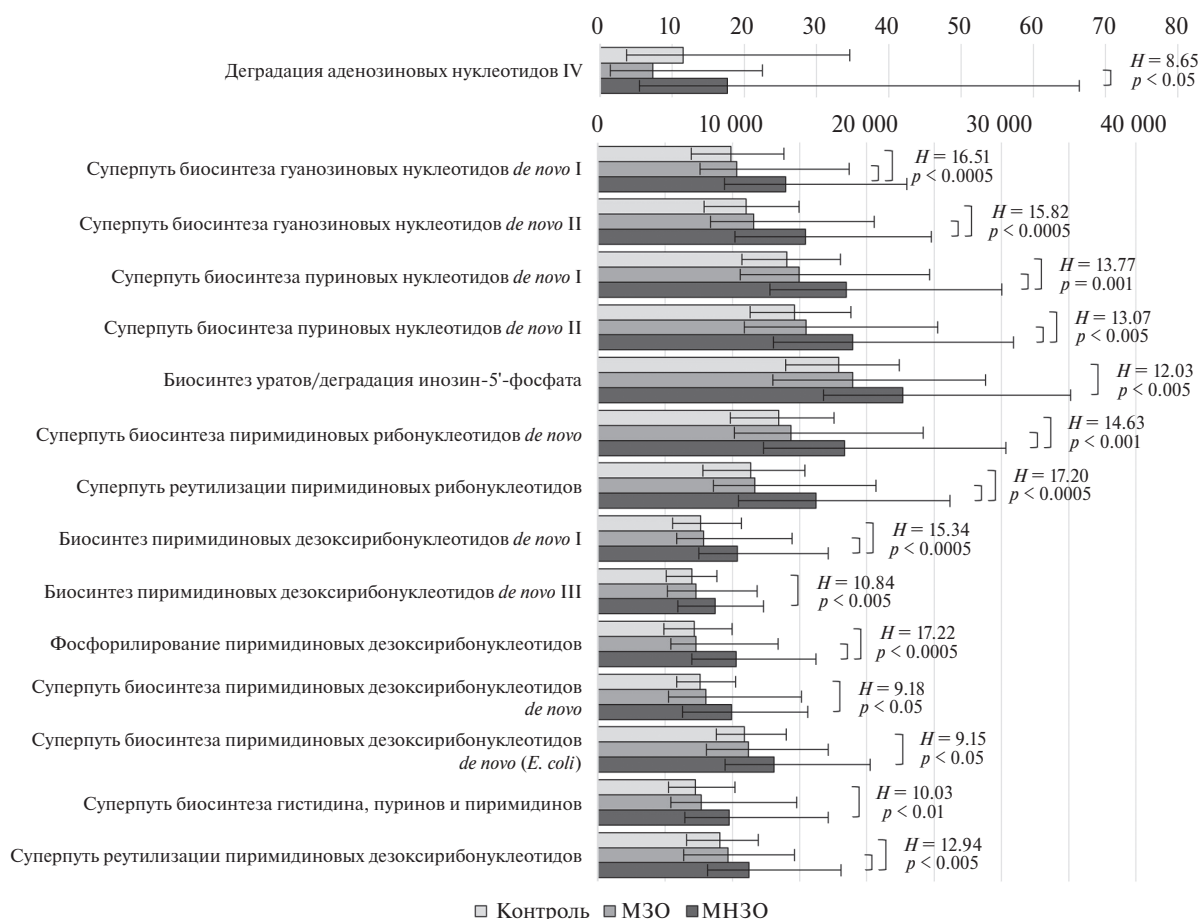


Рис. 5. Анализ путей метаболизма нуклеотидов в метаболических профилях микробиома пациентов с МЗО и МНЗО.

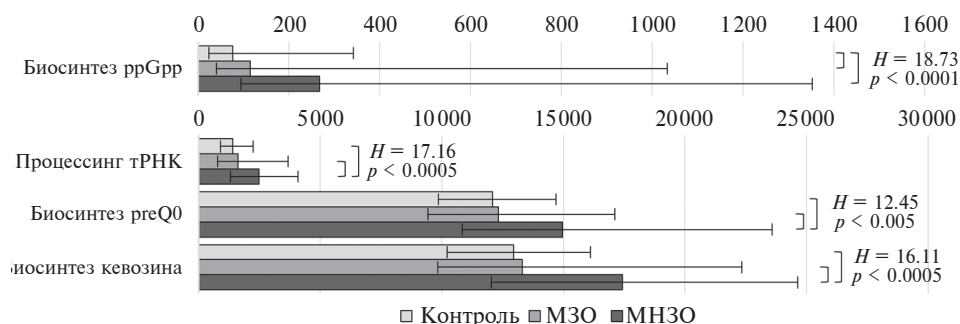


Рис. 6. Анализ путей процессинга нуклеиновых кислот в метаболических профилях микробиома пациентов с МЗО и МНЗО.

деградации тирозина I до ацетоацетата и фумарата, что отражает “повышенный спрос” на использование этой аминокислоты в качестве энергетического субстрата. Кроме того, у них чаще прогнозировали наличие различных путей деградации триптофана: деградации триптофана IX до ацетил-КоА у 22.80% пациентов, деградации триптофана до 2-амино-3-карбоксимуконата полуальдегида у 40.35% и триптофана XII (*Geobacillus*) до ацетил-КоА у 21.05% пациентов – по сравнению с соответственно 8.46, 26.15 и 8.46% у здоровых волонтеров без ожирения ($p < 0.05$). Таким образом, в микробиоте кишечника пациентов с МЗО повышена возможность метаболической деградации ароматических аминокислот и, как следствие, использования продуктов их метаболизма в качестве энергетических субстратов.

В микробиоте пациентов с МНЗО также чаще прогнозировали метаболические пути деградации триптофана IX (21.05% пациентов), триптофана до 2-амино-3-карбоксимуконата полуальдегида (44.74% пациентов) и триптофана XII (*Geobacillus*) (21.05% пациентов), что достоверно отличалось от здоровых доноров без ожирения ($p < 0.05$). Кроме триптофана, в их микробиоте потенциально

усилена деградация аминокислот тирозина, треонина, гистидина и аргинина.

На фоне повышенной деградации аминокислот, в частности аргинина, у пациентов с МНЗО выявлено увеличение представленности путей синтеза полиаминов: путресцина, спермидина и норспермидина. Ранее показано, что интенсивность продукции полиаминов зависит от степени ожирения [4]. Роль полиаминов в контексте ожирения неоднозначна. С одной стороны, показано, что введение спермидина и спермина мышам способствовало снижению массы тела, повышению толерантности к глюкозе и уменьшению стеатоза печени в модели ожирения, вызванного диетой с высоким содержанием жиров [48]. С другой стороны, известно, что полиамины участвуют в адипогенезе, а повышенный уровень путресцина при сахарном диабете коррелирует с концентрацией гликированного гемоглобина [49].

Следует отметить, что у пациентов с МНЗО повышенная деградация аминокислот была скомпенсирована увеличением представленности метаболических процессов их синтеза, в частности аргинина и ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана). Это согласуется

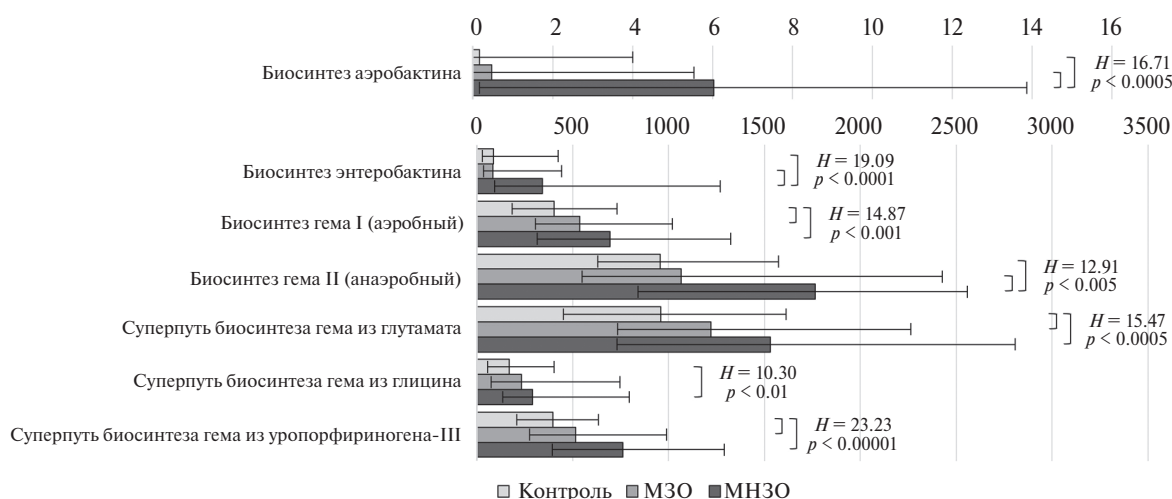


Рис. 7. Анализ путей обмена железа и гема в метаболических профилях микробиома пациентов с МЗО и МНЗО.

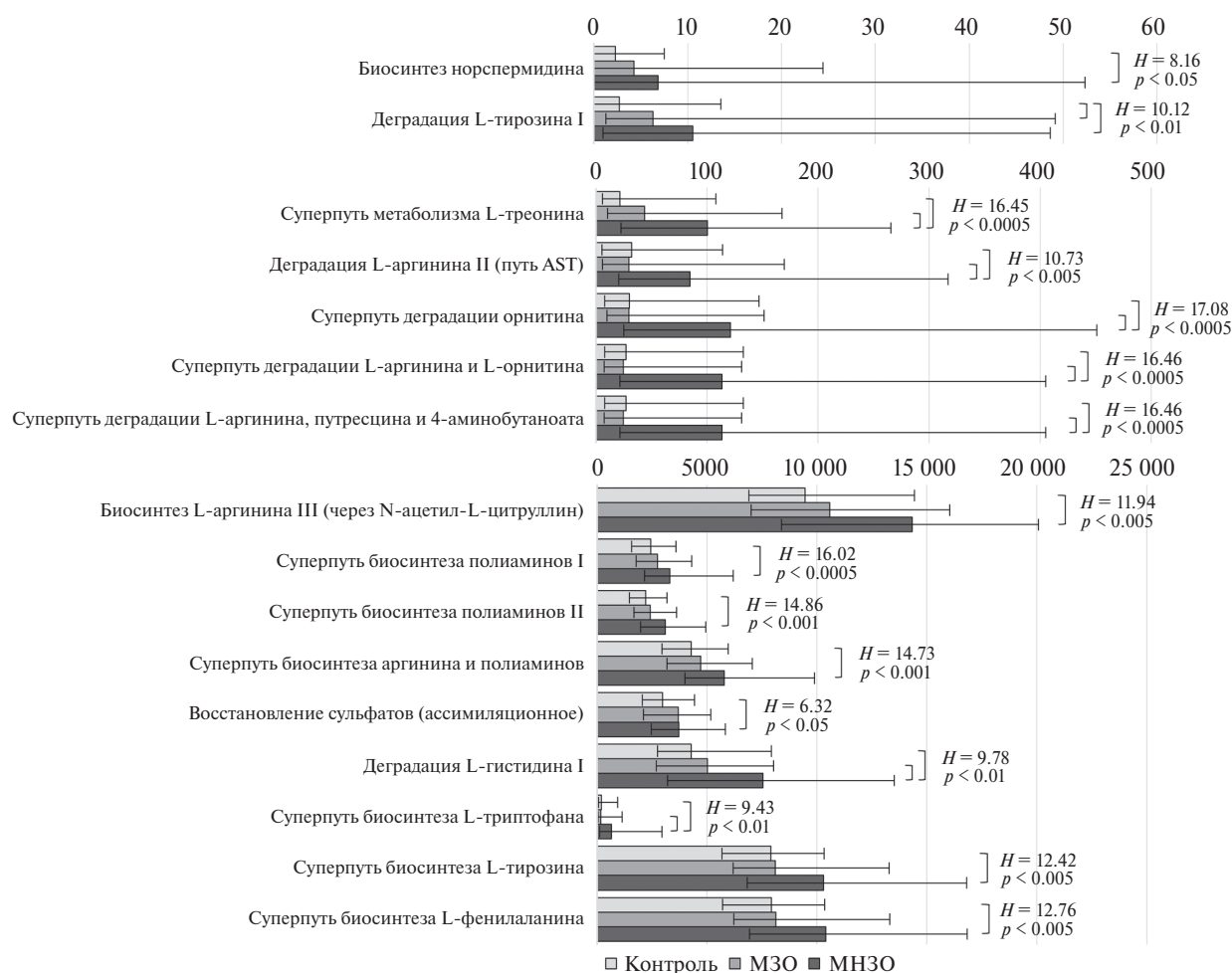


Рис. 8. Анализ путей обмена аминокислот в метаболических профилях микробиома пациентов с МЗО и МНЗО.

с ранее опубликованными данными по биосинтезу ароматических аминокислот в кишечной микробиоте пациентов с ожирением [4, 50]. Также при ожирении регистрировали снижение концентрации антралиловой кислоты в фекалиях пациентов с ожирением [51], что может быть ассоциировано с ее потреблением в качестве субстрата синтеза триптофана. Кроме того, у 35.53% пациентов с МНЗО мы прогнозировали наличие пути дегградации креатинина I, вовлеченного в биосинтез глицина, в то время как этот путь предсказали только для 12.31% здоровых волонтеров ($p < 0.05$). Также при МНЗО нами отмечено увеличение представленности пути восстановления сульфатов, которые впоследствии могут включаться в синтез содержащих серу аминокислот: цистеина и метионина.

В целом, ожирение, особенно метаболически нездорового фенотипа, по-видимому, ассоциировано с повышенным использованием аминокислот в качестве энергетических субстратов в микробиоте кишечника.

Дегградация ароматических соединений. Мы обнаружили целый спектр метаболических путей

деградации ароматических соединений, представленность которых была изменена у пациентов с ожирением (табл. 1). Ряд таких метаболических путей был характерен менее чем для 25% обследованных (0.000 [0.000; 0.000] для всех групп), поэтому мы сравнили частоту их прогнозирования в кишечном микробиоме (рис. 9).

В микробиоме пациентов с ожирением, особенно с метаболически нездоровым фенотипом, обнаружена повышенная дегградация ароматических соединений по сравнению со здоровыми волонтерами. Фенилацетат, 4-гидроксифенилацетат, фенилпропионат, фенилэтиламин образуются при дегградации фенилаланина и тирозина. Увеличение представленности этих метаболических путей, по-видимому, является следствием усиления биосинтеза ароматических аминокислот, характерного для пациентов с МНЗО, и может отражать менее эффективное использования этих аминокислот в качестве пластических субстратов.

По результатам большого проспективного исследования, проведенного среди городских жителей Китая, повышенная дегградация ароматических

Таблица 1. Изменения прогнозируемой представленности путей деградации ароматических соединений у пациентов с разными фенотипами ожирения

Метаболический путь	Здоровые доноры	МЗО	МНЗО	Критерий Красскала-Уоллиса
Деградация 4-гидроксифенилацетата	2.58 [0.24; 21.99]	5.20 [1.29; 34.75]	17.03 [3.83; 81.51]*†	$H = 20.68$ $p < 0.00005$
Деградация фенилацетата I (аэробная)	3.21 [0.50; 36.69]	5.99 [1.95; 45.39]	24.14 [5.45; 114.47]*†	$H = 19.32$ $p < 0.0001$
Деградация 3-фенилпропионата и 3-(3-гидроксифенил)пропионата до 2-оксопент-4-еноата	3.26 [0.64; 24.42]	5.91 [1.16; 35.31]	24.44 [3.87; 64.74]*†	$H = 18.52$ $p < 0.0001$
Деградация 3-фенилпропионата и 3-(3-гидроксифенил)пропионата	8.07 [1.98; 49.59]	12.97 [3.98; 72.61]	47.93 [9.50; 124.04]*†	$H = 21.45$ $p < 0.00005$
Деградация 3-фенилпропионата	3.97 [0.61; 11.96]	3.76 [0.66; 13.76]	7.39 [2.00; 38.44]*†	$H = 9.10$ $p < 0.05$
Суперпуть деградации фенилэтиламина	2.64 [0.42; 31.77]	5.07 [1.84; 40.65]	20.67 [4.89; 100.86]*†	$H = 18.85$ $p < 0.0001$
Деградация толуола I (аэробная) (через <i>о</i> -крезол)	66.35 [30.01; 143.21]	82.88 [47.64; 221.89]*	189.30 [66.40; 320.54]*†	$H = 20.04$ $p < 0.0005$
Деградация толуола II (аэробная) (через 4-метилкатехол)	66.35 [30.01; 143.21]	82.88 [47.64; 221.89]	189.30 [66.40; 320.54]*†	$H = 20.04$ $p < 0.0005$
Деградация толуола III (аэробная) (через <i>п</i> -крезол)	0.43 [0.00; 2.94]	1.99 [0.00; 10.37]*	2.95 [0.00; 23.71]*†	$H = 10.94$ $p < 0.005$
Деградация толуола IV (аэробная) (через катехол)	0.00 [0.00; 0.76]	0.00 [0.00; 1.63]*	0.00 [0.00; 5.15]*	$H = 6.15$ $p < 0.05$
Деградация катехола I (путь <i>мета</i> -расщепления)	15.62 [4.85; 37.02]	16.41 [7.90; 42.82]*	31.00 [11.15; 79.39]*	$H = 6.15$ $p < 0.01$
Деградация катехола II (путь <i>мета</i> -расщепления)	0.00 [0.00; 0.000]	0.00 [0.00; 1.17]*	0.00 [0.00; 2.91]*	$H = 5.64$ $p < 0.005$
Деградация катехола III (путь <i>орто</i> -расщепления)	0.22 [0.00; 1.94]	1.17 [0.14; 7.30]*	1.81 [0.00; 22.02]*	$H = 11.91$ $p < 0.05$
Деградация катехола до β -кетoadипата	0.12 [0.00; 1.70]	0.92 [0.00; 6.52]*	1.00 [0.00; 23.65]*	$H = 11.41$ $p < 0.005$
Деградация катехола до 2-оксопент-4-еноата II	0.00 [0.00; 0.00]	0.00 [0.00; 1.21]*	0.00 [0.00; 1.88]*	$H = 5.73$ $p < 0.005$
Деградация 4-метилкатехола (<i>орто</i> -расщепление)	0.16 [0.00; 1.79]	1.33 [0.00; 7.66]*	1.85 [0.00; 16.51]*	$H = 13.26$ $p < 0.001$
Суперпуть деградации салицилата	0.19 [0.00; 1.67]	1.34 [0.09; 7.30]*	1.71 [0.00; 19.38]*	$H = 13.20$ $p < 0.001$
Деградация галлата I	0.00 [0.00; 1.31]	0.61 [0.00; 2.86]*	0.86 [0.00; 9.66]*	$H = 8.21$ $p < 0.05$
Деградация циннамата и 3-гидроксизиннамата до 2-оксопент-4-еноата	3.26 [0.64; 24.42]	5.91 [1.16; 35.31]	24.44 [3.87; 64.74]*†	$H = 18.52$ $p < 0.0001$
Деградация ароматических соединений через β -кетoadипата	0.22 [0.00; 1.94]	1.17 [0.14; 7.30]*	1.81 [0.00; 22.02]*	$H = 11.91$ $p < 0.005$
Деградация протокатехуата II (путь <i>орто</i> -расщепления)	2.23 [0.00; 11.21]	5.09 [0.54; 19.12]	7.08 [0.50; 61.77]*	$H = 8.45$ $p < 0.05$

*Различия статистически значимы по сравнению со здоровыми донорами (апостериорный тест Conover, $p < 0.05$); † различия статистически значимы по сравнению с пациентами с МЗО (апостериорный тест Conover, $p < 0.05$).

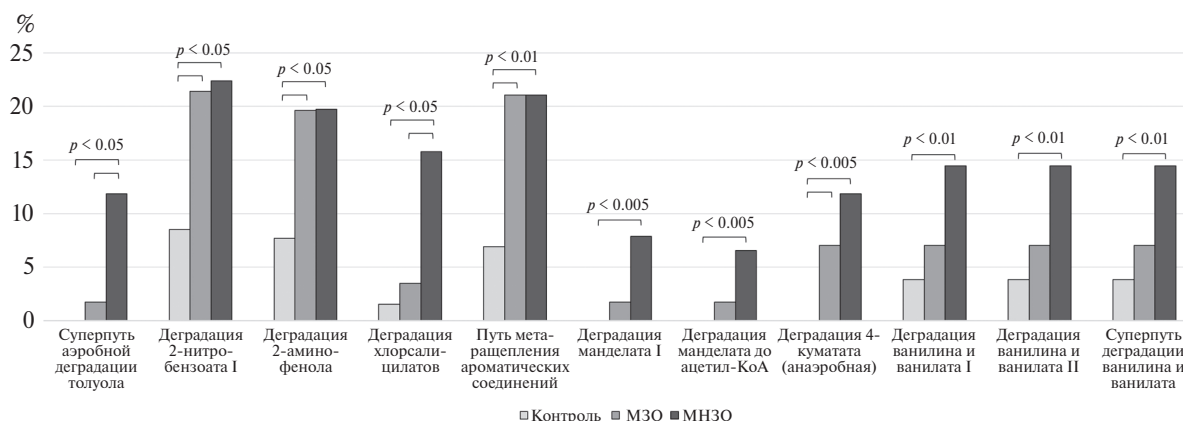


Рис. 9. Анализ распространенности путей деградации ароматических соединений в метаболических профилях микробиома пациентов с МЗО и МНЗО.

соединений, таких как толуол или катехол, характерна для микробиома лиц, практикующих здоровое и разнообразное питание [52]. Толуол может поступать с пищевыми продуктами, например с газированными безалкогольными напитками [53]. Кроме того, толуол образуется при декарбоксилировании фенилацетата — продукта деградации фенилаланина [54] — или из бензойной кислоты — распространенного консерванта с антибактериальной активностью [55]. Производные галлата активно используют в пищевой промышленности в качестве антиоксиданта [56]. Салициловая, ванилиновая, коричная, миндальная кислоты и их производные также присутствуют в пищевых продуктах. Интересно, что ванилин повышает чувствительность к инсулину, способствует снижению уровня провоспалительных цитокинов и препятствует снижению разнообразия кишечного микробиома при ожирении [57]. Таким образом, повышенная представленность путей деградации ванилатов в кишечном микробиоме пациентов с МНЗО можно рассматривать как потенциально неблагоприятный фактор. Кроме того, ранее мы обнаружили наличие путей деградации катехола в микробиоме здоровых детей и подростков, находившихся в младенческом возрасте на смешанном и искусственном вскармливании [58].

Таким образом, усиление метаболических возможностей деградации ароматических соединений можно объяснить особенностью питания таких пациентов — избыточного и гиперкалорийного.

Синтез структурных компонентов клеток. Среди метаболических путей, доля которых изменена у пациентов с ожирением, были процессы, вовлеченные в синтез структурных компонентов бактериальных клеток — углеводов и липидов (рис. 10).

Кишечная микробиота пациентов с МЗО и МНЗО обладала повышенным метаболическим потенциалом в продукции жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой, пальмитолеиновой, олеиновой и миколовых кислот). Кроме того,

изменения затронули и ряд метаболических путей синтеза производных сахаров — компонентов липополисахаридов, пептидогликанов и других структур бактериальных клеток. Интересно, что представленность путей образования компонентов липополисахаридов липида IVA и CMP-3-дезоксид-D-манно-октулозоната (известного как Kdo), а также их объединение последовательно возрастала в ряду: здоровые доноры → пациенты с МЗО → пациенты с МНЗО. Кроме того, у пациентов с МНЗО повышена активность суперпути синтеза липополисахарида и резистентности к полимиксину. Подобные различия могут способствовать формированию вялотекущего системного воспаления и воспаления жировой ткани, более характерного для пациентов с МНЗО [14, 59].

Главная функция липополисахаридов, пептидогликанов и других компонентов оболочки бактериальных клеток заключается в защите бактерии [60, 61]. Увеличение потребности кишечной микробиоты в таких структурах может отражать агрессивные условия среды ее обитания, создаваемые ожирением, особенно метаболически нездорового фенотипа.

Ожирение у взрослых, вне зависимости от метаболического фенотипа, сопровождается повышением концентрации TFF2 и TFF3 в плазме крови, что отличает их от детей с ожирением. Мы не обнаружили значимых ассоциаций между уровнем TFF и метаболическими путями кишечной микробиоты, что оставляет открытым вопрос о влиянии метаболического профиля микробиоты на состояние кишечной стенки.

Функциональный профиль микробного сообщества ожидаемо был более изменен у пациентов с метаболически нездоровым фенотипом ожирения, чем у пациентов с метаболически здоровым. У пациентов с МНЗО кишечная микробиота отличается большими метаболическими возможностями катаболизма энергетических субстратов, в том числе аминокислот, продукции АТФ в цикле

Кребса и цепи переноса электронов, синтеза хинонов, витаминов B1, B6, B7, захвата железа и синтеза гема, синтеза нуклеотидов, ароматических аминокислот и деградации ароматических соединений. Кроме того, в микробиоте этих пациентов усилен синтез защитных компонентов клеточной стенки, в частности липополисахаридов.

Ранее нами показано [37, 62], что при МНЗО снижено разнообразие кишечной флоры, в то время как при МЗО увеличено. Возможно, при МЗО повышенная способность кишечной микробиоты к синтезу гема, хинонов способствует лучшему энергообеспечению бактериальных клеток и дает им метаболические преимущества, способствуя тем самым увеличению микробного разнообразия.

МНЗО в свою очередь, по-видимому, сопровождается формированием агрессивных условий для кишечного микробиома, что, с одной стороны, истощает кишечную флору, а с другой – выступает мощным фактором селекции микробиома. Изменение метаболического профиля микробиоты при МНЗО может быть залогом выживания бактерий. В таких условиях выживание микробных клеток зависит от их способности к пролиферации (например, интенсивный синтез нуклеотидов), продукции энергии и синтезу защитных компонентов клеток. Однако подобное перерождение кишечного микробиома может вносить вклад в развитие метаболических нарушений. Таким образом, может происходить формирование порочного круга: метаболически нездоровое ожирение способствует

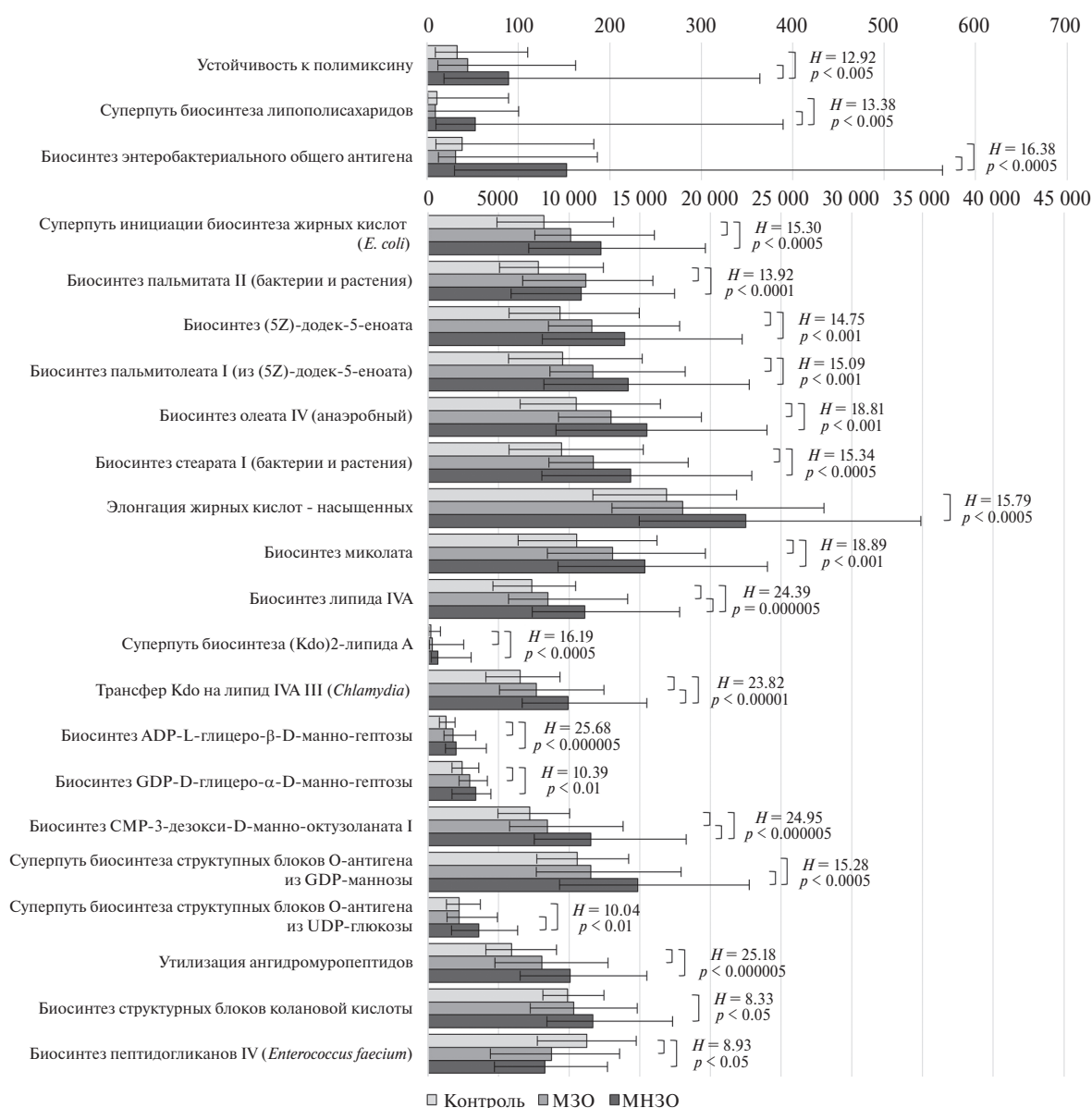


Рис. 10. Анализ путей синтеза структурных компонентов в метаболических профилях микробиома пациентов с МЗО и МНЗО.

истощению кишечного микробиома, дальнейшее перерождение которого вносит вклад в патогенез формирования метаболических нарушений у таких пациентов.

Статья подготовлена на основании результатов, полученных в ходе реализации “Соглашения о предоставлении гранта в форме субсидии из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня, выполняющих исследования и разработки по приоритетам научно-технологического развития” от 20 апреля 2022 года (№ 075-15-2022-310).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Проведение научно-исследовательской работы одобрено Локальным этическим комитетом (ЛЭК) ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 186 от 26.06.2019) и Локальным независимым этическим комитетом (ЛНЭК) ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (протокол № 20/19 от 12.12.2019). От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cheng Z., Zhang L., Yang L., Chu H. (2022) The critical role of gut microbiota in obesity. *Front. Endocrinol.* (Lausanne). **13**, 1025706. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2022.1025706>
- Van Hul M., Cani P.D. (2023) The gut microbiota in obesity and weight management: microbes as friends or foe? *Nat. Rev. Endocrinol.* **19**(5), 258–271. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00794-0>
- Douglas G.M., Maffei V.J., Zaneveld J.R., Yurgel S.N., Brown J.R., Taylor C.M., Huttenhower C., Langille M.G.I. (2020) PICRUST2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* **38**, 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Hu J., Guo P., Mao R., Ren Z., Wen J., Yang Q., Yu J., Zhang T., Liu Y., Yan T. (2022) Gut microbiota signature of obese adults across different classifications. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **15**, 3933–3947. <https://doi.org/10.2147/dms0.S387523>
- Kim M.H., Yun K.E., Kim J., Park E., Chang Y., Ryu S., Kim H.L., Kim H.N. (2020) Gut microbiota and metabolic health among overweight and obese individuals. *Sci. Rep.* **10**(1), 19417. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-76474-8>
- Duan M., Wang Y., Zhang Q., Zou R., Guo M., Zheng H. (2021) Characteristics of gut microbiota in people with obesity. *PLoS One.* **16**(8), e0255446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255446>
- Takiishi T., Fenero C.I.M., Câmara N.O.S. (2017) Intestinal barrier and gut microbiota: shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers.* **5**(4), e1373208. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>
- Portincasa P., Bonfrate L., Khalil M., De Angelis M., Calabrese F.M., D’amato M., Wang D.Q.-H., Di Ciaula A. (2022) Intestinal barrier and permeability in health, obesity and NAFLD. *Biomedicines.* **10**(1), 83. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010083>
- Braga Emidio N., Hoffmann W., Brierley S.M., Muttenthaler M. (2019) Trefoil factor family: unresolved questions and clinical perspectives. *Trends Biochem. Sci.* **44**(5), 387–390. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.01.004>
- Kjellev S. (2009) The trefoil factor family — small peptides with multiple functionalities. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**(8), 1350–1369. <https://doi.org/10.1007/S00018-008-8646-5>
- Madsen J., Nielsen O., Tornøe I., Thim L., Holmskov U. (2007) Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J. Histochem. Cytochem.* **55**(5), 505–513. <https://doi.org/10.1369/JHC.6A7100.2007>
- Шестопалов А.В., Дворников А.С., Борисенко О.В., Тутьян А.В. (2019) Трефолиновые факторы – новые маркеры мукозального барьера желудочно-кишечного тракта. *Инфекция и иммунитет.* **9**(1), 39–46. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-39-46
- Kurt-Jones E.A., Cao L.C., Sandor F., Rogers A.B., Whary M.T., Nambiar P.R., Cerny A., Bowen G., Yan J., Takaishi S., Chi A.L., Reed G., Houghton J.M., Fox J.G., Wang T.C. (2007) Trefoil family factor 2 is expressed in murine gastric and immune cells and controls both gastrointestinal inflammation and systemic immune responses. *Infect. Immun.* **75**(1), 471–480. <https://doi.org/10.1128/IAI.02039-05>
- Iacobini C., Pugliese G., Blasetti Fantauzzi C., Federici M., Menini S. (2019) Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism.* **92**, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.009>
- Шестопалов А.В., Колесникова И.М., Гапонов А.М., Григорьева Т.В., Хуснутдинова Д.Р., Камальдинова Д.Р., Волкова Н.И., Макаров В.В., Юдин С.М., Румянцев А.Г., Румянцев С.А. (2022) Влияние метаболического типа ожирения на микробиом крови. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* **25**(2), 35–41.
- Колесникова И.М., Карбышев М.С., Гапонов А.М., Хуснутдинова Д.Р., Григорьева Т.В., Камальдинова Д.Р., Борисенко О.В., Макаров В.В., Юдин С.М., Румянцев С.А., Шестопалов А.В. (2023) Особенности таксономической принадлежности бактериальной ДНК крови у пациентов с различными метаболическими фенотипами ожирения. *Бюллетень сибирской медицины.* **22**(2), 61–67. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-61-67>
- Expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. (2001) 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). *JAMA.* **285**(19), 2486–2497. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>
- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J.,

- Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J.E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislaw C.J., Brown C.T., Callahan B.J., Caraballo-Rodríguez A.M., Chase J., Cope E.K., Da Silva R., Diener C., Dorrestein P.C., Douglas G.M., Durall D.M., Duvallet C., Edwardson C.F., Ernst M., Estaki M., Fouquier J., Gauglitz J.M., Gibbons S.M., Gibson D.L., Gonzalez A., Gorlick K., Guo J., Hillmann B., Holmes S., Hlste H., Huttenhower C., Huttley G.A., Janssen S., Jarmusch A.K., Jiang L., Kaehler B.D., Kang K. Bin., Keefe C.R., Keim P., Kelley S.T., Knights D., Koester I., Kosciolk T., Kreps J., Langille M.G.I., Lee J., Ley R., Liu Y.X., Loftfield E., Lozupone C., Maher M., Marotz C., Martin B.D., McDonald D., McIver L.J., Melnik A.V., Metcalf J.L., Morgan S.C., Morton J.T., Naimey A.T., Navas-Molina J.A., Nothias L.F., Orchanian S.B., Pearson T., Peoples S.L., Petras D., Preuss M.L., Priesse E., Rasmussen L.B., Rivers A., Robeson M.S., Rosenthal P., Segata N., Shaffer M., Shiffer A., Sinha R., Song S.J., Spear J.R., Swafford A.D., Thompson L.R., Torres P.J., Trinh P., Tripathi A., Turnbaugh P.J., Ul-Hasan S., van der Hooft J.J.J., Vargas F., Vázquez-Baeza Y., Vogtmann E., von Hippel M., Walters W., Wan Y., Wang M., Warren J., Weber K.C., Williamson C.H.D., Willis A.D., Xu Z.Z., Zaneveld J.R., Zhang Y., Zhu Q., Knight R., Caporaso J.G. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME2. *Nat. Biotechnol.* **37**(8), 852–857.
<https://doi.org/10.1038/S41587-019-0209-9>
19. Quast C., Priesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**(Database issue), D590–D596.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
20. Ghanemi A., Yoshioka M., St-Amand J. (2021) Trefoil factor family member 2: from a high-fat-induced gene to a potential obesity therapy target. *Metabolites*. **11**(8), 536.
<https://doi.org/10.3390/metabo11080536>
21. Ghanemi A., Yoshioka M., St-Amand J. (2021) Trefoil factor family member 2 expression as an indicator of the severity of the high-fat diet-induced obesity. *Genes* (Basel). **12**(10), 1505.
<https://doi.org/10.3390/genes12101505>
22. Shestopalov A.V., Kolesnikova I.M., Savchuk D.V., Teplyakova E.D., Shin V.A., Grigoryeva T.V., Naboka Yu.L., Gaponov A.M., Roumiantsev S.A. (2023) Effect of the infant feeding type on gut microbiome taxonomy and levels of trefoil factors in children and adolescents. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **59**, 877–890.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023030201>
23. Коваленко Т.В., Ларионова М.А. (2019) Трекинг ожирения в детском возрасте. *Педиатрия*. **98**, 128–135.
<https://doi.org/10.24110/0031-403X-2019-98-4-128-135>
24. Wan Y., Yuan J., Li J., Li H., Yin K., Wang F., Li D. (2020) Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal tricarboxylic acid cycle intermediates. *Clin. Nutr.* **39**(10), 3189–3198.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.02.014>
25. Tan J., McKenzie C., Potamitis M., Thorburn A.N., Mackay C.R., Macia L. (2014) The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol.* **121**, 91–119.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
26. Brahe L.K., Astrup A., Larsen L.H. (2013) Is butyrate the link between diet, intestinal microbiota and obesity-related metabolic diseases? *Obes. Rev.* **14**(12), 950–959.
<https://doi.org/10.1111/OBR.12068>
27. Amabebe E., Robert F.O., Agbalalah T., Orubu E.S.F. (2020) Microbial dysbiosis-induced obesity: role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. *Br. J. Nutr.* **123**(10), 1127–1137.
<https://doi.org/10.1017/S0007114520000380>
28. Yang J., Keshavarzian A., Rose D.J. (2013) Impact of dietary fiber fermentation from cereal grains on metabolite production by the fecal microbiota from normal weight and obese individuals. *J. Med. Food.* **16**(9), 862–867.
<https://doi.org/10.1089/JMF.2012.0292>
29. Martínez-Cuesta M.C., del Campo R., Garriga-García M., Peláez C., Requena T. (2021) Taxonomic characterization and short-chain fatty acids production of the obese microbiota. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **11**, 598093.
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.598093>
30. Krolenko E.V., Kupriyanova O.V., Nigmatullina L.S., Grigoryeva T.V., Roumiantsev S.A., Shestopalov A.V. (2024) Changes of the concentration of short-chain fatty acids in the intestines of mice with different types of obesity. *Bull. Exp. Biol. Med.* **176**(3), 347–353.
doi: 10.1007/s10517-024-06022-1
31. Thomas-Valdés S., Tostes M. das G.V., Anunciação P.C., da Silva B.P., Sant’Ana H.M.P. (2017) Association between vitamin deficiency and metabolic disorders related to obesity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**(15), 3332–3343.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1117413>
32. Walther B., Philip Karl J., Booth S.L., Boyaval P. (2013) Menquinones, bacteria, and the food supply: the relevance of dairy and fermented food products to vitamin K requirements. *Adv. Nutr.* **4**(4), 463–473.
<https://doi.org/10.3945/AN.113.003855>
33. Aussel L., Pierrel F., Loiseau L., Lombard M., Fontecave M., Barras F. (2014) Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1837**(7), 1004–1011.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.015>
34. Nowrouzi B., Li R.A., Walls L.E., d’Espaux L., Malci K., Liang L., Jonguitud-Borrego N., Lerma-Escalera A.I., Morones-Ramirez J.R., Keasling J.D., Rios-Solis L. (2020) Enhanced production of taxadiene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **19**(1), 200.
<https://doi.org/10.1186/S12934-020-01458-2>
35. Goncheva M.I., Chin D., Heinrichs D.E. (2022) Nucleotide biosynthesis: the base of bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol.* **30**(8), 793–804.
<https://doi.org/10.1016/J.TIM.2021.12.007>
36. Ding T., Xu M., Li Y. (2022) An overlooked prebiotic: beneficial effect of dietary nucleotide supplementation on gut microbiota and metabolites in senescence-accelerated Mouse prone-8 mice. *Front. Nutr.* **9**, 820799.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.820799>
37. Гапонов А.М., Волкова Н.И., Ганенко Л.А., Набока Ю.Л., Маркелова М.И., Синягина М.Н., Харченко А.М., Хуснутдинова Д.Р., Румянцев С.А., Тугельян А.В., Макаров В.В., Юдин С.М., Шестопалов А.В. (2021) Особенности микробиома толстой кишки у пациентов с ожирением при его различных фенотипах

- (оригинальная статья). *Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиологии*. **98**(2), 144–155.
doi: 10.36233/0372-9311-66
38. Kesh K., Mendez R., Mateo-Victoriano B., Garrido V.T., Durden B., Gupta V.K., Oliveras Reyes A., Merchant N., Datta J., Banerjee S., Banerjee S. (2022) Obesity enriches for tumor protective microbial metabolites and treatment refractory cells to confer therapy resistance in PDAC. *Gut Microbes*. **14**(1), 2096328.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2096328>
 39. Wang X., Matuszek Z., Huang Y., Parisien M., Dai Q., Clark W., Schwartz M.H., Pan T. (2018) Queuosine modification protects cognate tRNAs against ribonuclease cleavage. *RNA*. **24**(10), 1305–1313.
<https://doi.org/10.1261/RNA.067033.118/-/DC1>
 40. Tuorto F., Legrand C., Cirzi C., Federico G., Liebers R., Müller M., Ehrenhofer-Murray A.E., Dittmar G., Gröne H., Lyko F. (2018) Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation. *EMBO J.* **37**(18), e99777.
<https://doi.org/10.15252/EMBJ.201899777>
 41. Nie X., Chen J., Ma X., Ni Y., Shen Y., Yu H., Panagiotou G., Bao Y. (2020) A metagenome-wide association study of gut microbiome and visceral fat accumulation. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**, 2596–2609.
<https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.09.026>
 42. Gaca A.O., Kajfasz J.K., Miller J.H., Liu K., Wang J.D., Abranches J., Lemos J.A. (2013) Basal levels of (p)ppGpp in *Enterococcus faecalis*: the magic beyond the stringent response. *mBio*. **4**(5), e00646–13.
<https://doi.org/10.1128/MBIO.00646-13>
 43. Siptroth J., Moskalenko O., Krumbiegel C., Ackermann J., Koch I., Pospisil H. (2023) Investigation of metabolic pathways from gut microbiome analyses regarding type 2 diabetes mellitus using artificial neural networks. *Discov. Artif. Intell.* **3**, 19.
<https://doi.org/10.1007/S44163-023-00064-6>
 44. Tosar J.P., Cayota A. (2020) Extracellular tRNAs and tRNA-derived fragments. *RNA Biol.* **17**(8), 1149–1167.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1729584>
 45. Gutiérrez-Repiso C., Molina-Vega M., Bernal-López M.R., Garrido-Sánchez L., García-Almeida J.M., Sajoux I., Moreno-Indias I., Tinahones F.J. (2021) Different weight loss intervention approaches reveal a lack of a common pattern of gut microbiota changes. *J. Pers. Med.* **11**(2), 109.
<https://doi.org/10.3390/JPM11020109>
 46. Constante M., Fragoso G., Calvé A., Samba-Mondonga M., Santos M.M. (2017) Dietary heme induces gut dysbiosis, aggravates colitis, and potentiates the development of adenomas in mice. *Front. Microbiol.* **8**, 1809.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01809>
 47. Ijssennagger N., Belzer C., Hooiveld G.J., Dekker J., Van Mil S.W.C., Müller M., Kleerebezem M., Van Der Meer R., Klaenhammer T.R. (2015) Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**(32), 10038–10043.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1507645112>
 48. Fernández Á.F., Bárcena C., Martínez-García G.G., Tamargo-Gómez I., Suárez M.F., Pietrocola F., Castoldi F., Esteban L., Sierra-Filardi E., Boya P., López-Otín C., Kroemer G., Mariño G. (2017) Autophagy counteracts weight gain, lipotoxicity and pancreatic β -cell death upon hypercaloric pro-diabetic regimens. *Cell Death Dis.* **8**(8), e2970. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2017.373>
 49. Ramos-Molina B., Queipo-Ortuño M.I., Lambertos A., Tinahones F.J., Peñafiel R. (2019) Dietary and gut microbiota polyamines in obesity- and age-related diseases. *Front. Nutr.* **6**, 24.
<https://doi.org/10.3389/FNUT.2019.00024>
 50. Liu R., Hong J., Xu X., Feng Q., Zhang D., Gu Y., Shi J., Zhao S., Liu W., Wang X., Xia H., Liu Z., Cui B., Liang P., Xi L., Jin J., Ying X., Wang X., Zhao X., Li W., Jia H., Lan Z., Li F., Wang R., Sun Y., Yang M., Shen Y., Jie Z., Li J., Chen X., Zhong H., Xie H., Zhang Y., Gu W., Deng X., Shen B., Xu X., Yang H., Xu G., Bi Y., Lai S., Wang J., Qi L., Madsen L., Wang J., Ning G., Kristiansen K., Wang W. (2017) Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat. Med.* **23**(7), 859–868.
<https://doi.org/10.1038/NM.4358>
 51. Шатова О.П., Гапонов А.М., Григорьева Т.В., Васильев И.Ю., Столетова Л.С., Макаров В.В., Юдин С.М., Румянцев С.А., Шестопалов А.В. (2023) Катаболиты триптофана и гены ферментов микробиома кишечника. *Вестник РГМУ*. **4**, 41–59.
doi: 10.24075/vrgmu.2023.027
 52. Yu D., Yang Y., Long J., Xu W., Cai Q., Wu J., Cai H., Zheng W., Shu X.O. (2021) Long-term diet quality and gut microbiome functionality: a prospective, shotgun metagenomic study among urban Chinese adults. *Curr. Dev. Nutr.* **5**(4), nzab026.
<https://doi.org/10.1093/CDN/NZAB026>
 53. Fabietti F., Delise M., Piccioli Bocca A. (2001) Investigation into the benzene and toluene content of soft drinks. *Food Control*. **12**(8), 505–509.
[https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00041-X](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00041-X)
 54. Srain B.M., Pantoja-Gutiérrez S. (2022) Microbial production of toluene in oxygen minimum zone waters in the Humboldt Current System off Chile. *Sci. Rep.* **12**(1), 10669.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-14103-2>
 55. Synowiec A., Żyła K., Gniewosz M., Kieliszek M. (2021) An effect of positional isomerism of benzoic acid derivatives on antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Open Life Sci.* **16**(1), 594–601.
<https://doi.org/10.1515/biol-2021-0060>
 56. Javaheri-Ghezeldizaj F., Alizadeh A.M., Dehghan P., Ez-zati Nazhad Dolatabadi J. (2023) Pharmacokinetic and toxicological overview of propyl gallate food additive. *Food Chem.* **423**, 135219.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.135219>
 57. Guo J., Han X., Zhan J., You Y., Huang W. (2018) Vanillin alleviates high fat diet-induced obesity and improves the gut microbiota composition. *Front. Microbiol.* **9**, 2733.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02733>
 58. Шестопалов А.В., Колесникова И.М., Савчук Д.В., Гапонов А.М., Теплякова Е.Д., Григорьева Т.В., Васильев И.Ю., Румянцев А.Г., Борисенко О.В., Румянцев С.А. (2023) Влияние типа вскармливания на первом году жизни на метаболические профили микробного сообщества кишечника детей и подростков с ожирением и нормальной массой тела, проживающих в Ростовской области. *Педиатрия им. Г.Н. Сперанского*. **102**(5), 90–102.
doi: 10.24110/0031-403X-2023-102-5-90-102
 59. Hersoug L.G., Møller P., Loft S. (2018) Role of microbiota-derived lipopolysaccharide in adipose tissue inflammation,

- adipocyte size and pyroptosis during obesity. *Nutr. Res. Rev.* **31**(2), 153–163.
<https://doi.org/10.1017/S0954422417000269>
60. Bertani B., Ruiz N. (2018) Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal Plus.* **8**(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.
<https://doi.org/10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0001-2018>
61. Pazos M., Peters K. (2019) Peptidoglycan. *Subcell. Biochem.* **92**, 127–168.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_5
62. Колесникова И.М., Гапонов А.М., Румянцев С.А., Ганенко Л.А., Волкова Н.И., Григорьева Т.В., Лайков А.В., Макаров В.В., Юдин С.М., Шестопалов А.В. (2022) Взаимосвязь содержания нейротрофинов и кишечного микробиома при различных метаболических типах ожирения. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* **58**(4), 43–56.
<https://doi.org/10.31857/S0044452922040076>

Metabolic Profile of Gut Microbiota and Levels of Trefoil Factors in Adults with Different Metabolic Phenotypes of Obesity

I. M. Kolesnikova^{1, 2, *}, L. A. Ganenko³, I. Yu. Vasilyev⁴, T. V. Grigoryeva⁴, N. I. Volkova³, S. A. Roumiantsev^{1, 2, 5}, A. V. Shestopalov^{1, 2, 5, 6}

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

²The National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, 117292 Russia

³Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, 344002 Russia

⁴Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

⁵Center for Molecular Health, Moscow, 117437 Russia

⁶Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: ir.max.kolesnikova@gmail.com

Obesity is associated with changes in the gut microbiota, as well as increased permeability of the intestinal wall. In 130 non-obese volunteers, 57 patients with metabolically healthy obesity (MHO), and 76 patients with metabolically unhealthy obesity (MUHO), bacterial DNA was isolated from stool samples, and the 16S rRNA gene was sequenced. The metabolic profile of the microbiota predicted by PICRUSt2 (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/picrust/>) was more altered in patients with MUHO than MHO. Obesity, especially MUHO, was accompanied by an increase in the ability of the gut microbiota to degrade energy substrates, produce energy through oxidative phosphorylation, synthesize water-soluble vitamins (B1, B6, B7), nucleotides, heme, aromatic amino acids, and protective structural components of cells. Such changes may be a consequence of the microbiota adaptation to the MUHO-specific conditions. Thus, a vicious circle is formed, when MUHO promotes the depletion of gut microbiome, and further degeneration of the latter contributes to the pathogenesis of metabolic disorders. The concentration of the trefoil factor family (TFF) in the serum of the participants was also determined. In MHO and MUHO patients, TFF2 and TFF3 levels were increased, but we did not find significant associations of these changes with the metabolic profile of the gut microbiota.

Keywords: metabolically healthy obesity, metabolically unhealthy obesity, gut microbiota, metabolic profile, TFF2, TFF3, PICRUSt2