

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЕЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ С СОСТАВОМ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК КРОВИ У ДЕТЕЙ С ОЖИРЕНИЕМ

С. А. Румянцев^{1,2,3}, И. В. Кирилина^{1,2,3}✉, А. М. Гапонов², Д. Р. Хуснутдинова⁴, Т. В. Григорьева⁴, Е. Д. Теплякова⁵, В. В. Макаров⁶, С. М. Юдин⁶, А. В. Шестопалов^{1,2,3}

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

² Центр молекулярного здоровья, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия

⁴ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

⁵ Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

⁶ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Жировая ткань как источник развития хронического низкоинтенсивного воспаления активизирует клетки иммунной системы путем выработки цитокинов и хемокинов. Баланс между про- и противовоспалительными молекулами и их связь с бактериальной ДНК крови при ожирении у детей и подростков недостаточно исследованы. Цель исследования — нахождение паттернов взаимодействия между долями семейств бактериальной ДНК у здоровых детей и с ожирением, анализ уровней цитокинов и их связь с бактериальной ДНК крови, оценка альфа-разнообразия микробиома крови и сходства микробиомов крови и кала. Обследовано 163 человека (дети и подростки), которых разделили на 2 группы: 80 человек с ожирением I–III степени и 83 здоровых. Материал исследования — венозная кровь. Критерии включения в группы — отсутствие приема антибиотиков, про- и пребиотиков в течение трех месяцев. Методы — мультиплексный ИФА (иммуноферментный анализ); секвенирование участка v3-v4 гена 16S рРНК. Выявлены различия в микробиоме крови на уровне семейств как по доле, так и по частоте выделения бактериальной ДНК. Более 3/4 ДНК крови в обеих группах приходилось на 19 семейств. Значимо больший вклад в альфа-разнообразие у детей с ожирением принадлежал бактериальной ДНК *Ruminococcaceae*, однако в группе здоровых детей эта роль принадлежала *Bacteroidaceae*. Анализ бета-разнообразия крови позволил выявить у детей с ожирением значимую отдаленность микробиома крови и кала, что свидетельствует о преимущественно внекишечной транслокации бактериальной ДНК. Выявлено увеличение содержания ИЛ-17А ($p = 0,017$) и PD-L1 ($p = 0,021$) у детей с ожирением, а также различия в микробиоме крови в группах. Определены паттерны взаимодействия между долями бактериальной ДНК, оценены уровни цитокинов.

Ключевые слова: ожирение, цитокины, бактериальная ДНК, микробиом крови, дети, воспаление, PD-L1

Финансирование: работа выполняется в рамках договора № 0373100122119000041 по проекту «Создание банка биообразцов сыворотки крови и фекалий от здоровых доноров и пациентов с ожирением, метаболическим синдромом, сахарным диабетом II типа, нарушением мукозального барьера желудочно-кишечного тракта с целью выявления кандидатных видонеспецифических медиаторов систем quorum sensing микробиоты человека, модулирующих эндокринные и метаболическую функцию жировой ткани».

Вклад авторов: А. В. Шестопалов, С. А. Румянцев — идея, планирование эксперимента, написание и редактирование статьи; С. М. Юдин, В. В. Макаров — идея, редактирование; А. М. Гапонов — идея, планирование, редактирование; И. В. Кирилина — идея, планирование, сбор и обработка данных, написание и редактирование статьи; Т. В. Григорьева — планирование, сбор и обработка данных, редактирование; Е. Д. Теплякова — планирование эксперимента, редактирование статьи; Д. Р. Хуснутдинова — сбор данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено ЛНЭК ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 186 от 26 июня 2019 г.) и ЛНЭК ФГБОУ ВО РостГМУ (протокол № 20/19 от 12 декабря 2019 г.). Обязательным условием включения в исследование было добровольное подписание информированных согласий пациентами и их родителями.

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Валерьевна Кирилина
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; kirilina-irina@bk.ru

Статья получена: 13.10.2023 **Статья принята к печати:** 25.11.2023 **Опубликована онлайн:** 23.12.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.049

RELATIONSHIP BETWEEN PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS AND BLOOD BACTERIAL DNA COMPOSITION IN OBESE CHILDREN

Roumiantsev SA^{1,2,3}, Kirilina IV^{1,2,3}✉, Gaponov AM², Khusnutdinova DR⁴, Grigoryeva TV⁴, Teplyakova ED⁵, Makarov VV⁶, Yudin SM⁶, Shestopalov AV^{1,2,3}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Center for Digital and Translational Biomedicine, Center for Molecular Health, Moscow, Russia

³ The National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russia

⁴ Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

⁵ Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

⁶ Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia

Adipose tissue, being a source of chronic low-grade inflammation, activates cells of the immune system by producing cytokines and chemokines. The balance between pro- and anti-inflammatory molecules and their relationship with blood bacterial DNA in obese children and adolescents has not been studied sufficiently. This study aimed to find patterns of interaction between fractions of bacterial families in healthy and obese children, analyze cytokine levels and their relationship with blood bacterial DNA content, evaluate alpha diversity of blood microbiome and similarities of blood and fecal microbiomes. We examined 163 individuals (children and adolescents), who were divided into 2 groups, obese ($n = 80$, obesity classes I through III) and healthy ($n = 83$). The material sampled and studied was venous blood. Only individuals that have not been taking antibiotics, pro- and prebiotics for at least 3 months before the study were included. The methods employed were multiplex ELISA (enzyme immunoassay) and 16S rRNA gene sequencing (region V3–V4). From the angle of bacterial families, we found differences in their content (fractions) in blood microbiome and the frequency of isolation of their DNA therein. Nineteen families accounted for over three quarters of all bacterial DNA identified in the blood. In obese children, one of the dominating roles was played by *Ruminococcaceae*, with their DNA a key part of the microbiome's alpha diversity, while in healthy participants this could be said about *Bacteroidaceae*. Analyzing beta diversity, we found that in obese children, fecal and blood microbiomes differed significantly, which indicates, mainly, extra-intestinal translocation of bacterial DNA. Obese children exhibited increased content of IL17A ($p = 0.017$) and PD-L1 ($p = 0.021$); there were differences in blood microbiome between groups. We identified the patterns of interaction between bacterial DNA fractions, and assessed cytokine levels.

Keywords: obesity, cytokines, bacterial DNA, blood microbiome, children, inflammation, PD-L1

Funding: the work was done in the context of agreement #0373100122119000041 under the Project "Compilation of a bank of blood serum and faecal samples from healthy donors and patients with obesity, metabolic syndrome, type II diabetes mellitus, disrupted intestinal mucosal barrier, with the aim of identifying candidate species-specific mediators of the human microbiota quorum sensing systems modulating endocrine and metabolic functions of adipose tissue."

Author contribution: Shestopalov AV, Roumiantsev SA — idea of the study, experiment planning, manuscript writing, editing; Yudin SM, Makarov VV — idea of the study, editing; Gaponov AM — idea, experiment planning, manuscript editing; Kirilina IV — idea, experiment planning, data processing, manuscript writing, editing; Grigoryeva TV — planning, data collection, data processing, editing; Teplyakova ED — experiment planning, manuscript editing; Khusnutdinova DR — data collection.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Local Ethics Committee of N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Minutes #186 of June 26, 2019) and Local Ethics Committee of Rostov State Medical University (Minutes #20/19 of December 12, 2019). To be included in the study, all patients and their parents mandatorily signed voluntary informed consent forms.

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina V. Kirilina
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; kirilina-irina@bk.ru

Received: 13.10.2023 **Accepted:** 25.11.2023 **Published online:** 23.12.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.049

Нарушение микробиоты в организме человека приводит к изменению метаболизма и увеличению жировой ткани, постепенно способствуя развитию ожирения. Наблюдается неуклонный рост страдающих ожирением людей как среди взрослых, так и среди детей и подростков, что обуславливает актуальность поиска новых механизмов возникновения патологии. Важно своевременно выявлять предрасположенность к ожирению у детей и подростков, так как есть возможность отсрочить или в лучшем случае вообще предотвратить прогрессию заболевания, приводящую к развитию сахарного диабета II типа, дислипидемии, нарушений со стороны работы сердечно-сосудистой системы, репродуктивной системы, печени, микрососудистым нарушениям и т. д. Ожирение сопровождается морфологическими и функциональными изменениями в белой жировой ткани, привлекая иммунные клетки, такие как макрофаги, Т-клетки, В-клетки, вызывая инфильтрацию жировой ткани и таким образом запуская воспалительный процесс. Воспаление при ожирении носит вялотекущий и прогрессирующий характер, в отличие от острого воспаления, направленного на элиминацию патогена и восстановление гомеостаза. Воспалительный ответ может быть обусловлен как эндогенными (DAMP от англ. Damage Associated Molecular Patterns — молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждением), так и экзогенными (PAMP от англ. Pathogen Associated Molecular Patterns — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) лигандами (в том числе бактериальной ДНК), распознающимися PRR (паттерн-распознающими рецепторами) [1, 2]. PRR экспрессируются в том числе и адипоцитами. Различные паттерн-распознающие рецепторы, такие как Toll-подобные рецепторы (TLR), активно участвуют в противовирусной и антибактериальной защите организма. PAMP способствуют повышению экспрессии рецепторов адипоцитов и секреции провоспалительных цитокинов и адипокинов. Активация TLR-3 запускает каскад внутриклеточных событий, сопровождающихся активацией иммунных клеток и продукцией хемокинов и провоспалительных цитокинов, таких как ФНО α , IL1 β , IL6, IL8, хорошо известных в развитии воспаления в жировой ткани, сопровождающегося формированием инсулинорезистентности [3].

В то же время TLR участвуют в механизмах адипогенной дифференцировки, что выражается в их сочетанной экспрессии с PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors — рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом) на разных этапах дифференцировки адипоцитов [4, 5].

Однако на настоящий момент остаются неописанными изменения в содержании и таксономическом разнообразии микробиома крови и его связи с факторами воспаления.

Таким образом, целью работы было сравнение уровней содержания про- и противовоспалительных цитокинов в крови детей с ожирением и здоровых детей, а также их взаимосвязь с таксономической представленностью в

микробиоме крови; определение вклада бактериальной ДНК различных семейств в формирование альфа-разнообразия микробиома крови и его связь с микробиомом кишечника.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в 2019–2020 гг. Были обследованы 163 человека (дети и подростки), которые обратились в детскую городскую поликлинику №1 г. Ростова-на-Дону с целью очередной плановой диспансеризации. Из них 80 человек (в возрасте 10–18 лет, средний возраст составлял $13,25 \pm 2,00$ лет) были группой наблюдения — дети с алиментарно-конституциональным ожирением разной степени, которые уже находились на диспансерном учете с установленным диагнозом (табл. 1). Группой сравнения были 83 здоровых ребенка и подростка (в возрасте 10–18 лет, средний возраст составлял $12,92 \pm 2,21$ лет), которые не имели ожирения и других метаболических нарушений (табл. 1).

Критерии включения в обе группы: отсутствие приема антибиотиков, пробиотических и пребиотических препаратов в течение трех месяцев до включения в исследование, подписанное информированное согласие для участия в исследовании. Критерии исключения для обеих групп: тяжелые соматические заболевания (хроническая почечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность), заболевания желудочно-кишечного тракта (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона), любое заболевание в острой форме. Дополнительный критерий включения в группу наблюдения: индекс массы тела $SDS > +2,0$ и установленный диагноз — алиментарно-конституциональное ожирение I–III степени. Исследование было одноцентровым и одномоментным со случайной выборкой участников.

Анализ таксономического состава микробиома крови проводили на базе центра цифровой и трансляционной биомедицины ООО «Центр молекулярного здоровья», Государственного бюджетного учреждения Ростовской области Детская городская больница №1 Российского национального исследовательского университета имени Н. И. Пирогова, Казанского (Приволжского) федерального университета. У всех участников исследования проводили оценку антропометрических параметров и забор крови и кала для лабораторных исследований.

Выделение микробной ДНК из образцов крови участников исследования проводили с использованием набора QIAamp BiOstic Bacterimia DNA Kit (Qiagen; Германия) в соответствии с протоколом производителя. Контроль качества ДНК, его количественный и качественный состав оценивали методами спектрофотометрии (Qubit, Thermo Fisher Scientific; США) и гель-электрофореза (1% агарозы).

Подготовку библиотек и секвенирование вариабельного участка V3–V4 гена 16S рПНК проводили на платформе Illumina MiSeq (Illumina; США) согласно рекомендациям производителя. Полученные последовательности

Таблица 1. Антропометрические показатели групп

Группа	Контрольная группа	Группа наблюдения	<i>p</i>
ИМТ, кг/м ² , Me [Q ₁ ; Q ₃]	20,1 [19,4; 21,2]	27,0 [25,9; 28,8]	< 0,001
Вес, кг, Me [Q ₁ ; Q ₃]	49,0 [45,0; 55,5]	71,0 [61,0; 78,0]	< 0,001
Рост, см, Me [Q ₁ ; Q ₃]	157,0 [150,0; 165,0]	159,0 [154,0; 164,0]	0,619
Возраст, лет, Me [Q ₁ ; Q ₃]	13,0 [11,0; 15,0]	13,0 [11,8; 15,0]	0,237
Пол (м / ж)	57,8%/42,2%	52,5%/47,5%	0,187

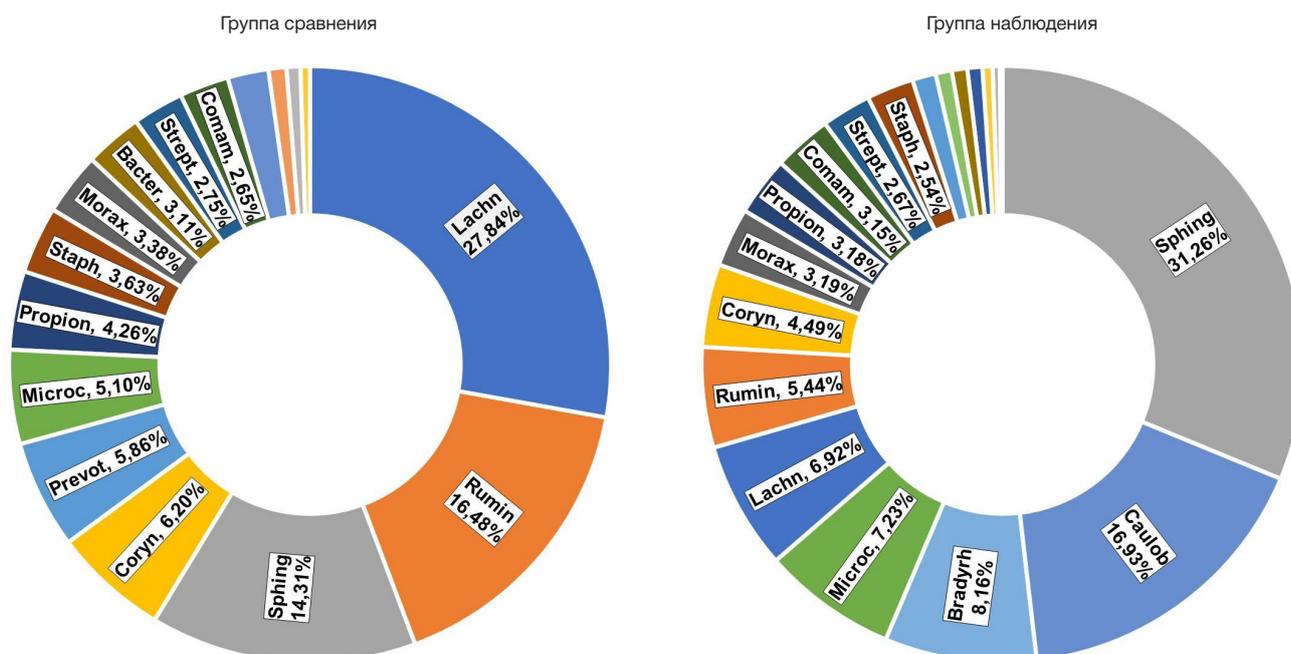


Рис. 1. Распределение бактериальной ДНК крови идентифицированных семейств среди здоровых детей и детей с ожирением в %. *Sphing* — *Sphingomonadaceae*, *Caulob* — *Caulobacteraceae*, *Bradyrh* — *Bradyrhizobiaceae*, *Microc* — *Micrococcaceae*, *Lachn* — *Lachnospiraceae*, *Rumin* — *Ruminococcaceae*, *Coryn* — *Corynebacteriaceae*, *Morax* — *Moraxellaceae*, *Propion* — *Propionibacteriaceae*, *Comam* — *Comamonadaceae*, *Strept* — *Streptococcaceae*, *Staph* — *Staphylococcaceae*, *Prevot* — *Prevotellaceae*, *Bacter* — *Bacteroidaceae*

генов 16S рРНК («риды») были проанализированы с помощью программного обеспечения QIIME (версия 1.9.1) [6] с использованием референсной базы данных Greengenes v. 13.8 [7] с 97%-ным порогом сходства между последовательностями.

Концентрации цитокинов IL6, 8, 10, 17, ФНО α определяли коммерческими наборами Milliplex (Merck; Германия) — Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel; фракталкин — Human Myokine Magnetic Bead Panel; PD-L1 (лиганд 1 запрограммированной клеточной гибели, от англ. Programmed cell death-ligand 1) — Human Immunology Checkpoint Protein Panel Magnetic Bead Panel методом мультиплексного иммуноферментного анализа (ИФА) на анализаторе Magpix (Bio-Rad Laboratories; США).

Статистическая обработка данных выполнена с помощью MedCalc® Statistical Software version 20.110 (MedCalc Software Ltd; Бельгия). Все массивы данных были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Ввиду отсутствия нормального распределения, в качестве меры центральной тенденции использовали медиану и ее [25–75] перцентили. Для сравнения величин индексов бета-разнообразия (Евклидово расстояние, Манхэттенское расстояние, несходство Брея–Кертиса), уровней содержания цитокинов и анализа различий в бактериальной ДНК крови применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Сравнение частоты выявления ДНК различных семейств из образцов крови в контрольной группе и у детей с ожирением проводили с использованием хи-квадрат анализа. Вне зависимости от использованного критерия различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$. Для выявления взаимосвязи между содержанием отдельных семейств (при условии их выделения из образцов крови пациентов) и характеристиками разнообразия микробиома крови проводили расчет коэффициента корреляции Спирмена. Коэффициенты корреляции (ρ) принимали во внимание при условии $|\rho| \geq 0,3$ — умеренная сила связи в

соответствии со шкалой Чэддока и при уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделенная из крови здоровых детей бактериальная ДНК принадлежала 29,0 [24,5–37,0] бактериальным семействам, а из крови детей с ожирением — 34,0 [28,0–42,0] семействам. Более 75% ДНК крови в обеих группах приходилось на 19 семейств: *Sphingomonadaceae*, *Caulobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Micrococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Comamonadaceae*, *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Chitinophagaceae*, *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Veillonellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Methylobacteriaceae* (рис. 1).

У детей с ожирением наблюдали статистически значимое увеличение доли ДНК: *Chitinophagaceae* ($p < 0,001$), *Caulobacteraceae* ($p < 0,001$), *Bradyrhizobiaceae* ($p = 0,004$), *Porphyromonadaceae* ($p = 0,091$) и *Sphingomonadaceae* ($p < 0,001$), тогда как содержание ДНК *Prevotellaceae* ($p < 0,001$) и *Lachnospiraceae* ($p < 0,001$) было статистически значимо ниже по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

У детей с ожирением статистически значимо чаще выделялась бактериальная ДНК семейств: *Sphingomonadaceae* ($p = 0,026$), *Ruminococcaceae* ($p = 0,085$), *Caulobacteraceae* ($p = 0,020$), *Bradyrhizobiaceae* ($p < 0,001$), *Porphyromonadaceae* ($p = 0,033$), *Chitinophagaceae* ($p < 0,001$), *Pasteurellaceae* ($p = 0,061$) и реже *Prevotellaceae* ($p = 0,044$), *Thermaceae* ($p = 0,084$) (табл. 2).

Анализ таксономической принадлежности бактериальной ДНК крови в группе детей с ожирением позволил установить повышение разнообразия бактериальной ДНК на уровне типов у детей с ожирением [8]. Представляет интерес анализ корреляционных взаимосвязей показателей альфа-разнообразия и таксономического состава бактериальной ДНК на уровне семейств. Выявлены отрицательные взаимосвязи показателей альфа-разнообразия с ДНК,

Таблица 2. Сравнение частоты встречаемости ДНК отдельных семейств бактерий и доли, приходящейся на эти семейства, в общем пуле бактериальной ДНК крови

Семейство	Частота встречаемости семейств у пациентов, %		Доля ДНК семейства в общем пуле бактериальной ДНК	
	Контрольная группа	Дети с ожирением	Контрольная группа	Дети с ожирением
<i>Lachnospiraceae</i>	85,5	86,3	0,1043 [0,0116–0,1954]	0,0314 [0,0074–0,0737]***
<i>Prevotellaceae</i>	84,3	71,3**	0,0220 [0,0053–0,0379]	0,0057 [0–0,0167]***
<i>Sphingomonadaceae</i>	84,3	95,0**	0,0536 [0,0115–0,1444]	0,1418 [0,0675–0,1946]***
<i>Comamonadaceae</i>	84,3	92,5	0,0100 [0,0029–0,0252]	0,0143 [0,0051–0,0371]*
<i>Ruminococcaceae</i>	71,1	82,5*	0,0618 [0–0,1281]	0,0247 [0,0035–0,0753]
<i>Caulobacteraceae</i>	65,1	81,3**	0,0082 [0–0,0750]	0,0768 [0,0148–0,1052]***
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	49,4	78,8***	0 [0–0,3148]	0,0370 [0,0031–0,3191]**
<i>Porphyromonadaceae</i>	44,6	61,3**	0 [0–0,0097]	0,0036 [0; 0,0113]*
<i>Chitinophagaceae</i>	32,5	65,0***	0 [0–0,0039]	0,0039 [0–0,0118]***
<i>Pasteurellaceae</i>	22,9	36,3*	0 [0–0]	0 [0–0,0025]
<i>Thermaceae</i>	36,1	23,8*	0 [0–0,0053]	0 [0–0]*

Примечание: различия достоверны по сравнению с контрольной группой: * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

относящейся к семействам — *Corynebacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Caulobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Moraxellaceae* — как в контрольной группе, так и у детей с ожирением.

Вместе с тем бактериальная ДНК только четырех семейств устанавливает положительные корреляции с показателями разнообразия микробиома крови, причем преимущественно биотопами являются толстый кишечник (*Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*) и ротовая полость (*Prevotellaceae*) (табл. 3).

Для выявления биотопов, формирующих микробиом крови, был проведен корреляционный анализ между характеристиками альфа-разнообразия долями бактериальной ДНК, приходящейся на отдельные семейства. Обнаружены положительные корреляции с *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*. Положительные корреляции возникли с ДНК микроорганизмов, населяющих главным образом два биотопа — толстый кишечник и ротовую полость, а также верхние дыхательные пути, мочеполовую систему; отрицательные — с ДНК бактерий, обнаруживаемых в толстом кишечнике, на кожных покровах, ротоглотке, носоглотке, пищеводе, желудке, воде, почве.

Примечательно, что у детей с ожирением наблюдается разнонаправленное изменение выраженности положительных корреляционных связей индексов альфа-разнообразия с семействами из одного и того же биотопа — снижение с семейством *Bacteroidaceae* и увеличение с семейством *Ruminococcaceae*.

Обращает также внимание снижение при ожирении крайне выраженных отрицательных корреляционных связей индексов альфа-разнообразия с ДНК семейств *Caulobacteraceae* и *Bradyrhizobiaceae* и появление отрицательных корреляций с ДНК семейства *Porphyromonadaceae* на фоне статистически значимого повышения их частоты встречаемости и доли в общем пуле бактериальной ДНК крови. Представители семейств *Caulobacteraceae* — обитатели почвы и воды, а *Bradyrhizobiaceae* входит в состав ядра микробиома грудного молока.

При анализе корреляций в группах здоровых детей и детей с ожирением выявлена различная архитектура взаимосвязей между ДНК различных таксономических

групп, содержащая как общие для обеих групп паттерны взаимосвязей, так и уникальные для каждой группы.

Обращает внимание, что в центре корреляционных связей находится ДНК семейства *Propionibacteriaceae*, которая устанавливает взаимосвязи с двумя паттернами корреляции. Один паттерн включает *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, другой — *Enterobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Comamonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Micrococcaceae*, *Caulobacteraceae*, *Sphingomonadaceae* (рис. 2, 3).

Примечательно, что в группе детей с ожирением возникает больше уникальных корреляционных взаимосвязей, и они образованы в основном ДНК микробиома внекишечных биотопов (кожа, ротовая полость, почва, вода).

Анализ бета-разнообразия проводили между микробиомами крови и кала. Данный анализ выявил значимое повышение показателей бета-разнообразия в группе детей с ожирением (Евклидово расстояние $p = 0,03$, Манхэттенское расстояние $p = 0,07$, несходство Брея-Кертиса $p = 0,07$), что свидетельствует о большем различии между микробиомами крови и кала у детей с ожирением. Это, в свою очередь, говорит о снижении доли кишечного микробиома в формировании микробиома крови и возрастании доли внекишечных микробиомов (рис. 4).

Таким образом, показанные нами ранее незначительное повышение альфа-разнообразия микробиома крови у детей с ожирением в виде статистически значимого увеличения количества операционных таксономических единиц (OTUs) и тенденции роста индекса филогенетического разнообразия (PD) дополняются данными о бета-разнообразии и корреляционных связях между ДНК различных семейств, которые свидетельствуют о том, что при ожирении повышение альфа-разнообразия микробиома крови сопровождается удалением его от микробиома кишечника, т. е. разнообразие достигается путем обогащения микробиома крови ДНК из внекишечных микробиомов [8].

Исследование уровня содержания цитокинов у детей с ожирением выявило статистически значимое увеличение IL17A и PD-L1 по сравнению со здоровыми детьми (табл. 4).

На основании проведенного корреляционного анализа установлены статистически значимые положительные взаимосвязи в группе детей с ожирением (табл. 5).

Таблица 3. Взаимосвязи между характеристиками альфа-разнообразия и бактериальной ДНК микробиома крови на таксономическом уровне — семейства

	Контрольная группа	Дети с ожирением
	Семейство <i>Bacteroidaceae</i>	
Индекс Shannon	$\rho = 0,669, p < 0,001, n = 57$	$\rho = 0,358^*, p = 0,015, n = 46$
Индекс Simpson	$\rho = 0,666, p < 0,001, n = 57$	$\rho = 0,356^*, p = 0,015, n = 46$
Индекс Chao1	$\rho = 0,533, p < 0,001, n = 57$	
Индекс PD	$\rho = 0,586, p < 0,001, n = 57$	
OTUs	$\rho = 0,575, p < 0,001, n = 57$	
Семейство <i>Prevotellaceae</i>		
Индекс Shannon	$\rho = 0,680, p < 0,001, n = 70$	$\rho = 0,540, p < 0,001, n = 56$
Индекс Simpson	$\rho = 0,678, p < 0,001, n = 70$	$\rho = 0,537, p < 0,001, n = 56$
Индекс Chao1	$\rho = 0,320, p < 0,001, n = 70$	$\rho = 0,358, p = 0,007, n = 56$
Индекс PD	$\rho = 0,535, p < 0,001, n = 70$	$\rho = 0,329, p = 0,013, n = 56$
OTUs	$\rho = 0,445, p < 0,001, n = 70$	$\rho = 0,333, p = 0,012, n = 56$
Семейство <i>Lachnospiraceae</i>		
Индекс Shannon	$\rho = 0,593, p < 0,001, n = 71$	$\rho = 0,638, p < 0,001, n = 68$
Индекс Simpson	$\rho = 0,614, p < 0,001, n = 71$	$\rho = 0,627, p < 0,001, n = 68$
Индекс Chao1	$\rho = 0,348, p = 0,003, n = 71$	$\rho = 0,368, p = 0,002, n = 68$
Индекс PD	$\rho = 0,369, p = 0,002, n = 71$	$\rho = 0,365, p = 0,002, n = 68$
OTUs	$\rho = 0,345, p = 0,003, n = 71$	$\rho = 0,321, p = 0,008, n = 68$
Семейство <i>Ruminococcaceae</i>		
Индекс Shannon	$\rho = 0,308, p = 0,018, n = 59$	$\rho = 0,714^*, p < 0,001, n = 65$
Индекс Simpson	$\rho = 0,357, p = 0,006, n = 59$	$\rho = 0,706^*, p < 0,001, n = 65$
Индекс Chao1		$\rho = 0,394, p = 0,001, n = 65$
Индекс PD		$\rho = 0,461, p < 0,001, n = 65$
OTUs		$\rho = 0,390, p = 0,001, n = 65$

Примечание: * — достоверность различий коэффициентов корреляций между контрольной группой и группой детей с ожирением.

В группе здоровых детей корреляционный анализ позволил установить следующие взаимосвязи между цитокинами и бактериальной ДНК на уровне семейств: IL10 умеренно положительно коррелировал с бактериальной ДНК *Erysipelotrichaceae* ($\rho = 0,438, p = 0,005, n = 40$); IL8 умеренно положительно коррелировал с *Bacteroidaceae* ($\rho = 0,370, p = 0,005, n = 57$), IL6 с *Pseudomonadaceae* ($\rho = 0,528, p = 0,012, n = 22$); IL17A с *Microbacteriaceae* ($\rho = 0,544, p = 0,006, n = 23$), *Bacillaceae* ($\rho = 0,796, p < 0,001, n = 18$), *Fusobacteriaceae* ($\rho = 0,506, p = 0,032, n = 18$); PD-L1 с [*Tissierellaceae*] ($\rho = 0,353, p = 0,044, n = 33$), *Pseudomonadaceae* ($\rho = 0,528, p = 0,012, n = 22$).

У детей с ожирением выявлена умеренно положительная взаимосвязь IL10 с *Lactobacillaceae* ($\rho = 0,395, p = 0,034, n = 29$), IL8 с *Veillonellaceae* ($\rho = 0,354, p = 0,017, n = 45$); IL6 с *Nocardiaceae* ($\rho = 0,605, p = 0,010, n = 17$), *Lactobacillaceae* ($\rho = 0,380, p = 0,042, n = 29$), *Veillonellaceae* ($\rho = 0,459, p = 0,002, n = 45$); IL17A с *Nocardiaceae* ($\rho = 0,521, p = 0,032, n = 17$), ФНО α с *Nocardiaceae* ($\rho = 0,495, p = 0,043, n = 17$), фракталкин с *Bacillaceae* ($\rho = 0,705, p = 0,010, n = 12$).

Выявленные корреляционные взаимосвязи между бактериальной ДНК и содержанием цитокинов в группах детей ассоциированы с разными семействами. В группе здоровых детей системный провоспалительный цитокин IL8 коррелирует с бактериальной ДНК *Bacteroidaceae*, которые выполняют в кишечнике защитную функцию, у детей с ожирением данной корреляции не выявлено. Следует также отметить, что взаимосвязи в контрольной группе выявлены с семействами, принадлежащими пяти

филумам — *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*; у детей с ожирением только с семействами, принадлежащими двум филумам: *Firmicutes* и *Actinobacteria*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты нашего исследования показали, что дети и подростки с ожирением характеризуются статистически значимо повышенными уровнями IL17A и PD-L1. В норме IL17A принимает участие в поддержании целостности эпителиального барьера слизистых оболочек посредством регулирования белков плотных контактов (окклюдина), однако главная функция заключается в рекрутировании нейтрофилов в кишечник при угрозе излишней проницаемости и в целях поддержания гомеостаза. В одном из исследований было показано, что ингибирование IL17A или IL17RA сопровождалось серьезным ослаблением эпителиального барьера [9]. IL17A также главный регулятор взаимодействия между организмом хозяина и микробиотой как на физиологическом уровне, так и при иммуноопосредованных воспалительных заболеваниях [10]. В экспериментах на мышах нокаут гена IL17 индуцировал развитие воспаления кишечника [11]. Вместе с тем в исследованиях, проведенных на трансгенной мышью модели рассеянного склероза HLA-DR3, показано, что дефицит IL17A (мышь HLA-DR3.IL17A $^{-/-}$) приводит к увеличению количества Treg-индуцирующих кишечных бактерий, таких как *Prevotella*, *Parabacteroides* и *Bacteroides*, что приводит к более легкому течению заболевания. Было также показано, что IL17A

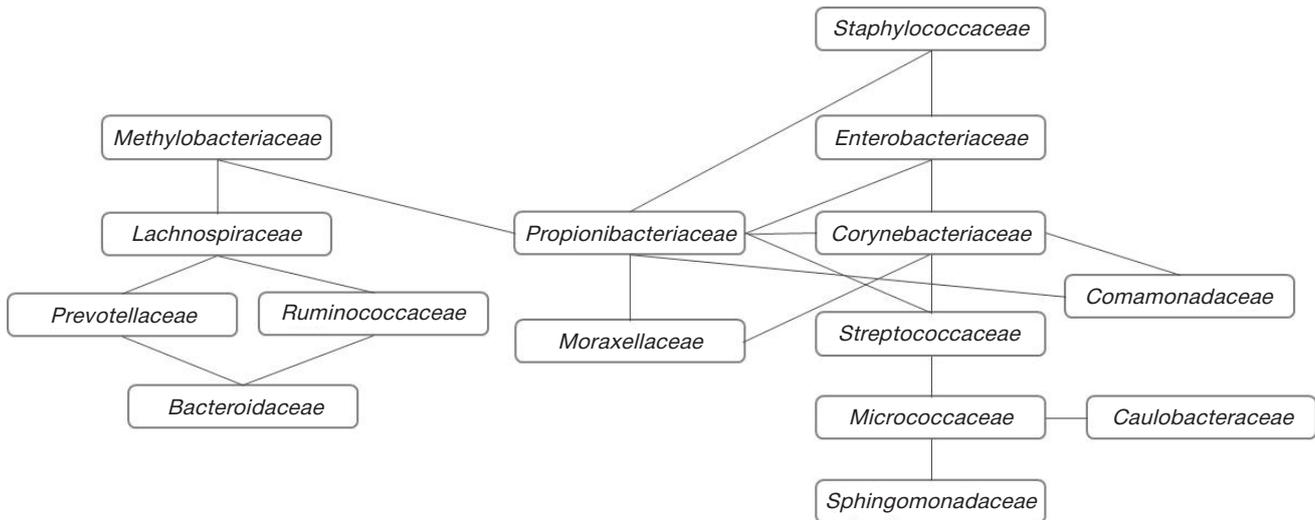


Рис. 2. Положительные корреляционные взаимосвязи между бактериальной ДНК в группе здоровых детей

может регулировать активность Treg и влиять на течение заболевания путем модуляции микробиоты кишечника и обеспечивает новый механизм, с помощью которого иммуномедиаторы влияют на микробиоту кишечника. Интересно, что у мышей DR3 с достаточным содержанием IL17A заболевание протекает в более легкой форме при содержании с мышами с дефицитом IL17A, тем самым подчеркивая доминирующую роль микробиоты в индукции Treg и снижении тяжести заболевания [12]. IL17A принимает участие и в патогенезе аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, псориаз, системная красная волчанка, бронхиальная астма и др. [13]. Лечение спондилоартрита и псориазического артрита путем ингибирования IL17 приводило к уменьшению содержания *Clostridiales* и увеличению *Bacteroidales*. Таким образом, можно предположить, что, имея повышенный уровень IL17A, дети с ожирением попадают в зону риска развития аутоиммунных заболеваний.

PD-L1 представляет собой лиганд, который играет важную роль в ингибировании опосредованного Т-клетками иммунного ответа [14]. Связывание PD-L1 с PD-1 вызывает апоптоз эффекторных Т-клеток и ускользание опухолевых клеток от иммунитета, что приводит к неблагоприятному прогнозу при онкологии. В ряде работ показано, что ингибирование взаимодействия между PD-L1 с PD-1 усиливает адаптивный иммунный ответ, и повышается

противоопухолевая активность [15–17]. Также выявлено, что PD-L1 экспрессируется на белых и бурых адипоцитах у мышей [18]. PD-L1 — не столь однозначная молекула: ее низкая экспрессия или нокаут на адипоцитах повышает противоопухолевый иммунитет при наличии опухоли у мышей, а в отсутствии опухоли абляция PD-L1 адипоцитов усугубляет обусловленное диетой увеличение массы тела, инфильтрацию провоспалительных макрофагов в жировую ткань и резистентность к инсулину [19]. PD-L1 обладает двойным эффектом: с одной стороны, снижение экспрессии повышает противоопухолевый иммунитет и подавляет рост опухоли, а с другой — увеличение экспрессии в адипоцитах позволяет поддерживать гомеостаз жировой ткани и смягчать вялотекущее воспаление, связанное с разрастанием жировой ткани и инфильтрацией ее макрофагами [20]. Микробиом кишечника может модулировать ответ пациентов с меланомой на иммунотерапию PD-1. По предположению авторов, пациенты с «благоприятным» микробиомом кишечника (например, с высоким разнообразием и обилием *Ruminococcaceae* и *Faecalibacterium*) имеют усиленный системный и противоопухолевый иммунный ответ, опосредованный улучшением презентации антигена и функции эффекторных Т-клеток на периферии и в микроокружении опухоли. Напротив, пациенты с «неблагоприятным» микробиомом кишечника (например,

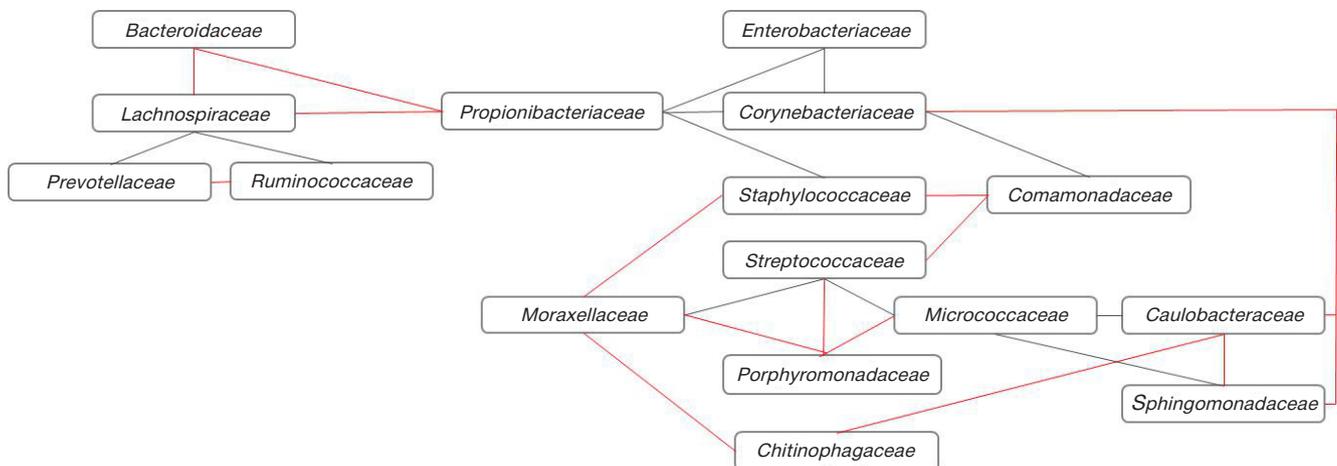


Рис. 3. Положительные корреляционные взаимосвязи между бактериальной ДНК в группе детей с ожирением. Красным выделены уникальные корреляции в группе детей с ожирением, черным — единые с контрольной группой

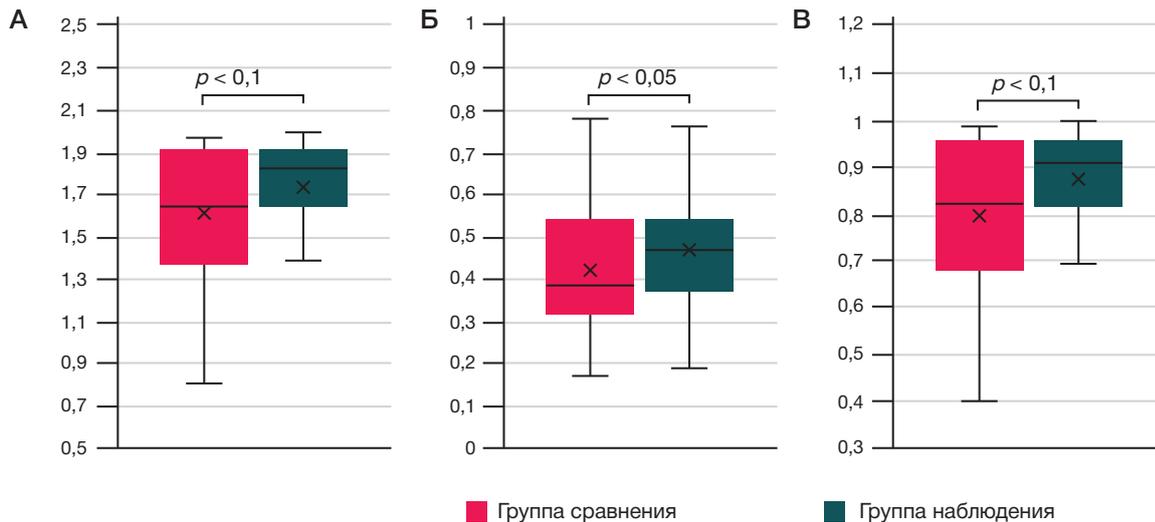


Рис. 4. Бета-разнообразие в группах детей. А. Манхэттенское расстояние. Б. Евклидово расстояние. В. Несходство Брея–Кертиса

с низким разнообразием и высокой относительной численностью *Bacteroidales*) имеют нарушенные системные и противоопухолевые иммунные реакции, опосредованные ограниченной внутриопухолевой лимфоидной и миелоидной инфильтрацией и ослабленной способностью к презентации антигенов. Эти результаты подчеркивают терапевтический потенциал модуляции микробиома кишечника у пациентов, получающих иммунотерапию с блокадой контрольных точек [21].

Несмотря на схожесть доминирующих семейств микробиома крови, в обеих обследованных группах детей и подростков найдены статистически значимые различия как по частоте выделения бактериальной ДНК крови, так и по долям, приходящимся на семейства в группе детей с ожирением. Из этого можно предположить, что у детей происходят значительные нарушения в проницаемости как кишечника, так и других биотопов, главным образом кожи. Изменение микробиоты оказывает влияние на качество и количество пристеночной микробиоты, процессы выработки бокаловидными клетками кишечника слизи, защищающей от проникновения патогенов. В группе детей с ожирением мы показали, что ДНК семейства *Bacteroidaceae* вносит значимо меньший вклад в альфа-разнообразие микробиома крови, что сопоставимо с данными других исследователей по микробиому кала [8]. Доказано, что увеличение доли *Proteobacteria* при ожирении,

неалкогольной жировой болезни печени и неалкогольном стеатогепатите [22–24] является предрасполагающим фактором нарушения работы печени и всего желудочно-кишечного тракта. Статистически значимое снижение доли *Lachnospiraceae* в группе детей с ожирением влечет за собой снижение синтеза бутирата, следовательно, снижается энергообеспечение клеток кишечного эпителия и утончается кишечный барьер в связи со снижением активации белка клаудина-1 [25]. Исследования показывают, что *Ruminococcaceae* сопряжены с развитием воспалительных заболеваний кишечника, таких как язвенный колит и болезнь Крона.

Основной биотоп *Ruminococcaceae* — это толстый кишечник, для *Bacteroidaceae* — толстый кишечник, ротовая полость, верхние дыхательные пути, мочеполовая система, а для *Prevotellaceae* — ротовая полость, что позволяет предположить снижение транслокации бактериальной ДНК из ротовой полости.

Согласно литературным данным у детей и подростков с ожирением были выявлены позитивные корреляционные взаимосвязи между содержанием трефоиловых факторов, а именно TFF3 с микробиотой кишечника, свидетельствующие о нарушении толерантности мукозального барьера к микробному сообществу [26].

Таким образом, вероятно, у детей с ожирением вследствие нарушения периферической толерантности и

Таблица 4. Содержание про- и противовоспалительных цитокинов у детей в сыворотке крови

Анализируемый показатель	Здоровые дети (n = 83)	Дети с ожирением (n = 80)	p-величина
IL6, пг/мл, Ме [Q ₁ ;Q ₃]	1,09 [0,28; 6,58]	1,19 [0,52; 8,24]	0,561
IL8, пг/мл, Ме [Q ₁ ;Q ₃]	8,65 [4,05; 16,3]	11,5 [6,08; 21,4]	0,103
IL10, пг/мл, Ме [Q ₁ ;Q ₃]	1,93 [0,67; 4,08]	2,30 [0,94; 6,02]	0,357
IL17A, пг/мл, Ме [Q ₁ ;Q ₃]	0,69 [0,13; 4,88]	4,22 [0,39; 9,56]**	0,017
ФНОα, пг/мл, Ме [Q ₁ ;Q ₃]	12,8 [7,74; 21,8]	13,2 [9,00; 20,7]	0,856
Фракталкин, пг/мл, Ме [Q ₁ ;Q ₃]	63,1 [47,1; 228]	90,8 [34,5; 209]	0,188
PD-L1, пг/мл, Ме [Q ₁ ;Q ₃]	25,8 [9,10; 53,1]	35,7 [19,5; 55,0]**	0,021

Примечание: различия достоверны по сравнению с контрольной группой: * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Таблица 5. Статистические параметры корреляционного анализа цитокинов у детей

	Дети с ожирением				Здоровые дети		
	IL6	IL8	IL10	IL17A	IL6	IL8	IL17A
IL8	rho = 0,583 p < 0,001 n = 80				rho = 0,439 p < 0,001 n = 83		
IL17A	rho = 0,505 p < 0,001 n = 80	rho = 0,391 p < 0,001 n = 80	rho = 0,349 p = 0,001 n = 80		rho = 0,344 p = 0,001 n = 83	rho = 0,446 p < 0,001 n = 83	
IL10	rho = 0,383 p < 0,001 n = 80						
ФНО α		rho = 0,441 p < 0,001 n = 80	rho = 0,400 p < 0,001 n = 80	rho = 0,427 p < 0,001 n = 80			rho = 0,316 p = 0,004 n = 83

проницаемости мукозальных барьеров происходит усиленная транслокация бактериальной ДНК не только из кишечника, но и из ротовой полости и кожных покровов. В результате транслокации повышается разнообразие микробиома крови. Бактериальная ДНК активирует рецепторы TLR9 и запускает секрецию провоспалительных цитокинов, в частности, IL17A, вынуждая организм поддерживать баланс и активировать запуск противовоспалительных механизмов путем активации синтеза PD-L1.

ВЫВОДЫ

Увеличение альфа-разнообразия в группе детей с ожирением наблюдается за счет бактериальной ДНК семейств *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*.

При ожирении увеличивается бета-разнообразие, что свидетельствует об увеличении транслокации бактериальной ДНК из внекишечных микробиомов. Появляются новые паттерны взаимосвязей по сравнению с паттернами взаимодействия в контрольной группе. У детей с ожирением повышение уровней IL17A и PD-L1 свидетельствует об активации про- и противовоспалительных механизмов и развитии вялотекущего воспаления. Ожирение характеризуется появлением значимых корреляций ДНК семейства *Nocardiaceae* с провоспалительными цитокинами, что свидетельствует о роли транслокации ДНК этого таксона в развитии вялотекущего воспаления и возможности разработки подходов по снижению этой транслокации в лечении ожирения.

Литература

- Shin JJ, Lee EK, Park TJ, Kim W. Damage associated molecular patterns and their pathological relevance in diabetes mellitus. *Ageing Research Reviews*. 2015; 24 (Pt A): 66–76. Epub 2015 Jul 18.
- Land WG. The role of damage-associated molecular patterns in human diseases: part I — promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2015; 15: 9–21.
- Ballak D, van Asseldonk E, van Diepen J, et al. TLR-3 is present in human adipocytes, but its signalling is not required for obesity-induced inflammation in adipose tissue in vivo. *PLoS ONE*. 2015; 10 (4): e0123152.
- Yu L, Li Y, Du C, Zhao W, Zhang H, Yang Y, et al. Pattern recognition receptor-mediated chronic inflammation in the development and progression of obesity-related metabolic diseases. *Hindawi Mediators of Inflamm*. 2019 Sep; 2019: 5271295. PubMed PMID: 31582899. PubMed Central PMCID: PMC6754942.
- Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocytes function. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Apr; 318 (1–2): 61–8. Epub 2009 Sep 20.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010 May; 7 (5): 335–6. Epub 2010 Apr 11.
- DeSantis T, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72 (7): 5069–72.
- Кирилина ИБ, Шестопалов АВ, Гапонов АМ, Камальдинова ДР, Хуснутдинова ДР, Григорьева ТВ и др. Особенности микробиома крови у детей с ожирением. *Педиатрия*. 2022; 101 (5): 15–22.
- Maxwell JR, Zhang Y, Brown WA, Smith CL, Byrne FR, Fiorino M et al. Differential roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in intestinal immunoregulation. *Immunity*. 2015; 43: 739–50.
- Brevi A, Cogrossi LL, Grazi G, Masciovecchio D, Impellizzeri D, Lacanfora L, et al. Much more than IL-17A: cytokines of the IL-17 family between microbiota and cancer. Mini review article *Front. Immunol. Sec. Cancer Immunity and Immunotherapy*. 2020 Nov; 11: 565470.
- Bi Y, Li C, Liu L, Zhou J, Li Z, Deng H, et al. IL-17A-dependent gut microbiota is essential for regulating diet-induced disorders in mice. *Science Bulletin*. 2017; 62 (15): 1052–63.
- Shahi SK, Ghimire S, Jensen SN, Lehman P, Borchering N, Gibson-Corley KN, et al. IL-17A controls CNS autoimmunity by regulating gut microbiota and inducing regulatory T cells *bioRxiv*. 2022 Apr; 04.22.489206.
- Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene*. 2017; 30 (614): 8–14. Epub 2017 Jan 22.
- Wang X, Teng F, Kong Li, Jinming Yu. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 5023–39.
- Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy-blockade, knockdown, or inhibition. *Front Immunol*. 2019; 10: 2022.
- Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Ge J, Xiang B, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer*. 2019; 18 (1): 10.
- Dermani FK, Samadi P, Rahmani G, Kohlan AK, Najafi R. PD1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. *J Cell Physiol*. 2019; 234 (2): 1313–25.
- Ingram JR, Dougan M, Rashidian M, Knoll M, Keliher EJ, Garrett S, et al. PD-L1 is an activation-independent marker of brown adipocytes. *Nature Communication*. 2017 Sep 21; 8 (1): 647.
- Wu B, Chiang H-C, Sun X, Yuan B, Mitra P, Hu Y, et al. Genetic ablation of adipocyte PD-L1 reduces tumor growth but accentuates obesity-associated inflammation. *J Immunother Cancer*. 2020 Aug; 8 (2): e000964. PubMed PMID: 32817394.

- PubMed Central PMCID: PMC7437875.
- Fujii T, Nishiki E, Endo M, Yajima R, Katayama A, Oyama T. Implication of atypical supraclavicular F18-fluorodeoxyglucose uptake in patients with breast cancer: Relationship between brown adipose tissue and TILs, PD-L1. Posters A: Risk factors. 2020 Oct; (Suppl 1): S94.
 - Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018 Jan 5; 359 (6371): 97–103. Epub 2017 Nov 2.
 - Плотникова Е. Ю., Краснов О. А. Метаболический синдром и кишечная микрофлора; что общего? Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015; 112 (12): 64–73.
 - Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013; 58: 120–7.
 - Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2012; 57: 601–9.
 - Лоранская И. Д., Халиф И. Л., Болдырева М. Н., Купаева В. А. Характеристика микробиома при воспалительных заболеваниях кишечника. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018; 153 (5): 104–11.
 - Шестопалов А. В., Колесникова И. М., Савчук Д. В., Теплякова Е. Д., Шин В. А., Григорьева Т. В. и др. Влияние вида вскармливания на таксономический состав кишечного микробиома и уровни треfoilовых факторов у детей и подростков. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2023; 109 (5): 656–72.
 - Shin JJ, Lee EK, Park TJ, Kim W. Damage associated molecular patterns and their pathological relevance in diabetes mellitus. *Ageing Research Reviews*. 2015; 24 (Pt A): 66–76. Epub 2015 Jul 18.
 - Land WG. The role of damage-associated molecular patterns in human diseases: part I — promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2015; 15: 9–21.
 - Ballak D, van Asseldonk E, van Diepen J, et al. TLR-3 is present in human adipocytes, but its signalling is not required for obesity-induced inflammation in adipose tissue in vivo. *PLoS ONE*. 2015; 10 (4): e0123152.
 - Yu L, Li Y, Du C, Zhao W, Zhang H, Yang Y, et al. Pattern recognition receptor-mediated chronic inflammation in the development and progression of obesity-related metabolic diseases. *Hindawi Mediators of Inflamm*. 2019 Sep; 2019: 5271295. PubMed PMID: 31582899. PubMed Central PMCID: PMC6754942.
 - Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocytes function. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Apr; 318 (1–2): 61–8. Epub 2009 Sep 20.
 - Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010 May; 7 (5): 335–6. Epub 2010 Apr 11.
 - DeSantis T, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72 (7): 5069–72.
 - Kirilina IV, Shestopalov AV, Gaponov AM, Kamaldinova DR, Khusnutdinova DR, Grigorjeva TV, et al. Features of the blood microbiome in obese children. *Pediatrics n.a. G. N. Speransky*. 2022; 101 (5): 15–22. Russian.
 - Maxwell JR, Zhang Y, Brown WA, Smith CL, Byrne FR, Fiorino M et al. Differential roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in intestinal immunoregulation. *Immunity*. 2015; 43: 739–50.
 - Brevi A, Cogrossi LL, Grazi G, Masciovecchio D, Impellizzeri D, Lacanfora L, et al. Much more than IL-17A: cytokines of the IL-17 family between microbiota and cancer. Mini review article *Front. Immunol. Sec. Cancer Immunity and Immunotherapy*. 2020 Nov; 11: 565470.
 - Bi Y, Li C, Liu L, Zhou J, Li Z, Deng H, et al. IL-17A-dependent gut microbiota is essential for regulating diet-induced disorders in mice. *Science Bulletin*. 2017; 62 (15): 1052–63.
 - Shahi SK, Ghimire S, Jensen SN, Lehman P, Borcharding N, Gibson-Corley KN, et al. IL-17A controls CNS autoimmunity by regulating gut microbiota and inducing regulatory T cells *bioRxiv*. 2022 Apr; 04.22.489206.
 - Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene*. 2017; 30 (614): 8–14. Epub 2017 Jan 22.
 - Wang X, Teng F, Kong Li, Jinming Yu. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 5023–39.
 - Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy-blockade, knockdown, or inhibition. *Front Immunol*. 2019; 10: 2022.
 - Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Ge J, Xiang B, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer*. 2019; 18 (1): 10.
 - Dermani FK, Samadi P, Rahmani G, Kohlan AK, Najafi R. PD1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. *J Cell Physiol*. 2019; 234 (2): 1313–25.
 - Ingram JR, Dougan M, Rashidian M, Knoll M, Keliher EJ, Garrett S, et al. PD-L1 is an activation-independent marker of brown adipocytes. *Nature Communication*. 2017 Sep 21; 8 (1): 647.
 - Wu B, Chiang H-C, Sun X, Yuan B, Mitra P, Hu Y, et al. Genetic ablation of adipocyte PD-L1 reduces tumor growth but accentuates obesity-associated inflammation. *J Immunother Cancer*. 2020 Aug; 8 (2): e000964. PubMed PMID: 32817394. PubMed Central PMCID: PMC7437875.
 - Fujii T, Nishiki E, Endo M, Yajima R, Katayama A, Oyama T. Implication of atypical supraclavicular F18-fluorodeoxyglucose uptake in patients with breast cancer: Relationship between brown adipose tissue and TILs, PD-L1. Posters A: Risk factors. 2020 Oct; (Suppl 1): S94.
 - Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018 Jan 5; 359 (6371): 97–103. Epub 2017 Nov 2.
 - Plotnikova EY, Krasnov OA. Metabolic syndrome and intestinal microflora: what overall? *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2015; 112 (12): 64–73. Russian.
 - Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013; 58: 120–7.
 - Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2012; 57: 601–9.
 - Loranskaya ID, Khalif IL, Boldyreva MN, Kupaeva VA. Characteristic of microbiome in inflammatory bowel disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2018; 153 (5): 104–11. Russian.
 - Shestopalov AV, Kolesnikova IM, Savchuk DV, Teplyakova ED, Shin VA, Grigoryeva TV, et al. Effect of the infant feeding type on gut microbiome taxonomy and levels of trefoil factors in children and adolescents. *Russian Journal of Physiology*. 2023; 109 (5): 656–72. Russian.