

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Данилова Н.А.¹, Абдулхаков С.Р.^{1,2}, Григорьева Т.В.², Маркелова М.И.², Павленко А.В.³, Тяхт А.В.³, Дубинкина В.Б.⁴, Кострюкова Е.С.³, Ларин А.К.³, Скородумова Л.О.³, Манолов А.И.³, Одинцова А.Х.⁵, Абдулхаков Р.А.¹

¹ Казанский государственный медицинский университет

² Казанский федеральный университет

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины федерального медико-биологического агентства

⁴ Московский физико-технический институт

⁵ Республиканская клиническая больница МЗ РТ

CHANGES OF INTESTINAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS

Danilova N.A.¹, Abdulkhakov S.R.^{1,2}, Grigoryeva T.V.², Markelova M.I.², Pavlenko A.V.³, Tyakht A.V.³, Dubinkina V.B.⁴, Kostryukova E.S.³, Larin A.K.³, Skorodumova L.O.³, Manolov A.I.³, Odintsova A.K.⁵, Abdulkhakov R.A.¹

¹ Kazan State Medical University

² Kazan Federal University

³ Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology

⁵ Republican Clinical Hospital of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan

Данилова

Наталья Александровна

Danilova Natalya A.

danilova.natalya.87@mail.ru

Данилова Наталья Александровна — кафедра госпитальной терапии, аспирант

Абдулхаков Рустам Аббасович — кафедра госпитальной терапии, профессор, д.м.н.

Абдулхаков Сайяр Рустамович — кафедра общей врачебной практики, ассистент; OpenLab «Генные и клеточные технологии», старший научный сотрудник, к.м.н.

Григорьева Татьяна Владимировна — OpenLab «Омиксные технологии», старший научный сотрудник, к.б.н.

Маркелова Мария Ивановна — OpenLab «Омиксные технологии», младший научный сотрудник

Павленко Александр Владимирович — научный сотрудник

Тяхт Александр Викторович — старший научный сотрудник лаборатории биоинформатики, к.б.н.

Дубинкина Вероника Борисовна — аспирант

Кострюкова Елена Сергеевна — заведующий лабораторией постгеномных исследований в биологии, к.б.н.

Ларин Андрей Константинович — младший научный сотрудник

Скородумова Любовь Олеговна — лаборант-исследователь

Манолов Александр Иванович — младший научный сотрудник

Одинцова Альфия Харисовна — заведующая гастроэнтерологическим отделением, к.м.н.

Danilova N. A. — PhD student of the Department of Hospital Therapy

Abdulkhakov S. R. — Department of General Medical Practice, Assistant Professor; OpenLab Gene and Cell Technologies, senior researcher, PhD

Grigoryeva T. V. — OpenLab Omics technologies, senior researcher, PhD biologist

Markelova M. I. — OpenLab Omics technologies, junior researcher

Pavlenko A. V. — researcher

Tyakht A. V. — senior researcher of bioinformatics laboratory, PhD biologist

Dubinkina V. B. — PhD student

Kostryukova E. S. — head of laboratory of post-genomic research in biology, PhD biologist

Larin A. K. — junior researcher

Skorodumova L. O. — laboratory researcher

Manolov A. I. — junior researcher

Odintsova A. Kh. — Head of Gastroenterology Department, PhD

Abdulkhakov R. A. — Department of Hospital Therapy, Professor, D. Med. Sc

Резюме

Цель исследования: изучить особенности кишечной микробиоты у пациентов с язвенным колитом.

Материалы и методы исследования: в исследование были включены 46 пациентов с язвенным колитом (25 мужчин и 21 женщина, средний возраст пациентов — 42,4±13,8 лет, длительность заболевания: 5,4 ± 8,2 лет). Для анализа были использованы результаты секвенирования образцов кала пациентов с язвенным колитом и 96 здоровых добровольцев. Полногеномное секвенирование осуществлялось на платформе SOLiD 5500 W (Life Technologies, Foster City, CA, USA).

Результаты: метагеномный анализ позволил детектировать в составе микробиоты кишечника у пациентов с язвенным колитом 29 классов бактерий, в том числе: 73 семейства, 154 рода, 437 вида микроорганизмов. На прокариотическую часть микробиоты приходится 99,5 % (из них 98,2 % — Bacteria, 1,8 % — Archaea), на вирусы — 0,5 %, эукариоты — 0,004 %. Таксономический анализ выявил изменения у пациентов с язвенным колитом по сравнению с группой контроля в относительной представленности бактериальных семейств: наблюдалось снижение *Lachnospiraceae*, *Rikenellaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Clostridiaceae* и увеличение *Enterobacteriaceae*. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* значимо отличался только род *Escherichia*, вид *Escherichia coli*. У пациентов с язвенным колитом представленность *Escherichia* составила $(3,74 \pm 8,01)\%$ и была больше, чем в группе контроля — $(1,49 \pm 5,23)\%$, тогда как содержание *Clostridium* — $(1,15 \pm 3,35)\%$ — было значительно меньше у пациентов с язвенным колитом, чем в группе контроля — $(2,33 \pm 4,26)\%$. При анализе биообразцов пациентов с язвенным колитом обнаружено снижение по сравнению с группой контроля индекса альфа-разнообразия, который характеризует богатство микробного сообщества.

Выводы: у пациентов с язвенным колитом выявлены значительные изменения таксономического состава микробиоты по сравнению с образцами контрольной группы.

Ключевые слова: микробиота, язвенный колит, воспалительные заболевания кишечника, метагеном

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2017; 142 (6): 54–60

Summary

The aim of the study was to evaluate the representation of the microbial community in patients with ulcerative colitis.

Materials and methods. The study included 46 patients with ulcerative colitis (25 men and 21 women, aged $42,4 \pm 13,8$ years, duration of the disease — $5,42 \pm 8,21$ years). Results of sequencing of ulcerative colitis patients stool samples as well as samples from 96 healthy volunteers were used for analysis. Whole genome sequencing was carried out on the SOLiD 5500W platform (Life Technologies, FosterCity, CA, USA).

Results. Metagenomic analysis allowed us to detect 29 classes of bacteria, including: 73 families, 154 genera, 437 species of microbes in intestinal microbiota of patients with ulcerative colitis. The prokaryotic part of microbiota formed 99.5 % (98.2 % — Bacteria, 1.8 % — Archaea), viruses — 0.5 %, eukaryotes — 0.004 % of all intestinal microbiota. Taxonomic analysis revealed changes in the relative representation of bacterial families: we observed decrease in *Lachnospiraceae*, *Rikenellaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Clostridiaceae* and increase in *Enterobacteriaceae*. Only the number of *Escherichia* genus, particularly *Escherichia coli* species was significantly abundant among the members of *Enterobacteriaceae* family. In ulcerative colitis patients the fraction of *Escherichia* was $(3,74 \pm 8,01)\%$ which was greater than in the control group $(1,49 \pm 5,23)\%$, whereas the fraction of *Clostridium* $(1,15 \pm 3,35)\%$ was significantly lower in patients with ulcerative colitis than in the control group $(2,33 \pm 4,26)\%$. The alpha-diversity index which characterizes richness of the microbial community was decreased in stool samples of patients with ulcerative colitis in comparison with the control group.

Conclusions. The metagenomics analysis revealed significant changes in intestinal microbiota in ulcerative colitis patients comparing with the control group.

Key words: intestinal microbiota, ulcerative colitis, inflammatory bowel diseases, metagenome

Ekspperimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2017; 142 (6): 54–60

Работа выполнена при поддержке гранта РФ № 16–15–00258 и в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

Исследования выполнены на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета.

Введение

Результаты современных отечественных и зарубежных исследований указывают на значительную роль микрофлоры в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) [1–6]. Впервые в 1907 году И.И. Мечников выдвинул гипотезу о влиянии микрофлоры кишечника на здоровье человека [7]. В 1926 г. Nissle A. показал, что перенос кишечной микрофлоры от здорового человека

к носителям *Salmonella typhimurium* приводит к эрадикации патогенного микроорганизма, и, тем самым, продемонстрировал защитную функцию кишечной микрофлоры [8].

Число и состав микрофлоры варьируют в зависимости от отдела желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Микробиота кишечника представлена от 500 до 1000 видов микроорганизмов

с соотношением анаэробов к аэробам 1000:1, а ее совокупный генный потенциал оценивается в 3–9 миллионов генов [9, 10].

В 2009 году Costello E. K. и соавторы провели исследование на 9 добровольцах обоих полов, проанализировав методом 16S рРНК секвенирования биообразцы, отобранные из различных участков тела: кал, волосы на голове, ротовая полость, участки кожи и др. [11]. Было показано, что более 90 % микробиоты кишечника человека состоит из четырех основных фил микроорганизмов. Это представители нормальной кишечной флоры: *Firmicutes* (49 %–76 %), которые в основном представлены *Clostridium* XIV и IV групп, *Bacteroidetes* (16 %–23 %), которые преобладают в дистальном отделе кишечника [12] и, в меньшей степени, *Proteobacteria* и *Actinobacteria* [13–15].

По данным проведенного в 2009 году Mariat D. и соавторами исследования было показано, что состав кишечной микробиоты изменяется с возрастом. В частности, соотношение основных представителей кишечной микробиоты – *Firmicutes* и *Bacteroidetes* – существенно отличается у лиц разных возрастных групп [16]. Изменения состава микробиоты с возрастом, начиная от периода новорожденности до раннего детства и, наконец, зрелого возраста связаны со снижением количества *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* и увеличением *Firmicutes*, *Clostridium* и *Bacteroides*, что может привести к более высокому риску развития аллергических и иммунологических заболеваний [17]. В этой связи возникла гипотеза, что уменьшение биоразнообразия в рамках непатогенной микробиоты может негативно влиять на показатели иммунного распознавания и активации клеток в процессе формирования иммунной системы, и, таким образом, стать одним из возможных факторов риска развития ВЗК в более старшем возрасте [18, 19]. Несмотря на доказанную изменчивость состава кишечной микробиоты, 60 % всех бактериальных видов сохраняются у человека неизменными на протяжении от 5 до 17 лет [20].

На сегодняшний день большое внимание уделяется изучению состава кишечной микробиоты при таких заболеваниях, как ВЗК, синдром раздраженного кишечника, целиакия, сахарный диабет 2 типа, заболевания нервной системы и ряде других [21–26].

Показано, что состав микробиоты кишечника у больных язвенным колитом (ЯК) отличается от здоровых людей снижением количества доминирующих представителей нормальной микрофлоры [27]. В некоторых исследованиях отмечается значительное снижение количества *Bifidobacteria* в кале у пациентов с ЯК по сравнению с контрольной группой здоровых лиц [28], а также снижение *Firmicutes* и увеличение *Proteobacteria* у пациентов с ВЗК. При ЯК также отмечено увеличение количества *Fusobacteria varium* по сравнению со здоровыми людьми [29]. В исследовании Vrakas S. и соавторов (2017) было показано, что у пациентов с ВЗК как в стадии обострения, так и в ремиссию заболевания наблюдалось уменьшение *Clostridium leptum* group (IV) и *Faecalibacterium prausnitzii* и увеличение количества *Bacteroides* spp. [4].

По данным большинства исследований, уменьшение количества *Firmicutes* наблюдается в основном за счет снижения представленности *Clostridium leptum* и *Faecalibacterium prausnitzii*, однако единого мнения в отношении *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* на сегодняшний день нет. Причинами отличий результатов, полученных в разных исследованиях, могут быть особенности образцов, взятых для анализа (биопсия или кал), место взятия исследуемого материала (из воспаленного или невоспаленного участка кишки), активность заболевания, лекарственные препараты, диета, возраст больного, курение и методы, используемые для анализа состава микробиоты [30].

Изменения количественного и качественного состава микробиоты кишечника сохраняются даже при стихании обострения воспалительного процесса: отмечено уменьшение количества нормальных анаэробных бактерий, таких как *Bacteroides*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* и *Ruminococcus*, и разнообразия микрофлоры кишечника в период ремиссии ЯК; состав микрофлоры кишечника у пациентов с ЯК был нестабильным в течение года даже на фоне ремиссии заболевания [31].

Состав кишечной микробиоты существенно меняется и при других заболеваниях, напрямую не связанных с поражением слизистой оболочки кишечника. В проведенном в 2015 году В.В. Дубинкиной и соавторами исследовании было выявлено, что при длительном употреблении алкоголя изменяется относительная представленность отдельных родов и видов бактерий, некоторые из них были ассоциированы с ВЗК. Так, например, отмечено повышение уровня видов *Ruminococcus gnavus* и *Ruminococcus torques*, которые активно участвуют в расщеплении муцина, выделяемого слизистой оболочкой кишечника; кроме того, у *Ruminococcus gnavus* был выявлен ген фермента транс-сиалидазы, который помогает бактерии приспособиться к существованию в слизистой оболочке кишечника [32]. Лекарственные препараты также влияют на состав микрофлоры кишечника. В 2012 году Michail S. и соавт. провели исследование с участием 27 детей, госпитализированных с тяжелой формой ЯК, и 26 здоровых добровольцев. Было выявлено, что у детей со стероидорезистентной формой ЯК число бактериальных видов уменьшается по сравнению с детьми, которые ответили на терапию глюкокортикостероидами. В исследовании был использован индекс Шеннона для оценки разнообразия сообщества; он был снижен у больных ЯК по сравнению с группой контроля [33].

Существенную роль в изменении состава микробиоты играют антибактериальные препараты. В частности, прием антибактериальных препаратов, входящих в схемы эрадикационной терапии *H. pylori*, сопровождается изменением состава кишечной микробиоты: в большинстве случаев уменьшением как числа детектируемых видов, так и индекса Шеннона, характеризующего видовое разнообразие бактерий [34]. Показано, что 14-дневный курс эрадикационной терапии приводит к уменьшению представленности родов *Coprococcus*, *Bifidobacterium*, *Collinsella* и увеличению для *Clostridium*, *Bacteroides*, *Coprobacillus* и *Flavonifractor*, причем, у большинства пациентов наблюдались незначительные изменения, связанные

с увеличением представленности рода *Bacteroides* и снижением *Bifidobacterium* и *Eubacterium*. Выраженные изменения состава кишечной микробиоты, которые наблюдались у 18 % пациентов, сопровождалось увеличением количества бактерий рода *Escherichia* [34, 35].

На сегодняшний день для изучения состава кишечной микробиоты используют бактериологическое исследование кала, хромато-масс-спектрометрию, исследование микробных метаболитов, полимеразную цепную реакцию, результаты гистохимического, морфологического исследования микроорганизмов, секвенирование [36, 37].

Культуральный метод, основанный на применении различных питательных сред для выращивания микробных популяций (живых культур) в зависимости от их метаболической активности, является наиболее распространенным и традиционно применяется для оценки состава микрофлоры кишечника. Данный метод позволяет идентифицировать не только нормальную микрофлору, но и выявить условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, а также определить чувствительность

к антибиотикам. Однако классическое бактериологическое исследование не позволяет определить наличие облигатных анаэробов, а также сопоставить относительные уровни представленности для родов, поскольку они растут на разных средах, при этом оценивается только полостная и транзиторная и не оценивается пристеночная микрофлора [38]. Для определения качественного и количественного состава бактериальной флоры и оценки пристеночной микробиоты иногда используют ПЦР-диагностику в реальном времени. Преимущества данного метода заключаются в том, что он не предъявляет жесткие условия к жизнеспособности микроорганизмов в исследуемых образцах [39].

Наиболее точным и информативным методом на данный момент является метагеномное секвенирование, которое дает качественную и количественную характеристику таксономического и функционального состава микробиоты, в том числе некультивируемых видов [12, 40].

Целью нашего исследования было изучение таксономических особенностей микробиоты кишечника у больных ЯК.

Материалы и методы

В исследование были включены 46 пациентов с ЯК (25 мужчин и 21 женщина, средний возраст пациентов – $42,4 \pm 13,8$ лет; средний индекс массы тела – $25,5 \pm 4,7$ кг/м²). Средняя длительность заболевания составила $5,4 \pm 8,2$ лет. Все пациенты получали базисную терапию препаратами 5-аминосалициловой кислоты. Для анализа были использованы результаты секвенирования образцов кала пациентов с ЯК. Забор кала осуществляли в индивидуальный пластиковый контейнер, образец весом 10–20 г подвергали немедленной заморозке и хранили при -80 °C. Подготовка фрагментной библиотеки ДНК и полногеномное секвенирование на платформе

SOLiD 5500 W (Life Technologies, Foster City, CA, USA) были произведены в соответствии с инструкциями производителя; для таксономического профилирования метагеномов использовали программу MetaPhlAn2 [41]. Идентификация таксонов, относительная представленность которых значительно различается между группами образцов, проводилась с использованием рангового критерия Манна-Уитни (уровень значимости 0,05, поправка на множественные сравнения по методу Бенджамини-Хохберга (FDR). В качестве внешнего контроля были использованы результаты секвенирования 96 образцов микробиоты здоровых добровольцев [40].

Результаты и их обсуждение

Доля прочтений, откартированных на геном человека в исследуемых образцах, составила ($14,61 \pm 18,62$)% против ($0,47 \pm 0,91$)% в контрольной группе, что, очевидно, говорит о наличии воспалительного процесса в кишечнике у пациентов исследуемой группы (рис. 1).

Метагеномный анализ позволил детектировать в составе микробиоты кишечника у больных ЯК 29 классов бактерий, в том числе: 73 семейства, 154 рода, 437 вида микроорганизмов. На прокариотическую часть микробиоты в среднем приходится 99,5 % (из них 98,2 % – Bacteria, 1,8 % – Archaea), вирусы – 0,5 %, эукариоты – 0,004 % (чаще всего обнаруживались грибы рода *Saccharomyces*). В образцах у пациентов с ЯК были выявлены четыре основных филогенетических группы бактерий: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* – данные филогенетические группы являются представителями нормальной микрофлоры кишечника [42] и совпадают с представленными у группы контроля.

Преобладающими в биообразцах, полученных от пациентов с ЯК, являются бактерии родов *Bacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Escherichia* и *Faecalibacterium*.

Отмечено достоверное повышение определенных бактериальных родов у больных ЯК относительно группы контроля (таблица 1).

В образцах пациентов с ЯК по сравнению с группой контроля было выявлено значительное снижение комменсальных микроорганизмов следующих семейств: *Lachnospiraceae*, *Rikenellaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Clostridiaceae*, за исключением *Enterobacteriaceae*, уровень которых был повышен (таблица 2).

Полученные нами данные подтверждают результаты проведенных ранее исследований, в которых было показано, что у пациентов с ВЗК наблюдается высокий уровень представителей семейства *Enterobacteriaceae*, включая *Escherichia coli*, *Klebsiella*

Рисунок 1.
Процент высококачественных ридов, откартированных на геном человека, в исследованных образцах (черные точки). Пунктирная линия показывает среднее значение этой величины в контрольной выборке.

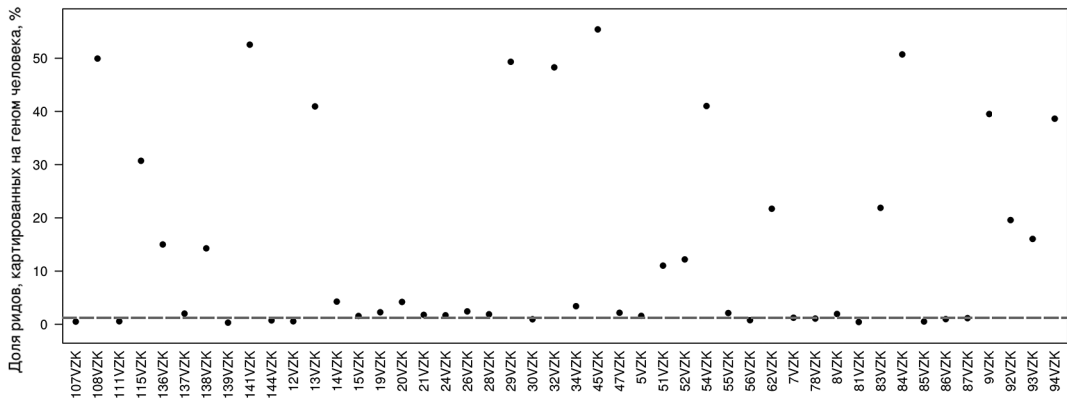


Таблица 1
Сравнительный анализ отличий между родами у пациентов с ЯК и группы контроля

Род	Среднее значение, группа контроля	Стандартное отклонение, группа контроля	Среднее значение, группа пациентов с ЯК	Стандартное отклонение, группа пациентов с ЯК	FDR adj. p-value (<0.05)
Anaerococcus	0	0	0,029	0,147	0,002
Bacteroides	7,820	10,748	17,368	17,572	0,001
Escherichia	1,491	5,231	3,740	8,015	0,004
Mitsuokella	0,060	0,148	0,253	1,501	0
Peptoniphilus	0	0,002	0,099	0,302	0,007
Peptostreptococcus	0,001	0,009	0,419	0,909	0

Рисунок 2.
Распределение значения индекса альфа-разнообразия по опытным образцам (черные точки). Сплошной линией отмечено среднее значение этого параметра для контрольной выборки, пунктиром – ± стандартное отклонение.

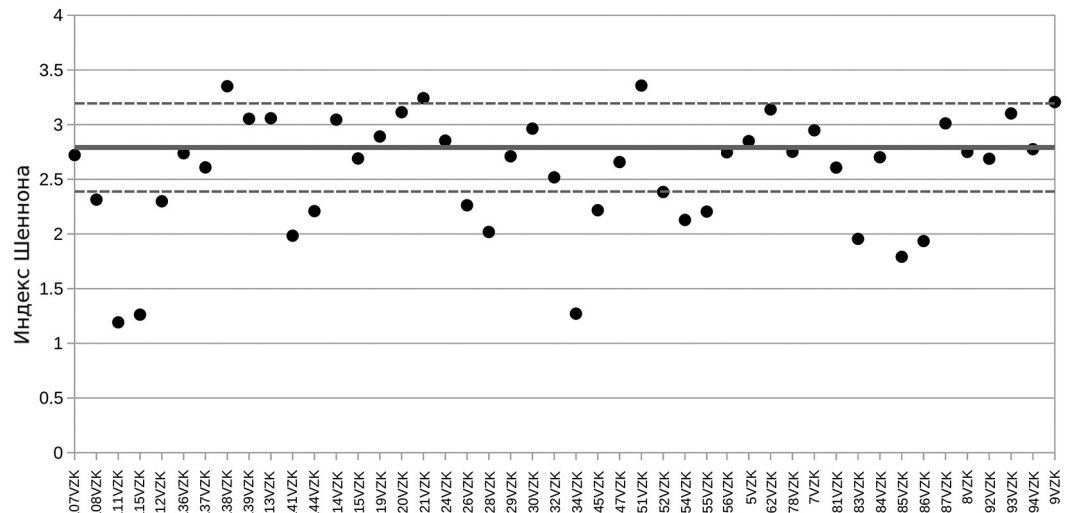


Таблица 2
Сравнительный анализ отличий между семействами у пациентов с ЯК и группы контроля

Таксон	Среднее значение, группа контроля	Стандартное отклонение, группа контроля	Среднее значение, группа пациентов с ЯК	Стандартное отклонение, группа пациентов с ЯК	FDR adj. p-value (<0.05)
Lachnospiraceae	19,18	9,21	10,26	8,5	0
Rikenellaceae	2,63	2,55	1,08	2,21	0
Acidaminococcaceae	1,19	2,27	0,69	1,6	0,0001
Verrucomicrobiaceae	0,97	2,4	0,5	2,74	0
Clostridiaceae	2,35	4,26	1,27	3,41	0,014
Enterococcaceae	0,25	0,61	0,22	0,8	0,0005
Desulfovibrionaceae	0,1	0,1	0,09	0,22	0,0037
Enterobacteriaceae	0,6	0,89	4,39	9,06	0,0357

pneumonia и *Proteus mirabilis*, что указывает на их возможную провокационную роль в развитии воспалительного процесса в кишечнике [29]. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae*, присутствующих у пациентов, нами были обнаружены рода *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Raoultella*, *Shigella*, неклассифицируемые представители семейства *Enterobacteriaceae*, однако, значимо отличался только род *Escherichia*, вид *Escherichia coli*. У пациентов с ЯК отмечалось повышение *Escherichia coli* ($3,72 \pm 8,02\%$) по сравнению с группой контроля ($1,46 \pm 5,22\%$), $p=0,02$. Бактерия *Escherichia coli* в организме человека играет неоднозначную роль: с одной стороны, она может усиливать воспаление при ЯК, с другой, может способствовать уменьшению воспаления кишечника путем ингибирования образования гидроксильных радикалов [43].

Интересным представляется повышение представленности бактерий рода *Ruminococcus gnavus* у пациентов с ЯК: ($2,18 \pm 8,06\%$) по сравнению

с ($2,18 \pm 8,06\%$) в образцах контрольной группы. *Ruminococcus gnavus* продуцирует руминококцин А, который подавляет рост патогенных *Clostridium* и бактерий, которые филогенетически связаны с *R. gnavus* [44], возможно, поэтому содержание *Clostridium* ($1,15 \pm 3,35\%$) было значительно меньше у пациентов с ЯК, чем в группе контроля ($2,33 \pm 4,26\%$), $p = 0,0058$.

Для оценки состава микробиоты кишечника был использован индекс альфа-разнообразия Шеннона, который прямо ассоциирован со здоровым клиническим статусом [45]. При анализе биообразцов пациентов с ЯК мы наблюдали снижение индекса альфа-разнообразия Шеннона ($2,57 \pm 0,53$) по сравнению с контрольной группой ($2,79 \pm 0,40$), $p=0,038$ (рис. 2).

Эпидемиологические данные и результаты большого количества исследований позволяют предположить, что нарушение регуляции состава микробиоты кишечника и снижение разнообразия ее представителей могут быть причинными факторами возникновения ВЗК [4, 13, 18, 46, 47].

Выводы

Анализ метагеномных данных у пациентов с ЯК, включающий оценку таксономического состава микробиоты кишечника, продемонстрировал

значительные изменения по сравнению с образцами контрольной группы.

Литература

- Li KY, Wei JP, Gao SY, et al. Fecal microbiota in pouchitis and ulcerative colitis. World Journal of Gastroenterology. 2016; 22(40):8929–8939. doi: 10.3748/wjg.v22.i40.8929
- Presley LL, Ye J, Li X, et al. Host-microbe relationships in inflammatory bowel disease detected by bacterial and metaproteomic analysis of the mucosal-luminal interface. Inflamm Bowel Dis. 2012 Mar; 18(3):409–417. doi: 10.1002/ibd.21793.
- Ganji L, Alebouyeh M, Shirazi MH, et al. Dysbiosis of fecal microbiota and high frequency of *Citrobacter*, *Klebsiella* spp., and *Actinomycetes* in patients with irritable bowel syndrome and gastroenteritis. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2016 Autumn; 9(4):325–330.
- Vrakas S, Mountzouris KC, Michalopoulos G, et al. Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. PLoS One. 2017; 12(1): e0170034. doi:10.1371/journal.pone.0170034
- Ситкин С. И., Вахитов Т. Я., Ткаченко Е. И. и соавт. Микробиота кишечника при язвенном колите и целиакии // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – № 1(137). – С. 8–30.
- Лазебник Л. Б., Конев Ю. В. Новое понимание роли микробиоты в патогенезе метаболического синдрома. // Consilium Medicum. (Прил.). – 2014. – 08. – с. 77–82.
- Мечников И. И. Этюды оптимизма. М.: Наука, 1964. – 128 с.
- Nisile A. Explanations of the significance of colonic dysbacteria & the mechanism of action of *E. coli* therapy (mutaflor) Medizinische. 1959; 4:1017–1022.
- Quigley EMM. Gut Bacteria in Health and Disease. Gastroenterol Hepatol (NY). 2013 Sep; 9(9):560–569.
- Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. Integr Med (Encinitas). 2014 Dec; 13(6):17–22.
- Costello EK, Lauber CL, Hamady M, et al. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. Science. 2009 Dec 18; 326(5960):1694–1697. doi: 10.1126/science.1177486.
- Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. Nature. 2010 Mar 4; 464(7285):59–65. doi: 10.1038/nature08821.
- Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. Semin Immunopathol. 2015; 37:47–55. doi: 10.1007/s00281-014-0454-4.
- Gill SR, Pop M, DeBoy R, et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. Science. 2006 Jun 2; 312(5778):1355–1359. doi: 10.1126/science.1124234.
- Tap J, Mondot S, Levenez F, et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. Environ Microbiol. 2009 Oct; Vol. 11 (10):2574–84. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x.
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. BMC Microbiol. 2009 Jun 9; 9:123. doi: 10.1186/1471-2180-9-123.
- Blaser MJ, Falkow S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? Nat Rev Microbiol. 2009 Dec; 7(12):887–94. doi: 10.1038/nrmicro2245.
- Brangiotti R, Lerardi E, Lovero R, et al. Intestinal microbiota: The explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease? World J Gastrointest Pathophysiol. 2014 Nov 15; 5(4):550–559. doi: 10.4291/wjg.v5.i4.550
- Bernstein CN, Shanahan F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. Gut. 2008 Sep; 57 (9):1185–1191. doi: 10.1136/gut.2007.122143.
- Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. Nat Rev Microbiol. 2016 Jan; 14 (1):20–32. doi: 10.1038/nrmicro3552.

21. Petriz BA, Franco OL. Metaproteomics as a Complementary Approach to Gut Microbiota in Health and Disease. *Front Chem*. 2017 Jan 26; 5:4. doi: 10.3389/fchem.2017.00004.
22. Yamashita T. Intestinal Immunity and Gut Microbiota in Atherogenesis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2017; Vol. 24 No. 2:110–119. doi.org/10.5551/jat.38265
23. Escobedo G, Lopez-Ortiz E, Torres-Castro I. Gut microbiota as a key player in triggering obesity, systemic inflammation and insulin resistance. *Rev Invest Clin*. 2014 Sep-Oct; 66(5):450–459.
24. Xuyun H, Guang J, Wei J, Houkai L. Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanism and Application of Metabolomics. *Int J Mol Sci*. 2016 Mar; 17(3):300. doi: 10.3390/ijms17030300.
25. Hua X, Goedert JJ, Pu A, et al. Allergy associations with the adult fecal microbiota: Analysis of the American Gut Project. *EBioMedicine*. 2015 Nov 27; 3:172–9. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.038.
26. Wieland A, Frank DN, Harnke B, Bambha K. Systematic review: Microbial dysbiosis and nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015 Nov; 42(9):1051–63. doi: 10.1111/apt.13376.
27. Ishikawa H, Abedo I, Umesaki Y, et al. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Col of Nutrition*. 2003 Feb; 22(1):56–63. doi: 10.1080/07315724.2003.10719276.
28. Saez-Lara MJ, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Gil A. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:505878. doi: 10.1155/2015/505878.
29. Ohkusa T. *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Aug; 17(8):849–53.
30. Matsuoka K, Mizuno S, Hayashi A, et al. Fecal microbiota transplantation for gastrointestinal diseases. *Keio J Med*. 2014; 63(4):69–74. doi: 10.2302/kjm.2014-0006-RE.
31. Ott SJ, et al. Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103:643–648. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01592.x.
32. Дубинкина В.Б., Тяхт А.В., Ильина Е.Н. и соавт. Метагеномный анализ таксономических и функциональных особенностей микробиоты кишечника у пациентов с синдромом алкогольной зависимости. // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61 (Вып. 6). – С. 742–749.
33. Michail S, Durbin M, Turner D, et al. Alterations in the gut microbiome of children with severe ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Oct; 18(10):1799–808. doi: 10.1002/ibd.22860.
34. Сафина Д.Д., Абдулхаков С.Р., Григорьева Т.В. и соавт. Влияние фармакотерапии на генетическое разнообразие биоценоза кишечника. // Гены & клетки. – 2015. – Том X, № 4. – С. 80–85.
35. Khusnutdinova D, Grigoryeva T, Abdulkhakov S, Safina D. Gut Microbiome Shotgun Sequencing in Assessment of Microbial Community Changes Associated with *H.pylori* Eradication Therapy. *BioNanoSci*. 2016; Vol.6, Is.4:585–587. doi:10.1007/s12668-016-0285-y.
36. Лоранская И.Д., Болдырева М.Н., Лаврентьева О.А., Мулухова Э.В. Пристеночная микрофлора кишечника. – М.: Прима принт, 2015. – 100 с.
37. Ардатская М.Д. Синдром избыточного бактериального роста. – М.: Форте принт, 2011. – 56 с.
38. Барсук А.Л., Сумина А.В. Практическое обоснование низкой диагностической ценности микробиологического исследования кала на дисбактериоз. // Вопросы диагностики педиатрии. – 2009. – № 2. – С. 7–11.
39. Лоранская И.Д., Лаврентьева О.А. Функциональный анализ микробиоценоза желудочно-кишечного тракта // РМЖ. – 2011. – № 17. – С. 1057.
40. Tyakht AV, Kostryukova ES, Popenko AS, et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat Commun*. 2013; 4:2469. doi: 10.1038/ncomms3469.
41. Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL, et al. MetaPhlAn2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nature Methods*. 2015; 12:902–903. doi:10.1038/nmeth.3589.
42. Human Microbiome Project (HMP) Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13; 486(7402):207–14. doi: 10.1038/nature11234.
43. Pilarczyk-Zurek M, Strus M, Piotr PA, Heczko B. The dual role of *Escherichia coli* in the course of ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol*. 2016; 16:128. doi: 10.1186/s12876-016-0540-2.
44. Dabard J, Bridonneau C, Phillippe C, et al. Fons Ruminococcin A, a New Lantibiotic Produced by a *Ruminococcus gnavus* Strain Isolated from Human Feces. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Sep; 67(9):4111–8.
45. Lozupone CA, Stombaugh JJ, Gordon JL, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012; Vol. 489 № 7415:220–230.
46. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006 Feb; 55(2):205–211. doi: 10.1136/gut.2005.073817.
47. Noor SO, Ridgway K, Scovell L, et al. Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. *BMC Gastroenterology*. 2010; 10:134. doi: 10.1186/1471-230X-10-134.