

Кишечный микробиом и современные методы его исследования у детей

Г.В. Волынец¹, А.В. Никитин^{1,2}, Т.А. Скворцова¹⁻³¹ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева» ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия;²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;³ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница» ДЗМ, Москва, Россия

Intestinal microbiome and modern methods of its study in children

G.V. Volynets¹, A.V. Nikitin^{1,2}, T.A. Skvortsova¹⁻³¹Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics at the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;³Morozov Children's City Clinical Hospital, Moscow, Russia;

Исследования кишечного микробиома в настоящее время вызывают большой интерес у клиницистов. Это связано с тем, что результаты проведенных исследований показывают тесную взаимосвязь кишечного микробиома с развитием различных заболеваний. В статье представлены современные методы отбора проб для исследований, охарактеризованы мультиомические методы исследования (метагеномика, метапротеомика, метатранскриптомика, метаболомика) и возможности их применения в клинической практике с указанием их преимуществ и недостатков. Описаны наиболее распространенные методы исследования (при этом особое внимание уделено изучению кишечного микробиома), в которых можно получить оптимально объективные результаты и точность вычислительного анализа данных. Эти исследования будут способствовать развитию персонализированной медицины, которая будет применяться в самых различных областях — от точной идентификации патогенных штаммов для целенаправленного лечения до тщательного мониторинга дисбаланса микробных сообществ при заболеваниях и до персонализированного и рационального плана манипуляций с микробиомом.

Ключевые слова: дети, кишечная микробиота, микробиом, метагеномика, метатранскриптомика, метапротеомика, метаболомика.

Для цитирования: Волынец Г.В., Никитин А.В., Скворцова Т.А. Кишечный микробиом и современные методы его исследования у детей. Рос вестн перинатол и педиатр 2022; 67:(4): 5–13. DOI: 10.21508/1027-4065-2022-67-4-5-13

Research on the intestinal microbiome is currently of great interest to clinicians. This is due to the fact that studies have shown a close relationship between the intestinal microbiome and the development of various diseases. The article presents modern methods of sampling for research, characterizes multiomic research methods (metagenomics, metaproteomics, metatranscriptomics, metabolomics) and the possibility of their application in clinical practice, indicating their strengths and limitations. The most common research methods with an emphasis on the intestinal microbiome are described, in which it is possible to obtain optimally objective research results and the accuracy of computational data analysis. These studies will contribute to the development of personalized medicine, which will be applied in a wide range of areas — from the accurate identification of pathogenic strains for targeted treatment, to the careful monitoring of microbial community imbalances in diseases, to personalized and rational microbiome manipulation design.

Key words: Children, intestinal microbiota, microbiome, metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics, metabolomics.

For citation: Volynets G.V., Nikitin A.V., Skvortsova T.A. Intestinal microbiome and modern methods of its study in children. Ros Vestn Perinatol i Pediatr 2022; 67:(4): 5–13 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2022-67-4-5-13

Под кишечной микробиотой следует понимать совокупность микроорганизмов, которые живут в кишечнике. Термин «микробиом» кишечника включает полный набор микроорганизмов (бактерии, археи, низшие и высшие эукариоты и вирусы), продуктов их жизнедеятельности, их генов и геномов, находящихся в кишечнике.

Этот термин также используется для обозначения набора геномов всех микроорганизмов в той или иной среде, и его легко спутать с термином «метагеном» который относится к генетическому материалу, присутствующему в образце окружающей среды, состоящему из геномов многих отдельных организмов. Однако термины «микробиом»

© Коллектив авторов, 2022

Адрес для корреспонденции: Волынец Галина Васильевна — д.м.н., гл. науч. сотр., рук. отдела гастроэнтерологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, ORCID: 0000-0002-5413-9599 e-mail: volynets_g@mail.ru

Никитин Артем Вячеславович — к.м.н., вед. науч. сотр. отдела гастроэнтерологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, асс. кафедры гастроэнтерологии факультета дополнительного последилового образования Российского национального исследовательского медицинского университета

им. Н.И. Пирогова, ORCID: 0000-0001-8837-9243

Скворцова Тамара Андреевна — к.м.н., вед. науч. сотр. отдела гастроэнтерологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева, доц. кафедры 2 гастроэнтерологии факультета дополнительного последилового образования Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, зав. отделением гастроэнтерологии Морозовской детской городской клинической больницы, гл. внештатный детский специалист-гастроэнтеролог Департамента здравоохранения Москвы, ORCID: 0000-0002-6525-8665 125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

и «микробиота» часто используются взаимозаменяемо даже в литературе по микробиологии.

Изучение кишечного микробиома и его влияния на здоровье человека быстро развивалось за последние два десятилетия и стало одной из самых популярных областей медицинских исследований. Всего несколько десятилетий назад считалось, что закончилась эра инфекционных заболеваний и знания о разрушительных действиях бактериальных, вирусных и других инфекций представляют лишь исторический интерес, стали не более чем интересными сносками в наших учебниках по микробиологии и медицине, и теперь можно решать новые задачи — нашего внимания требовали рак, нейродегенеративные заболевания, атеросклероз и т.д. Как же мы ошибались! Как фатально мы недооценили хитрость и генетический интеллект потенциальных патогенов. Мы не смогли предвидеть, как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) может парализовать нашу иммунную систему, как международные путешествия и миграция могут подвергнуть мир риску заражения вирусами Эбола (*Ebola virus*), лихорадки Западного Нила (*West Nile virus*), Зика (*Zika virus*) и Чикунгунья (*Chikungunya virus*), а также трипаномоза и как совершенно новая группа коронавирусов (коронавирус, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом, или *SARS-CoV/CoV1*, коронавирус, связанный с ближневосточным респираторным синдромом, или *MERS-CoV*), а теперь и вирус 2-го типа, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом (*SARS-CoV2*), вызывающий нынешнюю коронавирусную болезнь (COVID-19), могут поставить мир на колени. Фундаментальный урок всех упомянутых вспышек заключается в том, что они представляют глобальные проблемы.

Такую же глобальную проблему представляет микробиом, и кишечный микробиом не исключение в этом отношении. В самом деле, количество бактерий, находящихся в кишечнике, примерно в 10 раз превышает количество всех клеток в организме человека и совокупный бактериальный геном значительно больше, чем геном человека.

Технология секвенирования ДНК следующего поколения сделала возможным анализ метагенома кишечника человека, т.е. общего генетического содержания объединенных геномов микробного сообщества, включая бактериальные и небактериальные представители (вирусы, дрожжи и протисты). Было идентифицировано почти 10 млн неповторяющихся микробных генов. Каждый человек несет в желудочно-кишечном тракте в среднем 600 тыс. неповторяющихся микробных генов, и около 300 тыс. генов являются общими в том смысле, что имеются примерно у 50% людей. Каталог микробных генов кодирует группы белков, выполняющих до 40 тыс. биологических функций, связанных с жизнью в кишечной среде обитания. Минимальный функцио-

нальный метагеном, обнаруженный у всех людей, включает 6000 таких функций. Некоторые функции являются общими для свободноживущих бактерий, например основные метаболические пути (такие как синтез аминокислот, РНК- и ДНК-полимеразы, АТФ-синтаза, общий секреторный аппарат). Некоторые другие кластеры генов кодируют функции, которые могут быть особенно важны для жизни микробов в кишечнике, например, участвуя в адгезии к белкам хозяина (коллаген, фибриноген, фибронектин) или сборе сахаров из гликолипидов, секретируемых эпителиальными клетками.

Большинство исследователей утверждают, что микробы, населяющие кишечный тракт младенцев, поступают как во время начального процесса родов (вертикальная передача), так и от других людей и окружающей их среды в раннем младенчестве (горизонтальная передача). Однако совсем недавно с использованием современной технологии секвенирования это когда-то общепринятое представление было оспорено теми, кто предположил, что ни плод, ни плацента, ни амниотическая жидкость нестерильны и фактически служат хозяином того, что называют плацентарным микробиомом. Эта «гипотеза внутриутробной колонизации» утверждает, что плод подвергается воздействию этих микроорганизмов внутриутробно, когда начинается колонизация желудочно-кишечного тракта [1]. Хотя до сих пор нет твердого мнения о пренатальном микробиоме, обе гипотезы подчеркивают важность первых 3 лет жизни в развитии того, что станет зрелым кишечным микробиомом [2]. Факторы, которые наиболее сильно влияют на его состав, включают способ родоразрешения (вагинальное или кесарево сечение), источник питания (грудное молоко или смесь), масса тела матери, пренатальный рацион, место рождения и воздействие антибиотиков. Со временем состав кишечной микробиоты становится более стабильным и многие представители *Bacteroidetes*, в том числе обладающие способностью продуцировать бутират, становятся более стабильными.

Доказано, что исходный микробиом кишечника состоит из бактерий, способных метаболизировать лактозу из грудного или коровьего молока. Когда в рацион вводится твердая пища, микробиом эволюционирует в тот, который может метаболизировать углеводы, белки и жиры и синтезировать витамины. К препубертатному возрасту (от 7 до 12 лет) количество бактериальных таксонов и функциональных генов, присутствующих в микробиоме кишечника, достигает такого уровня, который будет сохраняться на протяжении большей части взрослой жизни. Во взрослом микробиоме преобладают два типа: *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. В более позднем возрасте кишечный микробиом, по-видимому, претерпевает некоторые возрастные изменения, характеризующиеся увеличением условно-патогенных протеобакте-

рий за счет симбионтов *Firmicutes* и *Bacteroidetes* — это типы, которые включают виды с признанными противовоспалительными свойствами.

Истинная степень последствий нарушений кишечной микробиоты, которые сопровождаются изменениями микробиома, и понимание ее ключевой роли во влиянии на состояние здоровья человека стала признаваться только в последнее время. Некоторые из этих последствий относительно очевидны. Например, когда многие компоненты нормальной флоры кишечника устраняются или подавляются курсом терапии антибиотиками широкого спектра действия, устанавливается приоритет для других микроорганизмов, которые могут быть патогенными и вызывать заболевание. Классический пример этого — антибиотикассоциированная диарея и псевдомембранозный энтероколит. Аналогичные нарушения в микрофлоре, как полагают, участвуют в развитии некротического энтероколита у новорожденных и особенно недоношенных детей. В других ситуациях бактерии могут быть там, где их не должно быть. Если нарушена моторика кишечника и/или значительно снижена кислотность желудочного содержимого, создаются благоприятные условия, способствующие распространению микроорганизмов в тонкой кишке, которые обычно ограничены толстой кишкой. Последствие этого — синдром избыточного бактериального роста.

Расширение знаний о кишечном микробиоме может раскрыть аспекты его взаимодействия с хозяином и привести к развитию новых диагностических и терапевтических возможностей. То, как мы поддерживаем или вредим этому важному фактору здоровья человека, будет иметь большое значение для здравоохранения в целом. Перинатальный уход, питание младенцев и детей и схемы использования антибиотиков — это лишь некоторые из факторов, которые фундаментально воздействуют на микробиом кишечника и, таким образом, нарушают гомеостаз в организме и могут влиять на восприимчивость к заболеваниям.

Большинство микроорганизмов, содержащихся в естественной среде, включая микробиоту кишечника человека, живут в смешанных популяциях. Обычно применяемые лабораторные методы культивирования не всегда приводят к успешной идентификации бактерий, и стандартными методами невозможно культивировать около 80% микроорганизмов. Следовательно, наиболее действенным подходом к изучению микробного разнообразия признается использование методов, не зависящих от молекулярной культуры. Применение этих методов позволяет выявить отличительные особенности микробиоты кишечника у здоровых и больных людей. Однако в последние годы исследования расширились от экологической характеристики микробиоты кишечника (различия бактериального и/или грибкового разнообразия и/или численности между образцами) до ее функциональной характеристики.

Анализ состава микробиоты человека становится все более актуальным из-за ее роли в широком спектре болезней. Все больше данных свидетельствует о корреляции между изменениями в составе и активности микробиоты кишечника и патофизиологией таких заболеваний, как депрессия, аутизм, аллергия и хронические воспалительные заболевания [3–6]. Поэтому исследования микробиома и поиск новых стратегий необходимы для решения проблем, которые могут представлять патогены будущего. Беспрецедентным и мощным подходом к исследованию микробиома, позволяющим охарактеризовать микробные сообщества без предварительного культивирования, становится секвенирование следующего поколения (NGS) [7].

Таксономический профиль микробного сообщества можно получить с помощью либо дробового анализа случайных фрагментов ДНК, секвенирования ампликона гена рибосомной РНК 16S (рДНК). Ранее было показано, что подход к секвенированию ампликона 16S рДНК дает количественно и качественно разные результаты по сравнению с метагеномикой дробовика в случае, если эти два метода используются для оценки состава микробного сообщества на одних и тех же образцах. Однако большинство таких сравнений были либо основаны на восстановлении последовательностей 16S рДНК в данных метагеномики дробовика, либо ограничивались одним микробиомом или синтетическими образцами.

Новые подходы к секвенированию и анализу позволяют проводить беспристрастные анализы для выявления патогенов, пропущенных методами целевого секвенирования и культивирования. Хотя метагеномные исследования еще не получили широкого распространения, они использовались для диагностики инфекций у детей, выявления генов резистентности в клинических образцах и характеристики вспышек заболеваний. При этом стоимость и время выполнения работ в настоящее время ограничивают его применение в клинических лабораториях, но новые платформы и повышенный комфорт при использовании этих методов продолжают продвигать диагностическую метагеномику в клиническую педиатрию. В этой области еще предстоит провести много исследований. В ближайшем будущем педиатры будут все чаще использовать метагеномные методы при обследовании и выборе лечения детей.

Методы отбора проб

Важный этап исследования микробиоты — отбор проб, поэтому, чтобы избежать искажения результатов, важно не только тщательно планировать эти исследования, но и учитывать строгие критерии включения и исключения в них пациентов. Наиболее типичным образцом для исследования кишечной микробиоты служит кал. Но на протяжении желудочно-кишечного тракта существуют различ-

ные экологические ниши, в которых обитают разные бактерии. Образцы кала не самые надежные образцы для характеристики проживающих в нижних отделах кишечника микробных сообществ, но к ним проще всего получить доступ для клинических исследований. Для взятия образца микробиоты желудка или тонкой кишки, которые труднодоступны, необходимо использовать такие инвазивные методы отбора проб, как эзофагодуоденоскопия, колоноскопия, люминальная чистка или даже хирургическая резекция кишечника. Применялись и такие методы, как прямой анализ микробиоты тонкой кишки у пациентов с илеостомой, но с ограниченным числом пациентов и очень вероятным загрязнением образца от кожи. Поэтому желудок и тонкая кишка обычно недостаточно представлены в исследованиях микробиоты кишечника, однако микробиота верхнего отдела кишечника значительно отличается от микробиоты нижнего отдела или образцов кала [8].

В настоящее время разработаны новые неинвазивные методы, такие как проглатывание роботизированной капсулы, содержащей датчики pH и температуры, а также независимые батареи. Эти капсулы могут брать образцы микробиоты из определенных точек, и по мере развития технологий затраты на их использование становятся все более доступными. Тем не менее еще есть некоторые проблемы, которые не были решены с появлением этих устройств, такие как загрязнение (из других мест, кроме желаемых) или сохранение образцов.

Методы исследования. Для изучения микроорганизмов, проживающих в кишечнике, впрочем, как и в других сферах обитания, в основном используют четыре подхода: метагеномика, метатранскриптомика, метапротеомика, метаболомика.

Метагеномика. Этот метод изучает набор генов всех микроорганизмов в представленных образцах — метагеном (метагеномное исследование ДНК), является традиционным и наиболее часто используемым методом для характеристики микробиоты кишечника. Метагеномный анализ позволяет определить видовое разнообразие микроорганизмов в исследуемом образце без необходимости их выделения и культивирования.

Метагеномное исследование ДНК отвечает на вопросы, какие микроорганизмы находятся в образце и какие функции они потенциально выполняют. Для этого определяется участок ДНК, в котором содержится нужная информация. Проводится амплификация такого универсального филогенетического гена-маркера, как ген *16S* рРНК, который отвечает за работу рибосомальной РНК или секвенирование всей ДНК [7]. Двухспиральная ДНК «разматывается» и копируется только одна ее сторона. Затем ДНК собирается обратно, а копию ее одной стороны (РНК) подхватывает рибосома. Она считывает последовательность нуклеотидов и строит по ней цепочку аминокислот, которая потом приобретает форму и становится белком.

Изучение таксономических профилей и того, как они различаются у разных людей или между когортами пациентов, может дать множество сведений о связи между микробиомом и здоровьем человека. Эти исследования могут, например, в качестве биомаркеров различных заболеваний точно определить конкретные виды микроорганизмов с известными факторами вирулентности, особенности дисбаланса кишечной микробиоты, возникшего под действием факторов окружающей среды или при патологических состояниях [5, 7].

Использование генных маркеров позволяет определить экологические особенности микробиоты кишечника в виде разнообразия и обилия определенных бактерий или грибов. Этот подход позволяет описать основные содержащиеся микроорганизмы и сравнить закономерности между отдельными людьми или группами. К наиболее распространенным измеряемым экологическими параметрами относятся альфа-разнообразие (количество и однородность видов, рассчитанные для каждой особи), бета-разнообразие (различия наличия/отсутствия, численности или филогенетических расстояний по сравнению со всей микробиотой человека) и относительная численность (различия в пропорциях видов бактерий или грибов при сравнении между группами).

Таксономический профиль микробного сообщества можно получить с помощью либо секвенирования ампликона гена рибосомной РНК *16S* (рДНК), либо дробового анализа случайных фрагментов ДНК. Одним из перспективных и современных методов идентификации возбудителя заболевания признана идентификация организмов по маркерному гену *16S* рРНК. Особенности расположения вариативных и консервативных участков этого гена до конца не изучены. Поэтому детальное изучение последовательностей нуклеотидов в данном гене может помочь при идентификации микроорганизмов. Ген *16S* рРНК выбран как универсальный маркер для видовой идентификации: он имеется в геномах всех прокариот и обладает сравнительно небольшой изменчивостью. Секвенирование гена *16S* рРНК — быстрый и точный метод идентификации бактерий и архей. Анализ гена *16S* рРНК (*16S*) используется для исследования микробного разнообразия и состава в микробных сообществах в сочетании с последующим вычислительным анализом нуклеотидных последовательностей *16S*.

Метагеномика дробовика позволяет избежать возможной системной ошибки, вызванной ПЦР-амплификацией генного маркера. Этот подход заключается в прямом секвенировании всей ДНК (а иногда и РНК), присутствующей в образце, без предвари-

тельного отбора генных маркеров. Это также расширяет спектр микроорганизмов, изучаемых в одном и том же образце, поскольку нет необходимости запускать разные реакции для каждого таксономического сообщества (одну для бактерий, другую для грибов) и можно анализировать обе реакции одновременно. В том же исследовании можно анализировать «темную материю» микробиоты (вирусы-хозяева, фаги и ранее не описанные фрагменты ДНК). Кроме того, участилось использование технологий секвенирования с длинным чтением, по этой причине идентификация более длинных фрагментов ДНК позволяет лучше определить таксономию. Метагеномика дробовика также позволяет сообщать о метаболических и функциональных генах бактерий и грибов, присутствующих в микробном сообществе (см. рисунок).

Используя этот подход, бактерии можно отнести к определенному роду и в некоторых случаях к определенному виду путем сравнения полученной нуклеотидной последовательности с последовательностями охарактеризованных видов в базах данных GeneBank и Ribosomal DNA. Отнесение микроорганизма к определенному таксономическому сообществу может быть проблемой при столкновении с новыми бактериями или грибами; в некоторых случаях гомогенность последовательностей этих генов не позволяет выявить различия на более низком таксономическом уровне, поскольку у многих бактерий основным геном составляет небольшую долю в пангеноме.

Проблемы с метагеномикой дробовика возникают из-за глубины секвенирования, необходимого для идентификации менее распространенных микроорганизмов, присутствующих в исследуемом сообществе. Важно учитывать, что низкая глубина исследования предоставляет меньше информации о менее распространенных микроорганизмах, присутствующих в микробиоте кишечника, чем подход с использованием генных маркеров. Еще одна проблема с метагеномикой дробовика заключается в том, что в зависимости от метода отбора проб многие полученные последовательности могут исходить от человека-хозяина, а не от микробного сообщества. Это более очевидно в образцах, которые содержат ткани человека, получаемые при биопсии или люминальной чистке. Несмотря на то что микробиота кишечника представляет собой наиболее изученную экологическую нишу, базы данных все же содержат неполную или еще неизвестную информацию. В результате получается много ненужной для анализа информации.

Сравнение метагеномики дробовика и секвенирования ампликона *16S* рДНК на одних и тех же образцах позволяет предположить, что эти два метода дают сопоставимые результаты. Однако сообщалось, что сравнение эффективности метагеномики дробовика и секвенирования ампликона *16S* для описания

таксономического профиля на уровне видов бактериальных сообществ в образце кала человека показывают более высокое разрешение таксономического анализа, выполненного с помощью метагеномики дробовика, по сравнению с секвенированием *16S*. Метагеномика секвенирования следующего поколения позволяет гораздо глубже охарактеризовать сложность микробиома, дает возможность идентифицировать большее количество видов для каждого образца по сравнению с секвенированием ампликона *16S* рДНК. При этом метагеномика дробовика примерно на 50% дороже, чем секвенирование ампликона *16S*. Необходимы дальнейшие сравнительные исследования на независимых выборках [9].

Метатранскриптомика — наука, изучающая экспрессию генов микроорганизмов в естественной среде, т.е. метатранскриптом, а также позволяет получить полный профиль экспрессии генов сложных микробных сообществ (см. рисунок). Транскрипт — молекула РНК, образующаяся в результате транскрипции (экспрессии соответствующего гена или участка ДНК). Транскриптом — совокупность всех молекул матричной РНК (мРНК), которые синтезирует одна клетка или группа микроорганизмов.

При метатранскриптомном анализе изучают непосредственно РНК, а не ген, который ее кодирует. Бактерия может присутствовать, но не участвовать в жизни микробного сообщества: у нее есть неактивные гены, которые не копируются молекулой РНК. Метатранскриптомные исследования позволяют оценить именно активную часть микробиоты. Однако молекула РНК не так стабильна, как ДНК, и быстро распадается. Поэтому выделить и сохранить ее для анализов сложнее.

Измерения экспрессии генов на уровне сообщества микроорганизмов могут дать важную информацию о том, как разные их виды реагируют друг на друга и на изменения окружающей среды, такие как лечение антибиотиками или нарушения режима питания [10, 11]. Эта технология также использовалась для описания закономерностей экспрессии генов в различных сообществах микроорганизмов [11–13].

Примечательно, что даже после обработки метатранскриптома оценка и изучение полученных данных представляют потенциально сложную задачу из-за множества таксонов, каждый из которых имеет тысячи экспрессированных генов, которые представлены исследованиями. Для решения этой проблемы был внедрен интерактивный инструмент (называемый Anvi'o), реализующий несколько алгоритмов метатранскриптомной и метагеномной обработки [14]. Еще одна проблема — статистически обоснованная нормализация и количественное сопоставление сложных наборов метатранскриптомных данных [15–17].

Метапротеомика — наука, изучающая информацию о структуре, функциях и динамике микробного сообщества с помощью изучения белков, которые находятся в образце (см. рисунок). Она дает сведения о взаимодействии микроорганизмов друг с другом, об их конкуренции за питание, о выработке ими метаболитов. Для этого из образца микробиома выделяют белки, затем для определения молекулярной массы проводят масс-спектрометрию. При этом получают информацию о фрагментах белка (пептидах), но не о белке в целом. Чтобы собрать «осколки» в единое целое, используют специальные программы. Метапротеомика помогает выявить нарушения функции микробиоты у людей с различными заболеваниями.

Хотя метапротеомные анализы дают возможность понять регуляцию уровня белка в сложных сообществах микроорганизмов, анализ таких данных сопровождается множеством препятствий, включая связанные с экспериментами на основе протеомики и изучением смешанного сообщества микробов. Для количественного определения пептидных фрагментов обычно используется тандемная масс-спектрометрия, а затем для идентификации каждого пептида используется справочная база данных теоретических или ранее собранных спектров. Это

обусловлено тем, что если пептид не найден в справочной базе данных, обычно он не может быть идентифицирован и много зависит от параметров поиска и выбора базы данных.

Кроме того, белки на уровне сообщества микроорганизмов имеют огромный динамический диапазон численности и поэтому невозможно с уверенностью определить, действительно ли пептид, не обнаруженный в данном образце с помощью нецелевого анализа, полностью отсутствует или имеется в очень небольшом количестве. Такое ограничивает полезность метапротеомики для моделирования метаболизма сообщества микроорганизмов, хотя это ограничение может быть нивелировано за счет совершенствования технологий [18].

Метабомика — наука, которая изучает совокупность всех метаболитов — конечных продуктов обмена веществ (см. рисунок). Термин «метаболом» введено S.G. Olivier и соавт. в 1998 г. и определяется как набор метаболитов, синтезируемых организмом. Метаболом представляет собой большое количество соединений, включая части аминокислот, липидов, органических кислот или нуклеотидов. Метаболиты используются или образуются в результате химических реакций, и их уровни можно рассматривать как конечную реакцию биологических систем

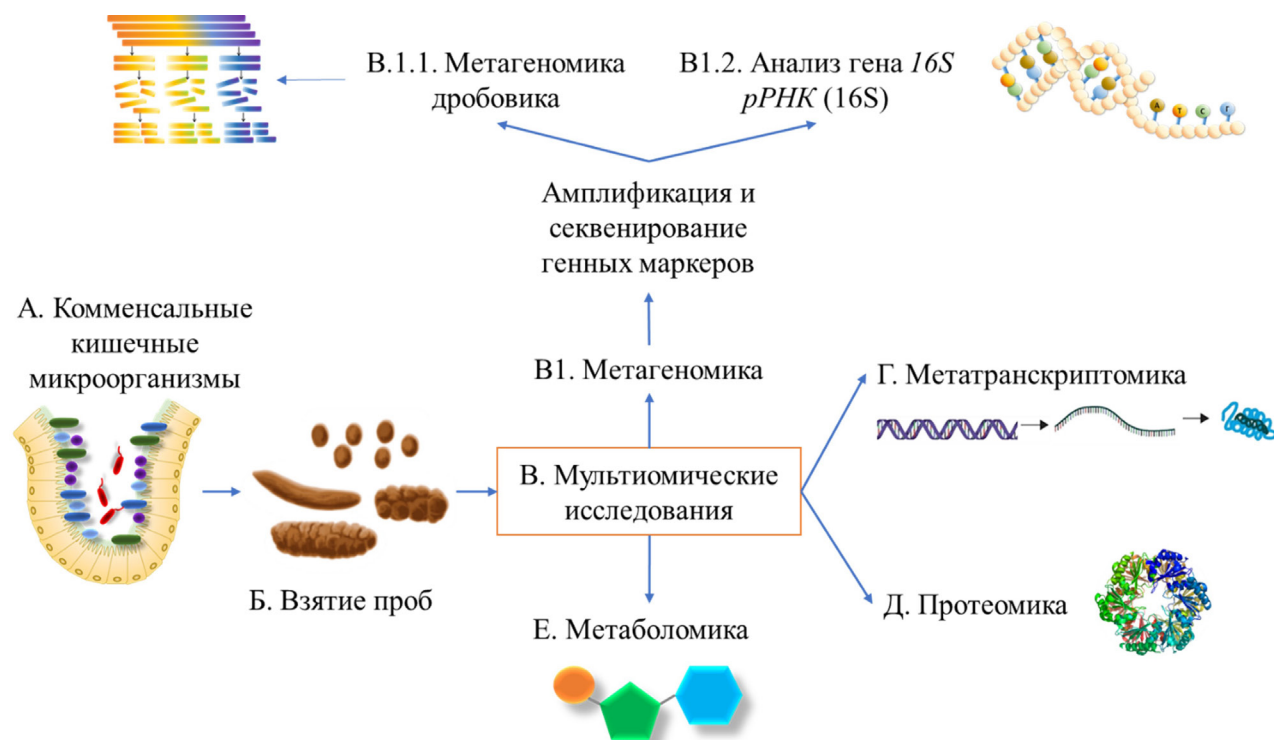


Рисунок. Методы исследования кишечного микробиома (составлено авторами).

А — сообщество микроорганизмов, которые находятся в кишечнике; Б — фекалии для исследований; В — под мультиомическими исследованиями подразумеваются исследования, определяющие состав микробиоты кишечника и ее функции: В1 — метагеномное исследование, которое может быть либо метагеномикой дробовика (В1.1.), либо исследованием гена *16S pPHK* (В1.2.). Мультиомические исследования включают также метатранскриптомику (Г), протеомику (Д) и метаболомику (Е).

Figure. Methods for the study of the intestinal microbiome (compiled by the author).

на генетические изменения или изменения окружающей среды.

Термин «метаболомика» используется для обозначения «количественного измерения динамического многопараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические стимулы или генетическую модификацию». Одно из лучших определений метаболомики — это «полный набор метаболитов/низкомолекулярных промежуточных соединений, которые зависят от контекста, варьируют в зависимости от физиологии, развития или патологическое состояние клетки, ткани, органа или организма».

В процессах пролиферации, функционирования и апоптоза клеток участвуют специфические метаболиты. Регистрация и изучение этих метаболитов позволят выявить биомаркеры, представляющие собой измеряемые биологические характеристики, которые можно использовать для диагностики, мониторинга или прогнозирования риска развития заболеваний [19]. Существует несколько подходов к изучению метаболома, включая анализ мишеней, метаболическое профилирование и метаболический фингерпринтинг [20]. Целевой анализ фокусируется на количественном определении небольшого числа известных метаболитов. Метаболическое профилирование фокусируется на более широком наборе неизвестных метаболитов. Метаболический фингерпринтинг фокусируется на внеклеточных метаболитах.

Вместо изучения отдельных метаболитов метаболомика собирает количественные данные по большому диапазону метаболитов, чтобы получить общее представление о метаболизме, связанном с конкретным состоянием [21]. Обнаружение биомаркеров с помощью метаболомики поможет диагностировать, предотвращать различные заболевания и производить лекарственные препараты для лечения.

Метаболомика может быть минимально инвазивной процедурой, поскольку данные можно собирать из плазмы, мочи, кала, спинномозговой жидкости или экстрактов тканей. Метаболомика — это всестороннее изучение низкомолекулярных метаболитов в биологических системах. Анализируя тысячи метаболитов в биологических образцах, метаболомика дает полную картину метаболического статуса и биохимических процессов в организме и становится все более мощным инструментом в изучении заболеваний. В метаболомике обычно приходится иметь дело с большими объемами данных. Более того, исходя из разных целей и дизайна исследований для получения точного и всестороннего результата может потребоваться использование различных методов анализа данных или их комбинация.

Метаболомика — это быстро развивающаяся область, которая значительно улучшила понимание метаболических механизмов, лежащих в основе

биологических процессов, а также болезней человека. Его общая цель состоит в том, чтобы понять, как общий метаболизм организма изменяется в различных условиях. Метаболомика использовалась для изучения таких заболеваний, как муковисцидоз, заболевания центральной нервной системы, рак, сахарный диабет и болезни сердца [20–24].

Важно отметить, что хотя гены и белки различаются в различных таксонах микроорганизмов, их метаболиты в принципе универсальны. Соответственно в отличие от метатранскриптомики и метапротеомики обработка и анализ метаболомических данных в масштабе всего сообщества микроорганизмов могут опираться на стандартные подходы к метаболомике одного организма без модификаций. Для нецелевой масс-спектрометрической метаболомики эти анализы обычно включают нормализацию и предполагаемую идентификацию метаболитов путем поиска совпадений в спектральной базе данных или известных соединений с соответствующими масс-профилями и профилями хроматографического элюирования [25]. Однако более серьезная проблема заключается в интерпретации этих наборов данных и в увязке наблюдаемых вариаций численности биомолекул с другими данными о структуре и функциях сообществ микроорганизмов. Статистическая связь ассоциации между болезнями, концентрацией метаболитов и численностью видов микробов наблюдалась в исследованиях случай–контроль при болезни Крона, колоректального рака и инфекции *Clostridium difficile*, но механистическая природа этих связей остается неясной [26]. Несколько исследований количественной оценки связи между сдвигами в метагеноме и функционально связанными вариациями метаболома дополнительно использовали информацию о метаболических путях [27]. Кроме того, в недавнем исследовании была введена новая вычислительная система MIMOSA для основанной на метаболической модели интеграции таксономических и метаболомических данных сообщества микроорганизмов и для оценки того, могут ли изменения в метаболоме быть механически объяснены вариациями в таксономическом профиле сообщества [28]. Такие методы имеют решающее значение для получения принципиального и системного понимания того, как изменения экологии влияют на метаболизм и поведение сообщества микроорганизмов.

Заключение

Растущее признание научной и клинической значимости микробиома человека привело к резкому росту числа исследований в этой области. Они обычно генерируют, собирают и изучают многофакторные метаданные в беспрецедентном масштабе. Обратив особое внимание на кишечный микробиом, мы описали наиболее распространенные методы исследования, в которых можно полу-

чить оптимально объективные результаты исследования и точность вычислительного анализа данных. Вычислительные инструменты распространяются в виде программного обеспечения с открытыми исходными кодами, которые можно применять к наборам данных. Однако важно отметить, что эти методы (и, вероятно, многие другие, которые еще будут разработаны для решения имеющихся проблем в ближайшие годы), ограничены большим количеством генов с неизвестной функцией и еще не охарактеризованных таксонов, содержащихся в микробиоме кишечника. Поэтому для полной реализации потенциала исследований микробиома необходимо разработать эффективные, рентабельные и точные методы демистификации скрытых слоев разнообразия микробиомов. Тем не менее разрешение и мас-

штабы профилирования микробных сообществ, вероятно, будут и далее улучшаться по мере развития технологий. Эти технологии обеспечат более детальное представление о структуре и функциях субпопуляций микробиома и даже отдельных клеток во времени и пространстве, о поведении таких субпопуляций и о том, как они взаимодействуют друг с другом и с хозяином. Эти достижения будут способствовать развитию персонализированной медицины, которая будет применяться в самых различных областях — от точной идентификации патогенных штаммов для целенаправленного лечения до тщательного мониторинга дисбаланса микробных сообществ при заболеваниях и до персонализированного и рационального набора манипуляций с микробиомом.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Collado M.C., Rautava S., Aakko J., Isolauri E., Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* 2016; 6: 23129. DOI: 10.1038/srep23129
- Perez-Muñoz M.E., Arrieta M.C., Ramer-Tait A.E., Walter J. A critical assessment of the «sterile womb» and «in utero colonization» hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 2017; 5(1): 48. DOI: 10.1186/s40168-017-0268-4
- Mayer E.A., Padua D., Tillisch K. Altered brain-gut axis in autism: comorbidity or causative mechanisms? *Bioessays* 2014; 36(10): 933–939. DOI: 10.1002/bies.201400075
- Kim N., Yun M., Oh Y.J., Choi H.J. Mind-altering with the gut: Modulation of the gut-brain axis with probiotics. *J Microbiol* 2018; 56(3): 172–182. DOI: 10.1007/s12275-018-8032-4
- Shreiner A.B., Kao J.Y., Young V.B. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2015; 31(1): 69–75. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000139
- Gomaa E.Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *N Engl J Med* 2016; 375(24): 2369–2379. DOI: 10.1056/NEJMr1600266
- Escobar-Zepeda A., Vera-Ponce de León A., Sanchez-Flores A. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front Genet* 2015; 6:348. DOI: 10.3389/fgene.2015.00348
- 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; 10:151. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00151
- Laudadio I., Fulci V., Palone F., Stronati L., Cucchiara S., Carrisi C. Quantitative Assessment of Shotgun Metagenomics and 16S rDNA Amplicon Sequencing in the Study of Human Gut Microbiome. *OMICS* 2018; 22(4): 248–254. DOI: 10.1089/omi.2018.0013
- Pérez-Cobas A.E., Gosalbes M.J., Friedrichs A., Knecht H., Artacho A., Eismann K. et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut* 2013; 62(11): 1591–1601. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303184
- David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014; 505(7484): 559–563. DOI: 10.1038/nature12820
- Jorth P., Turner K.H., Gumus P., Nizam N., Buduneli N., Whiteley M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *mBio* 2014;5(2): e01012–14. DOI: 10.1128/mBio.01012-14
- Aylward F.O., Eppley J.M., Smith J.M., Chavez F.P., Scholin C.A., DeLong E.F. Microbial community transcriptional networks are conserved in three domains at ocean basin scales. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(17): 5443–5448. DOI: 10.1073/pnas.1502883112
- Eren A.M., Esen Ö.C., Quince C., Vineis J.H., Morrison H.G., Sogin M.L. et al. Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data. *Peer J* 2015; 3: e1319. DOI: 10.7717/peerj.1319
- Dillies M.A., Rau A., Aubert J., Hennequet-Antier C., Jeanmougin M., Servant N. et al. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Brief Bioinform* 2013; 14(6): 671–683. DOI: 10.1093/bib/bbs046
- Huang H.C., Niu Y., Qin L.X. Differential Expression Analysis for RNA-Seq: An Overview of Statistical Methods and Computational Software. *Cancer Inform* 2015; 14(Suppl 1): 57–67. DOI: 10.4137/CIN.S21631
- Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014; 15(12): 550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Tobalina L., Bargiela R., Pey J., Herbst F.A., Lores I., Rojo D. et al. Context-specific metabolic network reconstruction of a naphthalene-degrading bacterial community guided by metaproteomic data. *Bioinformatics* 2015; 31(11): 1771–1779. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv036
- Xia J., Broadhurst D.I., Wilson M., Wishart D.S. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 2013; 9(2): 280–299. DOI: 10.1007/s11306-012-0482-9
- Tortora S.C., Bodiwala V.M., Quinn A., Martello L.A., Vignesh S. Microbiome and colorectal carcinogenesis: Linked mechanisms and racial differences. *World J Gastrointest Oncol* 2022; 14(2): 375–395. DOI: 10.4251/wjgo.v14.i2.375
- Kaddurah-Daouk R., Krishnan K.R. Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34(1): 173–186. DOI: 10.1038/npp.2008.174
- Wetmore D.R., Joseloff E., Pilewski J., Lee D.P., Lawton K.A., Mitchell M.W. et al. Metabolomic profiling reveals biochemical pathways and biomarkers associated with pathogenesis

- in cystic fibrosis cells. *J Biol Chem* 2010; 285(40): 30516–30522. DOI: 10.1074/jbc.M110.140806
23. Wang-Sattler R., Yu Z., Herder C., Messias A.C., Floegel A., He Y. et al. Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. *Mol Syst Biol* 2012; 8: 615. DOI: 10.1038/msb.2012.43
24. Griffin J.L., Atherton H., Shockcor J., Atzori L. Metabolomics as a tool for cardiac research. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8(11): 630–643. DOI: 10.1038/nrcardio.2011.138
25. Chong J., Xia J. Computational Approaches for Integrative Analysis of the Metabolome and Microbiome. *Metabolites* 2017; 7(4):62. DOI: 10.3390/metabo7040062
26. Jansson J., Willing B., Lucio M., Fekete A., Dicksved J., Halfvarson J. et al. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. *PLoS One* 2009; 4(7): e6386. DOI: 10.1371/journal.pone.0006386
27. McHardy I.H., Goudarzi M., Tong M., Ruegger P.M., Schwager E., Weger J.R. et al. Integrative analysis of the microbiome and metabolome of the human intestinal mucosal surface reveals exquisite inter-relationships. *Microbiome* 2013; 1(1): 17. DOI: 10.1186/2049–2618–1–17
28. Noecker C., Eng A., Srinivasan S., Theriot C.M., Young V.B., Jansson J.K. et al. Metabolic Model-Based Integration of Microbiome Taxonomic and Metabolomic Profiles Elucidates Mechanistic Links between Ecological and Metabolic Variation. *mSystems* 2016; 1(1): e00013–15. DOI: 10.1128/mSystems.00013–15

Поступила: 18.05.22

Received on: 2022.05.18

Исследование выполнено при финансовой поддержке Биокодекса Микробиота фонд, Национальный грант 2021, Россия.

The study was supported by the Biocodex Microbiota Foundation, National Grant 2021, Russia.

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.