

МИКОБИОТА КАК ЧАСТЬ МИКРОБИОТЫ: ОСОБЕННОСТИ МЕТОДОВ ИЗУЧЕНИЯ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Н.С. Багирова

д.м.н., вед. науч. сотрудник, микробиологическая лаборатория,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ (Москва)
E-mail: nbagirova@mail.ru

Н.В. Дмитриева

д.м.н., профессор, зав. микробиологической лабораторией,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ (Москва)
E-mail: prof.ndmitrieva@mail.ru

И.Н. Петухова

д.м.н., вед. науч. сотрудник, микробиологическая лаборатория,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ (Москва)
E-mail: irinapet@list.ru

З.В. Григорьевская

д.м.н., вед. науч. сотрудник, микробиологическая лаборатория,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ (Москва)
E-mail: izlatadoc@list.ru

И.В. Терещенко

мл. науч. сотрудник, микробиологическая лаборатория,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ (Москва)
E-mail: in.ter68@inbox.ru

Цель работы – обратить внимание исследователей, работающих в области изучения микробиоты/микробиома, на особенности планирования исследования. Важно применять наиболее современные методы получения биоматериала и методы их дальнейшего исследования. Стандартизация подобных исследований необходима для получения результатов, которые должны быть сопоставимы с прочими исследованиями в этой области. Корректное формирование дизайна будущего исследования определяет реперзентативность полученных результатов. Сегодня большинство исследований в основном сконцентрировано на изучении бактериального компонента кишечной микробиоты человека, при этом не учитывается ее грибковый компонент. Исследование кишечной микробиоты, которая относится к разнообразному множеству грибных видов, является относительно новой и быстро прогрессирующей областью изучения. Несмотря на вездесущность и численность грибов, населяющих кишечник человека, их совокупность на несколько порядков меньше, чем бактерий. Недавние исследования показали, что микобиота может быть тесно связана со здоровьем и болезнями. Грибковые сообщества не только изменяются при заболевании, но также играют роль в поддержании гомеостаза того или иного локуса тела человека, во влиянии на системный иммунитет. Кроме того, широко распространено мнение, что ассоциации грибов разных видов в организме хозяина, ассоциации бактерий и грибов имеют решающее значение для здоровья хозяина. Однако менее 0,4% литературы посвящены изучению микобиоты и микобиома. Механизмы, с помощью которых грибы взаимодействуют с другими компонентами микробиома и хозяина, остаются плохо охарактеризованными. Результаты научных исследований, которые проводятся с этой целью, нередко противоречивы, и возникают сложности при попытке сопоставить данные. Исследователи применяют разные методы получения материала, разные методы изучения его состава, обследуют разнородные группы больных (различные географические регионы, без первичного лечения, с лечением, разные стадии болезни и проч.), часто малой выборки. В настоящее время полноценное изучение микобиома возможно только при многогранном и междисциплинарном подходе. Чрезвычайно интересной областью изучения является функциональность различных видов грибов, включая то, как они взаимодействуют с другими эукариотами и прокариотами, присутствующими в различных локусах тела человека. Предстоит выяснить, что более важно, как эти взаимодействия влияют на нас.

Ключевые слова: микобиом, микробиом, микобиота, микробиота, бактериом.

Для цитирования: Багирова Н.С., Дмитриева Н.В., Петухова И.Н., Григорьевская З.В., Терещенко И.В. Микобиота как часть микробиоты: особенности методов изучения на современном этапе. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019; 22(11):3–8. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-11-01>

Микробиом – это совокупность разнообразия генов микробиоты (микрофлоры) различных экологических ниш. Разновидности микробиома изучаются методами молекулярной биологии [1]. Исследования микробного сообщества осложняются влиянием множества факторов окружающей среды, которые могут вызывать значительные сдвиги в микробных популяциях человека. Установлено взаимное влияние бактериального и грибкового компонентов. Грибковый компонент микробиоты (микобиота) – неотъемлемая и менее исследованная часть микробного сообщества по сравнению с бактериальным компонентом. Термин микобиом (совокупность разнообразия генов микобиоты) предложен в 2009 г. и набирает силу [2].

Цель работы – обратить внимание исследователей, работающих в области изучения микробиоты/микробиома, на особенности планирования исследования. Важно применять наиболее современные методы получения биоматериала и методы их дальнейшего исследования. Стандартизация подобных исследований необходима для получения репрезентативных результатов, которые должны быть сопоставимы с прочими исследованиями в этой области.

МИКОБИОТА КАК ОБЯЗАТЕЛЬНАЯ ЧАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОТЫ

В течение десятилетий внимание научных и медицинских исследовательских сообществ направлено на микробиом человека. Желудочно-кишечный тракт человека является хозяином огромных популяций микроорганизмов, включая бактерии, вирусы, археи и грибы (кишечная микробиота). Высокопроизводительные молекулярно-генетические методологии и достижения биоинформационных технологий обеспечивают беспрецедентную возможность исследовать структуру и функцию микробных сообществ, связанных с человеческим телом в здоровом состоянии и болезни. Сегодня большинство исследований в основном сосредоточено на изучении бактериального компонента кишечной микробиоты человека, при этом не учитывается ее грибковый компонент. Исследование кишечной микобиоты, которая относится к разнообразному множеству грибных видов, является относительно новой и быстро прогрессирующей областью изучения.

Несмотря на вездесущность и численность грибов, населяющих кишечник человека, их сово-

купность на несколько порядков меньше, чем бактерий. Недавние исследования показали, что микобиота может быть тесно связана со здоровьем и болезнями. Грибковые сообщества не только изменяются при заболевании, но также играют роль в поддержании гомеостаза того или иного локуса тела человека и во влиянии на системный иммунитет. В настоящее время широко распространено мнение, что ассоциации грибов разных видов в организме хозяина, ассоциации бактерий и грибов имеют решающее значение для здоровья хозяина. Однако менее 0,4% литературы посвящены изучению микобиоты и микобиома [3, 4].

ПРОБЛЕМЫ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МИКОБИОТЫ

Микобиота играет важную роль в поддержании структуры микробного сообщества, влияющего на модуляцию иммунной функции и обмен веществ. Но механизмы, с помощью которых грибы взаимодействуют с другими компонентами микробиома и хозяина, остаются плохо охарактеризованными [5]. Результаты научных исследований, которые проводятся с этой целью, нередко противоречивы, возникают сложности при попытке сопоставить данные. Наиболее частые причины этого следующие:

- разные методы получения материала для исследования;

- разные методы исследования состава микробиоты, микобиома и бактериома;

- разнородные группы больных (различные географические регионы, без первичного лечения, с лечением, разные стадии болезни и проч.);

- малая выборка.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАТЕРИАЛА

В настоящее время существует несколько методов получения материала для исследования микробиоты и микробиома:

- неинвазивный* (смывы, слюна, фекалии) – биоматериалы содержат просветную микробиоту. Данные биоматериалы легко получить. Это наиболее распространенный метод;

- инвазивный* (биопсия слизистой оболочки) – первый слой содержит микрофлору, прикрепленную непосредственно к поверхности эпителия, второй слой содержит микрофлору, обитающую внутри наружного слоя слизистой.

Результаты получения биоматериала этими методами значительно различаются.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКОБИОТЫ И МИКОБИОМА

При изучении микобиоты и микобиома не менее важны методы исследования. Наиболее распространенный метод исследования микобиоты – *культуральный* – посев биоматериала на искусственные питательные среды с дальнейшим изучением чистой культуры выросших микроорганизмов. Культуральный метод является основным в изучении микобиоты. Только этим методом можно получить чистую культуру микроорганизма для дальнейшего ее изучения. При исследовании микобиома культуральный метод может быть использован как начальный этап. Метод имеет свои ограничения: не все микроорганизмы можно выявить в предложенных им искусственных условиях. Значительная часть микобиоты некультивируемая. Данный метод в основном применяется для исследования смывов, слюны, фекалий, то есть изучается просветная микобиота.

Альтернативные методы – *молекулярно-генетические* – менее распространены ввиду того, что для большинства лабораторий они достаточно дороги. Между тем эти культурально-независимые методы необходимы, прежде всего, при изучении микобиома во всех его аспектах.

Следует отметить большие расхождения между данными, полученными культуральными и культурально-независимыми методами [6–8].

Традиционным методам культивирования присущи недостатки, многие из которых ранее были отмечены в исследованиях бактериальной фракции наиболее изученного кишечного сообщества микроорганизмов. Исследования, основанные на культуральном методе, чрезвычайно трудоемки и могут потребовать очень долгого времени. Кроме того, они ориентированы на быстрорастущие и непривередливые виды, которые способны использовать питательные вещества, содержащиеся в искусственных питательных средах. Эти особенности не являются проблемой, если основной целью было перечисление быстрорастущих грибковых видов, таких как *Candida albicans*, рост которых можно получить в течение 24–48 ч. Однако уклон в сторону легко культивируемых видов вреден, если целью исследования является предоставление полного обзора разнообразия грибов. Виды грибов, которые не нуждаются в сложных питательных веществах, могут также маскировать морфологически сходные с ними редкие виды, для роста которых требуется

значительно более длительная инкубация, и в условиях конкурентной борьбы за выживание они вытесняются быстро растущими видами даже при незначительном их количестве.

Влияние условий хранения биоматериала (например, замораживание образцов фекалий перед их исследованием) на способность микобиоты человека к росту только предполагалось. Тем не менее исследование, проведенное на животных, показало, что замораживание и хранение образцов фекалий при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ привело к двукратному снижению общего количества грибов. Хотя виды грибов, присутствующие в образцах фекалий крупного рогатого скота и человека, весьма различны, разумно предположить, что такое влияние на культивируемые виды грибов из образцов человека, скорее всего, возможно [9].

ПЕРСПЕКТИВЫ БУДУЩИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дальнейшее изучение микобиоты и микобиома требует установления неких золотых стандартов для культурально-независимых исследований с целью стандартизации и возможности проведения сравнительного анализа полученных данных между различными исследованиями. Крайне важно, что это потребует консенсуса в отношении методов выделения ДНК, выбора специфических праймеров для ПЦР и принятия передовых методов биоинформационных технологий с использованием только высококачественных баз данных. Уже существует консенсус по выбору праймеров, рекомендованных в качестве целевой области выбора. Тем не менее дальнейший прогресс будет зависеть от разработки тщательно отобранных, специализированных справочных баз данных для микологических исследований и дальнейшей разработки биоинформационных и вычислительных инструментов, которые позволят анализировать большие базы данных.

Появление молекулярно-генетических технологий привело к тому, что ученым больше не нужно полагаться исключительно на способность грибов расти на искусственных питательных средах. Применение таких методов, как ПЦР, технологии секвенирования позволяют исследователям изучать и идентифицировать микобиоту, не используя культуральный метод. Дальнейшее развитие вычислительных возможностей также привело к разработке и совершенствованию баз данных, подходящих для анализа грибов.

В то же время разработка более совершенных подходов, основанных на культуральном методе, является неотъемлемой частью развития исследований как микобиоты, так и микобиома. Это необходимо как для выделения интересующих видов грибов для дальнейшего экспериментирования, так и для присвоения соответствующей таксономии и соответствующих фенотипических характеристик, а также для создания эталонных геномов. Отсутствие доступных грибковых геномов является ключевым пробелом в наших знаниях о генетической информации и потенциальной функциональности, закодированной в грибковых геномах, которые охватывают микобиом человека. Следовательно, необходимо закрепить требования об увеличении количества эталонных геномов грибов, доступных в публичных базах данных.

Надлежащая интеграция всех аспектов соответствующих областей исследований необходима для того, чтобы способствовать изучению микобиома в области здоровья и заболеваний человека. Такой мультидисциплинарный подход должен включать в себя, среди прочего, микробиологию (в том числе микологию), иммунологию и биоинформатику.

Включение в исследования временных данных позволит ученым наблюдать и анализировать любые изменения в микобиоте и, соответственно, в микобиоме на разных этапах жизни (младенец, взрослый, пожилой), в том числе болезнь и период после различных вмешательств (например, диета, медицинское вмешательство). Это необходимо для предоставления ключевой информации о ряде факторов, которые могут потенциально влиять на микобиоту и, следовательно, на микобиом, а также информации, необходимой для определения наилучших стратегий для вмешательств, направленных на укрепление здоровья и предотвращение возникновения заболеваний.

По состоянию на сентябрь 2018 г. в базу данных Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI) внесено 3520 геномов грибов по сравнению с 162 834 бактериальными геномами. Прогнозируется резкое возрастание геномной базы грибов в ближайшие годы, так как все больше исследований сосредоточено на изучении влияния грибов на здоровье человека и развитие болезни [5].

МИКОБИОТА И БОЛЕЗНЬ

Микробиота персистирует внутри иммунных клеток хозяина путем деградирования механизмов

врожденной иммунной защиты хозяина. Микробиом нарушает многие процессы метаболизма человека, встраиваясь в них и изменяя экспрессию генов человека. Кумулятивный эффект этих изменений может привести к катастрофическому разрушению человеческого метаболизма [10].

Грибы составляют важную часть нашей микробиоты, с симбиотическими отношениями, которые варьируют от комменсальных до паразитарных. Симбиотические отношения между людьми и грибами недооценены и недостаточно изучены. Понимание баланса и переходов между этими отношениями имеет жизненно важное значение для будущего, поскольку многие грибы являются патогенными микроорганизмами [11].

На пути к пониманию роли микобиоты человека в заболевании необходимо разделять причины и следствия. Значение наблюдаемых изменений в микобиоме между здоровыми людьми и группами пациентов с той или иной болезнью еще полностью не известно. Это связано с тем, что различия в разнообразии и численности, наблюдаемые в группах больных по сравнению с контрольной группой, могут быть просто случайными для процесса развития болезни и фактически не являются фактором, способствующим этому. Выявление причинных ролей для определенных грибов, несомненно, является трудной задачей. Определенные виды грибов вовлечены в процесс развития заболевания, например, кишечника. Необходимо при этом установить влияние микобиома на этиологию заболевания, причем не только как отдельных видов, но и как потенциальных участников полимикробных инфекций. Первый шаг к этому потребует оценки любых возможных взаимодействий между грибами и другими составляющими микробиоты. Кроме того, многие заболевания желудочно-кишечного тракта обусловлены влиянием разнообразных факторов риска, поэтому необходимо определить и учесть относительную важность и влияние факторов окружающей среды и генетики хозяина на микобиом и бактериом, их комбинированное воздействие на общее состояние здоровья человека и на заболевание.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время остается неясным, являются ли изменения в микобиоме, наблюдаемые при многих заболеваниях, следствием процесса заболевания, или они действительно играют роль в этиологии заболевания. Иными словами, далеко не

всегда можно ответить на вопрос «кто водитель, а кто пассажир?». Также очевидно, что различные методы исследования могут дать совершенно разные объяснения разнообразию, присутствующему в любой выборке.

Очевидно, что большее число исследований, в которых используются сопоставимые и всеобъемлющие подходы и которые используют как культуральные, так и культурально-независимые методы, должны применяться к большим группам людей, чтобы мы могли определить общие черты и различия между группами и оценить, существует ли основная микобиота, оценить роль микобиома в здоровье и заболевании. Более того, анализ бактериального сообщества в настоящее время претерпевает определенные изменения, когда исследователи уходят от анализа на основе секвенирования ампликонов и вместо этого сосредотачивают свои усилия на метагеномном секвенировании. Вполне вероятно, что подобный подход был бы полезен для изучения микобиома человека, однако на данный момент принятие исключительно такого подхода может быть преждевременным.

Таким образом, полноценное изучение микобиома возможно только при многогранном и междисциплинарном подходе. Чрезвычайно интересной областью изучения является функциональность различных видов грибов, включая то, как они взаимодействуют с другими эукариотами и прокариотами, присутствующими в различных локусах тела человека. Предстоит выяснить, что более важно, как эти взаимодействия влияют на нас.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. *Methe´ B.A., Nelson K.E., Pop M., Creasy H.H., Giglio M.G., Huttenhower C. et al.* (248 collaborators: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699610>). Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research // *Nature*. 2012; 486, 7402: 215–221. doi:10.1038/nature11209.
2. *Gillevet P.M., Sikaroodi M., Torzilli A.P.* Analyzing salt-marsh fungal diversity: comparing ARISA fingerprinting with clone sequencing and pyrosequencing // *Fungal Ecol.* 2009; 2, 4: 160–167. doi: 10.1016/j.funeco. 2009.04.001.
3. *Forbes J.D., Bernstein C.N., Tremlett H., Van Domselaar G., Knox N.C.* A Fungal World: Could the Gut Mycobiome Be Involved in Neurological Disease? // *Front. Microbiol.* 2019; 9: 3249. doi: 10.3389/fmicb. 2018.03249.
4. *Hernández-Santos N., Klein B.S.* Through the scope darkly: the gut mycobiome comes into focus // *Cell Host. Microbe.* 2017; 22, 6: 728–729. doi: 10.1016/j.chom.2017.11.013.
5. *Huseyin C.E., O’Toole P.W., Cotter P.D., Scanlan P.D.* Forgotten fungi - the gut mycobiome in human health and disease // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017; 41, 4: 479–511. doi: 10.1093/femsre/fuw047.
6. *Griffith G.W., Ozkose E., Theodorou M., Davies D.R.* Diversity of anaerobic fungal populations in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources // *Fungal Ecol.* 2009; 2: 87–97. doi: 10.1016/j.funeco. 2009.01.005.
7. *Chen Y., Chen Z., Guo R., Chen N., Lu H., Huang S., Wang J., Li L.* Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 70, 4: 492–498. doi: 10.1016/j.diagmicrobio. 2010.04.005.
8. *Hamad I., Sokhna C., Raoult D., Bittar F.* Molecular detection of eukaryotes in a single human stool sample from Senegal // *PLoS One.* 2012; 7, 7: e40888. doi: 10.1371/journal.pone.0040888.
9. *Gouba N., Raoult D., Drancourt M.* Plant and fungal diversity in gut microbiota as revealed by molecular and culture investigations // *PLoS One* 2013; 8, 3: e59474. doi:10.1371/journal.pone.0059474.
10. *Proal A.D., Albert P.J., Marshall T.G.* Autoimmunity, and Vitamin D. CHAPTER 10 in «Infection and Autoimmunity», Second Edition. Edited by Yehuda Shoenfeld, Nancy Agmon-Levin, Noel R. Rose; p.163–182, Elsevier B.V, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63269-2.00007-6>.
11. *Hall R.A., Noverr M.C.* Fungal interactions with the human host: exploring the spectrum of symbiosis // *Curr. Opinion Microbiol.* 2017; 40: 58–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib. 2017.10.020>.

Поступила 23 сентября 2019 г.

MYCOBIOTA AS PART MICROBIOTA: FEATURES METHODS OF STUDYING AT PRESENT

© Authors, 2019

N.S. Bagirova

Dr.Sc. (Med.), Leading Research Scientist, Microbiological Laboratory, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow)
E-mail: nbagirova@mail.ru

N.V. Dmitrieva

Dr.Sc. (Med.), Professor, Head of the Microbiological Laboratory, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow)
E-mail: prof.ndmitrieva@mail.ru

I. N. Petukhova

Dr.Sc. (Med.), Leading Research Scientist, Microbiological Laboratory,
Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology»
of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow)
E-mail: irinapet@list.ru

Z.V. Grigoryevskaya

Dr.Sc. (Med.), Senior Research Scientist, Microbiological Laboratory,
Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology»
of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow)
E-mail: izlatadoc@list.ru

I.V. Tereshchenko

Junior Research Scientist, Microbiological Laboratory,
Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology»
of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow)
E-mail: in.ter68@inbox.ru

The correct formation of the design of future research determines the representativeness of the results. Today, most studies are mainly focused on the study of the bacterial component of the human intestinal microbiota, and its fungal component is not taken into account. The study of intestinal mycobiota, which belongs to a diverse set of fungal species, is a relatively new and rapidly progressing field of study. Despite the ubiquity and abundance of fungi that inhabit the human intestines, their totality is several orders of magnitude smaller than bacteria. Recent studies, however, have shown that mycobiota can be closely associated with health and disease, that fungal communities not only change with the disease, but also play a role in maintaining homeostasis of a particular locus of the human body, as well as in influencing systemic immunity. In addition, it is now widely believed that the associations of fungi of various species in the host organism, the associations of bacteria and fungi are crucial for the health of the host. However, less than 0.4% of the literature is devoted to the study of mycobiota and mycobiome. The mechanisms by which fungi interact with other components of the microbiome and host remain poorly characterized. The results of scientific research conducted for this purpose are often contradictory, and difficulties arise when trying to compare data. Researchers use different methods of obtaining material for research, different methods of studying its composition, diverse groups of patients (different geographical regions, without primary treatment, with treatment, different stages of the disease, etc.), often a small sample. Currently, a full-fledged study of mycobiome is possible only with a multifaceted and multidisciplinary approach. An extremely interesting field of study is the functionality of various species of fungi, including how they interact with other eukaryotes and prokaryotes present in various loci of the human body. It remains to be seen, more importantly, how these interactions affect us.

Key words: *mycobiome, microbiome, mycobiota, microbiota, bacteriome.*

For citation: Bagirova N.S., Dmitrieva N.V., Petukhova I.N., Grigoryevskaya Z.V., Tereshchenko I.V. Mycobiota as part microbiota: features methods of studying at present. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(11):3-8. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-11-01>



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Хелепин (таблетки, мазь) рег. №№ 87/1186/10; 87/1186/7 – противовирусное средство при заболеваниях, вызываемых ДНК-геномными вирусами группы герпеса, получаемое из травы дикорастущего растения леспециды копеечниковой (*Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag.).

Хелепин Д (таблетки, мазь, глазные капли), рег. №№ 94/108/6; 94/108/7; 99/47/11 – противовирусное средство, получаемое из травы культивируемого растения десмодиума канадского (*Desmodium canadense* D.C.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru