



УДК 579.262

МОДУЛЯЦИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У ДИАБЕТИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Кожаметов С.С.^{1,2,3}, Муханбетжанов Н.^{1,3}, Кушугулова А.Р.^{1,2}

¹National Laboratory Astana, Назарбаев Университет,
пр. Кабанабай батыра, 53. Нур-Султан, 010000, Казахстан

²Казахстанская ассоциация изучения микробиома человека,
Нур-Султан, 010000, Казахстан

³Инновационный центр ArtScience,
Нур-Султан, 010000, Республика Казахстан

sskozhakmetov@gmail.com

АБСТРАКТ

Сахарный диабет является одной из основных сложных проблем общественного здравоохранения в мире, и фактически переходит в разряд глобальной эпидемии. Он связан с повышенным риском большого количества осложнений, включающих дислипидемию, сердечно-сосудистые заболевания. Микробиота модулирует воспаление, метаболизирует не перевариваемые пищевые компоненты, влияет на проницаемость кишечника, метаболизм глюкозы и липидов, чувствительность к инсулину и общий энергетический гомеостаз. В исследовании проводилось изучение влияния мультиштаммового пробиотика на микрофлору кишечника у больных диабетом. В результате проведенных работ показано, что микробиом пациентов с сахарным диабетом отличается от нормального и обеднен бифидобактериями и некоторыми продуцентами бутирата, такими как *Subdoligranulum*, но обогащен *Prevotella*. Применение мультиштаммового пробиотика привело к увеличению биоразнообразия микрофлоры кишечника. Также в образцах фекалий увеличилось содержание ацетата и бутирата, тогда как концентрация пропионата заметно снизилась.

Ключевые слова: микробиом, кишечник, короткоцепочечные жирные кислоты, пробиотик, таксон, разнообразие

ВВЕДЕНИЕ

Микробиоценоз кишечника является продуктом сложного взаимодействия между хозяином и окружающей средой, а пищевые предпочтения является одной из основных движущих сил, формирующих типы кишечных бактериальных сообществ [1]. Западная диета, богатая насыщенными / транс-жирами и простыми сахарами и бедная клетчаткой, связана с селективной модуляцией таксономических профилей, которые функционально связаны с более провоспалительной средой и нарушением кишечного барьера. Нарушение кишечного гомеостаза, в свою очередь, приводит к чрезмерной внутренней диффузии бактериальных фрагментов / продуктов, это способствует воспалению в ключевых инсулин-чувствительных тканях, что приводит к инсулинорезистентности [2].

Результаты исследований показывают, что бактериальный профиль кишечника может быть предиктором некоторых заболеваний, и манипулирование посредством применения препаратов коррекции им может быть обнадеживающим подходом к профилактике и лечению метаболических заболеваний [3]

Кишечный микробиом представляет собой живую высоко диверсифицированную, гетерогенную экосистему, выполняющую и регулирующую важнейшие физиологические и иммунологические функции. Вместе с тем существует много данных, свидетельствующих о роли микробиома кишечника в патогенезе различных заболеваний, таких как, ожирение,

сахарный диабет, воспалительные заболевания кишечника, неалкогольный стеатогепатит, кардиоваскулярные заболевания [4]

Обнаружено, что сокращение разнообразия микрофлоры толстого кишечника коррелирует со многими заболеваниями, например, такими как метаболический синдром [5], сахарный диабет второго типа [6], воспалительные заболевания кишечника и колоректальный рак [7]. Потеря значительной части микрофлоры связана с диетой с высоким содержанием жиров и волокон с низким содержанием клетчатки. Напротив, потребление пищи с высоким содержанием ферментированных и растительных волокон увеличивает разнообразие микрофлоры. Сами пищевые волокна не могут перевариваться в кишечнике и проходят верхние отделы пищеварительного тракта, в значительной степени, неповрежденными, где становятся пищей для микробиоты [8]. Также в качестве гипотезы можно предположить, что состав и соотношение микроорганизмов в кишечнике и в особенности в дистальном отделе, может оказывать влияние на объем извлекаемой энергии из поступающей пищи.

Анаэробный метаболизм пищевых волокон толстокишечной микрофлорой приводит к продукции короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), в частности к ацетату, бутирату и пропианату. КЖК модулируют физиологические процессы организма хозяина и, как полагают, способствуют поддержанию здоровья [9]. Например, диета с высоким содержанием пшеничных отрубей способствует росту и развитию бактерий, продуцирующих бутират, принадлежащих к семейству *Lachnospiraceae* (*Eubacterium xylanophilum* и *Butyrivibrio* spp.) [10]. Молярное соотношение ацетата, пропионата и бутирата в толстой кишке и стуле составляет около 3: 1: 1 [11].

Пробиотики определяются как живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу для здоровья хозяина (FAO / WHO 2002). До недавнего времени пробиотики не оценивались против диабета и метаболических нарушений прежде всего вследствие недостаточного понимания механизмов их действия. В последнее десятилетие появились экспериментальные публикации раскрывающие эти механизмы. Так в нашем исследовании применения пробиотического препарата привело к снижению индекса массы тела. Установлено, что у казахских пациентов с метаболическими нарушениями сокращено количество как бифидобактерий и бутират продуцирующих бактерий [12]. Похожие результаты демонстрируют и другие исследования [13]. Также было продемонстрировано, что пропионат микробной продукции защищает от сердечных заболеваний и снижает атеросклероз при экспериментальной гипертензии [14].

В экспериментах на курах диетические добавки пробиотических бактерий влияли на разнообразие микробиоты слепой кишки, изменяли содержание короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) и подавляли липогенез. В эпителиальных клетках кишечника (IES) КЖК (ацетат, пропионат и бутират) повышают экспрессию глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) через пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) [15]. Нами в ходе предыдущих исследований разработан мультиштаммовый пробиотический продукт, содержащий в своем составе продуцентов короткоцепочечных жирных кислот. Штаммы в составе пробиотика были выделены от здоровых добровольцев классическими микробиологическими методами. Микроорганизмы охарактеризованы по выраженности пробиотических свойств. Целью данного исследования является определение влияния мультиштаммового пробиотического препарата на микробиоту кишечника пациентов с ожирением и диабетом.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на 9 добровольцах (4 мужского, 5 женского пола), таблица 1, подписавших информированное согласие. Мультиштаммовый пробиотик, продуцирующий короткоцепочечные жирные кислоты был изготовлен посредством

лиофилизации мультиштаммовой бактериальной суспензии и капсулирован в желатиновые капсулы размера «0». В качестве пребиотического наполнителя для получения концентрации 1×10^9 КОЕ/г использовали кобылье молоко и концентрат полифенолов.

Микробная ДНК была изолирована с использованием QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, 51306). Концентрацию двуцепочечной ДНК в изолированных образцах определяли с помощью Qubit 2.0 и набора Qubit dsDNA HS Assay kit (ThermoFisher, 32853).

Библиотеки для секвенирования следующего поколения (NGS), генерировали с помощью NEXTFlex® 16S V1–V3 Amplicon-Seq Kit (PerkinElmer, NOVA-4202-04), в соответствии с протоколом изготовителя. Качество библиотек оценивалось с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit. Ампликоны секвенировали на приборе MiSeq (Illumina).

Демультиплексирование, фильтрация, удаление шумов, химерных последовательностей, определение OTU и таксономическая идентификация были выполнены с использованием конвейера LotuS [16].

Анализ альфа-разнообразия для оценки численности сообщества, расчет альфа-биоразнообразия (индекс Шеннона), бета-биоразнообразия, а также построение таксономического распределения на уровне типа и рода были выполнены с использованием пакета vegan [17] и phyloseq R packages (v.1.24.2) графики были созданы с использованием пакетов ggplot2 и MicrobiomeAnalyst R.

Короткоцепочечные жирные кислоты разделяли с использованием Kinetex® 2,6 мкм ХВ-С18, $50 \times 2,1$ мм (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Подвижная фаза А вода + 0,1% муравьиной кислоты, подвижная фаза В ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты. Этапность работ проводили согласно методам описанным в [18]. В качестве стандартов использовали Propionic acid (Пропионовая кислота) 94425-1ML-F; Sigma-Aldrich); Butyric acid (Масляная кислота) (19215-5ML; Sigma-Aldrich); Acetic acid (уксусная кислота) (PHR1748-3X1.5ML; Sigma-Aldrich). Результаты приведены в таблице 9. Образцы сыворотки крови готовили в соответствии с протоколом Sandra F. Gallego [19]. Образец помещали на 5 ч при 90 °С и 750 об/мин. После охлаждения жирные кислоты экстрагировали 180 мкл н.-гексана путем перемешивания в течение 10 мин при 1400 об/мин и центрифугирования в течение 5 мин при 1000 g. Объединенные экстракты упаривали в вакууме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Добровольцы потребляли по 2 капсулы лиофилизированного мультиштаммового бактериального продукта, состоящего из продуцентов КЖК описанных в нашей предыдущей работе [20] и комплекса лактобактерий, в день после еды. До и после 3 месяцев приема проводили определение микробной сигнатуры кишечника. Определение таксономических различий после фильтрации по качеству, химерам, и количеству последовательностей, было назначено 942 таксономических единиц в 18 фекальных образцах (9 до приема и 9 после 3 месяцев приема). Средний возраст пациентов составил $44,7 \pm 2,53$ (таблица 1).

Таблица 1. Демографические показатели добровольцев

Показатель	Пациенты с СД (n=9)
Возраст, лет	$44,7 \pm 2,53$
Пол: муж, n /жен, n	4/5
Масса тела, kg/m ²	$29,1 \pm 2,31$

Также как и в других подобных исследованиях, мы в своей работе обнаружили, что большинство OTU в кишечнике соответствуют *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria* (рисунки 1).

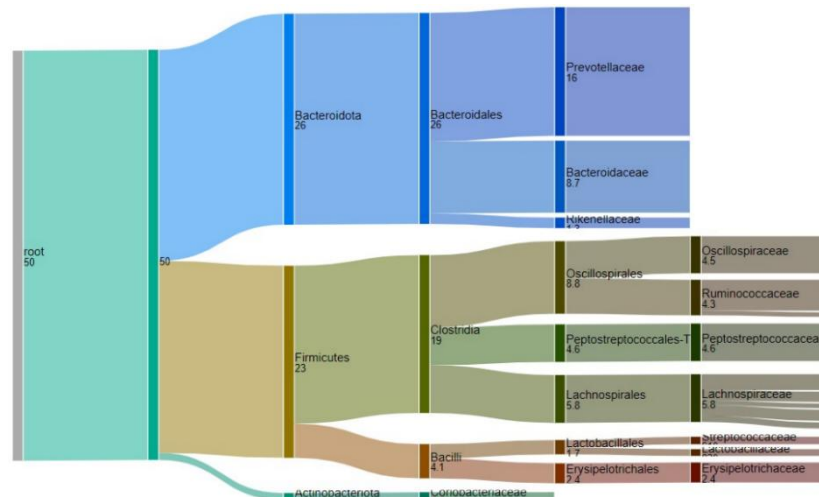


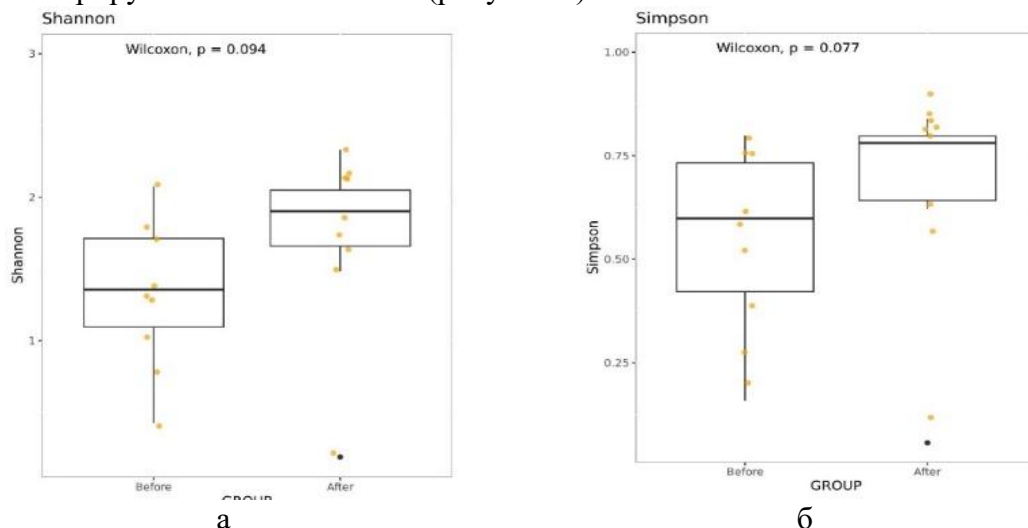
Рис. 1. Структура микробного сообщества фекального микробиома ранжированного относительно численности бактерий (Sankey plot)

Пакет R phyloseq был использован для определения богатства и альфа-разнообразия на уровне рода [21]. Оценка разнообразия внутри сообщества (альфа-разнообразия) проводилась с использованием 6 различных метрик – Ace, Chao1, Fisher, Observed, Shannon и Simpson. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Статистика альфа-разнообразия микробиома кишечника

JP	variable	n	min	max	edian	q1	q3	iqr	mean	sd
e		9	5,291	0,76	3,348	0,799	0,593	0,794	5,057	1,176
e		9	5,137	2,142	4,769	5,871	7,898	2,027	1,639	,876
e		9	8,75	72,5	36	27	38	11	5,528	5,147
e		9	15	82	33,5	25	3,333	3,333	5,944	0,131
e		9	,269	,362	,256	,796	,155	,359	,202	,088
e		9	,922	,673	,304	,215	,192	,976	,999	,539
e	ved	9	15	29	24	23	28	5	3,778	,969
e	ved	9	13	33	27	21	31	10	5,444	,912
e	on	9	,427	,074	,356	,095	,713	,617	,335	,506
e	on	9	,189	2,33	,902	,658	2,05	,392	,736	,643
e	son	9	,159	,799	,599	,422	,733	,311	,554	0,21
e	son	9	,057	,839	,781	,642	,797	,155	,676	,245

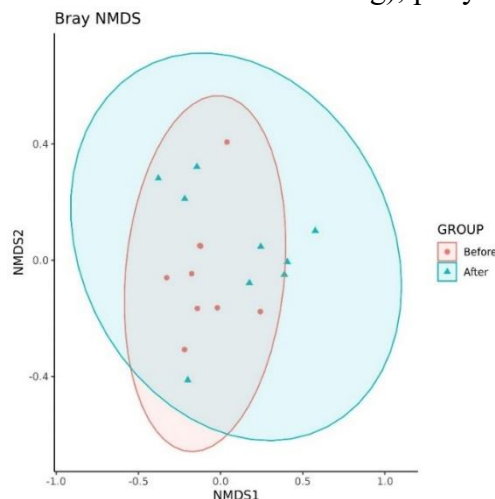
Индекс Шеннона более чувствителен к численности редких таксонов, тогда как, индекс Симпсона чувствителен к обычным таксонам. Сравнение результатов этих двух индексов демонстрируют согласованность (рисунок 2).



а. Индекс разнообразия Shannon, $p=0,094$. б. Индекс разнообразия Simpson $p=0,077$

Рис.2. Эффект оральной интервенции мультиштаммового пробиотика на композицию фекальной микрофлоры добровольцем, уровень род

Статистически значимых различий как в богатстве, так и в распределении не выявлено, возможно это связано с малым объемом выборки, но вместе с тем имеется тенденция к различию микробиома до и после приема мультиштаммового пробиотика продуцирующего короткоцепочечные жирные кислоты в том числе масляную кислоту. Оценка разнообразия между сообществами микроорганизмов кишечника, степени дифференцированности распределения (бета-разнообразия) проводилась с помощью дистанции Bray. Графическое представление бета-разнообразия проводилось с помощью NMDS шкалирования (Non-metric multidimensional scaling), рисунок 3.



[PERMANOVA] F-value: 2,3989; p-value = 0,026.

Рис. 3. Оценка степени дифференцированности распределения микроорганизмов до и после приема бутират продуцирующих бактерий, уровень рода

Наблюдалось заметное разделенное распределение, подтверждающее разницу в составе кишечной микробиоты между группами до и после интервенции. Бетта-разнообразие выявило достоверное отличие ($p<0,05$) между группами (рисунок 3). Что может говорить о том, что прием мультиштаммового продукта привел к увеличению биоразнообразия в сообществе кишечных микроорганизмов.

Таксономический анализ показал, что относительная численность 11 родов изменилась в группе после приема пробиотика. Большинство видов, численность которых увеличилась, принадлежали к семействам, производящим бутират, *Ruminococcaceae* и *Eubacterium hallii*, *Lactobacillales*, тогда как виды с сокращенной популяцией в основном принадлежали к семейству *Bacteroidaceae* (рисунок 4).

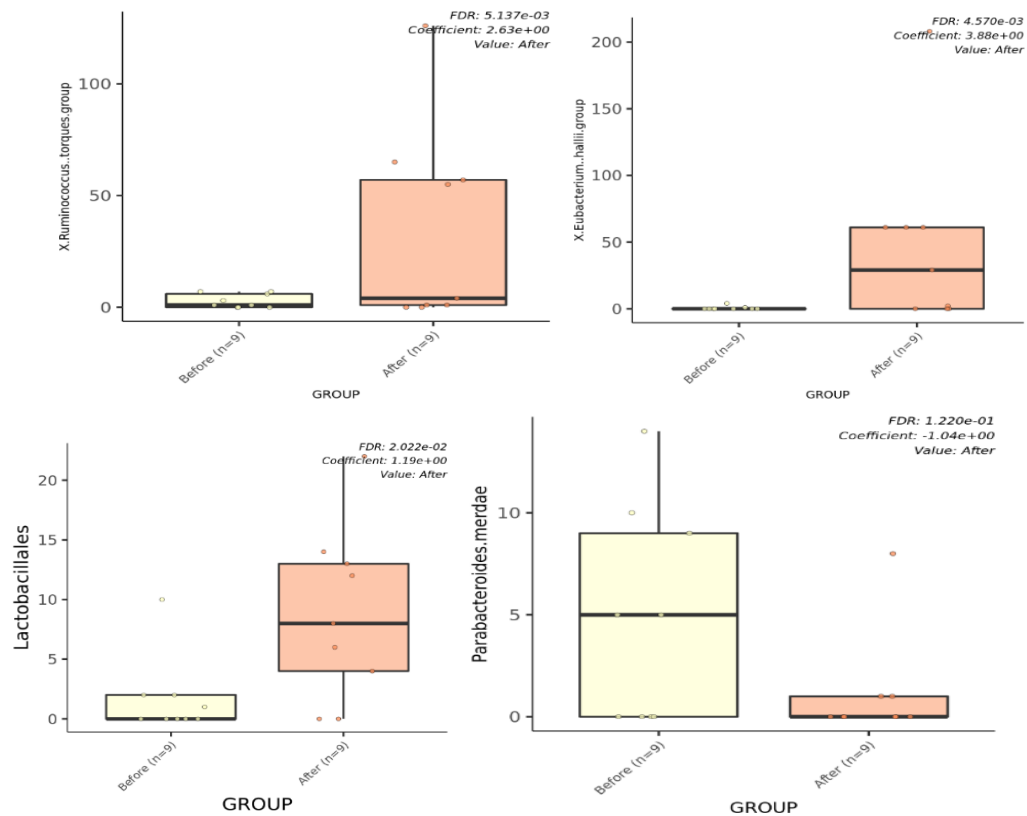


Рис. 4. Боксплот количественно меняющихся микроорганизмов после пероральной интервенции пробиотика, $p < 0,05$

В результате проведенной работы показано, что интервенция мультиштаммового пробиотика приводила к улучшению фекальной микрофлоры со стимулированием роста бутират продуцирующих микроорганизмов. В месте с тем обнаружено, что применение пробиотика снижало количество *Anaerostipes* также как утверждается связанного с бутират продукцией. С чем это связано, пока не известно, но имеются согласующиеся результаты Leimin Qian с соав., получившими аналогичные данные в группе добровольцев, перорально потреблявших пробиотик [22].

Анализ секвенирования микробной ДНК показал, что на уровне филума наиболее распространенными являются: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Archei* and *Verrucomicrobia*. К другим бактериальным филумам, широко представленным в популяции, относятся: *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, and *Tenericutes*. На уровне рода продемонстрировано преобладание *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Prevotella* и *Clostridium*.

Традиционный рацион казахов сильно отличается из европейской или восточноазиатской кухни. Это включает высокое потребление красного мяса (особенно конины), по устоявшейся традиции. Большинство казахстанцев тоже пьют черный чай, в среднем 6-10 чашек в день, обычным является регулярное потребление кисломолочных продуктов (курт, кумыс, шубат, пахта, сметана), и обжаренные в масле хлебобулочные изделия в больших количествах. Все эти факторы могут потенциально повлиять на микробиоту кишечника.

Метаболиты и метаболические пути тесно связаны с возникновением и развитием ожирения [23]. Недавние результаты исследований показали, что такие метаболиты кишечной микробиоты как короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК) влияют на физиологические процессы заболевания, энергоснабжение и иммунную регуляцию [24], особенно масляная кислота, которая может облегчать ожирение и резистентность к инсулину у мышей, находящихся на диете с высоким содержанием жиров [25],

пропионовая кислота играющая важнейшую роль в значительном ослаблении сердечной гипертрофии, фиброза, сосудистой дисфункции и гипертензии [14,26]. Кроме того, масляная кислота может снижать аппетит и предотвращать ожирение [27]. Короткоцепочечные жирные кислоты ацетат, бутират и пропионат образуются как конечные продукты микробной ферментации не перевариваемых углеводов в кишечнике [9]. Уровни КЖК и разнообразие продуцирующей их микробиоты, значительно снижаются у людей с ожирением по сравнению со здоровыми волонтерами, и применение продуктов содержащих или продуцирующих КЖК может стать обнадеживающей стратегией лечения ожирения. Исследования в области эффекта пробиотиков на организм человека при диабете доказывают связь между потреблением пробиотиков и метаболическим профилем [25]. Один из основных предполагаемых механизмов может включать увеличение секреции GLP-1 энтероэндокринными L-клетками для улучшения углеводного обмена, снижения глюкозотоксичности и повышения чувствительности к инсулину. Другие предлагаемые механизмы, объясняющие действие пробиотиков на диабет, связаны с противовоспалительным, антиоксидантным и иммуномодулирующим действием, изменением экспрессии некоторых генов, участвующих в диабете. Образцы фекалий гомогенизировали и разбавляли до концентрации 2,0 мг DW / мл. Количественное определение КЖК выполняли методом жидкостной хроматографии tandemной масс-спектрометрии (LC-MS / MS). Результаты приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Концентрация КЖК в кале пациентов до и после приема мультиштаммового пробиотика

мкмоль/г	Среднее ± SD	Медиана	Мин. значение	Макс. значение
до приема				
г	89,464±151,228	375,616	87,111	641,2
ац	21,362±14,497	120,861	115,149	137,054
ионат	173,09±28,668	171	105,858	225,422
после 3 месяцев приема				
г	48,336±113,290	459,856	179,346	648,320
ац	68,902±25,207	169,497	101,525	210,985
ионат	49,109±27,090	145,845	122,897	226,709

В результате потребления пробиотика в образцах фекалий увеличилось содержание ацетата и бутирата, тогда как концентрация пропионата заметно снизилась.

Большая часть масляной кислоты используется как источник энергии колоноцитами. Через воротную вену КЖК достигают печени, где ацетат и пропионат метаболизируются и частично окисляются или используются в качестве субстрата в глюконеогенезе и липогенезе [28]. Это стимулирует обновление клеток, улучшает выработку муцина и формирует слизистый барьер. Часть КЖК микробного происхождения попадает в периферический кровоток. Наибольшей концентрации достигает ацетат, тогда как пропионат и бутират определяется в небольших количествах.

Таблица 4. Концентрация КЖК в сыворотке крови пациентов до и после приема мультиштаммового пробиотика

мкмоль/л	Среднее ± SD	Медиана	Мин. значение	Макс. значение
до приема				
г	69,164±15,170	66,247	50,021	98,487
ац	4,839±2,875	4,888	0,552	9,649
ионат	3,942±1,953	4,126	1,242	9,328
после 3 месяцев приема				
г	70,507±14,800	69,279	49,778	95,526
ац	5,226±2,210	5,246	2,001	9,574
ионат	3,821±1,342	3,873	1,225	5,997

В сыворотке крови концентрация КЖК значительно ниже, чем в образцах стула. Медиана содержания в крови ацетата на 3 мкмоль/л выше после 3 месяцев приема



мультиштаммового пробиотика. Увеличилось и содержание бутирата после приема составило 5,246 мкмоль/л. Тогда как содержание пропионата, как и в кале было снижено после курса приема пробиотика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антидиабетический эффект мультиштаммового пробиотического препарата, по-видимому, связан с увеличением количества КЖК-продуцирующих бактерий, улучшением барьерной функции кишечника и указывает на то, что этот биологический активный продукт может быть хорошим кандидатом для профилактики и вспомогательной терапии диабета. Несмотря на то, что на сегодняшний день есть множество данных по эффекту пробиотиков на микрофлору кишечника при различных заболеваниях, есть данные показывающие межиндивидуальные различия этого эффекта вызванные диетическими, генетическими, возрастом и другими факторами.

Показано, что микробиом пациентов с метаболическими нарушениями, сахарным диабетом, ожирением отличается от нормального. Микробиомы пациентов с метаболическими нарушениями обеднены бифидобактериями и некоторыми продуцентами бутирата, такими как *Subdoligranulum*, но обогащены *Prevotella*.

Фактически, сдвиг микробиоты может напрямую влиять на жизненно важные функции организма. В исследовании на лабораторных животных мы наблюдали увеличение штаммов, продуцирующих КЖК, включая *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Muribaculaceae*, *Ruminococcaceae* в результате применения биологического продукта. Кроме того, было обнаружено уменьшение количества *Helicobacter* и других представителей патогенной микрофлоры кишечника. Наши результаты показывают, что биологически активные вещества бактерий обладают терапевтическим потенциалом для лечения язвенного колита. Однако для подтверждения его эффективности и клинической значимости необходимы дополнительные исследования.

Исследование на пациентах с сахарным диабетом показало прием мультиштаммового пробиотика приводит к увеличению микробного разнообразия, хотя и на небольшой процент и не является статистически значимым. Тем не менее введение пробиотика имело весьма значимый эффект на микробное сообщество, в особенности на бутират продуцирующие таксоны.

Финансирование

Авторы выражают признательность Министерству сельского хозяйства Республики Казахстан за финансирование исследовательской работы: Разработка технологий с использованием новых штаммов полезных микроорганизмов, ферментов, нутриентов и других комплектов при производстве специальных диетических продуктов питания ИРН: BR10764998; Министерству образования и науки Республики Казахстан грант: ИРН AP05134659.

ЛИТЕРАТУРА

1. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome // Nature. -2014.- Vol.505, № 7484.- P.559-563.
2. Khan M.T., Nieuwdorp M., Bäckhed F. Microbial modulation of insulin sensitivity // Cell Metab.- 2014. - Vol.20, №5. - P.753-60.
3. Le Barz M., Anhê F.F., Varin T.V., Desjardins Y., Levy E., Roy D., et al. Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders// Diabetes Metab J. - 2015. - Vol.39, № 4. -P. 291-303.

4. Yoshida N., Yamashita T., Hirata K.-I. Gut Microbiome and Cardiovascular Diseases // *Dis (Basel, Switzerland)*.- 2018.- Vol.6, № 3. - P.56.
5. Karlsson F., Tremaroli V., Nielsen J., Bäckhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases // *Diabetes*. - 2013. - Vol.62, № 10. - P. 3341-3349.
6. Laphorne S., Pereira-Fantini P.M., Fouhy F., Wilson G., Thomas S.L., Delliós N.L., et al. Gut microbial diversity is reduced and is associated with colonic inflammation in a piglet model of short bowel syndrome// *Gut Microbes*.- 2013.-Vol 4, № 3. - P.212-221.
7. Ahn J., Sinha R., Pei Z., Dominianni C., Wu J., Shi J., et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer // *J Natl Cancer Inst*. - 2013. - Vol.105, № 24. - P.1907-1911.
8. Hamaker B.R., Tuncil Y.E. A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota // *J Mol Biol*. - 2014. - Vol.426, № 23. - P.3838-3850.
9. Koh A., De Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F.. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites // *Cell*.- 2016. - Vol.165, № 6. - P.1332-1345.
10. Duncan S.H., Russell W.R., Quartieri A., Rossi M., Parkhill J., Walker A.W., et al. Wheat bran promotes enrichment within the human colonic microbiota of butyrate-producing bacteria that release ferulic acid // *Environ Microbiol*. - 2016.- Vol.18, № 7. - P.2214-2225.
11. Canfora E.E., Jocken J.W., Blaak E.E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity // *Nat Rev Endocrinol*. - 2015. - Vol.11, № 10. - P.577-591. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.128>
12. Kushugulova A., Forslund S.K., Costea P.I., Kozhakhmetov S., Khassenbekova Z., Urazova M., et al. Metagenomic analysis of gut microbial communities from a Central Asian population // *BMJ Open*. - 2018. - Vol.8, № 7. - e021682–e021682.
13. Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes // *Nature*. - 2012. - Vol. 490. - P.55-60.
14. Bartolomaeus H., Balogh A., Yakoub M., Homann S., Markó L., Höges S., et al. Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage// *Circulation*. - 2019. - Vol.139, № 11. - P.1407-1421.
15. Zhang J.-M., Sun Y.-S., Zhao L.-Q., Chen T.-T., Fan M.-N., Jiao H.-C., et al. SCFAs-Induced GLP-1 Secretion Links the Regulation of Gut Microbiome on Hepatic Lipogenesis in Chickens // *Front Microbiol*. - 2019. - Vol. 10. P. 2176.
16. Hildebrand F., Tadeo R., Voigt A.Y., Bork P., Raes J. LotuS: an efficient and user-friendly OTU processing pipeline // *Microbiome*.- 2014. - Vol.2, №1. - P.30.
17. Oksanen A.J., Blanchet F.G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., Mcglinn D., et al. Package ‘vegan.’ -2020.
18. Liebisch G., Ecker J., Roth S., Schweizer S., Öttl V., Schött H.-F., et al. Quantification of Fecal Short Chain Fatty Acids by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry- Investigation of Pre-Analytic Stability // *Biomolecules*. - 2019. - Vol. 9, №4. - P.121.
19. Gallego S.F., Hermansson M., Liebisch G., Hodson L., Ejsing C.S. Total Fatty Acid Analysis of Human Blood Samples in One Minute by High-Resolution Mass Spectrometry// *Biomolecules*. - 2018. - Vol.9, №1. - P.7.
20. Kozhakhmetov S., Babenko D., Kozhakhmetova S., Tuyakova A., Nurgaziyev M., Nurgozhina A., et al. Gut modulation of dysbiosis induced by dextran sulfate sodium // *Food Biosci*. - 2021. - Vol. 42. - P.101167.
21. McMurdie P.J., Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data // *PLoS One*. - 2013. - Vol.8, №4. - :e61217.
22. Qian L., Gao R., Huang J., Qin H. Supplementation of triple viable probiotics combined with dietary intervention is associated with gut microbial improvement in humans on a high-fat diet // *Exp Ther Med*.- 2019. - Vol.18, №3. - P.2262-2270.
23. Yoneshiro T., Wang Q., Tajima K., Matsushita M., Maki H., Igarashi K., et al. BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44 // *Nature*.- 2019. - Vol.

572, № 7771. - P.614-619.

24. O'Grady J., O'Connor E.M., Shanahan F. Review article: dietary fibre in the era of microbiome science // *Aliment Pharmacol Ther.* - 2019. - Vol.49, № 5. - P. 506-515.

25. Nagpal R., Wang S., Ahmadi S., Hayes J., Gagliano J., Subashchandrabose S, et al. Human-origin probiotic cocktail increases short-chain fatty acid production via modulation of mice and human gut microbiome // *Sci Rep.* - 2018. - Vol.8, № 1. P.12649.

26. Bartolomeus H., Avery E.G., Bartolomeus T.U.P., Kozhakhmetov S., Zhumadilov Z., Müller D.N., et al. Blood pressure changes correlate with short-chain fatty acid production potential shifts under a synbiotic intervention // *Cardiovasc Res.* - 2020. - Vol.116, № 7. - P.1252- 1253.

27. Li Z., Yi C.-X., Katiraei S., Kooijman S., Zhou E., Chung C.K., et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit // *Gut.* - 2018. - Vol.67, № 7. - P.1269-1279.

28. Boets E., Gomand S.V., Deroover L., Preston T., Vermeulen K., De Preter V., et al. Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study // *J Physiol.* - 2017. - Vol.595, № 2. - P.541-555.

REFERENCES

1. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 2014, vol.505, no.7484, pp.559-563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>

2. Khan M.T., Nieuwdorp M., Bäckhed F. Microbial modulation of insulin sensitivity. *Cell Metab.*, 2014, vol.20, no.5, pp. 753-60. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.006>

3. Le Barz M., Anhê F.F., Varin T.V., Desjardins Y., Levy E., Roy D., et al. Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J.*, 2015, vol.39, no. 4, pp. 291-303. <https://doi.org/10.4093/dmj.2015.39.4.291>

4. Yoshida N., Yamashita T., Hirata K.-I. Gut Microbiome and Cardiovascular Diseases. *Dis (Basel, Switzerland)*, 2018, vol.6, no. 3, pp.56. <https://doi.org/10.3390/diseases6030056>

5. Karlsson F., Tremaroli V., Nielsen J., Bäckhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes*, 2013, vol.62, no. 10, pp. 3341-3349. <https://doi.org/10.2337/db13-0844>

6. Laphorne S., Pereira-Fantini P.M., Fouhy F., Wilson G., Thomas S.L., Dellios N.L., et al. Gut microbial diversity is reduced and is associated with colonic inflammation in a piglet model of short bowel syndrome. *Gut Microbes.*, 2013, vol 4, no. 3, pp.212-221. <https://doi.org/10.4161/gmic.24372>

7. Ahn J., Sinha R., Pei Z., Dominianni C., Wu J., Shi J., et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 2013, vol.105, no. 24, pp.1907-1911. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.028>

8. Hamaker B.R., Tuncil Y.E. A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota. *J Mol Biol.*, 2014, vol.426, no 23, pp.3838-3850. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.028>

9. Koh A., De Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F.. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell.*, 2016, vol.165, no. 6, pp.1332-1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>

10. Duncan S.H., Russell W.R., Quartieri A., Rossi M., Parkhill J., Walker A.W., et al. Wheat bran promotes enrichment within the human colonic microbiota of butyrate-producing bacteria that release ferulic acid. *Environ Microbiol.*, 2016, vol.18, no. 7, pp .2214-2225. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13158>

11. Canfora E.E., Jocken J.W., Blaak E.E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol.*, 2015, vol.11, no.10, pp.577-591. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.128>

12. Kushugulova A., Forslund S.K., Costea P.I., Kozhakhmetov S., Khassenbekova Z.,

Urazova M., et al. Metagenomic analysis of gut microbial communities from a Central Asian population. *BMJ Open.*, 2018, vol.8, no. 7. - e021682–e021682. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-021682>

13. Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 2012, vol. 490, pp.55-60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>

14. Bartolomeaus H., Balogh A., Yakoub M., Homann S., Markó L., Höges S., et al. Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage, *Circulation*, 2019, vol.139, no. 11, pp.1407-1421. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036652>

15. Zhang J.-M., Sun Y.-S., Zhao L.-Q., Chen T.-T., Fan M.-N., Jiao H.-C., et al. SCFAs-Induced GLP-1 Secretion Links the Regulation of Gut Microbiome on Hepatic Lipogenesis in Chickens. *Front Microbiol.*, 2019, vol. 10, pp. 2176. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02176>

16. Hildebrand F., Tadeo R., Voigt A.Y., Bork P., Raes J. LotuS: an efficient and user-friendly OTU processing pipeline. *Microbiome*, 2014, vol.2, no.1, pp.30. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-30>

17. Oksanen A.J., Blanchet F.G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., Mcglinn D., et al. Package ‘vegan.’ -2020.

18. Liebisch G., Ecker J., Roth S., Schweizer S., Öttl V., Schött H.-F., et al. Quantification of Fecal Short Chain Fatty Acids by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry- Investigation of Pre-Analytic Stability. *Biomolecules*, 2019, vol. 9, no.4, pp.121. <https://doi.org/10.3390/biom9040121>

19. Gallego S.F., Hermansson M., Liebisch G., Hodson L., Ejsing C.S. Total Fatty Acid Analysis of Human Blood Samples in One Minute by High-Resolution Mass Spectrometry. *Biomolecules*, 2018, vol.9, no.1, pp.7. <https://doi.org/10.3390/biom9010007>

20. Kozhakhmetov S., Babenko D., Kozhakhmetova S., Tuyakova A., Nurgazyev M., Nurgozhina A., et al. Gut modulation of dysbiosis induced by dextran sulfate sodium. *Food Biosci.*, 2021, vol. 42, pp.101167. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101167>

21. McMurdie P.J., Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*, 2013, vol.8, no.4, :e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

22. Qian L., Gao R., Huang J., Qin H. Supplementation of triple viable probiotics combined with dietary intervention is associated with gut microbial improvement in humans on a high-fat diet. *Exp Ther Med.*, 2019, vol.18, no.3, pp. 2262-2270. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7801>

23. Yoneshiro T., Wang Q., Tajima K., Matsushita M., Maki H., Igarashi K., et al. BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature*, 2019, vol. 572, no. 7771, pp.614-619. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1503-x>

24. O’Grady J., O’Connor E.M., Shanahan F. Review article: dietary fibre in the era of microbiome science. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2019, vol.49, no. 5, pp. 506-515. <https://doi.org/10.1111/apt.15129>

25. Nagpal R., Wang S., Ahmadi S., Hayes J., Gagliano J., Subashchandrabose S, et al. Human-origin probiotic cocktail increases short-chain fatty acid production via modulation of mice and human gut microbiome. *Sci Rep.*, 2018, vol.8, no 1, pp.12649. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30114-4>

26. Bartolomeaus H., Avery E.G., Bartolomeaus T.U.P., Kozhakhmetov S., Zhumadilov Z., Müller D.N., et al. Blood pressure changes correlate with short-chain fatty acid production potential shifts under a synbiotic intervention. *Cardiovasc Res.*, 2020, vol.116, no. 7, pp.1252- 1253. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa083>

27. Li Z., Yi C.-X., Katiraei S., Kooijman S., Zhou E., Chung C.K., et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut.*, 2018, vol.67, no.7, pp.1269-1279. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314050>

28. Boets E., Gomand S.V., Deroover L., Preston T., Vermeulen K., De Preter V., et al. Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects:



a stable isotope study. *J Physiol.*, 2017, vol.595, no. 2, pp.541-555. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314050>

ДИАБЕТТІК НАУҚАСТАРДЫҢ ІШЕК МИКРОБИОТАСЫНЫҢ МОДУЛЯЦИЯСЫ

Қожахметов С.С.^{1,2,3}, Муханбетжанов Н.^{1,3}, Қушугулова А.Р.^{1,2}

¹*National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті,
53, Қабанбай батыр қөш., Нұр-Сұлтан, 010000, Қазақстан*

²*Қазақстан адам микробиомасын зерттеу қауымдастығы,
Нұр-Сұлтан, 010000, Қазақстан*

³*Art Science инновациялық орталығы,
Нұр-Сұлтан, 010000, Қазақстан Республикасы*
sskozhakhmetov@gmail.com

ТҮЙІН

Қант диабеті әлемдегі қоғамдық денсаулық сақтаудың негізгі проблемаларының бірі болып табылады және іс жүзінде жаһандық індет санатына енеді. Бұл дислипидемия, жүрек-тамыр аурулары сияқты көптеген асқынулардың қаупінің жоғарылауымен байланысты. Микробиота қабынуды модуляциялайды, сіңірілмейтін тағам компоненттерін метаболиздейді, ішек өткізгіштігіне, глюкоза мен липидтер алмасуына, инсулинге сезімталдыққа және жалпы энергетикалық гомеостазға әсер етеді. Зерттеу диабетпен ауыратын науқастардағы ішек микрофлорасына мультиштамддық пробиотиктің әсерін зерттеді. Жүргізілген жұмыстардың нәтижесінде қант диабетімен ауыратын науқастардың микробиомасы қалыптыдан өзгеше және бифидобактериялармен және *Subdoligranulum* сияқты бутираттың кейбір өндірушілерімен кемітілгені, бірақ *Prevotella*-мен байытылғаны көрсетілген. Мультиштамддық пробиотикті қолдану ішек микрофлорасының биоалуантүрлілігінің артуына алып келді. Сондай-ақ, нәжістің үлгілерінде ацетат пен бутираттың мөлшері артты, ал пропионат концентрациясы айтарлықтай төмендеді.

Негізгі сөздер: микробиом, ішек, қысқа тізбекті май қышқылдары, пробиотиктер, таксон, әртүрлілік

GUT MICROBIOTA MODULATION IN DIABETIC PATIENTS

Kozhakhmetov S.S.^{1,2,3}, Mukhanbetzhanov N.^{1,3}, Kushugulova A.R.^{1,2}

¹*National Laboratory Astana, Nazarbayev University,
53, Kabanbay batyr ave., Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan*

²*Kazakhstan Association of Human Microbiome Researchers,
Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan*

³*Innovative Center ArtScience,
Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan*
sskozhakhmetov@gmail.com

ABSTRACT

Metabolic disorders and diabetes mellitus are one of the major complex public health problems in the world, and in fact are becoming a global epidemic. It is associated with an increased risk of a large number of complications, including dyslipidemia, cardiovascular disease. The microbiota modulates inflammation, metabolizes indigestible food components, affects intestinal permeability, glucose and lipid metabolism, insulin sensitivity, and overall energy homeostasis. The study investigated the effect of a multistrain probiotic on the intestinal microflora in diabetic patients. As a result of the work carried out, it was shown that the microbiome



of patients with diabetes mellitus differs from normal and is depleted in bifidobacteria and some butyrate producers, such as *Subdoligranulum*, but enriched in *Prevotella*. The use of a multi-strain probiotic has led to an increase in the biodiversity of the intestinal microflora. Also, in the fecal samples, the content of acetate and butyrate increased, while the concentration of propionate decreased markedly.

Key words: microbiome, gut, short-chain fatty acids, probiotic, taxon, diversity