

article provides a detailed description of the equipment, content, stages, essence and sequence of collaborative actions of the supervisor, researchers, and subjects in the scientific-practical process.

This study allows for the recording of the cardiovascular system's state during the development of maximal force, the maintenance of that force level and throughout a six-minute recovery period.

**Conclusions.** We established and described a methodology for investigating the athlete's cardiovascular system during static loading and recovery, with simultaneous recording of rheography, electrocardiography, blood pressure measurement and dynamometer data acquisition. The results demonstrate clear and valuable insights. This comprehensive methodological approach to studying the athlete's cardiovascular system can be used in practice. Conducting the described complex study is possible with long-term practice of coordinated actions by a team of scientists. The testing of the proposed methodology with the participation of 18 volunteers proved to be successful and effective.

**Key words:** organization and establishment of the method, cardiovascular system, rheography, electrocardiography, blood pressure, static dynamometer, static loading.

### ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Bakunovskiy O. M.: <https://orcid.org/0000-0001-6546-1025><sup>ABDEF</sup>

Poltoratska I. Y.: <https://orcid.org/0009-0001-9052-2122><sup>ABD</sup>

Babak S. V.: <https://orcid.org/0000-0002-6985-1394><sup>ABDEF</sup>

Andrushchenko V. O.: <https://orcid.org/0009-0000-7323-6864><sup>BD</sup>

### Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

### Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Babak Svitlana Vitalliivna / Бабак Світлана Віталіївна  
National University of Ukraine on Physical Education and Sport / Національний університет фізичного виховання і спорту України

Ukraine, 03150, Kyiv, 1 Fizkultury str. / Адреса: Україна, 03150, м. Київ, вул. Фізкультури 1

Tel.: +380638335443 / Тел.: +380638335443

E-mail: [s.babak.s.1234@gmail.com](mailto:s.babak.s.1234@gmail.com)

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 05.12.2024 / Стаття надійшла 05.12.2024 року

Accepted 06.03.2025 / Стаття прийнята до друку 06.03.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-1-176-373-381

UDC 612.015.3:612.336.3:796.01

Palladina O. L., Kaliga A. M.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF CONTEMPORARY METHODS FOR INVESTIGATING THE COMPOSITION OF THE HUMAN GUT MICROBIOME

National University of Ukraine on Physical Education and Sport (Kyiv, Ukraine)

[anastasiya.kaliga@gmail.com](mailto:anastasiya.kaliga@gmail.com)

*The human gut microbiome is a complex system comprising trillions of microorganisms, including bacteria, archaea, fungi, and viruses, which influence metabolism and play a key role in digestion, vitamin synthesis, and immune response regulation. The impact of the microbiome on human health has gained particular importance in modern medicine, especially in sports physiology. It can determine adaptation to physical activity, recovery after training, and overall physical condition in athletes.*

*This study focuses on a comparative analysis of the most common methods for studying the human gut microbiome, their technical features, and prospects for application in sports medicine. Investigating the gut microbiome is challenging due to its structural complexity and variability under the influence of numerous internal and external factors, such as diet, physical activity, environmental conditions, and the use of medical drugs. The study analyzes modern and widespread methods for studying the gut microbiome, including polymerase chain reaction (PCR), 16S rRNA gene sequencing, and metagenomic sequencing. A comparative characterization of these approaches is presented, including their technological features, sensitivity, specificity, and limitations concerning taxonomic and functional data interpretation. The importance of proper conditions for sample collection, storage, and transportation is emphasized to ensure the reliability of results, with a focus on analyzing fecal samples as the primary non-invasive method for studying the gut microbiome.*

*The findings contribute to a deeper understanding of the mechanisms through which the microbiota affects the physical condition of athletes and provide a scientific basis for the individualization of training programs.*

**Key words:** metagenomics, bioinformatics, next-generation sequencing, microbiota, genetic testing, 16S rRNA sequencing.

### Connection of the publication with planned research work.

This study is part of the research project of the National University of Ukraine on Physical Education and Sport, "The Impact of Exogenous and Endogenous Factors on the Course of Adaptive Reactions of the Body to Physical Loads of Various Intensities" (state registration number 012U108187).

### Introduction.

The human gut microbiome represents one of the priority directions in modern research, particularly in the field of sports medicine. The microbial composition of the gut is extraordinarily complex and diverse, comprising over 40 trillion cells and more than three million genes. The human gut microbiota possesses significant metabolic potential, encompassing not only thousands of bacterial taxa but also fungi, viruses, and archaea [1-4].

It is well-established that the human microbiota plays an active role in nutrient production, immune response, and metabolic processes. The biosynthesis of vitamins, amino acids, and lipids is, to some extent, dependent on the microbial composition of the gut. Furthermore, microbial metabolites, such as short-chain fatty acids, can act as energy substrates, which is particularly critical in endurance sports, where uninterrupted energy availability is crucial for achieving optimal performance [5-7].

Despite significant progress in studying the human gut microbiome and numerous publications in this field, selecting optimal methods for microbiome analysis remains a challenging task. This is attributed to the need for proper sample collection, storage, and transportation, as well as accounting for the influence of numerous external and internal factors that may affect measurement accuracy. Additionally, challenges arise in selecting appropriate software for accurate data analysis and interpretation. This study examines a range of microbiome research methodologies, highlighting their advantages and limitations to identify the most effective approaches for analysis.

### The aim of the study.

To analyze modern methods of studying the human gut microbiome, their technological features, advantages, and limitations, with the goal of determining the most effective approaches for practical application in sports medicine, scientific research, and the diagnosis of diseases associated with microbiota imbalances.

### Main part.

#### *Sample collection methods*

Given the numerous interactions between the gut microbiota and human health, analyzing changes in microbiota composition and their impact on the onset, progression, and prognosis of various diseases is critically important [8-11]. Traditionally, gut microbiome studies were based on methods of isolating and culturing microorganisms. However, a significant portion of anaerobic bacteria, which constitute the majority of gut microbiota, are difficult to cultivate, limiting the accuracy of these approaches [12].

Advances in technology, such as next-generation sequencing (NGS), have opened new opportunities for microbiome analysis without the need for cultivation. This technology allows for precise identification of microbiota composition and its interaction with the host organ-

ism. At the same time, proper sample collection remains crucial to ensure the reliability of analysis results [13].

There are various sample collection methods, each with its advantages and disadvantages, which can influence the accuracy of microbiome composition representation (**table 1**).

Fecal sampling is the most common method for studying the intestinal microbiome due to its non-invasiveness, ease of implementation, availability, and the possibility of collecting material at home. This approach allows obtaining information about the composition of the microbiota and its metabolic activity without the need to intervene in the body's tissues. The main focus of this work is on methods for analyzing fecal samples as a key tool for studying the microbiome.

#### *Storage and transportation conditions*

To ensure accurate gut microbiome analysis, it is vital to maintain appropriate conditions for sample storage and transportation to minimize the risk of microbial DNA degradation and microbiota composition changes. Fecal samples should be immediately stabilized using specialized solutions (e.g., RNALater®, Omnigene-Gut®, Tris-EDTA) or frozen at -20°C to -80°C. Stabilization solutions preserve the microbial profile even during non-frozen transport [19, 20].

Freezing is the most effective method for long-term storage but requires specialized equipment, such as dry ice or thermal containers, to maintain low temperatures during transport. If samples are kept at room temperature, they should be delivered to the laboratory within four hours to avoid external factors, such as ambient temperature, affecting microorganism degradation [20, 21].

For short-term storage (up to 48 hours), samples can be kept at 4°C, but this significantly increases the risk of losing specific bacterial taxa, particularly anaerobes. Prolonged storage without stabilization or freezing can lead to substantial changes in microbiota composition, compromising analysis results. Therefore, using standardized protocols and appropriate transport equipment is critical to ensuring data reliability [20].

#### *Methods of analysis.*

Various methods based on modern molecular biological technologies are used to study the composition of the intestinal microbiome. Each of them has its own advantages, limitations, and areas of application [22-25].

**Polymerase chain reaction.** PCR (polymerase chain reaction) is a highly sensitive method that allows the detection of DNA or RNA of microorganisms in biological samples, such as feces. This method is used for the diagnosis of intestinal infections, dysbiotic conditions and other pathologies due to its high specificity and sensitivity, which allows us to detect even a small amount of genetic material. DNA from samples is isolated using specialized kits (QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) – for isolating DNA from fecal samples, PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) – effective for samples with a high content of inhibitors). PCR performs amplification of target DNA fragments, which allows us to detect and identify specific microorganisms. Specific primers that interact with certain DNA regions are used for amplification. Amplification is performed using thermal profiling on PCR equipment, which increases the number of target DNA fragments to a level suitable for detection. After amplification, the product is detected by meth-

ods such as fluorescence analysis, which determines the presence of DNA in the sample. During PCR, various key materials are used that ensure the efficiency and specificity of this method. These include specific DNA primers that ensure the selectivity of amplification of target DNA regions, as well as thermostable DNA polymerases, such as Taq polymerase, which play a major role in DNA synthesis. Also important are MgCl<sub>2</sub> (magnesium chloride), which acts as a cofactor to maintain DNA polymerase activity, and dNTPs (deoxynucleotides), which are the building blocks of DNA and are necessary for the amplification process. In addition, thermal PCR incubators or specialized PCR devices are used that perform thermal profiling and provide the necessary temperature cycles for successful amplification [9, 26, 27].

**16S rRNA sequencing.** One of the most common methods for studying the microbiome is based on the analysis of the 16S rRNA gene. This gene is part of the ribosomal RNA of bacteria and has unique hypervariable regions (e.g., V3-V5) that contain enough information for taxonomic identification of bacteria [9, 28].

For amplification, universal primers are used that bind to conserved regions of the gene, surrounding the hypervariable zones that are unique to different taxa and allow identification of bacteria. After amplification, the sample is analyzed using next-generation sequencing platforms. The resulting sequences allow the identification of operational taxonomic units (OTUs), which characterize bacterial taxa with more than 97% sequence identity. Sequencing data is cleaned using error correction algorithms such as Deblur or DADA2, which are integrated into the QIIME2 software. Reference genomes or de novo approaches can be used to cluster sequences to identify new species [9, 29].

**Table 1 – Advantages and disadvantages of sample collection methods for microbiome analysis**

	Method	Advantages	Disadvantages	Source
1	Fecal analysis	Convenient, non-invasive, sufficient material for analysis, relatively low-cost	Uneven bacterial distribution during homogenization	[14]
2	Endoscopic biopsy	Controlled collection, precise description	Invasive, risk of bleeding and infection	[15]
3	Luminal microbiota aspiration	Controlled sampling, accurate representation of luminal microbiota	Time-intensive preparation, invasive, patient discomfort, risk of infection	[16]
4	Brush sampling method	Controlled sampling, accurate description of luminal microbiota	Invasive, risk of infection	[16]
5	Laser capture microdissection	Controlled sampling, precise microbe-host interaction analysis	Costly, time-intensive preparation, invasive, risk of infection, limited material	[17]
6	Smart capsule	Easy for the patient, no preparation required, no infection risk, precise data	Expensive, complex implementation	[18]
7	FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)	Accurate spatial organization of microbiota and host-microbe interaction analysis	Requires specific probes tailored to individual microorganisms, high-tech equipment like fluorescent microscopes	[17]

In Ukraine, 16S rRNA sequencing is performed to study the gut microbiome using next-generation sequencing (NGS) and GA-map analysis.

**Shotgun metagenomics** (shotgun metagenomic sequencing) involves the random sequencing of DNA fragments followed by their realignment to perform taxonomic and functional analyses of the entire genome of the microbiota, including viruses, bacteria, archaea, and eukaryotes. In contrast to 16S rRNA sequencing, which focuses on ribosomal RNA fragments, this method provides complete information on genetic material, including phages, plasmids, extrachromosomal elements, as well as host DNA, chloroplasts, and mitochondria [30-32].

Metagenomic sequencing involves several steps, each of which requires specialized materials and software. First, DNA is isolated from the sample using kits such as the QIAamp DNA Stool Mini Kit or the Power-

**Table 2 – Comparison of methods for analyzing the gut microbiome**

	Method	Advantages	Disadvantages	Source
1.	PCR	Provides high specificity, speed, sensitivity and the possibility of early diagnosis. This method allows the detection of even minimal amounts of DNA, which is critical for the early diagnosis of intestinal infections, dysbiosis and other conditions	Possible false results due to contamination, improper sample collection, or errors in the technical process. Does not provide functional information about the microbiome and metabolism.	[9, 26, 27]
2.	16S rRNA sequencing	Versatility, as 16S rRNA is present in all bacteria. Relatively low cost Wide range of applications (study of microbiome structure and function in different samples).	The use of PCR may lead to over- or under-estimation of certain taxa. The number of copies of the 16S rRNA gene may vary between taxa, which affects the accuracy of quantitative analysis.	[9, 29]
3.	Metagenomic sequencing	Covers all genetic components of the microbiome, including rare and uncharacterized microorganisms. Determines the metabolic potential of the microbiota, enzyme activity and interactions between microorganisms. Able to identify strains and species.	Requires a significant amount of sequencing to achieve the required depth of analysis, which increases costs. Analyzing large amounts of data requires powerful computing resources and specialized bioinformatics knowledge. May reduce accuracy for samples with low levels of microorganisms	[31,32,34,35]

Soil DNA Isolation Kit, which provide efficient extraction even from fecal samples containing inhibitors. After DNA is isolated, it is fragmented and libraries are prepared for sequencing using platforms such as the Illumina NovaSeq 6000, which provides high-fidelity sequencing of short fragments, or the Oxford Nanopore MinION, which is suitable for long sequences. Nextera DNA Flex (Illumina) or Rapid Sequencing Kit (Oxford Nanopore) are often used to create libraries. The resulting data are processed using software focused on different aspects of the analysis. For taxonomic classification, tools such as Kraken2 or Kaiju, which work with the RefSeq, SILVA or NCBI GenBank databases, are used. For de novo sequence assembly, SPAdes, MetaVelvet or MEGAHIT are used, which provide efficient analysis of large volumes of metagenomic data. Additional functional annotation can be performed using Prokka or EggNOG-mapper, which allow the detection of protein clusters and functional characteristics of genes. This approach provides a comprehensive study of the composition and functions of the microbiome, allowing the study of both known and unknown taxa and obtaining a deep functional profile of microbial communities [31-35].

In Ukraine, metagenomic sequencing is available in laboratories that use next-generation sequencing (NGS) methods.

The advantages and disadvantages of each method are listed in **table 2**.

### Conclusions.

The analysis of modern and widely used methods for studying the composition of the human gut microbiome has demonstrated that each approach has its unique advantages and limitations. Polymerase chain reaction (PCR) shows high sensitivity and specificity for detecting individual microorganisms but is limited by its selective analysis and inability to assess the overall structure of the microbiome. 16S rRNA gene sequencing is a standard in many studies, providing reliable taxonomic anal-

ysis of the microbiota. However, it has limitations in determining functional potential and accurately differentiating closely related taxa.

Metagenomic sequencing offers the deepest level of analysis, allowing for the identification of complete genomes of microorganisms, including archaea, viruses, and eukaryotes, as well as the evaluation of the microbiome's functional potential. However, this method requires significant financial resources, high computational power, and meticulous sample preparation.

The critical importance of proper sample collection, storage, and transportation, particularly of fecal samples, which are the primary source for non-invasive microbiome analysis, has been emphasized. Inappropriate storage conditions can lead to the loss of sensitive taxa and distort analysis results.

The use of integrated approaches combining various analytical methods enables a more comprehensive understanding of the structure and functions of the gut microbiome. This contributes to uncovering the connections between the microbiota and adaptation to physical activity, opening up prospects for the individualization of training programs and the prevention of diseases associated with dysbiosis. Further research in this area has the potential to significantly expand our knowledge of the microbiome's role in maintaining human health and performance, as well as its influence on physiological and biochemical processes.

### Prospects for further research.

Future studies will focus on gaining a deeper understanding of the microbiome's connections with various aspects of human health, introducing new technologies, and developing practical applications in sports medicine and dietetics. This will not only facilitate the diagnosis and treatment of diseases but also enable the creation of conditions for individual adjustments in the training process and preparation for competitions, taking into account the unique microbiome composition of athletes.

DOI 10.29254/2077-4214-2025-1-176-373-381

УДК 612.015.3:612.336.3:796.01

Палладіна О. Л., Каліга А. М.

## ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ СУЧАСНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ МІКРОБІОМУ КИШКІВНИКА ЛЮДИНИ

Національний університет фізичного виховання і спорту України (м. Київ, Україна)

[anastasiya.kaliga@gmail.com](mailto:anastasiya.kaliga@gmail.com)

*Мікробіом кишківника людини є складною системою, що включає трильйони мікроорганізмів – бактерій, архей, грибів і вірусів, які впливають на метаболізм та відіграють ключову роль у процесах травлення, синтезі вітамінів, регуляції імунної відповіді. Вплив мікробіому на здоров'я людини набув особливого значення в умовах сучасної медицини, зокрема у спортивній фізіології. Він може визначати адаптацію до фізичних навантажень, відновлення після тренувань і впливає на загальний фізичний стан спортсменів.*

*Дана робота присвячена порівняльному аналізу найпоширеніших методів дослідження мікробіому кишківника людини, їх технічним особливостям і перспективам використання у спортивній медицині. Дослідження мікробіому кишківника є викликом через його структурну складність його складу мінливості під впливом багатьох внутрішніх і зовнішніх факторів, таких як харчування, фізична активність, екологічні умови та застосування медичних препаратів. У даному дослідженні проаналізовано сучасні й найпоширеніші методи вивчення мікробіому кишківника, зокрема полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), секвенування гена 16S рРНК, та метагеномне секвенування. Представлено порівняльну характеристику цих підходів, включаючи їхні технологічні особливості, чутливість, специфічність, а також обмеження щодо таксономічної та функціональної інтерпретації даних. Розглянуто важливість належних умов збору, зберігання та транспортування зразків для забезпечення достовірності результатів із акцентом на аналізі фекальних зразків як основного неінвазивного підходу до вивчення мікробіому кишківника.*

*Отримані результати сприятимуть глибшому розумінню механізмів впливу мікробіоти на фізичний стан спортсменів і створенню наукових основ для індивідуалізації тренувальних програм.*

**Ключові слова:** метагеноміка, біоінформатика, секвенування нового покоління, мікробіота, генетичне тестування, секвенування 16S rPHK.

### **Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.**

Робота є фрагментом НДР Національного університету фізичного виховання і спорту України «Вплив екзогенних та ендогенних факторів на перебіг адаптаційних реакцій організму до фізичних навантажень різної інтенсивності» (державний реєстраційний номер 012U108187).

#### **Вступ.**

Мікробіом кишківника людини є одним з пріоритетних векторів у сучасних дослідженнях, особливо у сфері спортивної медицини. Мікробний склад кишківника є надзвичайно складним та чисельним та відрізняється величезним різноманіттям. Він нараховує понад 40 трильйонів клітин та понад три мільйони генів. Мікробіота кишківника людини має великий метаболічний потенціал та містить не лише тисячі таксонів різноманітних бактерій, але і гриби, віруси, археї [1-4].

Достеменно відомо, що мікробіота людини бере активну участь у виробництві нутрієнтів, імунній відповіді та метаболічних процесах. Біосинтез вітамінів, амінокислот та ліпідів також певним чином залежить від мікробного складу кишківника. Окрім того, мікробні метаболіти, а саме, коротколанцюгові жирні кислоти можуть виступати як енергетичні субстрати, що особливо важливо у видах спорту на витривалість, де відсутність обмеження доступності енергії є критичним у досягненні результату [5-7].

Незважаючи на значний прогрес у вивченні мікробіому кишківника людини та численні публікації у цій галузі, вибір оптимальних методик дослідження мікробіому залишається складним завданням. Це пов'язано з необхідністю правильного збору матеріалу, зберігання та транспортування зразків, а також врахування впливу багатьох зовнішніх і внутрішніх факторів, які можуть впливати на точність вимірювань. Крім цього, існують труднощі в підборі програмного забезпечення для точного аналізу та інтерпретації даних. У цьому дослідженні ми розглянемо низку методик дослідження мікробіому, їхні переваги та обмеження з метою визначення найбільш ефективних підходів до аналізу.

#### **Мета дослідження.**

Проаналізувати сучасні методи дослідження мікробіому кишківника людини, їхні технологічні особливості, переваги та обмеження, з метою визначення найефективніших підходів для практичного застосування у спортивній медицині, наукових дослідженнях та діагностиці захворювань, пов'язаних із дисбалансом мікробіоти.

#### **Основна частина.**

##### **Методи збору зразків**

Зважаючи на численні взаємозв'язки між кишковою мікробіотою та здоров'ям людини, надзвичайно важливим є аналіз змін у складі мікробіоти та їхній вплив на виникнення, перебіг і прогноз різноманітних захворювань [8-11]. Традиційно вивчення кишкового мікробіому базувалося на методах ізоляції та

культивування мікроорганізмів. Проте значна кількість анаеробних бактерій, які складають основну частину кишкової мікробіоти, погано піддається культивуванню, що обмежує точність таких підходів [12].

Розвиток технологій, як приклад, секвенування нового покоління (NGS) відкрив нові можливості для аналізу мікробіому без необхідності культивування. Ця технологія дозволяє точно ідентифікувати склад мікробіоти та вивчати її взаємодію з організмом. Водночас критично важливим залишається правильний відбір зразків для забезпечення достовірності аналізу [13].

Існують різноманітні методи збору зразків, кожен з яких має свої переваги та недоліки та може впливати на точність відображення складу мікробіому (табл. 1).

Аналіз фекальних зразків є найбільш поширеним методом дослідження мікробіому кишківника завдяки своїй неінвазивності, простоті виконання, доступності, а також можливості збору матеріалу в домашніх умовах. Цей підхід дозволяє отримати інформацію про склад мікробіоти та її метаболічну активність без необхідності втручання у тканини організму. У даній роботі основна увага зосереджена на методах аналізу фекальних зразків як ключового інструменту для дослідження мікробіому.

##### **Умови зберігання та транспортування.**

Для точного дослідження мікробіому кишківника та транспортування зразків, щоб мінімізувати ризик деградації мікробної ДНК та зміни складу мікробіоти. Після збору фекальні зразки мають бути стабілізовані негайно або з використанням спеціальних стабілізуючих розчинів (RNALater®, Omnigene-Gut®, Tris-EDTA тощо) або шляхом заморожування при температурі від -20°C до -80°C. Використання стабілізуючих розчинів забезпечує збереження мікробного профілю до аналізу, навіть у разі транспортування без заморожування [19, 20].

Заморожування є найефективнішим методом для тривалого зберігання зразків, однак воно потребує спеціального обладнання для транспортування, такого як сухий лід чи термоконтейнери, які підтримують стабільну низьку температуру. Якщо зразки зберігаються за кімнатної температури, їх потрібно доставити до лабораторії якомога швидше, бажано протягом 4 годин, щоб уникнути впливу зовнішніх факторів, таких як температура навколишнього середовища, які можуть спричинити деградацію мікроорганізмів [20, 21].

Для короткотермінового зберігання (до 48 годин) допускається підтримання зразків при температурі 4°C, але така умова значно збільшує ризик втрати певних таксонів бактерій, особливо анаеробних. Тривале зберігання зразків без стабілізації або замороження може призводити до значних змін у складі мікробіоти, що негативно впливає на результати аналізу. Таким чином, використання стандартних протоколів та належного транспортувального обладнання

Таблиця 1 – Переваги та недоліки методів збору зразків для аналізу мікробіому

	Метод	Переваги	Недоліки	Джерело
1	Аналіз калу	Зручний, неінвазивний, надає достатньо матеріалу для дослідження, порівняно недорогий	Нерівномірний розподіл бактерій при гомогенізації зразка	[14]
2	Ендоскопічна біопсія	Можливість контрольованого збору, точний опис	Інвазивний метод. Ризик кровотечі та інфекції	[15]
3	Аспірація просвітної мікробіоти	Можливість контрольованого збору зразка, точність відображення просвітної мікробіоти	Необхідний час для підготовки, інвазивний метод, дискомфорт пацієнта, ризик інфекції	[16]
4	Метод збору за допомогою пензля	Можливість контрольованого збору, точний опис просвітної мікробіоти	Інвазивний метод, ризик інфекції	[16]
5	Метод дослідження за допомогою лазера. Laser capture microdissection	Можливість контрольованого збору, точний опис зв'язку "мікроорганізм-хазяїн"	Дороговартісний метод, необхідний час для підготовки, інвазивний метод, ризик інфекції, недостатньо матеріалу	[17]
6	Смарт-капсула	Легкий для пацієнта, не вимагає підготовки, відсутні ризики зараження, точні показники просвітної мікробіоти	Дороговартісний метод, складний у реалізації	[18]
7	Метод FISH	Точне відображення просторової організації мікробіоти та взаємодії "хазяїн-мікроорганізм"	Потреба у специфічних зондах, які необхідно розробляти індивідуально для кожного виду мікроорганізмів. Необхідність високоякісного обладнання, наприклад, флуоресцентних мікроскопів.	[17]

є ключовими факторами для забезпечення достовірності даних [20].

*Методи аналізу.*

Для дослідження складу мікробіому кишківника використовуються різноманітні методи, що базуються на сучасних молекулярно-біологічних технологіях. Кожен із них має свої переваги, обмеження та сфери застосування [22-25].

**Полімеразна ланцюгова реакція.** ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) – високочутливий метод, що дозволяє виявляти ДНК або РНК мікроорганізмів у біологічних зразках, таких як кал. Цей метод застосовують для діагностики кишкових інфекцій, дисбіотичних станів та інших патологій завдяки своїй високій специфічності та чутливості, що дозволяє виявляти навіть незначний вміст генетичного матеріалу. ДНК із зразків виділяється за допомогою спеціалізованих наборів (QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) – для виділення ДНК із фекальних зразків, PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) – ефективний для зразків із високим вмістом інгібіторів). ПЛР здійснює ампліфікацію цільових фрагментів ДНК, що дозволяє виявити та визначити конкретні мікроорганізми. Для ампліфікації використовуються специфічні праймери, що взаємодіють з певними ділянками ДНК. Ампліфікація проводиться за допомогою термопрофілювання на ПЛР-обладнанні, що дозволяє збільшити кількість

цільових фрагментів ДНК до рівня, придатного для виявлення. Після ампліфікації проводять детекцію продукту через такі методи, як флуоресцентний аналіз, що дозволяє визначити наявність ДНК у зразку. Під час ПЛР використовуються різноманітні ключові матеріали, які забезпечують ефективність та специфічність цього методу. До них належать специфічні ДНК-праймери, що забезпечують селективність ампліфікації цільових ділянок ДНК, а також термостабільні ДНК-полімерази, такі як Taq-полімераза, які відіграють основну роль у синтезі ДНК. Важливим є також MgCl<sub>2</sub> (магній хлорид), що виступає кофактором для підтримки активності ДНК-полімерази, та dNTP (дезоксинуклеотиди), які є будівельними блоками ДНК і необхідні для процесу ампліфікації. Крім цього, використовуються термальні ПЛР-інкубатори або спеціалізовані ПЛР-пристрої, що здійснюють термопрофілювання та забезпечують необхідні температурні цикли для успішної ампліфікації [9, 26, 27].

**16S rPHK секвенування.** Є одним із найпоширеніших методів дослідження мікробіому, що базується на аналізі гена 16S rPHK. Цей ген є частиною рибосомної РНК бактерій і має унікальні гіперваріабельні ділянки (наприклад, V3-V5), які містять достатньо інформації для таксономічної ідентифікації бактерій [9, 28].

Для ампліфікації використовуються універсальні праймери, які зв'язуються з консервативними ділянками гена, оточуючи гіперваріабельні зони, що є унікальними для різних таксонів і дозволяють ідентифікувати бактерії. Після ампліфікації зразок аналізується за допомогою платформ секвенування нового покоління. Отримані послідовності дозволяють визначити операційні таксономічні одиниці (OTUs), що характеризують бактеріальні таксони з більш ніж 97% ідентичністю послідовностей. Дані секвенування очищуються за допомогою алгоритмів корекції помилок, таких як Deblur або DADA2, які інтегровані в програмне забезпечення QIIME2. Для кластеризації послідовностей можуть використовуватися довідкові геноми або de novo підходи для виявлення нових видів [9, 29].

В Україні 16S rPHK секвенування виконується для дослідження мікробіому кишківника методом секвенування нового покоління NGS та GA-мар аналізу.

**Метагеномне секвенування** (shotgun metagenomics) передбачає випадкове секвенування фрагментів розщепленої ДНК із подальшою їхньою реалігнацією для проведення таксономічного та функціонального аналізу всього геному мікробіоти, включаючи віруси, бактерії, археї та еукаріоти. На відміну від 16S rPHK-секвенування, яке зосереджується на фрагментах рибосомної РНК, цей метод забезпечує повну інформацію про генетичний матеріал, включаючи фаги, плазміди, екстрахромосомні еле-

**Таблиця 2 – Порівняння методів аналізу мікробіому кишківника**

№	Назва	Переваги	Недоліки	Джерело
1.	ПЛР	Забезпечує високу специфічність, швидкість, чутливість та можливість ранньої діагностики. Цей метод дозволяє виявляти навіть мінімальні кількості ДНК, що є критичним для ранньої діагностики кишкових інфекцій, дисбіозу та інших станів	Можливі помилкові результати через забруднення, некоректний збір зразків або помилки в технічному процесі. Не надає функціональної інформації про мікробіом та метаболізм.	[9, 26, 27]
2.	16S rPHK секвенування	Універсальність, так як 16S rPHK є присутнім у всіх бактеріях. Відносно низька вартість Широкий діапазон застосування (вивчення структури та функцій мікробіому у різних зразках).	Використання ПЛР може призводити до переоцінки або недооцінки певних таксонів. Кількість копій гена 16S rPHK може різнитися між таксонами, що впливає на точність кількісного аналізу.	[9, 29]
3.	Метагеномне секвенування	Охоплює всі генетичні компоненти мікробіому, включаючи рідкісні та нехарактеризовані мікроорганізми. Визначає метаболічний потенціал мікробіоти, ферментну активність та взаємодії між мікроорганізмами. Можливість ідентифікації штамів і видів.	Вимагає значного обсягу секвенування для досягнення необхідної глибини аналізу, що збільшує витрати. Аналіз великих обсягів даних потребує потужних обчислювальних ресурсів і спеціалізованих знань у біоінформатиці. Можливе зниження точності для зразків із низьким вмістом мікроорганізмів	[31,32,34,35]

менти, а також ДНК хазяїна, хлоропластів і мітохондрій [30-32].

Метагеномне секвенування включає кілька етапів, кожен із яких потребує спеціалізованих матеріалів та програмного забезпечення. Спершу ДНК виділяється зі зразка за допомогою наборів, таких як QIAamp DNA Stool Mini Kit або PowerSoil DNA Isolation Kit, які забезпечують ефективну екстракцію навіть із фекальних зразків, що містять інгібітори. Після виділення ДНК її фрагментують і підготовляють бібліотеки для секвенування за допомогою платформ, таких як Illumina NovaSeq 6000, що забезпечує високоточне секвенування коротких фрагментів, або Oxford Nanopore MinION, який підходить для довгих послідовностей. Для створення бібліотек часто використовують Nextera DNA Flex (Illumina) чи Rapid Sequencing Kit (Oxford Nanopore). Отримані дані обробляються за допомогою програмного забезпечення, орієнтованого на різні аспекти аналізу. Для таксономічного класифікування використовують інструменти, такі як Kraken2 або Kaiju, що працюють із базами даних RefSeq, SILVA або NCBI GenBank. Для складання послідовностей методом *de novo* застосовують SPAdes, MetaVelvet або MEGAHIT, які забезпечують ефективний аналіз великих обсягів метагеномних даних. Додаткову функціональну анотацію можна виконати за допомогою Prokka або EggNOG-mapper, що дозволяють виявляти білкові кластери та функціональні характеристики генів. Цей підхід забезпечує комплексне дослідження складу та функцій мікробіому, дозволяючи вивчати як відомі, так і невідомі таксони, та отримувати глибокий функціональний профіль мікробіотних спільнот [31-35].

В Україні метагеномне секвенування доступне в лабораторіях, що застосовують методи секвенування нового покоління NGS.

Переваги та недоліки кожного методу наведено у таблиці 2.

### **Висновки.**

Аналіз сучасних і найпоширеніших методів дослідження складу мікробіому кишківника людини показав, що кожен із підходів має свої унікальні переваги й обмеження. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) демонструє високу чутливість і специфічність для визначення окремих мікроорганізмів, проте об-

межується вибірковістю аналізу й не дозволяє оцінити загальну структуру мікробіому. Секвенування гена 16S rPHK є стандартом у багатьох дослідженнях, що забезпечує надійний таксономічний аналіз мікробіоти, але має обмеження у визначенні функціонального потенціалу та точному розмежуванні близьких таксонів.

Метагеномне секвенування забезпечує найглибший рівень аналізу, дозволяючи ідентифікувати повні геноми мікроорганізмів, включаючи археї, віруси й еукаріоти, а також оцінювати функціональний потенціал мікробіому. Проте цей метод потребує значних фінансових ресурсів, високої обчислювальної потужності та ретельної підготовки зразків.

Розглянуто критичне значення належного збору, зберігання й транспортування зразків, особливо фекальних, які є основним джерелом для неінвазивного аналізу мікробіому. Невідповідність умов зберігання може призвести до втрати чутливих таксонів і викривлення результатів аналізу.

Застосування інтегрованих підходів із використанням різних методів аналізу дозволяє досягти більш комплексного розуміння структури й функцій мікробіому кишківника. Це сприяє розкриттю зв'язків між мікробіотою та адаптацією до фізичних навантажень, що відкриває перспективи для індивідуалізації тренувальних програм і профілактики захворювань, асоційованих із дисбіозом. Подальші дослідження в цьому напрямку здатні значно розширити наші знання про роль мікробіому в підтримці здоров'я людини і її працездатності, а також його вплив на фізіологічні та біохімічні процеси.

### **Перспективи подальших досліджень.**

Подальші дослідження будуть спрямовані на більш глибоке розуміння зв'язків мікробіому з різними аспектами здоров'я людини, впровадження нових технологій і розробку практичних застосувань у спортивній медицині та дієтології. Це дозволить не лише діагностувати й лікувати захворювання, а й створювати умови для індивідуальних змін у тренувальному процесі та підготовки до змагань, зважаючи на індивідуальний склад мікробіому атлетів.

## References / Література

- Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):135. DOI: [10.1038/s41392-022-00974-4](https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4).
- Bradley E, Haran J. The human gut microbiome and aging. *Gut Microbes*. 2024;16(1):2359677. DOI: [10.1080/19490976.2024.2359677](https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2359677).
- Fontana F, Longhi G, Tarracchini C, Mancabelli L, Lugli GA, Alessandri G, et al. The human gut microbiome of athletes: metagenomic and metabolic insights. *Microbiome*. 2023;11(1):27. DOI: [10.1186/s40168-023-01470-9](https://doi.org/10.1186/s40168-023-01470-9).
- Hughes RL, Holscher HD. Fueling Gut Microbes: A Review of the Interaction between Diet, Exercise, and the Gut Microbiota in Athletes. *Adv Nutr*. 2021;12(6):2190-2215. DOI: [10.1093/advances/nmab077](https://doi.org/10.1093/advances/nmab077).
- Fan L, Xia Y, Wang Y, Han D, Liu Y, Li J, et al. Gut microbiota bridges dietary nutrients and host immunity. *Sci China Life Sci*. 2023;66(11):2466-2514. DOI: [10.1007/s11427-023-2346-1](https://doi.org/10.1007/s11427-023-2346-1).
- Sangermani M, Desiati I, Jørgensen SM, Li JV, Andreassen T, Bathen TF, et al. Stability in fecal metabolites amid a diverse gut microbiome composition: a one-month longitudinal study of variability in healthy individuals. *Gut Microbes*. 2024;16(1):2427878. DOI: [10.1080/19490976.2024.2427878](https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2427878).
- Portincasa P, Bonfrate L, Vacca M, De Angelis M, Farella I, Lanza E, et al. Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1105. DOI: [10.3390/ijms23031105](https://doi.org/10.3390/ijms23031105).
- Zhang X, Li L, Butcher J, Stintzi A, Figeys D. Advancing functional and translational microbiome research using meta-omics approaches. *Microbiome*. 2019;7(1):154. DOI: [10.1186/s40168-019-0767-6](https://doi.org/10.1186/s40168-019-0767-6).
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Division on Earth and Life Studies, Board on Life Sciences, Board on Environmental Studies and Toxicology, Committee on Advancing Understanding of the Implications of Environmental-Chemical Interactions with the Human Microbiome. *Environmental Chemicals, the Human Microbiome, and Health Risk: A Research Strategy*. Washington (DC): National Academies Press; 2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK481559/>.
- O'Brien MT, O'Sullivan O, Claesson MJ, Cotter PD. The Athlete Gut Microbiome and its Relevance to Health and Performance: A Review. *Sports Med*. 2022;52(1):119-128. DOI: [10.1007/s40279-022-01785-x](https://doi.org/10.1007/s40279-022-01785-x).
- Al Bander Z, Nifert MD, Mousa A, Naderpoor N. The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(20):7618. DOI: [10.3390/ijerph17207618](https://doi.org/10.3390/ijerph17207618).
- Wan X, Yang Q, Wang X, Bai Y, Liu Z. Isolation and Cultivation of Human Gut Microorganisms: A Review. *Microorganisms*. 2023;11(4):1080. DOI: [10.3390/microorganisms11041080](https://doi.org/10.3390/microorganisms11041080).
- Wensel CR, Pluznick JL, Salzberg SL, Sears CL. Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *J Clin Invest*. 2022;132(7):e154944. DOI: [10.1172/JCI154944](https://doi.org/10.1172/JCI154944).
- Kim D, Jung JY, Oh HS, Jee SR, Park SJ, Lee SH, et al. Comparison of sampling methods in assessing the microbiome from patients with ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol*. 2021;21(1):396. DOI: [10.1186/s12876-021-01975-3](https://doi.org/10.1186/s12876-021-01975-3).
- Miyauchi E, Taida T, Kawasumi M, Ohkusa T, Sato N, Ohno H. Analysis of colonic mucosa-associated microbiota using endoscopically collected lavage. *Sci Rep*. 2022;12(1):1758. DOI: [10.1038/s41598-022-05936-y](https://doi.org/10.1038/s41598-022-05936-y).
- Marquez-Ortiz RA, Leon M, Abril D, Escobar-Perez J, Florez-Sarmiento C, Parra-Izquierdo V, et al. Colonoscopy aspiration lavages for mucosal metataxonomic profiling of spondylarthritis-associated gastrointestinal tract alterations. *Sci Rep*. 2023;13(1):7015. DOI: [10.1038/s41598-023-33597-y](https://doi.org/10.1038/s41598-023-33597-y).
- Tang Q, Jin G, Wang G, Liu T, Liu X, Wang B, et al. Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 9;10:151. DOI: [10.3389/fcimb.2020.00151](https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00151).
- Nejati S, Wang J, Sedaghat S, Balog NK, Long AM, Rivera UH, et al. Smart capsule for targeted proximal colon microbiome sampling. *Acta Biomater*. 2022;154:83-96. DOI: [10.1016/j.actbio.2022.09.050](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.09.050).
- Wu WK, Chen CC, Panyod S, Chen RA, Wu MS, Sheen LY, et al. Optimization of fecal sample processing for microbiome study – The journey from bathroom to bench. *J Formos Med Assoc*. 2019;118(2):545-555. DOI: [10.1016/j.jfma.2018.02.005](https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.02.005).
- Choo JM, Leong LE, Rogers GB. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Sci Rep*. 2015;5:16350. DOI: [10.1038/srep16350](https://doi.org/10.1038/srep16350).
- Dore J, Ehrlich SD, Levenez F, Pelletier E, Alberti A, Bertrand L, et al. IHMS SOP 02 V1: Standard operating procedure for fecal samples self-collection, laboratory analysis handled within 4 hours (x≤4 hours). Paris: IHMS Consortium; 2015. 13 p. Available from: <http://www.microbiomestandards.org>.
- Kim D, Hofstaedter CE, Zhao C, Mattei L, Tanes C, Clarke E, et al. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome*. 2017;5(1):52. DOI: [10.1186/s40168-017-0267-5](https://doi.org/10.1186/s40168-017-0267-5).
- Kumar A, Gravalal K, Segal JP, Steed H, Brookes MJ, Al-Hassi HO. Variability in the Pre-Analytical Stages Influences Microbiome Laboratory Analyses. *Genes (Basel)*. 2022;13(6):1069. DOI: [10.3390/genes13061069](https://doi.org/10.3390/genes13061069).
- Galloway-Peña J, Hanson B. Tools for Analysis of the Microbiome. *Dig Dis Sci*. 2020;65(3):674-685. DOI: [10.1007/s10620-020-06091-y](https://doi.org/10.1007/s10620-020-06091-y).
- Allaband C, McDonald D, Vázquez-Baeza Y, Minich JJ, Tripathi A, Brenner DA, et al. Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(2):218-230. DOI: [10.1016/j.cgh.2018.09.017](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.017).
- Jeong J, Mun S, Oh Y, Cho CS, Yun K, Ahn Y, et al. A qRT-PCR Method Capable of Quantifying Specific Microorganisms Compared to NGS-Based Metagenome Profiling Data. *Microorganisms*. 2022;10(2):324. DOI: [10.3390/microorganisms10020324](https://doi.org/10.3390/microorganisms10020324).
- Hughes RL, Frankensfeld CL, Gohl DM, Huttenhower C, Jackson SA, Vandeputte D, et al. Methods in Nutrition & Gut Microbiome Research: An American Society for Nutrition Satellite Session. *Nutrients*. 2023;15(11):2451. DOI: [10.3390/nu15112451](https://doi.org/10.3390/nu15112451).
- Nearing JT, Douglas GM, Hayes MG, MacDonald J, Desai DK, Allward N, et al. Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nat Commun*. 2022;13(1):342. DOI: [10.1038/s41467-022-28034-z](https://doi.org/10.1038/s41467-022-28034-z).
- Gotschlich EC, Colbert RA, Gill T. Methods in microbiome research: Past, present, and future. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2019;33(6):101498. DOI: [10.1016/j.berh.2020.101498](https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101498).
- Ji B, Nielsen J. From next-generation sequencing to systematic modeling of the gut microbiome. *Front Genet*. 2015;6:219. DOI: [10.3389/fgene.2015.00219](https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00219).
- Fricker AM, Podlesny D, Fricke WF. What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *J Adv Res*. 2019;19:105-112. DOI: [10.1016/j.jare.2019](https://doi.org/10.1016/j.jare.2019).
- Panek M, Čipčić Paljetak H, Barešić A, Perić M, Matijašić M, Lojkić I, et al. Methodology challenges in studying human gut microbiota – effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Sci Rep*. 2018;8(1):5143. DOI: [10.1038/s41598-018-23296-4](https://doi.org/10.1038/s41598-018-23296-4).
- Casén C, Vebo HC, Sekelja M, Hegge FT, Karlsson MK, Cierniejewska E, et al. Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;42(1):71-83. DOI: [10.1111/apt.13236](https://doi.org/10.1111/apt.13236).
- Lutz KC, Jiang S, Neugent ML, De Nisco NJ, Zhan X, Li Q. A Survey of Statistical Methods for Microbiome Data Analysis. *Front Appl Math Stat*. 2022;8:884810. DOI: [10.3389/fams.2022.884810](https://doi.org/10.3389/fams.2022.884810).
- Walker-Daniels J. Microbiome Research Methodologies. *Mater Methods*. 2020;10:2883. DOI: [10.13070/mm.en.10.2883](https://doi.org/10.13070/mm.en.10.2883).

## ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ СУЧАСНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ МІКРОБІОМУ КИШКІВНИКА ЛЮДИНИ

Палладіна О. Л., Каліга А. М.

**Резюме.** Мікробіом кишківника людини являє собою динамічну мікробну спільноту, яка включає бактерії, археї, гриби та віруси, що взаємодіють як між собою, так і з організмом хазяїна. Ця складна структура виконує важливі ролі, зокрема підтримання бар'єрної функції слизової оболонки кишківника, синтез певних метаболітів, таких як коротколанцюгові жирні кислоти, та регуляція роботи імунної системи. Мікробіом також впливає на метаболізм макро- і мікронутрієнтів, сприяючи їх засвоєнню. В останні роки зростає увага до ролі мікробіому у

забезпеченні адаптації до фізичних навантажень, що особливо важливо для спортсменів. Дисбаланс у складі мікробіоти може спричинити порушення метаболічних процесів, зниження імунітету та виникнення хронічних запальних станів. Таким чином, дослідження мікробіому стає важливим інструментом для вивчення механізмів, які забезпечують оптимальну фізичну працездатність і загальний стан здоров'я людини. У даному дослідженні проведено аналіз сучасних і найпоширеніших методів вивчення мікробіому кишківника, включаючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), секвенування гена 16S рРНК і метагеномне секвенування. Результати показали, що ПЛР забезпечує високу чутливість і специфічність для визначення окремих мікроорганізмів, однак обмежується у здатності характеризувати загальний мікробіом. Секвенування 16S рРНК є ефективним для таксономічного аналізу, проте має обмеження у вивченні функціонального потенціалу мікробіоти. Метагеномне секвенування, завдяки своїй здатності ідентифікувати повні геноми мікроорганізмів і оцінювати їхній функціональний потенціал, визнане найбільш інформативним методом, але водночас потребує значних ресурсів і технічної підготовки.

Встановлено, що умови збору, зберігання та транспортування зразків є критично важливими для достовірності результатів аналізу. Особливу увагу приділено фекальним зразкам, які є основним джерелом для неінвазивного дослідження мікробіому. Дослідження також продемонструвало ефективність інтеграції різних підходів для комплексного вивчення структури й функцій мікробіому. Отримані результати підкреслюють перспективність використання цих методів для розкриття зв'язків між мікробіотою, фізіологічною адаптацією та спортивною продуктивністю, що може бути основою для індивідуалізації тренувальних програм і профілактики захворювань, асоційованих із дисбіозом.

**Ключові слова:** метагеноміка, біоінформатика, секвенування нового покоління, мікробіота, генетичне тестування, секвенування 16S рРНК.

### COMPARATIVE ANALYSIS OF CONTEMPORARY METHODS FOR INVESTIGATING THE COMPOSITION OF THE HUMAN GUT MICROBIOME

Palladina O. L., Kaliga A. M.

**Abstract.** The human gut microbiome represents a dynamic microbial community comprising bacteria, archaea, fungi, and viruses, which interact both with each other and with the host organism. This complex structure plays vital roles, including maintaining the barrier function of the intestinal mucosa, synthesizing specific metabolites such as short-chain fatty acids, and regulating the immune system. The microbiome also influences the metabolism of macro- and micronutrients, facilitating their absorption. In recent years, increased attention has been paid to the role of the microbiome in enabling adaptation to physical exertion, which is particularly significant for athletes. An imbalance in the composition of the microbiota can lead to disruptions in metabolic processes, reduced immunity, and the development of chronic inflammatory conditions. Thus, studying the microbiome becomes a crucial tool for understanding the mechanisms that ensure optimal physical performance and overall human health. This study analyzed contemporary and widely used methods for studying the gut microbiome, including polymerase chain reaction (PCR), 16S rRNA gene sequencing, and metagenomic sequencing. The results demonstrated that PCR provides high sensitivity and specificity for detecting individual microorganisms but is limited in its ability to characterize the overall microbiome structure. 16S rRNA gene sequencing is effective for taxonomic analysis, though it has limitations in exploring the functional potential of the microbiota. Metagenomic sequencing, with its ability to identify complete microbial genomes and evaluate their functional potential, was found to be the most informative method, albeit requiring substantial resources and technical preparation.

It was established that the conditions for sample collection, storage, and transportation are critical for ensuring the reliability of analysis results. Particular attention was given to fecal samples as the primary non-invasive source for microbiome research. The study highlighted the effectiveness of integrating different approaches for comprehensive investigation of the microbiome's structure and functions. The findings underscore the potential of these methods for uncovering the relationships between microbiota, physiological adaptation, and athletic performance, providing a foundation for individualizing training programs and preventing microbiota-related disorders.

**Key words:** metagenomics, bioinformatics, next-generation sequencing, microbiota, genetic testing, 16S rRNA sequencing.

#### ORCID and contribution / ORCID автора та його внесок до статті:

Palladina O. L.: <https://orcid.org/0000-0001-7133-0072><sup>DEF</sup>

Kaliga A. M.: <https://orcid.org/0009-0001-7987-0142><sup>ABCD</sup>

#### Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

#### Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Kaliga Anastasiia Mykhailivna / Каліга Анастасія Михайлівна

National University of Ukraine on Physical Education and Sport / Національний університет фізичного виховання і спорту України

Ukraine, 03150, Kyiv, 1 Fizkultury str. / Адреса: Україна, 03150, м. Київ, вул. Фізкультури 1

Tel.: +380669420769 / Тел.: +380669420769

E-mail: [anastasiya.kaliga@gmail.com](mailto:anastasiya.kaliga@gmail.com)

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті

Received 26.09.2024 / Стаття надійшла 26.09.2024 року

Accepted 14.02.2025 / Стаття прийнята до друку 14.02.2025 року