

Клинические исследования микробиома человека. Стратегии применения методов и трансляция результатов в клиническую практику

С.И. Кошечкин^{✉1}, В.Е. Одинцова¹, А.В. Карасев², И.Н. Захарова³, И.В. Бережная³, А.Е. Кучина³, А.Е. Юдина⁴, И.С. Кузнецова³, Д.К. Дмитриева³, Я.В. Оробинская³, Л.С. Серикова⁵, А.В. Махаева^{3,6}, В.А. Романов¹

¹ООО «Нобиаз Технолджис», Москва, Россия;

²ООО Лаборатория «АБТ», Москва, Россия;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ГБУЗ «Городская клиническая больница №29 им. Н.Э. Баумана» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

⁵ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр высоких медицинских технологий – Центральный военный клинический госпиталь им. А.А. Вишневого» Минобороны России, Москва, Россия;

⁶ГБУЗ «Детская городская поликлиника №140» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Аннотация

Анализируются актуальные омиксные методы, которые имеют важное значение для научных исследований. Их применение позволяет изучить механизмы клинических проявлений путем анализа связей между характеристикой микробиоты и клиническими параметрами. Для представления сложных взаимодействий между микробиомом и метаболизмом хозяина наиболее релевантными являются методы метагеномики и метаболомики, которые способствуют поиску новых терапевтических подходов. На основании метагеномных данных осуществляется поиск ассоциированных таксонов, а метаболомный профиль указывает на результат жизнедеятельности микробного сообщества. Рассматриваются характеристики технологий для изучения метагеномов методом ампликонного секвенирования, оцениваются глубина идентификации микроорганизмов, уровень ошибок секвенирования и предпочтительность с точки зрения стоимости. Изучение эволюции патогенов и метаболических процессов, экспрессирующихся генов, а также детерминант антибиотикоустойчивости способствует разработке рациональных стратегий терапии заболеваний и контролю за распространением инфекционных заболеваний. В последние годы неуклонно растет количество научных проектов в области изучения микробиоты, что диктует необходимость повышения информированности врачей о современных методах и исследовательских подходах для применения актуальных данных в практической работе.

Ключевые слова: омиксные технологии, метагеномика, секвенирование гена *16S* рРНК, микробиота, биоинформатический анализ, альфа- и бета-разнообразие, метод баланса

Для цитирования: Кошечкин С.И., Одинцова В.Е., Карасев А.В., Захарова И.Н., Бережная И.В., Кучина А.Е., Юдина А.Е., Кузнецова И.С., Дмитриева Д.К., Оробинская Я.В., Серикова Л.С., Махаева А.В., Романов В.А., Клинические исследования микробиома человека. Стратегии применения методов и трансляция результатов в клиническую практику. Педиатрия. Consilium Medicum. 2024;1:15–24. DOI: 10.26442/26586630.2024.1.202774

© ООО «КОНСИЛИУМ МЕДИКУМ», 2024 г.

Введение

Изобретение микроскопа в XVII в. позволило впервые обнаружить обширный микромир и открыло возможность для наблюдения за ним. Следующим значительным шагом в развитии стало появление в XIX в. методов культивирования бактерий на питательных средах, что позволило не только наблюдать за микроорганизмами и описать около 12 тыс. видов [1], но и оценивать их способность разлагать различные субстраты, классифицировать по биохимическому профилю, создавать банки эталонных штаммов, искать маркеры для их выявления и точки влияния на них. Следующим шагом в данном направлении стало появление омиксных технологий (омиксов) – ОТ, получивших широкую популярность

благодаря инициативе изучения человеческого микробиома в рамках “Human Microbiome Project” [2] и глубоко внедривших «-омы» в клиническую практику (КП).

ОТ – это технологии ненаправленного изучения совокупности молекул какой-либо химической фракции целиком. Их можно поделить на 4 направления: геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика (табл. 1) [3]. Каждая из технологий может быть классифицирована на более мелкие омиксы и названа словом, производным от названия изучаемой фракции (метаболомика – в общем, липидомика – фракция липидов) и/или особенностей применяемых методик. В случае изучения какой-либо фракции от нескольких организмов сразу к названию любого омикса добавляется приставка

Информация об авторах / Information about the authors

✉ Кошечкин Станислав Игоревич – канд. биол. наук, дир. по науке ООО «Нобиаз Технолджис». E-mail: St.Koshechkin@gmail.com

Одинцова Вера Евгеньевна – гл. биоинформатик ООО «Нобиаз Технолджис»

Карасев Александр Владимирович – гл. исполнит. дир. ООО Лаборатория «АБТ»

Захарова Ирина Николаевна – д-р мед. наук, проф., зав. каф. педиатрии им. акад. Г.Н. Сперанского ФГБОУ ДПО РМАНПО, засл. врач РФ

Бережная Ирина Владимировна – канд. мед. наук, доц. каф. педиатрии им. акад. Г.Н. Сперанского ФГБОУ ДПО РМАНПО

Кучина Анастасия Евгеньевна – врач-педиатр ФГБОУ ДПО РМАНПО

Юдина Анастасия Евгеньевна – зав. отд.-нием патологии новорожденных и недоношенных детей ГБУЗ «ГКБ №29 им. Н.Э. Баумана»

✉ Stanislav I. Koshechkin – Cand. Sci. (Med.), Nobias Technologies LLC. E-mail: St.Koshechkin@gmail.com; ORCID: 0000-0002-7389-0476

Vera E. Odintsova – Chief bioinformatician, Nobias Technologies LLC. ORCID: 0000-0003-1897-4033

Alexander V. Karasev – Chief Executive Officer, Laboratory “ABT”. ORCID: 0000-0001-7484-4992

Irina N. Zakharova – D. Sci. (Med.), Prof., Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. ORCID: 0000-0003-4200-4598

Irina V. Berezhnaya – Cand. Sci. (Med.), Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. ORCID: 0000-0002-2847-6268

Anastasiya E. Kuchina – pediatrician, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. ORCID: 0000-0002-8998-264X

Anastasiya E. Yudina – Department Head, Bauman City Clinical Hospital №29. ORCID: 0000-0002-6920-8024

Clinical studies of the human microbiome. Strategies for applying methods and translating results into clinical practice: A review

Stanislav I. Koshechkin^{✉1}, Vera E. Odintsova¹, Alexander V. Karasev², Irina N. Zakharova³, Irina V. Berezhnaya³, Anastasiya E. Kuchina³, Anastasiya E. Yudina⁴, Irina S. Kuznetsova³, Diana K. Dmitrieva³, Yana V. Orobinskaya³, Liudmila S. Serikova⁵, Anastasia V. Makhaeva^{3,6}, Vladimir A. Romanov¹

¹Nobias Technologies LLC, Moscow, Russia;

²Laboratory "ABT", Moscow, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia;

⁴Bauman City Clinical Hospital №29, Moscow, Russia;

⁵National Medical Research Center for High Medical Technologies – Vishnevsky Central Military Clinical Hospital, Moscow, Russia;

⁶Children's City Polyclinic №140, Moscow, Russia

Abstract

Current omics methods, which are essential for scientific research, are overviewed. These methods enable studies of the mechanisms of clinical manifestations by analyzing the relationship between the microbiota characteristics and clinical parameters. To represent the complex interactions between the microbiome and host metabolism, metagenomics and metabolomics techniques that contribute to the search for new therapeutic approaches are most relevant. Based on the metagenomic data, the associated taxa are searched, and the metabolic profile indicates the result of the activity of the microbial community. The characteristics of technologies for studying metagenomes using the amplicon sequencing method are considered, and the depth of identification of microorganisms, the level of sequencing errors and the preference in terms of cost are evaluated. Studying the evolution of pathogens and metabolic processes, expressed genes, and determinants of antibiotic resistance contributes to the development of rational strategies for disease therapy and control of the spread of infectious diseases. In recent years, the number of scientific projects in the field of microbiota research has been steadily increasing, which necessitates the need to raise physicians' awareness of modern methods and research approaches in order to apply relevant data in practical work.

Keywords: omics technologies, metagenomics, 16S rRNA gene sequencing, microbiota, bioinformatics analysis, alpha and beta diversity, balance method

For citation: Koshechkin SI, Odintsova VE, Karasev AV, Zakharova IN, Berezhnaya IV, Kuchina AE, Yudina AE, Kuznetsova IS, Dmitrieva DK, Orobinskaya YaV, Serikova LS, Makhaeva AV, Romanov VA. Clinical studies of the human microbiome. Strategies for applying methods and translating results into clinical practice: A review. *Pediatrics. Consilium Medicum*. 2024;1:15–24. DOI: 10.26442/26586630.2024.1.202774

«мета-» (кроме метаболома). Например, методы изучения генетического материала микробного сообщества (МС) в целом относятся к метагеномным технологиям (МТ).

Появление МТ стало началом новой революции в экологии МС человека. Оказалось, что более 95% видов в составе микробиоты человека являются трудно культивируемыми или не культивируются совсем, соответственно, ранее они не выявлены микробиологическими методами [1]. Традиционное представление о том, что в толстой кишке человека преобладают бифидо- и лактобактерии, сменилось на восприятие микробиоты как сложнейшего биореактора, включающего в состав сотни и тысячи видов микробов. В связи с клиническими факторами найдены многочисленные «оси» связи микробиоты с любым клиническим состоянием, и, как результат, обнаружены новые биомаркеры для диагностики и возможности воздействия в целях лечения заболеваний [4].

Высокая сложность ОТ требует обучения высококвалифицированных узконаправленных лабораторных специалистов для каждой из них. При этом объем получаемых данных всего для одного образца настолько велик, что человеческий

Таблица 1. Разновидности ОТ в зависимости от фракции для изучения
Table 1. Varieties of omics technologies (OT) depending on the fraction to be studied

Название омикса	Фракция для изучения	Название относительно МС
Геномика	Тотальная ДНК в образце	Метагеномика
Транскриптомика	Совокупность РНК в образце	Метатранскриптомика
Протеомика	Совокупность белков и пептидов в образце	Метапротеомика
Метаболомика	Совокупность всех метаболитов, таких как сахара, липиды, органические кислоты и более мелкие соединения	Метаболомика

мозг не способен его осознать, поэтому обработку проводят с использованием биоинформатических подходов на вычислительных кластерах высокой мощности. В то же время интерпретировать результаты исследований должны специалисты в области медицины и биологии, что обеспечит их успешную трансляцию в КП. Соответственно, современные

Информация об авторах / Information about the authors

Кузнецова Ирина Сергеевна – ассист. каф. педиатрии им. акад. Г.Н. Сперанского ФГБОУ ДПО РМАНПО

Дмитриева Диана Кирилловна – аспирант каф. педиатрии им. акад. Г.Н. Сперанского ФГБОУ ДПО РМАНПО

Оробинская Яна Владимировна – аспирант каф. педиатрии им. акад. Г.Н. Сперанского ФГБОУ ДПО РМАНПО

Серикова Людмила Сергеевна – врач-педиатр, зав. детским отд-нием ФГБУ НМИЦ ВМТ–ЦВКГ им. А.А. Вишневого

Махаева Анастасия Владимировна – аспирант каф. педиатрии им. акад. Г.Н. Сперанского ФГБОУ ДПО РМАНПО; врач-педиатр, зав. отд-нием ГБУЗ ДГП №140

Романов Владимир Андреевич – менеджер клинических исследований ООО «Нобиаз Технолоджи».

Irina S. Kuznetsova – Assistant, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. ORCID: 0000-0001-5164-682X

Diana K. Dmitrieva – Graduate Student, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. ORCID: 0000-0002-1593-0732

Yana V. Orobinskaya – Graduate Student, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. ORCID: 0009-0005-2121-4010

Liudmila S. Serikova – pediatrician, National Medical Research Center for High Medical Technologies – Vishnevsky Central Military Clinical Hospital

Anastasia V. Makhaeva – Graduate Student, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, pediatrician, Department Head, Children's City Polyclinic №140. ORCID: 0000-0002-0006-5889

Vladimir A. Romanov – clinical research manager, Nobias Technologies LLC. ORCID: 0000-0002-7540-5884

исследования должны проводить мультидисциплинарные команды, одинаково понимающие особенности указанных методик. В статье описываются актуальные для клинических исследований (КИ) омиксные методы, рассматривается возможное их применение для изучения микробиоты кишечника человека, а также приводятся пути трансляции результатов таких исследований в КП.

Описание технологий

Приступая к изучению микробиома, о котором ничего не известно, не имеющего баз данных характерных микробных соединений или метаболических путей (МП), в первую очередь следует определиться с выбором ОТ. «Классификация» омиксных подходов к изучению микробиома вполне логична – каждый из них отвечает за определенную химическую фракцию, поэтому должен быть использован для конкретной задачи (табл. 2). В первую очередь необходимо узнать, какие микроорганизмы обитают в данной конкретной нише, а затем рассмотреть то, что происходит в результате их жизнедеятельности. Если один из МП представляет интерес, встает вопрос о том, как он реализуется.

Следовательно, в контексте КИ, направленных на понимание сложных взаимодействий между микробиомом и метаболизмом хозяина, а также на поиск новых терапевтических подходов с использованием про- и пребиотиков, наиболее релевантными являются технологии метагеномики и метаболомики [5]. При этом на основании метагеномных данных (МД) проводят поиск ассоциированных таксонов, а метаболомный профиль указывает на результат жизнедеятельности МС. В дальнейшем более глубокое изучение механизмов выявленных изменений возможно провести с использованием технологий транскриптомики и протеомики на выделенной культуре ассоциированных с клиническими факторами микробов.

Метагеномика

Метагеномика – это раздел молекулярной генетики, который изучает метагеном – набор генов микробов (последовательности ДНК) в пределах данной (одной) среды [5, 6]. Основной технологией для оценки метагеномов является высокопроизводительное секвенирование ДНК. В настоящее время наиболее распространены 2 технологии секвенирования, которые различаются по методу определения нуклеотидной последовательности (НП): секвенирование синтезом и установление НП с использованием нанопор [7, 8]. Среди наиболее «удобных» подходов к изучению метагенома чаще всего используют шотган-секвенирование – ШС (англ. shotgun sequencing) и ампликонное секвенирование (АС), что зависит от объема изучаемой генетической информации.

Технологии секвенирования

Наиболее распространенной технологией определения последовательности нуклеиновых кислот является секвенирование синтезом. Принцип ее работы заключается в детекции каждого присоединяющегося нуклеотида к строящейся цепи, комплементарной изучаемой ДНК. В общих чертах работу данной технологии можно описать следующим образом (рис. 1):

1) к специальным нуклеотидным адаптерам либо ферментам, иммобилизованным на проточной ячейке, прикрепляются фрагменты изучаемой ДНК;

2) по принципу комплементарности к строящейся цепи присоединяется нуклеотид с флуоресцентным красителем, который блокирует дальнейшую достройку цепи;

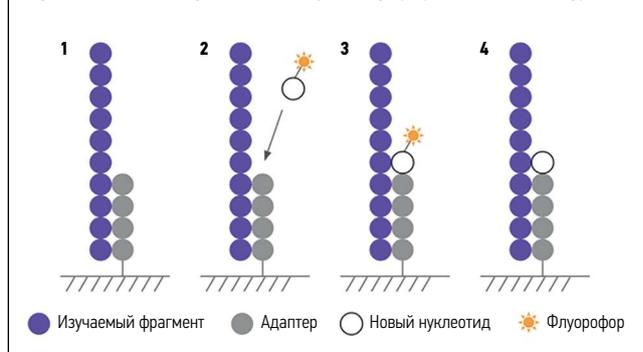
Таблица 2. Вопросы, на которые отвечает ОТ при изучении МС с точки зрения выполнения им метаболических функций

Table 2. Questions answered by OT in the study of the microbial community (MC) in terms of its metabolic functions

Технология	Пояснение	Вопрос
Метагеномика	Выявление микроорганизмов и предсказание их потенциальных функций	Кто живет?
Транскриптомика	Выявление генов, активных в конкретный момент	Как он это делает?
Протеомика	Выявление ферментов и других белков, задействованных при выполнении функции	Как он это делает?
Метаболомика	Выявление того, какой субстрат используется и какой результат получается после выполнения микроорганизмом своей функции	Что делает?

Рис. 1. Принципиальная схема работы технологии секвенирования синтезом.

Fig. 1. Schematic diagram of the sequencing by synthesis technology.

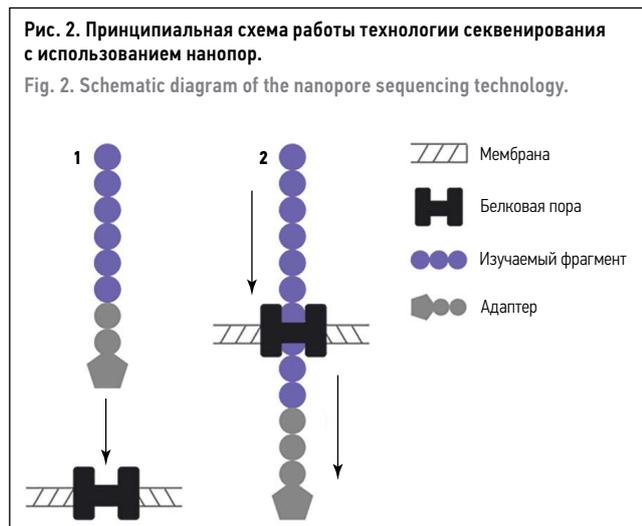


3) цвет красителя считывается детектором;

4) проводится отмывка от блокирующей достройку цепи красителя, а нуклеотид остается. После повторения цикла шагов 2–4 достаточное количество раз по набору флуоресцентных пиков можно с высоким качеством восстановить последовательность ДНК.

С учетом разрешающей способности детекторов сигнала, а также количества света, излучаемого единичным флуорофором, в большинстве приборов перед секвенированием проводится наработка изучаемой последовательности с образованием кластера идентичных ей копий [9]. В итоге мощность сигнала увеличивается многократно, однако это вносит ограничения в максимальную длину изучаемой ДНК (не более 300 нуклеотидов). В таком формате рассматриваемую технологию используют в приборах компаний Illumina (США), BGI (Китай) и в иных менее крупных. Другие компании, наиболее известной из которых является PacBio (США), пошли по пути использования сверхчувствительных детекторов и секвенирования одиночной молекулы, что позволило расшифровывать последовательности длиной до 25 тыс. нуклеотидов [10]. Однако в связи с высокой стоимостью такого подхода данная платформа достаточно ограничена для использования в России.

Принципиально другим подходом к считыванию НП является секвенирование с использованием нанопор, в основе которого лежит принцип определения разницы потенциалов при прохождении нуклеотидов разного размера через белковую нанопору. Не вдаваясь в технические детали, технология работает следующим образом (рис. 2):



1) к изучаемому фрагменту ДНК присоединяют специальный адаптер;

2) адаптер присоединяют к нанопоре, которая протягивает цепь ДНК сквозь мембрану;

3) с разных сторон мембраны поддерживают разницу потенциалов, а при прохождении нуклеотидов разного размера через пору пропускная способность поры меняется, что регистрируется детектором. Соответственно, по полученному графику изменений электропроводности нанопоры можно восстановить последовательность ДНК.

Хотя приведенная технология превосходит секвенирование синтезом по скорости и стоимости секвенирования, а главное – по длине возможной для расшифровки последовательности ДНК, количество ошибочно определенных нуклеотидов значительно выше. Наиболее известной компанией, использующей такую технологию в своих приборах, является Oxford Nanopore Technologies (Англия) [11].

Соответственно, в настоящее время в распоряжении исследователей присутствуют 3 платформы для секвенирования, которые различаются по количеству ошибок, длине секвенируемого фрагмента (рида), доступности в Российской Федерации и стоимости (табл. 3). Выбор платформы должен зависеть от целей эксперимента, исследуемого биоматериала и возможностей исследовательского коллектива.

Подходы к исследованию метагеномов

Оценка микробиоты с использованием МТ (или метагеномного секвенирования) делится на 2 принципиально разных подхода: ШС и АС (метабаркодинг), которые кардинально отличаются как с технической, так и со смысловой точек зрения, а выбор одного из них зависит от целей эксперимента и финансовых возможностей коллектива исследователей [13].

Шотган-секвенирование [14]

При использовании ШС из образца выделяют тотальную ДНК, дробят на фрагменты необходимой длины (зависит от платформы для секвенирования) и секвенируют на приборе. По полученному пулу генетической информации можно оценить полный состав микробиоты, вне зависимости от таксономической принадлежности (к бактериям, грибам, простейшим, вирусам), функциональные гены (метаболизм ксенобиотиков, резистентность к антибиотикам, токсигенность, вирулентность и т.д.), а также мобильные элементы (плазмиды, транспозоны и т.п.). В настоящее

Таблица 3. Сравнение характеристик проведения АС с использованием разных технологий и платформ [12]

Table 3. Comparison of the characteristics of amplicon sequencing (AC) using different technologies and platforms [12]

Метод	Стоимость	Точность, %	Минимальный таксономический уровень
Секвенирование синтезом, короткие риды (illumina, MGI и т.д.)	Средняя	99,98	Род
Секвенирование синтезом, длинные риды (PacBio)	Высокая	99,98	Вид
Нанопоровое секвенирование (Oxford Nanopore)	Низкая	98–99,5	Вид

время приведенный метод считается самым объемным с точки зрения количества получаемой информации о метагеноме. Однако большие возможности всегда связаны с огромными затратами, и, учитывая количество получаемой информации, рассматриваемый подход является достаточно дорогим, соответственно, редко применяется в КИ с размером выборки более 50 пациентов.

Ампликонное секвенирование

АС – наиболее распространенный в КИ подход, позволяющий обрабатывать тысячи образцов из-за сравнительно низкой стоимости. В основе данного подхода лежат выделение и секвенирование конкретного гена микроорганизмов (или его участка).

Наиболее известной модификацией является секвенирование гена *16S* рРНК для профилирования бактерий, который состоит из 9 гипервариабельных регионов (V1–V9), разделенных между собой консервативными участками. Полная последовательность гена *16S* рРНК взята за основу систематики микроорганизмов, т.к. позволяет отличать даже близкородственные виды между собой, что делает данную мишень идеальной для определения таксономического состава МС. Общая длина гена *16S* рРНК составляет около 1,5 тыс. нуклеотидов и может варьировать между микроорганизмами. В совокупности с тем, что для технологии секвенирования синтезом максимальная длина прочтений составляет не более 300 нуклеотидов (Illumina, MGI и др.) [15], при изучении метагеномов на данных платформах могут быть рассмотрены только отдельные гипервариабельные регионы. Например, для микробиоты кишечника чаще всего используют V3–V4 или только V4. В связи с тем что отдельно взятый регион может совпадать по составу у видов из одного рода, в большинстве случаев идентификация до уровня вида при рассматриваемом подходе невозможна. Тем не менее в настоящее время из-за распространенности данных платформ большинство исследований микробиоты выполняют именно в этом формате, а ассоциации проводят с родами и более высокими таксономическими уровнями. В случае использования технологий секвенирования длинных ридов (Nanopore, PacBio) возможно секвенировать полный ген *16S* и профилировать микробом до уровня видов и подвидов, что является неоспоримым преимуществом. Однако приведенные платформы только набирают популярность и уступают по количеству публикаций в открытом доступе.

Подход АС может быть распространен и на другие гены в зависимости от целей исследования. Например, для изучения

грибков используют внутренние спейсеры рибосомального оперона ITS1 и ITS2, для исследования простейших – ген *18S* рРНК, а в некоторых случаях – специфичные гены для типирования отдельных родов бактерий и потенциально для изучения функциональных генов, таких как гены резистентности к антибиотикам [16]. К сожалению, из-за высокой вариабельности геномов изучить вирусную фракцию целиком с помощью АС невозможно.

Проанализировав характеристики технологий для изучения метагеномов методом АС, мы пришли к выводу о том, что для скрининговых масштабных проектов по изучению микробиоты наиболее подходящей платформой является Oxford Nanopore [17], которая имеет наиболее выгодное сочетание по стоимости секвенирования и глубине идентификации микроорганизмов. При этом, с одной стороны, высокий уровень ошибок секвенирования является слабой стороной данной платформы, а с другой – процент сходства последовательности, определяющий принадлежность к одному виду, составляет 98, соответственно, таксономическая идентификация будет проходить более точно, чем в случае коротких ридов.

Следует подчеркнуть, что метагеномика – это новая и практически не стандартизированная область. Не существует методов объективного контроля аналитических характеристик ни для АС, ни для ШС. Следовательно, сравнивать результаты разных исследований или обрабатывать данные из разных научных проектов совместно будет некорректно. В таком ключе преимущество наиболее распространенных платформ в виде большого количества публикаций в открытом доступе становится малозначительным. Проблема стандартизации является фундаментальной технологической проблемой, и несколько коллективов в мире, включая нас, работают над ее решением. Возможно, в будущем появятся банки данных и стандартные протоколы, при использовании которых можно будет проводить прямое сравнение выборок между собой, однако в настоящее время данное направление только развивается, а сравнение корректно проводить только в рамках проектов, сделанных в одном коллективе на одинаковых реагентах. Особенно актуальна проблема унификации протоколов при изучении микробиоты сред с низкой биомассой, что само по себе представляет отдельную проблему анализа и интерпретации результатов. В качестве наглядного примера можно привести попытки описания «нормальной» микробиоты грудного молока. Отсутствие единых критериев включения, таких как возраст женщин, паритет родов, соматический статус, способ родов и т.п., подходов к идентификации бактерий, сроков сбора (молозиво, переходное, зрелое молоко), правил сбора молока (медицинским работником в максимально возможных стерильных условиях с использованием молокоотсоса или самой женщиной дома в ее же тару) и т.д., безусловно, создает препятствия для понимания истинного состава и значения микробиоты молока для матери и младенца [18].

Дизайн исследования и анализ данных

Дизайн исследования

Перед тем как начать исследование, необходимо сформулировать гипотезу, которую оно будет проверять, составить протокол, что позволяет продумать, какие сложности могут возникнуть и как их можно избежать. Плохо продуманный протокол может привести к тому, что уже после больших временных и денежных затрат становится понятно, что по собранным данным гипотезу невозможно ни подтвердить, ни опровергнуть.

В контексте исследований с использованием ОТ зачастую начальная гипотеза звучит довольно размыто, например такая как «определенное заболевание связано с изменениями микробиоты кишечника». Как правило, даже если размер набранной выборки позволяет определить, что изменения микробиоты есть, бывает сложно понять, что они значат с практической точки зрения. Дело в том, что в настоящее время не существует точного понимания того, что такое «нормальная» микробиота, в частности нет границ нормы для представленности определенных микробов, а определяемый состав микробиоты может зависеть от протокола пробоподготовки и секвенирования. Соответственно, на выходе исследователь получает внушительный список микробов, которые положительно или отрицательно ассоциированы с заболеванием, питанием либо лечением. Большая часть данных микробов являются обычными обитателями микробиоты и присутствуют как у больных, так и у здоровых людей, а в литературе далеко не всегда разъясняется значение каждого микроорганизма для здоровья человека.

Для того чтобы получить более осмысленные результаты, в первую очередь необходимо формализовать оценку клинического состояния пациентов и именно клинические показатели использовать в качестве основных конечных точек. ОТ следует применять для изучения механизма клинических проявлений, связывая характеристики микробиоты с клиническими параметрами.

Уже на начальном этапе планирования исследований можно создавать дорожную карту и прогнозировать ожидаемые результаты, на основе которых выбирать уточняющие методы или принимать решение о пересмотре гипотез и возвращении к исходным поисковым исследованиям. Другим аспектом является рассмотрение методов, планируемых к использованию в исследованиях. На начальных поисковых этапах предпочтительно использовать множество омиксных методов и получать об одном пациенте максимум возможной информации, а не только лабораторных данных.

Следует отметить, что при составлении дизайна проекта имеет смысл сфокусироваться на способе использования результатов. Во многих случаях исследователи руководствуются необъективными представлениями о важности того или иного типа микробиоты, опуская цель собственного проекта. Например, бытует широко распространенное мнение о большей важности пристеночной микробиоты относительно просветной. Данный тезис абсолютно верен, если исследователь хочет изучить патогенез, например, колоректального рака, однако абсолютно ошибочен, если целью является разработка неинвазивного метода диагностики заболевания. Следовательно, даже объект исследования необходимо подбирать, руководствуясь четко сформулированной гипотезой исследования.

Далее рассмотрим, какие именно характеристики обычно используют, а также какие статистические методы подходят для их изучения.

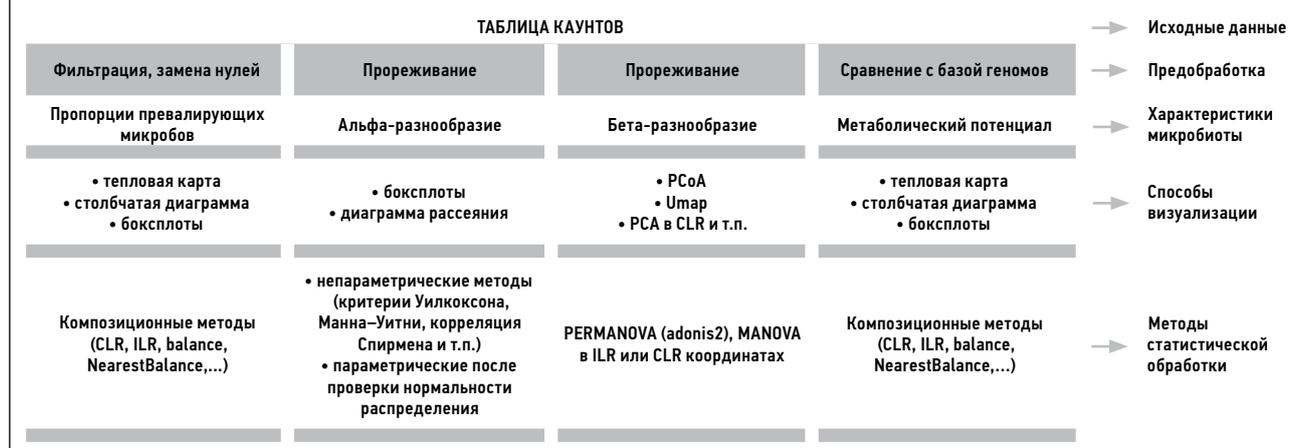
Анализ данных на примере АС

Анализ данных в целом состоит из биоинформатического (оценка состава каждого образца) и статистического анализов (сравнение выборок и поиск ассоциаций с различными факторами).

Биоинформатический анализ [19]

Биоинформатическая часть направлена на то, чтобы по данным, полученным с секвенатора, оценить состав микробиоты.

Рис. 3. Основные характеристики микробиома, способы их визуализации и статистического анализа.
 Fig. 3. The main characteristics of the microbiome, methods for their visualization and statistical analysis.



Существует множество инструментов для такого анализа, а выбор конкретного будет зависеть от платформы секвенирования и зачастую от личных предпочтений исследователя, т.к. многие из них сравнимы по точности.

Данные с секвенатора выглядят как текстовый файл, содержащий последовательности нуклеотидов для каждого ампликона (по-другому – рид или прочтение), а также баллы качества секвенирования. В каждом прочтении присутствуют служебные последовательности, необходимые для того, чтобы осуществить пробоподготовку и секвенирование, а также пометить разные образцы. Приведенные последовательности удаляют, а прочтения, относящиеся к разным образцам, разделяют. Затем проходит этап контроля качества секвенирования: в анализе оставляют только достаточно длинные и надежные прочтения (cutadapt, nanofilt). Если использовали технологию коротких прочтений, то для каждого ампликона будет получено 2 прочтения, которые затем «сшивают».

Полученные прочтения все еще содержат в себе ошибки секвенирования, поэтому к ним применяют различные алгоритмы, позволяющие уточнить последовательность прочтений (QIIME2, DADA2, Deblur, EMU, NanoClust). После этого можно сравнивать прочтения с базой данных микробов. Есть несколько часто используемых баз: NCBI, GreenGenes, SILVA, HitDB, которые отличаются полнотой данных (NCBI – самая полная, HitDB содержит только кишечные микробы), надежностью (остальные лучше курированы), частотой обновления (NCBI, GreenGenes и SILVA – наиболее современные).

Затем можно сделать поправку на копияность маркерного гена, которая у разных видов может сильно различаться. Однако в большинстве исследований данный шаг опускают, чему есть несколько причин. Во-первых, для многих микробов приведенных данных нет, приходится использовать методы, предсказывающие копияность ампликона на основе его последовательности. Во-вторых, обычно с практической точки зрения не так важно точно знать долю микроба в образце, важнее понять, ассоциирован ли он с заболеванием, приемом лекарства или с еще каким-то фактором. Копияность маркерного гена не так сильно влияет на приведенные выводы, особенно если они сделаны на уровне вида.

Каждый из шагов биоинформатического анализа может влиять на конечный результат. В целом разные инструменты дают все же примерно одинаковую оценку состава образцов. Наверное, наиболее важное и неочевидное влияние оказывает выбор референсной базы микробов. Таксономическая

классификация микробов постоянно меняется. Например, недавно многие виды *Lactobacillus* выделены в отдельный род *Lacticaseibacillus*. Соответственно, под одним и тем же названием *Lactobacillus* может скрываться разный набор видов в зависимости от года публикации, что затрудняет их прямое сравнение [20].

Характеристики микробиоты (рис. 3)

Как бы то ни было, после биоинформатической обработки в руках исследователя оказывается так называемая таблица каунтов, в которой для каждого образца указано, сколько ридов отнесено к определенному микробу. Общее количество ридов – покрытие образца – будет отличаться у разных образцов, т.к. из-за особенностей пробоподготовки невозможно точно его контролировать. Приведенная особенность важна для интерпретации: по результатам секвенирования нам известны только относительные представленности микробов, но не их абсолютное количество, которое можно уточнить, измерив его дополнительно с помощью qPCR. При этом важно нормировать данные значения, например на объем биоматериала либо на площадь взятия мазка. Иногда бывает трудно корректно сделать такую нормировку, соответственно, обычно используют именно относительные представленности микробов.

На рассматриваемом этапе уже можно использовать различные визуализации пропорций микробов, такие как тепловая карта или столбчатые диаграммы, которые позволяют оценить, есть ли в образцах загрязнение, соответствует ли состав ожиданиям. Однако для корректного сравнения образцов необходимо определить, какой набор микробов будет выбран за 100%. Дело в том, что из-за разного покрытия образцов точность их состава получается разной: чем больше получено ридов, тем больше микроорганизмов можно детектировать, а отсутствие микроба в образце может быть следствием низкого покрытия. Обычно данные фильтруют, убирая редкие и мало представленные микробы [21]. В настоящее время отсутствуют общепринятые пороги фильтрации. Обычно это выбор между тем, чтобы не упустить из внимания важные микробы, и тем, чтобы основывать выводы лишь на надежных данных. Для того чтобы контролировать присутствие важных микробов, можно проверить, какая доля микробиоты осталась в анализе после фильтрации. Для кишечной микробиоты после такой фильтрации обычно вместо сотен микробов остаются десятки, однако в анализе остается значительная часть микробиоты (80–95%). Если же после фильтрации в некоторых образцах остается мало микробов, то это может

означать, что в нем есть нехарактерные для остальной выборки, но высоко представленные микробы. Возможно, такие образцы стоит исключить из анализа как аутлаеры либо проводить отдельно качественный, а не количественный анализ присутствия таких микробов.

Помимо пропорций микробов обычно вычисляют еще 2 важные интегральные характеристики образцов: альфа- и бета-разнообразие [19]. Альфа-разнообразие – это характеристика одного образца, биоразнообразие микробиоты в нем. Бета-разнообразие – это характеристика 2 образцов – степень различия между ними. Для оценки приведенных показателей существует множество индексов. Индексы альфа-разнообразия могут в большей степени оценивать количество видов в микробиоте (индекс Chaol) либо равномерность их представленности (индекс Шеннона, индекс Симпсона). Для оценки бета-разнообразия используют различные меры, пришедшие из экологии, например меру UniFrac, индекс Жаккара, меру филогенетического сходства Фейта, или из математики (расстояние Эйтчисона). В одном исследовании можно использовать сразу несколько индексов альфа- и бета-разнообразия, т.к. каждый из них несет свой биологический смысл. Как правило, альфа- и бета-разнообразие вычисляется до фильтрации, т.к. она искажает разнообразие. Вместо этого данные прореживают до одного и того же количества ридов на образце, что позволяет нивелировать разницу влияния разного покрытия образцов. Исключение составляет расстояние Эйтчисона [22], которое напрямую оценивает сходство пропорций, соответственно, оно вычисляется после фильтрации.

Кроме того, на основании таблицы каунтов можно косвенно оценить метаболический потенциал микробиоты, используя базы геномного состава микроорганизмов. Необходимо понимать, что это лишь приблизительная оценка функций микробиоты, т.к. конкретные штаммы могут отличаться от референсных, в них есть отсутствующие в базе плазмиды, а часть генов может присутствовать, но не транслироваться. Метаболический потенциал можно оценивать на уровне не только отдельных генов, но и МП.

Статистический анализ

В целом в статистическом анализе, как и в биоинформатическом анализе данных секвенирования, нет устоявшихся подходов, а выбор доступных методов очень широк. Каждый обладает своими достоинствами и недостатками. Условно их можно разделить на покомпонентные и композиционные. Покомпонентные появились раньше и легче воспринимаются без специальных объяснений, композиционные – более математически строгие, однако более сложные в интерпретации. Однако современные рекомендации все же склоняют к использованию композиционных подходов.

Еще в 1897 г. К. Pearson указывал, что к композиционным данным нужен специфический подход [23]. Так, при увеличении абсолютной численности одного микроба в относительных представленных будит виден сдвиг всех пропорций, а доля остальных микробов упадет. Соответственно, например, можно сделать ложный вывод об отрицательной корреляции между микробами, которая не несет в себе биологического смысла: снижение доли одного микроба не ведет на практике к повышению абсолютной численности всех остальных, данный микроб не вытесняет все остальные. Более того, видимое увеличение относительной представленности разных микробов будет зависеть от их начальной представленности (рис. 4).

Для того чтобы избежать подобной путаницы, необходимо применять специальные методы, которые называют композиционными [24]. В их основе лежит другой подход к сравнению образцов: предлагается, во-первых, сравнивать не «на сколько» изменилась пропорция каждого микроба, а «во сколько раз», во-вторых, не рассматривать каждый микроб по-отдельности, а сравнивать изменения микробов между собой. Так, на рис. 4 доля m1 и m3 составляет 60% доли в первом образце, а доля m2 – 180%. Таким образом, можно заметить, что доля 1 и 3-го микробов поменялась одинаково, а 2-го – по-другому, его стало больше по отношению к другим двум микробам. Именно на комплексном анализе таких соотношений между компонентами и строится композиционный подход. У такого подхода есть обратная сторона – менее очевидная интерпретация результатов. Приходится оперировать не набором микробов, положительно и отрицательно ассоциированных с заболеванием или другим фактором, а соотношением между группами микробов. Как правило, для этого используется специальный термин – «баланс между двумя группами микробов» [25] – величина, которая характеризует, на сколько порядков в среднем различается доля микробов в одной и другой группе в данном образце. Например, в образцах на рис. 4 баланс 1 и 3-го микроба одинаковый, значения отрицательные, т.е. 1-го микроба меньше, чем 3-го. Опуская подробности, можно сказать, что различия между образцами состоят в балансе между m2 и остальными микробами.

Что же касается альфа- и бета-разнообразия, то здесь методы являются гораздо более устоявшимися. Как правило, для анализа бета-разнообразия используют пермутационный многомерный анализ вариации (PERMANOVA) [26], который дает оценку статистической значимости связи бета-разнообразия с различными факторами. Например, есть ли такое, что образцы больных с больными и здоровых со здоровыми больше похожи, чем образцы больных и здоровых.

Для анализа альфа-разнообразия обычно используют непараметрические методы (критерий Манна–Уитни, Уилкоксона, Крускала–Уоллиса). Можно также использовать более мощные параметрические методы (ANOVA, критерий Стьюдента и т.п.), однако вначале нужно проверить данные на нормальность распределения.

Трансляция омиксных исследований в КП

При соблюдении всех особенностей технологий изучения микробиоты, сбора выборок необходимого объема и тщательном анализе данных становится возможным приобретение знаний, пригодных для трансляции в КП.

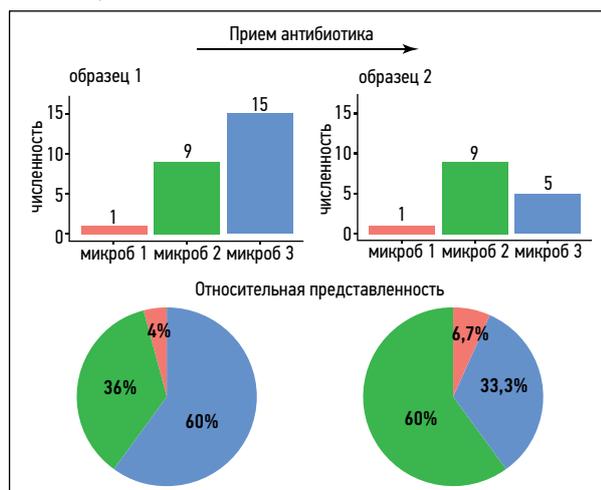
Логическим результатом завершения поисковых омиксных исследований является выявление маркеров, коррелирующих с клиническими показателями. Такими маркерами могут быть отдельные как конкретные физические объекты, такие как микроорганизмы или их группы, МП или результаты их выполнения, балансы микробов антагонистов и протагонистов, так и метрики оценки микробиома в целом, такие как альфа-разнообразие, богатство генов, экологическая устойчивость и др. Несмотря на то что найденная корреляция сама по себе не является доказательством причинно-следственной связи, она может быть использована для скрининговых целей как дополнительный маркер при оценке состояния здоровья человека.

Серьезные неинфекционные заболевания, ставшие глобальной проблемой общественного здравоохранения,

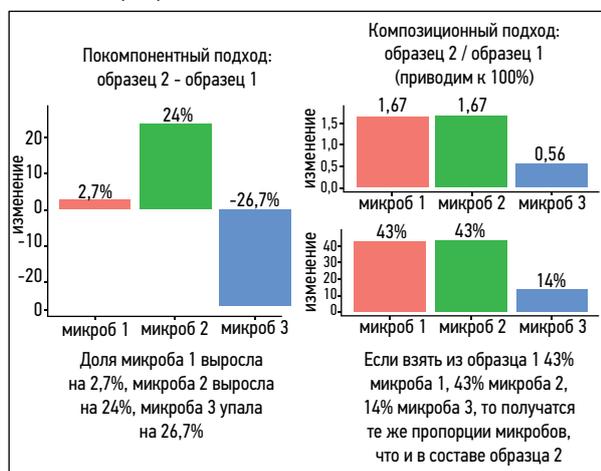
Рис. 4. Сравнение покомпонентного и композиционного сравнения к сравнению пропорций микробов на искусственном примере влияния антибиотика на микробиоту, состоящую из 3 микробов. Представим, что антибиотик действует избирательно только на микроб 3 и его численность падает в 3 раза:
 а – абсолютная и относительная представленность микробов до и после приема антибиотика. В абсолютном количестве меняется только 3-й микроб, в относительном – все 3 микроба;
 б – покомпонентное и композиционное определение различий между двумя образцами;
 с – сравнение выводов, которые можно было бы сделать на основе каждого подхода, с теми, которые можно сделать, зная абсолютные представленности микробов

Fig. 4. Component-by-component and compositional comparison vs the comparison of the proportions of microbes on a contrived example of the antibiotic effect on a microbiota consisting of 3 microorganisms

а. Состав образцов



б. Изменение пропорций



с. Какие можно сделать выводы:

Абсолютная численность:
 Антибиотик влияет только на микроб 3, снижает его численность

Покомпонентное сравнение:
 Антибиотик сильнее всего влияет на микроб 2 и микроб 3
 Антибиотик создает благоприятную среду для микроба 2 и подавляет рост микроба 3

Композиционное сравнение:
 Численность микроба 3 падает по отношению к численности остальных микробов. Возможно, антибиотик подавляет рост микроба 3 либо создает благоприятную среду для роста микроба 1 и микроба 2
 Соотношение микроба 1 и микроба 2 не меняется под воздействием антибиотика

объединяющие метаболические нарушения (ожирение, диабет), аллергию, воспалительные заболевания кишечника, психические расстройства, рассматриваются как следствие нарушения микробиоты одного или нескольких локусов человеческого организма – дисбактериоза/дисбиоза, который приобрел совершенно другое «звучание» и значение [4, 27].

Анализ состава микробиоты и ее функциональный потенциал позволяют прогнозировать риски развития данных нарушений, разрабатывать методы профилактики и лечения. Пожалуй, самый яркий пример – трансплантация микробиоты. Зародившийся еще в Древнем Китае метод фекальной трансплантации для лечения различных кишечных расстройств [28], предложенный в качестве терапии псевдомембранозного колита в виде клизм только в середине XX в. [29], наконец обрел «доказательства целесообразности и эффективности» на микробиологическом уровне, став многообещающим новым методом лечения инфекций, вызванных *Clostridioides difficile* [30], ожирения и других расстройств, связанных с метаболическим синдромом [31].

В 2021 г. запущена платформа для метаанализа метатранскриптома воспалительных заболеваний кишечника – IBD (TaMMA) – с большой статистической мощностью [32], авторы которой активно приглашают исследователей объединяться для создания «сообщества» по изучению воспалительных заболеваний кишечника. Совсем недавно с большим успехом платформа протестирована для анализа транскриптомных данных 18 исследований, посвященных изучению эозинофильного эзофагита. Оказалось, что хемоаттрактантный хемокин (CXCL14), экспрессируемый эпителием, стромальными клетками и тканевыми макрофагами, специфично реагирует на преобладающие в микробиоте пищевода *Streptococcus mitis* и *Hemophilus parainfluenzae*, что существенно отличает эозинофильный эзофагит от гастроэзофагеального рефлюкса и облегчает дифференциальную диагностику [33]. Возможно, в скором времени такой анализ позволит заменить инвазивную и неприятную для пациента эзофагогастроскопию, используемую в качестве основного диагностического инструмента. Более того, учитывая выявленную связь дисбиоза кишечника с онкогенезом, уже определены некоторые маркеры кишечного онкомикробиома (GOMS), которые предложены в качестве высокоэффективной ранней и экономически выгодной диагностики рака кишечника [34]. Если обнаруженным маркером является не конкретный микроорганизм или метаболит, а общая сигнатура или особенность микробиома, применяют другие методы для ее оценки, пока еще не получившие регистрационных удостоверений, на основании которых невозможно принять клинические решения. К примеру, полученные клинически описанные данные открывают возможность разработки предсказательных моделей или классификаторов. В упрощенном описании – это математический аппарат, позволяющий на основании полной композиции микробиоты одного образца отнести его к больным или здоровым, с разной степенью достоверности для разных заболеваний, в зависимости от выраженности изменений в микробиоте, объема и качества референсной выборки. Такой подход приобрел популярность в коммерчески доступных метагеномных тестах микробиоты. Тем не менее на основании такого результата нельзя говорить о рисках развития или защищенности от развития того или иного заболевания, можно только сказать о том, насколько похож микробиом конкретного человека на когорту с заболеванием относительно здоровых людей, с учетом всех описанных ограничений. Результаты приведенных

тестов следует трактовать с осторожностью и подтверждать конвенциональными клиническими и лабораторными анализами, указанными в клинических рекомендациях.

В настоящее время оценка влияния на микробиом различных диет, специализированного питания, про- и пребиотиков, а также лекарственных средств с помощью метагеномных методов является наиболее полным вариантом исследования. Однако, как мы уже говорили, микробиом в большинстве подобных случаев служит скорее для объяснения биологического механизма изменения клинической картины. Например, при изучении эффективности иммунотерапии для онкобольных получены наблюдения о том, что вариативность в ответе на терапию коррелирует с приемом антибиотиков. Одной из гипотез для дальнейшей работы является проверка корреляции состава микробиоты толстого кишечника и эффективности терапии. На данный момент проведено множество КИ на людях и на искусственных моделях, осуществлены проекты по пересадке микробиоты респондеров к нереспондерам с дальнейшим улучшением эффективности лечения. Таким образом, при оценке основного клинического параметра – эффективности терапии – обнаружен механизм улучшения лечения и ведется работа по подбору средств коррекции микробиоты. В дальнейших проектах состав микробиоты может являться одной из конечных точек, но только в том случае, если в распоряжении у исследователей имеется собственный набор референсных выборок от респондеров и нереспондеров. Если ведется исследование влияния, например, пробиотика на восстановление микробиоты после антибиотикотерапии, без сравнения с собственной референтной выборкой и только по известным из литературы маркерам, такой результат, скорее всего, не воспроизведется и не будет иметь перспективы трансляции.

Другим успешным примером трансляции результатов исследования микробиоты является разработка препаратов подходов для коррекции. Многие про- и пребиотики охарактеризованы на основании анализа больших выборок и выведены в коммерческое использование как биологически активные добавки или лекарственные средства [35]. Однако после обнаружения корреляций необходимо не только выделить штамм, но и провести большое количество доказательных *in vitro* и *in vivo* экспериментов для подтверждения наличия причинно-следственной связи и клинической эффективности в последующем. Отдельным классом препаратов в данном направлении стоит консорциум микробов, разработкой которого занимаются единичные компании в мире. Данный класс является очень перспективным, т.к. для коррекции микробиоты применяют не один микроб, который не выдержит конкуренции в устоявшейся экологической нише, а сформировавшийся консорциум, который отвечает за множество МП и способен эффективно заселить кишечник. Несмотря на то что данный подход еще не получил одобрение регуляторов и недоступен ни в России, ни в мире, мы считаем, что он – будущее препаратов для коррекции микробиоты, представляющее собой реализацию подхода по управлению функциями микробиоты и квинтэссенцию трансляционных метагеномных проектов.

Заключение

В 2007 г., на заре золотой эры исследования микробиома, Комитет Национального исследовательского совета (США) по метагеномике обозначил ее потенциальные возможности в сфере биомедицинских наук, заключающиеся в «глобальном

вкладе человеческого микробиома в здоровье и болезни отдельных лиц и популяций» [36]. Во многих странах запущены крупные проекты по изучению микробиоты, среди которых нашумевший Human Microbiome Project (HMP, США) [37], совместный Европейский проект, объединяющий 15 институтов из 8 стран, – «МЕТАгеномика кишечного тракта человека» (MetaHIT) [38], Инициатива изучения микробиома Китайской академии наук (CAS-CMI) [39] и др. В настоящее время, спустя 17 лет, совершенно очевидно, что надежды, возложенные на метагеномику и в целом на потенциал ОТ, превзошли ожидания, причем речь идет не только об успехах в борьбе с инфекционными заболеваниями и точной идентификации возбудителей (вирусов, бактерий, грибов), по сравнению с культуральными методами. Изучение эволюции патогенов, их метаболитов, транскрипционно активных факторов вирулентности, детекция генов антибиотикорезистентности и иные меры способствуют подбору рациональной специфической терапии, осуществлению четкого микробиологического контроля за инфекциями и их распространением [40].

В целом, как подчеркнуто ранее, из-за экспериментальной вариативности объединение и приведение десятков исследований к общему знаменателю для выявления «общих черт» кишечного (или иного другого) микробного профиля (дисбиоза), характерного для конкретного патологического состояния с использованием человеческого ресурса, – очень сложный путь, требующий участия большого числа специалистов с разными компетенциями, но с одной целью. Разрабатываются стандартизированные технологии лабораторного анализа, специальные платформы для анализа данных и цифровые биобанки, способные интегрировать и обрабатывать большие объемы МД и клинических данных, что «на годы» сокращает процесс получения достоверных результатов и ускоряет применение их на практике. Однако стоит учесть, что эффективная трансляция достижений современных исследований в КП возможна только при глубоком понимании сути ОТ клиницистом. Так, глубокая вера врачей в эффективность пробиотиков объясняется понятностью и прозрачностью механизмов их действия. Практикующему врачу не доставляет труда трактовать принцип «работы» пробиотического штамма и цель его назначения пациенту, что, безусловно, повышает комплаентность лечению и результат.

Мы не случайно привели в тексте нетривиальные примеры достижений ОТ в диагностике и лечении, надеясь привлечь интерес врачей к открывающимся возможностям и «намекая» на необходимость повышать свои знания в данной области, что особенно касается клиницистов-участников проектов по изучению микробиоты человека, набирающих в нашей стране «обороты». Недостаточная информированность, недопонимание или недобросовестность врача, участвующего в сборе образцов, приведут к неминуемому искажению результатов и фатальным ошибкам на этапе «слияния» МД с клиникой и их интерпретацией.

Раскрытие интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических

данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Авторы декларируют отсутствие внешнего финансирования для проведения исследования и публикации статьи.

Funding source. The authors declare that there is no external funding for the exploration and analysis work.

Литература / References

- Overmann J, Abt B, Sikorski J. Present and Future of Culturing Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2017;71:711-30. DOI:10.1146/annurev-micro-090816-093449
- Proctor LM. The National Institutes of Health Human Microbiome Project. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016;21(6):368-72. DOI:10.1016/j.siny.2016.05.002
- Chen C, Wang J, Pan D, et al. Applications of multi-omics analysis in human diseases. *MedComm (2020).* 2023;4(4):e315. DOI:10.1002/mco2.315
- Postler TS, Ghosh S. Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System. *Cell Metab.* 2017;26(1):10-30. DOI:10.1016/j.cmet.2017.05.008
- Aw W, Fukuda S. An Integrated Outlook on the Metagenome and Metabolome of Intestinal Diseases. *Diseases.* 2015;3(4):341-59. DOI:10.3390/diseases3040341
- Marco D. Metagenomics: Theory, Methods and Applications [Internet]. 2010. Available at: <https://books.google.com/books/about/Metagenomics.html?hl=&id=8kl8zQEACAAJ>. Accessed: 14.02.2023.
- Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep.* 2015;3(4):158-65. DOI:10.1007/s40142-015-0076-8
- Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, et al. Next Generation Sequencing (NGS): A Revolutionary Technology in Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1168:9-30. DOI:10.1007/978-3-030-24100-1_2
- Anderson MW, Schrijver I. Next generation DNA sequencing and the future of genomic medicine. *Genes (Basel).* 2010;1(1):38-69. DOI:10.3390/genes1010038
- Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016;107(1):1-8. DOI:10.1016/j.jygeno.2015.11.003
- Wang Y, Zhao Y, Bollas A, et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol.* 2021;39(11):1348-65. DOI:10.1038/s41587-021-01108-x
- Meslier V, Quinquis B, Da Silva K, et al. Benchmarking second and third-generation sequencing platforms for microbial metagenomics. *Sci Data.* 2022;9(1):694. DOI:10.1038/s41597-022-01762-z
- Usyk M, Peters BA, Karthikeyan S, et al. Comprehensive evaluation of shotgun metagenomics, amplicon sequencing, and harmonization of these platforms for epidemiological studies. *Cell Rep Methods.* 2023;3(1):100391. DOI:10.1016/j.crmeth.2022.100391
- Hillmann B, Al-Ghalith GA, Shields-Cutler RR, et al. Evaluating the Information Content of Shallow Shotgun Metagenomics. *mSystems.* 2018;3(6). DOI:10.1128/mSystems.00069-18
- de Muinck EJ, Trosvik P, Gilfillan GD, et al. A novel ultra high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing library preparation method for the Illumina HiSeq platform. *Microbiome.* 2017;5(1):68. DOI:10.1186/s40168-017-0279-1
- Gao B, Chi L, Zhu Y, et al. An Introduction to Next Generation Sequencing Bioinformatic Analysis in Gut Microbiome Studies. *Biomolecules.* 2021;11(4). DOI:10.3390/biom11040530
- Pugh J. The Current State of Nanopore Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2023;2632:3-14. DOI:10.1007/978-1-0716-2996-3_1
- LeMay-Nedjelski L, Copeland J, Wang PW, et al. Methods and Strategies to Examine the Human Breastmilk Microbiome. *Methods Mol Biol.* 2018;1849:63-86. DOI:10.1007/978-1-4939-8728-3_5
- Liu YX, Qin Y, Chen T, et al. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein Cell.* 2021;12(5):315-30. DOI:10.1007/s13238-020-00724-8
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020;70(4):2782-858. DOI:10.1099/ijsem.0.004107
- Cao Q, Sun X, Rajesh K, et al. Effects of Rare Microbiome Taxa Filtering on Statistical Analysis. *Front Microbiol.* 2020;11:607325. DOI:10.3389/fmicb.2020.607325
- Aitchison J. The statistical analysis of compositional data. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological).* 1982;44(2):139-77.
- Pearson K. Mathematical contributions to the theory of evolution – on a form of spurious correlation which may arise when indices are used in the measurement of organs. *Proceedings of the Royal Society of London (1854–1905).* 1896;60(1):489-98. DOI:10.1098/rsp.1896.0076. 10.1098/rsp.1896.0076
- Calle ML. Statistical Analysis of Metagenomics Data. *Genomics Inform.* 2019;17(1):e6. DOI:10.5808/GI.2019.17.1.e6
- Egozcue JJ, Pawłowsky-Glahn V. Groups of parts and their balances in compositional data analysis. *Mathematical Geology.* 2005;37:795-828. DOI:10.1007/s11004-005-7381-9
- Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 2001;26:32-46. DOI:10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x
- Shapiro H, Suez J, Elinav E. Personalized microbiome-based approaches to metabolic syndrome management and prevention. *J Diabetes.* 2017;9(3):226-36. DOI:10.1111/1753-0407.12501
- Zhang F, Luo W, Shi Y, et al. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol.* 2012;107(11):1755; author reply p.1755-6. DOI:10.1038/ajg.2012.251
- Collins DC. Pseudomembranous enterocolitis. Further observations on the value of donor fecal enemas as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Am J Proctol.* 1960;2:389-91.
- Rao K, Safdar N. Fecal microbiota transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Med.* 2016;11(1):56-61. DOI:10.1002/jhm.2449
- Marotz CA, Zarrinpar A. Treating Obesity and Metabolic Syndrome with Fecal Microbiota Transplantation. *Yale J Biol Med.* 2016;89(3):383-8.
- Massimino L, Lamparelli LA, Houshyar Y, et al. The Inflammatory Bowel Disease Transcriptome and Metatranscriptome Meta-Analysis (IBD TaMMA) framework. *Nat Comput Sci.* 2021;1(8):511-5. DOI:10.1038/s43588-021-00114-y
- Massimino L, Barchi A, Mandarino FV, et al. A multi-omic analysis reveals the esophageal dysbiosis as the predominant trait of eosinophilic esophagitis. *J Transl Med.* 2023;21(1):46. DOI:10.1186/s12967-023-03898-x
- Thomas AM, Fidelle M, Routy B, et al. Gut OncoMicrobiome Signatures (GOMS) as next-generation biomarkers for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2023;20(9):583-603. DOI:10.1038/s41571-023-00785-8
- World Gastroenterology Organisation practice guideline: Probiotics and prebiotics. *Arab J Gastroenterol.* 2009;10(1):33-42. DOI:10.1016/j.ajg.2009.03.001
- National Research Council (US) Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications. *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet.* Washington (DC): National Academies Press (US), 2007. DOI:10.17226/11902
- NIH HMP Working Group; Peterson J, Garges S, Giovanni M et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2009;19(12):2317-23. DOI:10.1101/gr.096651.109
- MetaHIT. Available at: <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/metahit>. Accessed: 15.02.2023.
- Shi W, Qi H, Sun Q, et al. gcMeta: a Global Catalogue of Metagenomics platform to support the archiving, standardization and analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D637-48. DOI:10.1093/nar/gky1008
- Nam NN, Do HDK, Loan Trinh KT, Lee NY. Metagenomics: An Effective Approach for Exploring Microbial Diversity and Functions. *Foods.* 2023;12(11). DOI:10.3390/foods12112140

Статья поступила в редакцию / The article received: 10.10.2023

Статья принята к печати / The article approved for publication: 12.04.2024



OMNIDOCTOR.RU