

Таксономический состав и биоразнообразие кишечного микробиома пациентов с синдромом раздраженного кишечника, язвенным колитом и бронхиальной астмой

А.Ю. Тикунов¹, А.Н. Швалов², В.В. Морозов¹, И.В. Бабкин¹, Г.В. Селедцова³, И.О. Волошина¹, И.П. Иванова³, А.В. Бардашева¹, В.В. Морозова¹, В.В. Власов¹, Н.В. Тикунова¹ ✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора Российской Федерации, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

³ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

✉ tikunova@niboch.nsc.ru; arttik@ngs.ru

Аннотация. К настоящему времени показана ассоциация дисбаланса кишечной микробиоты с различными заболеваниями человека, включая не только патологии желудочно-кишечного тракта, но и нарушения иммунной системы. Однако, несмотря на значительный объем накопленных данных, многие ключевые вопросы до сих пор остаются без ответа. Описаны различия в микробных сообществах кишечника в зависимости от возраста больных, типа питания и региона проживания. Учитывая ограниченность данных о составе микробиоты кишечника при язвенном колите (ЯК) и синдроме раздраженного кишечника (СРК) у пациентов из регионов Сибири, а также отсутствие сведений о кишечной микробиоте больных бронхиальной астмой (БА), цель исследования – оценка биоразнообразия кишечного микробиома пациентов с СРК, ЯК и БА в сравнении с таковым здоровых добровольцев (ЗД). Проведена сравнительная оценка биоразнообразия и таксономической структуры микробиома содержимого кишечника пациентов с СРК, ЯК, БА и ЗД, определенных на основании 16S рРНК-последовательностей бактериальных генов. В четырех выборках доминировали последовательности типов Firmicutes и Bacteroidetes. Третьи по встречаемости во всех группах – последовательности типа Proteobacteria, членами которого являются патогенные и условно-патогенные бактерии. Последовательности типа Actinobacteria были в среднем четвертыми по встречаемости. Результаты показали наличие дисбиоза в образцах пациентов по сравнению со здоровыми участниками. Соотношение Firmicutes/Bacteroidetes в выборках СРК и ЯК уменьшилось относительно ЗД, а в группе БА – увеличилось. В образцах пациентов с заболеваниями кишечника (СРК и ЯК) обнаружено увеличение доли последовательностей типа Bacteroidetes и уменьшение доли последовательностей класса Clostridia, а также семейства Ruminococcaceae, но не Erysipelotrichaceae. В выборках СРК, ЯК и БА отмечено достоверно больше в сравнении с ЗД последовательностей Proteobacteria, включая *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Parasutterella*, *Halomonas*, *Vibrio*, а также последовательности *Escherichia* и *Shigella*. В кишечном микробиоме взрослых пациентов с БА выявлено уменьшение доли последовательностей *Roseburia*, *Lachnospira*, *Veillonella*, однако доля последовательностей *Faecalibacterium* и *Lactobacillus* была такой же, как и у здоровых участников. Впервые получены данные о существенном увеличении доли последовательностей *Halomonas* и *Vibrio* в кишечном микробиоме пациентов с бронхиальной астмой.

Ключевые слова: микробиом; 16S рРНК-последовательности; язвенный колит; синдром раздраженного кишечника; бронхиальная астма.

Для цитирования: Тикунов А.Ю., Швалов А.Н., Морозов В.В., Бабкин И.В., Селедцова Г.В., Волошина И.О., Иванова И.П., Бардашева А.В., Морозова В.В., Власов В.В., Тикунова Н.В. Таксономический состав и биоразнообразие кишечного микробиома пациентов с синдромом раздраженного кишечника, язвенным колитом и бронхиальной астмой. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8):864-873. DOI 10.18699/VJ21.100

Taxonomic composition and biodiversity of the gut microbiome from patients with irritable bowel syndrome, ulcerative colitis, and asthma

A.Y. Tikunov¹, A.N. Shvalov², V.V. Morozov¹, I.V. Babkin¹, G.V. Seledtsova³, I.O. Voloshina¹, I.P. Ivanova³, A.V. Bardasheva¹, V.V. Morozova¹, V.V. Vlasov¹, N.V. Tikunova¹ ✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

³ Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

✉ tikunova@niboch.nsc.ru; arttik@ngs.ru

Abstract. To date, the association of an imbalance of the intestinal microbiota with various human diseases, including both diseases of the gastrointestinal tract and disorders of the immune system, has been shown. However, despite the huge amount of accumulated data, many key questions still remain unanswered. Given limited data on the composition of the

gut microbiota in patients with ulcerative colitis (UC) and irritable bowel syndrome (IBS) from different parts of Siberia, as well as the lack of data on the gut microbiota of patients with bronchial asthma (BA), the aim of the study was to assess the biodiversity of the gut microbiota of patients with IBS, UC and BA in comparison with those of healthy volunteers (HV). In this study, a comparative assessment of the biodiversity and taxonomic structure of gut microbiome was conducted based on the sequencing of 16S rRNA genes obtained from fecal samples of patients with IBS, UC, BA and volunteers. Sequences of the Firmicutes and Bacteroidetes types dominated in all samples studied. The third most common in all samples were sequences of the Proteobacteria type, which contains pathogenic and opportunistic bacteria. Sequences of the Actinobacteria type were, on average, the fourth most common. The results showed the presence of dysbiosis in the samples from patients compared to the sample from HVs. The ratio of Firmicutes/Bacteroidetes was lower in the IBS and UC samples than in HV and higher the BA samples. In the samples from patients with intestinal diseases (IBS and UC), an increase in the proportion of sequences of the Bacteroidetes type and a decrease in the proportion of sequences of the Clostridia class, as well as the Ruminococcaceae, but not Erysipelotrichaceae family, were found. The IBS, UC, and BA samples had significantly more Proteobacteria sequences, including *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Parasutterella*, *Halomonas*, *Vibrio*, as well as *Escherichia* spp. and *Shigella* spp. In the gut microbiota of adults with BA, a decrease in the proportion of *Roseburia*, *Lachnospira*, *Veillonella* sequences was detected, but the share of *Faecalibacterium* and *Lactobacillus* sequences was the same as in healthy individuals. A significant increase in the proportion of *Halomonas* and *Vibrio* sequences in the gut microbiota in patients with BA has been described for the first time.

Key words: microbiome; 16S rRNA sequences; ulcerative colitis; irritable bowel syndrome; bronchial asthma.

For citation: Tikunov A.Y., Shvalov A.N., Morozov V.V., Babkin I.V., Seledtsova G.V., Voloshina I.O., Ivanova I.P., Bardasheva A.V., Morozova V.V., Vlasov V.V., Tikunova N.V. Taxonomic composition and biodiversity of the gut microbiome from patients with irritable bowel syndrome, ulcerative colitis, and asthma. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8):864-873. DOI 10.18699/VJ21.100. (in Russian)

Введение

К настоящему времени накоплено достаточно данных о микробных сообществах кишечника человека и показана ассоциация дисбаланса кишечной микробиоты с различными патологическими состояниями, в том числе не только заболеваниями желудочно-кишечного тракта, но и нарушениями иммунной системы (O'Hara, Shanahan, 2006). Однако, несмотря на значительный объем информации, многие ключевые вопросы остаются без ответа. Так, до сих пор неизвестно, являются ли такие заболевания кишечника, как язвенный колит (ЯК) и синдром раздраженного кишечника (СРК), результатом нарушенного иммунного ответа на нормальную микробиоту или служат проявлением нормального иммунного ответа на нарушения в микрофлоре кишечника (Cheng, Fisher, 2017).

Патогенез этих заболеваний также не вполне ясен: вероятно, механизм развития имеет сложную природу и опосредован нарушениями кишечной микробиоты, генетической предрасположенностью и экологическими факторами (Shen et al., 2018). Известно лишь, что при ЯК и СРК снижено биоразнообразие микробиоты кишечника (Machiels et al., 2014; Dubinsky, Braun, 2015). При ЯК отмечено уменьшение количества представителей типов Bacteroidetes и Firmicutes; для последнего зарегистрировано уменьшение встречаемости последовательностей *Roseburia hominis* и *Faecalibacterium prausnitzii* (отряд Clostridia, сем. Lachnospiraceae и Ruminococcaceae соответственно) (Machiels et al., 2014; Тикунов и др., 2020). Особенно заметно снижение *Akkermansia muciniphila* (тип Verrucomicrobia), в норме достигающей 1–5 % всего бактериального сообщества (Manichanh et al., 2012; Vajer et al., 2017). Одновременно в микробиоте пациентов с ЯК увеличено количество представителей Actinomycetes и Proteobacteria, а среди протеобактерий часто выявляют *Helicobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. и энтероинвазивные *Escherichia coli* (Saebo et al., 2005; Gradel et al., 2009; Sonnenberg, Genta, 2012; Shen et al., 2018; Тикунов

и др., 2020). В случае СРК, как и при ЯК, в микробиоте кишечника количество представителей типа Proteobacteria увеличено, а число представителей Actinomycetes, наоборот, уменьшено (Bennet et al., 2015; Su et al., 2018).

Соотношение основных представителей микробного сообщества кишечника человека, Firmicutes/Bacteroidetes, при СРК может и увеличиваться, и уменьшаться (Tana et al., 2010; Rajilić-Stojanović et al., 2011; Jeffery et al., 2012; Jalanka-Tuovinen et al., 2014; Pozuelo et al., 2015; Tap et al., 2017). Такое несовпадение данных может быть связано как с динамичностью кишечного микробного сообщества у отдельного индивидуума, так и высоким биоразнообразием кишечной микробиоты у людей не только при различном состоянии здоровья, но и в зависимости от возраста, региона проживания и особенностей питания (Fujimura et al., 2010; Qin et al., 2010; Donaldson et al., 2016). В связи с этим изучение ассоциации особенностей микробиоты с различными заболеваниями человека – одно из наиболее актуальных направлений современных биомедицинских исследований.

Учитывая ограниченность данных о составе микробиоты кишечника при ЯК и СРК у пациентов из регионов Сибири, а также отсутствие сведений о кишечной микробиоте больных бронхиальной астмой (БА), цель исследования – оценка 16S рРНК-профилей пациентов с СРК, ЯК и БА в сравнении с таковыми здоровых доноров.

Материалы и методы

В работе использовали образцы фекалий, полученные от восьми пациентов с БА, восьми больных с СРК и 18 пациентов с ЯК. Среди исследуемых женщины составили 47.4 %, мужчины – 52.6 %. Диагнозы «синдром раздраженного кишечника» и «язвенный колит» подтверждали на основании результатов исследования уровня фекального кальпротектина, данных фиброколоноскопии и гистологического исследования биоптатов, взятых из разных отделов толстой и подвздошной кишок. Образцы пациен-

тов, в которых рутинными методами были обнаружены *Clostridium difficile*, не исследовали. Диагноз «атопическая бронхиальная астма» подтверждали на основании общего, биохимического и иммунологического анализов крови и данных сенсibilизации. Также в исследовании использованы восемь образцов здоровых добровольцев без хронических заболеваний и не болевших последние три месяца. Все пациенты и добровольцы отрицали систематическое употребление алкоголя, только три больных мужского пола с СРК употребляли табачные изделия. Все участники исследования в течение как минимум двух недель до забора образцов не принимали антибактериальные препараты. Все пациенты и добровольцы предоставили информированное согласие с проводимым исследованием и анонимной обработкой данных. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Автономной некоммерческой организации «Центр новых медицинских технологий в Академгородке».

Выделение суммарной ДНК проводили, как описано ранее (Тикунов и др., 2020). Основные этапы включали осветление 50 мг из каждого образца с последующим применением набора для выделения ДНК из клеток тканей и крови (ООО «БиоЛабМикс», Россия) с добавлением лизоцима для повышения эффективности получения ДНК из грамположительных бактерий. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК, содержащего переменные участки V3 и V4, проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием в качестве матрицы полученной ДНК фьюжн-праймеров (NEB-FF 5'-ACACTCTTCCCTACA CGACGCTCTTCCGACTCTACGGGAGGCAGCAG-3', NEB-FR 5'-GTGACTGGAGTTCAGACGCTGTGCTCTTC CGATCTGGACTACCGGGTATCT-3') и высокоточной полимеразы Q5 (New England Biolabs, США). Продукты амплификации очищали электрофоретически в геле из легкоплавкой SeaKem GTG-агарозы (Lonza, США).

Конструирование библиотек выполняли, как описано ранее (Тикунов и др., 2020). Основные этапы включали обогащение полученных ампликонов, введение баркодов и служебных последовательностей с использованием полимеразы Q5 и набора олигонуклеотидов Dual index set (New England Biolabs, США) с последующей очисткой полученных библиотек на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter, США). Концентрацию ДНК в библиотекх измеряли с помощью набора Qubit dsDNA HS (Life Technologies, США). По результатам измерений библиотеки объединяли в пул таким образом, чтобы соотношение ДНК-библиотек в пуле было эквимоллярным. Секвенирование вели на платформе MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq reagent kit v2 2 × 250-cycles (Illumina, США).

Методы анализа данных секвенирования описаны ранее (Тикунов и др., 2020). Предварительно из последовательностей ридов удаляли последовательности адаптеров и проводили фильтрацию ридов по качеству. Полученные риды анализировали с помощью генерации операционных таксономических единиц (OTU) с последующим картированием последовательностей на полученные OTU в пакете программ Usearch-9.2 и использованием классификации ридов алгоритмом Kraken по базе данных известных последовательностей 16S рРНК Silva v.132 (full).

В первом случае OTU генерировали алгоритмом unoise2 с отбраковкой химерных последовательностей и учетом ошибок чтения. Таблицы полученных частот встречаемости OTU обработаны в среде R3.3.3. Во втором случае полученные риды картировали на базу данных 16S рРНК Silva с помощью алгоритма seed-kraken с использованием разреженного *k*-мера со специальной решеткой, позволяющей увеличить специфичность классификации. Индекс Шеннона рассчитывали в пакете программ R; достоверность различий между индексами Шеннона определяли с помощью *t*-теста Хатчесона. Визуализацию результатов анализа библиотек последовательностей методом главных координат PCoA проводили на основе матриц дистанций с применением пакета программ vegan. Для установления достоверности различий между величинами использовали критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Оценка биоразнообразия бактериальных сообществ

На основе ДНК, выделенной из образцов фекалий пациентов и доноров, сконструированы 42 библиотеки фрагментов гена 16S рРНК. Фрагменты содержали переменные участки V3 и V4 гена 16S рРНК – на основе этой последовательности возможна таксономическая классификация большинства бактерий (Chakravorty et al., 2007; Wang, Qian, 2009). Образцы сгруппированы в четыре выборки: БА – 8 образцов больных атопической БА (средний возраст 38.1 года; от 25 до 56 лет), СРК – 8 образцов пациентов с СКР (средний возраст 44.9 года; от 25 до 64 лет), ЯК – 18 образцов пациентов с ЯК (средний возраст 39.6 года; от 25 до 65 лет), здоровые добровольцы (ЗД) – 8 образцов здоровых добровольцев (средний возраст 27.1 года; от 20 до 39 лет). Средний возраст добровольцев в группе ЗД был достоверно ниже в сравнении с группами пациентов с БА, СРК и ЯК ($p \leq 0.01$ во всех случаях); при этом данный показатель в трех выборках больных статистически значимо не различался.

Результаты секвенирования и классификации полученных ридов представлены в табл. 1. Все библиотеки содержали более 100 тыс. ридов, в среднем более 99.6 % ридов таксономически отнесены к определенному типу бактерий. В двух образцах больных БА и одном образце пациента с СРК обнаружены последовательности архей (тип Euryarchaeota).

Альфа-разнообразие бактериальных сообществ в исследуемых группах оценивали с помощью индекса Шеннона – комплексного показателя, учитывающего количество видов и их выровненность. Самым низким индекс Шеннона был для выборки ЯК, самым высоким – для ЗД (рис. 1), хотя различия не имели статистической значимости. Оценка выборок методом главных компонент показала, что наиболее компактно расположены точки, характеризующие библиотеки последовательностей из группы ЗД (рис. 2). Расположение точек, характеризующих библиотеки из выборок пациентов, при меньшем значении индекса Шеннона по сравнению с таковым для ЗД свидетельствует об относительной нестабильности микробиомов у таких больных.

Table 1. The taxonomy of reads in 16S rRNA libraries

Parameter	IBS, n = 8	UC, n = 18	Asthma, n = 8	HV, n = 8	
Number of reads, N ± δ	149863 ± 13477	138479 ± 16887	142314 ± 13724	129435 ± 12429	
Reads with identified bacterium phylum, % ± δ	99.57 ± 0.18	99.66 ± 0.12	99.62 ± 0.11	99.64 ± 0.13	
Shannon index, I ± δ	3.27 ± 0.85	3.05 ± 0.63	3.28 ± 0.72	3.48 ± 0.39	
The overall number of bacterium phyla	11, 7 to 8 per library	11, 5 to 9 per library	11, 6 to 9 per library	11, 5 to 9 per library	
Percentage of detected bacterium phyla	Firmicutes	53.2	56.1	65.1	70.4
	Bacteroidetes	38.5	31.3	18.5	26.5
	Proteobacteria	5.7	10.0	13.4	1.4
	Actinobacteria	1.0	1.9	0.7	0.7
	Verrucomicrobia	1.0	0.4	1.9	0.5
	Fusobacteria	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Tenericutes	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Synergistetes	< 0.1	< 0.1	n.d.	< 0.1
	Epsilonbacteraeota	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Cyanobacteria	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Patescibacteria	< 0.1	< 0.1	< 0.1	n.d.
	Fibrobacteres	n.d.	n.d.	< 0.1	< 0.1
	The overall number of bacterium classes	17, 13 to 14 per library	15, 11 to 15 per library	16, 12 to 15 per library	17, 10 to 15 per library
Percentage of detected bacterium classes	Bacilli	0.8	1.5	0.6	0.5
	Clostridia	41.8	46.7	55.8	66.0
	Erysipelotrichia	0.2	0.2	0.2	< 0.1
	Negativicutes	10.2	7.5	8.3	3.7
	Bacteroidia	38.5	31.3	18.5	26.5
	Alphaproteobacteria	1.9	5.4	2.0	0.4
	Deltaproteobacteria	0.2	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Gammaproteobacteria	3.6	4.4	11.2	0.9
	Actinobacteria	0.6	0.6	0.5	0.4
	Coriobacteriia	0.4	1.3	0.3	0.3
	Verrucomicrobia	1.0	0.4	1.9	0.5
	Fusobacteriia	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Mollicutes	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Synergistia	< 0.1	< 0.1	n.d.	< 0.1
	Campylobacteria	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Oxyphotobacteria	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	Saccharimonadia	< 0.1	< 0.1	< 0.1	n.d.
	Fibrobacteria	n.d.	n.d.	< 0.1	< 0.1

Note. Library designations here and below: IBS, irritated bowel syndrome; UC, ulcerative colitis, HV, healthy volunteers. n.d., not detected.

Всего в библиотеках выявлены последовательности 12 типов бактерий (см. табл. 1); последовательности девяти типов присутствовали во всех четырех выборках. Из них последовательности пяти типов (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria и Fusobacteria) определены во всех библиотеках, а последовательности, относящиеся к типу Verrucomicrobia, обнаружены во всех библиотеках из групп БА и ЗД, при этом в СРК и ЯК

они отсутствовали в одной и четырех библиотеках соответственно. Последовательности представителей типов Tenericutes, Epsilonbacteraeota, Cyanobacteria, Synergistetes, Patescibacteria и Fibrobacteres найдены не во всех библиотеках, а последних трех типов – не во всех выборках. В среднем во всех группах доминировали последовательности Firmicutes (в среднем по выборке > 53 %) и Bacteroidetes (в среднем > 18 %), причем в группе СРК

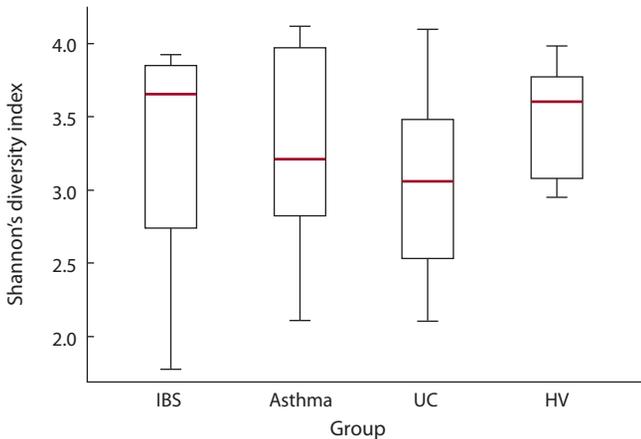


Fig. 1. Shannon index, reflecting the alpha-diversity of the gut microbiome in samples obtained from patients with irritable bowel syndrome (IBS), bronchial asthma, ulcerative colitis (UC), and healthy volunteers (HV). Median values and quartiles are indicated.

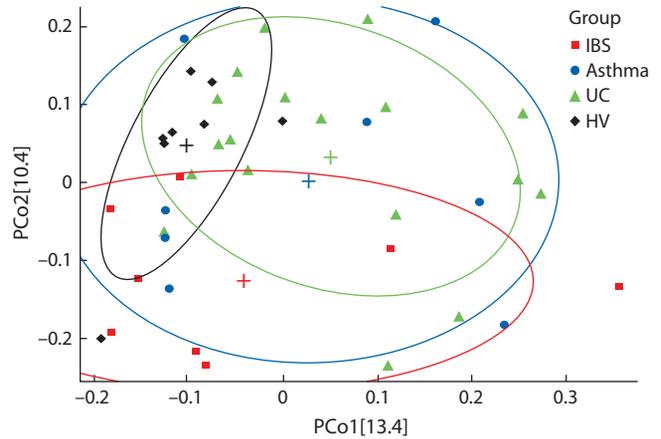


Fig. 2. Visualization of sequence library analysis by the method of principal coordinates PCoA based on matrices of distances. Red squares indicate data for libraries from IBS samples; blue dots, from asthma samples; green triangles, from UC samples; and black diamonds – from HV samples.

Plus signs of the corresponding colors mark the centers of areas occupied by the respective groups of samples. The values of the first and second principal coordinates are presented on the X and Y axes, respectively.

последовательности *Bacteroidetes* выявлены статистически значимо чаще, чем в БА (в среднем 38.5 против 18.5%; $p \leq 0.05$). Третьими по встречаемости во всех выборках были последовательности *Proteobacteria*. Из табл. 1 видно, что меньше всего таких последовательностей зафиксировано в группе ЗД (1.36 %), в остальных выборках таких последовательностей отмечено существенно больше (СРК – 5.71 %, БА – 13.35 %, ЯК – 10.00 %); статистическая достоверность различий показана даже для групп ЗД и СРК. Последовательности типа *Actinobacteria* были в среднем четвертыми по встречаемости, однако в выборках ЯК и СРК (заболевания кишечника) их встречаемость в среднем превышала таковую для последовательностей *Proteobacteria* в группе ЗД.

Девять из двенадцати обнаруженных бактериальных типов представлены последовательностями единственного класса, включая один доминирующий тип *Bacteroidetes* (класс *Bacteroidia*). Еще один доминирующий тип, *Firmicutes*, был представлен последовательностями четырех классов – *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Negativicutes*, причем во всех выборках доминировали последовательности класса *Clostridia*. Тип *Proteobacteria* содержал последовательности трех классов – *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*, у пациентов из этого типа преобладали последовательности последнего класса. Тип *Actinobacteria* включал последовательности двух классов – *Actinobacteria* и *Coriobacteria*. Всего выявлены последовательности 18 классов (см. табл. 1). Встречаемость последовательностей основных порядков показана на рис. 3.

Сравнительный анализ таксономического состава микробных сообществ

Известно, что основными компонентами микробного сообщества кишечника здоровых людей выступают представители типов *Firmicutes* (~70 %), *Bacteroidetes* (~30 %), *Proteobacteria* (<5 %), *Actinobacteria* (<2 %), *Verrucomi-*

crocobia (<1 %) и *Fusobacteria* (<1 %); представители еще 10–12 типов бактерий являются транзитными или встречаются в зависимости от региона проживания человека, его возраста и типа питания (Belizário et al., 2018). Анализ таксономического состава библиотек из выборки ЗД показал соответствие средних значений приведенным показателям (см. табл. 1). Это позволило оценить сдвиг таксономического состава в кишечном микробиоме пациентов с СРК и ЯК (заболевания кишечника) и БА относительно кишечного микробиома здоровых доноров.

Изменение соотношения количества представителей *Firmicutes* и *Bacteroidetes* в микробиоте кишечника может быть одним из индикаторов нарушения состояния микробиоты, при этом сдвиг этого соотношения как в сторону увеличения, так и уменьшения описан при ряде заболеваний (Tana et al., 2010; Rajilić-Stojanović et al., 2011; Jeffery et al., 2012; Jalanka-Tuovinen et al., 2014; Pozuelo et al., 2015; Tap et al., 2017). Соотношения *Firmicutes*/*Bacteroidetes* в группе ЗД составило 2.6, в СРК и ЯК это соотношение существенно уменьшилось (1.4 и 1.8 соответственно), а в выборке БА – увеличилось (3.5) (табл. 2). Полученные данные согласуются с описанным ранее уменьшением встречаемости *Firmicutes* при ЯК (Machiels et al., 2014) и СРК (Jalanka-Tuovinen et al., 2014; Bennet et al., 2015; Pozuelo et al., 2015; Su et al., 2018), однако относительно СРК результаты разнятся и в ряде исследований зарегистрировано увеличение соотношения *Firmicutes*/*Bacteroidetes* (Tana et al., 2010; Rajilić-Stojanović et al., 2011; Jeffery et al., 2012; Tap et al., 2017).

Обнаруженное в данном исследовании уменьшение доли последовательностей, принадлежащих типу *Firmicutes*, в выборках больших относительно группы ЗД наиболее выражено среди пациентов с заболеваниями кишечника. Наибольший вклад в эти различия внесли последовательности класса *Clostridia*, уменьшение доли которых в выборках СРК и ЯК было статистически значимым ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно). Одновременно

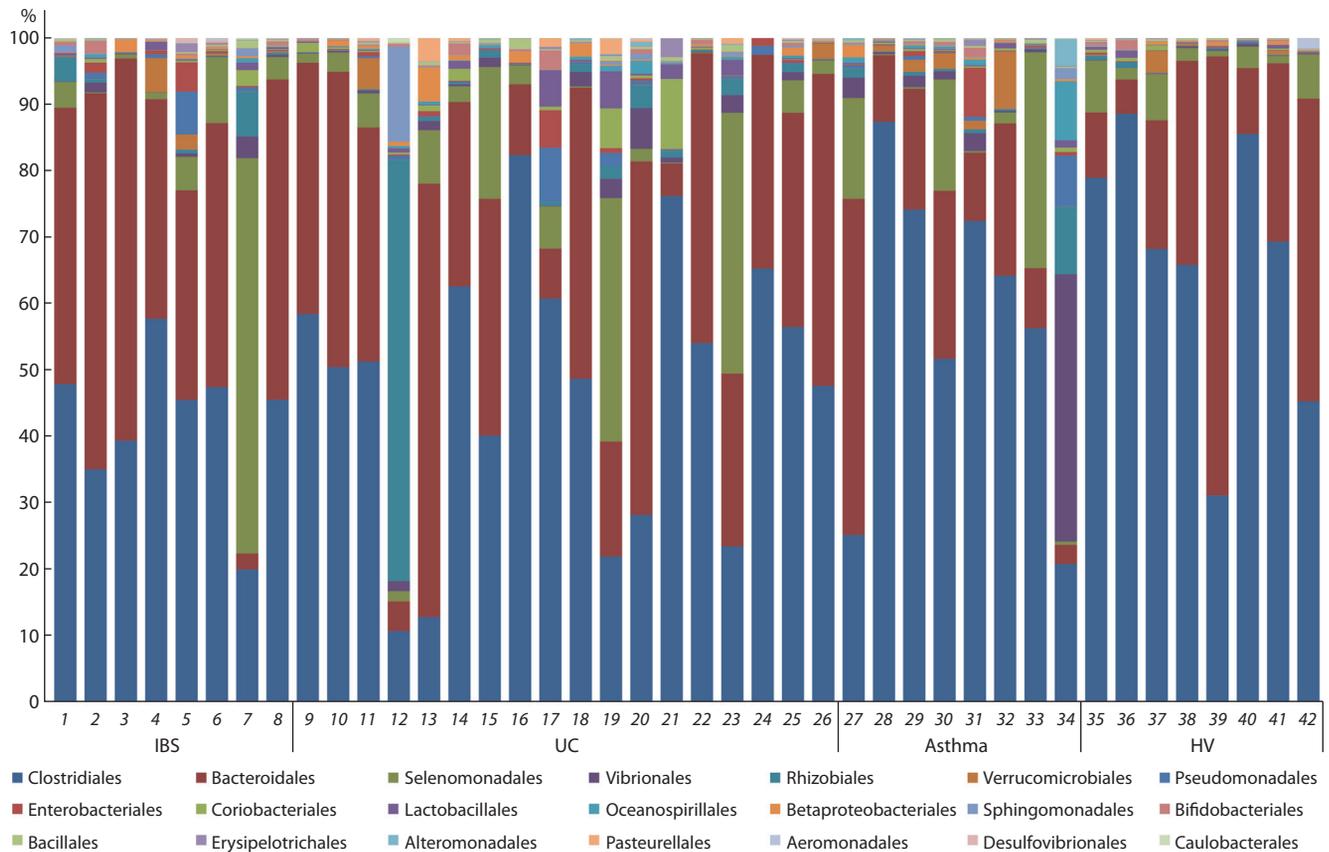


Fig. 3. Taxonomic classification of operational taxonomic units at the order level based on the Silva v.132 (full) database.

Samples 1–8 were obtained from patients with IBS; 9–26 from patients with UC; 27–34 from patients with bronchial asthma; and 35–42 from healthy volunteers (HV). Orders with abundance exceeding 0.1 % are shown.

доля последовательностей класса Negativicutes во всех группах больных, наоборот, увеличилась (см. табл. 1). Ранее отмечено, что при СРК уменьшается доля последовательностей семейств Ruminocossaceae и Erysipelotrichaceae, представители которых участвуют в продукции короткоцепочечных жирных кислот (Załęski et al., 2013; Pozuelo et al., 2015).

В данном исследовании также выявлено снижение доли последовательностей Ruminocossaceae как при СРК, так и при ЯК, однако доля последовательностей Erysipelotrichaceae в выборках пациентов с заболеваниями кишечника и БА существенно не изменилась по сравнению с ЗД (см. табл. 2). Среди последовательностей Ruminocossaceae особенно заметно снижение доли последовательностей *Faecalibacterium* spp. в группе СРК относительно ЗД ($p < 0.01$), что соответствует полученным ранее результатам (Rajilić-Stojanović et al., 2011; Rodiño-Janeiro et al., 2018). Кроме этого, следует отметить заметное увеличение доли последовательностей сем. Veillonellaceae среди больных, однако описанное в литературе увеличение доли последовательностей *Veillonella* spp. при СРК (Malinen et al., 2005; Tana et al., 2010; Riggsbee et al., 2012) в нашей работе не определено, хотя при ЯК наблюдалось. Не обнаружено существенных отличий встречаемости во всех исследуемых выборках последовательностей *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp., среди которых присутству-

ют патогенные и условно-патогенные виды. Зафиксировано существенное уменьшение доли последовательностей *Roseburia* spp. и *Lachnospira* spp. в группе БА (см. табл. 2). Ранее показано, что *Roseburia* spp. наряду с представителями родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* является основным продуцентом полиненасыщенных жирных кислот, уменьшение концентрации которых в кишечнике детей раннего возраста ассоциировано с риском развития БА (Chiu et al., 2019; Lee-Sarwar et al., 2020). Снижение числа представителей рода *Lachnospira* связано с увеличением относительного обилия представителей рода *Clostridium*, что, в свою очередь, также ассоциировано с повышением риска развития астмы у детей (Arieta et al., 2015; Stiemsma et al., 2016; Hufnagl et al., 2020).

В литературе описано уменьшение доли последовательностей, принадлежащих типу Bacteroidetes у пациентов с ЯК (Machiels et al., 2014). В нашем исследовании средняя доля последовательностей этого типа в группах ЯК и СРК, наоборот, несколько увеличилась по сравнению с ЗД (см. табл. 1), причем наиболее значимое увеличение зарегистрировано для последовательностей *Bacteroides* spp. (см. табл. 2). В выборке БА доля последовательностей Bacteroidetes незначительно уменьшилась по сравнению с ЗД, однако встречаемость последовательностей *Bacteroides* spp. в этой группе значимо не изменилась. Следует отметить, что в выборках СРК, ЯК и БА заметно увеличилось соотношение представителей

Table 2. Mean percentages of sequences from different bacterial taxa in 16S rRNA libraries

Taxon	IBS	UC	Asthma	HV
Ratio	1.4	1.8	3.5	2.6
Firmicutes/Bacteroidetes				
Firmicutes				
fam. Lactobacillaceae	< 0.1	0.1	0.1	< 0.1
<i>Lactobacillus</i> spp.	< 0.1	0.1	< 0.1	< 0.1
fam. Ruminococcaceae	31.5	31.8	43.3	51.4
<i>Faecalibacterium</i> spp.	5.4	18.4	17.0	23.6
fam. Erysipelotrichaceae	0.2	0.3	0.2	< 0.1
fam. Lachnospiraceae	6.3	11.5	7.3	9.9
<i>Roseburia</i> spp.	1.6	2.15	0.5	1.2
<i>Lachnospira</i> spp.	0.1	0.3	< 0.1	0.1
fam. Veillonellaceae	9.2	6.8	8.2	1.4
<i>Veillonella</i> spp.	< 0.1	2.5	< 0.1	0.1
Bacteroidetes				
fam. Prevotellaceae	8.8	4.8	3.2	9.3
fam. Bacteroidaceae	20.7	18.4	10.6	8.9
<i>Bacteroides</i> spp.	20.7	18.4	10.6	8.9
Proteobacteria				
fam. Beijerinckiaceae	0.7	2.0	1.0	0.2
<i>Methylobacterium</i> spp.	0.7	1.9	1.0	0.1
fam. Sphingomonadaceae	0.3	1.0	0.3	< 0.1
<i>Sphingomonas</i> spp.	0.3	0.8	0.2	< 0.1
fam. Burkholderiaceae	0.4	0.8	0.4	0.2
<i>Parasutterella</i> spp.	0.3	0.3	0.3	0.1
fam. Enterobacteriaceae	0.9	0.6	1.2	0.1
<i>Enterobacter</i> spp.	< 0.1	< 0.1	0.2	< 0.1
<i>Escherichia-Shigella</i>	0.6	0.4	0.2	< 0.1
fam. Halomonadaceae	0.2	0.3	1.4	< 0.1
<i>Halomonas</i> spp.	0.2	0.3	1.3	< 0.1
fam. Vibrionaceae	0.7	1.2	6.2	0.2
<i>Vibrio</i> spp.	0.7	1.2	6.2	0.2
Actinobacteria				
fam. Bifidobacteriaceae	0.4	0.5	0.3	0.3
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0.4	0.5	0.3	0.3

семейств Bacteroidaceae/Prevotellaceae по сравнению с ЗД (2.4, 3.8, 3.3 против 0.9 соответственно). Обычно доля последовательностей Bacteroidaceae больше у людей, питающихся преимущественно белковой пищей, а доля Prevotellaceae – у людей, отдающих предпочтение растительной пище: жителей средиземноморского региона, Юго-Восточной Азии и у вегетарианцев (Ley, 2016). Доминирующие виды из обоих семейств, обнаруживаемые в кишечной микробиоте человека, способны расщеплять различные растительные полисахариды (Flint et al., 2012), и для объяснения различий в исследуемых выборках необходима видоспецифическая характеристика образцов.

Значительные отличия обнаружены во встречаемости в исследуемых группах последовательностей типа Proteobacteria, ряд представителей которого относятся к патогенным и условно-патогенным бактериям. В выборках СРК, ЯК и БА по сравнению с ЗД вклад таких последовательностей был существенно выше (см. табл. 1), что коррелировало с описанными ранее данными для пациентов с СРК и ЯК (Saebo et al., 2005; Gradel et al., 2009; Sonnenberg, Genta, 2012; Bennet et al., 2015; Shin et al., 2015; Shen et al., 2018). При этом в группах пациентов заметно увеличилась доля последовательностей классов Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria: в частности, обнаружен рост встречаемости последовательностей родов *Methylobacterium* (сем. Beijerinckiaceae), *Sphingomonas* (сем. Sphingomonadaceae), *Parasutterella* (сем. Burkholderiaceae), *Halomonas* и *Vibrio* (сем. Halomonadaceae), а также последовательностей *Escherichia* spp. и *Shigella* spp. В выборке БА обнаружено значимо больше последовательностей рода *Enterobacter* (сем. Enterobacteriaceae). Важно отметить, что некоторые виды вышеперечисленных родов могут вызывать инфекции, особенно у людей со сниженным иммунитетом (Lai et al., 2011; Kovaleva et al., 2014; Baker-Austin et al., 2018; Chen et al., 2018). Более того, доказана ассоциация *Parasutterella*, в частности *P. excrementihominis*, с СРК и воспалительными заболеваниями кишечника (Shin et al., 2015; Chen et al., 2018). У пациентов по сравнению с ЗД не зафиксировано заметного увеличения последовательностей родов протеобактерий, членами которых являются хорошо известные инфекционные агенты: *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* (все сем. Enterobacteriaceae), *Acinetobacter* (сем. Moraxellaceae), *Pseudomonas* (сем. Pseudomonadaceae) и *Stenotrophomonas* (сем. Xanthomonadaceae). Несмотря на отсутствие заметного повышения доли последовательностей вышеперечисленных родов в группах СРК, ЯК и БА относительно ЗД факт увеличения встречаемости последовательностей Proteobacteria, в частности, Enterobacteriaceae, в исследуемых выборках библиотек от пациентов служит признаком дисбиоза кишечной микрофлоры (Shin et al., 2015).

Доля последовательностей типа Actinobacteria в группах ЯК и СРК в среднем превышала таковую для ЗД (см. табл. 1), однако вклад последовательностей *Bifidobacterium* spp. во всех четырех исследуемых выборках практически не различался (см. табл. 2), что не соответствует результатам, описанным ранее для пациентов с СРК (Malinen et al., 2005; Rajilić-Stojanović et al., 2011; Parkes et al., 2012; Zhuang et al., 2017). *Bifidobacterium* spp. наряду с *Lactobacillus* spp. (сем. Bacilli) способны модулировать состав кишечной микробиоты и влиять на иммунную систему человека путем взаимодействия с рецепторами CD209, экспонированными на поверхности дендритных клеток (Pace et al., 2015). Кроме того, отдельные представители этих родов секретируют бактериоцины – соединения, обладающие бактерицидным эффектом в отношении ряда патогенных бактерий (Angelakis et al., 2013; Rodiño-Janeiro et al., 2018). Отличий во встречаемости последовательностей лактобацилл в исследуемых группах также не обнаружено.

Заключение

В данном пилотном исследовании проведена сравнительная оценка биоразнообразия и таксономической структуры 16S-профилей кишечного микробиома пациентов с СРК, ЯК и БА и здоровых добровольцев. Подтверждены различия между кишечными сообществами бактерий у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника и таковыми у здоровых людей. В ряде случаев полученные нами данные согласуются с результатами аналогичных зарубежных исследований: уменьшение индекса Шеннона, соотношения и обилия представителей Firmicutes/Bacteroidetes и увеличение доли последовательностей Proteobacteria в микробиоме пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника в отличие от здоровых. Вместе с тем по некоторым показателям наши результаты отличаются от опубликованных ранее. Так, у пациентов с СРК и ЯК не уменьшилась доля последовательностей Egysipelotrichaceae, а даже несколько увеличилась (представители этого семейства продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты); не отмечено и уменьшение встречаемости лакто- и бифидобактерий (отвечают за продукцию полиненасыщенных жирных кислот). Также нетипично увеличение доли последовательностей Bacteroidetes, в частности *Bacteroides* spp., у больных ЯК и СРК вместо зарегистрированного ранее уменьшения (Machiels et al., 2014; Dubinsky, Braun, 2015); не обнаружен рост доли последовательностей *Veillonella* spp. при СРК. Подобные отличия могут быть объяснены как многократными попытками лечения пациентов, кишечные сообщества которых изучали, так и региональными характеристиками популяции и особенностями питания.

Следует отметить, что ранее мы описывали похожую выборку больных ЯК из Западной Сибири (Тикунов и др., 2020) и в целом данные по долям последовательностей из семейств, принадлежащих типам Firmicutes, Bacteroidetes и Actinobacteria, в обоих исследованиях существенно не различались; лишь доля последовательностей Proteobacteria в предыдущей работе была несколько меньше. Также в настоящем исследовании, в отличие от предыдущего, у пациентов с ЯК не обнаружены последовательности архей. Отсутствие существенных различий между 16S-профилями кишечных микробиомов двух групп больных ЯК свидетельствует об определенных региональных особенностях микробиоты таких пациентов. Вместе с тем в данное пилотное исследование включены лишь по 8, 18 и 8 образцов пациентов с СРК и ЯК и здоровых участников соответственно. Для вывода о том, являются ли обнаруженные тенденции закономерностями, необходимо продолжение исследований с использованием большего количества анализируемых образцов.

При этом ряд результатов исследования бактериальных сообществ пациентов с БА получены впервые. Выполненные до настоящего времени исследования включали изучение микробиоты лишь младенцев и детей постарше с БА, причем большая часть работ посвящена микробиоте дыхательных путей и ротовой полости. Исследования же содержимого кишечника детей с БА в основном сводились к поиску ассоциаций между содержанием определенных соединений и развитием астмы. В нашей работе оценены бактериальные сообщества кишечника взрослых паци-

ентов с БА. В связи с этим нельзя сделать заключение о том, насколько существенно обнаруженное увеличение соотношения Firmicutes/Bacteroidetes в выборке БА относительно ЗД. Ряд выявленных особенностей кишечной микробиоты взрослых с БА согласуются с описанными ранее показателями таковой у больных детей. Так, в кишечной микробиоте взрослых с БА, как и детей, определено уменьшение доли последовательностей *Roseburia* spp., *Lachnospira* spp., *Veillonella* spp., однако доля последовательностей *Faecalibacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. у взрослых пациентов, в отличие от детей, была такой же, как и у здоровых. Возможно, недостаточную представленность некоторых, но не всех бактерий в кишечной микробиоте детей с БА с годами компенсирует диета или прием пробиотиков. Также наблюдаемые различия могут быть связаны не с возрастом пациентов, а региональными особенностями питания. Выявленное в данном исследовании существенное превышение доли последовательностей Enterobacteriaceae в выборке БА по сравнению с ЗД закономерно, так как свидетельствует о дисбиозе кишечной микробиоты. Однако отсутствует достоверное объяснение обнаруженного нами значимого превышения доли последовательностей *Halomonas* и *Vibrio* в кишечной микробиоте пациентов с БА по сравнению не только со здоровыми добровольцами, но и больными СРК и ЯК. Важно, что указанные различия не связаны с особенностями питания пациентов с БА, поскольку доля последовательностей *Halomonas* spp. и *Vibrio* spp. у больных атопическим дерматитом, находившихся одновременно с пациентами с БА в том же отделении медицинского учреждения, не отличалась от таковой в группах ЗД, СРК и ЯК. Вышеперечисленные факты свидетельствуют о том, что дисбаланс кишечной микрофлоры, наблюдаемый при БА, ассоциирован с развитием этого заболевания, однако для понимания роли отдельных компонентов микробиоты кишечника в его патогенезе необходимы дальнейшие исследования с включением более объемных выборок.

Список литературы / References

- Тикунов А.Ю., Морозов В.В., Швалов А.Н., Бардашева А.В., Шрайнер Е.В., Максимова О.А., Волошина И.О., Морозова В.В., Власов В.В., Тикунова Н.В. Изменение кишечного микробиома пациентов с язвенным колитом после трансплантации кишечной микробиоты. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020; 24(2):168-175. DOI 10.18699/VJ20.610.
- [Tikunov A.Y., Morozov V.V., Shvalov A.N., Bardasheva A.V., Shrayner E.V., Maksimova O.A., Voloshina I.O., Morozova V.V., Vlasov V.V., Tikunova N.V. Fecal microbiome change in patients with ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(2):168-175. DOI 10.18699/VJ20.610. (in Russian)]
- Angelakis E., Merhej V., Raoult D. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. *Lancet Infect. Dis.* 2013;13(10):889-899. DOI 10.1016/S1473-3099(13)70179-8.
- Arrieta M.C., Stiemsma L.T., Dimitriu P.A., Thorson L., Russell S., Yurist-Doutsch S., Kuzeljevic B., Gold M.J., Britton H.M., Lefebvre D.L., Subbarao P., Mandhane P., Becker A., McNagny K.M., Sears M.R., Kollmann T. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci. Transl. Med.* 2015; 7(307):307ra152. DOI 10.1126/scitranslmed.aab2271.
- Bajer L., Kverka M., Kostovcik M., Macinga P., Dvorak J., Stehlikova Z., Brezina J., Wohl P., Spicak J., Drastich P. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and

- ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* 2017;23(25):4548-4558. DOI 10.3748/wjg.v23.i25.4548.
- Baker-Austin C., Oliver J.D., Alam M., Ali A., Waldor M.K., Qadri F., Martinez-Urtaza J. *Vibrio* spp. infections. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2018;4(1):8. DOI 10.1038/s41572-018-0005-8.
- Bennet S.M., Ohman L., Simren M. Gut microbiota as potential orchestrators of irritable bowel syndrome. *Gut Liver.* 2015;9(3):318-331. DOI 10.5009/gnl14344.
- Belizário J.E., Faintuch J., Garay-Malpartida M. Gut microbiome dysbiosis and immunometabolism: new frontiers for treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:1-12. DOI 10.1155/2018/2037838.
- Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 2007;69(2):330-339.
- Chen Y.J., Wu H., Wu S.D., Lu N., Wang Y.T., Liu H.N., Dong L., Liu T.T., Shen X.Z. Parasutterella, in association with irritable bowel syndrome and intestinal chronic inflammation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2018;33(11):1844-1852. DOI 10.1111/jgh.14281.
- Cheng Y.W., Fischer M. The present status of fecal microbiota transplantation and its value in the elderly. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* 2017;15(3):349-362. DOI 10.1007/s11938-017-0143-1.
- Chiu C.Y., Cheng M.L., Chiang M.H., Kuo Y.L., Tsai M.H., Chiu C.C., Lin G. Gut microbial-derived butyrate is inversely associated with IgE responses to allergens in childhood asthma. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2019;30(7):689-697. DOI 10.1111/pai.13096.
- Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14(1):20-32. DOI 10.1038/nrmicro3552.
- Dubinsky M., Braun J. Diagnostic and prognostic microbial biomarkers in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2015;149:1265-1274e3. DOI 10.1053/j.gastro.2015.08.006.
- Flint H.J., Scott K.P., Duncan S.H., Louis P., Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes.* 2012; 3(4):289-306. DOI 10.4161/gmic.19897.
- Fujimura K.E., Slusher N.A., Cabana M.D., Lynch S.V. Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010;8(4):435-454. DOI 10.1586/eri.10.14.
- Gradel K.O., Nielsen H.L., Schönheyder H.C., Ejlersen T., Kristensen B., Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology.* 2009;137(2):495-501. DOI 10.1053/j.gastro.2009.04.001.
- Hufnagl K., Pali-Schöll I., Roth-Walter F., Jensen-Jarolim E. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Semin Immunopathol.* 2020;42(1):75-93. DOI 10.1007/s00281-019-00775-y.
- Jalanka-Tuovinen J., Salojärvi J., Salonen A., Immonen O., Garsed K., Kelly F.M., Zaitoun A., Palva A., Spiller R.C., de Vos W.M. Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome. *Gut.* 2014;63(11):1737-1745. DOI 10.1136/gutjnl-2013-305994.
- Jeffery I.B., O'Toole P.W., Ohman L., Claesson M.J., Deane J., Quigley E.M., Simrén M. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut.* 2012; 61(7):997-1006. DOI 10.1136/gutjnl-2011-301501.
- Kovaleva J., Degener J.E., van der Mei H.C. Methylobacterium and its role in health care-associated infection. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(5):1317-1321. DOI 10.1128/JCM.03561-13.
- Lai C.C., Cheng A., Liu W.L., Tan C.K., Huang Y.T., Chung K.P., Lee M.R., Hsueh P.R. Infections caused by unusual Methylobacterium species. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(9):3329-3331. DOI 10.1128/JCM.01241-11.
- Lee-Sarwar K.A., Lasky-Su J., Kelly R.S., Litonjua A.A., Weiss S.T. Gut microbial-derived metabolomics of asthma. *Metabolites.* 2020; 10(3):97. DOI 10.3390/metabo10030097.
- Ley R.E. Gut microbiota in 2015: Prevoetella in the gut: choose carefully. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016;13(2):69-70. DOI 10.1038/nrgastro.2016.4.
- Machiels K., Joossens M., Sabino J., De Preter V., Arijis I., Eeckhaut V., Ballet V., Claes K., Van Immerseel F., Verbeke K., Ferrante M., Verhaegen J., Rutgeerts P., Vermeire S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2014; 63(8):1275-1283. DOI 10.1136/gutjnl-2013-304833.
- Malinen E., Rintilä T., Kajander K., Mättö J., Kassinen A., Krogius L., Saarela M., Korpela R., Palva A. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am. J. Gastroenterol.* 2005;100(2):373-382.
- Manichanh C., Borruel N., Casellas F., Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012;9(10):599-608. DOI 10.1038/nrgastro.2012.152.
- O'Hara A.M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006;7(7):688-693. DOI 10.1038/sj.embor.7400731.
- Pace F., Pace M., Quartarone G. Probiotics in digestive diseases: focus on Lactobacillus GG. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2015;61(4): 273-292.
- Parkes G.C., Rayment N.B., Hudspeth B.N., Petrovska L., Lomer M.C., Brostoff J., Whelan K., Sanderson J.D. Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 2012;24(1): 31-39. DOI 10.1111/j.1365-2982.2011.01803.x.
- Pozuelo M., Panda S., Santiago A., Mendez S., Accarino A., Santos J., Guarner F., Azpiroz F., Manichanh C. Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Sci. Rep.* 2015;5:12693. DOI 10.1038/srep12693.
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J.; MetaHIT Consortium, Bork P., Ehrlich S.D., Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65. DOI 10.1038/nature08821.
- Rajilić-Stojanović M., Biagi E., Heilig H.G., Kajander K., Kekkonen R.A., Tims S., de Vos W.M. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2011;141(5):1792-1801. DOI 10.1053/j.gastro.2011.07.043 2011.
- Rigsbee L., Agans R., Shankar V., Kenche H., Khamis H.J., Michail S., Paliy O. Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 2012;107(11):1740-51. DOI 10.1038/ajg.2012.287.
- Rodiño-Janeiro B.K., Vicario M., Alonso-Cotoner C., Pascua-García R., Santos J. A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. *Adv. Ther.* 2018;35(3):289-310. DOI 10.1007/s12325-018-0673-5.
- Saebo A., Vik E., Lange O.J., Matuszkiewicz L. Inflammatory bowel disease associated with Yersinia enterocolitica O:3 infection. *Eur. J. Intern. Med.* 2005;16(3):176-182.
- Shen Z.H., Zhu C.X., Quan Y.S., Yang Z.Y., Wu S., Luo W.W., Tan B., Wang X.Y. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* 2018;24(1): 5-14. DOI 10.3748/wjg.v24.i1.5.
- Shin N.R., Whon T.W., Bae J.W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33:496-503. DOI 10.1016/j.tibtech.2015.06.011.
- Sonnenberg A., Genta R.M. Low prevalence of *Helicobacter pylori* infection among patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2012;35(4):469-476. DOI 10.1111/j.1365-2036.2011.04969.x.
- Stiemsma L.T., Arrieta M.C., Dimitriu P.A., Cheng J., Thorson L., Lefebvre D.L., Azad M.B., Subbarao P., Mandhane P., Becker A.,

- Sears M.R., Kollmann T.R., Canadian Healthy Infant Longitudinal Development (CHILD) Study Investigators; Mohn W.W., Finlay B.B., Turvey S.E. Shifts in *Lachnospira* and *Clostridium sp.* in the 3-month stool microbiome are associated with preschool age asthma. *Clin. Sci. (Lond)*. 2016;130(23):2199-2207. DOI 10.1042/CS20160349.
- Su T., Rongbei L., Lee A., Long Ya., Du L., Lai S., Chen X., Wang L., Si J., Chung O., Chen S. Altered intestinal microbiota with increased abundance of *Prevotella* is associated with high risk of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterol. Research Pract.* 2018;2018:6961783. DOI 10.1155/2018/6961783.
- Tana C., Umesaki Y., Imaoka A., Handa T., Kanazawa M., Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 2010;22(5):512-519, e114-5. DOI 10.1111/j.1365-2982.2009.01427.x.
- Tap J., Derrien M., Törblom H., Brazeilles R., Cools-Portier S., Doré J., Störsrud S., Le Nevé B., Öhman L., Simrén M. Identification of an intestinal microbiota signature associated with severity of irritable bowel syndrome. *Gastroenterol.* 2017;152(1):111-123.e8. DOI 10.1053/j.gastro.2016.09.049.
- Wang Y., Qian P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One.* 2009;4:e7401. DOI 10.1371/journal.pone.0007401.
- Załęski A., Banaszkiewicz A., Walkowiak J. Butyric acid in irritable bowel syndrome. *Prz. Gastroenterol.* 2013;8(6):350-353. DOI 10.5114/pg.2013.39917.
- Zhuang X., Xiong L., Li L., Li M., Chen M. Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;32(1):28-38. DOI 10.1111/jgh.13471.

ORCID ID

A.Y. Tikunov orcid.org/0000-0000-0001-5613-5447
A.N. Shvalov orcid.org/0000-0001-6890-1575
I.V. Babkin orcid.org/0000-0001-7158-3774
A.V. Bardasheva orcid.org/0000-0002-3872-4122
V.V. Morozova orcid.org/0000-0002-0869-3476
V.V. Vlasov orcid.org/0000-0003-2845-2992
N.V. Tikunova orcid.org/0000-0002-1687-8278

Acknowledgements. This study was supported by the Russian Science Foundation, project 18-74-00082, and the Program of basic research for national academies of sciences in 2013–2020, project AAAA-A17-117020210027-9.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received May 4, 2020. Revised February 19, 2021. Accepted March 17, 2021.