



Микробиота кишечника при комбинированном лечении колоректального рака с использованием аутопробиотиков

Ермоленко Е. И.¹, Алехина Г. Г.¹, Кашенко В. А.², Захаренко А. А.³, Тен О. А.³, Морозова А. С.¹, Цапиева А. Н.¹, Ильина А. С.², Тимофеев Т. О.², Пунченко О. Е.¹, Гладышев Н. С.¹, Дмитриев А. В.¹, Суворов А. Н.¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», (ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-Петербург, 197022, Россия)

² Федерального государственного бюджетного учреждения «Северо-Западный окружной научно-клинический центр имени Л. Г. Соколова», (пр. Культуры, д. 4, Санкт-Петербург, 194291, Россия)

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени Павлова И. П.», (ул. Льва Толстого, д. 6–8, г. Санкт-Петербург, 197022, Россия)

Для цитирования: Ермоленко Е. И., Алехина Г. Г., Кашенко В. А., Захаренко А. А., Тен О. А., Морозова А. С., Цапиева А. Н., Ильина А. С., Тимофеев Т. О., Пунченко О. Е., Гладышев Н. С., Дмитриев А. В., Суворов А. Н. Микробиота кишечника при комбинированном лечении колоректального рака с использованием аутопробиотиков. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2023; 218(10): 63–76. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-218-10-63-76

✉ Для переписки:

Ермоленко Елена Игоревна

ermolenko1@yandex.ru

Ермоленко Елена Игоревна, д. м. н., заведующий лабораторией персонализированной микробной терапии научно-образовательного центра «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины»

Алехина Галина Геннадьевна, к. м. н., ст. н. сотр. лабораторией персонализированной микробной терапии научно-образовательного центра «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины»

Кашенко Виктор Анатольевич, д. м. н., профессор, заведующий кафедрой факультетской хирургии; заместитель генерального директора по научно-образовательной работе, главный хирург

Захаренко Александр Анатольевич, д. м. н. профессор, руководитель отдела онкохирургии, заведующий кафедрой онкологии

Тен Олег Андреевич, к. м. н. научный сотрудник отдела онкохирургии, ассистент кафедры стоматологического факультета с курсом колопроктологии

Морозова Анастасия Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории онколитических бактерий, научно-образовательного центра «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины»

Цапиева Анна Николаевна, к. б. н., заведующий лабораторией онколитических бактерий, научно-образовательного центра «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины»

Ильина Анастасия Сергеевна, врач-гастроэнтеролог

Овчинников Тимофей Сергеевич, аспирант

Пунченко Ольга Евгеньевна, к. м. н., старший научный сотрудник, научно-образовательного центра «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины»

Гладышев Никита Сергеевич, научный сотрудник, научно-образовательного центра «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины»

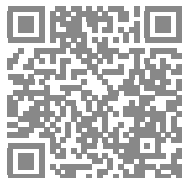
Дмитриев Александр Валентинович, д. б. н., профессор РАН, заведующий научно-образовательным центром «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины»

Суворов Александр Николаевич, д. м. н., профессор, заведующий отделом персонализированной микробной научно-образовательного центра «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины»

Резюме

Несмотря на большие успехи в лечении онкологических заболеваний, остается актуальной разработка медицинских технологий, позволяющих предотвратить или уменьшить осложнения терапии, в частности, связанные с оперативным вмешательством и введением антибиотиков.

EDN: ULGBRD



Целью исследования явилась оценка эффективности использования аутопробиотиков на основе индигенных непатогенных штаммов *Enterococcus faecium* и *E. hirae* при комплексной терапии колоректального рака (КРР) в раннем послеоперационном периоде. Использование аутопробиотиков не вызывало побочных эффектов, приводило к снижению уровня провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-18 в сыворотке крови. Выявлены особенности микробиома кишечника у больных с КРР, принципиально отличающиеся от данных других авторов увеличением альфа-биоразнообразия,

представительства лактобацилл, бифидобактерий, *Bacteroides thetaiotaomicron* и его дополнительные различия, связанные с отсутствием непатогенных энтерококков: большее количество *Parvimonas micra*, меньшее количество *Akkermansia* sp., увеличение содержания *Klebsiella* sp., *Fusobacterium nucleatum* и *Clostridium perfringens*. Применение аутопробиотиков приводило к элиминации *P. micra*, снижению количественного содержания *C. perfringens*, что способствовало нормализации микробиоты у большинства пациентов.

Доказана эффективность аутопробиотиков при терапии КРП, которая, по-видимому, связана с изменением состава кишечного микробиоценоза.

Ключевые слова: микробиом, *Enterococcus* spp., *Parvimonas micra*, альфа-разнообразие, дисбиоз кишечника, интерлейкины



<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-218-10-63-76>

Gut microbiota in the combined treatment of colorectal cancer using autoprobiotics

E. I. Ermolenko¹, G. G. Alyokhina¹, V. A. Kashchenko², A. A. Zakharenko³, O. A. Ten³, A. S. Morozova¹, A. N. Tsapieva¹, O. B. Gushchina², T. O. Timofeev², A. S. Ilyina², O. E. Punchenko¹, N. S. Gladyshev¹, A. V. Dmitriev¹, A. N. Suvorov¹

¹ Institute of Experimental Medicine, (12 Akademika Pavlova St., St. Petersburg, 197022, Russia)

² North-Western district scientific and clinical centre named after L. G. Sokolov Federal Medical and Biological Agency, (4 Kultury Ave., St. Petersburg, 194291, Russia)

³ Academician I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, (6–8, Lva Tolstoy str., St. Petersburg, 197022, Russia)

For citation: Ermolenko E. I., Alyokhina G. G., Kashchenko V. A., Zakharenko A. A., Ten O. A., Morozova A. S., Tsapieva A. N., Gushchina O. B., Timofeev T. O., Ilyina A. S., Punchenko O. E., Gladyshev N. S., Dmitriev A. V., Suvorov A. N. Gut microbiota in the combined treatment of colorectal cancer using autoprobiotics. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2023; 218(10): 63–76. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-218-10-63-76

✉ **Corresponding author:**

Elena I. Ermolenko
leermolenko1@
yandex.ru

Elena I. Ermolenko, Doctor of Medical Sciences, Head, Laboratory of Personalized microbial therapy of the Research and educational centre for molecular basis of interaction between microorganisms and human. World-class research centre for personalized medicine; ORCID: 0000-0002-2569-6660

Galina G. Alyokhina, PhD of medical sciences, Research Associate of the research and educational centre for molecular basis of interaction between microorganisms and human, World-class research centre for personalized medicine; ORCID: 0000-0003-0275-6621

Viktor A. Kashchenko, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Faculty Surgery; Deputy Director General for Scientific and Educational Work, Chief Surgeon; ORCID: 0000-0002-4958-5850

Alexander A. Zakharenko, Doctor of Medical Sciences, Professor. Head of the Department of Oncosurgery. Chair of the Department of Oncology. Faculty of Postgraduate Education; ORCID: 0000-0002-8514-5377

Oleg A. Ten, PhD (Medicine), Research Scientist of the Department of Oncosurgery. Assistant of the Department of Surgical Diseases of the Stomatology Faculty with a course of coloproctology; ORCID: 0000-0002-9927-5607

Anastasia S. Morozova, Junior Researcher at the Laboratory of Oncolytic Bacteria, Scientific and Educational Center "Molecular Foundations of Interaction between Microorganisms and Humans" NCMU "Center for Personalized Medicine"; ORCID: 0009-0004-5269-0039

Anna N. Tsapieva, PhD, Head of the Laboratory of Oncolytic Bacteria, Scientific and Educational Center "Molecular Foundations of Interaction between Microorganisms and Humans" NCMU "Center for Personalized Medicine"; ORCID: 0000-0001-7878-6339

Anastasia S. Ilyina, gastroenterologist; ORCID: 0000-0002-7925-7743

Timofey S. Ovchinnikov, Postgraduate student; ORCID: 0000-0002-4961-7381

Olga E. Punchenko, Ph.D., Senior Researcher, Scientific and Educational Center "Molecular Foundations of interaction between microorganisms and humans" NCMU "Center for Personalized Medicine"; ORCID: 0000-0002-1847-3231

Nikita S. Gladyshev, Researcher, Scientific and Educational Center "Molecular Foundations of Interaction between Microorganisms and Humans" NCMU "Center for Personalized Medicine"; ORCID: 0000-0003-2732-5676

Alexander V. Dmitriev, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Scientific and Educational Centre "Molecular Foundations of Interaction between Microorganisms and Humans" NCMU "Centre for Personalized Medicine"; ORCID: 0000-0002-6214-9770

Alexander N. Suvorov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Personalized Microbial Research and Educational Centre "Molecular Foundations of Interaction between Microorganisms and Humans" NCMU "Centre for Personalized Medicine"; ORCID: 0000-0003-2312-5589

Summary

Despite great advances in the treatment of oncological diseases, the development of medical technologies to prevent or reduce complications of therapy, in particular, those associated with surgery and the introduction of antibiotics, remains relevant. The aim of the study was to evaluate the effectiveness of the use of autoprobiotics based on indigenous non-pathogenic strains of *Enterococcus faecium* and *E. hirae* in the complex therapy of colorectal cancer (CRC) in the early postoperative period.

The use of autoprobiotics did not cause side effects and led to a decrease in the level of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-18) in the blood serum. The features of the intestinal microbiome in patients with CRC were revealed, which are fundamentally different from those of other authors by an increase in alpha- biodiversity, lactobacilli, bifidobacteria, *Bacteroides thetaiotaomicron* and its additional differences associated with the absence of non-pathogenic enterococci: a greater amount of *Parvimonas micra*, a smaller amount of *Akkermansia* spp., an increase in the content of *Klebsiella* sp., *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium perfringens*.

The use of autoprobiotics led to the elimination of *P. micra*, a decrease in *C. perfringens*, which led to the normalization of the microbiota in most patients. The effectiveness of autoprobiotics in the treatment of CRC has been proven, which, apparently, is associated with a change in the composition of intestinal microbiocenosis.

Keywords: microbiome, *Enterococcus* spp., *Parvimonas micra*, alpha-biodiversity, intestinal dysbiosis, interleukins

Введение

Выявлена связь между особенностями состава микробиоты кишечника и развитием онкологических заболеваний, в частности, колоректального рака (КРР). Качественные и количественные нарушения микробиоценоза напрямую связаны с проявлениями иммунологического дисбаланса, как правило проявляющегося подавлением врожденного и гуморального иммунитета, пролиферацией лимфоидной ткани, разобщением механизмов ограничения роста и лизиса опухолевой ткани [1–4]. Несмотря на достаточно противоречивые данные, выявленные при метаанализе состава микробиоты и метаболома при КРР [5], при этой патологии чаще всего наблюдается уменьшение биологического разнообразия и увеличение представителей родов *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Prevotella*, *Clostridium* и филума *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*) [5–11]. Увеличение количества представителей таких видов бактерий, как *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus* spp., *Parvimonas micra* и *Peptostreptococcus stomatis* также имеет высокую степень корреляции с КРР [5, 12–13]. Важную роль в генезе КРР играют патогенные *Escherichia coli* [14], *Enterococcus faecalis* [15], муколитические бактерии *Akkermansia muciniphila* [16] и индукторы синтеза холестерина *Peptostreptococcus anaerobius*, стимулирующие пролиферацию колоноцитов [17].

Также к числу онкогенных бактерий относят сульфидогенные бактерии [18], сальмонеллы и другие патогенные микроорганизмы, способствующие развитию воспаления в толстой кишке [19].

В то же самое время у бактерий, принадлежащих к родам *Collinsella*, *Slackia*, *Faecalibacterium* и *Roseburia*, выявлен антионкогенный эффект [20–23]. Механизмы противоопухолевой защиты обнаружены у пробиотических бактерий *Streptococcus faecalis*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus mesentericus*, *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) 299v, *L. plantarum*, *Lactisacibacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. (в частности, *B. longum*) и *Saccharomyces cerevisiae* [24–29].

Противоопухолевый эффект пробиотиков связывают с ингибированием колонизации слизистой оболочки кишечника патогенными бактериями, усилением барьерных функций кишечника, стимуляцией выработки муцина и экспрессией белков плотных контактов. Они способствуют «гомеостатическим» иммунным реакциям, увеличивая пролиферацию Treg-клеток, регулируя выработку провоспалительных цитокинов и усиливая апоптоз раковых клеток [30].

Применение пробиотиков целесообразно в процессе лечения больных КРР на всех этапах: в периоперационном и в отдаленном послеоперационном периоде, на фоне использования облучения и введения цитостатиков, так как все указанные традиционные способы терапии оказывают отрицательное воздействие на организм, одним из которых является усугубление дисбиоза кишечника [28, 31–32]. В ряде случаев недостаточная эффективность пробиотиков, быстрое выведение из организма, побочные эффекты, связанные с их приемом: ацидоз, диспепсия, инфекционные осложнения [33–34] обусловили поиск альтернативных методов коррекции клинко-лабораторных показателей при КРР. В ФГБНУ «ИЭМ» разработана медицинская технология, позволяющая до начала терапии выделять из образцов микробиоты кишечника индигенные полезные бактерии, а вовремя и после проведения комплекса лечебных мероприятий вводить для восстановления кишечного микробиоценоза аутопробиотические штаммы в тех же количествах, что и пробиотические [35]. Применение аутопробиотиков в качестве персонифицированного функционального пищевого продукта (ПФПП) — новый терапевтический подход, имеющий ряд преимуществ по сравнению с применением промышленных пробиотиков. Основным преимуществом применения индигенных непатогенных штаммов лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков являются: биологическая совместимость с другими представителями микробиоты хозяина, адаптация к условиям обитания в организме, отсутствие дополнительной нагрузки

на иммунную систему и благотворное влияние на пищеварение. Эти феномены изучены на биологической модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза кишечника [36–38]. Актуальность использования аутопробиотических энтерококков доказана также при терапии многих соматических заболеваний и коррекции дисбиотических состояний [39–41].

Материалы и методы

Исследование проводилось на пациентах с КРР I–III стадии, давших до оперативного вмешательства письменное информированное добровольное согласие на пробиотическую поддержку, и соответствовавших критериям включения/исключения. Прооперировано 55 человек, из них 28 мужчин (от 55 до 86 лет) и 27 женщин (от 55 до 80 лет) с диагнозами: рак сигмовидной кишки, ректосигмоидного отдела и восходящей ободочной кишки.

Критерии включения пациентов

1. Гистологически верифицированный рак толстой кишки T1–4 N0–2 M0.
2. Радикальное оперативное вмешательство по поводу рака толстой кишки (ободочной кишки) лапароскопическим доступом.
3. Возраст старше 18 лет.
4. Индекс Карновского более 80%, ECOG-ВОЗ 0–2.

Критерии невключения пациентов

1. Первично-множественные опухоли.
2. Наличие отдаленных метастазов.
3. Хронические воспалительные заболевания толстой кишки.
4. Предшествовавшие операции на кишечнике, в том числе эндоскопические.
5. Иммунодефицитные состояния.
6. Психиатрические заболевания.
7. Установленный диагноз семейного полипоза или синдрома Линча.
8. Любые другие клинические состояния, которые могут влиять на безопасное выполнение протокола.
9. Употребление пробиотических продуктов и препаратов, антибиотиков и алкоголя менее чем за 10 дней до оперативного вмешательства.

Критерии исключения пациентов (основания для прекращения применения апробируемого метода).

Дизайн исследования

За 10 дней до оперативного вмешательства у пациентов из пробы фекалий были выделены аутопробиотические штаммы *Enterococcus faecium* или *E. hirae*, на основе которых получен ПФПП (группа А). Пациентам, у которых не удалось выделить аутопробиотические штаммы энтерококков, назначались пробиотические энтерококки (группа В). В качестве группы сравнения микробиоты у здоровых лиц и пациентов с КРР взяты 20 здоровых волонтеров (группа К). Все пациенты и здоровые волонтеры, участвующие в эксперименте подписали добровольное информированное согласие.

Первая проба фекалий для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и метагеномного анализа забиралась

Несмотря на значительный массив исследований, посвященных микробной терапии с аутопробиотиками, их влияние на организм и его микробиоту при терапии онкологических больных изучено недостаточно. В данной работе проведена оценка эффективности аутопробиотиков в раннем послеоперационном периоде терапии КРР.

1. Наличие urgentных осложнений заболевания (кровотечение, перфорация, острая кишечная непроходимость), повлекшие за собой оперативное лечение в экстренном порядке.
2. Неоперабельность опухоли, выявленная интраоперационно.
3. Отказ пациента от участия в протоколе на любом из этапов.
4. Несоблюдение пациентом режима и условий лечения.
5. Смерть пациента.
6. Достижение конечных точек исследования.

Все пациенты до начала обследования и лечения были информированы о плане лечения и возможных осложнениях. Параметры, которые оценивались в ходе исследования, включали: возраст, пол, вес, тип, дифференцировку и локализацию опухоли, наличие и степень стеноза просвета кишки, предоперационное лечение (химиотерапия, лучевая терапия), предоперационную подготовку кишечника, объем оперативного вмешательства, антибактериальную терапию, сроки появления перистальтики, стула и газов после операции, послеоперационные осложнения, лабораторные показатели. Предоперационная подготовка кишечника включала в себя бесшлаковую диету в течение 7 суток перед операцией. Очистительные клизмы выполняли пациентам со стенозирующей опухолью (просвет непроходим для колоноскопа в комплексе с клинической картиной субкомпенсированных нарушений кишечной проходимости). Всем больным внутривенно профилактически вводили антимикробные препараты: 1,5 г цефуроксима и 0,5 г метронидазола за 30–40 минут до операции и двукратно после операции в течение 24 часов.

у больных до операции и терапии аутопробиотиком. Вторая — сразу же после курса введения ПФПП. Аутопробиотики больные получали в течение 10 дней по 50 мл 2 раза в день с первого дня после операции. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Во время приема аутопробиотика пациенты вели дневники, в которых указывали частоту дефекации, характеристики стула, наличие метеоризма и боли. Свойства стула после предоставления дневников пациентов оценивались по шкале Бристоля. Пробы фекалий до и после приема аутопробиотика были исследованы на состав микробиоценоза кишечника при помощи ПЦР-РВ и метагеномного исследования 16S rPHK.

Рисунок 1.
Этапы исследования

Условные обозначения:
V1 и V2 — визит первый и второй, соответственно, для сдачи биоматериала.

АМП —
антимикробные препараты.

**Изготовление аутопробиотиков**

Была использована методика изготовления аутопробиотиков на основе непатогенных *E. faecium*, разработанная нами ранее [42]. Все выделенные культуры аутопробиотических энтерококков были идентифицированы до вида и исследованы на наличие генов патогенности по разработанному ранее

алгоритму [43]. Идентификацию энтерококков проводили при помощи ПЦР и MALDI-TOF.

Непатогенные *E. faecium* и *E. hirae*, выделенные от пациентов, выращивали на среде SuproPlus 2640 (Monsanto company, Missouri, США, концентрация 40 г/л) и затем на их основе готовили ПФПП.

Лабораторные исследованияЦитокиновый статус

Уровень содержания цитокинов TNF- α , IL-8, IL-10, IL-1 бета, IL-6, IL-18, MCP-1, гамма-интерферона в сыворотке крови определяли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа, используя тест системы ЗАО «Вектор-Бест», (Новосибирск, РФ) и комплекса аналитического оборудования для ELISA (Bio-Rad, США).

Анализ микробиоты кишечникаПолимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Выделение ДНК из фекалий проводили, используя набор ДНК-ЭКСПРЕСС «Литех» (Москва, Россия). ПЦР-РВ с флуоресцентно-мечеными зондами Taqman проводилась на приборе Bio-Rad с использованием тест системы «Колонофлор-16» (ООО АльфаЛаб). Данная методика позволяет оценить общее количество бактерий, а также количество облигатных и условно-патогенных представителей микробиоты: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium difficile*, *Enterococcus* spp., *E. coli*, энтеропатогенная *E. coli*, *B. fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*,

Faecalibacterium prausnitzii, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Candida* spp., *Clostridioides difficile*, *Clostridium perfringens*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Methanobrevibacter* spp., *Fusobacterium* spp., *Akkermansia* spp., *Acinetobacter* spp., *Prevotella* spp.

Анализ последовательностей генов 16S рРНК

С целью изучения метагенома кишечника были проанализированы библиотеки вариабельных участков V3 и V4 гена 16S рРНК с использованием прибора MiSeq (Illumina, США) [36]. Для приготовления библиотек использовали стандартный, рекомендованный компанией Illumina, метод, основанный на проведении двух раундов ПЦР. Первый раунд включал амплификацию фрагмента гена 16S РНК, добавление к целевому фрагменту адаптерных нуклеотидных последовательностей за счет ПЦР-праймеров. На базе модулей lattice и ggplot2 программного пакета R были реализованы средства визуализации состава микробиома, полученного в результате секвенирования областей V3/V4 16S рРНК.

Методы статистического анализа результатов исследований

Статистическую обработку материала проводили с помощью программы Statistica for Windows, v. 10 (StatSoft, США) с использованием параметрических и непараметрических критериев. Статистическую обработку данных о концентрации микроорганизмов в кале выполняли после предварительной логарифмической трансформации исходных величин. Достоверность различий между значениями оценивали с использованием критерия для непараметрических данных (А-тест Крускала-Уоллиса,

уровень значимости $p < 0,05$). Графики и диаграммы строили в программах Statistica for Windows, Excel, GraphPadPrism.

Для каждой группы вычисляли дескриптивные характеристики: частота встречаемости признака (для дискретных признаков), среднее значение показателя (M), стандартное отклонение (σ), ошибка среднего (m), минимум, максимум, медиана и квартили для признаков с непрерывным распределением. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования**1. Клинико-лабораторные данные**

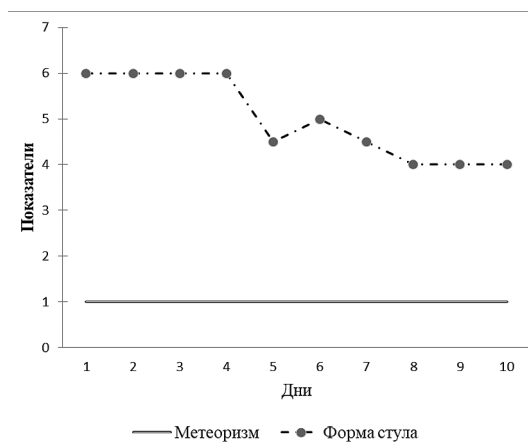
По литературным данным, у всех пациентов с КРР возникают существенные сдвиги в кишечном микробиоценозе. Оперативное вмешательство с использованием антибактериальных препаратов приводит, как правило, к еще более тяжелым последствиям, проявляющимися в существенном изменении клинико-лабораторных показателей и состава микробиоты, которые создают предпосылки к таким

серьезным осложнениям, как абдоминальный сепсис, псевдомембранозный колит, антибиотико-ассоциированные дисбиозы и колиты [44–46].

В ходе настоящего исследования больные КРР находились в клинике после операции 5–7 дней, что свидетельствовало об отсутствии послеоперационных осложнений на фоне применяемой комплексной терапии. В период наблюдений на фоне быстрой

Рисунок 2.
Выраженность метеоризма и характеристик стула во время терапии аутопробиотиками.

Примечание:
Характеристика стула проведена с использованием Бристольской шкалы. Метеоризм оценивали по выраженности в баллах (0 — отсутствие, 1 — слабо выраженный, 2 — умеренно выраженный, 3 — сильно выраженный).



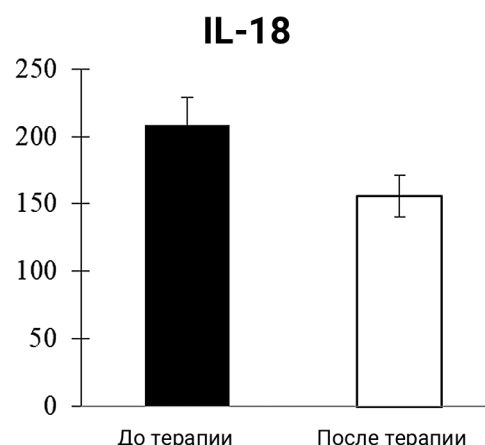
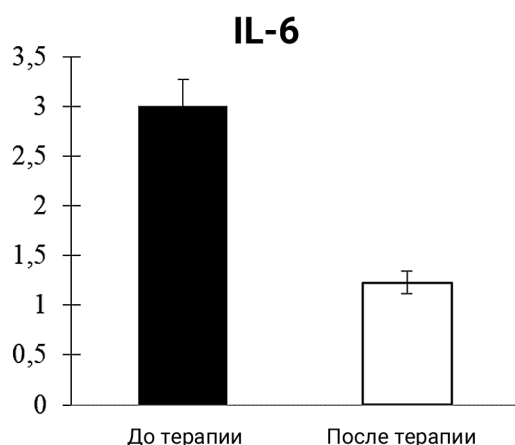
нормализации частоты стула наблюдались низкая выраженность метеоризма и изменение свойств стула с 6 до 4 через 3 дня приема аутопробиотиков (рисунок 2). Это соответствовало результатам, описанным при использовании пробиотиков другими

Главными механизмами неопластической трансформации клеток хозяина считаются нарушение микробиоценоза кишечника, синтез бактериями, заселяющими желудочно-кишечный тракт, «патологических» метаболитов и продукция токсических активных форм кислорода, реактивного азота и других факторов, вследствие которых нарушаются иммунные процессы и возникает воспаление [50–51]. Известно, что в патогенезе КРР значительную роль играют провоспалительные цитокины и гормоны. Негативным прогностическим фактором при КРР является избыток хорионического гонадотропина человека, провоцирующего гиперсекрецию TNF-α и IL-6, а также синтез IL-8 и матриксных металлопротеиназ, способствующих инвазии патогенных микроорганизмов за пределы слизистой оболочки кишечника [52–54]. Опубликованы данные по негативному прогнозу КРР при высоком содержании IL-6 и TNF-α в перитонеальной жидкости в послеоперационном периоде [55].

Другими авторами также отмечено увеличение

Рисунок 3.
Изменения в уровне IL-6 и IL-18 в сыворотке крови до и после введения аутопробиотиков.

Примечание:
Данные представлены в пкмоль на 1 л.



авторами при терапии онкологических заболеваний [47–49].

Введение аутопробиотиков приводило к снижению уровня провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-18 в сыворотке крови (рисунок 3). Трактовка этих результатов достаточно сложна, так как наблюдения за изменениями цитокинового статуса у больных КРР до и после терапии практически не проводились ранее.

содержания IL-6 и TNF-α в сыворотке крови больных КРР и их снижение после операции на 40–60% [52].

Нельзя исключить, что наблюдаемые нами изменения после аутопробиотической поддержки связаны не только с базовой комплексной терапией КРР, но и с противовоспалительным действием аутопробиотиков, оказавшимся влияние на иммунитет и микробиоту [36].

2. Исследование микробиоты кишечника

2.1. Особенности микробиоты при колоректальном раке

2.1.1. Бактериологическое исследование

Бактериологическое исследование было нацелено на выделение непатогенных *Enterococcus* spp. для получения аутопробиотиков. Генетический анализ ДНК, выращенных на азидной среде энтерококков, позволил выявить их видовую принадлежность и наличие в геноме генов патогенности и устойчивости к ванкомицину (Рисунки 4, 5). Пациенты (33 человека), у которых из фекалий были выделены непатогенные *E. faecium* (97,3% клонов) и/или *E. hirae* (73% клонов), были отнесены к группе А.

В группе П (22 человека) указанные виды энтерококков были обнаружены значительно реже, причем все выделенные клоны содержали в геноме гены патогенности. С одинаковой частотой были выделены в обеих группах *E. durans* и *E. faecalis*. Выявление непатогенных *Enterococcus* spp. рассматривалось нами как позитивный фактор и было использовано для аутопробиотикотерапии, ранее успешно апробированной при лечении различных заболеваний [56–58].

Рисунок 4.
Частота
обнаружения
различных видов
энтерококков
в фекалиях
больных из групп
А и П.

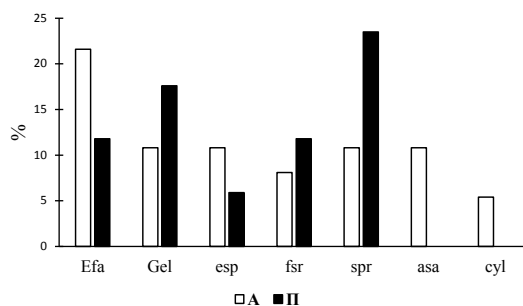
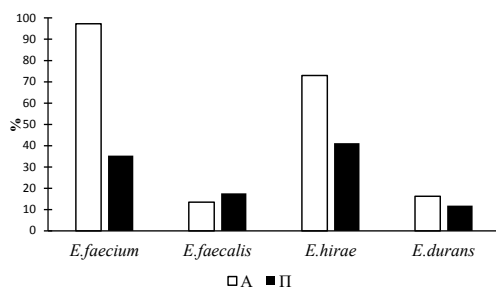


Рисунок 5.
Частота
обнаружения
различных генов
патогенности при
исследовании
E. faecium
и *E. hirae*,
выделенных
из кишечника
больных из групп
А и П.



2.1.2. Исследование микробиома

Исследование микробиома кишечника при КРР проводили двумя методами, определяя количественное содержание маркерных таксонов при помощи ПЦР-РВ и анализируя представительство отдельных таксонов с использованием метагеномного анализа 16S рРНК. Анализ проводили для всех больных с КРР, в том числе и для группы П, у которых выявить непатогенные энтерококки не удалось. Микробиоту пациентов группы А, у которых удалось выделить аутопробиотики (непатогенные энтерококки *E. faecium* и *E. hirae*), сравнивали с микробиотой остальных пациентов (Группа П).

2.1.3. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Сравнение микробиоты здоровых волонтеров и больных с КРР с помощью ПЦР-РВ (рисунок 6) выявило у пациентов увеличение: количественного содержания *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *E. coli*, *P. micra*, *C. perfringens*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *F. nucleatum*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* spp. (*B. fragilis* группа).

Ряд выявленных особенностей микробиоты кишечника исследованных нами больных с КРР не укладывалось в концепцию «уменьшение полезных бактерий». Это проявлялось в увеличении количественного содержания *Lactobacillus* spp., *F. prausnitzii* и *Bifidobacterium* spp., что было неожиданным, хотя ранее и описано в редких работах по метаанализу микробиоты кишечника при рассматриваемой патологии [5, 58–61]. По-видимому, роль лактобацилл, бифидобактерий и *Faecalibacterium* spp. при КРР не совсем ясна и требует уточнения видовой принадлежности, а также изучения штаммовых особенностей этих бактерий.

Обращало на себя внимание увеличение популяции *B. thetaiotaomicron*. С одной стороны, эти бактерии участвуют в реализации уникального противовоспалительного PPAR-γ-зависимого механизма, ослабляя экспрессию провоспалительных цитокинов, способствуя ядерному экспорту RelA одной из субъединиц NF-κB. Рассматриваемые бактерии

также способны ингибировать, вызванную TNF-α и IFN-γ дисфункцию кишечного эпителия, изменяя как трансэпителиальное сопротивление, так и проницаемость кишечника [62].

B. thetaiotaomicron и *F. prausnitzii* могут метаболически дополнять друг друга. В присутствии ацетогенного *B. thetaiotaomicron* *F. prausnitzii* продуцирует больше противовоспалительного метаболита бутирата, основного источника энергии для колоноцитов. Таким образом, эти бактерии, модулируя слизистый барьер кишечника, изменяя бокаловидные клетки и гликозилирование муцина, поддерживают гомеостаз эпителия толстой кишки [63]. С другой стороны, те же авторы указывают на способность *B. thetaiotaomicron* индуцировать экспериментальный колит у мышей с мутациями, обуславливающими чувствительность к воспалительным заболеваниям кишечника (ВЗК) характерными для человека.

Следует отметить, что при раке толстой кишки регуляция метилирования и деметилирования гистонов является важным процессом для регуляции экспрессии опухолевых супрессоров и онкогенов. Несколько гистонметилтрансфераз и деметилаз сверхэкспрессируются и участвуют в росте КРР и метастазировании посредством эпигенетической регуляции. Дегградация гистонметилтрансферазы EHMT2 пропионатом, продуцируемым *B. thetaiotaomicron*, индуцирует апоптоз раковых клеток толстой кишки посредством эпигенетической регуляции TNFAIP1 [64]. Увеличение содержания *B. thetaiotaomicron* может быть следствием иницирования при КРР одного из защитных механизмов организма, направленных на разрушение опухолевой ткани и стабилизации кишечного барьера.

В то же время наличие так называемых онкогенных маркерных бактерий (*P. micra* и *F. nucleatum*), увеличение потенциально онкогенных эшерихий, токсигенных *B. fragilis* и *C. perfringens* подтверждает данные, полученные другими авторами [5, 11, 14].

Еще более интересные данные были получены при сравнении микробиоты групп А и П больных с КРР до терапии, сравнивая материалы, взятые во время первого визита в лабораторию (биоматериал AV1 и PV1). Исследование при помощи ПЦР-РВ микробиоты пациентов групп А и П до оперативного вмешательства выявило большее содержание *A. muciniphila* и меньше *P. micra* в группе пациентов, у которых удалось выделить непатогенные энтерококки (рисунок 7).

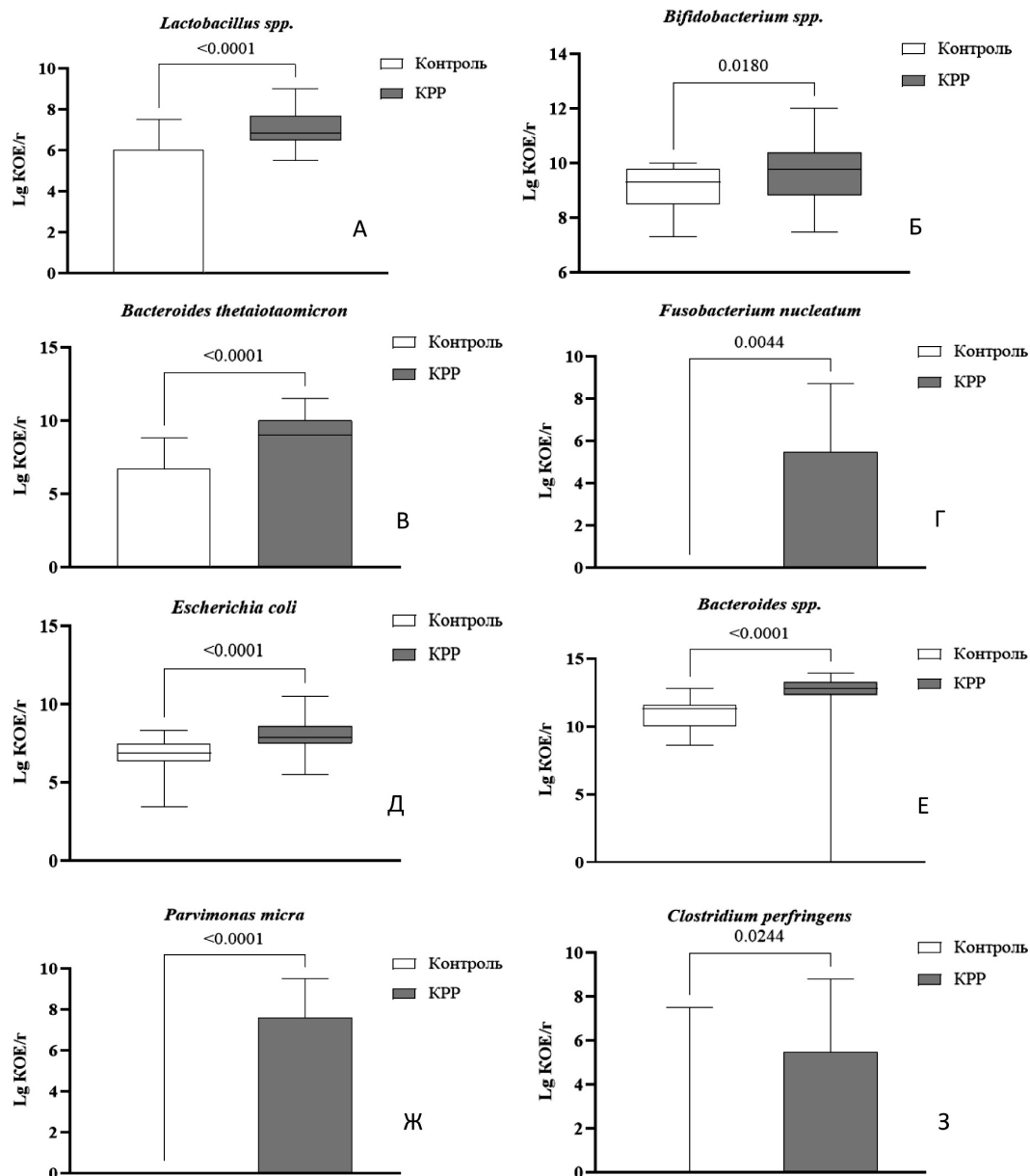
Содержание аккермансий в составе микробиоты кишечника не было изменено при сравнении с контролем (нормобиозом). Однако в группе А было больше, чем в группе П.

A. muciniphila, грамотрицательные анаэробные бактерии, относящиеся к типу *Verrucomicrobia*, могут быть выделены из кишечника человека и других животных [65]. Эти бактерии являются одними из наиболее распространенных представителей комменсальной микробиоты кишечника. У здоровых взрослых людей представительство *A. muciniphila* может достигать 1–4% всех микроорганизмов, присутствующих в толстой кишке. Важными физиологической и метаболической функциями *A. muciniphila* является их способность фиксироваться к эпителиальным клеткам кишечника, формировать плотный

Рисунок 6.

Особенности микробиоты у пациентов с колоректальным раком по сравнению с группой контроля (количественное содержание статистически значимых бактерий, по данным ПЦР-РВ).

Примечания: Количественное содержание *Lactobacillus* spp. (А); *Bifidobacterium* spp. (Б); *Bacteroides thetaiotaomicron* (В); *Fusobacterium nucleatum* (Г); *Escherichia coli* (Д); *Bacteroides* spp. (Е); *Parvimonas micra* (Ж); *Clostridium perfringens* (З). На боксплотах отражены от 25-го до 75-го процентиля, «усы» — минимум и максимум, линия — медиана, «+» — ср. значение.



монослой и активно деградировать муцин. В процессе деградации и метаболизации муцина *A. muciniphila* образуют различные низкомолекулярные соединения, включая КЦЖК (ацетат, пропионат и небольшие количества 1,2 пропанедиола и сукцината), которые используются энтероцитами, бокаловидными и иммунными клетками кишечника в качестве источника энергии и в различных метаболических процессах. Эти микробные жирные кислоты также выступают как сигнальные молекулы в работе иммунной системы, модуляторы иммунокомпетентных клеток и регуляторы продукции и активности генов нейрогуморальной системы [51, 65–67].

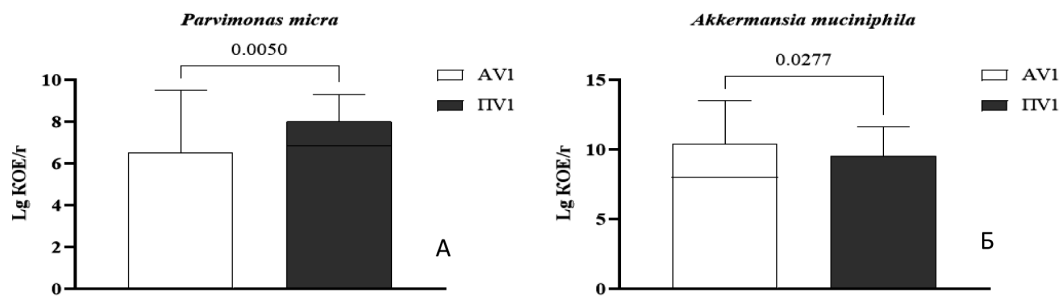
Анализ зарубежных данных показал, что у больных с язвенным колитом наблюдалось снижение *A. muciniphila* в составе фекальной микробиоты как при ремиссии [35], так и в процессе активной стадии этого заболевания [41, 54]. Данные биопсии кишечной мукозы больных с ВЗК позволили выявить сниженные уровни этого микроорганизма [50]. В модельных и клинических исследованиях удалось показать, что *A. muciniphila* оказывали воздействие

на иммунный статус хозяина, включая усиление продукции антимикробного пептида Reg3 в отношении грамположительных бактерий в толстой кишке и слабый про-воспалительный эффект T-reg клеток у мышей [48, 49]. Модуляция воспаления и иммунной системы, осуществляемая *A. muciniphila*, происходила за счет сигнальных путей, связанных с TNF- α , IFN- γ , IL-10 и IL-4 [48]. Эти эффекты *A. muciniphila* ассоциируют с наличием на поверхности этих бактерий похожих на пили структур с размером более 100 kDa. В последующем в них были выявлены специальные мембранные белки (в частности, Amuc_1100 белок). Этот белок взаимодействует с Toll-2 рецептором эпителиальных клеток, усиливает барьер слизистой кишечника и индуцирует широкий спектр иммуномодулирующих ответов, включая продукцию цитокинов IL-6, IL-8 и IL-10 у сегментоядерных лейкоцитов [47, 49, 51]. Иммуномодулирующая роль этого белка подтверждена как в опытах *in vitro*, так в экспериментах на различных животных. Однако на экспериментальной модели (индукция азокси-метаном /декстрансульфатом натрия KPP у мышей

Рисунок 7.

Различия в содержании *Parvimonas micra* и *Akkermansia muciniphila* в группах А и П до оперативного вмешательства (количественное содержание статистически значимых бактерий, по данным ПЦР-РВ).

Примечания: Количественное содержание бактерий при первом визите группы А (AV1), группы П (PV1). На боксплотах отражены от 25-го до 75-го процентиля, «усы» — минимум и максимум, линия — медиана, «+» — ср.значение.



C57BL/6) показано, что введение *A. muciniphila* может индуцировать воспаление и пролиферацию опухолевых клеток. Мыши, получавшие *A. muciniphila*, имели более серьезную потерю веса, меньшую длину толстой кишки и большее количество метастазов опухолей кишечника, большее повреждение толстой кишки и меньшее количество бокаловидных клеток, повышенную экспрессию генов воспалительных цитокинов, чем животные контрольной группы, которым после индукции КРР вводился фосфатный буфер. Кроме того, результаты экспериментов *in vitro* показали, что совместное культивирование эпителиальных клеток толстой

кишки с *A. muciniphila* усиливало клеточную пролиферацию и экспрессию генов молекул, связанных с пролиферацией [67–68]. Следовательно, *A. muciniphila* может не только нормализовать функции кишечного эпителия, но и способствовать развитию КРР.

Также обращали на себя внимание тенденции к увеличению количества энтерококков на фоне снижения количества *F. nucleatum* в группе А по сравнению с П, количество *C. perfringens* и *Klebsiella* spp. были увеличены у больных с КРР по сравнению с группой контроля и преобладали в группе П по сравнению с группой А (рисунок 8).

2.1.4. Метагеномный анализ

При метагеномном анализе обращало на себя внимание статистически достоверное увеличение альфа-биоразнообразия (рисунок 9), обычно сниженное при развитии патологических процессов. Альфа-биоразнообразие играет важную роль в поддержании сбалансированной экосистемы, способствуя ее стабильности и экологической функции [67–68]. Однако некоторые исследования выявили увеличение альфа-разнообразия у пациентов с аутизмом, эпилепсией или транзиторной ишемией [69], что могло либо усугублять патологию, либо являться одним из направлений компенсаторных изменений микробиоценоза.

Метагеномный анализ позволил выявить различия при сравнении представительств отдельных бактерий в группах П и К (рисунок 10). Обнаружены статистически достоверные уменьшение ($p=0,0017$) в представительстве филумов *Bacillota* (синоним *Firmicutes*) и увеличение ($p=0,0067$) *Bacteroidota* (*Bacteroidetes*) в группе П

по сравнению с контролем. В группе А выявленная закономерность проявилась как тенденция. Представительство *Pseudomonadota* (синоним *Proteobacteria*) в группе А и в большей степени П имело тенденцию к увеличению.

Полученные нами результаты вступают в противоречие с литературными данными, в том числе метаанализом обзорных статей, обобщающих результаты исследования микробиома при КРР [5]. Следует отметить, что приведенные в обзорах и отдельных публикациях данные неоднозначны и весьма противоречивы, по-видимому, в результате недостаточной стандартизации оценки состава микробиома, отсутствие учета стадии и тяжести КРР.

В наших исследованиях отсутствие существенных сдвигов в соотношении отдельных представителей микробиоты кишечника в группе А коррелировало с результатами ПЦР-РВ, выявившем в этой группе менее выраженный, чем в группе П, дисбаланс в составе кишечного микробиоценоза.

Рисунок 8. Количественное содержание до оперативного вмешательства энтерококков, стафилококков, фузобактерий в группах А и П (ПЦР-РВ).

Примечания: Количественное содержание бактерий при первом визите группы А (AV1), группы П (PV1). На боксплотах отражены от 25-го до 75-го процентиля, «усы» — минимум и максимум, линия — медиана, «+» — ср.значение.

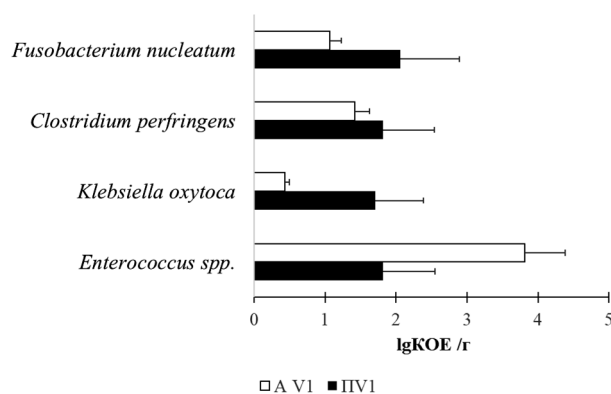


Рисунок 9. Альфа-разнообразие микробиоты кишечника у пациентов из групп А, П и К (метагеномный анализ 16S рРНК).

Примечания: Количественное содержание бактерий при первом визите группы А (АV1), группы П (ПV1). На боксплотах отражены от 25-го до 75-го перцентилей, «усы» — минимум и максимум, линия — медиана, «+» — ср.значение.

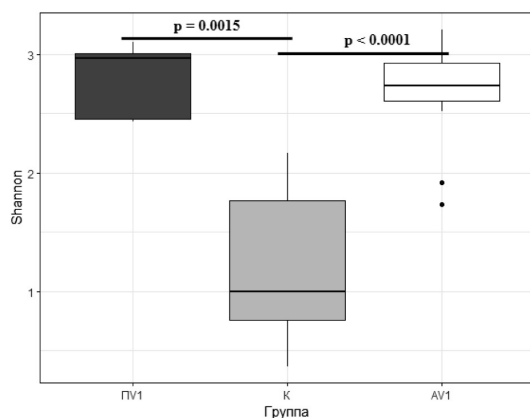
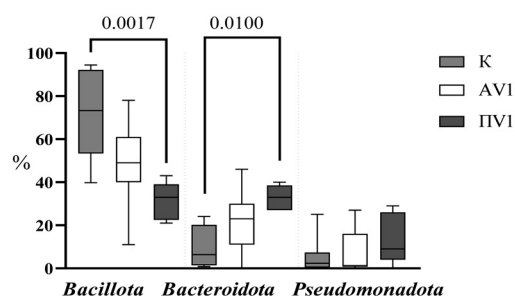
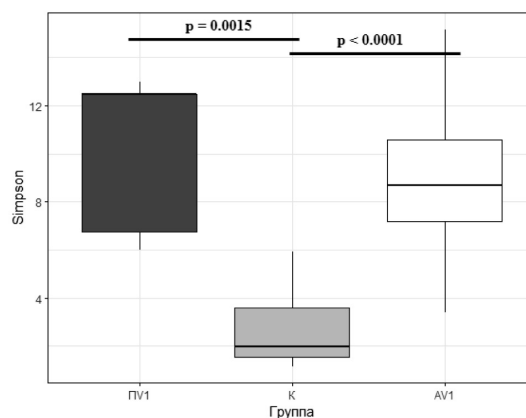


Рисунок 10. Представительство филов в пробах фекалий пациентов из групп А, П и К (метагеномный анализ 16S рРНК).

Примечания: Количественное содержание бактерий при первом визите группы А (АV1), группы П (ПV1) и в группе здоровых волонтеров (К). На боксплотах отражены от 25-го до 75-го перцентилей, «усы» — минимум и максимум, линия — медиана, «+» — ср.значение.



2.2. Микробиота кишечника после терапии аутопробиотиком

После курса терапии аутопробиотическими энтерококками при помощи ПЦР-РВ показано, что в группе А наблюдалось статистически достоверное снижение количества *A. muciniphila*, *C. perfringens* и *P. micra* и тенденция к увеличению *Enterococcus spp.* (рисунок 11).

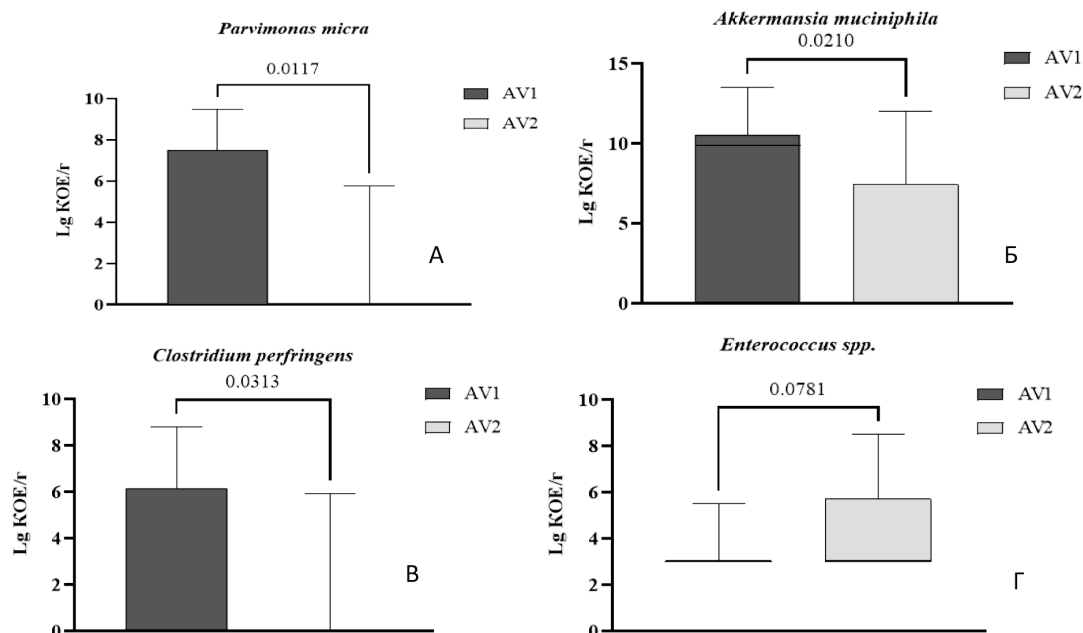
Достаточно сложно объяснить снижение на фоне проведенной терапии содержания аккермансий, проявляющих как было отмечено ранее двойственное влияние на организм. Однако этот показатель колебался в пределах нормальных значений и его снижение скорее всего можно рассматривать

как адаптивный механизм и нивелирование возможных отрицательных воздействий этих бактерий, разрушающих муцин в поврежденной слизистой оболочки кишечника.

Обращало на себя внимание и отсутствие изменений в содержании *F. nucleatum* на фоне терапии. Эти бактерии являются частью комменсальной флоры кишечника и полости рта, но ее присутствие связывают с патологическими состояниями, включая аппендицит, ВЗК, периодонтит и КРР. На экспериментальных биологических моделях продемонстрировано множество механизмов, с помощью которых

Рисунок 11. Различия в составе микробиоты кишечника до и после терапии аутопробиотиком (ПЦР-РВ).

Примечания: Количественное содержание *Parvomonas micra* (А); *Akkermansia muciniphila* (Б); *Clostridium perfringens* (В); энтерококков (Г). На боксплотах отражены от 25-го до 75-го перцентилей, «усы» — минимум и максимум, линия — медиана, «+» — ср.значение.



F. nucleatum может способствовать прогрессированию КРР, включая опосредованную E-кадгерином активацию передачи сигналов Wnt/ β -катенина [70]. Также было высказано предположение, что *F. nucleatum* ингибирует противоопухолевый иммунный ответ [71]. Следовательно, их присутствие у рассматриваемой группы пациентов до и после терапии может быть и полезным. Неудивительно, что представительство фузобактерий у больных КРР по данным метаанализа может быть как уменьшено, так и увеличено по сравнению со здоровыми людьми [5].

P. micra, как и *F. nucleatum*, является комменсалом полости рта, участвует в патогенезе внутричерепного абсцесса, перикардита и некротизирующего фасциита, а также КРР [72–76]. Однако роль *P. micra* в прогрессировании КРР все еще в значительной степени неизвестна, и потенциал этих бактерий в качестве фекального маркера для выявления КРР до конца не выяснен [79]. В данном исследовании *P.*

micra полностью элиминировали после воздействия аутопробиотика, что может рассматриваться как один из позитивных эффектов комплексной терапии.

Увеличение *C. perfringens* является характерной чертой микробиоты при КРР, а уменьшение их содержания после терапии свидетельствует об ее успешности. По данным метаанализа, при КРР популяции аккермансии, как правило, увеличиваются, хотя есть публикации, свидетельствующие об обратном [5, 10, 11]. Первоначальное большее содержание этих бактерий в группе А, по сравнению с группами К и П, в результате терапии аутопробиотиками восстанавливается до значений, характерных для нормобиоты.

При помощи метагеномного анализа статистически достоверные различия до и после терапии в альфа-биоразнообразии и в представительстве таксонов не установлены. Возможно, это было связано с незначительными различиями микробиоты в группе А и К до терапии.

Заключение

Проведенное пилотное исследование свидетельствует о безопасности аутопробиотических энтерококков при терапии КРР. Применение аутопробиотиков в послеоперационном периоде облегчает послеоперационное течение, улучшает клиническую картину, нивелирует воспаление, способствует восстановлению кишечного микробиоценоза и его функций. Все выявленные эффекты, по-видимому, в большой степени связаны с изменением состава кишечного

микробиоценоза. Использование аутопробиотиков является одним из новых перспективных средств дополнительной терапии КРР.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России, соглашение № 075–15–2022–302 (20.04.2022)

The work was supported by the Russian Ministry of Education and Science, agreement No. 075–15–2022–302 (04/20/2022)

Литература | References

- Hooper L. V., Littman D. R., Macpherson A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012 Jun; 336 (6086): 1268–1273. doi: 10.1126/science.1223490.
- Alexander K. L., Targan S. R., Elson III C. O. Microbiota activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Immunological reviews*. 2014 Jun; 260(1): 206–220. doi: 10.1111/imr.12180.
- Zhang M., Sun K., Wu Y., Yang Y., Tso P., Wu Z. Interactions between intestinal microbiota and host immune response in inflammatory bowel disease. *Frontiers in immunology*. 2017 Aug; 8: 942. doi: 10.3389/fimmu.2017.00942.
- Zhao Y., Chen F., Wu W., Sun M., Bilotta A. J., Yao, S. GPR43 mediates microbiota metabolite SCFA regulation of antimicrobial peptide expression in intestinal epithelial cells via activation of mTOR and STAT3. *Mucosal immunology*. 2018 May; 11 (3): 752–762. doi: 10.1038/mi.2017.118.
- Tarashi S., Siadat S. D., Ahmadi B. S., Zali M., Biassoni R., Ponzoni M., Moshiri A. Gut bacteria and their metabolites: which one is the defendant for colorectal cancer? *Microorganisms*. 2019 Nov; 7 (11): 561. doi: 10.3390/microorganisms7110561.
- Kostic A. D., Chun E., Meyerson M., Garrett W. S. Microbes and inflammation in colorectal cancer. *Cancer immunology research*. 2013 Sept; 1 (3): 150–157. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0101.
- Bruner S. D., Jobin C. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease and carcinogenesis: implication for therapeutics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2016 Feb; 99 (6): 585–587. doi: 10.1002/cpt.348.
- Cheng Y., Ling Z., Li L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020 Nov; 30;11:615056. doi: 10.3389/fimmu.2020.615056.
- Huipeng W., Lifeng G., Chuang G., Jiaying Z., Yuankun C. The differences in colonic mucosal microbiota between normal individual and colon cancer patients by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2014 Feb; 48 (2): 138–144. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182a26719.
- Warren R. L., Freeman D. J., Pleasance S., Watson P., Moore R. A., Cochrane K., Holt R. A. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome*. 2013 May; 1 (1): 1–12. doi: 10.1186/2049-2618-1-16.
- Wu N., Yang X., Zhang R., Li J., Xiao X., Hu Y., Zhu B. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. *Microbial ecology*. 2013 Jun; 66: 462–470. doi: 10.1007/s00248-013-0245-9.
- Johnson C. M., Wei C., Ensor J. E., Smolenski D. J., Amos C. I., Levin B., Berry D. A. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer causes & control*. 2013 Mar; 4: 1207–1222. doi: 10.1007/s10552-013-0201-5.
- Yu J., Feng Q., Wong S. H., Zhang D., Yi Liang Q., Qin Y., Wang, J. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut*. 2017 Mar; 66 (1): 70–78. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309800.

14. Cougnoux A., Delmas J., Gibold L., Faïs T., Romagnoli C., Robin F., Bonnet R. Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. *Gut*. 2016; 65 (2): 278–285. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307241.
15. Sánchez-Alcoholado L., Ramos-Molina B., Otero A., Laborda-Illanes A., Ordóñez R., Medina J. A., Queipo-Ortuño M. I The role of the gut microbiome in colorectal cancer development and therapy response. *Cancers*. 2020 April; 12 (6): 1406. doi: 10.3390/cancers12061406.
16. Karamzin A. M., Ropot A. V., Boshian R. E. The relationship of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* with colorectal cancer. *Experimental and clinical gastroenterology*. 2010; 6 (178): 158–165. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-178-6-158-165.
Карамзин А. М., Ропот А. В., Бошнян Р. Е. Взаимосвязь муколитической бактерии *Akkermansia muciniphila* с колоректальным раком. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2020; 6 (178): 158–165. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-178-6-158-165.
17. Tsoi H., Chu E. S., Zhang X., Sheng J., Nakatsu G., Yu J. *Peptostreptococcus anaerobius* induces intracellular cholesterol biosynthesis in colon cells to induce proliferation and causes dysplasia in mice. *Gastroenterology*. 2017; 152(6): 1419–1433. doi: 10.1053/j.gastro.2017.01.009.
18. Yazici C., Wolf P. G., Kim H., Cross T. W. L., Vermillion K., Carroll T., Gaskins H. R. Race-dependent association of sulfidogenic bacteria with colorectal cancer. *Gut*. 2017; 66(11): 1983–1994. doi:10.1136/gutjnl-2016-313321.
19. Kharchenko E. P., Soloviev I. A. microbiota, immune system and colorectal cancer. *Pelvic Surgery and Oncology* 2017; 4: 11–19. (In Russ.) doi.org: 10.17650/2220-3478-2017-7-4-11-19.
Харченко Е. П., Соловьев И. А. Микробиота, иммунная система и колоректальный рак. *Тазовая хирургия и онкология* 2017; 4: 11–19. doi.org: 10.17650/2220-3478-2017-7-4-11-19
20. Dulal S., Keku T. O. Gut microbiome and colorectal adenomas. *Cancer journal*. 2014; 20(3): 225. doi: 10.1097/PPO.0000000000000050.
21. Dutilh B., Backus L., Hijum S. V., Tjalsma H. Screening metatranscriptomes for toxin genes as functional drivers of human colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013 Feb; 27(1):85–99. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.008.
22. Wu X., Wu Y., He L., Wu L., Wang X., Liu Z. Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer. *Journal of Cancer* 2018 Jun; 9(14): 2510. doi: 10.7150/jca.25324
23. Kochkina S. O., Gordeev S. S., Mammadli Z. Z. The influence of human microbiota on the development of colorectal cancer. *Pelvic Surgery and Oncology* 2019; 9(3): 11–17. (In Russ.) doi: 10.17650/2686-9594-2019-9-3-11-17
Кочкина С. О., Гордеев С. С., Мамедли З. З. Влияние микробиоты человека на развитие колоректального рака. *Тазовая хирургия и онкология* 2019; 9(3): 11–17. doi: 10.17650/2686-9594-2019-9-3-11-17
24. Ivashkin K. V., Reshetova M. S., Zolnikova O. Yu., Korneeva V. R., Shirokova E. N. The place of probiotics in the complex therapy of various diseases of the gastrointestinal tract. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology* 2020, 30(1):42–48. (In Russ.) doi.org/10.22416/1382-4376-2020-30-1-42-48
Ивашкин К. В., Решетова М. С., Зольникова О. Ю., Корнеева В. Р., Широкова Е. Н. Место пробиотиков в комплексной терапии различных заболеваний желудочно-кишечного тракта. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии* 2020, 30(1): 42–48. doi: 10.22416/1382-4376-2020-30-1-42-48
25. Pitsillides L., Pellino G., Tekkis P., Kontovounisios C. The effect of perioperative administration of probiotics on colorectal cancer surgery outcomes. *Nutrients* 2021 Apr; 13(5): 1451. doi: 10.3390/nu13051451
26. Zaharuddin L., Mokhtar N. M., Muhammad Nawawi K. N., Raja Ali R. A. A randomized double-blind placebo-controlled trial of probiotics in post-surgical colorectal cancer. *BMC gastroenterology* 2019; 19(1): 1–8. doi: 10.1186/s12876-019-1047-4
27. Consoli M. L. D., da Silva R. S., Nicoli J. R., Bruña-Romero O., da Silva R. G., de Vasconcelos Generoso S., Correia M. I. T. Randomized clinical trial: impact of oral administration of *Saccharomyces boulardii* on gene expression of intestinal cytokines in patients undergoing colon resection. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2016; 40(8): 1114–1121. doi: 10.1177/0148607115584387
28. Pitsillides L., Pellino G., Tekkis P., Kontovounisios C. The Effect of Perioperative Administration of Probiotics on Colorectal Cancer Surgery Outcomes. *Nutrients* 2021 Apr; 13: 1451. doi.org/10.3390/nu13051451
29. Peitsidou K., Karantanos T., Theodoropoulos G. E. (2013). Probiotics, prebiotics, synbiotics: is there enough evidence to support their use in colorectal cancer surgery? *Digestive surgery* 2013 Dec; 29(5): 426–438. doi: 10.1159/000345580
30. Khakimova G. G., Tryakin A. A., Zabolina T. N., Tsukanov A. S., Aliyev V. A., Gutorov S. L. (2019). The role of the intestinal microbiota in immunotherapy of colon cancer. *Malignant tumors* 2019; 9(2): 5–11. (In Russ.) doi: 10.18027/2224 5057 2019 9 2 5-11
Хакимова Г. Г., Трякин А. А., Заботина Т. Н., Цуканов А. С., Алиев В. А., Гуторов С. Л. Роль кишечной микробиоты при иммунотерапии рака толстой кишки. *Злокачественные опухоли* 2019; 9(2): 5–11. doi: 10.18027/2224 5057 2019 9 2 5-11
31. Zakharenko A. A., Suvorov A. N., Shlyk I. V., Ten O. A., Jamalov S. R., Natha, A. S., Belyaev M. A. Disorders of intestinal microbiocenosis in patients with colorectal cancer and methods of their correction (literature review). *Coloproctology* 2016; 2: 48–56. (In Russ.) doi: 10.33878/2073-7556-2016-0-2-48-56
Захаренко А. А., Суворов А. Н., Шлык И. В., Тен О. А., Джамилов Ш. Р., Натха А. С., Беляев М. А. Нарушения микробиоценоза кишечника у больных колоректальным раком и способы их коррекции (обзор литературы). *Колопроктология* 2016; 2: 48–56. doi: 10.33878/2073-7556-2016-0-2-48-56
32. Finlay B. B., Goldszmid R., Honda K., Trinchieri G., Wargo J., Zitvogel, L. Can we harness the microbiota to enhance the efficacy of cancer immunotherapy? *Nature Reviews Immunology* 2020 Jul; 20(9): 522–528. doi: 10.1038/s41577-020-0374-6
33. Costa R. L., Moreira J., Lorenzo A., Lamas, C. C. Infectious complications following probiotic ingestion: a potentially underestimated problem? A systematic review of reports and case series. *BMC complementary and alternative medicine* 2018 Dec; 18(1): 1–8. doi: 10.1186/s12906-018-2394-3
34. Venugopalan, V., Shriner, K. A., & Wong-Beringer, A. (2010). Regulatory oversight and safety of probiotic use. *Emerging infectious diseases* 2010 Nov; 16(11): 1661 doi: 10.3201/eid1611.100574
35. Suvorov A. N., Ermolenko E. I., Kotyleva M. P., Tsapleva A. N.: Method for preparing autoprobiotic based on anaerobic bacteria consortium. Patent for invention 2734896 C2, 10/26/2020. Application No. 2018147697 dated 12/28/2018
36. Suvorov A., Karaseva A., Kotyleva M., Kondratenko Y., Lavrenova N., Korobeynikov A., Ermolenko E. Auto-probiotics as an approach for restoration of personalised

- microbiota. *Frontiers in microbiology* 2018 Sep; 9: 1869. doi: 10.3389/fmicb.2018.01869
37. Gromova L. V., Ermolenko E. I., Sepp A. L., Dmitrieva Y. V., Alekseeva A. S., Lavrenova N. S., Gruzdkov A. A. Gut Digestive Function and Microbiome after Correction of Experimental Dysbiosis in Rats by Indigenous Bifidobacteria. *Microorganisms* 2021 Mar; 9(3): 522. doi: 10.3390/microorganisms9030522
 38. Ermolenko E. I., Yerofeev N. P., Zakharova L. B., Pariyskaya E. N., Kotyleva M. P., Kramskaya T. A., Suvorov A. N. (2017). Features of the composition of the microbiota and intestinal motility after correction of experimental dysbiosis by probiotic and autoprobiotic enterococci. *Experimental and clinical gastroenterology*, 2017; 7(143): 89–96. (In Russ.)
Ермоленко Е. И., Ерофеев Н. П., Захарова Л. Б., Парийская Е. Н., Котылева М. П., Крамская Т. А., Суворов А. Н. Особенности состава микробиоты и моторики кишечника после коррекции экспериментального дисбиоза пробиотическими и аутопробиотическими энтерококками. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология* 2017; 7(143): 89–96.
 39. Solovyova O. I., Simanenkova V. I., Suvorov A. N., Ermolenko E. I., Shumikhina I. A., Sviridov, D. A. The use of probiotics and autoprobiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *Experimental and clinical gastroenterology* 2017; 7 (143): 115–120 (In Russ.)
Соловьева О. И., Симаненков В. И., Суворов А. Н., Ермоленко Е. И., Шумихина И. А., Свиридо, Д. А. Использование пробиотиков и аутопробиотиков в лечении синдрома раздраженной толстой кишки. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология* 2017; 7 (143): 115–120.
 40. Alferova L. S., Ermolenko E. I., Chernikova A. T., Novikova N. S., Anopova A. D., Vasyukova E. A., Suvorov A. N. Autoprobiotic enterococci as a component of complex therapy of metabolic syndrome. *Russian Journal of Personalized Medicine* 2023; 2 (6): 98–114. (In Russ.)
Алфёрова Л. С., Ермоленко Е. И., Черникова А. Т., Новикова Н. С., Анопова А. Д., Васюкова Е. А., Суворов А. Н. Аутопробиотические энтерококки как компонент комплексной терапии метаболического синдрома. *Российский журнал персонализированной медицины* 2023; 2 (6): 98–114.
 41. Artemyev I. A., Ermolenko E. I., Kostyleva M. P., Gladysheva N. P., Tsapieva A. N., Gaidukova I. Z., Maslyansky A. L. The use of autoprobiotics in the complex therapy of axial spondyloarthritis. *Russian Journal of Personalized Medicine* 2023; 3 (1): 80–97 (In Russ.)
Артемьев И. А., Ермоленко Е. И., Котылева М. П., Гладышева Н. П., Цапиева А. Н., Гайдукова И. З., Маслянский А. Л. Использование аутопробиотиков при комплексной терапии аксиального спондилоартрита. *Российский журнал персонализированной медицины* 2023; 3 (1): 80–97
 42. A method for obtaining an autoprobiotic based on *Enterococcus faecium*, a representative of the indigenous intestinal microflora of the host. Suvorov A. N., Simanenkova V. I., Sundukova Z. R., Ermolenko E. I., Tsapieva A. N., Donetsk V. N., Solovyova O. I. Patent for invention RUS 2460778 12/30/2010. (In Russ.)
Способ получения аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина. Суворов А. Н., Симаненков В. И., Сундукова З. Р., Ермоленко Е. И., Цапиева А. Н., Донец В. Н., Соловьева О. И. Патент на изобретение RUS 2460778 30.12.2010.
 43. Vershinin A. E., Kolodzhieva V. V., Ermolenko E. I., Grabovskaia K. B., Klimovich B. V., Suvorov A. N., Bondarenko V. M. Genetic identification as method of detection of pathogenic and symbiotic strains of enterococci. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2008 Sep-Oct; 5: 83–87. (In Russ.)
 44. Hendler, R., & Zhang, Y. (2018). Probiotics in the treatment of colorectal cancer. *Medicines*, 5(3), 101. *Medicines* 2018; 5 (3): 101. doi: 10.3390/medicines5030101
 45. Pitsillides L., Pellino, G., Tekkis P., Kontovounisios C. The Effect of Perioperative Administration of Probiotics on Colorectal Cancer Surgery Outcomes. *Nutrients* 2021 Feb; 13 (5): 1451. doi: 10.3390/nu13051451
 46. Bagnenko S. F. et al. Perioperative changes in intestinal microbiocenosis in patients with colon cancer. *Bulletin of Surgery named after A.I. Grekov* 2016; 175 (6): 33–37. (In Russ.)
Багненко С. Ф., Захаренко А. А., Суворов А. Н., Шлык И. В., Тен О. А., Джамилов Ш. Р., Рыбальченко В. А. Периперационные изменения кишечного микробиоценоза у больных раком толстой кишки. *Вестник хирургии имени ИИ Грекова* 2016; 175(6): 33–37.
 47. Vorobyeva A., Gershanovich M. L., Petrov L. N. Prerequisites and prospects for the use of probiotics in the complex therapy of cancer patients. *Questions of oncology*. 2004; 50 (3): 361–365. (In Russ.)
Воробьев А. А., Гершанович М. Л., Петров Л. Н. Предпосылки и перспективы применения пробиотиков в комплексной терапии онкологических больных. *Вопросы онкологии* 2004; 50 (3): 361–365.
 48. Mogensen I. R., Tore M., Rangan F. G. Functional Aspects of Pro-and Prebiotics A literature review on immune modulation and influence on cancer. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2000; 12 (2): 40–44. doi: 10.1080/089106000750060279
 49. Ohigashi S, Hoshino Y, Ohde S, Onodera H. Functional outcome, quality of life, and efficacy of probiotics in post-operative patients with colorectal cancer. *Surg Today* 2011 Aug; 41 (9): 1200–1206. doi: 10.1007/s00595-010-4450-6
 50. O'Keefe S. J., Ou J., Aufreiter S., O'Connor D., Sharma S., Sepulveda J., Mawhinney T. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *The Journal of nutrition* 2009 Sep; 139 (11): 2044–2048. doi: 10.3945/jn.109.104380
 51. Wang X., Huycke M. M. Colorectal cancer: role of commensal bacteria and bystander effects. *Gut Microbes* 2015; 6(6):370–6. doi: 10.3945/jn.109.104380
 52. Zorina V. N. et al. Production of proinflammatory cytokines and alpha-2-macroglobulin by peripheral blood cells of patients with colorectal cancer. *Medical Immunology* 2016; 18 (5): 483–488. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-483-488
Зорина В. Н., Промзелева Н. В., Зорин Н. А., Рябичева Т. Г., Зорина Р. М. Продукция провоспалительных цитокинов и альфа-2-макроглобулина клетками периферической крови больных колоректальным раком. *Медицинская иммунология* 2016; 18 (5): 483–488. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-483-488
 53. Promzeleva N. V. Zorina V. N., Baranov A. I., Ryabicheva, T. G., Zorina R. M., Zorin N. A. Regulatory transport proteins and serum cytokines in colorectal cancer. *Questions of oncology*. 2015; 61(5): 774–777. (In Russ.)
Промзелева Н. В., Зорина В. Н., Баранов А. И., Рябичева, Т. Г., Зорина Р. М., Зорин Н. А. Регуляторно-транспортные белки и цитокины сыворотки крови при колоректальном раке. *Вопросы онкологии*. 2015; 61(5): 774–777.

54. Khare P, Bose A., Singh P, Singh S., Javed S., Jain S. K., Pal R. Gonadotropin and tumorigenesis: direct and indirect effects on inflammatory and immunosuppressive mediators and invasion. *Molecular Carcinogenesis*. 2017 May; 56 (2): 359–370. doi: 10.1002/mc.22499.
55. Sparreboom C. L., Wu Z., Dereci A., Boersema G. S., Menon A. G., Ji J., Lange J. F. Cytokines as early markers of colorectal anastomotic leakage: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology research and practice*. 2016 Nov; 2016. doi: 10.1155/2016/3786418.
56. Simanenkova V. I., Bakulina N. V., Tikhonov S. V., Ermolenko E. I., Dekkanova V. D., Kotyleva M. P., Tsapieva A. N. Efficacy and safety of autoprobiotic therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Medical Alphabet*. 2020; 1(30): 48–53. (In Russ.)
Симаненков В. И., Бакулина Н. В., Тихонов С. В., Ермоленко Е. И., Декканова В. Д., Котылева М. П., Цапиева А. Н. Эффективность и безопасность аутопробиотической терапии у пациентов с сахарным диабетом второго типа. *Медицинский алфавит*. 2020; 1 (30): 48–53.
57. Suvorov A. N., Simanenkova V. I., Sundukova Z. R., Ermolenko E. I., Tsapieva A. N., Donets V. N., Solovyova O. I. Patent for invention RUS 2460778 12/30/2010. (In Russ.)
Суворов А. Н., Симаненков В. И., Сундукова З. Р., Ермоленко Е. И., Цапиева А. Н., Донец В. Н., Соловьева О. И. Патент на изобретение RUS 2460778 30.12.2010
58. Nugent J. L., McCoy A. N., Addamo C. J., Jia W., Sandler R. S., Keku T. O. Altered tissue metabolites correlate with microbial dysbiosis in colorectal adenomas. *Journal of proteome research*. 2014 Mar; 13 (4): 1921–1929. doi: 10.1021/pr4009783.
59. Sanapareddy N., Legge R. M., Jovov B., McCoy A., Burcal L., Araujo-Perez F., Keku T. O. Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *The ISME journal*. 2012 May; 6 (10): 1858–1868. doi: 10.1038/ismej.2012.43.
60. Xu K., Jiang B. Analysis of mucosa-associated microbiota in colorectal cancer. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2017; 23: 4422. doi: 10.12659/MSM.904220.
61. Shen X. J., Rawls J. F., Randall T. A., Burcall L., Mpande C., Jenkins N., Keku T. O. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut microbes*. 2010 May; 1 (3): 138–147. doi: 10.4161/gmic.1.3.12360.
62. Sze M. A., Baxter N. T., Ruffin M. T., Rogers M. A., Schloss P. D. Normalization of the microbiota in patients after treatment for colonic lesions. *Microbiome*. 2017 Nov; 5 (1): 1–10. doi: 10.1186/s40168-017-0366-3.
63. Sitkin, S., Pokrotnieks, J. Gut microbiota as a host defender and a foe: the 2 faces of commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2019 May; 25 (6), e71–e71. doi: 10.1093/ibd/izy377.
64. Ryu T. Y., Kim K., Han T. S., Lee M. O., Lee J., Choi J., Cho H. S. Histone methyltransferase EHMT2 degradation by propionate derived from *Bacteroides thetaiotaomicron* induced colon cancer apoptosis via epigenetic regulation of TNFAIP1 2020 Apr; doi.org/10.21203/rs.3.rs-22596/v1.
65. Shenderov B. A., Yudin S. M., Zagaynova A. V., Shevyreva M. P. The role of commensal gut bacteria in the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease: *Akkermansia muciniphila*. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2018;159(11): 4–13. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-159-11-4-13.
- Шендеров, Б. А., Юдин, С. М., Загайнова, А. В., & Шевырева, М. П. (2018). Роль комменсальной кишечной микробиоты в этиопатогенезе хронических воспалительных заболеваний: *Akkermansia muciniphila*. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология* 2018; 11 (159): 4–13. (In Russ.). doi: 10.31146/1682-8658-ecg-159-11-4-13.
66. Wang K, Wu W, Wang Q, Yang L, Bian X, Jiang X, Lv L, Yan R, Xia J, Han S and Li L. The negative effect of *Akkermansia muciniphila*-mediated post-antibiotic reconstitution of the gut microbiota on the development of colitis-associated colorectal cancer in mice. *Front. Microbiol*. 2010; 13:932047. doi: 10.3389/fmicb.2022.932047 022.
67. Wang F, Cai K, Xiao Q, He L, Xie L, Liu Z. *Akkermansia muciniphila* administration exacerbated the development of colitis-associated colorectal cancer in mice. *J Cancer*. 2020 Jan; 13 (1): 124–133. doi: 10.7150/jca.63578.
68. Gong D, Gong X, Wang L, Yu X, Dong Q. Involvement of reduced microbial diversity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Research and Practice*. 2016;2016:6951091.. doi: 10.1155/2016/6951091.
69. Wang Z., Xiao R., Huang J., Qin X., Hu D., Guo E., Chen G. The diversity of vaginal microbiota predicts neoadjuvant chemotherapy responsiveness in locally advanced cervical cancer. *Microbial ecology*. 2021 Aug; 1–12. doi: 10.1007/s00248-021-01800 71.
70. Li Z., Zhou J., Liang H., Ye L., Lan L., Lu F., Huang J. Differences in alpha diversity of gut microbiota in neurological diseases. *Frontiers in Neuroscience*. 2022 Jun; 16: 892. doi: 10.3389/fnins.2022.879318.
71. Zorron Cheng Tao Pu L., Yamamoto K., Honda T., Nakamura M., Yamamura T., Hattori S., Fujishiro M. Microbiota profile is different for early and invasive colorectal cancer and is consistent throughout the colon. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2019 Oct; 35 (3): 433–437. doi.org/10.1111/jgh.14868.
72. Gur C., Ibrahim Y., Isaacson B., Yamin R., Abed J., Gamliel M., Mandelboim, O. Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity*. 2015 Feb; 42 (2): 344–355. doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.010.
73. Drewes J. L., White J. R., Dejea C. M., Fathi P., Iyadorai T., Vadivelu J., Sears C. L. High-resolution bacterial 16S rRNA gene profile meta-analysis and biofilm status reveal common colorectal cancer consortia. *NPJ biofilms and microbiomes*. 2017; 3(1): 34. doi.org/10.1038/s41522-017-0040-3.
74. Purcell R. V., Visnovska M., Biggs P. J., Schmeier S., Frizelle F. A. Distinct gut microbiome patterns associate with consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Scientific reports*. 2017 Sep; 7 (1): 11590. https://doi.org/10.1038/s4159 8-017-11237-6.
75. Desantis T. Z., Weinmaier T., Shah M. S., Hollister-Branton E. B. Leveraging sequence-based fecal microbial community survey data to identify a composite biomarker for colorectal cancer. 2017 Mar; Application PCT/US2018/022862 events. https://patents.google.com/patent/WO2018170396A1/en
76. Yu J., Feng Q., Wong S. H., Zhang D., yi Liang Q., Qin Y., Wang J. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut*. 2015 Sep; 66 (1): 70–78. doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309800.
77. Löwenmark T., Löfgren-Burström A., Zingmark C., Eklöf V., Dahlberg M., Wai S. N., Palmqvist R. *Parvimonas micra* as a putative non-invasive faecal biomarker for colorectal cancer. *Scientific reports*. 2020 Sep; 10 (1): 1–10. doi: 10.1038/s41598-020-72132-1.