УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ КАЗАНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА.
СЕРИЯ ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ

2017, Т. 159, кн. 2 ISSN 2542-064X (Print)
С. 217–231 ISSN 2500-218X (Online)

УДК 616.34-008.87

ВЛИЯНИЕ ЭРАДИКАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ *Helicobacter pylori* НА МИКРОБИОТУ ЧЕЛОВЕКА: МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА

Д.Р. Хуснутдинова[1], *М.И. Маркелова*[1], *Е.А. Булыгина*[1], *М.Н. Синягина*[1], *С.Ю. Маланин*[1], *Т.В. Григорьева*[1], *Р.К. Исмагилова*[1], *Д.Д. Сафина*[1], *С.Р. Абдулхаков*[1], *Р.А. Абдулхаков*[2], *В.М. Чернов*[1,3], *О.А. Чернова*[1,3]

[1]*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия*
[2]*Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, 420012, Россия*
[3]*Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань, 420111, Россия*

Аннотация

Для определения влиянии эрадикационной терапии *Helicobacter pylori* на представителей родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* и *Clostridium* был использован метагеномный анализ клинического материала (152 образца кала от 76 пациентов). Относительная представленность бактерий в составе кишечной микрофлоры пациентов до и после антибиотикотерапии была определена на основании данных, полученных методом шотган-секвенирования. Обнаружено, что относительная численность *Lactobacillus*, *Escherichia* и *Clostridium* в микробном сообществе после терапии варьирует в пределах 0.5% у 76.5%, 51.3% и 55.2% пациентов соответственно, численность *Bifidobacterium* значимо снижается у 60.5%, но увеличивается у 9.2% пациентов. Полученные данные свидетельствуют о том, что эрадикационная терапия *Helicobacter pylori* оказывает разнонаправленное влияние на численность ключевых представителей кишечной микрофлоры у существенной части пациентов, что необходимо учитывать при прогнозировании рисков последствий лечения, основанного на применении антибиотиков.

Ключевые слова: микробиота кишечника человека, *Helicobacter pylori*, эрадикационная терапия, антибиотики, шотган-секвенирование, метагеномный анализ

Введение

Микроорганизмы составляют значительный объем биомассы тела человека, создавая с ним сложную симбионтную экосистему. Кишечник человека населяют около 800–1000 бактериальных видов и более 7000 штаммов [1]. Нормальное функционирование кишечной микробиоты является необходимым условием здоровья человека благодаря ее участию во многих физиологических процессах, таких как формирование иммунной системы, защита от инвазии патогенных микроорганизмов, синтез аминокислот и витаминов и др. [2, 3]. В результате использования молекулярных методов было установлено, что микробиота специфична в отношении хозяина [4] и относительно стабильна у индивидов [5]. Вместе с тем известно, что ряд факторов может значительно нарушать экологический баланс микробного сообщества и вызывать дисбиотические

изменения, определяющие патологические последствия для организма в целом. Наиболее существенное влияние на микробиоту человека оказывают антибиотики. В этой связи необходимость оценки рисков терапии, основанной на применении антибиотиков, представляется важной задачей при определении схем лечения.

Эрадикационная терапия *Helicobacter pylori* проводится в соответствии с рекомендациями Маастрихтского консенсуса и Российской гастроэнтерологической ассоциации по сложной схеме, включающей применение ингибитора протонной помпы, амоксициллина 1000 мг, кларитромицина 500 мг и субсалицилата висмута. Данные о последствиях комплексного приема этих препаратов в отношении микробиомного профиля в литературе пока отсутствуют. Определение влияния эрадикационной терапии *Helicobacter pylori* на микробиоту кишечника явилось задачей настоящей работы. Классическим способом оценки численности полезной и патогенной микрофлоры кишечника и диагностики дисбиозов является микробиологический посев содержимого кишечника. Однако из-за невозможности создания подходящих условий для культивирования большинства микроорганизмов, населяющих кишечник, этот метод является малоинформативным [6]. Применение молекулярно-генетических подходов, основанных на использовании методов ПЦР-анализа, таргетного или шотган-секвенирования, позволяет преодолеть эту проблему [7].

В настоящей работе мы описываем изменения в составе микробного сообщества кишечника у пациентов после эрадикационной терапии *H. pylori*, выявленные нами в результате метагеномного шотган-секвенирования микробиома. Основное внимание направлено на численность ключевых представителей кишечной микрофлоры – *Bifidobacterium, Lactobacillus, Escherichia* и *Clostridium* – бактериальных родов, определяемых классическими методами при диагностике дисбактериоза.

1. Материалы и методы

1.1. Сбор образцов. Для проведения исследования было собрано 152 образца кала 76 пациентов, имеющих симптомы заболеваний желудка и/или двенадцатиперстной кишки, у которых при эндоскопическом обследовании была обнаружена инфекция *Helicobacter pylori*. Образцы были собраны на базе амбулаторно-поликлинического отделения Республиканской клинической больницы № 2 и платных клиник г. Казани от пациентов, наблюдающихся у терапевтов/гастроэнтерологов, при первичном обращении и сразу после проведенного курса эрадикационной терапии. Показаниями для проведения эрадикационной терапии служили заболевания или состояния, указанные в V Маастрихтском консенсусе [8]. Учитывая, что пациенты ранее не получали эрадикационную терапию, схема лечения в соответствии с рекомендациями Маастрихтского консенсуса и Российской гастроэнтерологической ассоциации включала ингибитор протонной помпы в стандартной дозе 2 раза в день, амоксициллин 1000 мг 2 раза в день, кларитромицин 500 мг 2 раза в день, субсалицилат висмута 240 мг 2 раза в день [9]. Продолжительность лечения составляла 14 дней. В качестве пребиотика на всем протяжении эрадикационной терапии применялась лактулоза. В контрольную группу вошли 24 образца от добровольцев – взрослых людей,

не инфицированных *H. pylori* и не принимавших антибактериальные препараты в течение 6 мес. Контрольная и опытная группы обследуемых были сформированы на основании данных анкетирования и заключений, сделанных врачом-терапевтом или гастроэнтерологом после осмотра пациентов и добровольцев.

Образцы биоматериала представителей обеих групп собирали в индивидуальные пластиковые контейнеры, избегая попадания мочи и туалетной бумаги. Образцы весом 10–20 г подвергались немедленной заморозке, после чего хранились при –20 °C, либо были использованы для выделения ДНК сразу после забора материала. Подготовка биоматериала к хранению и его маркировка производились медицинским персоналом.

1.2. Выделение ДНК и секвенирование. Тотальная ДНК из образцов кала была получена с использованием набора для выделения ДНК из биологических образцов PurelinkGenomic DNA ExtractionKit (Invitrogen, США). Подготовка метагеномных библиотек для секвенирования, а также шотган-секвенирование на платформе SOLiD 5500 Wildfire осуществлялись согласно протоколу производителя (LifeTechnologies, США). Исходные данные хранятся на серверах Казанского (Приволжского) федерального университета и доступны с разрешения соавторов статьи и Локального этического комитет КФУ по запросу.

1.3. Биоинформатический анализ. На первом этапе полученные с прибора прочтения («риды») подверглись фильтрации по качеству: риды, прошедшие фильтр QC > 15, далее были обрезаны с 5'-конца до первого прочтенного с высокой достоверностью нуклеотида (QC ≥ 30). Риды, длина которых после этого не превышала 30 нуклеотидов, были удалены из анализа.

Во избежание попадания в дальнейший анализ последовательностей ДНК человека риды были картированы на референс hg18 (стандартный референсный геном человека) с помощью программы bowtie со следующими фильтрами: максимальное число несовпадений нуклеотидов – 3, вставки и делеции не допускаются. Неоткартированные риды подверглись дальнейшему таксономическому профилированию с использованием филогенетического инструмента MetaPhlAn [10].

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Бактериальный состав микробиоты содержимого кишечника человека до и после эрадикационной терапии *H. pylori*. Микробиота кишечника человека отличается большим качественным и количественным разнообразием представителей. По данным последнего наиболее обширного исследования кишечной микрофлоры взрослого человека [11], в число наиболее часто встречаемых родов входят *Bacteroides, Clostridium, Prevotella, Faecalibacterium, Eubacterium, Ruminococcus, Streptococcus, Collinsella, Bifidobacterium, Lactobacillus* и др. и в зависимости от доминирующего в микробиоме кишечника микроорганизма – *Bacteroides, Clostridium* или *Ruminococcus* – микрофлору хозяина можно отнести к одному из трех энтеротипов с дискретными [12] или размытыми [13] границами.

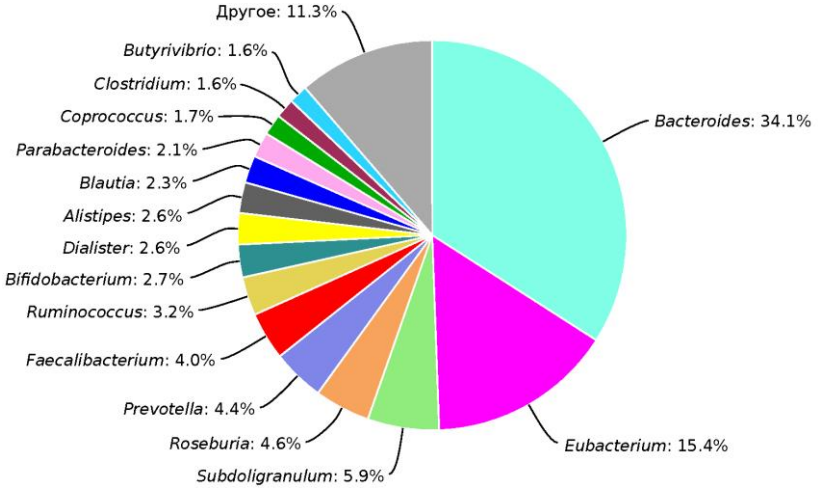

Рис. 1. Распределение 15 родов бактерий, доминирующих в метагеноме кишечника контрольной группы, %

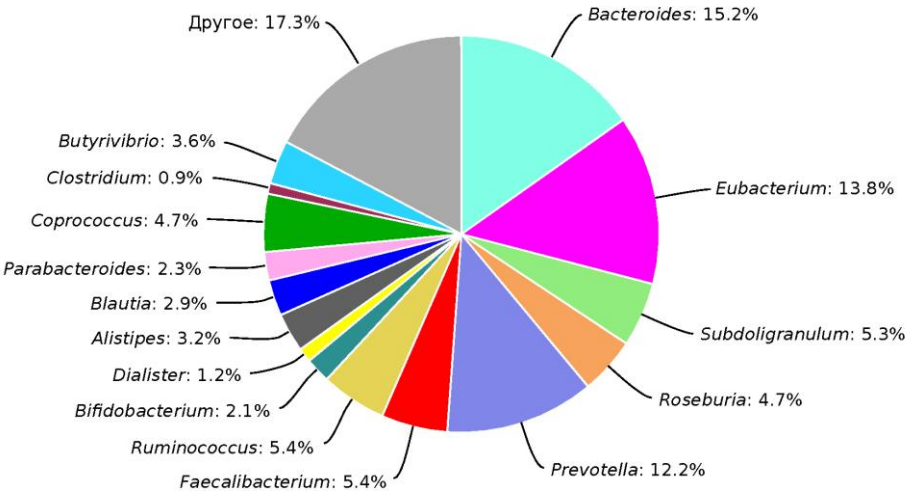

Рис. 2. Распределение 15 родов бактерий, доминирующих в метагеноме кишечника группы пациентов до эрадикационной терапии *H. pylori*, %

Распределение основных родов в группе контроля в нашем исследовании согласуется с данными литературы и свидетельствует о доминировании в микробиоме кишечника рода *Bacteroides* (рис. 1).

В микрофлоре содержимого кишечника пациентов до антибиотикотерапии также присутствуют вышеперечисленные представители, однако соотношение родов *Bacteroides* и *Prevotella* почти равное (рис. 2).

Ранее нами было показано, что пациенты по-разному отвечают на прием антибиотиков с точки зрения сдвигов в составе микробного сообщества кишечника и их обратимости [14, 15]. В зависимости от силы изменений показателей бактериального разнообразия – индекса Шеннона и расстояния Брея – Кертиса – пациенты подразделяются на группы со слабым, средним и сильным эффектом от приема лекарственных препаратов. Следует отметить, что во многих случаях

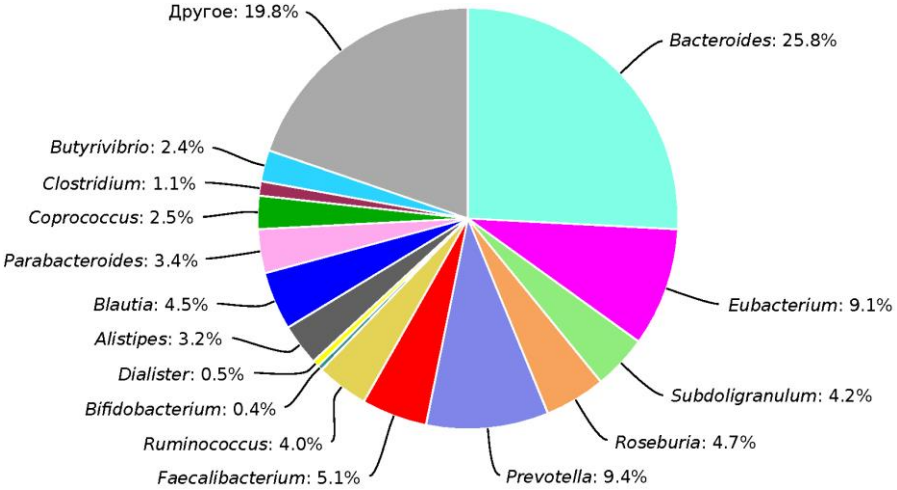

Рис. 3. Распределение 15 родов бактерий, доминирующих в метагеноме кишечника группы пациентов после эрадикационной терапии *H. pylori*, %

микробиота кишечника пациентов, которым показана эрадикационная терапия, уже изначально отличается от пациентов контрольной группы, у которых *H. pylori* не выявлена. Эти отличия индивидуальны и характеризуются различной представленностью родов *Bacteroides, Prevotella, Eubacterium, Ruminococcus, Coprococcus*, а также их большей вариацией относительно среднего значения в группе контроля. Согласно полученным нами данным в микробиоте кишечника однонаправленные сдвиги в представленности ключевых бактериальных родов в ответ на антибиотикотерапию не обнаруживаются. Эти результаты свидетельствуют о том, что влияние эрадикационной терапии *H. pylori* на кишечный биоценоз носит индивидуальный характер, что необходимо учитывать при оценке рисков лечения.

Поскольку важнейшими маркерами в микробиологической диагностике дисбиоза кишечника являются представители родов *Bifidobacterium, Lactobacillus, Escherichia* и *Clostridium,* определение влияния эрадикационной терапии *H. pylori* на эти группы бактерий представляет значительной интерес с точки зрения как фундаментальных исследований, так и практических разработок [16].

2.2. Влияние антибиотиков на основные маркеры дисбактериоза. Одним из классических способов диагностики дисбактериоза кишечника служит бактериологическое исследование кала (посев на диагностические среды). При данном способе диагностики внимание направлено на численность представителей как резидентной (бифидобактерии), так и факультативной микрофлоры (лактобациллы, эшерихии), а также на присутствие транзиторных микроорганизмов (клостридии).

Бифидобактерии – грамположительные прокариоты, в норме колонизирующие ЖКТ и другие органы человека. Эти микроорганизмы не доминируют количественно в микрофлоре кишечника, но являются ключевыми комменсалами, поддерживающими здоровое состояние ЖКТ за счет метаболизма олигосахаридов, а также синтеза аминокислот и некоторых витаминов [17]. Представители

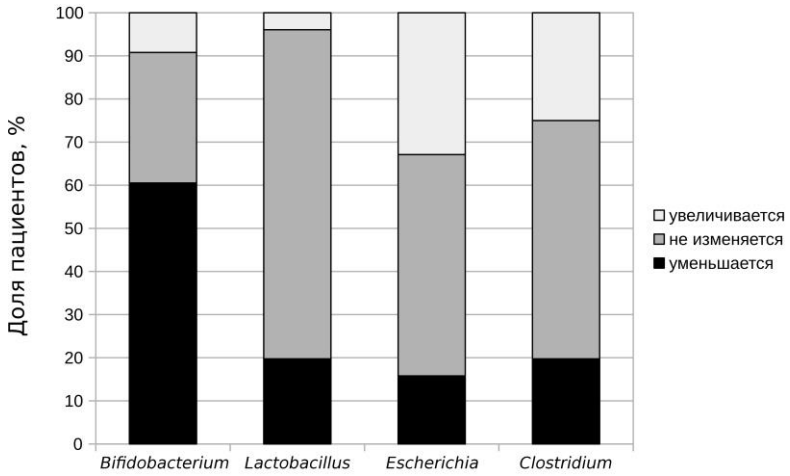

Рис. 4. Изменение числа представителей родов *Bifidobacterium, Lactobacillus, Escherichia* и *Clostridium* в микрофлоре кишечника пациентов после антибиотикотерапии

рода *Lactobacillus* широко распространены в микрофлоре кишечника здоровых людей. В ранних исследованиях было показано, что лактобациллы оказывают подавляющее действие на патогенные микроорганизмы, населяющие кишечник [18], а также угнетают метаболическую активацию канцерогенов [19]. Эшерихии – грамотрицательные представители семейства *Enterobacteriaceae*, частые обитатели ЖКТ человека и животных. Среди представителей рода *Escherichia* встречаются как непатогенные, так и патогенные штаммы, обсемененность которыми связывают с различными воспалительными заболеваниями кишечника и диареей [20]. Род *Clostridium* является типичным представителем нормальной микрофлоры ЖКТ, однако вид *Clostridium difficile* может быть причиной развития псевдомембранного колита [21].

Согласно опубликованным данным [22–24], антибиотики кларитромицин и амоксициллин оказывают угнетающее действие на все вышеперечисленные представители кишечного биоценоза. Вместе с тем имеются сведения, указывающие, что *Clostridium difficile* на фоне антибиотикотерапии может увеличивать численность из-за высокой распространенности в микробиомах индивидов штаммов, резистентных к антимикробным препаратам [25].

В результате нашего исследования было обнаружено, что эрадикационная терапия *H. pylori* оказывает разнонаправленный эффект на представителей вышеперечисленных родов бактерий, причем относительная численность *Lactobacillus, Escherichia* и *Clostridium* изменяется слабо (варьирует в пределах 0.5%) у 76.5%, 51.3% и 55.2% пациентов соответственно (рис. 4). У 60.5% пациентов доля бифидобактерий после терапии уменьшается, но у 9.2% пациентов, наблюдается увеличение количества соответствующих микроорганизмов. При этом у 32.9% регистрируется рост численности *Escherichia,* а у 25% – *Clostridium,* что может быть связано с присутствием (в кишечной микробиоте индивидов) штаммов с повышенной устойчивостью к кларитромицину и амоксициллину. Однако так ли это, еще предстоит выяснить.

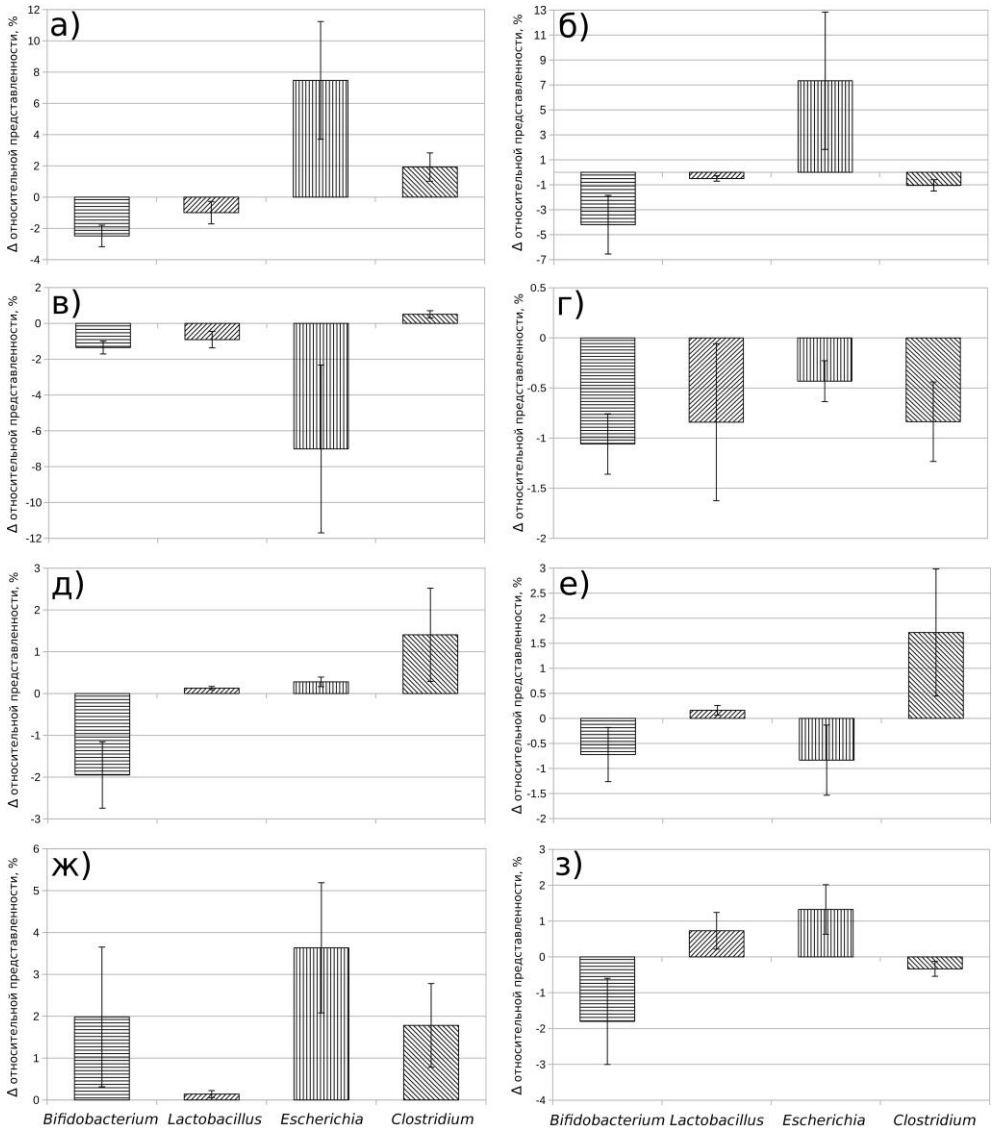

Рис. 5. Основные варианты изменений относительной представленности родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* и *Clostridium* в микрофлоре кишечника пациентов после антибиотикотерапии в порядке убывания доли случаев

Наиболее частый вариант последствий антибиотикотерапии, обнаруженный у четверти пациентов, характеризуется снижением доли представителей *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* и повышением доли *Escherichia* и *Clostridium* (рис. 5, *а*); у 14.5% пациентов регистрируется снижение доли нормофлоры на фоне роста числа кишечных палочек (рис. 5, *б*); у 22.4% больных (рис. 5, *в*, *г*) – снижение численности всех анализируемых микроорганизмов, кроме *Clostridium* (рис. 5, *в*). Остальные варианты изменений микробиоценоза кишечника (рис. 5, *д–з*) составляют 23.7% случаев; у 14.4% пациентов последствия эрадикационной терапии носят выраженный индивидуальный характер (данные не представлены). Отсутствие негативного влияния антибиотикотерапии

Табл. 1

Корреляция представленности родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* и *Clostridium* с индексом Шеннона и расстоянием Брея – Кёртиса в микрофлоре кишечника пациентов

Род	Индекс Шеннона		Расстояние Брея – Кёртиса	
	R	P_{value}	R	P_{value}
Lactobacillus	–0.135	0.244	0.128	0.270
Bifidobacterium	–0.209	0.069	–0.116	0.317
Escherichia	0.066	0.570	0.149	0.198
Clostridium	–0.129	0.267	–0.042	0.717

на представленность лактобактерий и бифидобактерий было обнаружено у 10.5% пациентов. Эти пациенты и микробиом их кишечника представляют значительный интерес с точки зрения фундаментальных исследований механизмов стабильности микрофлоры человека к стрессорам, а также практической разработки эффективных пробиотических препаратов и терапевтической трансплантации микробиоты.

Корреляция между изменениями в группах полезных (*Lactobacillus* и *Bifidobacterium)* и так называемых потенциально патогенных (*Escherichia* и *Clostridium*) микроорганизмов с общими изменениями сообщества (таксономическое расстояние) (табл. 1) не обнаружена. Отсутствие статистической значимости между откликом в четырех исследуемых группах микробиоты кишечника с индексом разнообразия, косвенно отражающим устойчивость сообществ, исключает возможность точного прогнозирования влияния эрадикационной терапии *H. pylori* на индивидов и диктует необходимость поиска эффективных диагностических параметров.

Заключение

Согласно результатам нашего исследования, эрадикационная терапия *H. pylori* сопровождается снижением численности полезной микрофлоры кишечника у более чем 80% пациентов. При этом изменения микробиоты кишечника у значительной части пациентов имеют выраженные индивидуальные особенности. Это необходимо учитывать при назначении препаратов и оценке рисков антибиотикотерапии. Полученные данные могут представлять интерес как для фундаментальных исследований регуляции факторов антибиотикорезистентности полезной и патогенной микрофлоры, так и для практической разработки методов прогнозирования и корректировки последствий антибиотикотерапии.

Исследование было проведено с использованием оборудования Междисциплинарного центра протеомных исследований Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение № 14.575.21.0076 от 22.08.2014, ID RFMEFI575I4X0076).

Литература

1. *Bäckhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I.* Host-bacterial mutualism in the human intestine // Science. – 2005. – V. 307, No 5717. – P. 1915–1920. – doi: 10.1126/science.1104816.
2. *Round J.L., Mazmanian S.K.* The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease // Nat. Rev. Immunol. – 2009. – V. 9, No 5. – P. 313–323. – doi: 10.1038/nri2515.
3. *Guarner F.* Enteric flora in health and disease // Digestion. – 2006. – V. 73, Suppl. 1. – P. 5–12.
4. *Dicksved J., Flöistrup H., Bergström A., Rosenquist M., Pershagen G., Scheynius A., Roos S., Alm J.S., Engstrand L., Braun-Fahrländer Ch., Mutius E., Jansson J.K.* Molecular fingerprinting of the fecal microbiota of children raised according to different lifestyles // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73, No 7. – P. 2284–2289. – doi: 10.1128/AEM.02223-06.
5. *Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L., De Vos W.M.* Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64, No 10. – P. 3854–3859.
6. *Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein Ch.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.* Diversity of the human intestinal microbial flora // Science. – 2005. – V. 308, No 5728. – P. 1635–1638. – doi: 10.1126/science.1110591.
7. *Brugère J.-F., Mihajlovski A., Missaoui M., Peyret P.* Tools for stools: The challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics // Expert Rev. Mol. Diagn. – 2009. – V. 9, No 4. – P. 353–365. – doi: 10.1586/erm.09.16.
8. *Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A., Gisbert J.P., Kuipers E.J., Axon A.T., Bazzoli F., Gasbarrini A., Atherton J., Graham D.Y., Hunt R., Moayyedi P., RokkasT., Rugge M., Selgrad M., Suerbaum S., Sugano K., El-Omar E.M.* Management of *Helicobacter pylori* infection — the Maastricht V / Florence consensus report // Gut. – 2016. – doi: 10.1136/gutjnl-2016-312288.
9. *Ивашкин В.Т., Маев И.В., Лапина Т.Л., Шептулин А.А.* Рекомендации Российской Гастроэнтерологической Ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых // Рос. журн. гастроентерологии, гепатологии и колопрактологии. – 2012. – Т. 22, Вып. 1. – С. 87–89.
10. *Segata N., Waldron L., Ballarini A., Narasimhan V., Jousson O., Huttenhower C.* Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes // Nat. Methods. – 2012. – V. 9, No 8. – P. 811–814. – doi: 10.1038/nmeth.2066.
11. *Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., Sunagawa S., Arumugam M., Kultima J.R., Prifti E., Nielsen T., Juncker A.S., Manichanh C., Chen B., Zhang W., Levenez F., Wang J., Xu X., Xiao L., Liang S., Zhang D., Zhang Z., Chen W., Zhao H., Al-Aama J.Y., Edris S., Yang H., Wang J., Hansen T., Nielsen H.B., Brunak S., Kristiansen K., Guarner F., Pedersen O., Doré J., Ehrlich S.D., MetaHIT Consortium, Bork P., Wang J.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome // Nat. Biotechnol. – 2014. – V. 32, No 8. – P. 834–841. – doi: 10.1038/nbt.2942.
12. *Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Paslier D.L., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.-M., Bertalan M., Borruel N., Casellas F., Fernandez L., Gautier L., Hansen T., Hattori M., Hayashi T., Kleerebezem M., Kurokawa K., Leclerc M., Levenez F., Manichanh C., Nielsen H.B., Nielsen T. et al.* Enterotypes of the human gut microbiome // Nature. – 2011. – V. 473, No 7346. – P. 174–180. – doi: 10.1038/nature09944.

13. *Knights D., Ward T.L., McKinlay Ch.E., Miller H., Gonzalez A., McDonald D., Knight R.* Rethinking “Enterotypes” // Cell Host Microbe. – 2014. – V. 16, No 4. – P. 433–437. – doi: 10.1016/j.chom.2014.09.013.

14. *Khusnutdinova D., Grigoryeva T., Abdulkhakov S., Safina D., Siniagina M., Markelova M., Boulygina E., Malanin S., Tyakht A., Kovarsky B., Ismagilova R., Abdulkhakov R., Chernov V.* Gut microbiome shotgun sequencing in assessment of microbial community changes associated with *H. pylori* eradication therapy // BioNanoScience. – 2016. – V. 6, No 4. – P. 585–587. – doi: 10.1007/s12668-016-0285-y.

15. *Сафина Д.Д., Абдулхаков С.Р., Григорьева Т.В., Маркелова М.И., Исмагилова Р.К., Хуснутдинова Д.Р., Маланин С.Ю., Лайков А.В., Синягина М.Н., Абдулхаков Р.А., Чернов В.М.* Влияние фармакотерапии на генетическое разнообразие биоценоза кишечника // Гены и клетки. – 2015. – Т. 10, Вып. 4. – С. 80–85.

16. *Ардатская М.Д., Бельмер С.В., Добрица В.П., Захаренко С.М., Лазебник Л.Б., Минушкин О.Н., Орешко Л.С., Ситкин С.И., Ткаченко Е.И., Суворов А.Н., Хавкин А.И., Шендеров Б.А.* Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – Т. 5, Вып. 117. – С. 13–50.

17. *Schell M.A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M.-C., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore R.D., Arigoni F.* The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2002. – V. 99, No 22. – P. 14422–14427. – doi: 10.1073/pnas.212527599.

18. *Sandine W.E., Muralidhara K.S., Elliker P.R., England D.C.* Lactic acid bacteria in food and health: a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli // J. Milk Food Technol. – 1972. – V. 35. – P. 691–702. – doi: 10.4315/0022-2747-35.12.691.

19. *Goldin B.R., Gorbach S.L.* Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine // Cancer. – 1977. – V. 40. – P. 2421–2426.

20. *Clarke S.C., Haigh R.D., Freestone P.P.E., Williams P.H.* Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen // Clin. Microbiol. Rev. – 2003. – V. 16, No 3. – P. 365–378.

21. *Bartlett J.G., Chang T.E.W., Gurwith M., Gorbach Sh.L., Onderdonk A.B.* Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia // N. Engl. J. Med. – 1978. – V. 298, No 10. – P. 531–534.

22. *Adamsson I., Nord C.E., Lundquist P., Sjöstedt S., Edlund C.* Comparative effects of omeprazole, amoxycillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients // J. Antimicrob. Chemother. – 1999. – V. 44, No 5. – P. 629–640.

23. *Brismar B., Edlund C., Nord C.E.* Comparative effects of clarithromycin and erythromycin on the normal intestinal microflora // Scand. J. Infect. Dis. – 1991. – V. 23, No 5. – P. 635–642.

24. *Edlund Ch., Beyer G., Hiemer-Bau M., Ziege S., Lode H., Nord C.E.* Comparative effects of moxifloxacin and clarithromycin on the normal intestinal microflora // Scand. J. Infect. Dis. – 2000. – V. 32, No 1. – P. 81–85.

25. *Bartlett J.G., Chang T.E.W., Gurwith M., Gorbach Sh.L., Onderdonk A.B.* Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia // N. Engl. J. Med. – 1978. – V. 298, No 10. – P. 531–534.

Поступила в редакцию
14.02.17

Хуснутдинова Диляра Рашидовна, аспирант кафедры генетики, главный инженер проекта Междисциплинарного центра протеомных исследований Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *dilyahusn@gmail.com*

Маркелова Мария Ивановна, младший научный сотрудник Openlab «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *mimarkelova@gmail.com*

Булыгина Евгения Александровна, младший научный сотрудник Openlab «Омиксные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *boulygina@gmail.com*

Синягина Мария Николаевна, аспирант кафедры генетики, техник-проектировщик Междисциплинарного центра протеомных исследований Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *marias25@mail.ru*

Маланин Сергей Юрьевич, кандидат биологических наук, главный инженер проекта Междисциплинарного центра протеомных исследований Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *sergen83@mail.ru*

Григорьева Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, главный инженер проекта Междисциплинарного центра протеомных исследований Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *tatabio@inbox.ru*

Исмагилова Рузиля Камилевна, техник-проектировщик Междисциплинарного центра протеомных исследований Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *ruz-ismagilova@yandex.ru*

Абдулхахов Сайяр Рустамович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Openlab «Генные и клеточные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *sayarabdul@yandex.ru*

Абдулхахов Рустам Аббасович, доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной терапии

Казанский государственный медицинский университет
ул. Бутлерова, д. 49, г. Казань, 420012, Россия
E-mail: *rustemabdul@mail.ru*

Чернов Владислав Моисеевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярных основ патогенеза; заведующий кафедрой генетики

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *chernov@kibb.knc.ru*

Чернова Ольга Александровна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ патогенеза; профессор кафедры генетики

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
ул. Лобачевского, д. 2/31, г. Казань, 420111, Россия
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *ol.chernova2010@yandex.ru*

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI

(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2017, vol. 159, no. 2, pp. 217–231

The Effect of *Helicobacter pylori* Eradication on Human Microbiota: Metagenome Analysis of the Human Gut Microbiome

D.R. Khusnutdinova[a*], *M.I. Markelova*[a**], *E.A. Boulygina*[a], *M.N. Siniagina*[a], *S.Yu. Malanin*[a], *T.V. Grigoryeva*[a], *R.K. Ismagilova*[a], *D.D. Safina*[a], *S.R. Abdulkhakov*[a], *R.A. Abdulkhakov*[b], *V.M. Chernov*[a,c], *O.A. Chernova*[a,c]

[a]*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*
[b]*Kazan State Medical University, Kazan, 420012 Russia*
[c]*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia*
E-mail: [*]*dilyahusn@gmail.com*, [**]*mimarkelova@gmail.com*

Received February 14, 2017

Abstract

A total of 152 stool samples from 76 patients with symptoms of gastrointestinal diseases have been analyzed using metagenomic shotgun sequencing technology to assess the effect of *Helicobacter pylori* eradication therapy on *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, and *Clostridium* genera. The relative abundance of bacteria representing these genera in the intestinal microflora of patients before and after antibiotic therapy has been evaluated. It has been shown that the therapy did not have any critical effect in the majority of cases on the number of *Lactobacillus*, *Escherichia* and *Clostridium* genera in the microbial community. Their abundance varied within 0.5% in 76.5%, 51.3%, and 55.2% of patients, respectively. The *Bifidobacterium* genus has been found to be more susceptible to antibiotics (their number decreased significantly in 60.5% of cases). However, 9.2% of patients have shown the opposite effect. Thus, the obtained data demonstrate that *Helicobacter pylori* eradication therapy does not have uniform effects on the key members of human intestinal microbiota. This fact should be taken into account when predicting the risks of side effects of antibiotics.

Keywords: human intestinal microbiome, *Helicobacter pylori*, eradication therapy, antibiotics, shotgun sequencing, metagenome analysis

Acknowledgments. The study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation as part of the federal target program "Investigations and developments on priority areas of scientific-technological complex of Russia for 2014–2020" (Agreement no. 14.575.21.0076 of August 22, 2014, ID RFMEFI575I4X0076).

Figure Captions

Fig. 1. The distribution of 15 bacterial genera dominating in the intestinal metagenome of the control group, %.

Fig. 2. The distribution of 15 bacterial genera dominating in the intestinal metagenome of patients before *H. pylori* eradication therapy, %.

Fig. 3. The distribution of 15 bacterial genera dominating in the intestinal metagenome of patients after *H. pylori* eradication therapy, %.

Fig. 4. Changes in the number of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, and *Clostridium* in the intestinal microbiome of patients after antibiotic therapy.

Fig. 5. The main variants of changes in the relative abundance of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, and *Clostridium* in the intestinal microbiome of patients after antibiotic therapy in the descending order of percentage of cases.

References

1. Bäckhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 2005, vol. 307, no. 5717, pp. 1915–1920. doi: 10.1126/science.1104816.
2. Round J.L., Mazmanian S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, vol. 9, no. 5, pp. 313–323. doi: 10.1038/nri2515.
3. Guarner F. Enteric flora in health and disease. *Digestion*, 2006, vol. 73, suppl. 1, pp. 5–12.
4. Dicksved J., Flöistrup H., Bergström A., Rosenquist M., Pershagen G., Scheynius A., Roos S., Alm J.S., Engstrand L., Braun-Fahrländer Ch., Mutius E., Jansson J. K. Molecular fingerprinting of the fecal microbiota of children raised according to different lifestyles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 7, pp. 2284–2289. doi: 10.1128/AEM.02223-06.
5. Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L., De Vos W.M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64, no. 10, pp. 3854–3859.
6. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein Ch.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005, vol. 308, no. 5728, pp. 1635–1638. doi: 10.1126/science.1110591.
7. Brugère J.-F., Mihajlovski A., Missaoui M., Peyret P. Tools for stools: The challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2009, vol. 9, no. 4, pp. 353–365. doi: 10.1586/erm.09.16.
8. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C.A., Gisbert J.P., Kuipers E.J., Axon A.T., Bazzoli F., Gasbarrini A., Atherton J., Graham D.Y., Hunt R., Moayyedi P., Rokkas T., Rugge M., Selgrad M., Suerbaum S., Sugano K., El-Omar E.M. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht V / Florence consensus report. *Gut*, 2016. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312288.
9. Ivashkin V.T., Maev I.V., Lapina T.L., Sheptulin A.A. Guidelines of the Russian Gastroenterological Association on diagnostics and treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults. *Ross. Zh. Gastroenterol., Gepatol. Kolopraktol.*, 2012, vol. 22, no. 1, pp. 87–89. (In Russian)
10. Segata N., Waldron L., Ballarini A., Narasimhan V., Jousson O., Huttenhower C. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat. Methods*, 2012, vol. 9, no. 8, pp. 811–814. doi: 10.1038/nmeth.2066.

11. Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., Sunagawa S., Arumugam M., Kultima J.R., Prifti E., Nielsen T., Juncker A.S., Manichanh C., Chen B., Zhang W., Levenez F., Wang J., Xu X., Xiao L., Liang S., Zhang D., Zhang Z., Chen W., Zhao H., Al-Aama J. Y., Edris S., Yang H., Wang J., Hansen T., Nielsen H.B., Brunak S., Kristiansen K., Guarner F., Pedersen O., Doré J., Ehrlich S.D., MetaHIT Consortium, Bork P., Wang J. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.*, 2014, vol. 32, no. 8, pp. 834–841. doi: 10.1038/nbt.2942.

12. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Paslier D.L., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.-M., Bertalan M., Borruel N., Casellas F., Fernandez L., Gautier L., Hansen T., Hattori M., Hayashi T., Kleerebezem M., Kurokawa K., Leclerc M., Levenez F., Manichanh C., Nielsen H.B., Nielsen T. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, vol. 473, no. 7346, pp. 174–180. doi: 10.1038/nature09944.

13. Knights D., Ward T.L., McKinlay Ch.E., Miller H., Gonzalez A., McDonald D., Knight R. Rethinking “Enterotypes”. *Cell Host Microbe*, 2014, vol. 16, no. 4, pp. 433–437. doi: 10.1016/j.chom.2014.09.013.

14. Khusnutdinova D., Grigoryeva T., Abdulkhakov S., Safina D., Siniagina M., Markelova M., Boulygina E., Malanin S., Tyakht A., Kovarsky B., Ismagilova R., Abdulkhakov R., Chernov V. Gut microbiome shotgun sequencing in assessment of microbial community changes associated with *H. pylori* eradication therapy. *BioNanoScience*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 585–587. doi: 10.1007/s12668-016-0285-y.

15. Safina D.D., Abdulkhakov S.R., Grigoryeva T.V., Markelova M.I., Ismagilova R.K., Khusnutdinova D.R., Malanin S.Yu., Laikov A.V., Siniagina M.N., Abdulkhakov R.A., Chernov V.M. Pharmacotherapy effect on genetic diversity of intestinal biocenosis. *Geny Kletki*, 2015, vol. 10, no. 4. pp. 80–85. (In Russian)

16. Ardatskaya M.D., Bel’mer S.V., Dobritsa V.P., Zakharenko S.M., Lazebnik L.B., Minushkin O.N., Oreshko L.S., Sitkin S.I., Tkachenko E.I., Suvorov A.N., Khavkin A.I., Shenderov B.A. Colon dysbacteriosis (dysbiosis): Modern state of the problem, comprehensive diagnosis and treatment correction. *Eksp. Klin. Gastroenterol.*, 2015, vol. 5, no. 117, pp. 13–50. (In Russian)

17. Schell M.A., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M.-C., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore R.D., Arigoni F. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, vol. 99, no. 22, pp. 14422–14427. doi: 10.1073/pnas.212527599.

18. Sandine W.E., Muralidhara K.S., Elliker P.R., England D.C. Lactic acid bacteria in food and health: A review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *J. Milk Food Technol.*, 1972, vol. 35, pp. 691–702. doi: 10.4315/0022-2747-35.12.691.

19. Goldin B.R., Gorbach S.L. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer*, 1977, vol. 40, pp. 2421–2426.

20. Clarke S.C., Haigh R.D., Freestone P.P.E., Williams P.H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, vol. 16, no. 3, pp. 365–378.

21. Bartlett J.G., Chang T.E.W., Gurwith M., Gorbach Sh.L., Onderdonk A.B. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.*, 1978, vol. 298, no. 10, pp. 531–534.

22. Adamsson I., Nord C.E., Lundquist P., Sjöstedt S., Edlund C. Comparative effects of omeprazole, amoxycillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in Helicobacter pylori-infected patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1999, vol. 44, no. 5, pp. 629–640.

23. Brismar B., Edlund C., Nord C.E. Comparative effects of clarithromycin and erythromycin on the normal intestinal microflora. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1991, vol. 23, no. 5, pp. 635–642.

24. Edlund Ch., Beyer G., Hiemer-Bau M., Ziege S., Lode H., Nord C.E. Comparative effects of moxifloxacin and clarithromycin on the normal intestinal microflora. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2000, vol. 32, no. 1, pp. 81–85.

25. Bartlett J.G., Chang T.E.W., Gurwith M., Gorbach Sh.L., Onderdonk A.B. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.*, 1978, vol. 298, no. 10, pp. 531–534.

***Для цитирования*:** *Хуснутдинова Д.Р., Маркелова М.И., Булыгина Е.А., Синягина М.Н., Маланин С.Ю., Григорьева Т.В., Исмагилова Р.К., Сафина Д.Д., Абдулхаков С.Р., Абдулхаков Р.А., Чернов В.М., Чернова О.А.* Влияние эрадикационной терапии *Helicobacter pylori* на микробиоту человека: метагеномный анализ микробиома кишечника // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2017. – Т. 159, кн. 2. – С. 217–231.

***For citation*:** Khusnutdinova D.R., Markelova M.I., Boulygina E.A., Siniagina M.N., Malanin S.Yu., Grigoryeva T.V., Ismagilova R.K., Safina D.D., Abdulkhakova S.R., Abdulkhakov R.A., Chernov V.M., Chernova O.A. The effect of *Helicobacter pylori* eradication on human microbiota: Metagenome analysis of the human gut microbiome. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2017, vol. 159, no. 2, pp. 217–231. (In Russian)