

Для корреспонденции

Сасуга Ясухиро – Центр исследований и разработок Хачиоджи,
B&S Corporation Co., Ltd., Токио, Япония
E-mail: y-sasuga@bandscorp.jp
<https://orcid.org/0000-0002-2758-9375>

Фукути М.¹, Сугита М.², Бандзэ М.², Ёнэкура К.³, Сасуга Я.¹

Влияние участия в соревнованиях и приема экстракта на основе соевого молока, ферментированного молочнокислыми бактериями, на микробиоту кишечника и метаболиты в моче спортсменов, выступающих в видах спорта, тренирующих выносливость: открытое пилотное исследование*

The impact of a competitive event and the efficacy of a lactic acid bacteria-fermented soymilk extract on the gut microbiota and urinary metabolites of endurance athletes: An open-label pilot study

Fukuchi M.¹, Sugita M.², Banjo M.², Yonekura K.³, Sasuga Y.¹

¹ Центр исследований и разработок Хачиоджи, B&S Corporation Co., Ltd., Токио, Япония

² Факультет образования, Университет Миэ, Миэ, Япония

³ B&S Corporation Co., Ltd., Токио, Япония

¹ Hachioji Center for Research and Development, B&S Corporation Co., Ltd., Tokyo, Japan

² Faculty of Education, Mie University, Mie, Japan

³ B&S Corporation Co., Ltd., Tokyo, Japan

Диета и физические упражнения могут изменить микробиоту кишечника, в недавних исследованиях оценивали влияние спортивных соревнований на микробиоту кишечника и метаболиты организма. Авторы спланировали открытое пилотное исследование для изучения влияния как спортивных соревнований, так и экстракта на основе соевого молока, ферментированного несколькими штаммами молочнокислых бактерий (LEX), на микробиоту кишечника у спортсменов японского колледжа, выступающих в видах спорта, тренирующих выносливость.

Доступность данных. Файлы Fastq хранятся в базе данных DDBJ под регистрационным номером DRA011638 с идентификатором биопроекта h PRJDB11304 и идентификаторами биопроб SAMD00283406-SAMD00283454.

Финансирование. Данное исследование было поддержано компанией B&S Corporation Co. Ltd.. Спонсор оказывал поддержку в виде заработной платы авторам [М.Ф., Ё.К. и Я.С.], но не играл никакой дополнительной роли в планировании исследования, сборе и анализе данных, принятии решения о публикации или подготовке рукописи.

Вклад авторов. Курирование данных, формальный анализ, исследование, ресурсы, валидация, визуализация, написание первоначального варианта – Фукути М.; концептуализация, привлечение финансирования, методология, администрирование проекта, ресурсы, надзор, валидация, написание, просмотр и редактирование – Сугита М.; курирование данных, исследование, ресурсы, написание статьи, просмотр и редактирование – Бандзэ М.; концептуализация, привлечение финансирования, ресурсы, написание – просмотр и редактирование – Ёнэкура К.; концептуализация, формальный анализ, привлечение финансирования, методология, администрирование проекта, ресурсы, надзор, валидация, визуализация, написание первоначального варианта, просмотр и редактирование – Сасуга Я.

Конфликт интересов. Авторы ознакомились с политикой журнала, и у авторов настоящей рукописи существуют следующие конфликты интересов. Исследуемый образец (биологически активная добавка к пище в соответствии с терминологией, принятой в Российской Федерации) была изготовлена и продана компанией B&S Corporation Co. Ltd. Авторы [М.Ф., Ё.К. и Я.С.] являются наемными сотрудниками компании B&S Corporation Co. Ltd. Какие-либо патенты или продукты на стадии разработки, о которых можно было бы заявить, отсутствуют. Данные факты не влияют на строгое соблюдение нами политики журнала PLOS ONE в отношении обмена данными и материалами.

Для цитирования: Fukuchi M., Sugita M., Banjo M., Yonekura K., Sasuga Y. The impact of a competitive event and the efficacy of a lactic acid bacteria-fermented soymilk extract on the gut microbiota and urinary metabolites of endurance athletes: An open-label pilot study. PLoS ONE. 2022; 17 (1): e0262906. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906>

© 2022 Fukuchi et al.

* Данная статья находится в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons «с указанием авторства», которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии указания автора и источника.

Для выявления изменений в составе микробиоты кишечника и метаболизма организма проводили анализ метагенома 16S рРНК кала и метаболитов мочи. При исследовании микробиоты кала до и после забега без использования добавки (в период первичного наблюдения) наблюдалось увеличение филума *Firmicutes* и уменьшение филума *Bacteroidetes*. Однако никаких изменений в указанных филумах не наблюдалось до и после забега у тех, кто употреблял LEX. До и после приема LEX изменения метаболитов в моче включали значительное снижение уровня дрожжевых и грибковых маркеров, нейромедиаторов и митохондриальных метаболитов, включая метаболиты цикла трикарбоновых кислот. Было обнаружено несколько корреляций между метаболитами в моче и составом микробиоты кала. Например, уровень трикарбаллиевой кислоты положительно коррелировал с относительной численностью филума *Firmicutes* (коэффициент корреляции Пирсона $r=0,66$; $p<0,01$). Было также обнаружено, что вид бактерий *Parabacteroides distasonis* умеренно коррелирует с несколькими метаболитами в моче. Полученные результаты свидетельствуют о следующем. Во-первых, у спортсменов, выступающих в видах спорта, тренирующих выносливость, наблюдаются значительные колебания микробиоты кишечника после однократного соревнования. Во-вторых, прием LEX может уменьшить разрастание дрожжей и микроскопических грибов в желудочно-кишечном тракте и улучшить метаболическую функцию митохондрий.

*Diet and exercise can alter the gut microbiota, but recent studies have assessed the impact of athletic competition on gut microbiota and host metabolites. We designed an open-label pilot study to investigate the effects of both official competition and a multi-strain lactic acid bacteria-fermented soymilk extract (LEX) on the gut microbiota in Japanese college endurance athletes. The analysis of fecal 16S rRNA metagenome and urinary metabolites was used to identify changes in gut microbiota composition and host metabolism. When the fecal microbiota were investigated before and after a race without using of a supplement (preobservation period), there was an increase in the phylum Firmicutes and decrease in Bacteroidetes. However, no changes in these phyla were seen before and after a race in those who consumed LEX. Before and after LEX ingestion, changes in urinary metabolites included a significant reduction in yeast and fungal markers, neurotransmitters, and mitochondrial metabolites including the TCA cycle. There were several correlations between urinary metabolites and the composition of fecal microbiota. For example, the level of tricarballylic acid was positively correlated with the composition ratio of phylum Firmicutes (Pearson's $r=0.66$; $p<0.01$). The bacterial species *Parabacteroides distasonis* was also found to correlate moderately with several urinary metabolites. These findings suggest two possibilities. First, endurance athletes experience significant fluctuations in gut microbiota after a single competition. Second, LEX ingestion may improve yeast and fungal overgrowth in the gastrointestinal tract and enhancing mitochondrial metabolic function.*

Микробиота кишечника важна для здоровья – она играет важную роль в усвоении пищевых веществ, синтезе витаминов, энергетическом обмене, модуляции воспаления и иммунном ответе организма [1, 2]. Использование методов секвенирования следующего поколения значительно расширило наши знания о составе микробиоты и ее связи с заболеваниями [3].

Многочисленные внутренние и внешние факторы могут влиять на микробиоту кишечника, что приводит к созданию очень динамичной и сложной среды кишечника. Рацион является основным модифицирующим фактором, влияющим на состав микробиоты человека, а пищевые компоненты действуют как субстраты для метаболизма микроорганизмов, влияя как на состав,

Data Availability Statement: Fastq files are deposited in the DDBJ database under the accession number DRA011638 with h BioProject ID PRJDB11304 and BioSample IDs SAMD00283406-SAMD00283454.

Funding. This work was supported by B&S Corporation Co. Ltd. The funder provided support in the form of salaries for authors [MF, YK and YS], but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Contribution. Data curation, formal analysis, investigation, resources, validation, visualization, writing – original draft – Fukuchi M.; conceptualization, funding acquisition, methodology, project administration, resources, supervision, validation, writing – review & editing – Sugita M.; data curation, investigation, resources, writing – review & editing – Banjo M.; conceptualization, funding acquisition, resources, writing – review & editing – Yonekura K.; conceptualization, formal analysis, funding acquisition, methodology, project administration, resources, supervision, validation, visualization, writing – original draft, writing – review & editing Sasuga Ya.

Conflict of interest. The authors have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing conflicts. The test article used for this study was manufactured and marketed by B&S Corporation Co. Ltd. Authors [MF, YK and YS] are paid employees of B&S Corporation Co. Ltd. There are no patents or products in development to declare. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

For citation: Fukuchi M., Sugita M., Banjo M., Yonekura K., Sasuga Y. The impact of a competitive event and the efficacy of a lactic acid bacteria-fermented soymilk extract on the gut microbiota and urinary metabolites of endurance athletes: An open-label pilot study. PLoS ONE. 17 (1): e0262906. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906>

так и на функции микробиома [4]. Кроме того, недавние исследования предполагают способность физических упражнений вызывать изменения в микробиоте кишечника, что также может влиять на физическую работоспособность. Например, по сравнению с контрольными группами лиц, ведущих сидячий образ жизни, у спортсменов наблюдалось относительное увеличение скорости метаболизма (например, биосинтеза аминокислот, антимикробных веществ, углеводного обмена) и уровня метаболитов в кале (например, короткоцепочечных жирных кислот), связанных с усилением обмена в мышцах [5].

Несколько исследований показали, что спортсмены спорта высших достижений и те, кто часто тренируется, имеют более высокое разнообразие видов бактерий (α -разнообразие), чем те, кто ведет малоподвижный образ жизни или имеет низкий уровень физической подготовки [6–8]. Увеличение количества симбиотических видов *Akkermansia muciniphila* и *Faecalibacterium prausnitzii* наблюдалось у спортсменов и лиц с высоким уровнем физической активности [6, 9].

Чрезмерная физическая нагрузка сильно воздействует на желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) и увеличивает вероятность возникновения множества симптомов, связанных с нарушением микробиоты кишечника и снижением работоспособности [10]. Добавки¹, направленные на улучшение состояния кишечной среды, включая пробиотики, обычно ориентированы на здоровье спортсменов с точки зрения снижения стресса, вызванного физической нагрузкой, повышения иммунитета организма, уменьшения симптомов инфекций ЖКТ и верхних дыхательных путей [11]. Ожидается, что, помимо пробиотических препаратов, другие БАД и СПП, такие как продукты микробной ферментации, улучшат симптомы со стороны ЖКТ. Экстракт соевого молока, ферментированного несколькими штаммами молочнокислых бактерий (LEX), является одним из таких продуктов, сообщалось об эффекте улучшения состава метаболитов кишечной микробиоты [12]. Другое исследование показало, что пероральный прием LEX может предотвратить рак толстой кишки и активировать иммунную систему кишечника [13, 14].

Понимание того, играет ли микробиота кишечника и его среда жизненно важную роль в достижении спортивных результатов и ежедневной физической подготовке, особенно интересно для спортсменов. Кроме того, такие знания могут принести пользу здоровью человека. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить ежедневные изменения в микробиоте кишечника и метаболитах организма или положительное влияние рациона на повседневное здоровье спортсменов.

Упражнения, развивающие показатели выносливости, – это виды деятельности, которые выполняют в течение длительных промежутков времени и преиму-

щественно на аэробном уровне метаболизма. Их можно определить как длительные кардиотренировки, включающие такие виды деятельности, как бег, катание на беговых лыжах, езда на велосипеде, аэробика или плавание. Физиологическая адаптация к упражнениям, направленным на тренировку выносливости, включает коррекцию электролитного дисбаланса, усиленных системных воспалительных реакций и уменьшения накопления гликогена, окислительного стресса, проницаемости кишечника и повреждения мышц [15]. Спортсмены, занимающиеся видами спорта, требующими выносливости, чаще страдают инфекциями верхних дыхательных путей и расстройствами ЖКТ, включая повышенную проницаемость слизистой оболочки ЖКТ («синдром дырявого кишечника»), нарушение толщины слоя слизи и усиленную миграцию бактерий [16].

Для изучения изменения в микробиоте кишечника во время чрезмерных физических нагрузок и соревнований было проведено пилотное исследование с участием бегунов на длинные дистанции. Кроме того, изучали влияние приема LEX на микробиоту кишечника и метаболиты в моче для оценки воздействия на среду ЖКТ. Использовали секвенирование метагенома микробов кала и метаболомный анализ мочи для определения изменений до и после забега и приема LEX у бегунов на длинные дистанции.

Материал и методы

Дизайн исследования и участники

Проведено открытое исследование для оценки влияния как спортивных соревнований, так и приема LEX на показатели выносливости спортсменов. В исследовании приняли участие бегуны на длинные дистанции из японского колледжа в возрасте от 19 до 21 года, продолжительность исследования была выбрана таким образом, чтобы в течение каждого периода наблюдения проводился 1 официальный забег. Всего было набрано 13 участников: 9 мужчин и 4 женщины. Лица с аллергией на соевые бобы, сырье для БАД были исключены из исследования. Исследование состояло из двух 4-недельных периодов, каждые 4 нед участники соревновались в 1 забеге. В течение первого 4-недельного периода первичного наблюдения (до приема LEX) измеряли изменения в микробиоте кишечника только в связи со спортивными результатами. Во втором 4-недельном периоде изучали влияние ежедневного приема LEX на микробиоту кишечника.

Кроме того, чтобы исследовать влияние приема LEX на метаболиты организма, измеряли содержание метаболитов в моче до и после приема LEX. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией. Было получено информированное согласие от каждого

¹ Далее биологически активные добавки (БАД) к пище и специализированные пищевые продукты (СПП) в соответствии с терминологией, принятой в Российской Федерации. – Прим. ред.

участника, а также этическое одобрение от Комитета по этике Факультета образования Университета Миэ (регистрационный номер: 2016-4, Миэ, Япония).

Оцениваемая биологически активная добавка

Оцениваемая БАД представляет собой коммерчески доступную БАД к пище (торговая марка DAIGO), полученную из экстракта соевого молока, ферментированного с использованием мультиштаммовой закваски (LEX), состоящей из 16 штаммов молочнокислых бактерий (*Lactocaseibacillus paracasei* R0101, R0301, R0401, R0601, R0701, R0901, R1001, R1402, R1502, R1602, *Lactiplantibacillus plantarum* R0502, R0801, R1101, Y1201, *Levilactobacillus brevis* R0201, R1305). Молочнокислые бактерии культивировали в соевом молоке до уровня приблизительно 10¹² КОЕ/г, а затем проводили экстракцию с использованием этанола. БАД представляет собой жидкость объемом 10 мл, состоящую из чистого экстракта, эквивалентного примерно 10¹⁰ КОЕ/мл, с добавлением молочной и лимонной кислот.

Участники исследования принимали ее дважды в день: утром и вечером перед едой в течение 4-недельного периода приема LEX.

БАД DAIGO была получена от компании B&S Corporation Co. Ltd. (Токио, Япония).

Методика

Участники были набраны в университетских легкоатлетических клубах; 13 бегунов на длинные дистанции были отобраны с 20 октября по 16 декабря 2016 г. Участникам были предоставлены БАД, 4 набора для сбора кала и 2 набора для сбора мочи. Им также было дано указание принимать исследуемую БАД по 10 мл 2 раза в день ежедневно в течение 4 нед после 4-недельного периода первичного наблюдения (без включения БАД в рацион).

Официальный забег проводился дважды в течение всего периода наблюдения. Расписание было составлено таким образом, чтобы забег проходил в середине как периода первичного наблюдения, так и периода приема БАД (LEX). Официальные соревнования были представлены вторым забегом на длинную дистанцию (12.11.2016, Айти, Япония, Организатор: Ассоциация легкой атлетики Айти) и 78-м чемпионатом по шоссейной эстафете Межуниверситетских спортивных союзов Токай-Экиден (2016. 12.4, Айти, Япония, Организатор: Межуниверситетский спортивный союз Токай), которые проводились соответственно в период первичного наблюдения и в период приема LEX. Основные результаты получены в ходе измерения состава микробиоты кала и метаболитов в моче. На рис. 1А показано время проведения забегов и отбора проб в течение периода исследования. Состав микробиоты кала исследовали 4 раза: перед забегом в период первичного наблюдения без приема БАД (LEX) (PRE_b), в конце (после забега) периода первичного наблюдения (PRE_a), перед забегом в период приема LEX (POST_b) и в конце периода приема LEX (после забега) (POST_a). Помимо этого, были измерены метаболиты в моче дважды на этапах



Рис. 1. Дизайн исследования: А – расписание гонок и время взятия проб кала и мочи; Б – блок-схема обследования участников

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.g001>

PRE_a и POST_a для оценки эффективности приема LEX. В течение периода наблюдения участники вели дневник о своем физическом состоянии во время тренировок, общем времени тренировок, пробеге, состоянии усталости и интенсивности упражнений для оценки специфики нагрузки. Была введена шкала интенсивности упражнений, содержащая 11 уровней – от 0 до 10 (0 – перерыв в тренировках, 1 – низкая, 10 – высокая), и такая же оценка была дана нагрузке на соревнованиях при участии в забегах.

Выделение бактериальной ДНК и секвенирование 16S рПНК

Участники самостоятельно собирали образцы кала в полиэтиленовые контейнеры для сбора образцов. Затем их немедленно помещали в морозильную камеру, транспортировали в лабораторию в замороженном виде и хранили при температуре -80 °С для дальнейшего ана-

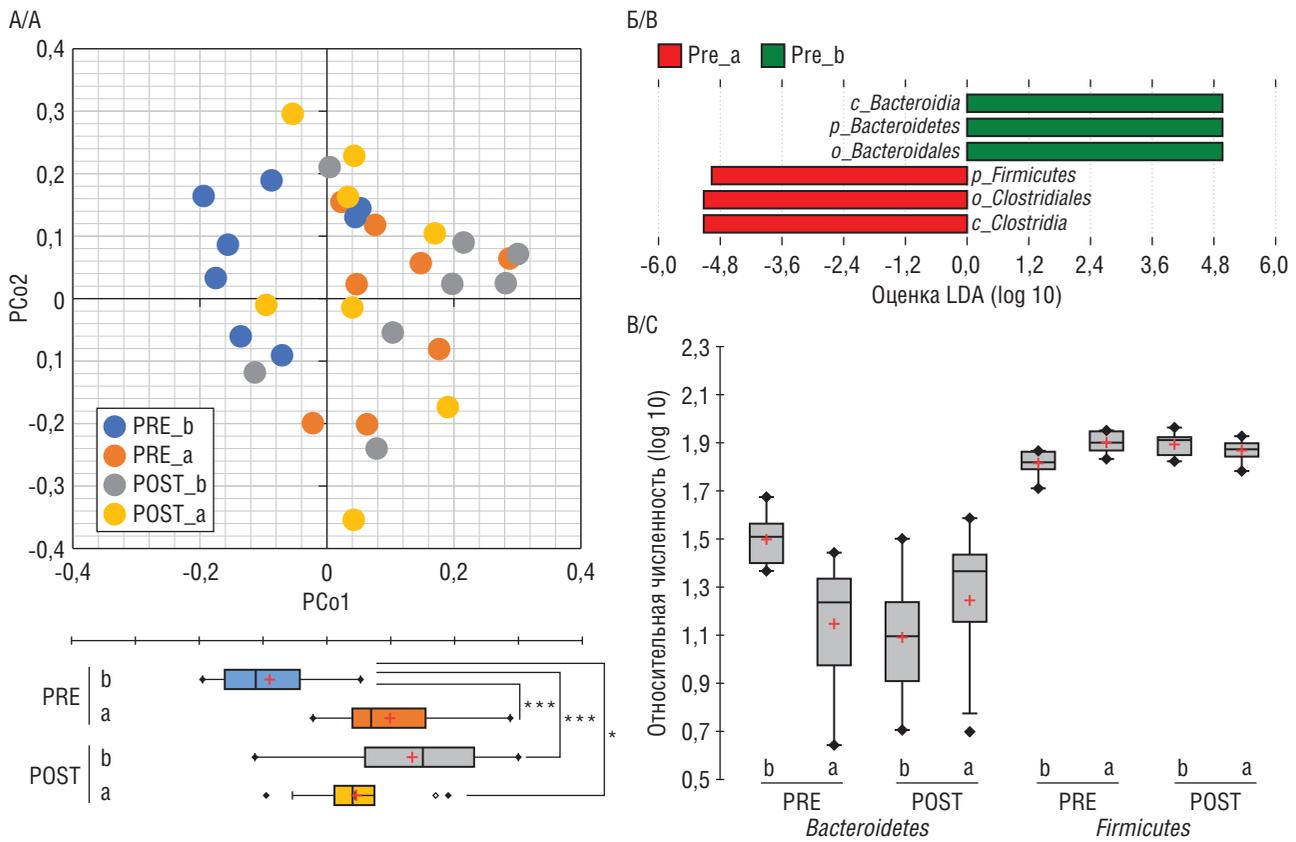


Рис. 2. Разница в составе микробиоты кала до и после забега во время периодов предварительного наблюдения и приема LEX: А – график анализа главных координат (PCoA) (взвешенный анализ UniFrac); Б – график линейного дискриминантного анализа (LDA) величины эффекта (LEfSe) в микробиоте кала в 4 группах (PRE_b, PRE_a, POST_b и POST_a). Указаны оценка LDA (log10) >2 и $p < 0,05$; В – гистограмма относительного распределения филумов *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. PRE: период первичного наблюдения. POST: период приема LEX; b – до забега; a – после забега. На всех диаграммах размаха центральные линии представляют медиану, а края прямоугольника представляют 1-й и 3-й квартили со средним значением (+ красного цвета). Статистическую значимость определяли с помощью повторного дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Бонферрони для графика PCoA. * и *** указывают на статистически значимые различия при $p < 0,05$ и $p < 0,001$ соответственно

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.g002>

ков были следующими (показаны средние значения \pm стандартное отклонение): рост, см: мужчины $173,6 \pm 5,1$, женщины $158,7 \pm 4,9$, доля жировой массы тела (ЖМТ), %: мужчины $9,9 \pm 2,0$, женщины $22,9 \pm 3,7$, ИМТ, $\text{кг}/\text{м}^2$: мужчины $19,2 \pm 0,9$, женщины $21,3 \pm 1,2$. Все участники питались 3 раза в день и придерживались сбалансированного рациона, включающего мясо, рыбу и овощи, и не меняли его в течение периода исследования. Кроме того, 8 из 13 участников (61,5%) употребляли йогурт в течение периода исследования, как и обычно. В течение каждого периода проводилось по 1 официальному забегу. На рис. 1Б показана блок-схема обследования участников. 9 (5 мужчин и 4 женщины) из 13 участников приняли участие в 2 забегах. 2 образца мочи у женщин не были собраны до начала приема LEX из-за физиологических условий, не подходящих для анализа мочи. Из 52 собранных образцов ДНК кала 3 образца от участников-мужчин не соответствовали требованиям, и результатов секвенирования получено не было. В результате для тех, кто участвовал в 2 забегах, были проведены анализы микробиоты кала (образцы

от 5 мужчин и 3 женщин) и метаболитов в моче (образцы от 6 мужчин и 2 женщин). Для анализа взаимосвязей между составом микробиоты кала и метаболитами в моче были включены данные 9 участников, независимо от участия в 2 забегах.

На рис. S1 показаны данные самооценки об общем времени тренировок и пробеге для каждого 4-недельного периода исследования, а также показатель воспринимаемой нагрузки (RPE) для каждого из 2 забегов. По данным спортсменов, как интенсивность тренировок, так и общее время тренировок были выше (примерно на 25 и 17% соответственно) в период предварительного наблюдения до приема LEX, чем в период ее приема.

Общая дистанция первого забега в период до приема LEX составляла 5000 м для мужчин и 3000 м для женщин, а общая дистанция второго забега в период приема LEX составляла от 5,4 до 12,3 км для мужчин и от 3,7 до 8,1 км для женщин. Таким образом, RPE, о котором сообщили спортсмены, был значительно ($p = 0,048$ для анализа микробиоты кала, $p = 0,038$ для анализа метаболитов в моче) выше во втором забеге (в период приема LEX).

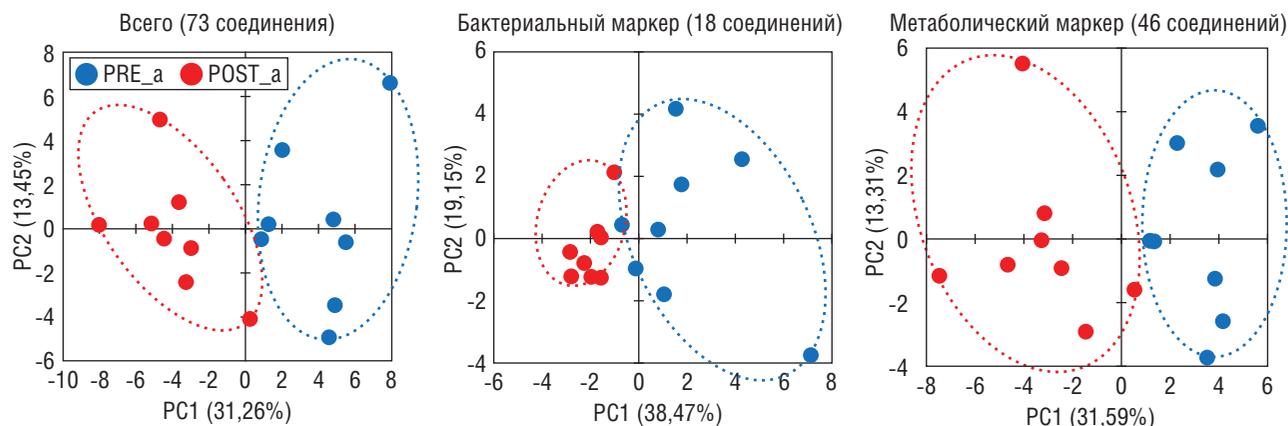


Рис. 3. Диаграмма рассеяния маркеров в моче в пространстве первых двух главных компонент(PCA)

Левый график: всего 73 соединения; центральный график: бактериальный маркер – 18 соединений; правый график: метаболический маркер: 46 соединений. PRE_a: до приема LEX (синий замкнутый круг), POST_a: после приема LEX (красный замкнутый круг) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.g003>

Изменения в составе микробиоты кишечника в течение периода исследования

В общей сложности было получено 1 115 654 (1,1 млн) считываний 16S рПНК из образцов кала, предоставленных 8 бегунами, со средним значением считываний $39\ 095 \pm 7899$ (SD), $30\ 933 \pm 11\ 006$, $36\ 016 \pm 12\ 926$ и $33\ 414 \pm 11\ 309$ для PRE_b (период первоначального наблюдения, перед забегом), PRE_a (период первоначального наблюдения, после забега), POST_b (период приема LEX, перед забегом) и POST_a (период приема LEX, после забега) соответственно. Прочтения, соответствующие 12 филумам, 61 семейству и 90 родам, были определены у 8 бегунов. Анализ PCoA, основанный на взвешенных расстояниях UniFrac для последовательностей 16S рПНК, выявил четкую дифференциацию микробных популяций до и после однократного забега (рис. 2А). Однако в течение периода приема LEX изменения, наблюдаемые в микробных популяциях вследствие участия в забегах, были небольшими, и в значительной степени состояние POST_a имело тенденцию возвращаться в состояние PRE_b.

Для выявления значимого изменения численности бактериальных таксонов в зависимости от участия в забеге и приема LEX был проведен анализ LEfSe. Оценка LDA показала более высокие ассоциации филума *Bacteroidetes* (включая класс *Bacteroidia*) и филума *Firmicutes* (включая класс *Clostridia*) с обследованием до и после забега в течение периода первоначального наблюдения (рис. 2Б). Относительная численность филума *Bacteroidetes* уменьшилась, а филума *Firmicutes* значительно увеличилась после забега (рис. 2Б). Соотношение *Firmicutes* и *Bacteroidetes* (F/B) было значительно ($p=0,038$) выше после забега. Такие тенденции сохранялись даже через 14 дней приема LEX (POST_b) (рис. S2). В конце периода приема LEX (POST_a), несмотря на увеличение RPE (требовались повышенные усилия), о котором сообщили спортсмены, участвующие в забеге в данный период, в ходе анализа

LEfSe не было обнаружено значительных различий между PRE_b и POST_a. Кроме того, соотношение F/B в момент POST_a также имело тенденцию соответствовать показателям, полученным в период предварительного наблюдения до приема LEX (PRE-b).

Дальнейший анализ α -разнообразия микроорганизмов на уровне филумов в образцах кала, не выявил существенных различий в индексе Чжао1 и индексе Шеннона. Однако дисперсия индекса Шеннона до и после забега в течение периода предварительного наблюдения значительно различалась (F-критерий: $p=0,001$) (рис. S3). Таким образом, индекс Чжао1 отражает предполагаемое богатство структуры сообщества, в то время как индекс Шеннона представляет как богатство, так и равномерность разнообразия видов, указывая на то, что равномерность структуры микробного сообщества, вероятно, будет колебаться до и после забега.

Изменения в метаболитах мочи вследствие приема биологически активной добавки

В моче были проанализированы 73 метаболита на предмет изменений как микробиоты ЖКТ, так и метаболизма, вызванных приемом LEX. Данные соединения включали метаболиты дрожжей и микроскопических грибов (грибков), бактериальные, цикла трикарбоновых кислот в митохондриях, нейромедиаторов и другие метаболиты. Комплексы указанных метаболитов в моче из отдельных образцов мочи были подвергнуты анализу по методу главных компонент (PCA), как показано на рис. 3. Примечательно, что были выявлены значительные различия в уровне метаболитов до и после приема LEX у участников, которые смогли собрать образцы мочи и участвовали в обоих забегах. Различия были также очевидны в случаях 18 бактериальных маркеров и 46 метаболических маркеров. Кроме того, было отмечено, что оцененное по PCA рассеяние бактериальных маркеров агрегировалось до определенной степени после приема LEX по сравнению с метаболическим маркером.

Таблица 1. Изменение содержания метаболитов в моче до и после приема LEX; показаны только те результаты, которые имеют значимые различия<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.t001>

Категория маркера	Компонент	Среднее значение (стандартное отклонение)		Значение <i>p</i> после коррек- тировки FDR
		ммоль/моль креатинина		
		PRE	POST	
Дрожжи и микроскопические грибы	β-Кетоглутаровая кислота	0,06 (0,05)	0,00 (0,01)	0,029
	Винная кислота	0,32 (0,18)	0,07 (0,10)	0,049
	Арабиноза	48,25 (17,17)	17,00 (5,21)	0,016
	Трикарбаллиловая кислота	0,11 (0,08)	0,02 (0,05)	0,024
Бактерии	Миндальная кислота	0,33 (0,12)	0,23 (0,18)	0,037
	4-гидроксигиппуровая кислота	6,79 (3,31)	1,94 (1,15)	0,044
<i>Clostridia</i>	п-Крезол	8,75 (7,37)	2,76 (3,22)	0,027
Цикл трикарбоновых кислот	α-Кетоглутаровая кислота	9,30 (5,03)	5,68 (4,81)	0,005
	Аконитовая кислота	9,78 (1,35)	3,15 (2,10)	0,005
Митохондриальная аминокислота	3-метилглутаровая кислота	0,59 (0,31)	0,21 (0,15)	0,023
	3-гидроксиглутаровая кислота	7,59 (4,65)	2,09 (1,62)	0,029
	3-метилглутаконовая кислота	1,15(0,38)	0,73 (0,42)	0,011
Нейромедиаторы	Гомованилиновая кислота	1,95 (0,43)	0,81 (0,28)	0,006
	Ванилилминдальная кислота	1,41 (0,17)	0,75 (0,36)	0,006
	Хинолиновая кислота	1,58 (0,33)	0,58 (0,28)	<0,001
	Кинуреновая кислота	1,18 (0,25)	0,39 (0,25)	<0,001
Пиримидин	Тимин	0,18 (0,05)	0,09 (0,07)	0,049
Окисление кетонов и жирных кислот	Метилантарная кислота	1,13 (0,28)	0,50 (0,23)	0,004
Витамины	Пантотеновая кислота	1,51 (0,53)	0,49 (0,32)	0,012
	3-гидрокси-3-метилглутаровая кислота	11,13 (2,54)	4,91 (2,30)	0,011
	Метиллимонная кислота	0,57 (0,18)	0,21 (0,10)	0,011
Детоксикация	Пироглутаминовая кислота	21,25 (3,01)	13,14 (4,07)	0,011
	Оротовая кислота	0,31 (0,16)	0,14 (0,12)	0,024
	2-гидроксигиппуровая кислота	0,78 (0,68)	0,21 (0,31)	0,044
Аминокислоты	Фенилпировиноградная кислота	0,85 (0,25)	0,50 (0,43)	0,037
	4-гидроксифенилмолочная кислота	0,22 (0,08)	0,06 (0,03)	0,011
Минеральные вещества	Ортофосфорная кислота	3,58 (0,84) *1	2,67 (1,01)*1	0,039

*1 – моль/моль Cr.

В табл. 1 приведены данные о метаболитах в моче, значимо различающиеся до и после приема LEX в течение 4 нед. Для 27 из 73 соединений наблюдали значительные изменения до и после приема LEX. Например, арабиноза является одним из маркеров дрожжевых микроорганизмов, уровень арабинозы в моче до приема LEX составлял $48,25 \pm 17,17$ (SD) ммоль/моль Cr, что было выше референсного диапазона [мужчины (≥ 13 лет): ≤ 20 ммоль/моль Cr, женщины (≥ 13 лет): ≤ 29 ммоль/моль Cr]. Однако средняя концентрация арабинозы в моче после приема LEX значимо снизилась ($p=0,016$) до $17,00 \pm 5,21$ ммоль/моль Cr, достигнув референсного диапазона. Уровни других маркеров дрожжей и микроскопических грибов (грибков), таких как β-кетоглутаровая кислота, винная кислота и трикарбаллиловая (пропан-1,2,3-трикарбоновая) кислота, также статистически значимо снизились после приема LEX. Кроме того, содержание 3-метилглутаровой и 3-гидроксиглутаровой кислот – 2 маркеров метаболизма аминокислот в митохондриях – также было повышенным до приема LEX по сравнению с установленными рефе-

ренсными уровнями [3-метилглутаровая кислота: мужчины (≥ 13 лет): 0,02–0,38 ммоль/моль Cr, женщины (≥ 13 лет): $\leq 0,76$ ммоль/моль Cr, 3-гидроксиглутаровая кислота: мужчины (≥ 13 лет): $\leq 4,6$ ммоль/моль Cr, женщины (≥ 13 лет): $\leq 6,2$ ммоль/моль Cr], но после приема LEX наблюдалось значимое снижение (3-метилглутаровая кислота: $p=0,023$, 3-гидроксиглутаровая кислота: $p=0,029$). Помимо этого, после приема LEX наблюдалось значимое снижение концентрации метаболитов цикла трикарбоновых кислот (α-кетоглутаровая кислота: $p=0,005$, аконитовая кислота: $p=0,005$) и метаболитов нейромедиаторов (гомованилиновая кислота: $p=0,006$, ванилилминдальная кислота: $p=0,006$, хинолиновая кислота: $p=0,0003$, кинуреновая кислота: $p=0,0004$).

Связь между микробиотой кишечника и метаболитами в моче

Впоследствии была исследована взаимосвязь между показателями фекальной микробиоты и концентрацией метаболитов в моче. Результаты показали наличие нескольких умеренных корреляций между относитель-

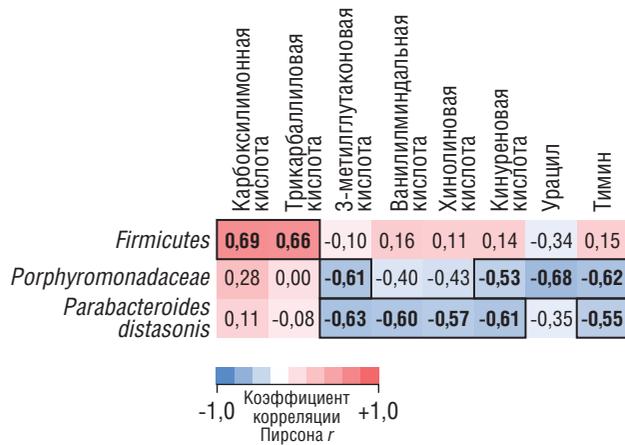


Рис. 4. Тепловая карта корреляций (коэффициент корреляции Пирсона) между микробиотой кала и метаболитами в моче. Цветовая полоса (внизу легенды) представляет корреляцию между каждым элементом. Более темный цвет указывает на то, что коэффициент корреляции постепенно увеличивается. Например, красный цвет показывает положительную корреляцию, в то время как синий – отрицательную. Цифры обозначают коэффициенты корреляции Пирсона (r), а полужирный шрифт означает $p < 0,05$.

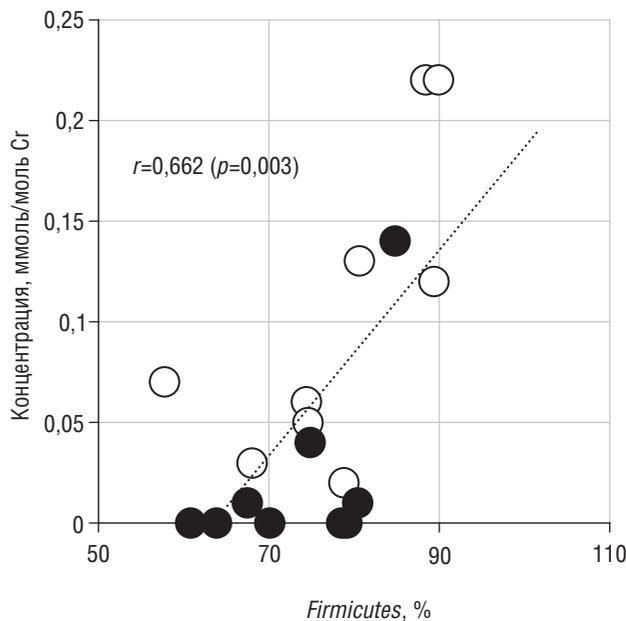
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.g004>

ной численностью микроорганизмов и концентрацией метаболитов. На рис. 4 суммированы эти корреляции. Данные о трикарбаллиловой и карбоновой² кислотах, являющихся маркерами дрожжей и микроскопических грибов, показаны в виде точечных диаграмм (рис. 5), они свидетельствуют о наличии положительной корреляции филума *Firmicutes* с трикарбаллиловой ($r=0,662$, $p=0,003$) и карбоновой кислотами ($r=0,689$, $p=0,002$).

На уровне семейств наблюдались умеренные корреляции с несколькими метаболитами для *Porphyromonadaceae* (рис. 4 и S4). Они отрицательно коррелировали с 3-метилглутаконовой кислотой ($r=-0,609$, метаболит митохондриальной аминокислоты), кинуреновой кислотой ($r=-0,529$, метаболит триптофана) и метаболитами пиримидина (урацил: $r=-0,680$, тимин: $r=-0,625$). Также была выявлена корреляция вида *Parabacteroides distasonis* (филум *Bacteroidetes*, семейство *Porphyromonadaceae*) с несколькими метаболитами (см. рис. 4 и S4). Умеренные корреляции обнаруживались с 3-метилглутаконовой кислотой ($r=0,630$), метаболитами нейромедиаторов (ванилилминдальная кислота: $r=-0,602$, хинолиновая кислота: $r=-0,570$ и кинуреновая кислота: $r=-0,630$) и метаболитами пиримидина (тимин: $r=-0,554$).

A/A

Трикарбаллиловая кислота



B/B

Карбоксимонная кислота

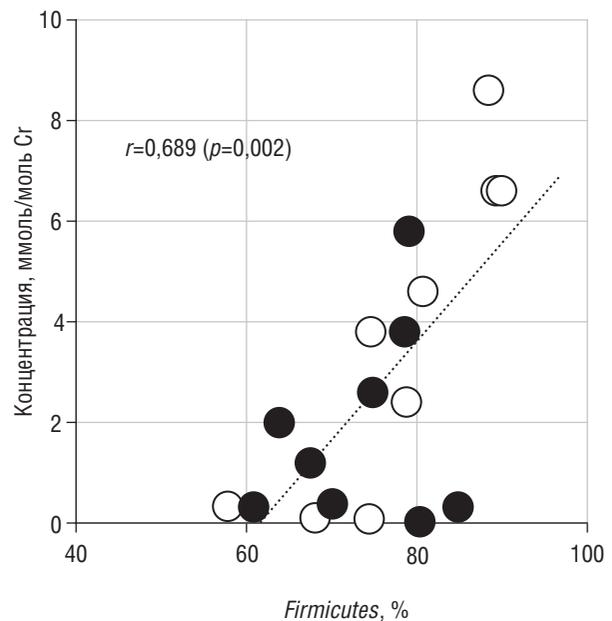


Рис. 5. Корреляции между метаболитами в моче и бактериальным составом на уровне филума Филум *Firmicutes* в сравнении с трикарбаллиловой кислотой (А) и карбоксимонной кислотой (Б). Полые и закрашенные круги представляют значения в период предварительного наблюдения (PRE) и в период приема LEX (POST) соответственно. Коэффициенты корреляции Пирсона (r) указаны для каждого графика со значением p. Анализ проводили с использованием данных по 18 пунктам из 2 образцов, предоставленных 9 участниками

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.g005>

² В тексте исходной статьи допущена опечатка – имелась в виду карбоксимонная кислота (2-гидроксипропан-1,1,2,3-тетракарбоновая кислота). – Прим. ред.

Чтобы выявить значимые изменения численности бактериальных таксонов в ответ на прием LEX, был проведен анализ LEfSe для 11 участников, независимо от того, участвовали ли они в обоих забегах или нет. Результаты оценки LDA показали значительные различия в бактериальном составе до и после приема LEX (рис. S5). Доля *Odoribacter* (филум *Bacteroidetes*, семейство *Odoribacteraceae*), *Turicibacter* (филум *Firmicutes*, семейство *Turicibacteraceae*) и *P. distasonis* увеличилась, а *Oribacterium* (филум *Firmicutes*, семейство *Lachnospiraceae*) уменьшилась после приема LEX. *P. distasonis* являлся единственным биомаркером, обнаруженным на уровне вида, который имел самую высокую относительную численность среди данных биомаркеров.

Обсуждение

Настоящее пилотное исследование позволяет нам сделать 2 ценных вывода о соревнованиях и приеме БАД спортсменами, выступающими в видах спорта, тренирующих выносливость. Насколько нам известно, это первое исследование, объединяющее анализ изменений микробиоты кишечника и метаболитов в моче спортсменов, развивающих показатели выносливости, при приеме LEX и без него.

Настоящее исследование показало, что у спортсменов, участвовавших в соревнованиях, наблюдались изменения в составе микробиоты кишечника. Также было высказано предположение, что прием LEX подавляет чрезмерный рост дрожжей и микроскопических грибов и улучшает метаболизм, включая цикл трикарбонных кислот в митохондриях.

Данное исследование имеет несколько ограничений. Во-первых, мы признаем ограничения данного исследования, поскольку в нем отсутствовала контрольная группа, а также возможно, что наблюдаемая эффективность приема LEX объяснялась эффектом плацебо. Помимо этого, ввиду используемого дизайна исследования не удалось определить, произошли ли изменения в микробиоте вследствие приема LEX или тренировок. Следует также отметить, что расписание было скорректировано таким образом, чтобы спортсмены могли участвовать в 2 забегах в течение периода исследования. Тем не менее было сложно согласовать интенсивность соревнований с периодом наблюдения. Во-вторых, недостаточно физиологических данных о физических нагрузках и клинических данных о состоянии ЖКТ. В-третьих, в настоящем исследовании не был проведен углубленный анализ рациона питания участников по многим причинам. Питание и физическая нагрузка являются двумя факторами, которые существенно влияют на микробиоту кишечника [4, 5]. Поэтому необходимо провести рандомизированное плацебо-контролируемое исследование с учетом влияния физической нагрузки на физиологические данные участников и их рациона, чтобы проанализировать, насколько питание,

включая прием БАД, и физические нагрузки влияют на таксономический состав микробиоты кишечника у спортсменов.

В настоящем исследовании в течение периода предварительного наблюдения (без приема БАД) были отмечены колебания состава микробиоты кишечника на уровне филумов, с уменьшением количества *Bacteroidetes* и увеличением количества *Firmicutes* до и после забега. Важно отметить, что образцы были взяты за день до и через 6 дней после забега, но тенденция сохранялась как минимум 14 дней. Несколько исследований на экспериментальных животных и клинических исследований выявили корреляцию между специфическими изменениями в структуре микробного сообщества кишечника и физической нагрузкой, хотя в них изучали последствия длительных физических нагрузок. В большинстве опубликованных исследований на моделях с мышами изучали комбинированное воздействие физической нагрузки, диетических вмешательств и заболеваний. В исследовании Choi и соавт. (2013) показано, что при использовании бегового колеса у мышей наблюдалось увеличение численности филума *Firmicutes* и уменьшение численности филумов *Tenericutes* и *Bacteroidetes*, что ослабляло изменения в микробиоте кишечника, вызванные пероральным введением полихлорированных бифенилов [20]. Аналогичным образом как у мышей с сахарным диабетом 2 типа, так и у мышей контрольной группы физическая нагрузка приводила к большему обилию видов *Firmicutes* и меньшему количеству родов *Bacteroides/Prevotella*, чем у мышей, ведущих малоподвижный образ жизни [21]. Напротив, Evans и соавт. (2014) описали увеличение филума *Bacteroidetes* и уменьшение филума *Firmicutes* пропорционально расстоянию, которое пробежали мыши, находящиеся на рационе с высоким содержанием жиров [22]. В краткосрочном клиническом исследовании Zhao и соавт. (2018) выявили, что полумарафонский забег вызвал увеличение разнообразия семейств *Coriobacteriaceae* и *Succinivibrionaceae*, которые принадлежат к филумам *Actinobacteria* и *Proteobacteria* соответственно [23]. Поэтому считается, что физическая нагрузка влияет на состав микробиоты кишечника, который может колебаться из-за участия в однократном соревновании. Разница в дисперсии индекса Шеннона до и после забега позволяет предположить, что бактериальный состав относительно нестабилен после забега. Участники настоящего исследования осуществляли ежедневные тренировки, и изменения в микробиоте кишечника на уровне филумов могут быть связаны с жесткими физическими требованиями официального забега и психологическими эффектами соревнований. Интересно, что такое изменение сохраняется в течение относительно длительного периода. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять, как микробиом связан с физической подготовкой спортсменов.

Бегуны на длинные дистанции нуждаются в постоянной энергии в течение регулярных продолжительных

и длительных тренировок. Метаболические потребности скелетных мышц, печени, почек и жировой ткани увеличиваются в течение дня или нескольких дней после бега. Исследования взаимосвязей между составом микробиоты и потреблением пищи выявили множество корреляций. Потребление жира и энергии являлось компонентом, имеющим наибольшие корреляции с бактериальными таксонами [23]. Изменения в бактериальном составе могут быть вызваны регулированием энергетического и гормонального баланса или реакцией на изменения в рационе. Тем не менее спортсмены получают высокую нагрузку во время тренировок ежедневно. Учитывая это, психологическое воздействие соревнования также может быть связано с изменениями бактериального состава в результате однократного участия в соревновании. Кроме того, такие изменения могут оказать существенное влияние на поддержание состояния спортсмена после соревнований. Поэтому необходимо проводить исследование, точно оценивая рацион питания и психическое состояние до и после соревнований.

Изменения состава микроорганизмов до и после забега в период приема LEX были меньшими, чем в период предварительного наблюдения, поскольку бактериальный состав в последний день приема LEX (POST_a) был аналогичен исходному состоянию (PRE_b). Однако прямое сравнение 2 периодов исследования является проблематичным, поскольку отбор образцов после забега происходил в течение более длительного времени (6 дней) в период приема LEX. Более того, возможно, что между периодом предварительного наблюдения (до приема БАД) и периодом приема LEX прошло недостаточно времени, чтобы микробиом вернулся к исходному уровню, что потенциально могло исказить наблюдаемые результаты. Необходимо также учитывать, что интенсивность физических упражнений могла незначительно различаться в зависимости от периода наблюдения, что потенциально могло повлиять на микробиоту. Однако, поскольку изменения микробиоты в период POST_b не сохраняются (т.е. возвращаются к исходному микробному составу перед забегом), можно ожидать, что прием LEX способен подавлять изменения в кишечной микробиоте, возникающие в результате участия в официальных соревнованиях.

В настоящем исследовании также были изучены изменения метаболитов в моче до и после приема LEX. К сожалению, необходимо воздерживаться от употребления спортивных напитков и фруктов, которые влияют на метаболиты в моче, за день до сбора мочи и с учетом поддержания состояния перед забегом. Анализ метаболитов в моче за день до соревнований не мог быть проведен одновременно со сбором образцов кала. Перед приемом LEX концентрация арабинозы (в среднем 48,25 ммоль/моль Cr) была значительно выше референсного диапазона. Арабиноза является маркером видов *Candida* (дрожжи), и повышение уровня арабинозы в моче коррелирует с чрезмерным

ростом дрожжей [24]. После приема LEX уровень арабинозы в моче значительно снизился. Кроме того, также наблюдалось значительное снижение таких маркеров дрожжевых микроорганизмов и грибов, как концентрация β -кетоглутаровой, винной и трикарбаллиловой кислот [25–27]. В целом данные результаты свидетельствуют о том, что непрерывный прием LEX подавляет чрезмерный рост дрожжей и микроскопических грибов.

У людей микроскопические грибы и дрожжи колонизируют кишечник вскоре после рождения [28]. Фекальный кишечный микробиом человека отличается низким разнообразием бактериального состава, и в нем преобладают дрожжи, включая *Saccharomyces*, *Malassezia* и *Candida* [29]. Изучение взаимосвязи между рационом и ростом микроскопических грибов выявило, что *Candida* в избытке встречается в ответ на недавнее потребление углеводов [30]. Присутствие грибов связано с обострением ряда заболеваний человека, включая воспалительные заболевания кишечника и рак толстой и прямой кишки [31–33]. Также сообщалось, что рост грибов в кишечнике вовлечен в воспалительный ответ и усиливает аллергическую реакцию [34]. Спортсмены, участвующие в видах спорта, требующих выносливости, регулярно тренируются в беге на длинные дистанции (для участников настоящего исследования средняя месячная дистанция бега составляла около 260 км), и такая чрезмерная физическая нагрузка может снизить устойчивость микробиоты кишечника, что приводит к росту дрожжей и микроскопических грибов. Чрезмерный рост грибов в кишечнике способствует системному воспалению и усилению усталости, что влияет на поддержание физического состояния спортсмена. Прием LEX может подавлять чрезмерный рост микроскопических грибов и может быть эффективным для ежедневной подготовки.

Из 9 маркеров, связанных с ростом бактерий, 3 показали значимое снижение после приема LEX. Ими являются метаболиты тирозина и фенилаланина. Данные результаты предполагают, что избыточный рост специфических бактерий, в том числе клостридий, и микробный дисбиоз подавляются. Кроме того, изменения в метаболитах в моче, отражающие уровни нейромедиаторов, наблюдались в отношении метаболизма фенилаланина, тирозина или триптофана. Недавно мы сообщили о том, что прием LEX снижает уровень индоксилсульфата в моче, метаболита триптофана, образующегося в результате метаболизма микробиоты кишечника [12]. Предполагается, что изменения указанных метаболитов также, возможно, опосредованы микробиотой кишечника.

Еще одним заметным изменением метаболитов в моче до и после приема LEX являются маркеры митохондриальных метаболитов, включая метаболиты цикла трикарбоновых кислот. Уровень 9 маркеров до приема LEX находился в пределах установленного диапазона, но концентрация 5 соединений значительно снизилась после приема LEX. Мы предполагаем, что непрерывный прием LEX улучшает митохондриальный метаболизм, что при-

водит к поддержанию накопления энергии и доступности субстрата для процессов ассимиляции, таких как липогенез. 3-метилглутаровая и 3-метилглутаконовая кислоты являются метаболитами лейцина – мощного стимулятора синтеза белка путем стимуляции мишени рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR) [35]. Учитывая эти моменты, поддержание среды ЖКТ может способствовать устранению усталости и восстановлению мышц за счет модуляции воспаления при ежедневных тренировках.

Витамины группы В участвуют в процессе цикла трикарбоновых кислот в качестве кофакторов/ферментов, таких как ФАД (В₂) и НАД (В₃), в качестве компонентов ацетил-КоА (В₅) или в качестве коэнзима Q₁₀ (В₅) [36]. В отношении витаминов значимые изменения наблюдались в содержании пантотеновой кислоты (В₅), 3-гидрокси-3-метилглутаровой кислоты (предшественник кофермента Q₁₀) и метиллимонной кислоты (индикатор биотина). Хотя витамины группы В всасываются через тонкую кишку, они также могут поступать в результате биосинтеза микробиотой кишечника. В целом предполагается, что активация митохондриального метаболизма и цикла трикарбоновых кислот при приеме LEX может быть опосредована микробиотой кишечника.

Затем была проанализирована взаимосвязь между составом микробиоты кишечника и метаболитами в моче. Были обнаружены положительные корреляции между филумом *Firmicutes* и маркерами дрожжей и микроскопических грибов, включая трикарбаллиловую и карбоксилимонную кислоты. Предполагается, что дисбаланс микробиома кишечника может вызвать чрезмерный рост дрожжей и грибов, что было продемонстрировано ранее. К примеру, применение антибиотиков у мышей приводит к значительному росту грибов [34, 37], что позволяет предположить, что сбалансированный состав микробиоты контролирует распространенность микроскопических грибов в кишечнике. В составе микробиоты кишечника человека филумы *Firmicutes* и *Bacteroidetes* являются двумя основными доминирующими [38]. Соотношение *Firmicutes* и *Bacteroidetes* было хорошо изучено в микробиоте кишечника человека и мыши. Многочисленные исследования показывают, что соотношение F/B коррелирует с ожирением и другими заболеваниями [39–42]. Также предполагается, что баланс филумов *Firmicutes* и *Bacteroidetes* влияет на рост микроскопических грибов у спортсменов.

Parabacteroides distasonis – единственный вид бактерий, который, как было обнаружено, коррелирует с метаболитами в моче на уровне вида. Бактерии рода *Parabacteroides*, включая *P. distasonis*, являются грамотрицательными анаэробными бактериями и определяются как 1 из 18 основных представителей микробиоты кишечника человека [43]; таким образом, считается, что указанный род участвует в важных физиологических функциях организма. Распространенность *P. distasonis* относительно ниже у пациентов с ожирением, неалкогольной жировой болезнью печени, воспалительными заболеваниями кишечника

и рассеянным склерозом [44–47]. Более того, было показано, что лечение живыми *P. distasonis* у мышей оказывает противовоспалительное действие, снижает увеличение массы тела, улучшает гомеостаз глюкозы, корректирует связанные с ожирением нарушения и индуцирует регуляторные Т-лимфоциты из наивных CD4⁺-Т-клеток [48, 49]. Было также высказано предположение, что данные эффекты регулируются *P. distasonis* посредством янтарной кислоты и вторичной выработки желчных кислот или подавления сигналов TLR4 и AKT [49]. Данные результаты подтверждают, что *P. distasonis* кишечника является многообещающим симбионтом, который может модулировать метаболизм организма, потенциально облегчая метаболическую дисфункцию. В настоящем исследовании многие метаболиты в моче коррелировали с составом *P. distasonis*, предполагая связь с метаболизмом лейцина, фенилаланина, тирозина и триптофана. Являясь компонентом микробиоты кишечника, бактерия *P. distasonis* также может являться важным маркером физической подготовки спортсменов, поскольку она также связана с противовоспалительными реакциями.

Для справки: изменения в составе *P. distasonis* вследствие приема LEX значительно увеличиваются по сравнению с периодом до и после приема LEX, независимо от того, участвовали ли спортсмены в 2 забегах или нет. Хотя было предложено использовать *P. distasonis* в качестве пробиотика, важнее определить пищевые ингредиенты, которые будут регулировать эндогенную бактерию *P. distasonis*, чем использовать введение этих бактерий как таковых.

В заключение следует отметить, что настоящее исследование дает представление о влиянии соревнований и перорального приема LEX на здоровье спортсменов, участвующих в видах спорта, требующих выносливости, уделяя особое внимание составу их микробиома. Наши данные показывают, что однократный официальный забег на длинные дистанции может незамедлительно вызвать поразительные изменения состава микробиоты кишечника. Данные изменения также потенциально могут сохраняться в течение относительно длительного периода времени. Анализ метаболитов в моче показал, что у участников также может происходить чрезмерный рост дрожжей и микроскопических грибов в ЖКТ. Таким образом, прием LEX может оказать общее положительное влияние и в этом аспекте.

Полученные данные свидетельствуют о том, что прием LEX может, помимо этого, улучшить митохондриальный метаболизм и метаболизм аминокислот и способствовать эффективному поддержанию ежедневного метаболического гомеостаза у спортсменов. Кроме того, наблюдалась взаимосвязь между ростом микроскопических грибов и преобладанием филума *Firmicutes*, а бактерия *P. distasonis*, которая связана со многими метаболитами в моче, также может быть важным показателем состояния спортсмена. Тем не менее в дальнейших исследованиях необходимо прояснить влияние соревновательных мероприятий на микробиом кишечника спортсменов

спорта высших достижений и изучить варианты смягчения неблагоприятного воздействия на ЖКТ, например, как в случае приема LEX.

Вспомогательная информация

Онлайн-версия статьи содержит дополнительные материалы:

Рис. S1. Физические нагрузки в период первоначального наблюдения и в период приема LEX
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.s001>

Рис. S2. Изменения в соотношении *Firmicutes* и *Bacteroidetes* в микробиоте кала
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.s002>

Рис. S3. Изменения α -разнообразия микробиоты кала на уровне филумов
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.s003>

Рис. S4. Графики корреляции бактериального состава кала и метаболитов в моче
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.s004>

Рис. S5. Различия в численности микробных таксонов до и после приема LEX
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262906.s005>

Благодарность

Авторы благодарны всем спортсменам, принявшим участие в исследовании. Кроме того, признательны компаниям California Nutrients, Inc. и Bioengineering Lab. Co., Ltd. за техническую помощь в проведении анализа мочи и высокопроизводительного секвенирования соответственно. Документ на английском языке был проверен профессиональной службой (Enago) и редактором, который является носителем английского языка.

Литература/References

- Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*. 2018; 361: k2179. Epub 2018/06/15. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179> PMID: 29899036; PubMed Central PMCID: PMC6000740.
- Yang Q, Liang Q, Balakrishnan B, Belobrajdic DP, Feng QJ, Zhang W. Role of dietary nutrients in the modulation of gut microbiota: a narrative review. *Nutrients*. 2020; 12. Epub 2020/02/07. <https://doi.org/10.3390/nu12020381> PMID: 32023943; PubMed Central PMCID: PMC7071260.
- Durack J, Lynch SV. The gut microbiome: relationships with disease and opportunities for therapy. *J Exp Med*. 2019; 216: 20–40. Epub 2018/10/17. <https://doi.org/10.1084/jem.20180448> PMID: 30322864; PubMed Central PMCID: PMC6314516.
- Kolodziejczyk AA, Zheng D, Elinav E. Diet-microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol*. 2019; 17: 742–753. Epub 2019/09/22. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0256-8> PMID: 31541197.
- Barton W, Penney NC, Cronin O, Garcia-Perez I, Molloy MG, Holmes E, et al. The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level. *Gut*. 2018; 67: 625–633. Epub 2017/04/01. <https://doi.org/10.1136/gutjnl2016-313627> PMID: 28360096.
- Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*. 2014; 63: 1933–1920. Epub 2014/07/16. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306541> PMID: 25021423.
- Estaki M, Pither J, Baumeister P, Little JP, Gill SK, Ghosh S, et al. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome*. 2016; 4: 42. Epub 2016/08/10. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0189-7> PMID: 27502158; PubMed Central PMCID: PMC4976518.
- Kulecka M, Fraczek B, Mikula M, Zeber-Lubecka N, Karczmariski J, Paziewska A, et al. The composition and richness of the gut microbiota differentiate the top Polish endurance athletes from sedentary controls. *Gut Microbes*. 2020; 11(5):1374–84. Epub 2020/05/14. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1758009> PMID: 32401138; PubMed Central PMCID: PMC7524299.
- Mohr AE, Jager R, Carpenter KC, Kerkick CM, Purpura M, Townsend JR, et al. The athletic gut microbiota. *J Int Soc Sports Nutr*. 2020; 17: 24. Epub 2020/05/14. <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00353-w> PMID: 32398103; PubMed Central PMCID: PMC7218537.
- Rawson ES, Miles MP, Larson-Meyer DE. Dietary supplements for health, adaptation, and recovery in athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2018; 28: 188–199. Epub 2018/01/19. <https://doi.org/10.1123/ijsem.2017-0340> PMID: 29345167.
- Sivamaruthi BS, Kesika P, Chaiyasut C. Effect of probiotics supplementations on health status of athletes. *Int J Environ Res Public Health*. 2019; 16. Epub 2019/11/27. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224469> PMID: 31766303; PubMed Central PMCID: PMC6888046.
- Fukuchi M, Yasutake T, Matsumoto M, Mizuno R, Fujita K, Sasuga Y. Effect of lactic acid bacteria-fermented soy milk extract (LEX) on urinary 3-indoxyl sulfate in Japanese healthy adult women: an open-label pilot study. *Nutr Diet Suppl*. 2020; 12: 301–309. <https://doi.org/10.2147/nds.S281180>
- Fukui M, Fujino T, Tsutsui K, Maruyama T, Yoshimura H, Shinohara T, et al. The tumor-preventing effect of a mixture of several lactic acid bacteria on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in mice. *Oncol Rep*. 2001; 8: 1073–1078. Epub 2001/08/10. <https://doi.org/10.3892/or.8.5.1073> PMID: 11496319.
- Takahashi S, Kawamura T, Kanda Y, Taniguchi T, Nishizawa T, Iiai T, et al. Activation of CD1d-independent NK1.1+ T cells in the large intestine by Lactobacilli. *Immunol Lett*. 2006; 102: 74–78. Epub 2005/08/19. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.07.003> PMID: 16107279.
- Mach N, Fuster-Botella D. Endurance exercise and gut microbiota: a review. *J Sport Health Sci*. 2017; 6: 179–197. Epub 2017/06/01. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2016.05.001> PMID: 30356594; PubMed Central PMCID: PMC6188999.
- Lamprecht M, Frauwallner A. Exercise, intestinal barrier dysfunction and probiotic supplementation. *Med Sport Sci*. 2012; 59: 47–56. Epub 2012/10/19. <https://doi.org/10.1159/000342169> PMID: 23075554.
- Shaw W, Kassen E, Chaves E. Increased urinary excretion of analogs of Krebs cycle metabolites and arabinose in two brothers with autistic features. *Clin Chem*. 1995; 41: 1094–1104. Epub 1995/08/01. PMID: 7628083.
- Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011; 12(6):R60. Epub 2011/06/28. <https://doi.org/10.1186/gb2011-12-6-r60> PMID: 21702898; PubMed Central PMCID: PMC3218848.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 1995; 57: 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Choi JJ, Eum SY, Rampersaud E, Daunert S, Abreu MT, Toborek M. Exercise attenuates PCB-induced changes in the mouse gut microbiome. *Environ Health Perspect*. 2013; 121: 725–730. Epub 2013/05/02. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306534> PMID: 23632211; PubMed Central PMCID: PMC3672930.
- Lambert JE, Myslicki JP, Bomhof MR, Belke DD, Shearer J, Reimer RA. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015; 40: 749–752. Epub 2015/05/13. <https://doi.org/10.1139/apnm-2014-0452> PMID: 25962839.
- Evans CC, LePard KJ, Kwak JW, Stancukas MC, Laskowski S, Dougherty J, et al. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One*. 2014; 9: e92193. Epub 2014/03/29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092193> PMID: 24670791; PubMed Central PMCID: PMC3966766.
- Zhao X, Zhang Z, Hu B, Huang W, Yuan C, Zou L. Response of gut microbiota to metabolite changes induced by endurance exercise. *Front Microbiol*. 2018; 9: 765. Epub 2018/05/08. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00765> PMID: 29731746; PubMed Central PMCID: PMC5920010.
- Shaw W, Baptist J, Geenens D. Immunodeficiency, gastrointestinal candidiasis, wheat and dairy sensitivity, abnormal urine arabinose, and autism: a case study. *N Am J Med Sc*. 2010; 3. <https://doi.org/10.7156/v31p001>
- Chen Q, Qiao Y, Xu XJ, You X, Tao Y. Urine organic acids as potential biomarkers for autism-spectrum disorder in Chinese children. *Front Cell Neurosci*. 2019; 13: 150. Epub 2019/05/23. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00150>

- 3389/fncel.2019.00150 PMID: 31114480; PubMed Central PMCID: PMC6502994.
26. Kimura Y, Tani S, Hayashi A, Ohtani K, Fujioka S, Kawano T, et al. Nematicidal activity of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid against plant-parasitic nematodes. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2007; 62: 234–238. Epub 2007/06/05. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-3-413> PMID: 17542490.
 27. Lord RS, Bralley JA. Clinical applications of urinary organic acids. Part 2. Dysbiosis markers. *Altern Med Rev.* 2008; 13: 292–306. Epub 2009/01/21. PMID: 19152477.
 28. Stewart CJ, Nelson A, Scribbins D, Marrs EC, Lanyon C, Perry JD, et al. Bacterial and fungal viability in the preterm gut: NEC and sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013; 98: F298–F303. Epub 2013/02/22. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2012-302119> PMID: 23426613.
 29. Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC, et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome.* 2017; 5: 153. Epub 2017/11/28. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4> PMID: 29178920; PubMed Central PMCID: PMC5702186.
 30. Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, et al. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One.* 2013; 8: e66019. Epub 2013/06/27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066019> PMID: 23799070; PubMed Central PMCID: PMC3684604.
 31. Hoarau G, Mukherjee PK, Gower-Rousseau C, Hager C, Chandra J, Retuerto MA, et al. Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn's disease. *mBio.* 2016; 7. Epub 2016/09/22. <https://doi.org/10.1128/mBio.01250-16> PMID: 27651359; PubMed Central PMCID: PMC5030358.
 32. Luan C, Xie L, Yang X, Miao H, Lv N, Zhang R, et al. Dysbiosis of fungal microbiota in the intestinal mucosa of patients with colorectal adenomas. *Sci Rep.* 2015; 5: 7980. Epub 2015/01/24. <https://doi.org/10.1038/srep07980> PMID: 25613490; PubMed Central PMCID: PMC4648387.
 33. Sokol H, Leducq V, Aschard H, Pham HP, Jegou S, Landman C, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut.* 2017; 66: 1039–1048. Epub 2016/02/05. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746> PMID: 26843508; PubMed Central PMCID: PMC5532459.
 34. Kim YG, Udayanga KG, Totsuka N, Weinberg JB, Nunez G, Shibuya A. Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE(2). *Cell Host Microbe.* 2014; 15: 95–102. Epub 2014/01/21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.010> PMID: 24439901; PubMed Central PMCID: PMC3957200.
 35. Drummond MJ, Rasmussen BB. Leucine-enriched nutrients and the regulation of mammalian target of rapamycin signalling and human skeletal muscle protein synthesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; 11: 222–226. Epub 2008/04/12. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282fa17fb> PMID: 18403916; PubMed Central PMCID: PMC5096790.
 36. Kennedy DO. B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review. *Nutrients.* 2016; 8: 68. Epub 2016/02/02. <https://doi.org/10.3390/nu8020068> PMID: 26828517; PubMed Central PMCID: PMC4772032.
 37. Dollive S, Chen YY, Grunberg S, Bittinger K, Hoffmann C, Vandivier L, et al. Fungi of the murine gut: episodic variation and proliferation during antibiotic treatment. *PLoS One.* 2013; 8: e71806. Epub 2013/08/27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071806> PMID: 23977147; PubMed Central PMCID: PMC3747063.
 38. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010; 464: 59–65. Epub 2010/03/06. <https://doi.org/10.1038/nature08821> PMID: 20203603; PubMed Central PMCID: PMC3779803.
 39. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 11070–11075. Epub 2005/07/22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102> PMID: 16033867; PubMed Central PMCID: PMC1176910.
 40. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006; 444: 1022–1023. Epub 2006/12/22. <https://doi.org/10.1038/4441022a> PMID: 17183309.
 41. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes V, Sokol H, Dore J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 123. Epub 2009/06/11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123> PMID: 19508720; PubMed Central PMCID: PMC2702274.
 42. Stojanov S, Berlec A, Strukelj B. The influence of probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms.* 2020; 8. Epub 2020/11/04. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715> PMID: 33139627; PubMed Central PMCID: PMC7692443.
 43. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science.* 2016; 352: 560–564. Epub 2016/04/30. <https://doi.org/10.1126/science.aad3503> PMID: 27126039.
 44. Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114: 10713–10718. Epub 2017/09/13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711235114> PMID: 28893978; PubMed Central PMCID: PMC5635915.
 45. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omicsbased approach. *Hepatology.* 2017; 65: 451–464. Epub 2016/03/31. <https://doi.org/10.1002/hep.28572> PMID: 27028797.
 46. Verdum FJ, Fuentes S, de Jonge C, Zoetendal EG, Erbil R, Greve JW, et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2013; 21: E607–E615. Epub 2013/03/26. <https://doi.org/10.1002/oby.20466> PMID: 23526699.
 47. Zitomersky NL, Atkinson BJ, Franklin SW, Mitchell PD, Snapper SB, Comstock LE, et al. Characterization of adherent Bacteroidales from intestinal biopsies of children and young adults with inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2013; 8: e63686. Epub 2013/06/19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063686> PMID: 23776434; PubMed Central PMCID: PMC3679120.
 48. Cuffaro B, Assouhoun ALW, Boutillier D, Sukenikova L, Desramaut J, Boudebouze S, et al. In vitro characterization of gut microbiota-derived commensal strains: selection of Parabacteroides distasonis strains alleviating TNBS-induced colitis in mice. *Cells.* 2020; 9. Epub 2020/09/20. <https://doi.org/10.3390/cells9092104> PMID: 32947881; PubMed Central PMCID: PMC7565435.
 49. Wang K, Liao M, Zhou N, Bao L, Ma K, Zheng Z, et al. Parabacteroides distasonis alleviates obesity and metabolic dysfunctions via production of succinate and secondary bile acids. *Cell Rep.* 2019; 26: 222–235 e5. Epub 2019/01/04. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.028> PMID: 30605678.