

ДИНАМИКА КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ПАЦИЕНТОВ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Е. В. ОХРЕМЧУК¹⁾, Е. Я. СКОПОВЕЦ²⁾, А. Э. ОХРЕМЧУК¹⁾,
Н. П. КИРСАНОВА²⁾, А. В. СИДОРЕНКО¹⁾, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ¹⁾

¹⁾Институт микробиологии НАН Беларуси,
ул. Академика Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

²⁾Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский район, Беларусь

Исследована динамика микробиоты кишечника 32 пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Показано, что обратный индекс Симпсона, характеризующий таксономическое разнообразие микробиоты, на 14-й и 30-й дни после трансплантации снижается более чем в 3 раза и к 100-му дню возвращается к исходному уровню. Связи между снижением биоразнообразия микробиоты и развитием посттрансплантационных осложнений не выявлено. Отмечен индивидуальный характер изменений качественного и количественного состава микробиоты пациентов после трансплантации. Определен ряд бактериальных таксонов, таких как семейства Streptococcaceae, Actinomycetaceae, Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Desulfovibrionaceae, Prevotellaceae, роды *Streptococcus*, *Clostridioides*, *Phascolarctobacterium*, *Paraprevotella*, *Bilophila*, *Akkermansia*, *Coprococcus*, *Sutterella*, *Alistipes*, изменение представленности которых связано с развитием посттрансплантационных

Образец цитирования:

Охремчук ЕВ, Скоповец ЕЯ, Охремчук АЭ, Кирсанова НП, Сидоренко АВ, Валентович ЛН. Динамика кишечной микробиоты пациентов с онкогематологическими заболеваниями после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:48–59.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-48-59>

For citation:

Akhremchuk KV, Skapavets KY, Akhremchuk AE, Kirsanova NP, Sidarenka AV, Valentovich LN. Dynamics of gut microbiota in patients suffering from hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:48–59. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-48-59>

Авторы:

Екатерина Владимировна Охремчук – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и гено-инженерных исследований».

Екатерина Ярославовна Скоповец – младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований.

Артур Эдуардович Охремчук – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и гено-инженерных исследований».

Наталья Павловна Кирсанова – кандидат медицинских наук; врач-гематолог отделения трансплантации.

Анастасия Вячеславовна Сидоренко – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией «Коллекция микроорганизмов».

Леонид Николаевич Валентович – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией «Центр аналитических и гено-инженерных исследований».

Authors:

Katsiaryna V. Akhremchuk, researcher at the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

katerina_akhr@bio.bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-3195-6529>

Katsiaryna Y. Skapavets, junior researcher at the laboratory of molecular genetic research.

skopovets@yandex.by
<https://orcid.org/0000-0002-4510-6760>

Artur E. Akhremchuk, researcher at the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

akhremchuk@bio.bsu.by
<https://orcid.org/0000-0001-8602-4887>

Natallia P. Kirsanova, PhD (medicine); hematologist at the department of transplantation.

litvinko_natasha@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3193-4864>

Anastasiya V. Sidarenka, PhD (biology); head of the laboratory «Microbial collection».

a_sidarenka@mbio.bas-net.by
<https://orcid.org/0000-0001-8447-9538>

Leonid N. Valentovich, PhD (biology); head of the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

valentovich@mbio.bas-net.by
<https://orcid.org/0000-0001-7329-743X>

осложнений. Выдвинуто предположение, что повышенная относительная численность представителей отдела Proteobacteria, семейств Actinomycetaceae и Streptococcaceae, рода *Streptococcus* до трансплантации может являться потенциальным биомаркером развития реакции «трансплантат против хозяина».

Ключевые слова: микробиом; реакция «трансплантат против хозяина»; дисбиоз; метагеномика.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» на 2016–2020 гг. (подпрограмма «Инновационные биотехнологии – 2020», мероприятие 67¹).

DYNAMICS OF GUT MICROBIOTA IN PATIENTS SUFFERING FROM HEMATOLOGIC MALIGNANCIES AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

K. V. AKHREMCHUK^a, K. Y. SKAPAVETS^b, A. E. AKHREMCHUK^a,
N. P. KIRSANOVA^b, A. V. SIDARENKA^a, L. N. VALETOVICH^a

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Akademika Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus

^bBelarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzienskaja Street, Baraŭliany 223053, Minsk District, Belarus

Corresponding author: K. V. Akhremchuk (katerina_akhr@bio.bsu.by)

In this study, we described the dynamics of intestinal microbiota of 32 patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). After HSCT, on 14th day and 30th day, the inverse Simpson index value was more than 3 times lower compared to the pre-HSCT period. Biodiversity became more similar to the pre-HSCT level by 100th day. The correlation between diversity of microbiota and development of post-HSCT complications wasn't observed. Our findings indicated individual-specific changes in the taxonomic structure of patients' microbiota after HSCT. Changes in the relative abundance of the bacterial families Streptococcaceae, Actinomycetaceae, Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Desulfovibrionaceae, Prevotellaceae, genera *Streptococcus*, *Clostridioides*, *Phascolarctobacterium*, *Paraprevotella*, *Bilophila*, *Akkermansia*, *Coprococcus*, *Sutterella*, *Alistipes* appear to be associated with the development of post-HSCT complications. High abundance of phylum Proteobacteria, families Actinomycetaceae and Streptococcaceae, genus *Streptococcus* before HSCT can be considered as a potential predictor of graft-versus-host disease development in the post-HSCT period.

Keywords: microbiome; graft-versus-host disease; dysbiosis; metagenomics.

Acknowledgements. This work was supported by the state program «Science-intensive technologies and equipment» for 2016–2020 (subprogram «Innovative biotechnologies – 2020», measure 67¹).

Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) широко применяется при лечении онкогематологических заболеваний. Однако реципиенты ТГСК подвергаются высокому риску развития осложнений, таких как реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), синдром синусоидальной обструкции, бактериальные инфекции и др. Острая РТПХ (ОРТПХ) является одной из основных причин смертности пациентов, перенесших трансплантацию [1; 2].

Рядом исследователей показано, что высокая частота инфекционных и иммунных осложнений с летальными исходами после ТГСК ассоциирована с кишечным дисбиозом – снижением общего разнообразия микробиоты и количества облигатно-анаэробных комменсальных бактерий, а также размножением патогенных и (или) условно-патогенных микроорганизмов [3–5]. Считается, что развитие РТПХ инициируется каскадом воспалительных реакций, вызванных повреждением тканей и транслокацией бактерий из кишечника [6]. Сообщалось, что состав микробиоты кишечника реципиентов ТГСК при приживлении нейтрофилов может являться предиктором развития ОРТПХ [7].

Изменения качественного и количественного состава кишечной микробиоты в ранние сроки после ТГСК – период максимального риска осложнений и летальных исходов – все еще мало изучены. Однако обсуждается возможность использования микробных биомаркеров для прогнозирования риска развития посттрансплантационных осложнений, в том числе РТПХ. В данном исследовании предпринята попытка проанализировать изменения состава микробиоты пациентов с онкогематологическими заболеваниями после ТГСК (первые 100 дней), выявить взаимосвязь между степенью дисбиоза и клиническим проявлением инфекционных и иммунологических осложнений, определить потенциальные микробные маркеры развития РТПХ.

Материалы и методы исследования

Исследование одобрено комитетом по медицинской этике Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии. Все пациенты, включенные в исследование, либо их родители дали письменное информированное согласие на сбор и анализ клинических данных, а также образцов биологического материала. Сбор клинических данных проводился путем ретроспективного обзора клинических карт лицами, не участвующими в анализе микробиоты.

Исследуемая группа пациентов. В исследование включены 32 пациента с онкогематологическими заболеваниями в возрасте от 2 до 29 лет (медиана 10,5 года), проходивших лечение в условиях дневного стационара на базе Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии. Перед ТГСК пациентам назначался миелоаблативный либо немиелоаблативный режим кондиционирования с учетом возраста и соматического статуса, источника стволовых клеток, степени совместимости между донором и реципиентом, типа и стадии болезни. За период наблюдения после ТГСК (100 дней) у 8 пациентов развилась РТПХ различной степени тяжести; для 6 пациентов отмечен летальный исход, однако ни у одного из них не выявлены признаки РТПХ. Медиана возраста в группе пациентов с РТПХ составила 16,0 года (интерквартильный размах 5–29 лет), в группе пациентов без РТПХ – 6,0 года (интерквартильный размер 2–28 лет). Общая характеристика¹ пациентов и параметров ТГСК представлена в табл. 1.

Таблица 1

Основные характеристики пациентов и параметры ТГСК

Table 1

Characteristics of patients and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) parameters

Параметр	Количество пациентов (доля, %)		
	с РТПХ	без РТПХ	всего
Половая принадлежность			
Женщины	4 (50,0)	10 (41,7)	14 (43,7)
Мужчины	4 (50,0)	14 (58,3)	18 (56,3)
Диагноз			
Острый лимфобластный лейкоз	5 (62,5)	4 (16,7)	9 (28,1)
Острый миелоидный лейкоз	2 (25,0)	4 (16,7)	6 (18,8)
Приобретенная апластическая анемия	0 (0)	5 (20,9)	5 (15,6)
Неходжкинская лимфома	1 (12,5)	2 (8,3)	3 (9,4)
Первичный иммунодефицит	0 (0)	3 (12,5)	3 (9,4)
Миелодиспластический синдром	0 (0)	2 (8,3)	2 (6,3)
Анемия Блекфена – Даймонда	0 (0)	1 (4,2)	1 (3,1)
Талассемия	0 (0)	1 (4,2)	1 (3,1)
Острый бифенотипический лейкоз	0 (0)	1 (4,2)	1 (3,1)
Лимфома Ходжкина	0 (0)	1 (4,2)	1 (3,1)
Режим кондиционирования			
Миелоаблативный	8 (100,0)	15 (62,5)	23 (71,9)
Немиелоаблативный	0 (0)	9 (37,5)	9 (28,1)
Вид ТГСК			
От HLA-идентичного неродственного донора	4 (50,0)	10 (41,7)	14 (43,7)
От совместимого родственного донора	0 (0)	8 (33,3)	8 (25,0)
Гаплоидентичная	4 (50,0)	6 (25,0)	10 (31,3)

¹Более подробную характеристику пациентов см. в прил. 1: http://bio.bsu.by/ebb/2022/2/supplementary_data_1.pdf.

Окончание табл. 1
Ending table 1

Параметр	Количество пациентов (доля, %)		
	с РТПХ	без РТПХ	всего
Источник стволовых клеток			
Костный мозг	2 (25,0)	15 (62,5)	17 (53,1)
Периферические стволовые клетки	6 (75,0)	9 (37,5)	15 (46,9)

Сбор и хранение биоматериала. Образцы кала собирали у пациентов в нескольких контрольных точках: до ТГСК ($n = 30$) и через 14 дней ($n = 19$), 30 дней ($n = 21$) и 100 дней ($n = 15$) после трансплантации. Сбор биоматериала осуществляли в стерильные криопробирки объемом 2 мл с металлическим шариком (диаметр 4,5 мм) для гомогенизации и перемешивания содержимого. Образцы кала замораживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до выделения ДНК.

Секвенирование и биоинформатическая обработка данных. Выделение метагеномной ДНК из образцов кала осуществляли с помощью набора NucleoSpin[®] DNA Soil (740780; Macherey-Nagel, Германия). Подготовку библиотек для секвенирования проводили в соответствии с руководством 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США). Для определения нуклеотидных последовательностей V3–V4 варибельного региона генов 16S рPHK использовали комплект реактивов MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (MS-102-3003; Illumina) и секвенатор MiSeq (Illumina). Удаление последовательностей праймеров и объединение прочтений² выполняли с помощью скрипта *preprocess16S* (<https://github.com/masikol/preprocess16S>). Последующую обработку данных осуществляли с использованием среды программирования R. Для контроля качества объединенных прочтений, конструирования таблицы вариантов ампликонных последовательностей, удаления химерных последовательностей и присвоения таксономического статуса применяли конвейер *dada2* (<https://benjjneb.github.io/dada2/>). При таксономической классификации в качестве референса использовали тренировочный набор данных на основе базы данных *Silva SSU NR99* (версия 138) [8], форматированный для применения в конвейере *dada2*. Удаление предположительно контаминирующих последовательностей осуществляли с помощью библиотеки *decontam* (<https://benjjneb.github.io/decontam/>). Для вычисления и визуализации обратного индекса Симпсона [9] использовали возможности библиотеки *phyloseq* (<https://joey711.github.io/phyloseq/>). Для попарных сравнений применяли *T*-критерий Вилкоксона [10], для поправки на множественную проверку гипотез – метод Бенджамини – Хохберга [11]. Вычисление логарифма кратного изменения ($\log_2\text{FoldChange}$) представленности вариантов ампликонных последовательностей и соответствующих значений средней доли ложных отклонений гипотезы (FDR) проводили с помощью библиотеки *DESeq2* (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>).

Результаты и их обсуждение

Биоразнообразие и динамика кишечной микробиоты пациентов после ТГСК. Разнообразие микробиоты пациентов с онкогематологическими заболеваниями анализировали до ТГСК (медиана за 8 дней до ТГСК) и через 14; 30; 100 дней после трансплантации. Медиана обратного индекса Симпсона, описывающего вероятность принадлежности двух случайно отобранных из неопределенно большого сообщества прочтений к разным таксономическим единицам, у пациентов до ТГСК составляла 9,5, на 14-й день после ТГСК – 2,1, на 30-й день – 3,1, на 100-й день – 9,7. Таким образом, через 14 и 30 дней после трансплантации наблюдалось статистически значимое снижение биоразнообразия кишечной микробиоты реципиентов ТГСК. Наблюдаемые изменения, вероятно, связаны с предшествующим ТГСК кондиционированием, а также интенсивной антибиотикотерапией после трансплантации. Через 100 дней после ТГСК биоразнообразие кишечной микробиоты пациентов возвращалось к уровню предтрансплантационного периода (рис. 1). Резкое снижение α -разнообразия микробиоты, особенно между точкой до ТГСК и 14-м днем после трансплантации, отмечено и в других исследованиях [12; 13]. В работе Э. Илетт с коллегами статистически значимые отличия в уровне α -разнообразия кишечного микробиоценоза наблюдали также между предтрансплантационным периодом и 100-м днем после ТГСК [14].

Основываясь на статистически значимых отличиях в значениях обратного индекса Симпсона у пациентов до ТГСК и через 14 и 30 дней после трансплантации, авторы проверили гипотезу о наличии связи между уровнем биоразнообразия кишечной микробиоты и развитием посттрансплантационных осложнений. В настоящем исследовании статистически значимых отличий в таксономическом разнообразии микробных сообществ кишечника у реципиентов ТГСК с симптомами РТПХ и без данного

²Информацию о количестве прочтений, приходящихся на каждый образец, см. в прил. 2: http://bio.bsu.by/ebb/2022/2/supplementary_data_2.xlsx.

осложнения не выявлено (рис. 2). Также не обнаружено взаимосвязи между биоразнообразием кишечной микробиоты и режимом кондиционирования (миелоаблативным либо немиелоаблативным). Схожие результаты опубликованы Э. Илетт с коллегами [14]. С другой стороны, рядом исследований показано, что снижение биоразнообразия кишечной микробиоты у реципиентов ТГСК связано с режимом кондиционирования и антибиотикотерапией и может индуцировать оРТПХ [15; 16]. У взрослых пациентов, перенесших ТГСК и имеющих симптомы РТПХ, отмечено значимое уменьшение таксономического разнообразия микробиоты по сравнению с пациентами, у которых РТПХ не диагностировалась [17]. Таким образом, полученные в настоящее время данные, касающиеся роли биоразнообразия кишечной микробиоты в развитии РТПХ, довольно противоречивы, что свидетельствует о необходимости проведения дальнейших исследований в этом направлении.

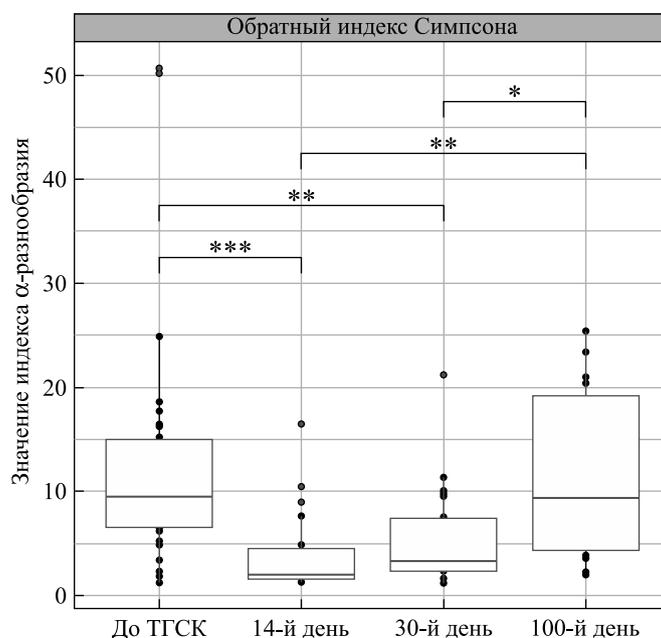


Рис. 1. Динамика α -разнообразия кишечной микробиоты у реципиентов ТГСК. Уровень значимости p установлен с помощью T -критерия Вилкоксона с применением метода Бенджамини – Хохберга для поправки на множественную проверку гипотез: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,001$; *** – $p \leq 0,0001$

Fig. 1. Changes in alpha diversity of gut microbiota in HSCT recipients. The Wilcoxon pairwise test with the Benjamini – Hochberg procedure was used to estimate and correct the p -values: * – $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.001$; *** – $p \leq 0.0001$

Авторы проанализировали динамику представленности четырех наиболее характерных для микробиоты здоровых людей отделов бактерий (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria) в кишечнике пациентов в разных временных точках после ТГСК (рис. 3). Количество представителей отдела Firmicutes изменялось незначительно. Данный факт примечателен, так как в исследованиях других научных групп отмечено снижение относительной численности фирмикут после ТГСК [12; 18], а в ряде работ низкая доля этих бактерий ассоциирована с дисбиозом [19]. Представленность отдела Bacteroidetes снижалась в поздний посттрансплантационный период ($p < 0,001$), что согласуется с литературными данными [12; 19]. Доля представителей отдела Actinobacteria уменьшалась в ранний период после ТГСК ($p = 0,019$), но возвращалась к исходному уровню уже через 30 дней. В исследовании С. Куиди с соавторами также отмечено снижение доли актинобактерий у реципиентов ТГСК [19]. Количество представителей отдела Proteobacteria варьировалось в широких пределах и статистически значимо не отличалось у пациентов с симптомами РТПХ и без данного осложнения. Отсутствие достоверных отличий в доле протеобактерий отмечено и в работе Н. Манцини с соавторами [12]. В ранее упомянутом исследовании С. Куиди с коллегами, напротив, выявлено повышение относительного количества представителей отдела Proteobacteria после ТГСК [19].

Наиболее распространенными семействами бактерий в кишечнике пациентов до ТГСК были Lachnospiraceae, Bacteroidaceae и Ruminococcaceae, относительно высокое содержание которых характерно и для кишечной микробиоты здоровых людей [20]. Значительную долю также занимали представители семейств Enterococcaceae, Streptococcaceae, Enterobacteriaceae, Peptostreptococcaceae и др. Через 14 дней после трансплантации состав микробиоты пациентов характеризовался существенными индивидуальными

отличиями, что могло быть связано со случайным характером колонизации желудочно-кишечного тракта после кондиционирования и ТГСК во время нахождения в дневном стационаре. Лишь 14 общих таксонов с относительным содержанием более 0,1 % прочтений присутствовали у 50 % или более пациентов. При этом самой распространенной и многочисленной группой являлись энтерококки, у отдельных пациентов занимающие более 95 % прочтений. Помимо семейства Enterococcaceae, детектировались семейства Vacteroidaceae, Streptococcaceae и Enterobacteriaceae. На 30-й день после ТГСК все еще преобладали бактерии семейства Enterococcaceae, однако появлялись бактерии других семейств, таких как Erysipelatoclostridiaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bifidobacteriaceae, присутствовавших в кишечном микробиоме пациентов до трансплантации. Через 100 дней после ТГСК наиболее представленным в кишечнике пациентов являлось семейство Lachnospiraceae, также были распространены семейства Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Streptococcaceae. Стоит отметить, что состав микробиоты на 100-й день был все еще крайне вариабелен, для некоторых пациентов отмечено дисбиотическое состояние, что может свидетельствовать об инфекционном процессе в организме. Так, на уровне клинической картины у 2 реципиентов ТГСК диагностировали сепсис, вызванный бактериями вида *Pseudomonas aeruginosa*, у 3 реципиентов – стафилококковую инфекцию кровотока, у 1 реципиента – инфекцию кровотока, вызванную бактериями рода *Achromobacter*, у остальных реципиентов – энтероколиты различной природы, вирусные инфекции, микозы и др.

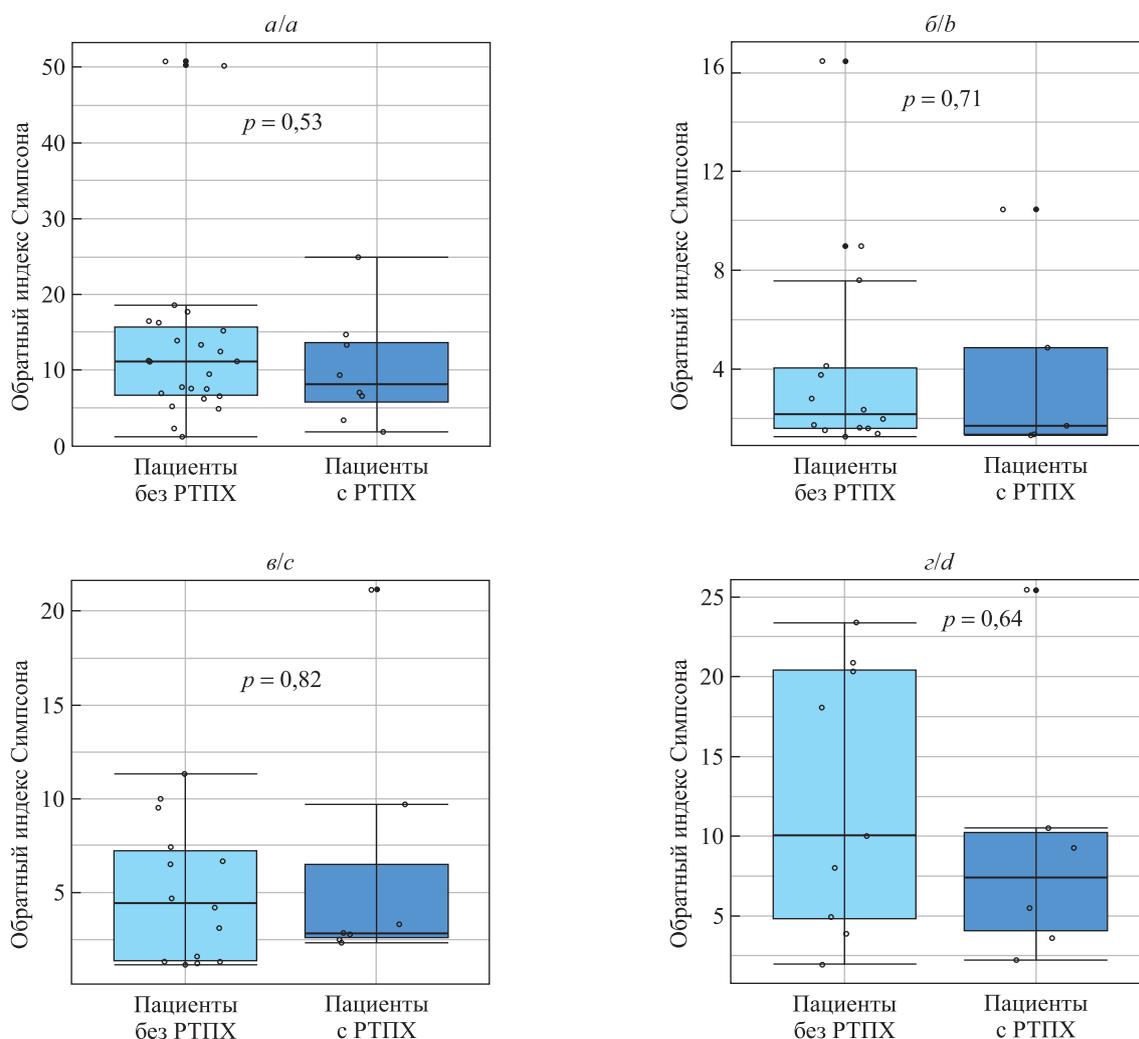


Рис. 2. Значения обратного индекса Симпсона в группе пациентов без РТПХ и в группе пациентов с РТПХ: а – до ТГСК; б – на 14-й день после ТГСК; в – на 30-й день после ТГСК; г – на 100-й день после ТГСК.

Уровень значимости p установлен с помощью T -критерия Вилкоксона

Fig. 2. Inverse Simpson index in patients with and without graft-versus-host disease: а – in pre-HSCT period; б – on 14th day after HSCT; в – on 30th day after HSCT; г – on 100th day after HSCT. p -Values were estimated using the Wilcoxon rank sum test

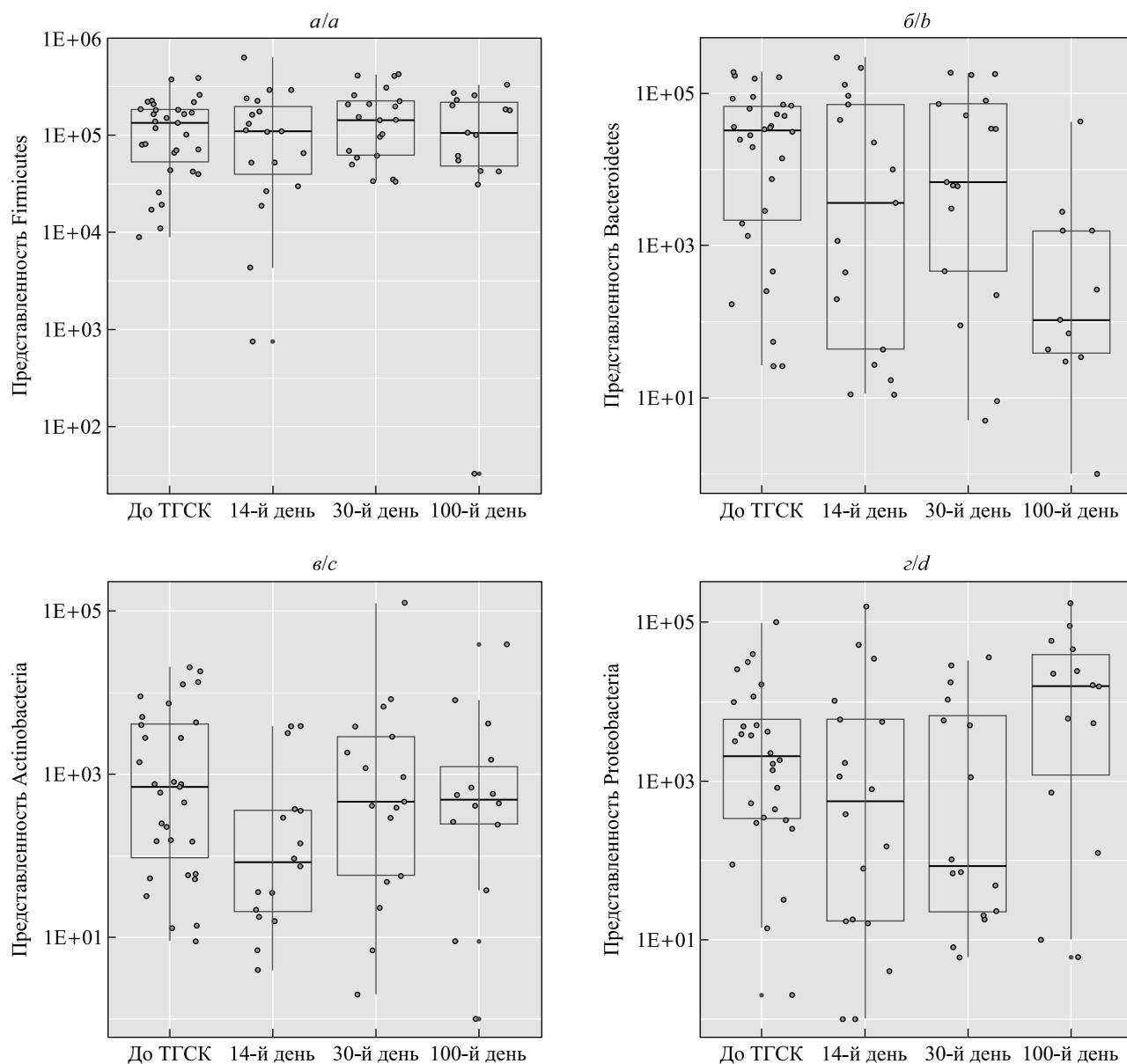


Рис. 3. Изменение представленности наиболее многочисленных отделов бактерий в микробиоте кишечника пациентов после ТГСК

Fig. 3. Changes in the abundance of prevalent taxa of gut microbiota in patients after HSCT

Таким образом, изменение качественного и количественного состава микробиоты пациентов после ТГСК носило индивидуальный характер. В большинстве случаев на фоне кондиционирования и антибиотикотерапии отмечались снижение таксономического разнообразия и смена доминирующих таксонов бактерий в ранний период после ТГСК (14-й и 30-й дни) и возвращение структуры микробиома к состоянию, близкому к предтрансплантационному периоду, через 100 дней. На фоне дисбиотических изменений микробиоты у пациентов часто наблюдалось избыточное развитие условно-патогенных микроорганизмов, в том числе энтерококков, стафилококков и энтеробактерий, что могло стать причиной инфекционных осложнений.

Связь между изменениями состава кишечной микробиоты и развитием посттрансплантационных осложнений. Сведения об изменениях таксономического состава микробиоты кишечника и отдельных таксонов микроорганизмов, которые могли бы служить маркерами, позволяющими прогнозировать развитие РТПХ, не согласованы и часто противоречивы [21; 22]. Вероятно, это связано с тем, что состав микробиоты кишечника зависит от множества факторов, включая прием антибиотиков, кондиционирование, сопутствующие заболевания, питание, географические условия и др. [3; 22–25].

В настоящем исследовании в составе микробиоты пациентов выявлено статистически значимое увеличение относительной численности бактерий родов *Staphylococcus*, *Pseudomonas* и *Enterococcus* от

предтрансплантационного периода к 14-му и 30-му дням после ТГСК (FDR < 0,01) (табл. 2). Возрастание доли стафилококков в ранний посттрансплантационный период упоминалось и в работе Э. Илетт с соавторами [14]. Кроме того, положительные значения $\log_2\text{FoldChange}$ установлены для родов *Stenotrophomonas* и *Lactococcus*. Между точкой до ТГСК и 100-м днем после трансплантации изменялась доля представителей рода *Klebsiella* (FDR < 0,01).

Таблица 2

Значения $\log_2\text{FoldChange}$ представленности таксонов бактерий в микробиоте пациентов между точкой до ТГСК и 14, 30, 100-м днями после трансплантации

Table 2

$\log_2\text{FoldChange}$ in the relative abundance of bacterial taxa in the microbiota of patients between the point before H SCT and 14, 30, 100th days after transplantation

Род	Значение $\log_2\text{FoldChange}$		
	между точкой до ТГСК и 14-м днем после трансплантации	между точкой до ТГСК и 30-м днем после трансплантации	между точкой до ТГСК и 100-м днем после трансплантации
<i>Staphylococcus</i>	5,47	8,19	–
<i>Pseudomonas</i>	8,23	12,88	–
<i>Enterococcus</i>	3,63	4,43	–
<i>Stenotrophomonas</i>	9,74	–	–
<i>Lactococcus</i>	–	3,91	–
<i>Klebsiella</i>	–	–	6,73

Колонизация кишечника пациентов бактериями рода *Stenotrophomonas*, в частности видом *S. maltophilia*, может быть связана с пребыванием в онкологическом отделении и терапией после ТГСК. К факторам риска заселения кишечного тракта бактериями *S. maltophilia* относят тяжелый мукозит и нейтропению, длительную терапию и прием антибиотиков [26–28]. Исследуемые пациенты входили в группу риска, так как перед трансплантацией им назначалась интенсивная химио- и антибиотикотерапия, что приводило к фебрильной нейтропении, а у 3 пациентов был диагностирован мукозит. Колонизация кишечника бактериями *S. maltophilia* отмечена у 8 из 32 пациентов. Увеличение доли данных бактерий происходило в ранний период после ТГСК, а к 100-му дню их численность снижалась.

Доля бактерий рода *Klebsiella* также повышалась после ТГСК. Высокая численность клебсиелл (0,3–99,9 %) на 100-й день наблюдалась у 6 пациентов, из них у 4 пациентов до ТГСК клебсиеллы не детектировались, а у 2 пациентов занимали малую долю (<0,01 %). Лишь у 1 пациента бактерии рода *Klebsiella* до ТГСК выявлялись в количестве 1,7 % от всех прочтений, а через 100 дней после трансплантации не обнаруживались. Таким образом, вероятно, клебсиеллы попадали в организм пациентов во время нахождения в лечебном отделении.

Для выявления связи между изменением представленности определенных таксонов бактерий в кишечном микробиоме реципиентов ТГСК и развитием РТПХ были изучены различия в количестве прочтений генов 16S рРНК на разных таксономических уровнях у пациентов с данным осложнением и без него. Установлено, что осложнения различной степени тяжести развивались у пациентов, в микробиоме которых до ТГСК была повышена доля представителей отдела Proteobacteria, семейств Actinomycetaceae и Streptococcaceae, а также рода *Streptococcus* (табл. 3).

Представители отдела Proteobacteria у пациентов без осложнений занимали до 22,72 % прочтений с медианой 0,55 %, а у пациентов с РТПХ – до 59,89 % с медианой 3,25 % (рис. 4). Стоит отметить, что протеобактерии часто чрезмерно представлены при кишечных и внекишечных заболеваниях, сопровождающихся воспалительным процессом [29]; связь бактерий отдела Proteobacteria с развитием РТПХ отмечалась и ранее [16; 30]. Рядом исследователей показано, что увеличение доли протеобактерий коррелирует со снижением соотношения лимфоцитов T_{reg}/T_h17 [16], первые из которых обладают противовоспалительной активностью, а вторые опосредованно стимулируют выработку антимикробных пептидов эпителиальными клетками кишечника [31; 32]. Таким образом, повышенная численность бактерий отдела Proteobacteria в кишечнике увеличивает риск инфекционных осложнений.

Таблица 3

Таксоны в составе кишечного микробиома пациентов, доля которых была повышена у пациентов с РТПХ (FDR < 0,01)

Table 3

Taxa of the patients' intestinal microbiome, which show increased relative abundance in patients with graft-versus-host disease (FDR < 0.01)

Таксон	Значение \log_2 FoldChange
Proteobacteria	3,72
Actinomycetaceae	3,01
Streptococcaceae	4,47
<i>Streptococcus</i>	3,44

Семейство Actinomycetaceae в микробиоме пациентов без РТПХ составляло до 0,48 % прочтений с медианой 0,02 %, в то время как у пациентов с РТПХ на данный таксон приходилось от 0,01 до 0,94 % с медианой 0,06 % (см. рис. 4). Стоит отметить, что полученные авторами результаты противоречат ряду исследований, продемонстрировавших уменьшение доли бактерий семейства Actinomycetaceae у пациентов с оРТПХ [33]. В то же время показано, что высокое содержание в микробиоме бактерий γ -Proteobacteria положительно коррелирует со смертельным исходом, а высокая относительная численность бактерий Lachnospiraceae и Actinomycetaceae – с благоприятным исходом ТГСК [3]. За время наблюдения летальный исход зафиксирован у 6 пациентов, однако ни у одного из них смерть не была связана с развитием РТПХ.

Доля прочтений, приходящихся на семейство Streptococcaceae, у пациентов без РТПХ колебалась от 0,10 до 4,71 % с медианой 0,98 %, а у пациентов с РТПХ – от 0,14 до 81,79 % с медианой 8,19 %. На род *Streptococcus* у пациентов с РТПХ приходилось от 0,09 до 79,39 % с медианой 6,56 % (см. рис. 4). Доминирование стрептококков в составе микробиоты пациентов после трансплантации является достаточно распространенным и считается одной из наиболее частых причин инфекций кровотока после ТГСК [34].

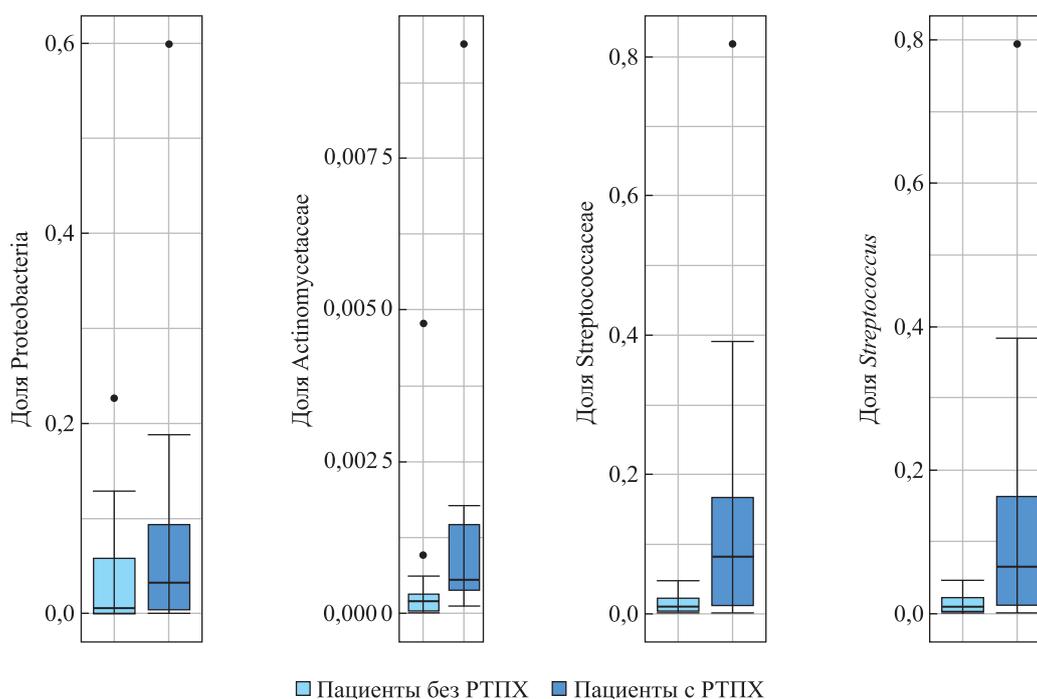


Рис. 4. Различия в представленности отдельных таксонов бактерий в кишечном микробиоме пациентов без РТПХ и пациентов с РТПХ

Fig. 4. Differences in given taxa abundance in patients with and without graft-versus-host disease

На основании представленных данных можно предположить, что высокая относительная численность бактерий отдела Proteobacteria, семейств Actinomycetaceae и Streptococcaceae, рода *Streptococcus* в микробиоте кишечника пациентов до ТГСК может рассматриваться как потенциальный биомаркер развития РТПХ, однако для подтверждения данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования на большей выборке пациентов.

На фоне присутствия перечисленных бактериальных таксонов в повышенном количестве у пациентов с РТПХ было снижено содержание представителей отделов Verrucomicrobia и Desulfobacterota, семейств Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Desulfovibrionaceae и Prevotellaceae, родов *Clostridioides*, *Phascolarctobacterium*, *Bilophila*, *Akkermansia*, *Paraprevotella*, *Coproccoccus*, *Sutterella*, *Alistipes*, *Oscillospiraceae* NK4A214 и *Eubacterium siraeum*.

Представители семейства Acidaminococcaceae, и в частности рода *Phascolarctobacterium*, являются продуцентами пропионовой кислоты [35], снижение их численности отмечено у пациентов с колоректальным раком [36].

Представители семейства Akkermansiaceae являются продуцентами короткоцепочечных жирных кислот и широко распространены в микробиоте кишечника здоровых людей. Снижение содержания бактерий данного семейства и непосредственно рода *Akkermansia* отмечали при сахарном диабете, синдроме раздраженного кишечника, гипертонии, ожирении, болезнях печени [37–42]. В настоящее время род *Akkermansia* включают в перечень микроорганизмов, которые в перспективе можно использовать в качестве альтернативы противовоспалительной и иммуносупрессивной терапии [43].

Влияние бактерий семейства Prevotellaceae на здоровье человека пока считается неоднозначным. Повышенную долю представителей семейства Prevotellaceae связывают с пародонтитом, бактериальным вагинозом, системным воспалением, ревматоидным артритом и метаболическими нарушениями. Имеются сведения, что воспаление слизистых, опосредованное превотеллой, приводит к системному распространению медиаторов воспаления, что может влиять на исход системных заболеваний [44]. В то же время показано, что представители семейства Prevotellaceae продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты, нехватка которых является причиной повышенной проницаемости кишечника [45]. Род *Paraprevotella* – один из четырех родов семейства Prevotellaceae, для которого характерна продукция короткоцепочечных жирных кислот. В 2019 г. Т. Танэ с соавторами установил, что бактерии рода *Paraprevotella* индуцируют выработку γ -интерферона Т-клетками, не вызывая воспаления, опосредованного дендритными CD103⁺-клетками и главным комплексом гистосовместимости. Данный интерферон играет решающую роль в противоопухолевом иммунитете и повышает эффективность применения ингибиторов иммунных контрольных точек [46].

Таким образом, снижение доли ряда семейств (Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Prevotellaceae) и родов (*Clostridioides*, *Phascolarctobacterium*, *Paraprevotella*, *Akkermansia*, *Alistipes* и др.) кишечной микробиоты может влиять на иммунную систему, метаболический и функциональный статус желудочно-кишечного тракта пациентов с РТПХ. Воздействие конкретных представителей микробиоты на статус пациентов с онкогематологическими заболеваниями требует дальнейшего изучения.

Следует отметить, что данное исследование ограничено небольшой выборкой пациентов с онкогематологическими заболеваниями, перенесших ТГСК, которые относились к разным возрастным группам (2–29 лет), имели различный диагноз (острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, приобретенная апластическая анемия, неходжкинская лимфома и др.) и сопутствующие заболевания, проходили лечение в условиях стационарного отделения одного медицинского учреждения. Каждый из этих факторов может влиять на качественный и количественный состав микробиоты кишечника и отчасти являться причиной отличия представленных результатов от данных, полученных другими исследовательскими группами. В связи с этим желательнее дальнейшее детальное изучение динамики изменения кишечной микробиоты реципиентов ТГСК на более репрезентативных и гомогенных группах пациентов для разработки диагностических маркеров РТПХ и способов коррекции дисбиотических состояний в целях профилактики посттрансплантационных осложнений.

Заключение

Исследована динамика восстановления кишечной микробиоты пациентов с онкогематологическими заболеваниями в ранние сроки после ТГСК. Выявлено, что изменения кишечного микробиоценоза пациентов носят индивидуальный характер, различия в таксономическом составе микроорганизмов более выражены в ранний период после трансплантации (14-й и 30-й дни). Настоящее исследование подтверждает, что дисбиоз у реципиентов ТГСК проявляется снижением общего разнообразия микробиоты. Медиана обратного индекса Симпсона на 14-й день после трансплантации была в 4,5 раза ниже медианы данного индекса до ТГСК. Однако связи между биоразнообразием кишечной микробиоты и развитием

осложнений после трансплантации, а также режимом кондиционирования не установлено. До трансплантации в составе кишечной микробиоты пациентов доминировали семейства Lachnospiraceae, Bacteroidaceae, Enterococcaceae, Ruminococcaceae, Streptococcaceae, Enterobacteriaceae, Peptostreptococcaceae. На 14-й день после ТГСК биоразнообразие было наименьшим, преобладали семейства Enterococcaceae, Bacteroidaceae, Streptococcaceae, Lactobacillaceae. Через 100 дней после трансплантации α -разнообразие микробиоты приближалось к предтрансплантационному уровню, детектировались таксоны, характерные для периода до трансплантации (Erysipelatoclostridiaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae).

Обнаружена связь между развитием посттрансплантационных осложнений и изменением относительной численности бактерий 3 отделов (Proteobacteria, Verrucomicrobia, Desulfobacterota), 6 семейств (Streptococcaceae, Actinomycetaceae, Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Desulfovibrionaceae, Prevotellaceae) и 11 родов (*Streptococcus*, *Clostridioides*, *Phascolarctobacterium*, *Paraprevotella*, *Bilophila*, *Akkermansia*, *Coprococcus*, *Sutterella*, *Alistipes*, *Oscillospiraceae* NK4A214, *Eubacterium siraeum*) в кишечном микробиоме реципиентов ТГСК. Сделано предположение, что повышенная относительная численность представителей отдела Proteobacteria, семейств Actinomycetaceae и Streptococcaceae, рода *Streptococcus* до ТГСК может являться потенциальным биомаркером развития РТПХ.

Библиографические ссылки / References

1. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet*. 2009;373(9674):1550–1561. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60237-3.
2. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *The New England Journal of Medicine*. 2012;367:1487–1496. DOI: 10.1056/NEJMoa1203517.
3. Taur Y, Jenq RR, Perales M-A, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;124(7):1174–1182. DOI: 10.1182/blood-2014-02-554725.
4. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, Littmann ER, Taur Ying, Sung AD, et al. Microbiota as predictor of mortality in allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine*. 2020;382:822–834. DOI: 10.1056/NEJMoa1900623.
5. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Jenq RR. Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease. *International Journal of Hematology*. 2015;101:428–437. DOI: 10.1007/s12185-015-1781-5.
6. Bekker V, Zwiittink RD, Knetsch CW, Sanders IMJG, Berghuis D, Heidt PJ, et al. Dynamics of the gut microbiota in children receiving selective or total gut decontamination treatment during hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2019;25(6):1164–1171. DOI: 10.1016/j.bbmt.2019.01.037.
7. Golob JL, Pergam SA, Srinivasan S, Fiedler TL, Liu C, Garcia K, et al. Stool microbiota at neutrophil recovery is predictive for severe acute graft vs host disease after hematopoietic cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(12):1984–1991. DOI: 10.1093/cid/cix699.
8. McLaren MR. Silva SSU taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 138) [Internet]. Geneva: CERN; 2020 March 27 [cited 2022 February 20]. Available from: <https://zenodo.org/record/3731176#.YrK8unZByUk>. DOI: 10.5281/zenodo.3731176.
9. Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature*. 1949;163(4148):688. DOI: 10.1038/163688a0.
10. Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin*. 1945;1:80–83. DOI: 10.2307/3001968.
11. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289–300.
12. Mancini N, Greco R, Pasciuta R, Barbanti MC, Pini G, Morrow OB, et al. Enteric microbiome markers as early predictors of clinical outcome in allogeneic hematopoietic stem cell transplant: results of a prospective study in adult patients. *Open Forum Infectious Diseases*. 2017;4(4):ofx215. DOI: 10.1093/ofid/ofx215.
13. Ingham AC, Kielsen K, Cilieborg MS, Lund O, Holmes S, Aarestrup FM, et al. Specific gut microbiome members are associated with distinct immune markers in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Microbiome*. 2019;7(1):131. DOI: 10.1186/s40168-019-0745-z.
14. Ilett EE, Jørgensen M, Noguera-Julian M, Nørgaard JC, Daugaard G, Helleberg M, et al. Associations of the gut microbiome and clinical factors with acute GVHD in allogeneic HSCT recipients. *Blood Advances*. 2020;4(22):5797–5809. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002677.
15. Han L, Zhang H, Chen S, Zhou L, Li Y, Zhao K, et al. Intestinal microbiota can predict acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2019;25(10):1944–1955. DOI: 10.1016/j.bbmt.2019.07.006.
16. Han L, Jin H, Zhou L, Zhang X, Fan Z, Dai M, et al. Intestinal microbiota at engraftment influence acute graft-versus-host disease via the T_{reg}/T_H17 balance in allo-HSCT recipients. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:669. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00669.
17. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(5):903–911. DOI: 10.1084/jem.20112408.
18. Laterza L, Rizzatti G, Gaetani E, Chiusolo P, Gasbarrini A. The gut microbiota and immune system relationship in human graft-versus-host disease. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2016;8(1):e2016025. DOI: 10.4084/MJHID.2016.025.
19. Kouidhi S, Souai N, Zidi O, Mosbah A, Lakhali A, Othmane TB, et al. High throughput analysis reveals changes in gut microbiota and specific fecal metabolomic signature in hematopoietic stem cell transplant patients. *Microorganisms*. 2021;9(9):1845. DOI: 10.3390/microorganisms9091845.
20. Akhremchuk KV, Skapavets KY, Akhremchuk AE, Kirsanova NP, Sidarenka AV, Valentovich LN. Gut microbiome of healthy people and patients with hematological malignancies in Belarus. *Microbiology Independent Research Journal (MIR Journal)*. 2022;9(1):18–30. DOI: 10.18527/2500-2236-2022-9-1-18-30.

21. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, et al. Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(8):1373–1383. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.04.016.
22. Chen J, Ryu E, Hathcock M, Ballman K, Chia N, Olson JE, et al. Impact of demographics on human gut microbial diversity in a US Midwest population. *PeerJ*. 2016;4:e1514. DOI: 10.7717/peerj.1514.
23. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterology*. 2015;15:100. DOI: 10.1186/s12876-015-0330-2.
24. Yi M, Yu S, Qin S, Liu Q, Xu H, Zhao W, et al. Gut microbiome modulates efficacy of immune checkpoint inhibitors. *Journal of Hematology & Oncology*. 2018;11(1):47. DOI: 10.1186/s13045-018-0592-6.
25. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Velardi E, Tsai JJ, et al. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Science Translational Medicine*. 2016;8(339):339ra71. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf2311.
26. Apisarnthanarak A, Fraser VJ, Dunne WM, Little JR, Hoppe-Bauer J, Mayfield JL, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* intestinal colonization in hospitalized oncology patients with diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;37(8):1131–1135. DOI: 10.1086/378297.
27. Labarca JA, Leber AL, Kern VL, Territo MC, Brankovic LE, Bruckner DA, et al. Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in allogeneic bone marrow transplant patients: role of severe neutropenia and mucositis. *Clinical Infectious Diseases*. 2000;30(1):195–197. DOI: 10.1086/313591.
28. Apisarnthanarak A, Mayfield JL, Garison T, McLendon PM, DiPersio JF, Fraser VJ, et al. Risk factors for *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in oncology patients: a case-control study. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2003;24(4):269–274. DOI: 10.1086/502197.
29. Rizzatti G, Lopetusu LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: a common factor in human diseases. *BioMed Research International*. 2017;2017:9351507. DOI: 10.1155/2017/9351507.
30. Lähteenmäki K, Wacklin P, Taskinen M, Tuovinen E, Lohi O, Partanen J, et al. Haematopoietic stem cell transplantation induces severe dysbiosis in intestinal microbiota of paediatric ALL patients. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52:1479–1482. DOI: 10.1038/bmt.2017.168.
31. Lazar V, Ditu L-M, Pircalabioru GG, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, et al. Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1830. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01830.
32. Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N. [Gut microbiota and development of the immune system]. *Medecine Sciences (Paris)*. 2016;32(11):961–967. French. DOI: 10.1051/medsci/20163211011.
33. Lin D, Hu B, Li P, Zhao Y, Xu Y, Wu D. Roles of the intestinal microbiota and microbial metabolites in acute GVHD. *Experimental Hematology & Oncology*. 2021;10:49. DOI: 10.1186/s40164-021-00240-3.
34. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(7):905–914. DOI: 10.1093/cid/cis580.
35. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*. 2017;19(1):29–41. DOI: 10.1111/1462-2920.13589.
36. Youssef O, Lahti L, Kokkola A, Karla T, Tikkanen M, Ehsan H, et al. Stool microbiota composition differs in patients with stomach, colon, and rectal neoplasms. *Digestive Diseases and Sciences*. 2018;63:2950–2958. DOI: 10.1007/s10620-018-5190-5.
37. Hänninen A, Toivonen R, Pöysti S, Belzer C, Plovier H, Ouwerkerk JP, et al. *Akkermansia muciniphila* induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice. *Gut*. 2018;67(8):1445–1453. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314508.
38. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Medicine*. 2017;23(1):107–113. DOI: 10.1038/nm.4236.
39. Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment *in vitro* utilization of mucin by other bacteria. *The American Journal of Gastroenterology*. 2010;105(11):2420–2428. DOI: 10.1038/ajg.2010.281.
40. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature Medicine*. 2019;25(7):1096–1103. DOI: 10.1038/s41591-019-0495-2.
41. Belzer C, de Vos WM. Microbes inside – from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *The ISME Journal*. 2012;6(8):1449–1458. DOI: 10.1038/ismej.2012.6.
42. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*. 2013;8(8):e71108. DOI: 10.1371/journal.pone.0071108.
43. van der Lelie D, Oka A, Taghavi S, Umeno J, Fan T-J, Merrell KE, et al. Rationally designed bacterial consortia to treat chronic immune-mediated colitis and restore intestinal homeostasis. *Nature Communications*. 2021;12:3105. DOI: 10.1038/s41467-021-23460-x.
44. Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 2017;151(4):363–374. DOI: 10.1111/imm.12760.
45. Liu X, Lieberman J. Chapter three – a mechanistic understanding of pyroptosis: the fiery death triggered by invasive infection. In: Alt FW, editor. *Advances in immunology. Volume 135*. Cambridge: Academic Press; 2017. p. 81–117. DOI: 10.1016/bs.ai.2017.02.002.
46. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, Skelly AN, Suda W, Sugiura Y, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*. 2019;565(7741):600–605. DOI: 10.1038/s41586-019-0878-z.

Получена 29.04.2022 / исправлена 20.05.2022 / принята 23.05.2022.
Received 29.04.2022 / revised 20.05.2022 / accepted 23.05.2022.