

АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ МИКРОБНОГО СОСТАВА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ И СТУЛА У ПАЦИЕНТОВ С АДЕНОМАМИ И КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Карасев Иван Александрович

Кандидат медицинских наук, доцент,
заведующий отделением,

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, г. Москва
Ronc-karasev@yandex.ru

ANALYSIS OF COLONIC AND STOOL MICROBIAL COMPOSITION SAMPLES FROM PATIENTS WITH ADENOMAS AND COLORECTAL CANCER

I. Karasev

Summary. The study presents an analysis of the colonic microbiome and stool microbiome in patients with adenomas and colorectal cancer. The microbiota is critical in the pathogenesis of sporadic colorectal cancer, as evidenced by the identification of certain microorganisms associated with different stages of precancerous lesions. The microbiome was investigated in correlation with the type, localization, and risk of malignization of neoplasms. The study methodology included 16S rRNA sequencing and data analysis using modern bioinformatics tools. The results demonstrate that the microbiome may be associated with the morphologic type and potential of neoplasms, which holds promise for the development of new methods for colorectal cancer diagnosis and prevention.

Keywords: colorectal cancer, intestinal microbiome, adenomas, malignization, sequencing.

Аннотация. В работе представлен анализ микробиома ободочной кишки и стула у пациентов с аденомами и колоректальным раком. Микробиота имеет критическое значение в патогенезе спорадического колоректального рака, что подтверждается выявлением определенных микроорганизмов, ассоциированных с различными стадиями предраковых образований. Микробиом исследован во взаимосвязи с типом, локализацией и риском малигнизации новообразований. Методология исследования включала секвенирование 16S рРНК и анализ данных с использованием современных биоинформатических инструментов. Результаты демонстрируют, что микробиом может быть связан с морфологическим типом и потенциалом новообразований, что открывает перспективы для разработки новых методов диагностики и профилактики колоректального рака.

Ключевые слова: колоректальный рак, микробиом кишечника, аденомы, малигнизация, секвенирование.

Введение

Колоректальный рак является одной из наиболее распространенных в настоящее время форм рака, занимая третье место по частоте среди мужчин и второе — среди женщин [1]. В случае колоректального рака, злокачественному образованию практически всегда предшествует доброкачественное предраковое образование — полип, которое может быть заблаговременно обнаружен при колоноскопии и удалено. Программы скрининга людей старше 50 лет, включающие колоноскопию, способствовали нисходящему тренду заболеваемости колоректальным раком в развитых странах начиная с 2000-х годов [2]. При этом наличие эпителиальных образований разной степени злокачественности является достаточно распространенным явлением, их выявляют у более половины индивидов старше 50 лет со средним риском колоректального рака. Однако не все они имеют одинаковый риск малигнизации. Данный риск зависит от размера, локализации, факторов риска, морфологического типа образования, а также динамики его роста [3]. При обнаружении эпителиального образования производится полипэктомия, эндоскопическая резекция слизистой оболочки, эндоскопическая резекция с дис-

секцией в подслизистом слое или рекомендуется наблюдение при воспалительном или гиперпластическом характере новообразования.

Согласно настоящему пониманию, малигнизация аденом может происходить двумя путями в зависимости от типа полипа: классический вариант аденома-аденокарцинома и по зубчатому пути. Ранее считалось, что у зубчатых аденом низкий риск малигнизации и единственным путем образования рака является малигнизация аденом. На данный момент известно, что существует альтернативный путь развития рака из зубчатых полипов, и он составляет 20–25 % от спорадического колоректального рака [4].

Последовательная малигнизация аденомы проходит стадию легкой дисплазии и развивается в аденокарциному [5]. При этом, первичной в подавляющем большинстве случаев является мутация в гене APC [6]. В норме APC отвечает за деградацию β-катенина, который является одним из основных участников внутриклеточного сигнального пути, который позволяет стволовым клеткам оставаться в нативном состоянии, и в норме активен в стволовых клетках кишечника в основании крипт,

и неактивен в дифференцированных клетках кишечника. Мутация гена APC приводит к длительной активации внутриклеточного сигнального пути и образованию гиперплазии [7]. Дальнейшее развитие опухоли сопровождается мутациями в гене супрессоре TP53, а также потерей гетерогенности [8–9].

Зубчатые образования включают в себя гиперпластические полипы (~75%), сидячие зубчатые образования (SSL) (~25%) и традиционные зубчатые аденомы (TSA) (<1%) [10]. При этом два последних типа считаются предшественниками рака. Гиперпластические образования обычно не превышают в размерах 5 мм и не нарушают регулярность и структуру крипт, а расположены преимущественно в дистальных отделах кишечника. SSL характеризуются нарушением архитектуры крипты, размер составляет 5–7 мм, а располагаются они в проксимальных отделах кишечника. Значительно реже встречающиеся TSA обычно превышают в размерах SSL и имеют характерный вилезный исчерченный рисунок. Зубчатые образования обычно сидячие, что затрудняет их диагностику.

Считается, что механизм образования зубчатых полипов и их последующей малигнизации включает ряд последовательных мутаций. Первой из них является усиление функции BRAF-мутации, приводящей к обширному метилированию CpG островков, что в свою очередь приводит к блокировке различных генов, в том числе подавляющих опухолеобразование. Большая часть развившихся в результате этих процессов опухолей толстой кишки характеризуется микросателлитной нестабильностью (MSI). Появляющиеся в результате гиперметилирования мутации приводят к активации внутриклеточного сигнального пути, как и в случае последовательной малигнизации аденомы. Однако в отличие от последовательной малигнизации аденомы, где активация пути происходит за счет мутаций в гене APC (>90%), в случае зубчатых образований обычно происходят мутации в RNF43-ZNRF3 комплексе. Описанный выше путь наиболее характерен для SSL образований. Для TSA образований первичной наряду с BRAF может быть и мутация KRAS, в этом случае гиперметилирования не происходит, а в развившемся раке не наблюдается MSI [11]. Интересно, что KRAS, являясь ключевым элементом альтернативного пути и активатором BRAF, демонстрирует различие в механизмах онкогенеза при этих двух мутациях [12]. При мутациях KRAS не наблюдается гиперметилирования CpG островков, микросателлитной нестабильности, и вследствие этого общее количество мутаций в образованиях, развивающихся по пути, аденома-карцинома, в среднем меньше, чем при зубчатом пути.

Кроме двух упомянутых выше путей существуют наследственные синдромы, приводящие к колоректальному раку, включающие герминальную мутацию в гене APC

(наследственный аденоматозный полипоз) и синдром Линча. Однако настоящая работа посвящена именно исследованию спорадического колоректального рака. Близнецовые исследования показали, что роль окружающей среды, преимущественно, особенности диеты, малоподвижный образ жизни, наличие кариозных зубов, гипопродукция соляной кислоты, преобладание в рационе красного мяса, превалируют над наследственными факторами в патогенезе спорадического колоректального рака [13]. В последнее время активно изучается роль микробиоты в развитии колоректального рака, в обиход введены термины «канцерогенный микробиом» и «орализация кишечного микробиома». Рассмотрим далее механизмы влияния микробиома на развитие рака ободочной и прямой кишки.

В настоящее время проведено множество исследований по сравнению кишечного микробиома людей с КРР и людей, не имеющих данного заболевания; мета-анализы и обзоры показывают, что ряд наиболее выраженных ассоциаций консистентен для разных популяций [14–15]. Ряд исследований включает в себя не только людей с развившимся раком, но и с начальными стадиями рака, что позволяет разделить микроорганизмы, ассоциированные с болезнью на так называемых «драйверов» (ассоциированных с ранними стадиями и предположительно каузальных) и «пассажира» [16]. Среди микроорганизмов, ассоциированных с ранними предраковыми образованиями, наблюдаются бактерии, типичные скорее для ротовой полости, чем для кишечника [17]. Исследования предраковых образований особенно важны, так как они могут пролить свет на неизвестные в настоящий момент механизмы влияния микробиоты на развитие CRC, а также предоставить информацию для разработки новых методов терапии и диагностики. Однако при этом остается малоисследованным микробиом предраковых образований с учетом их типа и локализации [18]. В настоящем исследовании мы проводим комплексный анализ микробиома первой российской когорты пациентов с предраковыми образованиями, используя образцы стула и биопсии. Цель исследования — выяснить, как микробиом отличается в новообразованиях различного типа, локализации и с разным риском малигнизации (который может быть оценен через размер полипа).

Материал и методы

Для эндоскопического исследования использовались видеокOLONоскопы EVIS EXERA III CF-H190,185,180 серии Olympus Co., EC-690 WM и EC-600WM (Fujifilm Co.). Хорошая подготовка определялась как оценка ≥ 6 по бостонской шкале. Время выведения эндоскопа определялось от слепой кишки до анального края, выражалось в секундах и рассчитывалось на колоноскопиях без патологических изменений.

В исследовании принимали участие 25 человек, каждый человек предоставил самостоятельно собранный образец стула. Образец биопсии получали при эндоскопическом исследовании при помощи стерильной цитологической щетки.

Все пациенты подписали информированное согласие об участии в исследовании.

Критерии включения/исключения

Исключения: антибиотики менее 3-х месяцев назад.

В ходе исследования была собрана следующая информация о пациентах:

- пол, возраст, индекс массы тела;
- статус курения;
- локализация образования;
- морфологическая характеристика образования;
- количество образований;
- размер образования;
- клиническая картина (наличие запоров, дегтеобразного стула, кровянистых выделений);
- анализ на наличие мутаций KRAS, NRAS and BRAF.

Пробоподготовка и секвенирование

Выделение ДНК из образцов кала проводилось с использованием набора Qiagen Power Fecal PRO в соответствии с инструкцией производителя. Амплификацию переменного участка V4 гена 16S рПНК проводили с использованием следующей системы праймеров: модификация 515 F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3' [19] и Pro-mod-805 R (5'-GACTACNVGGGTTCTAATCC-3') [20]. Второй раунд амплификации проводился с использованием стандартных индексов Illumina с адаптерами. Оба раунда ПЦР проводились с использованием ПЦР буфера производства Евроген и амплификатора Bio-Rad CFX-96. Очистку ПЦР продуктов проводили с помощью набора для выделения ДНК реакционных смесей Cleanup Mini (Евроген). Концентрацию ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit® (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. Очищенные ампликоны смешивали эквимольно в соответствии с полученными концентрациями. Дальнейшая подготовка образца к секвенированию и секвенирование пулированной библиотеки осуществляли с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (500 циклов) и прибора MiSeq (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя. Первичная обработка (экстракция баркодов) была проведена как описано ранее [21]. После обрезания по баллу качества объединение ДНК-прочтений (ридов) проводилось с помощью пакета SeqPrep; итоговая длина ридов составила 252 пн.

Предобработка и первичный анализ данных

Для каждого образца было получено не менее 3000 ридов на образец. В процессе секвенирования совмест-

но с образцами каждой партии был отсекарован образец отрицательного контроля; риды, с высокой вероятностью соответствующие бактериям-контаминантам, найденные в отрицательном контроле, были удалены из файлов реальных образцов. Далее данные были проанализированы с помощью аналитической системы Кномикс-Биота (22); в том числе, были осуществлены: базовая фильтрация и оценка качества данных, профилирование таксономического состава, визуализация, сопоставление состава с метаданными. Кратко основные шаги анализа описаны ниже.

В процессе секвенирования совместно с образцами был отсекарован образец отрицательного контроля; риды, с высокой вероятностью соответствующие бактериям-контаминантам, найденные в отрицательном контроле, а также известные контаминанты были удалены из файлов реальных образцов (см. дополнительную таблицу 1). Сырые риды были предварительно обработаны с использованием программного пакета QIIME v2 [23]. В первую очередь была проведена фильтрация ридов с помощью алгоритма DADA2 [24] для получения представленности характерных последовательностей ASV (amplicon sequence variant). Далее проводилась таксономическая классификация этих последовательностей с использованием классификатора, реализованного в программном пакете QIIME2 [25] и обученного по базе SILVA v.138 [26], предварительно обработанной с помощью RESCRIPt [27]. Последовательности базы 16S были обрезаны в соответствии с использованными праймерами (515F/806R) и агрегированы с порогом сходства 99 %.

Полученные представленности характерных последовательностей были переданы в алгоритм PICRUSt2 [28], представленность метаболических путей и модулей оценивалась по базам KEGG [29] и MetaCyc [30].

Для анализа альфа разнообразия таблицы представленности на уровне родов были прорежены до 2700 ридов на образец. Альфа разнообразие было оценено по метрике Шеннона и Chao1. Таблицы представленности на уровнях вида, рода, семейства и т. д. были получены путем суммирования представленности характерных последовательностей, принадлежащих соответствующей таксономической группе. Расстояние между образцами было оценено на уровне бактериальных родов с использованием меры расстояния Айчитсона.

Статистический анализ данных

В связи с небольшим количеством образцов нами была проведена агрегация уровней для ряда параметров метаданных. В таблице 1 приведены исследованные параметры и уровни, по которым проводилась агрегация. Предположительный путь был определен на основе информации о мутациях, макроскопических характеристиках и гистологии.

Таблица 1.
 Параметры метаданных и агрегация значений параметров

Параметры	Категории до объединения (количество пациентов)	Категории после объединения (количество пациентов)
Локализация	Слепая кишка (2) Восходящая ободочная кишка (5) Поперечно-ободочная кишка (2)	Правые отделы (9)
	Нисходящая ободочная кишка (1) Сигмовидная кишка (12) Прямая кишка (2)	Левые отделы (15)
Макроскопическая характеристика	0-1s (18)	Сидячие (18)
	0-1p (2) 0-1sp (4)	на ножке/смешанный (6)
NICE категория	1 (7) 2 (15) 3 (2)	(7) (17)
Количество образований	1 (14) 2 (9) 5 (1)	(14) (10)
Размер образований	меньше, чем 5 мм (7) 6–9 мм (8)	меньше, чем 10 мм (15)
	10–14 мм (3) 15–19 мм (3) Больше 20 мм (3)	больше или равно 10 мм (9)
Гистология	Гиперпластический полип (5)	Полип (5)
	Сидячий зубчатый полип с дисплазией низкой степени выраженности (8) Аденома с дисплазией высокой степени (2) Аденома с дисплазией низкой степени (8) Высокодифференцированная аденокарцинома (1)	Аденома/Сидячий зубчатый полип/аденокарцинома (19)
Предполагаемый путь	Последовательность аденома-карцинома (12) Зубчатый (12)	
Kras-мутация	Да (8) Нет (16)	
Braf-мутация	Да (9) Нет (15)	
Nras-мутация *	Да (3) Нет (21)	

* — не был включен в анализ данных из-за небольшого числа случаев в одной из категорий

Поиск ассоциаций между составом микробиома, оцененным по стулу или биопсии и измеренными параметрами (см. табл. 1), проводился также на уровне бета разнообразия, альфа разнообразия, представленности отдельных таксонов, а также метаболических путей. Вклад параметров в вариацию состава сообщества оценивался по методу PERMANOVA с использованием расстояния Айчитсона (импутирование нулей производилось методом smultrepl). Связь между метаданными и разнообразием сообщества оценивалась с помощью линейной регрессии. Как для анализа альфа, так и бета разнообразия применялась поправка на множественное тестирование методом Бенджамини-Хохберга. Ассоциации с представленностью отдельных таксонов были проанализированы с помощью алгоритма selbal. Во внимание принимались результаты, показывающие воспроизводимость выше 50 % и AUC>0.7 для категориальных факторов или же воспроизводимость > 50 % и R2>0.2 для непрерывных факторов. Анализ проводился на таксономических уровнях от типа до вида.

Результаты и обсуждение

По результатам секвенирования для всех образцов было получено более 2700 видов после деноезинга [31]. В среднем различия между микробными сообществами, полученными методами биопсии и забора образца стула для одного индивида (расстояние Айчитсона 30.6 ± 3.94) были выше меж индивидуальных различий между образцами, собранными каждым методом в отдельности (для стула 25.2 ± 3.4 , для биопсии 22.7 ± 2.9) (рисунок {beta}, тест Манна-Уитни, $p < 0.05$).

Результаты оценки альфа-разнообразия для образцов, полученных с помощью биопсии и забора стула, зависели от выбранной метрики альфа-разнообразия. При использовании индекса Шеннона, позволяющего оценить богатство и ровность сообщества, наблюдалось повышенное разнообразие в образцах стула (парный тест Вилкоксона $p=0.0002$, рисунок {beta B, C}). При использовании же индекса chao1, представляющего собой оценку богатства сообщества, значимой зависимости не наблюдалось (рисунок {beta D, E}). Также в случае использования индекса chao1 внутрigrupповая вариация для образцов биопсии была выше, чем для образцов стула (тест Levene, $p=0.0914$).

Различия между двумя методами на уровне таксонов были также достаточно выражены. Мы проанализировали их с помощью алгоритма Selbal, а также метода поиска ближайшего баланса (NB) на уровне родов. Несмотря на то, что оба метода показали близкое к 1 значение AUC в результате кросс-валидации (0.86 ± 0.10 для selbal и 1.00 ± 0.00 для NB), воспроизводимость отдельных таксонов в балансах для Selbal не превышала 50 %. Это, вероятно, связано с тем, что высокая предсказательная

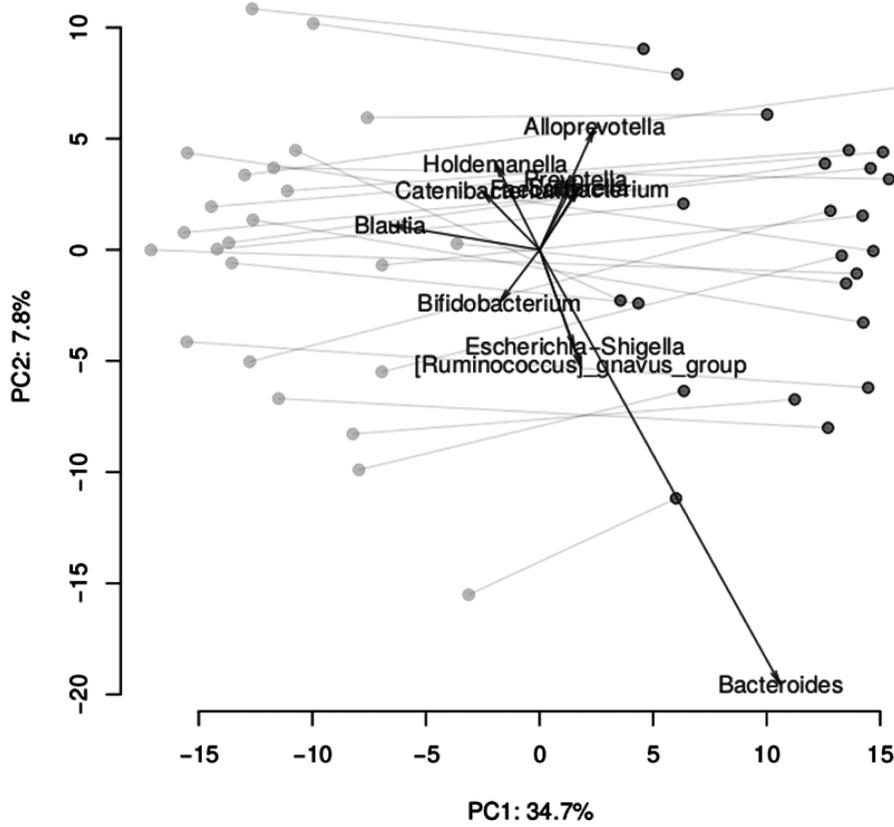


Рис. 1. Оценка Альфа разнообразия образцов стула

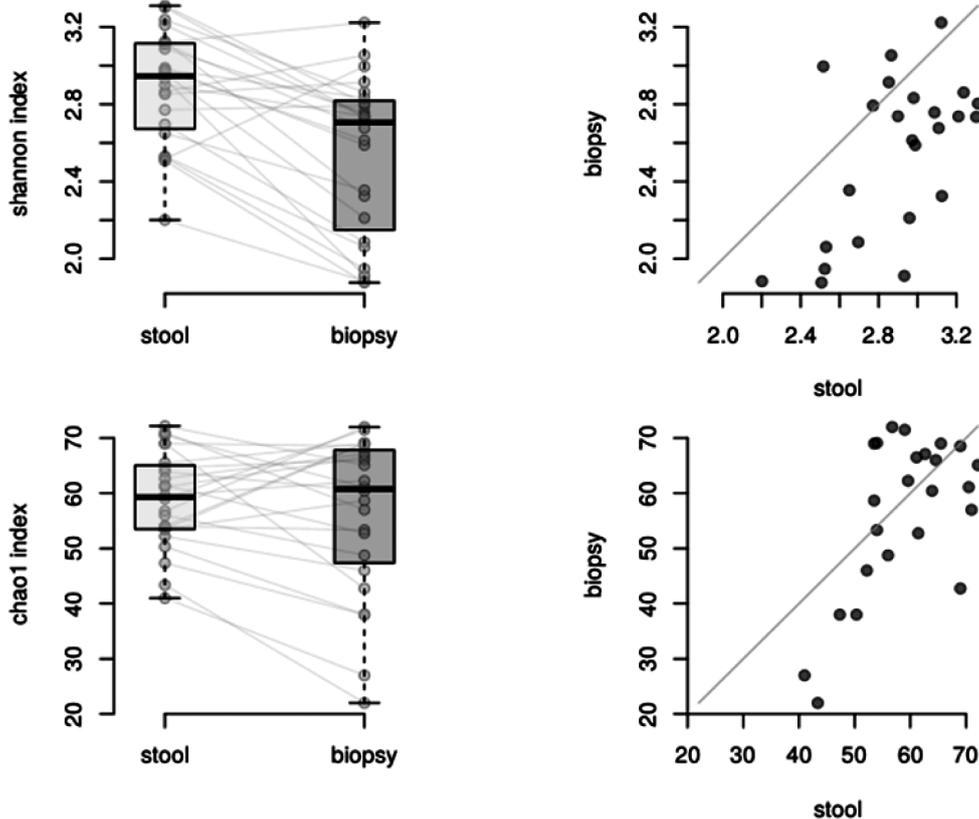


Рис. 2. Различия состава микробного сообщества между образцами стула и биопсии. Сравнение общего состава образцов методом PcoA (Principal Coordinates Analysis). В, С — Сравнение альфа-разнообразия образцов стула и биопсии по метрике Shannon. D, E — Сравнение альфа-разнообразия образцов стула и биопсии по метрике Chao1

сила достигалась уже при наличии двух таксонов в балансе, что и было выбрано алгоритмом как оптимальный размер баланса, в то время как ассоциированных таксонов было значительно больше. В методе NB не накладываются ограничения на размер баланса, с помощью данного метода было найдено 19 воспроизводимых таксонов (консистентно включенных более чем в 90 % балансов по результатам кросс-валидации), ассоциированных с образцами биопсии (числитель баланса) и 26 таксонов, ассоциированных с образцами стула (знаменатель баланса).

Интересно, что образцы биопсии характеризовались повышенной представленностью *Fusobacterium*. Также среди маркеров биопсии были некоторые бактерии, которые были больше похожи на контаминантов.

Зависимость между характеристиками образований и микробиомом

Наибольший процент объясненной вариации для образцов биопсии приходился на количество образований (1.4 %), наличие мутации в гене *Kras* (1.4 %) и локализацию (1.2 %); для стула — мутацию в гене *Braf* (1.2 %), балл по шкале NICE (1.1 %) и мутацию в гене *Kras* (1.1 %). Для альфа-разнообразия также не было найдено значимых ассоциаций.

Анализ на уровне со-представленных групп микроорганизмов в духе композиционного подхода также не выявил значимых ассоциаций.

Анализ на уровне балансов бактерий с помощью алгоритма *selbal* выявил несколько воспроизводимых (воспроизводимость > 70 %) ассоциаций, обладающих достаточно хорошей предсказательной силой ($AUC > 0.8$). Анализ был проведен на всех таксономических уровнях. Ассоциации были выявлены только для образцов биопсии:

- представленность [*Ruminococcus*] была ассоциирована с зубчатым путем канцерогенеза (воспроизводимость = 0.73, $AUC = 0.80 \pm 0.18$);
- представленность phylum *Fusobacteriota* была ассоциирована положительно с количеством образований (воспроизводимость = 0.90, $AUC = 0.81 \pm 0.17$);
- представленность phylum *Verrucomicrobiota* была ассоциирована положительно с количеством об-

разований (воспроизводимость = 0.77, $AUC = 0.81 \pm 0.17$).

Анализ методом ближайшего баланса не был проведен, так как не было выявлено значимых ассоциаций на уровне бета-разнообразия.

Анализ ассоциаций с помощью описанных выше методов выполнялся для таксонов с минимальной представленностью более 10 ридов более чем в 10 образцах. При этом многие таксоны, ранее ассоциированные с CRC, не прошли данный порог. В связи с этим мы проанализировали связь наличия таксонов, ранее ассоциированных с CRC, с исследуемыми характеристиками с помощью теста Фишера.

Среди данных таксонов были выделены: *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Parvimonas*, *Solobacterium*, *Gemella*, *Atopobium*, *Actinomyces*, *Desulfovibrio*, *Phascolarctobacterium*, *Streptococcus*, *Bilophila*.

Заключение

Исследование продемонстрировало, что морфологический тип образования и его потенциал тесно коррелирует с кишечным микробиомом. По нашему мнению, необходимо селективно выделять группы риска на основании анамнеза, канцерогенности кишечного микробиома, факторов риска, включающих курение, злоупотребление алкоголем, малоподвижный образ жизни, атрофический гастрит 3–4 степени по OLGA/OLGIM, состояние после аппендэктомии, холецистэктомии и бариатрические операции со сроком давности более 20 лет, стоматиты, пародонтозы, кариозные зубы. Необходимо проведение скрининга колоректального рака данным группам риска с 45 лет; помимо этого, необходимо создание централизованного биобанка российской популяции пациентов и изучение возможности коррекции микробиома с целью профилактики рецидивов, мультицентрических форм рака толстой кишки. Данные были подтверждены независимо от наличия у этих лиц личного или семейного анамнеза полипов или рака. Анализ микробных ассоциаций у пациентов с колоректальным раком является новым направлением медицинской науки и видится крайне перспективным направлением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *C.A. Cancer, J. Clin.* 2021 Jan;71(1):7–33. doi: 10.3322/caac.21654. Epub 2021 Jan 12. Erratum in: *C.A. Cancer, J. Clin.* 2021 Jul;71(4):359. doi: 10.3322/caac.21669. PMID: 33433946.
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *C.A. Cancer, J. Clin.* 2021 May;71(3):209–249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
3. Pickhardt P.J., Pooler B.D., Kim D.H., Hassan C., Matkowskyj K.A., Halberg R.B. The Natural History of Colorectal Polyps: Overview of Predictive Static and Dynamic Features. *Gastroenterol Clin North Am.* 2018 Sep;47(3):515–536. doi: 10.1016/j.gtc.2018.04.004. Epub 2018 Jun 29. PMID: 30115435; PMCID: PMC6100796.

4. Liu C., Li Z., Ding J., Zhen H., Fang M. & Nie C. (2021). Species-level analysis of the human gut microbiome shows antibiotic resistance genes associated with colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*, 12, 765291.
5. Fearon E.R., & Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767.
6. Armaghany T., Wilson J.D., Chu Q., & Mills G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research: GCR*, 5(1), 19.
7. Armaghany T., Wilson J.D., Chu Q., & Mills G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research: GCR*, 5(1), 19.
8. Crockett S.D., & Nagtegaal D. (2019). Terminology, molecular features, epidemiology, and management of serrated colorectal neoplasia. *Gastroenterology*, 157(4), 949–966.
9. Szyłberg Ł., Janiczek M., Popiel A., & Marszałek A. (2015). Serrated polyps and their alternative pathway to the colorectal cancer: a systematic review. *Gastroenterology research and practice*, 2015(1), 573814.
10. Crockett S.D., & Nagtegaal D. (2019). Terminology, molecular features, epidemiology, and management of serrated colorectal neoplasia. *Gastroenterology*, 157(4), 949–966.
11. Morkel M., Riemer P., Bläker H., & Sers C. (2015). Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget*, 6(25), 20785.
12. Morkel M., Riemer P., Bläker H., Sers C. Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget*. 2015 Aug 28;6(25):20785–800. doi: 10.18632/oncotarget.4750. PMID: 26299805; PMCID: PMC4673229.
13. Hu H., Kang L., Zhang J., Wu Z., Wang H., Huang M., ... & Deng, Y. (2022). Neoadjuvant PD-1 blockade with toripalimab, with or without celecoxib, in mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high, locally advanced, colorectal cancer (PICC): a single-centre, parallel-group, non-comparative, randomised, phase 2 trial. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 7(1), 38–48.
14. Wirbel J., Pyl P.T., Kartal E., Zych K., Kashani A., Milanese A., ... & Zeller, G. (2019). Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nature medicine*, 25(4), 679–689.
15. Dai Z., Coker O.O., Nakatsu G., Wu W.K.K., Zhao L., Chen Z., Chan F.K.L., Kristiansen K., Sung J.J.Y., Wong S.H., Yu J. Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. *Microbiome*. 2018 Apr 11;6(1):70. doi: 10.1186/s40168-018-0451-2. PMID: 29642940; PMCID: PMC5896039.
16. Tjalsma H., Boleij A., Marchesi J.R., & Dutilh B.E. (2012). A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 575–582.
17. Yachida S., Mizutani S., Shiroma H., Shiba S., Nakajima T., Sakamoto T., Watanabe H., Masuda K., Nishimoto Y., Kubo M., Hosoda F., Rokutan H., Matsumoto M., Takamaru H., Yamada M., Matsuda T., Iwasaki M., Yamaji T., Yachida T., Soga T., Kurokawa K., Toyoda A., Ogura Y., Hayashi T., Hatakeyama M., Nakagama H., Saito Y., Fukuda S., Shibata T., Yamada T. Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. *Nat Med*. 2019 Jun;25(6):968–976. doi: 10.1038/s41591-019-0458-7. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31171880.
18. DeDecker L., Coppedge B., Avelar-Barragan J., Karnes W., Whiteson K. Microbiome distinctions between the CRC carcinogenic pathways. *Gut Microbes*. 2021 Jan-Dec;13(1):1854641. doi: 10.1080/19490976.2020.1854641. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33446008; PMCID: PMC8288036.
19. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., ... & Andersson A.F. (2014). DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, 80(16), 5116–5123.
20. Schellerer V.S., Langheinrich M.C., Zver V., Grützmann R., Stürzl M., Gefeller O., Naschberger E., & Merkel S. (2019). Soluble intercellular adhesion molecule-1 is a prognostic marker in colorectal carcinoma. *International journal of colorectal disease*, 34(2), 309–317. <https://doi.org/10.1007/s00384-018-3198-0>
21. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M. & Ravel J. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, 2, 1–7.
22. Efimova D., Tyakht A., Popenko A., Vasilyev A., Altukhov I., Dovidchenko N., ... & Alexeev D. (2018). Knomics-Biota—a system for exploratory analysis of human gut microbiota data. *BioData mining*, 11, 1–7.
23. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., ... & Caporaso J.G. (2019). Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852–857.
24. Callahan B.J., Sankaran K., Fukuyama J.A., McMurdie P.J., & Holmes S.P. (2016). Bioconductor workflow for microbiome data analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research*, 5.
25. Bokulich N.A., Maldonado J., Kang D. W., Krajmalnik-Brown, R. & Caporaso J.G. (2019). Rapidly processed stool swabs approximate stool microbiota profiles. *Msphere*, 4(2), 10–1128.
26. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., & Glöckner F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1–e1.
27. Romanov V.A., Karasev I.A., Klimenko N.S., Koshechkin S.I., Tyakht A.V., & Malikhova O.A. (2022). Luminal and tumor-associated gut microbiome features linked to precancerous lesions malignancy risk: a compositional approach. *Cancers*, 14(21), 5207.
28. Douglas G.M., Maffei V.J., Zaneveld J.R., Yurgel S.N., Brown J.R., Taylor C.M., Huttenhower C. & Langille M.G.I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature biotechnology*, 38(6), 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
29. Kanehisa M. & Goto S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27–30.
30. Caspi R., Billington R., Fulcher C.A., Keseler I.M., Kothari A., Krummenacker M. ... & Karp P.D. (2018). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic acids research*, 46(D1), D633–D639.
31. Efimova D., Tyakht A., Popenko A., Vasilyev A., Altukhov I., Dovidchenko N., Odintsova V., Klimenko N., Loshkarev R., Pashkova M., Elizarova A., Voroshilova V., Slavskii ., Pekov Y., Filipova E., Shashkova T., Levin E., Alexeev D. Knomics-Biota — a system for exploratory analysis of human gut microbiota data. *BioData Min*. 2018 Nov 6; 11:25. doi: 10.1186/s13040-018-0187-3. PMID: 30450127; PMCID: PMC6220475.

© Карасев Иван Александрович (Ronc-karasev@yandex.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»