

МИКРОБИОМ И *in vitro* МОДЕЛИ КИШЕЧНИКА

© 2023 г. Д. М. Хушпульян^{1, 2, *}, С. В. Никулин²,
А. А. Захарянц^{2, 3}, С. С. Савин⁴, В. И. Тишков^{1, 4, **}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, 117418 Россия

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

⁴Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: hushpulian@gmail.com

**e-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 28.09.2023 г.

После доработки 16.10.2023 г.

Принята к публикации 05.11.2023 г.

В обзоре рассмотрена роль микробиоты в поддержании здоровья и современное состояние исследований по микробиому человека с фокусом на разработку и перспективы применения современных методологических подходов, таких как технология “кишечник-на-чипе”. Обсуждается связь микробиома и метаболомики, а также основные результаты международных проектов по микробиому человека. Отмечены ограничения как культуральных, так и чисто генетических подходов (метагеномика) к изучению банка образцов микробиоты. Центральное место уделено сравнению различных моделей кишечника, приведены аргументы в пользу использования подхода, основанного на применении микрофлюидных биочипов. В заключении кратко обсуждаются регуляторные аспекты практического внедрения микрочипов в разработку лекарственных средств и персонализированную медицину.

Ключевые слова: микробиом, сокультивирование, *in vitro* модели кишечника, микрофлюидика

DOI: 10.56304/S0234275823050071

ВВЕДЕНИЕ

Кишечная микрофлора, или микробиота, играет фундаментальную роль в здоровье человека, регулируя такие важные функции, как защита от повреждения клеточного эпителия кишечника, отложение жиров и стимулирование кишечного ангиогенеза. В кишечнике присутствует порядка 10^{14} (более 1000 видов) бактерий, а также грибы, вирусы и простейшие. На сегодняшний день изучена только треть этих микроорганизмов [1–4].

Специфика симбиоза микроорганизмов в кишечнике человека отражает непрерывное влияние окружающих факторов на организм хозяина.

Список сокращений: ЛОС — летучие органические соединения; ПДМС — полидиметилсилоксан; СРК — синдром раздраженного кишечника; ЭАП — эндогенные антимикробные пептиды; FOBT (fecal occult blood test) — тест на скрытую кровь в кале; SFB (segmented filamentous bacteria) — филаментная (нитчатая) бактерия; TEER (transepithelial electrical resistance) — трансэпителиальное электрическое сопротивление.

У взрослых доминируют такие типы бактерий, как Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria и Actinobacteria [5]. Микробиота достаточно стабильна и, как показано в клинических исследованиях, способна к восстановлению исходного состояния после терапии антибиотиками [6]. Данный факт объясняется тем, что бокаловидные клетки кишечника (клетки Гоблета, Goblet cells) секретируют высокомолекулярные гликопротеины, известные как муцины (от лат. *mucus* — слизь), образующие своего рода физический барьер, защищающий клетки кишечника, а также наличием в кишечнике так называемых крипт (рис. 1), в том числе и аппендикса. В глубине крипты находятся только бактерии, способные пройти через слизь и сформировать там устойчивые колонии, непосредственно взаимодействующие с клетками эпителия, и при этом не погибнуть в результате атаки иммунной системы (клетки кишечника ежедневно вырабатывают порядка 3–6 г IgA) [7]. Таким образом, подобные “ответвления” служат хранили-

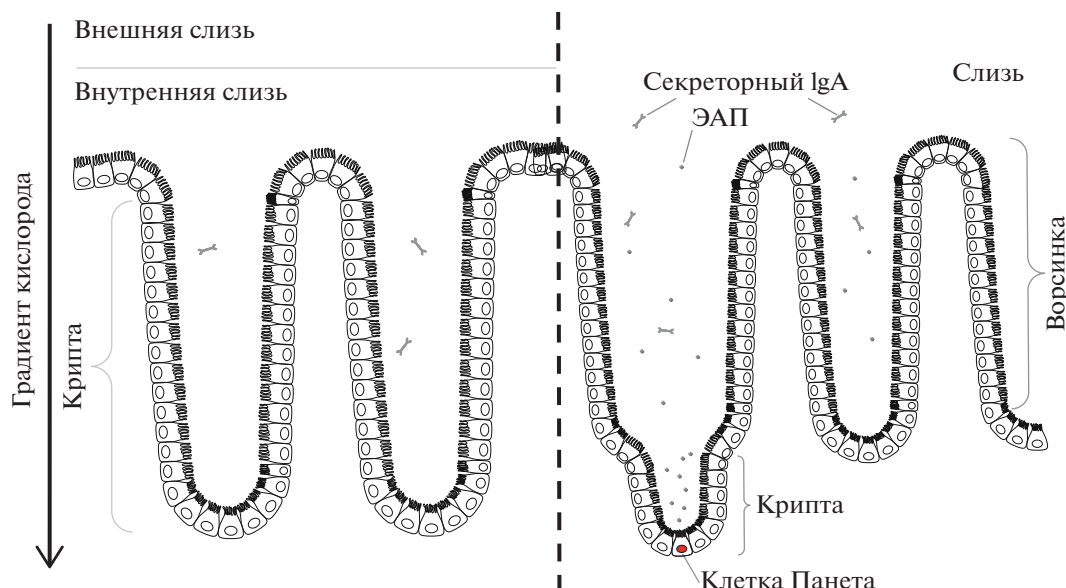


Рис. 1. Слои слизи в толстой (слева) и тонкой (справа) кишке. ЭАП — эндогенные антимикробные пептиды.
Fig. 1. Mucus layers in the large (left) and small (right) intestine. EAPs are endogenous antimicrobial peptides.

шем бактерий-комменсалов в случае терапии антибиотиками или других химических воздействий.

В тонкой кишке также есть специальные клетки, обеспечивающие выделение катионных пептидов — альфа-дефензинов, — которые могут формировать поры в мембранах атакуемых клеток. Благодаря распространенности отрицательных ионов на мембранах бактерий в противовес более положительно заряженным клеткам человека, дефензины выполняют свою функцию, не повреждая органы хозяина. Градиент кислорода в просвете кишечника и около стенок влияет на распределение анаэробных и аэробных бактерий [8, 9].

Экспериментально показано, что повреждение слизистого барьера и воспаление связано с высокой концентрацией флагеллина — главного белка бактериальных жгутиков. Флагеллин представляет собой лиганд Toll-подобного рецептора-5 (TLR5). Бактериальная подвижность в кишечнике, как правило, ограничена иммуногенностью флагеллина и вязкостью слизи, которая ограничивает передвижение бактерий [8]. Тем не менее шансы добраться до тканей хозяина для таких микроорганизмов, как *Salmonella*, зависят от жгутиков и хемотаксиса. Напротив, у клеток *Escherichia coli* развита альтернативная стратегия: они секретируют сериновую протеазу, которая быстро разлагает слизь. А у *Proteobacteria* для этого есть пептидаза M60 [9].

АДГЕЗИЯ БАКТЕРИЙ

Адгезивными свойствами характеризуются как представители нормальной микрофлоры, так и

патогенные микроорганизмы. Благодаря адгезии резидентная микрофлора препятствует заселению кишечника патогенными микроорганизмами. А для последних адгезия — первый шаг на пути образования резистентных биопленок, объединившись в которые микробы приобретают повышенную устойчивость к действию иммунной системы и антибиотикам. Таким образом, молекулярные механизмы адгезии универсальны как для комменсалов, так и для патогенных видов. Это, как правило, селективное лиганд–рецепторное взаимодействие специфических внеклеточных белков, капсул, лектинов, адгезинов и фимбрии (пили) с белками и липидами кишечника.

Например, у бактерии *Helicobacter*, обитающей в желудке и тонком кишечнике, развито взаимодействие с поверхностными гликанами эпителия [10, 11]. В качестве примеров различного механизма связывания можно привести патоген *Vibrio cholera* (штамм O395), который формирует токсинрегулируемый слой клеток, прикрепляющийся к эпителию тонкой кишки [12]. Кроме того, холерные вибрионы штаммов O1 и O139 прикрепляются к слизи с помощью внеклеточного белка, связывающего N-ацетил-D-глюкозамин [13].

Клетки *E. coli* обладают большим разнообразием лектинов, связывающихся как со слизью, так и с гликопротеинами, а также внеклеточными компонентами эпителиальных клеток [14]. Недавно на слое клеток кишечного эпителия *in vitro* культивировали сегментированную филаментную (нитчатую) бактерию (segmented filamentous bacteria, SFB) *Candidatus savagella*, хотя механизм ее прикрепления к эпителию пока не выяснен [15].

Клетки грамположительной бактерии *Listeria* экспрессируют поверхностный белок, так называемый интерналин А, который сначала связывается с эпителиальным кадгерином, а затем взаимодействует с актином, тем самым индуцируя фагоцитоз [16].

Бактерии-комменсалы прикрепляются к слизи и эпителию аналогичными способами, занимая сайты связывания патогенов и тем самым блокируя их прикрепление. Так, D. Savage [17] и M. Morotomi с соавт. [18] показали, что бактерии *Lactobacillus*, образуя связанный с эпителием слой клеток, предотвращают прикрепление к эпителию дрожжей и стафилококков. F. Turgoni с соавт. [19] описали аналогичные механизмы для бактерии *Bifidobacterium bifidum*, которая использует пили для связывания с белками внеклеточного матрикса эпителия.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА МИКРОБИОТЫ

Бактерии, связавшись со слизистой кишечника, остаются там только в том случае, если не вызывают иммунный ответ хозяина. В слизи содержится много секреторного иммуноглобулина А (sIgA), который находится в форме димера и связывается с чужеродными для хозяина компонентами, в том числе бактериями. sIgA устойчив к действию протеолитических ферментов и, в отличие от IgG, не является спутником воспаления, а, наоборот, связывает антигены на поверхности слизистой оболочки и препятствует их проникновению, предотвращая дальнейшее воспаление. Связывание sIgA с клетками-комменсалами приводит к образованию биопленки, которая служит барьером для патогенов. Таким образом, с помощью этого механизма sIgA регулирует гомеостаз между хозяином и микробиотой, как и между хозяином и потенциальными патогенами на поверхности слизистых оболочек.

Альтернативное мнение состоит в том, что иммунная система не запрограммирована четко распознавать симбионты, а скорее всего, некоторые виды просто приспособились не индуцировать сильный иммунный ответ. Некоторые бактерии, например *Bacteroides fragilis*, научились подавать и использовать обратные сигналы иммунной системы хозяина [20]. Компонент их капсулы, полисахарид А, через “посредника” подает сигнал в антигенпрезентирующую клетку и стимулирует экспрессию интерлейкина-10 Т-клеткой. Появление противовоспалительных клеток, вырабатывающихся в ответ на этот сигналинг, облегчает прохождение *Bacteroides fragilis* через слой слизи.

Похожим образом SFB стимулируют выработку Т-хелперных клеток [21]. И, как выяснилось недавно, SFB могут “тренировать” иммунитет:

вызывать сильный иммунный ответ за счет интенсивной стимуляции созревания Т- и В-клеток. Колонии этих бактерий способствуют созреванию лимфоидной ткани в слизистой кишечника, активируют медиаторы врожденного иммунитета в кишечнике. Кроме того, колонизация этими бактериями оказывает адъювантное действие на системный иммунный ответ [22].

Следует отметить, что не только комменсальные составляющие микробиоты кишечника функционируют как барьер для патогенов, но и условно-патогенные бактерии (например, *E. coli* и другие) являются неотъемлемой частью здоровой микробиоты, которая помимо барьерной выполняет и стимулирующую функцию.

МИКРОБИОМ И БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

Распределение микробов в кишечнике способствует развитию и стабильности микробного сообщества, поскольку пространственно разделенные ниши увеличивают диверсификацию видов. Частично развитие микробиоты может происходить от проксимальных к дистальным отделам, так как соответствует направлению потока фекалий. Такой поток, совместно с факторами внешней среды (инфекция, химикаты и т.п.), может физически удалить все компоненты микробиома и, как следствие, вызовет серьезные нарушения в организме. По-видимому, чтобы предотвратить такое развитие событий, в процессе эволюции появились защищенные резервуары, а именно крипты и аппендикс, который, кстати, ранее считали атавизмом. В работах D. Gevers с соавт. [23] и F. Rowan с соавт. [24] приведены прямые и косвенные доказательства положительного влияния обособленных резервуаров на микробиоту. Кроме того, известно, что состояние микробиоты влияет на течение воспалительных заболеваний кишечника, цирроза печени [23–25] и на развитие синдрома раздраженного кишечника (СРК) [26]. По результатам мета-анализа 13 клинических исследований по микрофлоре кишечника X. Zhuang с соавт. [27] пришли к выводу, что пациенты с СРК существенно отличаются от здоровых по количеству бактерий *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Faecalibacterium prausnitzii*. Кроме того, J. Beatty и др. [28] обнаружили негативное влияние инфекции *Giardia duodenalis*: помимо ранее известной активности провоцировать диарею, лямблии поддерживают длительный дисбиоз и последующее развитие СРК.

Кроме пробиотиков и лекарственных средств, обычно используемых для нормализации микрофлоры кишечника, известны и другие, пока еще не столь широко используемые подходы. Так, исследуют возможность трансплантации микробиоты здоровых доноров пациентам с нарушенной микрофлорой. В ряде клинических исследований показа-

но позитивное действие трансплантированной микробиоты на пациентов с СРК и с инфекцией *Clostridium difficile* в более 50% описанных случаев [29–31]. На сегодняшний день есть три способа трансплантации образцов здорового донора: i) через колоноскопию, ii) через назальную трубку, достигающую двенадцатиперстной кишки, iii) перорально с помощью кишечнорастворимой капсулы.

Полученные клинические данные за последнее десятилетие подтверждают важнейшую роль нарушений микробиоты в течении и развитии многих заболеваний [32]. Интересно, что выявлена прямая связь нарушений в микробиоме с риском развития различных нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера [33].

МЕТОДОЛОГИЯ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОМА

Сбор и экстракция образцов

В настоящее время для изучения микробиоты используют метагеномный анализ [3]. Для его проведения необходим набор отработанных воспроизводимых методик, позволяющих обеспечить точность и однозначную интерпретацию данных. Так, правильная экстракция ДНК из образцов фекалий или клеток кишечника — ключевые этапы пробоподготовки для анализа микрофлоры кишечника. В ряде исследований показано, что на выделение и последующий анализ ДНК оказывает влияние множество факторов. Установлено, что образцы для исследования скрытой крови в фекалиях хорошо сохраняются вплоть до четырех суток без замораживания; а в случае необходимости заморозки получают мазки и ДНК экстрагируют из них 70%-ным этанолом [34–36].

Метагеномика

Помимо изучения образцов бактерий напрямую, разработаны различные подходы, такие как библиотеки клонов, конечный полиморфизм длинных рестрикционных фрагментов (T-RFLP), количественная ПЦР (qPCR), анализ транскриптома и высокопроизводительное секвенирование. Заметим, что пиросеквенирование ампликонов 16S рРНК и секвенирование Illumina считаются надежными методами для изучения разнообразия геномов и различий в экспрессии генов микробного сообщества в кишечнике [3] и в полости рта [37]. Эти две технологические платформы не только ускорили метатранскриптомные исследования микробиома, но и вместе с банком метагеномных данных открыли новые возможности в понимании структурно-функциональных зависимостей в микробных сообществах. Более того, эти методы не требуют культивирования образцов и тем самым позволяют идентифицировать “некультивируемые” микроорганизмы (то есть,

для которых пока не разработаны условия культивирования) в составе микробиома.

Культуромика

Одно из основных ограничений метагеномных исследований относится к чувствительности метода, так как современные технологии не позволяют обнаруживать бактерии в концентрациях менее 10^5 клеток/г фекалий. Хотя с помощью метагеномики удается определять последовательности ДНК многих “некультивируемых” бактерий, для проведения дальнейших исследований необходимы жизнеспособные микроорганизмы в чистой культуре. Культуральные изоляты не только расширяют референтную базу геномных данных, но и позволяют идентифицировать новые гены и их функции, а также молекулярные мишени для разработки новых терапевтических средств. Так, J. Lagier с соавт. [38], используя 212 различных условий культивирования и времяпролетную масс-спектрометрию с матричноактивированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF-MS) для анализа полученных образцов, идентифицировали 340 видов бактерий, 5 грибов и один гигантский вирус в трех пробах фекалий. Эти важнейшие результаты послужили платформой к возрождению методов культивирования и развития таксономии для классификации новых бактерий [39].

Метабономика

Микробиота кишечника отвечает за такие метаболические функции, как биосинтез аминокислот, короткоцепочечных жирных кислот, незаменимых витаминов (например, К и В12), биотрансформацию и гидролиз желчных кислот, а также ферментацию неперевариваемых полисахаридов [40]. Метабономика включает широкомасштабное исследование низкомолекулярных продуктов метаболизма клеток, тканей, биологических жидкостей и организмов в целом в конкретный момент времени. Эта технология эффективна для “распутывания” сложных взаимодействий метаболитов кишечной микробиоты — метаболома. Сравнительные исследования метаболома микробиоты здоровых людей и пациентов с различными заболеваниями позволят выявить уникальные метаболиты, которые могут быть использованы в качестве диагностических или прогностических биомаркеров. Две основными технологии, которые используют в метаболомике, — это масс-спектрометрия (MS) и ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Эти спектральные методы характеризуются широким диапазоном подлежащих исследованию соединений, высокой чувствительностью и возможностью количественного анализа [41]. Используя этот подход, G. Le Gall и др. [42] продемонстрировали, что метаболомный профиль фе-

Таблица 1. Современные технологии, используемые для изучения микробиома человека
Table 1. Modern technologies used in the study of the human microbiome

Технология	Методы	Области применения
Метагеномика	– Библиотеки клонов – T-RFLP – qPCR – Транскриптомный анализ – Высокопроизводительное секвенирование – Метагеномный анализ	(1) Открытие новых видов, не культивированных ранее (2) Изучение структуры и функции микробных сообществ (3) Анализ разнообразия геномов и дифференциальной экспрессии генов микробных сообществ (4) Определение роли микробов в развитии заболевания
Культуромика	Различные условия культивирования биологических образцов и идентификация в них бактерий с использованием современных спектральных методов, в том числе MALDI-TOF-MS	(1) Выделение микроорганизмов из биологических образцов для последующего анализа (2) Расширение доступных баз эталонных геномов (3) Обнаружения новых генов/функций для возможного использования при разработке новых лекарственных средств
Метаболомика	Масс-спектрометрия, ЯМР	(1) Идентификация продуктов метаболизма в определенный промежуток времени (2) Изучение механизмов взаимодействия между метаболитами и кишечным микробиомом (3) Идентификация уникальной метаболической сигнатуры для диагностических/прогностических приложений

кальных экстрактов у пациентов с язвенным колитом при наличии и отсутствии СРК отличался от такового образцов, полученных от здоровых доноров. Обнаружено, что нарушенный микробный метаболизм при СРК приводит к увеличению уровня газообразного водорода, а также индола, фенолов и других соединений [43]. Летучие органические соединения (ЛОС) выделяются бактериями в качестве побочных продуктов метаболизма, которые могут быть определены с помощью твердофазной микроэкстракции с последующим газохроматографическим масс-спектрометрическим анализом (solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry method, SPME-GC-MS). Специфические микробные профили ЛОС можно рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров в диагностике конкретных заболеваний [44]. Современные подходы, используемые для изучения микробиома человека, кратко суммированы в табл. 1.

ПРОЕКТ “МИКРОБИОМ ЧЕЛОВЕКА” И ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В связи с накопившимися данными о важной роли микробиоты кишечника к началу XXI века в США было начато финансирование проекта “The Human Microbiome Project” (“Микробиом человека”) (<https://commonfund.nih.gov/hmp>). Этот проект — инициатива Национальных институтов здравоохранения США (NIH), направленная на лучшее

понимания микрофлоры человека и ее значения для здоровья и проблем, с ним связанных. Первая фаза запущенного в 2007 году проекта была сосредоточена на определении и характеристиках микрофлоры человека. Вторая фаза, известная как Integrative Human Microbiome Project (Интегративный проект “Микробиом человека”), началась в 2014 году с целью развития ресурсной базы для характеристики микробиома и выяснения роли микробов в состоянии здоровья человека. За период 2007–2016 гг. эта программа получила финансовую поддержку в размере 170 млн долларов США из общего фонда NIH. Основные результаты этих программных исследований описаны в ряде работ [14, 31, 45–58]. Обнаружены явные ассоциации между изменениями в микробиоме и псориазом, артритом, СРК и другими патологическими состояниями. Помимо этих работ следует отметить появление новых “дочерних” проектов: например, “Alzheimer Gut Microbiome project” (<https://alzheimergut.org/>). Несмотря на существенные инвестиции в проект, до определения “эталонного микробиома” еще очень далеко и многие ответы на поставленные вопросы до сих пор не получены. Главный результат проекта — крупнейшая база метаданных, которая легла в основу дальнейшего изучения взаимосвязи микробиома и различных заболеваний.

МОДЕЛИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ *in vitro**Сравнительная характеристика моделей*

Система совместного культивирования клеток кишечника и микробов *in vitro* имеет много преимуществ для раскрытия непосредственного участия бактерий в функционировании этого органа при условии, что система надежна и действительно имитирует пищеварительную экосистему. Ниже дано краткое описание недавно разработанных систем, которые позволяют совместно культивировать (анаэробные) кишечные бактерии и эпителиальные клетки (требующие кислорода).

Модели совместного культивирования Transwell® (Corning Inc., США) — пример систем, которые используют для изучения межклеточного взаимодействия. Такие системы совместного культивирования, по-видимому, особенно полезны для изучения взаимодействия между бактериями, иммунными клетками слизистой оболочки и эпителиальными клетками кишечника в статических условиях, причем, как правило, аэробных [59–61].

Модуль НМІ™ (LabMET, Бельгия) [62] представляет собой изготовленную на заказ систему совместного культивирования, состоящую из двух отсеков: “просветного”, содержащего кишечные бактерии, и “хозяина”, содержащего условные энтероциты (например, клетки Сасо-2). Важное отличие от вышеописанной системы совместного культивирования Transwell® состоит в том, что через эти два отсека идет непрерывный поток жидкости и отсеки разделены функциональным двойным слоем (полупроницаемой мембраной и искусственно добавленным слоем слизи).

Третья система, НохВан [63], нацелена на имитацию взаимодействий между хозяином и микроорганизмом, происходящих в кислородно-аноксической интерфазе кишки человека. Это система совместного культивирования *Bacteria anaerobic* и клеток Сасо-2 или DLD-1 (CCL-221™). В отличие от модели Transwell® и модуля НМІ™, система НохВан не требует специального (в том числе изготовленного на заказ) оборудования.

Четвертая, относительно недавно описанная аэробно–анаэробная система совместного культивирования, представляет собой модульное микрофлюидное устройство НуМіХ [64]. Этот “сэндвич” модульных эластомерных прокладок, расположенных между двумя поликарбонатными кожухами, позволяет сокультивировать клетки Сасо-2 и *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Пятая система, которая получила наибольшую популярность при изучении взаимодействия между хозяином и микроорганизмом, — это “кишечник-на-чипе” (“gut-on-a-chip”). В отличие от ранее описанных эта система до недавнего времени не получила широкого применения для совместного культивирования клеток человека со строго анаэ-

робными кишечными бактериями [65]. Это связано с тем, что технически поддержание анаэробных условий в системе затруднено. Тем не менее очень интересные результаты получены J. Barrila с соавт. [66] при совместном культивировании клеток Сасо-2 с толерантными к кислороду кишечными бактериями. Полученные авторами результаты важны для дальнейшего развития истинных аэробно–анаэробных систем совместного культивирования. Особенно следует отметить возможность проводить исследование симбиоза бактерий и клеток человека в течение продолжительного времени — до двух недель.

Детальное сравнение вышеописанных моделей приведено в табл. 2.

Как видно из табл. 2, система “кишечник-на-чипе” обладает рядом весомых преимуществ, что позволяет считать ее универсальной и эффективной моделью сокультивирования клеток бактерий и кишечника. Главное преимущество состоит в том, что открывается перспектива культивирования нескольких видов органоидов одновременно (например, ткань эпителия кишечника, клетки печени и нейрональные клетки), создавая приближенные к реальности модели различных заболеваний.

“Кишечник-на-чипе”: устройство и возможности применения

Разработка и внедрение микрофлюидных моделей “орган-на-чипе” (“organ-on-a-chip”) с тканями кишечника человека произвели в своем роде революцию в исследованиях кишечной физиологии и патофизиологии. Ранее совместное культивирование энтеральных бактерий с жизнеспособным эпителием более чем в течение 24 ч было невозможно. Более того, подобное было недостижимо даже для культур органоидов кишечника. Например, в формате двумерной клеточной культуры с однослойными клетками Сасо-2 невозможно воспроизвести физиологические условия в кишечнике (такие как уникальная морфология кишечной ткани с ворсинками и образующейся слизи), а также ключевые дифференцированные функции этого отдела желудочно-кишечного тракта, включая метаболизм лекарственных препаратов на основе цитохрома Р-450. Помимо указанных проблем, в этих моделях совместного культивирования все комменсальные бактерии быстро разрастаются и загрязняют культуры клеток человека. И только недавно, благодаря изобретению моделей микрофлюидных чипов органов кишечника человека, эти проблемы были преодолены [67].

Одно из самых ранних устройств “кишечник-на-чипе” было разработано Х. Ким (H. Kim) и ее коллегами под руководством Д. Ингбера (D. Ingber) [68]. Устройство представляло собой перистальтическую микрофлюидную двухканальную

Таблица 2. Характеристика и сравнение *in vitro* моделей кишечника
Table 2. Characterization and comparison of *in vitro* models of the intestine

Компоненты системы и условия культивирования	Transwell	Модуль НМІ	НохВан	HuMIX	“Кишечник-на-чипе”
Тип клеток	Сасо-2	Сасо-2	Сасо-2 DLD-1	Сасо-2	Сасо-2
Прямой контакт бактерий и клеток хозяина	Да	Нет	Да	Нет	Да
Слой слизи	Нет	Да (искусственно добавлена)	Да (искусственно добавлена)	Да (слой муцина)	Да (естественно экспрессируется)
Условия культивирования эпителиальных клеток	M199 + 10% FBS ^a	DMEM + 10% FBS	DMEM + 10% FBS	DMEM + 20% FBS	DMEM + 20% FBS
Условия культивирования бактериальных клеток	Анаэробная среда M199	Смешанный бактериальный бульон для SHIME ^b	УСFAG (анаэробный бульон <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)	Бескислородная среда DMEM	DMEM + 20% FBS
Возможная продолжительность сокультивирования	8 ч	48 ч	36 ч	24 ч	2 нед
Статичная модель или модель с потоком жидкости	Статичная	Поток 6.5 мл/мин	Статичная	Поток 25 мкл/мин	Поток 30 мкл/мин
Возможность стимуляции перистальтики	Нет	Нет	Нет	Нет	Да
Сокультивирование со строгими анаэробами	Да	Да	Да	Да	Да
Смешанные бактериальные культуры	Нет	Да	Нет	Да	Да
Комбинирование с другими клетками человека	Нет	Нет	Нет	Да	Да
Анализ функции эпителиального барьера ^c	Да (TEER, IF-окрашивание и др.)	Да (диффузия FITC-декстрана)	Да (окрашивание)	Да (специальное TEER-устройство)	Да (TEER)
Модель заболевания	Нет	Нет	Да	Нет	Да

Примечание: ^a FBS (fetal bovine serum) – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота; ^b SHIME® (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem) – стимулятор микрофлоры кишечника человека; ^c TEER (trans epithelial electrical resistance) – трансэпителиальное электрическое сопротивление, IF – иммунофлуоресценция.
Note: ^a FBS – fetal bovine serum; ^b SHIME® – Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem; ^c TEER – trans epithelial electrical resistance; IF – immunofluorescence.

модель кишечного чипа и включало пористую гибкую мембрану, служащую каркасом для эпителиальных клеток кишечника. Прибор имитировал динамику (перистальтику), структуру и физиологические функции (абсорбция и транспорт) кишечника человека и был пригоден для культивирования не только клеток кишечника человека, но и эндотелиальных клеток капилляров, иммунных клеток и микроорганизмов. Интересно, что естественный обитатель кишечника человека — *Lactobacillus rhamnosus* GG — совместно культивировалась с клетками кишечника на поверхности просвета в течение двух недель. Уже через год разработчики системы и ее исследователи, D. Nuh и соавт. [69], подробно описали микроинженерию, стоящую за изготовлением этих органов-на-чипах. Описаны материалы и размеры, используемые для конструирования микроустройств, а также принципы машиностроения, которые воспроизводят движения, подобные перистальтике, и поток жидкости, который имитирует реальную ситуацию в кишечнике. Микрофлюидное устройство предназначалось для оценки проницаемости, фармакокинетики и фармакодинамики тестируемых лекарственных средств, а также их доставки в определенный отдел кишечника. Вскоре Н. Kimura и др. [70] адаптировали похожее устройство к исследованию микробиома.

Крайне важным аспектом применения “кишечника-на-чипе” является возможность исследования перекрестных взаимодействий между клетками иммунной системы человека и микробиомом и идентификация новых маркеров хронических воспалительных заболеваний [71]. Предполагается, что в будущем применение “кишечного чипа” распространится на другие модели заболеваний. В настоящее время производство чипов для различных органоидов активно развивается. Уже получили известность несколько профильных компаний, предлагающих широкий спектр продуктов и услуг в этой области. Так, коммерческая система “кишечник-на-чипе” представляет собой перфузированные каналцы кишечного эпителия — трехмерные кишечные каналцы в так называемой OrganoPlate (<https://mimetas.com/page/products>).

Мониторинг сокультивирования в реальном времени

Биочипы позиционируют как современные и универсальные платформы, позволяющие оперативно получать важную информацию, причем в данном случае крайне практично использование оптических методов мониторинга. При исследовании симбиотических процессов применяя ряд современных неинвазивных оптических технологий, таких как рамановская, флуоресцентная или фосфоресцентная спектроскопии. Например, в Федеральном институте технологий Швейцарии

(Integrated Systems Laboratory, Swiss Federal Institute of Technology, Швейцария) успешно применена флуоресцентная микроскопия для мониторинга иммунного ответа, индуцируемого бактериальным липополисахаридом в клетках Caco-2, культивируемых на чипе совместно с иммунными клетками (концепция NutriChip) [72]. В Бостоне (Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering, США) под руководством D. Ingber также применили иммунофлуоресцентные методы мониторинга [73]. Следует отметить, что благодаря форме самих чипов, похожей на предметные стекла, подобные методики широко используют для получения изображений клеточных культур. В недавно опубликованной работе М. Mauger и др. [74] описаны иммунофлуоресцентные методы для окрашивания маркеров эпителиальных тканей и использование высокоразрешающей сканирующей электронной микроскопии.

Одно из интересных направлений развития флуоресцентной технологии — микроскопия визуализации жизни флуоресценции (fluorescence-lifetime imaging microscopy, FLIM). Этот метод применяют для неинвазивного мониторинга сдвигов в метаболизме клеток Caco-2: например, в сторону гликолиза либо окислительного фосфорилирования [75]. Помимо эукариотических клеток описание применения FLIM для фингерпринтинга (дактилоскопии) бактерий, в частности *E. coli* [76].

Следует заметить, что, как продолжение FLIM, разработан метод микроскопии визуализации жизни фосфоресценции (phosphorescence lifetime imaging, PLIM). Использование комбинации методов FLIM и PLIM со счетом единичных фотонов с корреляцией по времени описан в двух работах еще в 2017 году [77, 78]. Подобный подход позволяет получать высокоточные данные о распределении кислорода в изучаемых тканях в реальном времени. Важно заметить, что этот неинвазивный метод детекции пригоден для исследований не только микробиоты, но и гипоксии различных тканей.

ОГРАНИЧЕНИЯ, ПЕРСПЕКТИВЫ И РЕГУЛЯТОРНЫЙ СТАТУС *in vitro* МОДЕЛЕЙ

Успехи в изучении микробиоты и ее взаимодействия с клетками хозяина существенно расширяют наши знания о влиянии микрофлоры на здоровье человека, позволяют идентифицировать терапевтические мишени и разрабатывать на их основе новые лекарственные средства. Так, недавно изучены механизмы сократительных бионанотрубок — шприцеобразных наномашин для молекулярной пункции. Эти нанотрубки продуцируются некоторыми бактериями: бактериоцины R-типа *Pseudomonas aeruginosa*, пиоцины R-типа или диффоцины R-типа *Clostridium difficile* [79]. По-

добные системы инъекции есть у бактериофагов с сократительным хвостом, например у фага Т4 (*Escherichia virus T4*). Механизм этой естественной антимикробной функции вируса заключается во введении полой трубки в клеточную стенку бактерии, инъекции вирусной ДНК с последующим лизисом хозяина под действием потока ионов и деполяризации внутренней мембраны [80]. Используя этот уникальный природный механизм, можно синтезировать нанотрубки с различной специфичностью для микроорганизмов-мишеней, заменив домены распознавания лигандов рецепторсвязывающих белков фагов или сократительных бактериоцинов.

Несмотря на множество преимуществ моделей “орган-на-чипе” перед другими системами *in vitro*, у них есть и некоторые ограничения. Многие из этих моделей имеют несколько типов ячеек, улучшенную 3D-архитектуру, но пока они работают только на узком репертуаре из множества известных на сегодня типов клеток. Так, пока нет сообщений по микроскладчатым клеткам (М-клеткам) в системах “кишечник-на-чипе”. Конечно, назрела необходимость в создании физически связанных многоорганных моделях типа “человек-на-чипе” (“human-on-a-chip”) [69, 81]. Другим ограничением является материал — полидиметилсилоксан (ПДМС), — обычно используемый для изготовления чипов. Во-первых, ПДМС может поглощать небольшие гидрофобные молекулы и тем самым искажать результаты скрининга лекарственных средств и анализа клеточных сигналов [82–84]. Во-вторых, есть риск выщелачивания мономера в культуру, если полимеризация полностью не завершена, что приводит к повреждению клеток [83, 84].

Как упомянуто выше, в большинстве современных моделей кишечника число ячеек достаточно, чтобы разместить в них различные типы клеток, но в некоторых экспериментах может потребоваться гораздо большее число таких ячеек, их может не хватать, особенно если речь идет о компонентах внеклеточного матрикса [85, 86]. Моделирование инфекционных заболеваний, как правило, включает множество последовательных пассажей всех клеток, поэтому в работе используют несколько многоруночных планшетов. Например, при исследовании колонизации модели кишечника образцы собирают в разное время. В этом случае прагматичный подход заключается в использовании нескольких модельных 3D-систем, которые будут адаптированы к решению определенной экспериментальной задачи. Это связано с тем, что единой модельной системы недостаточно для рассмотрения всех сценариев инфекционных заболеваний.

Безусловно, создание моделей “орган-на-чипе” и их дальнейшее усовершенствование до специализированной, “кишечник-на-чипе” с возможно-

стью сокультивирования с бактериальными клетками, следует рассматривать как прорывную технологию в биомедицине. Создание в недалеком будущем модели “человек-на-чипе” позволит проводить скрининг разрабатываемых лекарственных средств в условиях, максимально приближенных к физиологическим. Нет сомнения, что такие системы станут мощным инструментом персонифицированной медицины. Следует отметить, что до недавнего времени персонифицированная медицина имела только один важный вектор развития — онкология. Но с открытием новых данных по микробиому человека появляется так же и второе направление — персонифицированная гастроэнтерология.

Данная наука достаточно молода и, с точки зрения регуляторного вопроса, о замене клинических исследований моделями “человек-на-чипе” либо о персонифицированной медицине говорить всерьез пока рано. В настоящий момент все лекарственные препараты, в том числе и медицинские услуги/протоколы, проходят обязательные клинические исследования на людях в парадигме доказательной медицины. В то же время на ранних этапах исследования большинство фармацевтических компаний уже прибегает к моделям человеческих органоидов и активно их использует как для оценки токсичности, так и эффективности изучаемых кандидатов. Уже более 10 лет в обязательный набор испытаний для формирования регистрационного досье нового перорального лекарственного средства входит предварительное исследование проницаемости молекулы основного вещества на клетках Caco-2. И данный подход не ограничивается только моделью кишечника. Так, для первичной оценки токсичности соединения-кандидата на лекарственный препарат в стандартный набор доклинических исследований уже более 30 лет входят *in vitro* модели печени, основанные на гепатоцитах, культивируемых совместно с эпителиальными клетками [87]. Особую популярность сегодня набирают микрофлюидные устройства и 3D-органоиды [88, 89]. Главная задача использования таких моделей — отбор перспективных соединений по результатам первичного *in vitro* скрининга: выбирают наиболее активные, наименее токсичные, наиболее стабильные к окислению и максимально биодоступные. Таким образом, дальнейшее развитие микрофлюидных модельных комбинаций: “3D-печень” и “кишечник с микробиотой” — позволит заменить ряд фармакокинетических моделей на животных. Учитывая объемы инвестиций в проекты по микробиому человека и персонифицированную медицину в развитых странах, можно ожидать, что в ближайшие 10–15 лет “органы-на-чипе” частично или полностью (в зависимости от нозологии) заменят доклинические исследования на животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00207).

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lozupone C.A., Stombaugh J.I., Gordon J.I., Jansson J.K., Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 2012, 489, 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
2. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I. The Human Microbiome Project. *Nature*, 2007, 449, 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
3. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., Bork P., Ehrlich S.D., Wang J., Antolin M., Artiguenave F., Blottiere H., Borruel N., Bruls T., Casellas F., Chervaux C., Cultrone A., Delorme C., Denariáz G., Dervyn R., Forte M., Friss C., Van De Guchte M., Guedon E., Haimet F., Jamet A., Juste C., Kaci G., Kleerebezem M., Knol J., Kristensen M., Layec S., Le Roux K., Leclerc M., Maguin E., Melo Minardi R., Oozeer R., Rescigno M., Sanchez N., Tims S., Torrejon T., Varela E., De Vos W., Winogradsky Y., Zoetendal E. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464, 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
4. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., 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., Pons N., Poulain J., Qin J., Sicheritz-Ponten T., Tims S., Torrents D., Ugarte E., Zoetendal E.G., Wang J., Guarner F., Pedersen O., De Vos W.M., Brunak S., Doré J., Weissenbach J., Ehrlich S.D., Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, 473, 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
5. Bäckhed F., Fraser C.M., Ringel Y., Sanders M.E., Sartor R.B., Sherman P.M., Versalovic J., Young V., Finlay B.B. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe*, 2012, 12, 611–622. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.012>
6. Koo H., Hakim J.A., Crossman D.K., Kumar R., Lefkowitz E.J., Morrow C.D. Individualized recovery of gut microbial strains post antibiotics. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2019, 5, 30. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0103-8>
7. Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, 14, 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
8. Cullender T.C., Chassaing B., Janzon A., Kumar K., Muller C.E., Werner J.J., Angenent L.T., Bell M.E., Hay A.G., Peterson D.A., Walter J., Vijay-Kumar M., Gewirtz A.T., Ley R.E. Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellar motility in the gut. *Cell Host Microbe*, 2013, 14, 571–581. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.10.009>
9. Nakjang S., Ndeh D.A., Wipat A., Bolam D.N., Hirt R.P. A novel extracellular metalloproteinase domain shared by animal host-associated mutualistic and pathogenic microbes. *PLoS One*, 2012, 7(1), e30287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030287>
10. Mahdavi J., Sonden B., Hurtig M., Olfat F.O., Forsberg L., Roche N., Ångström J., Larsson T., Teneberg S., Karlsson K.A., Altraja S., Wadström T., Kersulyte D., Berg D.E., Dubois A., Petersson C., Magnusson K.E., Norberg T., Lindh F., Lundskog B.B., Arnqvist A., Hammarström L., Borén T. *Helicobacter pylori* sabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 2002, 297 (80), 573–578. <https://doi.org/10.1126/science.1069076>
11. Matos R., Amorim I., Magalhães A., Haesebrouck F., Gärtner F., Reis C. Adhesion of *Helicobacter* species to the human gastric mucosa: a deep look into glycans role. *Front. Mol. Biosci.*, 2021, 8, 656439. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.656439>
12. Chatterjee D., Chaudhuri K. *Vibrio cholerae* O395 outer membrane vesicles modulate intestinal epithelial cells in a NOD1 protein-dependent manner and induce dendritic cell-mediated Th2/Th17 cell responses. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288(6), 4299–4309. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.408302>
13. Vezzulli L., Stauder M., Grande C., Pezzati E., Verheye H.M., Owens N.J.P., Pruzzo C. *gfpA* as a novel qPCR target for the species-specific detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1/Non-O139 in environmental, stool, and historical continuous plankton recorder samples. *PLoS One*, 2015, 10(4), e0123983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123983>
14. Sokurenko E.V., Chesnokova V., Doyle R.J., Hasty D.L. Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin: differential binding to mannosides and uroepithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(28), 17880–17886. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17880>
15. Schnupf P., Gaboriau-Routhiau V., Gros M., Friedman R., Moya-Nilges M., Nigro G., Cerf-Bensussan N., Sansonetti P.J. Growth and host interaction of mouse seg-

- mented filamentous bacteria *in vitro*. *Nature*, 2015, 520 (7545), 99–103.
<https://doi.org/10.1038/nature14027>
16. Lecuit M., Vandormael-Pournin S., Lefort J., Huerre M., Gounon P., Dupuy C., Babinet C., Cossart P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science*, 2001, 292(5522), 1722–1725.
<https://doi.org/10.1126/science.1059852>
 17. Savage D.C. Microbial interference between indigenous yeast and lactobacilli in the rodent stomach. *J. Bacteriol.*, 1969, 98, 1278–1283.
 18. Morotomi M., Watanabe T., Suegara N., Kawai Y., Mutai M. Distribution of indigenous bacteria in the digestive tract of conventional and gnotobiotic rats. *Infect. Immun.*, 1975, 11, 962–968.
 19. Turroni F., Serafini F., Foroni E., Duranti S., Motherway M.O.C., Taverniti V., Mangifesta M., Milani C., Viappiani A., Roversi T., Sánchez B., Santoni A., Gioiosa L., Ferrarini A., Delledonne M., Margolles A., Piazza L., Palanza P., Bolchi A., Guglielmetti S., Van Sinderen D., Ventura M. Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110, 11151–11156.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1303897110>
 20. Round J.L., Mazmanian S.K. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107, 12204–12209.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>
 21. Ivanov I.I., Atarashi K., Manel N., Brodie E.L., Shima T., Karaoz U., Wei D., Goldfarb K.C., Santee C.A., Lynch S.V., Tanoue T., Imaoka A., Itoh K., Takeda K., Umesaki Y., Honda K., Littman D.R. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 2009, 139, 485–498.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
 22. Blutt S.E., Estes M.K. Gut bacterial bouncers: keeping viral pathogens out of the epithelium. *Cell Host Microbe*, 2019, 26, 569–570.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.10.018>
 23. Gevers D., Kugathasan S., Denson L.A., Vázquez-Baeza Y., Van Treuren W., Ren B., Schwager E., Knights D., Song S.J., Yassour M., Morgan X.C., Kostic A.D., Luo C., González A., McDonald D., Haberman Y., Walters T., Baker S., Rosh J., Stephens M., Heyman M., Markowitz J., Baldassano R., Griffiths A., Sylvester F., Mack D., Kim S., Crandall W., Hyams J., Huttenhower C., Knight R., Xavier R.J. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*, 2014, 15, 382–392.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.005>
 24. Rowan F., Docherty N.G., Murphy M., Murphy T.B., Coffey J.C., O'Connell P.R. Bacterial colonization of colonic crypt mucous gel and disease activity in ulcerative colitis. *Ann. Surg.*, 2010, 252, 869–874.
<https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181fdc54c>
 25. Lynch S.V., Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N. Engl. J. Med.*, 2016, 375, 2369–2379.
<https://doi.org/10.1056/NEJMr1600266>
 26. Chong P.P., Chin V.K., Looi C.Y., Wong W.F., Madhavan P., Yong V.C. The microbiome and irritable bowel syndrome – a review on the pathophysiology, current research and future therapy. *Front. Microbiol.*, 2019, 10, 1136.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01136>
 27. Zhuang X., Xiong L., Li L., Li M., Chen M. Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2017, 32, 28–38.
<https://doi.org/10.1111/jgh.13471>
 28. Beatty J.K., Akierman S.V., Motta J.P., Muise S., Workentine M.L., Harrison J.J., Bhargava A., Beck P.L., Rioux K.P., McKnight G.W., Wallace J.L., Buret A.G. *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. *Int. J. Parasitol.*, 2017, 47, 311–326.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.11.010>
 29. Halkjær S.I., Boelsen A.W., Günther S., Christensen A.H., Petersen A.M. Can fecal microbiota transplantation cure irritable bowel syndrome? *World J. Gastroenterol.*, 2017, 23, 4112–4120.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i22.4112>
 30. Mizuno S., Masaoka T., Naganuma M., Kishimoto T., Kitazawa M., Kurokawa S., Nakashima M., Takeshita K., Suda W., Mimura M., Hattori M., Kanai T. *Bifidobacterium* – rich fecal donor may be a positive predictor for successful fecal microbiota transplantation in patients with irritable bowel syndrome. *Digestion*, 2017, 96, 29–38.
<https://doi.org/10.1159/000471919>
 31. Kao D., Roach B., Silva M., Beck P., Rioux K., Kaplan G.G., Chang H.J., Coward S., Goodman K.J., Xu H., Madsen K., Mason A., Wong G.K.S., Jovel J., Patterson J., Louie T. Effect of oral capsule – vs colonoscopy-delivered fecal microbiota transplantation on recurrent *Clostridium difficile* infection: a randomized clinical trial. *J. Am. Med. Assoc.*, 2017, 318, 1985–1993.
<https://doi.org/10.1001/jama.2017.17077>
 32. Hou, K., Wu, Z.X., Chen, X.Y., Wang J., Zhang D., Xiao C., Zhu D., Koya J.B., Wei L., Li J., Chen Z. Microbiota in health and diseases. *Sig. Transduct. Target Ther.*, 2022, 7, 135.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
 33. Chandra S., Sisodia S.S., Vassar R.J. The gut microbiome in Alzheimer's disease: what we know and what remains to be explored. *Mol. Neurodegener.*, 2023, 18, 9.
<https://doi.org/10.1186/s13024-023-00595-7>
 34. Sinha R., Chen J., Amir A., Vogtmann E., Shi J., Inman K.S., Flores R., Sampson J., Knight R., Chia N. Collecting fecal samples for microbiome analyses in epidemiology studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2016, 25, 407–416.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0951>
 35. Vogtmann E., Chen J., Amir A., Shi J., Abnet C.C., Nelson H., Knight R., Chia N., Sinha R. Comparison of collection methods for fecal samples in microbiome studies. *Am. J. Epidemiol.*, 2017, 185, 115–123.
<https://doi.org/10.1093/aje/kww177>
 36. Wu W.K., Chen C.C., Panyod S., Chen R.A., Wu M.S., Sheen L.Y., Chang S.C. Optimization of fecal sample

- processing for microbiome study – the journey from bathroom to bench. *J. Formos. Med. Assoc.*, 2019, 118, 545–555.
<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.02.005>
37. Lazarevic V., Whiteson K., Huse S., Hernandez D., Fari-nelli L., Østerås M., Schrenzel J., François P. Metage-nomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J. Microbiol. Methods*, 2009, 79, 266–271.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.012>
38. Lagier J.C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C., Bittar F., Fournous G., Gimenez G., Maranin-chi M., Trape J.F., Koonin E. V., La Scola B., Raoult D. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, 18, 1185–1193.
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12023>
39. Lagier J.C., Hugon P., Khelaifia S., Fournier P.E., La Scola B., Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, 28, 237–264.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00014-14>
40. Putignani L., Del Chierico F., Petrucca A., Vernocchi P., Dallapiccola B. The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatr. Res.*, 2014, 76, 2–10.
<https://doi.org/10.1038/pr.2014.49>
41. Vernocchi P., Del Chierico F., Putignani L. Gut microbi-ota profiling: metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. *Front. Microbiol.*, 2016, 7, 1144.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01144>
42. Le Gall G., Noor S.O., Ridgway K., Scovell L., Jamieson C., Johnson I.T., Colquhoun I.J., Kemsley E.K., Narbad A. Metabolomics of fecal extracts detects altered metabol-ic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and ir-ritable bowel syndrome. *J. Proteome Res.*, 2011, 10, 4208–4218.
<https://doi.org/10.1021/pr2003598>
43. Kumar S., Misra A., Ghoshal U.C. Patients with irritable bowel syndrome exhale more hydrogen than healthy subjects in fasting state. *J. Neurogastroenterol. Motil.*, 2010, 16, 299–305.
<https://doi.org/10.5056/jnm.2010.16.3.299>
44. Bunge M., Araghipour N., Mikoviny T., Dunkl J., Schnitzhofer R., Hansel A., Schinner F., Wisthaler A., Margesin R., Märk T.D. On-line monitoring of micro-bial volatile metabolites by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74, 2179–2186.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02069-07>
45. Proctor L.M., Creasy H.H., Fettweis J.M., Lloyd-Price J., Mahurkar A., Zhou W., Buck G.A., Snyder M.P., Strauss J.F., Weinstock G.M., White O., Huttenhower C. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*, 2019, 569, 641–648.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1238-8>
46. Huttenhower C., Gevers D., Knight R., Abubucker S., Badger J.H., Chinwalla A.T., Creasy H.H., Earl A.M., Fitzgerald M.G., Fulton R.S., Giglio M.G., Hallsworth-Pepin K., Lobos E.A., Madupu R., Magrini V., Martin J.C., Mitreva M., Muzny D.M., Sodergren E.J., Versalovic J., Wollam A.M., Worley K.C., Wortman J.R., Young S.K., Zeng Q., Aagaard K.M., Abolude O.O., Allen-Vercoe E., Alm E.J., Alvarado L., Andersen G.L., Anderson S., Ap-pelbaum E., Arachchi H.M., Armitage G., Arze C.A., Ayvaz T., Baker C.C., Begg L., Belachew T., Bhonagiri V., Bihan M., Blaser M.J., Bloom T., Bonazzi V., Paul Brooks J., Buck G.A., Buhay C.J., Busam D.A., Campbell J.L., Canon S.R., Cantarel B.L., Chain P.S.G., Chen I.M.A., Chen L., Chhibba S., Chu K., Ciulla D.M., Clemente J.C., Clifton S.W., Conlan S., Crabtree J., Cutting M.A., Davi-dovics N.J., Davis C.C., Desantis T.Z., Deal C., Dele-haunty K.D., Dewhirst F.E., Deych E., Ding Y., Dooling D.J., Dugan S.P., Michael Dunne W., Scott Durkin A., Ed-gar R.C., Erlich R.L., Farmer C.N., Farrell R.M., Faust K., Feldgarden M., Felix V.M., Fisher S., Fodor A.A., For-ney L.J., Foster L., Di Francesco V., Friedman J., Fried-ric D.C., Fronick C.C., Fulton L.L., Gao H., Garcia N., Giannoukos G., Giblin C., Giovanni M.Y., Goldberg J.M., Goll J., Gonzalez A., Griggs A., Gujja S., Kinder Haake S., Haas B.J., Hamilton H.A., Harris E.L., Hepburn T.A., Herter B., Hoffmann D.E., Holder M.E., Howarth C., Huang K.H., Huse S.M., Izard J., Jansson J.K., Jiang H., Jordan C., Joshi V., Katancik J.A., Keitel W.A., Kelley S.T., Kells C., King N.B., Knights D., Kong H.H., Koren O., Koren S., Kota K.C., Kovar C.L., Kyrpides N.C., La Rosa P.S., Lee S.L., Lemon K.P., Lennon N., Lewis C.M., Lewis L., Ley R.E., Li K., Liolios K., Liu B., Liu Y., Lo C.C., Lozupone C.A., Dwayne Lunsford R., Madden T., Mahurkar A.A., Mannon P.J., Mardis E.R., Markow-itz V.M., Mavromatis K., McCorrison J.M., McDonald D., McEwen J., McGuire A.L., McInnes P., Mehta T., Mihin-dukulasuriya K.A., Miller J.R., Minx P.J., Newsham I., Nusbaum C., Ogloughlin M., Orvis J., Pagani I., Palaniappan K., Patel S.M., Pearson M., Peterson J., Podar M., Pohl C., Pollard K.S., Pop M., Priest M.E., Proctor L.M., Qin X., Raes J., Ravel J., Reid J.G., Rho M., Rhodes R., Riehle K.P., Rivera M.C., Rodriguez-Mueller B., Rog-ers Y.H., Ross M.C., Russ C., Sanka R.K., Sankar P., Fah Sathirapongsasuti J., Schloss J.A., Schloss P.D., Schmidt T.M., Scholz M., Schriml L., Schubert A.M., Segata N., Segre J.A., Shannon W.D., Sharp R.R., Sharpton T.J., Shenoy N., Sheth N.U., Simone G.A., Singh I., Smillie C.S., Sobel J.D., Sommer D.D., Spicer P., Sutton G.G., Sykes S.M., Tabbaa D.G., Thiagarajan M., Tomlinson C.M., Torralba M., Treangen T.J., Truty R.M., Vishnivetskaya T.A., Walker J., Wang L., Wang Z., Ward D.V., Warren W., Watson M.A., Wellington C., Wetterstrand K.A., White J.R., Wilczek-Boney K., Wu Y., Wylie K.M., Wylie T., Yandava C., Ye L., Ye Y., Yooseph S., Youmans B.P., Zhang L., Zhou Y., Zhu Y., Zoloth L., Zucker J.D., Birren B.W., Gibbs R.A., Highlander S.K., Methé B.A., Nelson K.E., Petrosino J.F., Weinstock G.M., Wilson R.K., White O. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 2012, 486, 207–214.
<https://doi.org/10.1038/nature11234>
47. Lloyd-Price J., Mahurkar A., Rahnavard G., Crabtree J., Orvis J., Hall A.B., Brady A., Creasy H.H., McCracken C., Giglio M.G., McDonald D., Franzosa E.A., Knight R., White O., Huttenhower C. Strains, functions and dy-namics in the expanded Human Microbiome Project.

- Nature*, 2017, 550, 61–66.
<https://doi.org/10.1038/nature23889>
48. Cuellar-Partida G., Buske F.A., McLeay R.C., Whittington T., Noble W.S., Bailey T.L. Epigenetic priors for identifying active transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, 2012, 28, 56–62.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr614>
 49. Haft D.H. Bioinformatic evidence for a widely distributed, ribosomally produced electron carrier precursor, its maturation proteins, and its nicotinoprotein redox partners. *BMC Genomics*, 2011, 12, 21.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-21>
 50. Caporaso J.G., Lauber C.L., Costello E.K., Berg-Lyons D., Gonzalez A., Stombaugh J., Knights D., Gajer P., Ravel J., Fierer N., Gordon J.I., Knight R. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol.*, 2011, 12(5), R50.
<https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50>
 51. Sczesnak A., Segata N., Qin X., Gevers D., Petrosino J.F., Huttenhower C., Littman D.R., Ivanov I.I. The genome of Th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment. *Cell Host Microbe*, 2011, 10, 260–272.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.005>
 52. Ballal S.A., Gallini C.A., Segata N., Huttenhower C., Garrett W.S. Host and gut microbiota symbiotic factors: lessons from inflammatory bowel disease and successful symbionts. *Cell. Microbiol.*, 2011, 13, 508–517.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01572.x>
 53. Bergmann G.T., Bates S.T., Eilers K.G., Lauber C.L., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 2011, 43, 1450–1455.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.012>
 54. Yeoman C.J., Yildirim S., Thomas S.M., Durkin A.S., Torralba M., Sutton G., Buhay C.J., Ding Y., Dugan-Rocha S.P., Muzny D.M., Qin X., Gibbs R.A., Leigh S.R., Stumpf R., White B.A., Highlander S.K., Nelson K.E., Wilson B.A. Comparative genomics of *Gardnerella vaginalis* strains reveals substantial differences in metabolic and virulence potential. *PLoS One*, 2010, 5(8), e12411.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012411>
 55. Koren O., Spor A., Felin J., Fåk F., Stombaugh J., Tremaroli V., Behre C.J., Knight R., Fagerberg B., Ley R.E., Bäckhed F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108, 4592–4598.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1011383107>
 56. Cattaneo A., Cattane N., Galluzzi S., Provasi S., Lopizzo N., Festari C., Ferrari C., Guerra U.P., Paghera B., Muscio C., Bianchetti A., Volta G.D., Turla M., Cotelli M.S., Genuso M., Prella A., Zanetti O., Lussignoli G., Mirabile D., Bellandi D., Gentile S., Belotti G., Villani D., Harach T., Bolmont T., Padovani A., Boccardi M., Frisoni G.B. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol. Aging*, 2017, 49, 60–68.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019>
 57. Roy Sarkar S., Banerjee S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. *J. Neuroimmunol.*, 2019, 328, 98–104.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.01.004>
 58. Marri P.R., Paniscus M., Weyand N.J., Rendón M.A., Calton C.M., Hernández D.R., Higashi D.L., Sodergren E., Weinstock G.M., Rounsley S.D., So M. Genome sequencing reveals widespread virulence gene exchange among human *Neisseria* species. *PLoS One*, 2010, 5(7), e11835.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011835>
 59. Haller D., Bode C., Hammes W.P., Pfeifer A.M.A., Schiffrin E.J., Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*, 2000, 47, 79–87.
<https://doi.org/10.1136/gut.47.1.79>
 60. Zoumpopoulou G., Tsakalidou E., Dewulf J., Pot B., Grangette C. Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, 131, 40–51.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.037>
 61. Parlesak A., Haller D., Brinz S., Baeuerlein A., Bode C. Modulation of cytokine release by differentiated CACO-2 cells in a compartmentalized coculture model with mononuclear leucocytes and nonpathogenic bacteria. *Scand. J. Immunol.*, 2004, 60, 477–485.
<https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01495.x>
 62. Marzorati M., Vanhoecke B., De Ryck T., Sadaghian Sadabad M., Pinheiro I., Possemiers S., Van Den Abbeele P., Derycke L., Bracke M., Pieters J., Hennebel T., Harmsen H.J., Verstraete W., Van De Wiele T. The HMI™ module: a new tool to study the Host-Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract *in vitro*. *BMC Microbiol.*, 2014, 14.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-133>
 63. Sadabad M.S., Von Martels J.Z.H., Khan M.T., Blokzijl T., Paglia G., Dijkstra G., Harmsen H.J.M., Faber K.N. A simple coculture system shows mutualism between anaerobic faecalibacteria and epithelial Caco-2 cells. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 17906.
<https://doi.org/10.1038/srep17906>
 64. Shah P., Fritz J. V., Glaab E., Desai M.S., Greenhalgh K., Frachet A., Niegowska M., Estes M., Jäger C., Seguin-Devaux C., Zenhausern F., Wilmes P. A microfluidics-based *in vitro* model of the gastrointestinal human-microbe interface. *Nat. Commun.*, 2016, 7, 11535.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11535>
 65. Jalili-Firoozinezhad S., Gazzaniga F.S., Calamari E.L., Camacho D.M., Fadel C.W., Bein A., Swenor B., Nestor B., Cronce M.J., Tovaglieri A., Levy O., Gregory K.E., Breault D.T., Cabral J.M.S., Kasper D.L., Novak R., Ingber D.E. A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip. *Nat. Biomed. Eng.*, 2019, 3, 520–531.
<https://doi.org/10.1038/s41551-019-0397-0>
 66. Barrila J., Crabbé A., Yang J., Franco K., Nydam S.D., Forsyth R.J., Davis R.R., Gangaraju S., Mark Ott C., Coyne C.B., Bissell M.J., Nickerson C.A. Modeling host-pathogen interactions in the context of the micro-environment: three-dimensional cell culture comes of

- age. *Infect. Immun.*, 2018, 86(11), e00282-18.
https://doi.org/10.1128/IAI.00282-18
67. Bein A., Shin W., Jalili-Firoozinezhad S., Park M.H., Sontheimer-Phelps A., Tovaglieri A., Chalkiadaki A., Kim H.J., Ingber D.E. Microfluidic organ-on-a-chip models of human intestine. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 2018, 5, 659–668.
https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.12.010
 68. Kim H.J., Huh D., Hamilton G., Ingber D.E. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip*, 2012, 12, 2165–2174.
https://doi.org/10.1039/c2lc40074j
 69. Huh D., Kim H.J., Fraser J.P., Shea D.E., Khan M., Bahinski A., Hamilton G.A., Ingber D.E. Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat. Protoc.*, 2013, 8, 2135–2157.
https://doi.org/10.1038/nprot.2013.137
 70. Kimura H., Ikeda T., Nakayama H., Sakai Y., Fujii T. An on-chip small intestine–liver model for pharmacokinetic studies. *J. Lab. Autom.*, 2015, 20, 265–273.
https://doi.org/10.1177/2211068214557812
 71. Kang T.H., Kim H.J. Farewell to animal testing: innovations on human intestinal microphysiological systems. *Micromachines* (Basel), 2016, 7, 107.
https://doi.org/10.3390/mi7070107
 72. Ghaye J., Kamat M.A., Corbino-Giunta L., Silacci P., Vergères G., De Micheli G., Carrara S. Image thresholding techniques for localization of sub-resolution fluorescent biomarkers. *Cytom. Part A*, 2013, 83, 1001–1016.
https://doi.org/10.1002/cyto.a.22345
 73. Kim H.J., Ingber D.E. Gut-on-a-chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation. *Integr. Biol.* (United Kingdom), 2013, 5, 1130–1140.
https://doi.org/10.1039/c3ib40126j
 74. Maurer M., Gresnigt M.S., Last A., Wollny T., Berlinghof F., Pospich R., Cseresnyes Z., Medyukhina A., Graf K., Gröger M., Raasch M., Siwczak F., Nietzsche S., Jacobsen I.D., Figge M.T., Hube B., Huber O., Mosig A.S. A three-dimensional immunocompetent intestine-on-chip model as *in vitro* platform for functional and microbial interaction studies. *Biomaterials*, 2019, 220, 119396.
https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119396
 75. Lakner P.H., Monaghan M.G., Möller Y., Olayioye M.A., Schenke-Layland K. Applying phasor approach analysis of multiphoton FLIM measurements to probe the metabolic activity of three-dimensional *in vitro* cell culture models. *Sci. Rep.*, 2017, 7, 42730.
https://doi.org/10.1038/srep42730
 76. Bhattacharjee A., Datta R., Gratton E., Hochbaum A.I. Metabolic fingerprinting of bacteria by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Sci. Rep.*, 2017, 7, 3743.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-04032-w
 77. Okkelman I.A., Foley T., Papkovsky D.B., Dmitriev R.I. Multi-parametric imaging of hypoxia and cell cycle in intestinal organoid culture. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, 1035, 85–103.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-67358-5_6
 78. Zhdanov A.V., Okkelman I.A., Golubeva A.V., Doerr B., Hyland N.P., Melgar S., Shanahan F., Cryan J.F., Papkovsky D.B. Quantitative analysis of mucosal oxygenation using *ex vivo* imaging of healthy and inflamed mammalian colon tissue. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2017, 74, 141–151.
https://doi.org/10.1007/s00018-016-2323-x
 79. Ge P., Scholl D., Leiman P.G., Yu X., Miller J.F., Zhou Z.H. Atomic structures of a bactericidal contractile nanotube in its pre- and postcontraction states. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2015, 22(5), 377–382.
https://doi.org/10.1038/nsmb.2995
 80. Maghsoodi A., Chatterjee A., Andricioaei I., Perkins N.C. How the phage T4 injection machinery works including energetics, forces, and dynamic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019, 116(50), 250974–25105.
https://doi.org/10.1073/pnas.1909298116
 81. Abaci H.E., Shuler M.L. Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling. *Integr. Biol.* (United Kingdom), 2015, 7, 383–391.
https://doi.org/10.1039/c4ib00292j
 82. Huh D., Torisawa Y.S., Hamilton G.A., Kim H.J., Ingber D.E. Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-Chips. *Lab Chip*, 2012, 12, 2156–2164.
https://doi.org/10.1039/c2lc40089h
 83. Halldorsson S., Lucumi E., Gómez-Sjöberg R., Fleming R.M.T. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 63, 218–231.
https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.029
 84. Sackmann E.K., Fulton A.L., Beebe D.J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 2014, 507, 181–189.
https://doi.org/10.1038/nature13118
 85. Frantz C., Stewart K.M., Weaver V.M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.*, 2010, 123, 4195–4200.
https://doi.org/10.1242/jcs.023820
 86. Bonnans C., Chou J., Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2014, 15, 786–801.
https://doi.org/10.1038/nrm3904
 87. Fabre G., Combalbert J., Berger Y., Cano J.-P. Human hepatocytes as a key *in vitro* model to improve preclinical drug development. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 1990, 15, 165–171.
https://doi.org/10.1007/BF03190200
 88. Poloznikov A. *In vitro* and *in silico* liver models: current trends, challenges and opportunities. *ALTEX*, 2018, 397–412.
https://doi.org/10.14573/altex.1803221
 89. Zakharyants A.A., Burmistrova O.A., Poloznikov A.A. The use of human liver cell model and cytochrome P450 substrate–inhibitor panel for studies of dasatinib and warfarin interactions. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, 162, 515–519.
https://doi.org/10.1007/s10517-017-3651-z

Microbiome and *in vitro* Gut Models

D. M. Hushpulian^{a, b, #}, S. V. Nikulin^b, A. A. Zakharyants^{b, c}, S. S. Savin^d, and V. I. Tishkov^{a, d, ##}

^a*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology",
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, 117418 Russia*

^c*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

^d*Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

[#]*e-mail: hushpulian@gmail.com*

^{##}*e-mail: vitishkov@gmail.com*

The review discusses the role of the microbiota in maintaining human health and the current state of research on the human microbiome, with a focus on the development and prospects for the use of modern methodological approaches, such as "gut-on-a-chip" technology. The relationship between the microbiome and metabolomics is discussed, as well as the main results of international projects on the human microbiome. The limitations of both cultural and purely genetic (metagenomics) approaches for studying the microbiota bank are highlighted. The central focus is on the comparison of different gut models. Arguments in favor of a microfluidic biochips approach are presented. Finally, regulatory aspects of the practical implementation of microarrays in drug development and personalized medicine are briefly discussed.

Keywords: microbiome, co-cultivation, *in vitro* gut models, microfluidics