



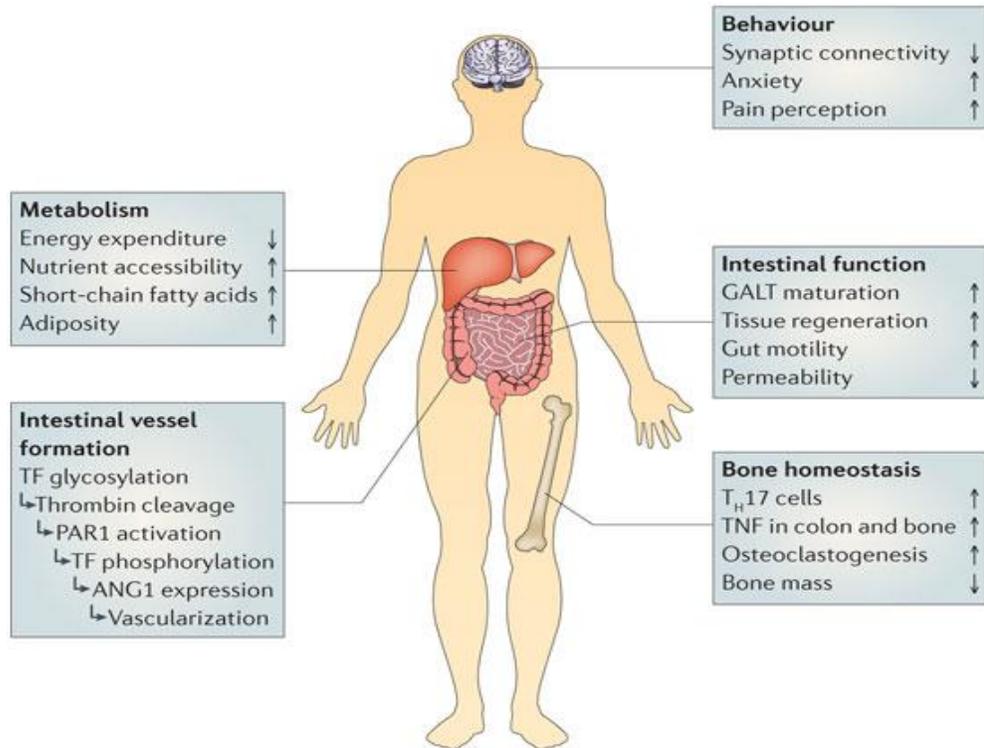
Микробиом человека в норме и патологии. Пути коррекции

**Зав. отделом генетических основ биотехнологии
проф., д.б.н., ДАНИЛЕНКО В.Н.
Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН,
Москва, Россия**

<http://www.vigg.ru/>
E-mail:valerid@vigg.ru

**05 октября 2018г, НИЦ «Курчатовский институт – ГосНИИгенетика»
Школа-конференция «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике»**

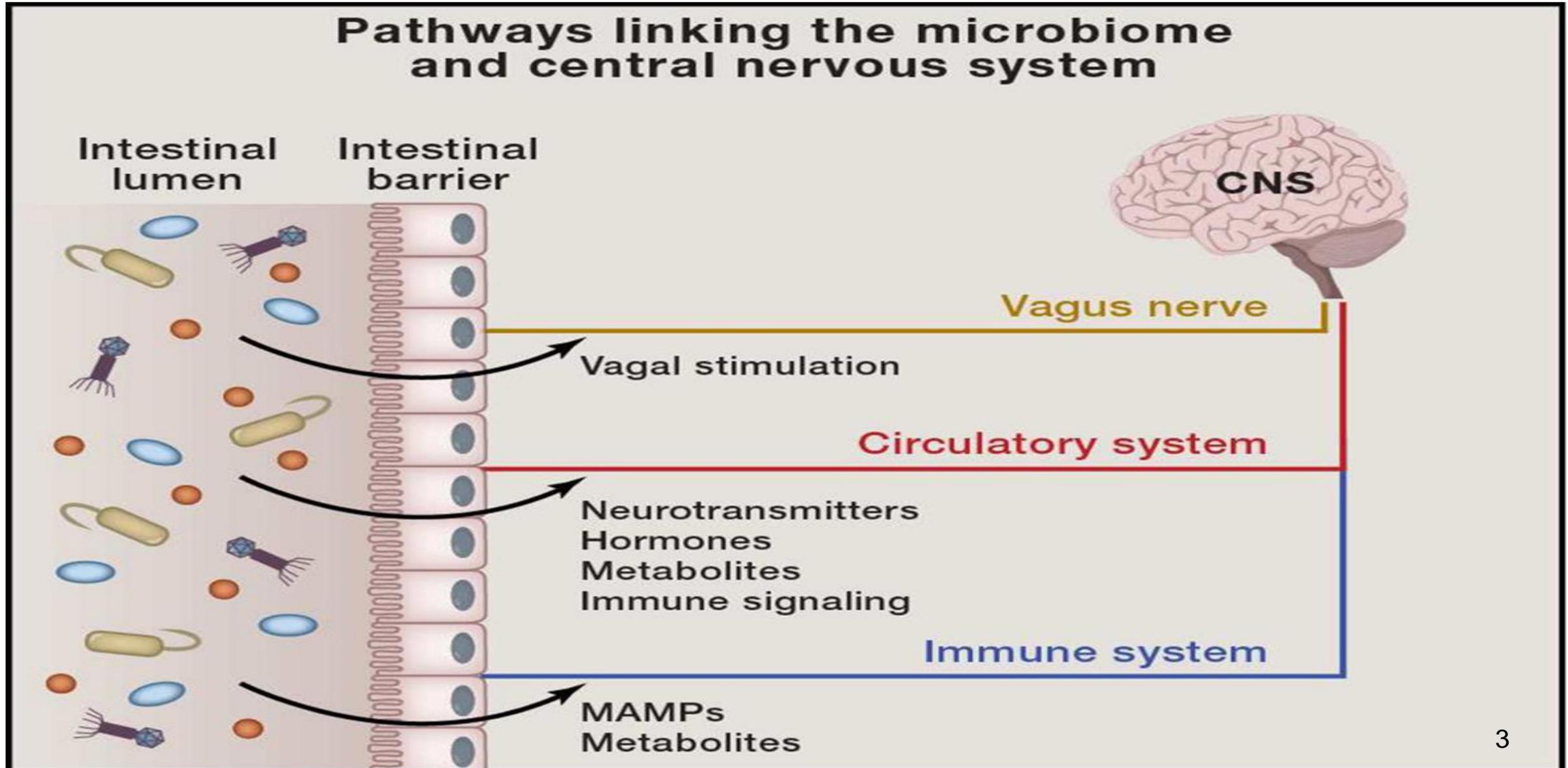
Новые взгляды на микробиоту ЖКТ



Nature Reviews | Microbiology

- Микробиоту ЖКТ сегодня рассматривают как эндокринный орган, играющий ключевую роль в развитии и поддержании иммунной системы, гомеостаза и формировании поведения (Foster et al., 2013; Clarke G. et al., 2014).
- Композиция кишечной микробиоты является индикатором его состояния (Turroni et al., 2009).
- Кишечные бактерии способны продуцировать нейротрансмиттеры: гамма-аминомасляную кислоту, серотонин, дофамин и другие (Lyte M., 2013. 2014).
- Кишечные бактерии могут реагировать на присутствие нейрорегуляторов и отправить ответный сигнал в головной мозг через иммунную систему, периферическую систему и блуждающий нерв.
- Ось кишечник-мозг является двунаправленной коммуникационной системой, обеспечивающая функционирование ЦНС и ЖКТ.

Пути связи микробиомом и ЦНС



Микробиота кишечника способна оказывать влияние на организм хозяина благодаря своей способности синтезировать различные биологически активные соединения

Нейромодуляторы

(включая малые РНК и короткие пептиды)



Центральная нервная система

Иммуномодулирующие

вещества

(включая малые РНК и др.)



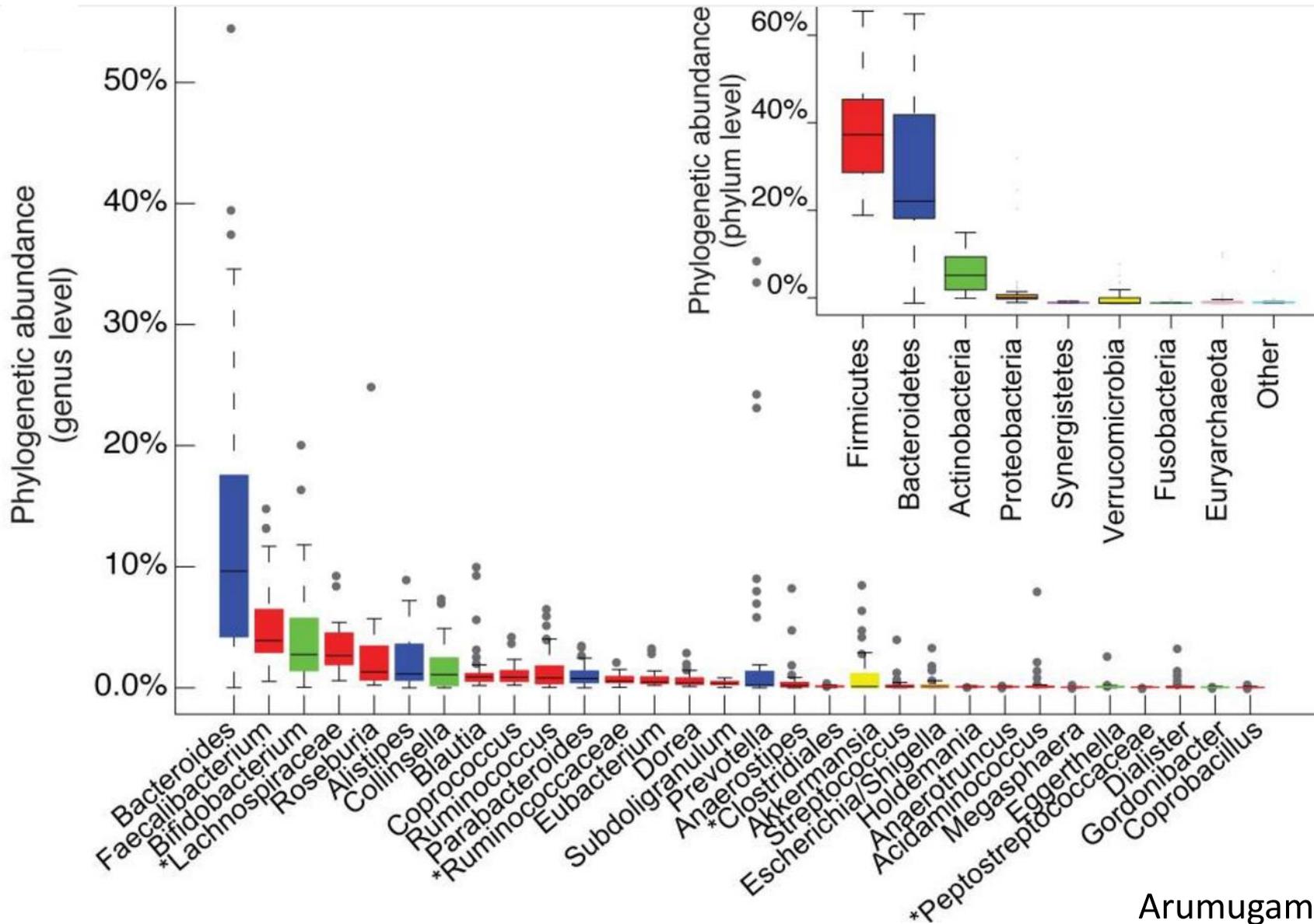
Иммунная система

Антиоксиданты



Эндокринная система

Микробиота кишечника человека – совокупность микроорганизмов, населяющих пищеварительный тракт человека



32 наиболее распространенных рода:

- *Actinomyces*
- *Alistipes*
- *Anaerostipes*
- *Bacteroides*
- *Bifidobacterium*
- *Blautia*
- *Butyrivibrio*
- *Citrobacter*
- *Clostridium*
- *Desulfovibrio*
- *Dialister*
- *Dorea*
- *Eggerthella*
- *Enterobacter*
- *Enterococcus*
- *Escherichia*
- *Eubacterium*
- *Gordonibacter*
- *Helicobacter*
- *Holdemania*
- *Lactobacillus*
- *Listeria*
- *Megasphaera*
- *Odoribacter*
- *Parabacteroides*
- *Parvimonas*
- *Prevotella*
- *Proteus*
- *Providencia*
- *Roseburia*
- *Ruminococcus*
- *Streptococcus*

Дисбаланс микробиоты при различных заболеваниях и стрессах

- **Микробиота и нейродепрессивные заболевания**
- **Микробиота и аутизм, шизофрения**
- **Микробиота и диабет II типа**
- **Микробиота и кардиологические заболевания**
- **Микробиота и иммунные заболевания**
- **Микробиота и смена климатических зон (Арктика)**

Нейроактивные вещества, синтезируемые бактериями микробиоты ЖКТ



Аверина О.В., Даниленко В.Н.,
2017.

Lyte et al., 2010.

Метагеномная сигнатура

- Метагеномная сигнатура – совокупность важных родов и ферментов, характеризующая состояние микробиоты кишечника человека
- Сигнатуры могут быть разными (нейромодуляторов, антиоксидантов и т.д.)
- Изменения в таксономическом составе \Leftrightarrow изменения сигнатуры
- Изменения сигнатуры можно фиксировать
- Необходимо знать сигнатуру в норме

Определение метагеномной сигнатуры микробиоты кишечника в норме

- **Определение сигнатуры метаболомных биомаркеров нейродомуляторов**
- **508 геномов бактерий – изолятов микробиоты кишечника здорового человека (база данных Human Microbiome Project)**
- **147 метагеномов здоровых взрослых людей из США (база данных Human Microbiome Project)**

Каталог ортологов

- 17 основных ферментов, участвующих в метаболизме различных нейроактивных соединений:

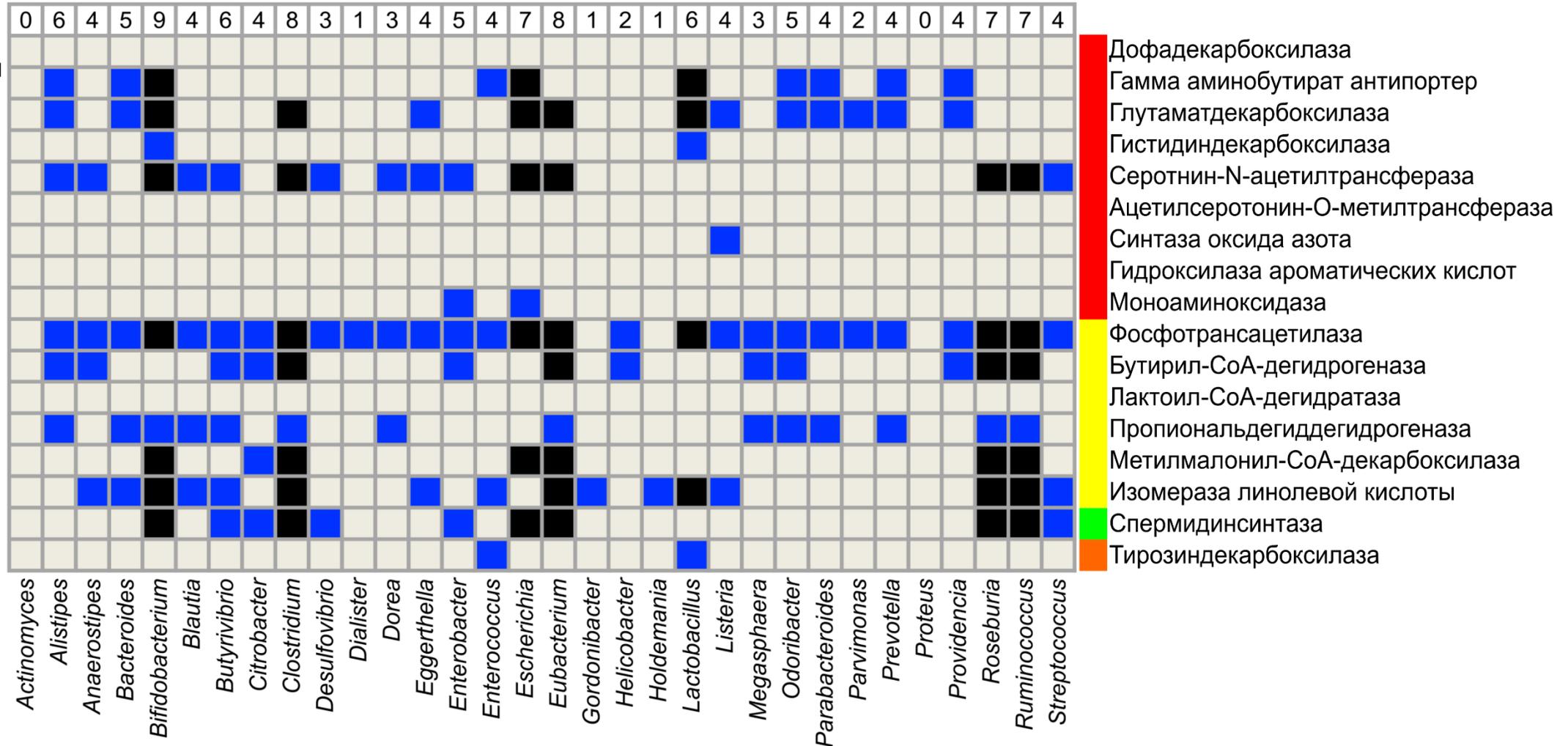
ГРУППА	Соединения
Нейротрансмиттеры	Серотонин, дофамин, норадреналин, ГАМК, гистамин, мелатонин и окись азота
Жирные кислоты	Уксусная, масляная, пропионовая, конъюгированная линолевая кислота
Полиамины	Спермидин
Биогенные амины	Тирамин

- Всего 292 ортолога из 32 родов бактерий из 4 типов (5 родов *Bacteroidetes*, 16 родов *Firmicutes*, 4 родов *Actinobacteria*, 7 родов *Proteobacteria*)
- Ковтун А.С. и др. 2018

Определение метагеномной сигнатуры микробиоты кишечника

Легенда

- Нейромедиаторы
- Жирные кислоты
- Спермидин
- Тирозин



- Дофадекарбоксилаза
- Гамма-аминобутират-антипортер
- Глутаматдекарбоксилаза
- Гистидиндекарбоксилаза
- Серотин-N-ацетилтрансфераза
- Ацетилсеротин-O-метилтрансфераза
- Синтаза оксида азота
- Гидроксилаза ароматических кислот
- Моноаминоксидаза
- Фосфотрансацетилаза
- Бутирил-CoA-дегидрогеназа
- Лактоил-CoA-дегидратаза
- Пропиональдегиддегидрогеназа
- Метилмалонил-CoA-декарбоксилаза
- Изомераза линолевой кислоты
- Спермидинсинтаза
- Тирозиндекарбоксилаза

Метагеномная сигнатура биомаркеров нейромодуляторов

							Функция фермента	
							Гамма аминокбутират антипортер	Транспорт ГАМК
							Глутаматдекарбоксилаза	Синтез ГАМК
							Серотнин-N-ацетилтрансфераза	Синтез мелатонина
							Фосфотрансацетилаза	Образование уксусной кислоты
							Бутирил-СоА-дегидрогеназа	Образование масляной кислоты
							Метилмалонил-СоА-декарбоксилаза	Образование пропионовой кислоты
							Изомераза линолевой кислоты	Конъюгация линолевой кислоты
							Спермидинсинтаза	Синтез спермидина
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Roseburia</i>	<i>Ruminococcus</i>		

Ковтун А.С. и др.2018

Полногеномный анализ кишечных микробиом российских детей с РАС

- **Объект исследования:**

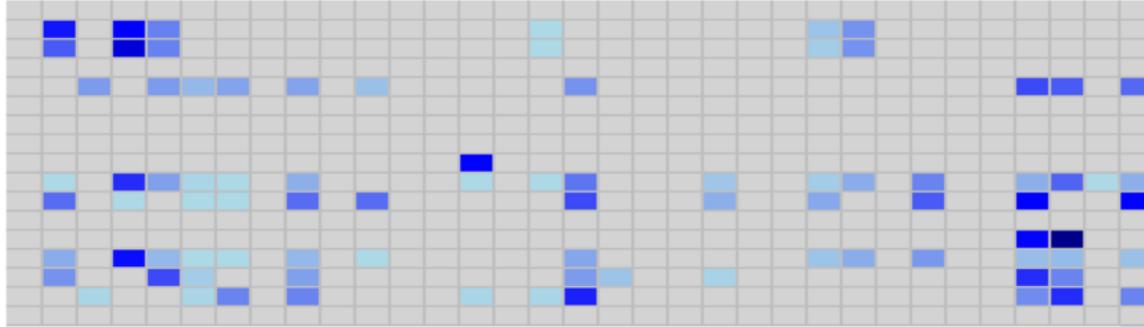
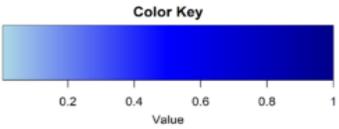
образцы фекалий от детей с РАС

- группы 1 со средними и слабыми проявлениями аутичности
- группы 2 с тяжелыми проявлениями аутичности
- и группы здоровых детей

- **Метод исследования:**

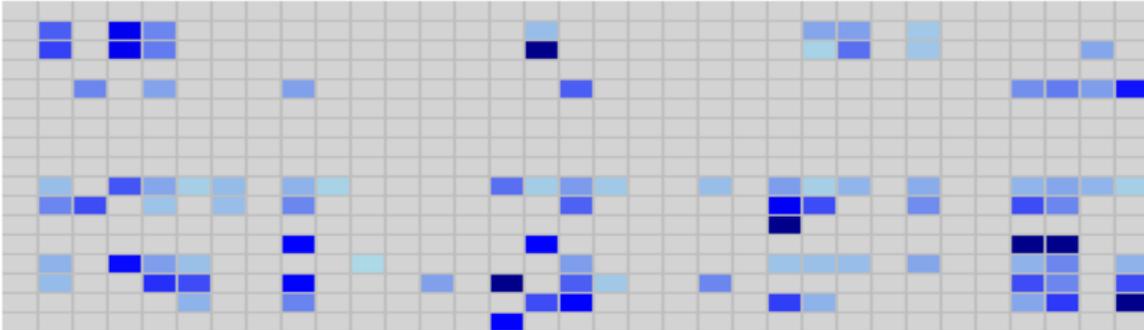
- Выделение общей бактериальной ДНК из образцов фекалий
- Подготовка библиотеки
- Секвенирование ДНК на приборе Illumina HiSeq 4000
- Подготовка ридов для метагеномного анализа
- Метагеномный анализ с использованием известных программ и разработанного алгоритма
- Статистическая обработка результатов

Метагеномная сигнатура нейромодуляторов



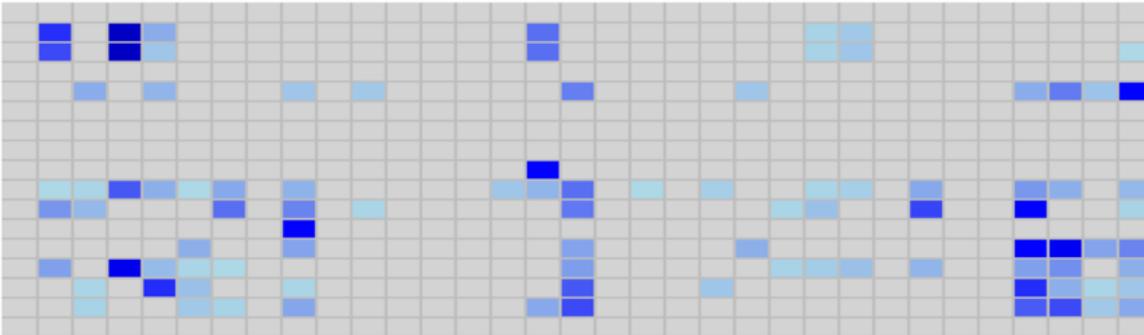
Dopa decarboxylase
Gamma-aminobutyrate antiporter
Glutamate decarboxylase
Histidine decarboxylase
Serotonin N-acetyltransferase
Acetylserotonin O-methyltransferase
Nitric oxide synthase
Aromatic amino acid hydroxylases
Monoamine oxidase
Phosphotransacetylase
Butyryl-CoA dehydrogenase
Lactoyl-CoA dehydratase
Propionaldehyde dehydrogenase
Methylmalonyl-CoA decarboxylase
Linoleic acid isomerase
Spermidine synthase
Tyrosine decarboxylase

Контроль



Dopa decarboxylase
Gamma-aminobutyrate antiporter
Glutamate decarboxylase
Histidine decarboxylase
Serotonin N-acetyltransferase
Acetylserotonin O-methyltransferase
Nitric oxide synthase
Aromatic amino acid hydroxylases
Monoamine oxidase
Phosphotransacetylase
Butyryl-CoA dehydrogenase
Lactoyl-CoA dehydratase
Propionaldehyde dehydrogenase
Methylmalonyl-CoA decarboxylase
Linoleic acid isomerase
Spermidine synthase
Tyrosine decarboxylase

Аутизм,
средняя
тяжесть



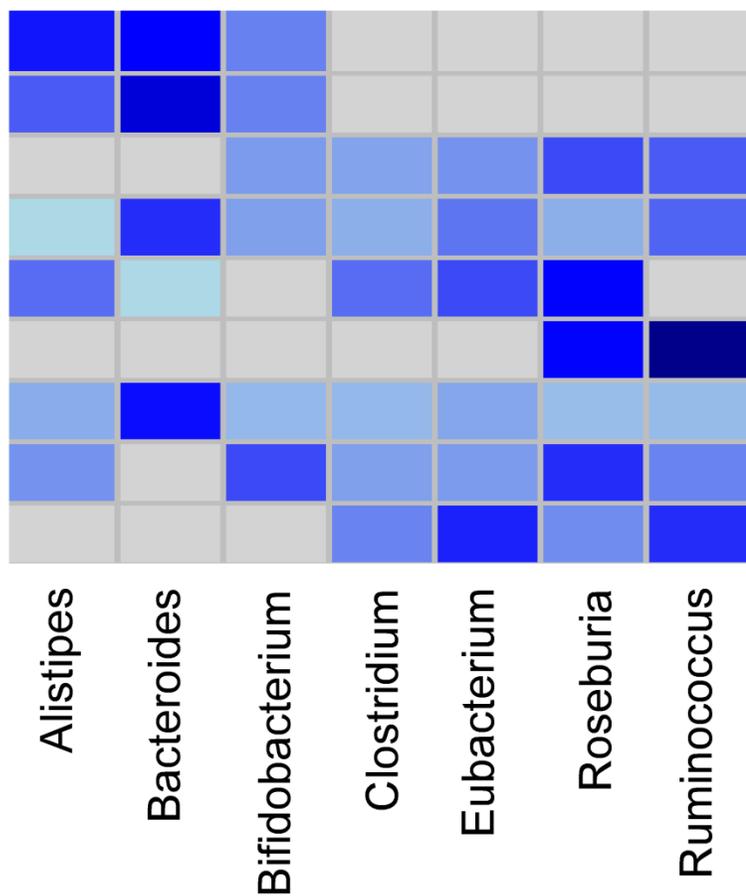
Dopa decarboxylase
Gamma-aminobutyrate antiporter
Glutamate decarboxylase
Histidine decarboxylase
Serotonin N-acetyltransferase
Acetylserotonin O-methyltransferase
Nitric oxide synthase
Aromatic amino acid hydroxylases
Monoamine oxidase
Phosphotransacetylase
Butyryl-CoA dehydrogenase
Lactoyl-CoA dehydratase
Propionaldehyde dehydrogenase
Methylmalonyl-CoA decarboxylase
Linoleic acid isomerase
Spermidine synthase
Tyrosine decarboxylase

Аутизм,
высокая
тяжесть

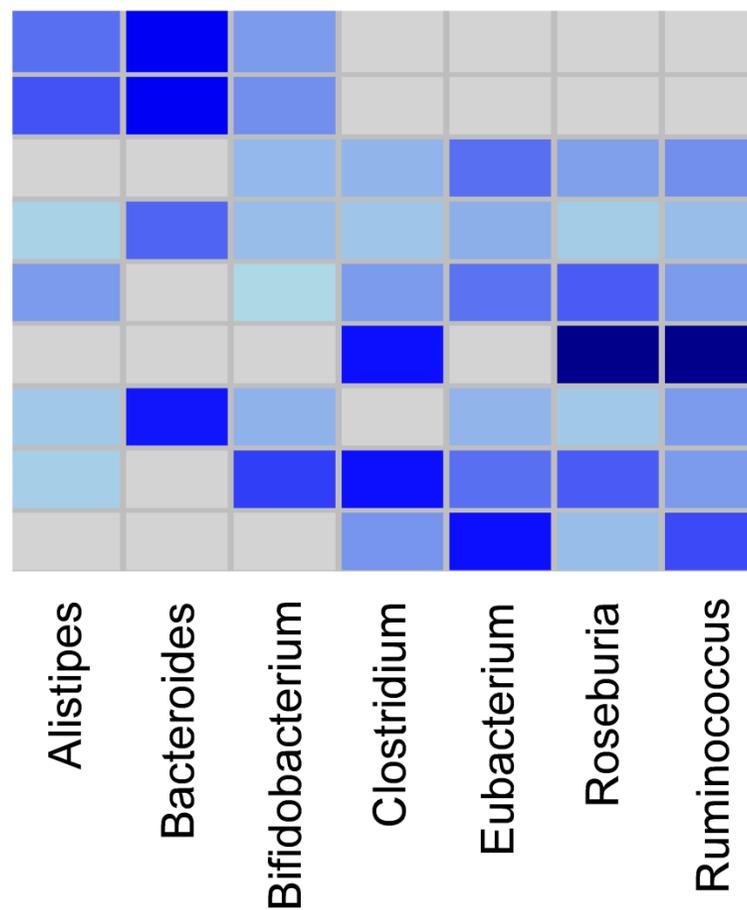
Actinomyces
Alisipes
Anaerostipes
Bacteroides
Bifidobacterium
Blautia
Butyrivibrio
Citrobacter
Clostridium
Desulfovibrio
Dialister
Dorea
Eggerthella
Enterobacter
Enterococcus
Escherichia
Eubacterium
Gordonibacter
Helicobacter
Holdemania
Lactobacillus
Listeria
Megasphaera
Odoribacter
Parabacteroides
Parvimonas
Prevotella
Proteus
Providencia
Roseburia
Ruminococcus
Streptococcus
Unclassified

Изменения в коровой метагеномной сигнатуре при аутизме (средняя тяжесть заболевания)

КОНТРОЛЬ



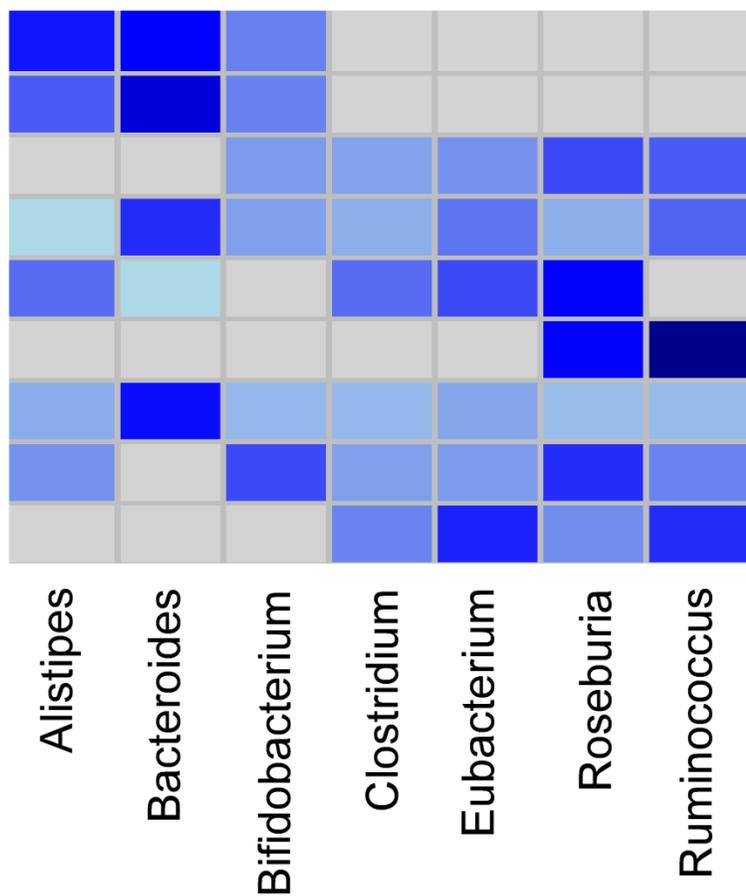
АУТИЗМ



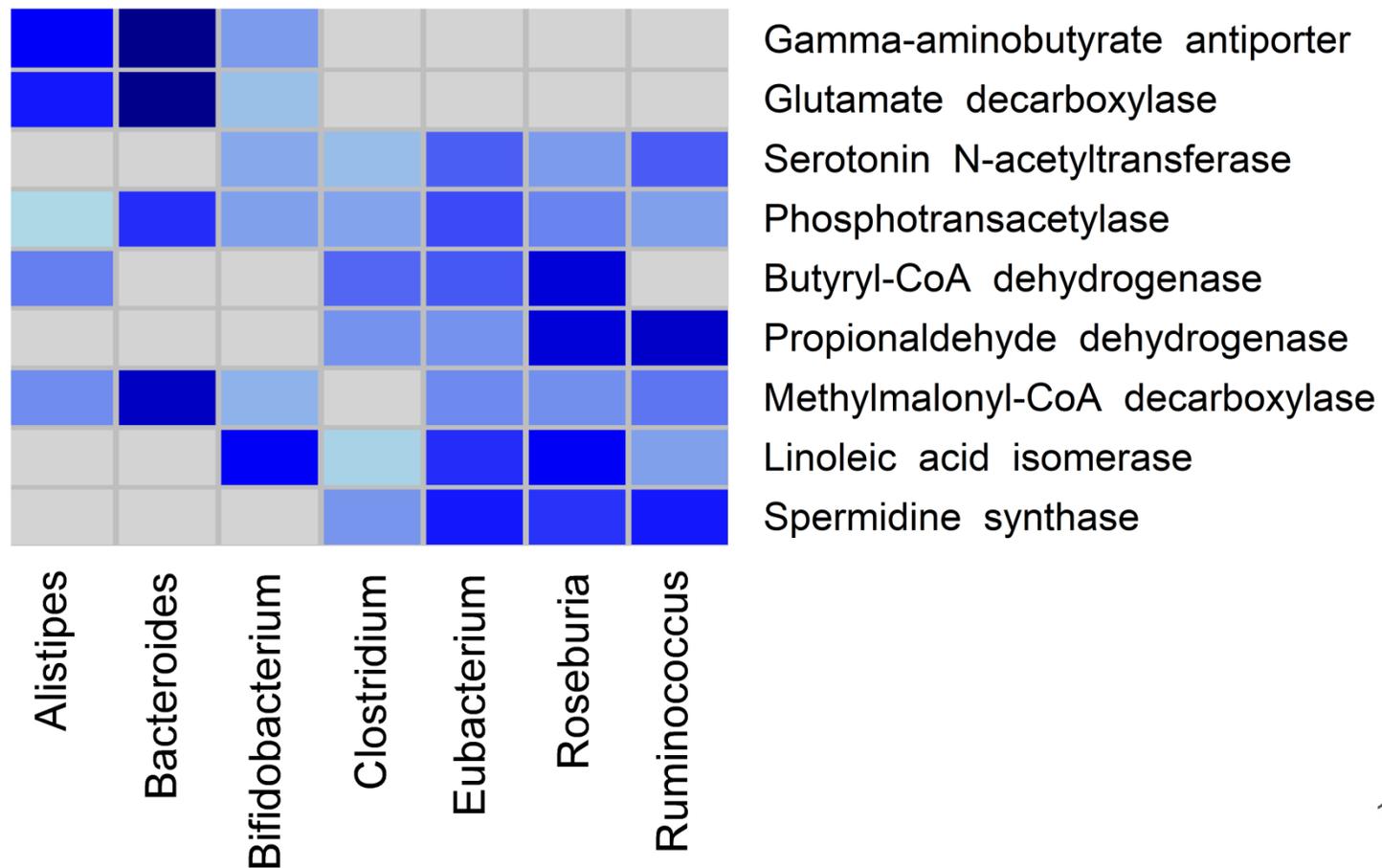
Gamma-aminobutyrate antiporter
 Glutamate decarboxylase
 Serotonin N-acetyltransferase
 Phosphotransacetylase
 Butyryl-CoA dehydrogenase
 Propionaldehyde dehydrogenase
 Methylmalonyl-CoA decarboxylase
 Linoleic acid isomerase
 Spermidine synthase

Изменения в коровой метагеномной сигнатуре при аутизме (высокая тяжесть заболевания)

КОНТРОЛЬ

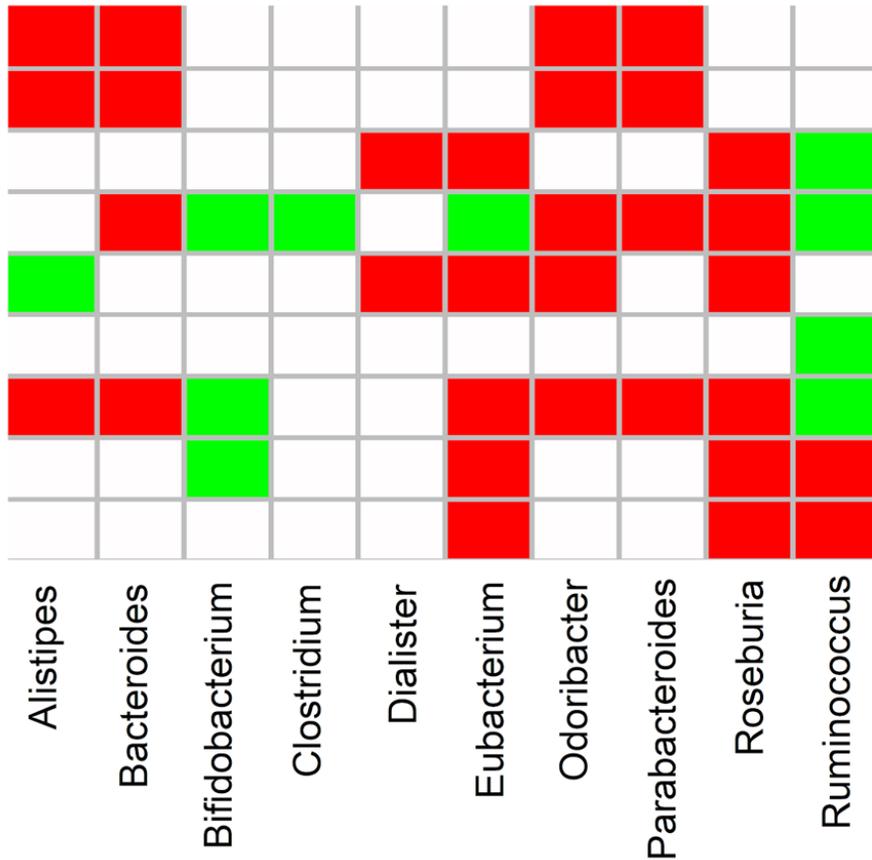


АУТИЗМ

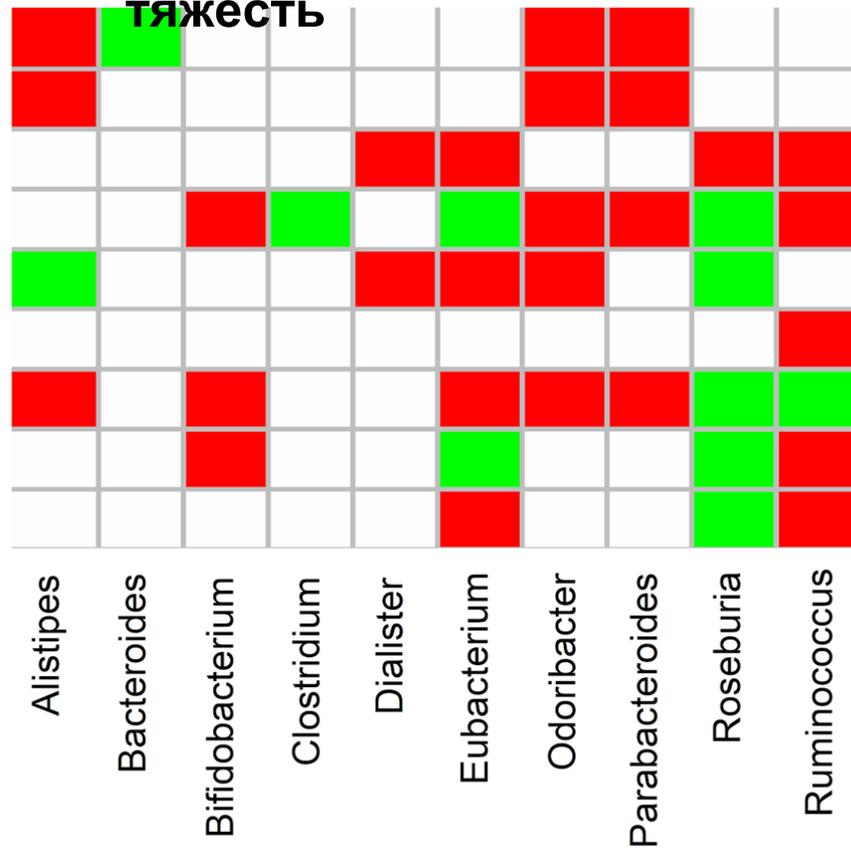


Изменения в метагеномной сигнатуре при аутизме (тест Манна-Уитни)

Аутизм, средняя тяжесть



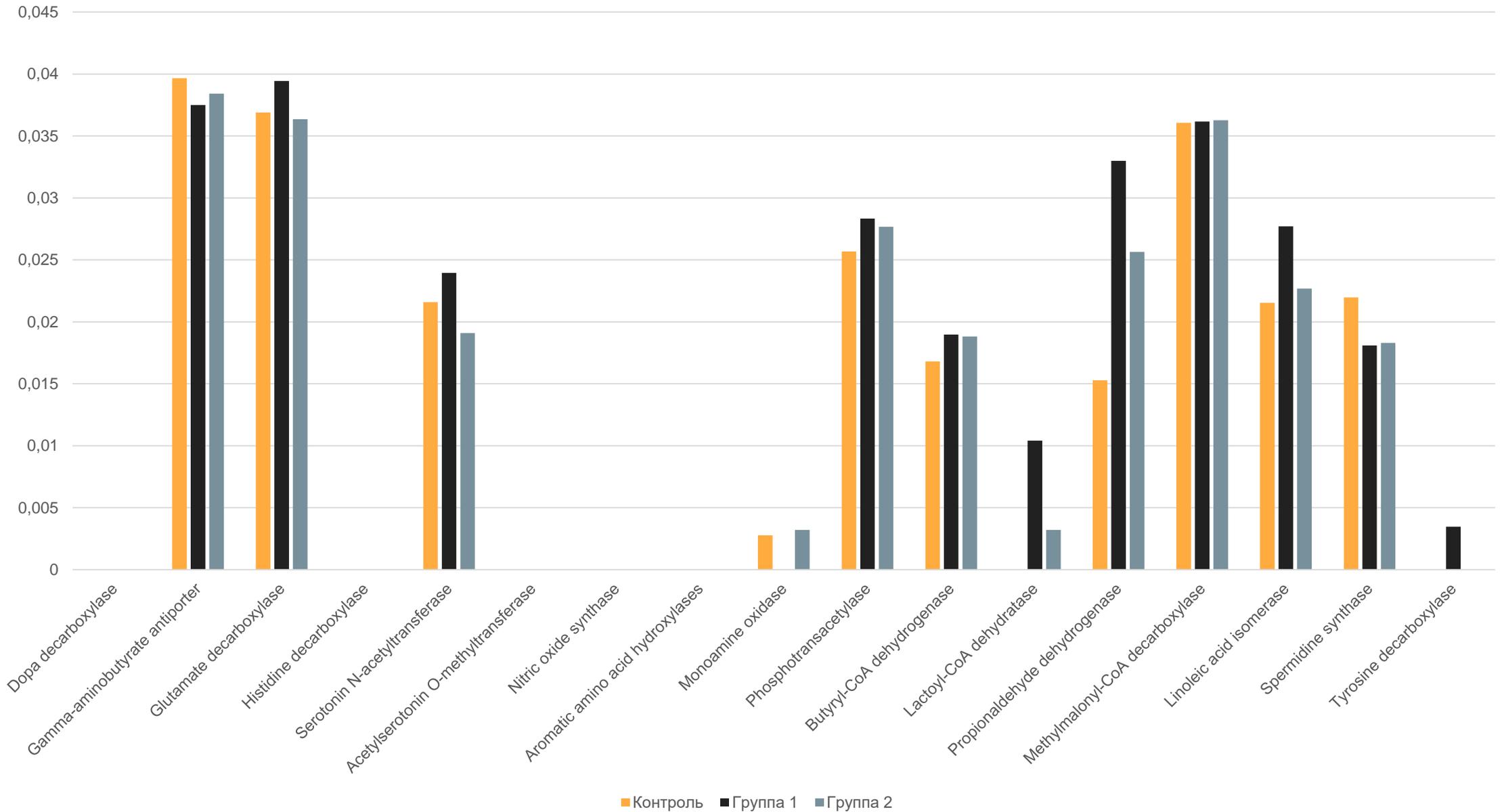
Аутизм, высокая тяжесть



- Glutamate decarboxylase
- Gamma-aminobutyrate antiporter
- Serotonin N-acetyltransferase
- Phosphotransacetylase
- Butyryl-CoA dehydrogenase
- Propionaldehyde dehydrogenase
- Methylmalonyl-CoA decarboxylase
- Linoleic acid isomerase
- Spermidine synthase

■ Снижение относительно контроля
■ Увеличение относительно контроля

Распределение генов нейроактивных соединений в метагеномах сравниваемых групп детей



Резюме

Микробиота кишечника детей с РАС отличается от здоровых детей снижением уровня биоразнообразия и по таксономическому составу. Значительная разница в численности наблюдается для представителей 20 доминирующих родов бактерий и соответствует опубликованным данным

Наблюдается разница в численности представителей отобранных 20 родов бактерий при сравнении метагеномов детей с различными проявлениями аутичности

Микробиом кишечника детей с РАС отличается от здоровых детей по бактериальному метаболическому потенциалу. Наблюдается разница в количестве для 11 генов. В метагеномах детей с различной тяжестью заболевания наблюдается увеличение числа генов, участвующих в синтезе короткоцепочечных жирных кислот, особенно пропионовой кислоты.

Разработка методов диагностики состояния микробиоты

- **Разработка диагностикумов на основе функциональных (стресс-адекватных) биомаркеров систем токсин-антитоксин II типа для видовой и штаммовой идентификации композиционного состава микробиоты ЖКТ**
- **Разработка диагностикумов для оценки нейромодулирующего, иммуномодулирующего, антиоксидантного потенциалов микробиоты ЖКТ**
- **Разработка специализированных диагностикумов для ранней стадии идентификации иммунных, психиатрических, нейродегенеративных, кардиометрических, онкологических и др. заболеваний.**

Подходы и пути коррекции микробиоты ЖКТ при различных дисбалансах (дисфункциях)

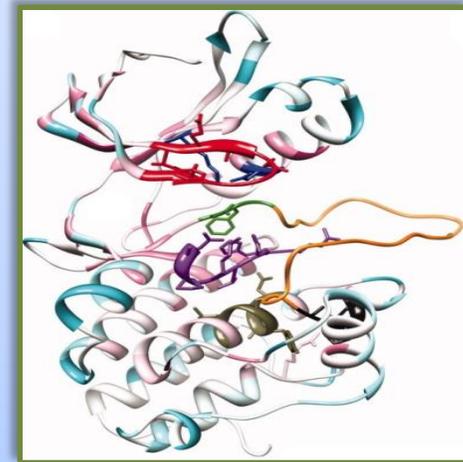
- **Применение фекальной трансплантации**
- **Селективные препараты бактериофагов учитывающие композицию CRISPR-Cas систем в микробиоте**
- **Применение пробиотиков нового поколения: психобиотиков, иммунобиотиков, антиоксибиотиков и др.**
- **Применение антибиотиков и их более мягкой формы ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ (воздействие на вирулентность, адгезию, модуляторы коммуникации внутри микробиоты и с организмом хозяина).**

Коррекция состава кишечной микробиоты при диабете 2 типа с помощью селективных ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ

	Phylum	Correlation with type 2 diabetes	
Gram-negative	<i>Bacteroidetes</i>	<i>phylum Bacteroidetes</i> « » ↑ <i>genus Bacteroides</i> « » ↑ <i>but species Bacteroides vulgates</i> « » ↓ <i>genus Parabacteroides</i> « » ↑ <i>genus Prevotella</i> « »/« » ↓ <i>genus Alistipes</i> « » ↑	
	<i>Proteobacteria</i>	<i>phylum Proteobacteria</i> « » ↑ <i>class Betaproteobacteria</i> « » ↑ <i>species Escherichia coli</i> « » ↑ <i>species Desulfovibrio</i> « » ↑	
Gram-positive	<i>Firmicutes</i>	<i>phylum Firmicutes</i> <i>and class Clostridia</i> « » ↓ <i>family Lachnospiraceae</i> « » ↑ <i>but genus Clostridium</i> « » ↑ <i>class Bacilli</i> « » ↑ <i>genus Lactobacillus</i> « » ↑ <i>genus Roseburia</i> « » ↓ <i>genus Subdoligranulum</i> « » ↑	
	<i>Actinobacteria</i>	<i>relative abundances of Actinobacteria unchanged</i> <i>but genus Bifidobacterium</i> « » <i>species Eggerthella lenta</i> « » ↓	
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>species Akkermansia muciniphila</i> « » ↑	
			↑
			↑



В лаборатории ведется метагеномный анализ кишечной микробиоты (КМ) от лиц с диабетом 2 типа (Д2Т) и от контрольной группы лиц, который позволит идентифицировать СТПК тех групп бактерий, наличие и количество которых будет отлично у лиц с Д2Т по сравнению с контрольной группой.



Выявленные СТПК могут быть предложены в качестве потенциальных биомишеней для селективных ингибиторов, разработка и применение которых позволит корректировать таксономический состав КМ при Д2Т.

Тестирование препарата Бактогамк на линии мышей BALB/c

В одной капсуле содержится:

- 1 x 10⁸ КОЕ *L. plantarum***
- 1 x 10⁸ КОЕ *B. adolescentis***

В течении 2-х недель:

Группа 1 (n=12) — получала препарат БАКТОГАМК

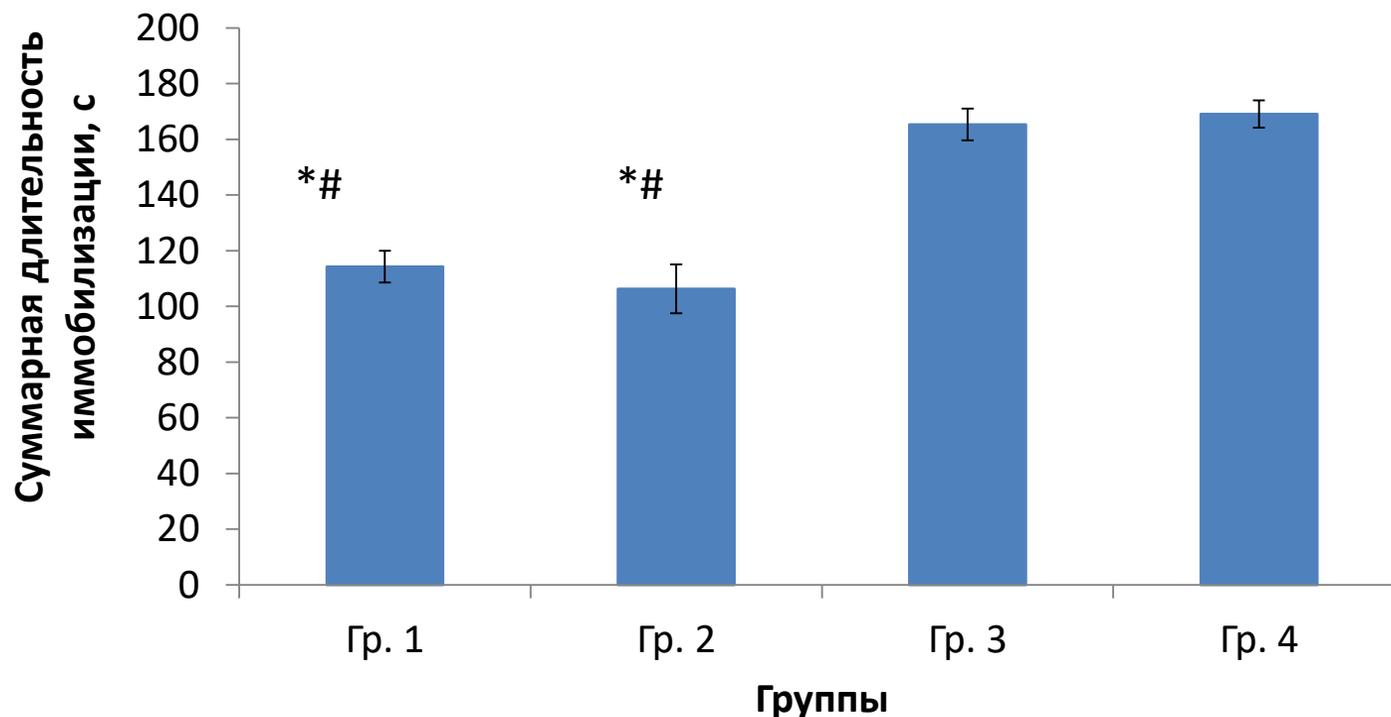
Группа 2 (n=12) — получала препарат сравнения флуоксетин

Группа 3 (n=12) — получала глутамат натрия

Группа 4 (n=12) — получала физ-раствор

Животных опускали в сосуд наполненный водой на 6 минут, при этом регистрация поведения проводилась со 2-й по 6-ю минуту. Фиксировалась длительность периодов (в секундах) активного плавания и иммобилизации.

Результаты теста Порсолта

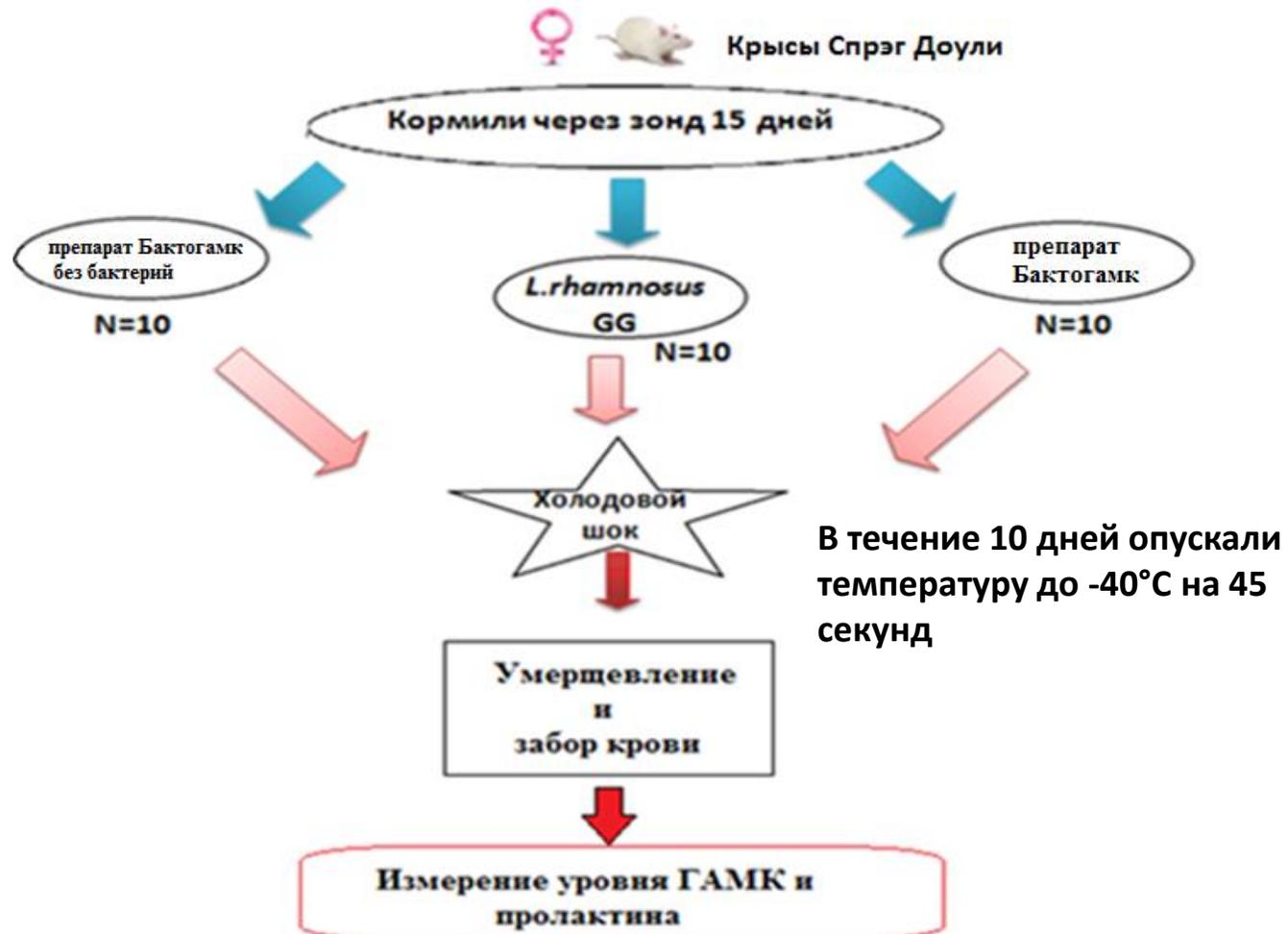


- Гр.1 — препарат БАКТОГАМК
- Гр.2 — флуоксетин
- Гр.3 — глутамат натрия
- Гр.4 — стерильный физ. раствор

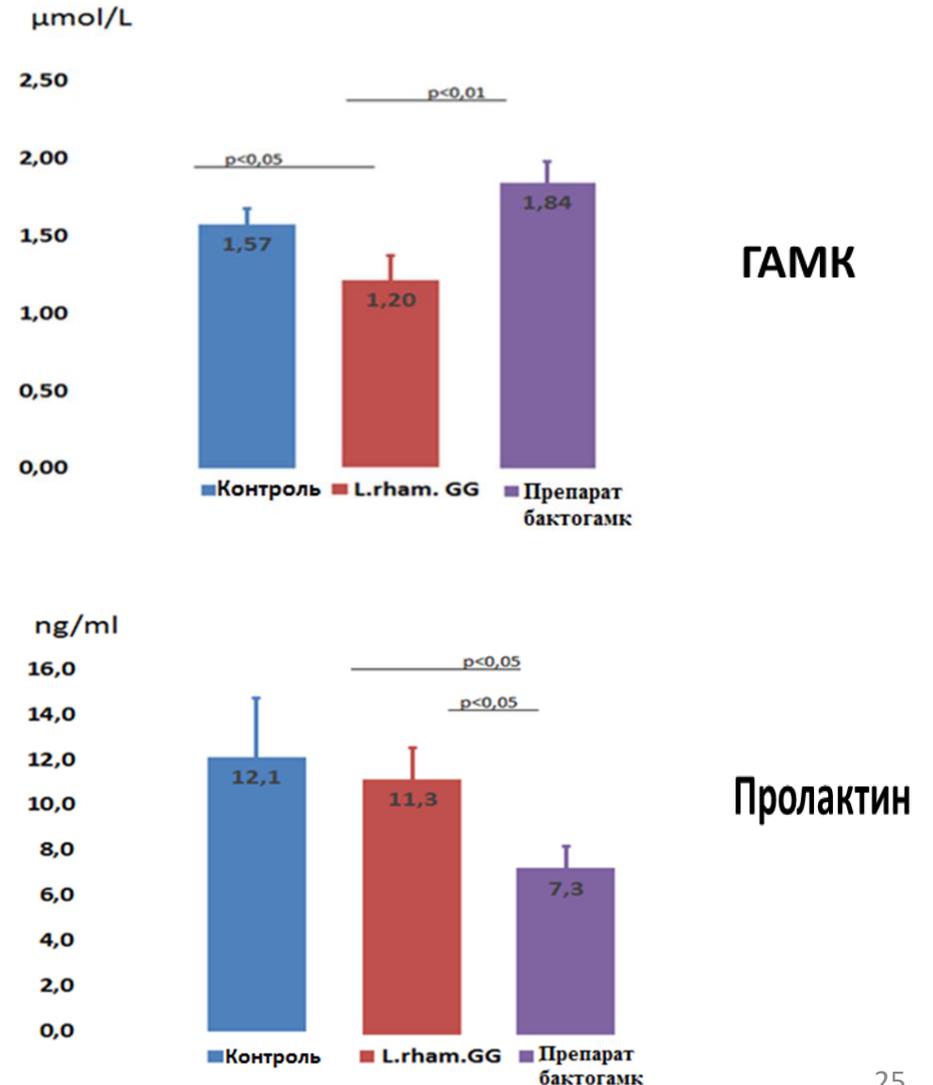
Показатели депрессивноподобного состояния мышей BALB\с под влиянием двухнедельного введения БАКТОГАМКА (гр.1), флуоксетина (гр.2), глутамата натрия (гр.3) и дистиллированной воды (гр.4). *# — статистически значимые отличия от 4 группы (контроль) и 3 группы (глутамат натрия), соответственно (U-критерий Манна-Уитни).

Юнес Р.А., Ковалев Г.П. и др.2018

Тестирование препарата Бактогамк на линии крыс Спрэг Доули



Количество ГАМК и пролактина в крови крыс Спрэг-Доули по окончании опыта



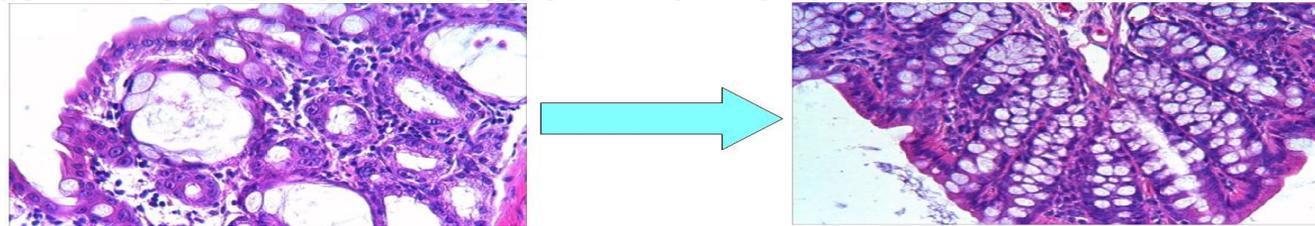
Эффективность применения Lb47f (*Lactobacillus brevis* 47f)

1. Введение 5-фторурацила сопровождается выраженными явлениями мукозита кишечника:

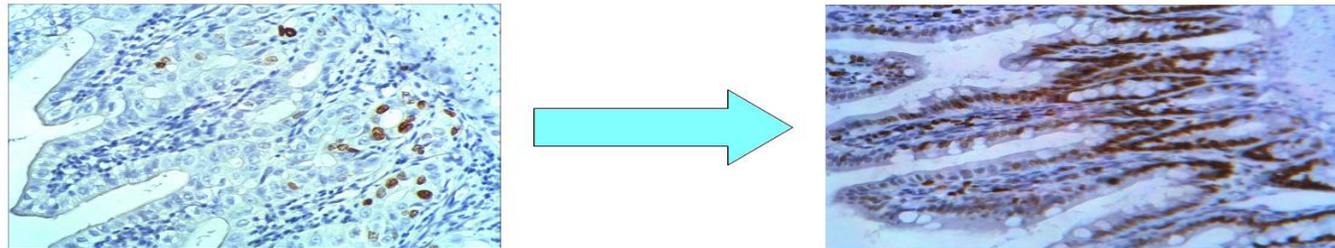
- истончение ворсин,
- снижение количества бокаловидных (слизеобразующих) клеток,
- резкое падение пролиферативной активности энтероцитов.

2. Пероральное введение Lb47f перед инъекциями 5-фторурацила:

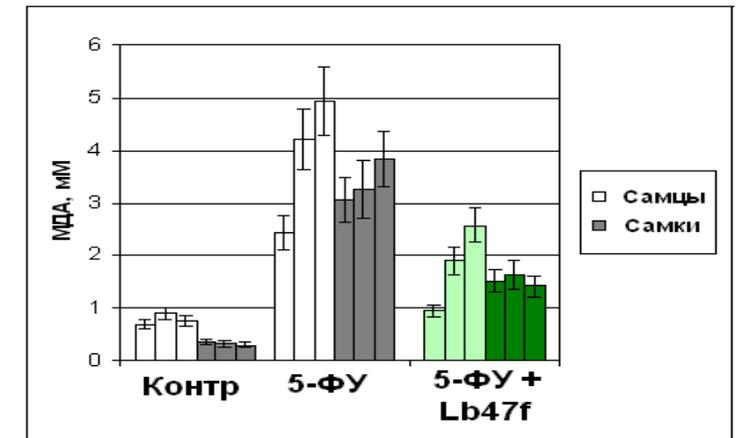
- оказывает протективный эффект в отношении ворсин тонкого и толстого кишечника



- предотвращает снижение пролиферации энтероцитов



- сдерживает рост концентрации МДА в крови и кишечнике.



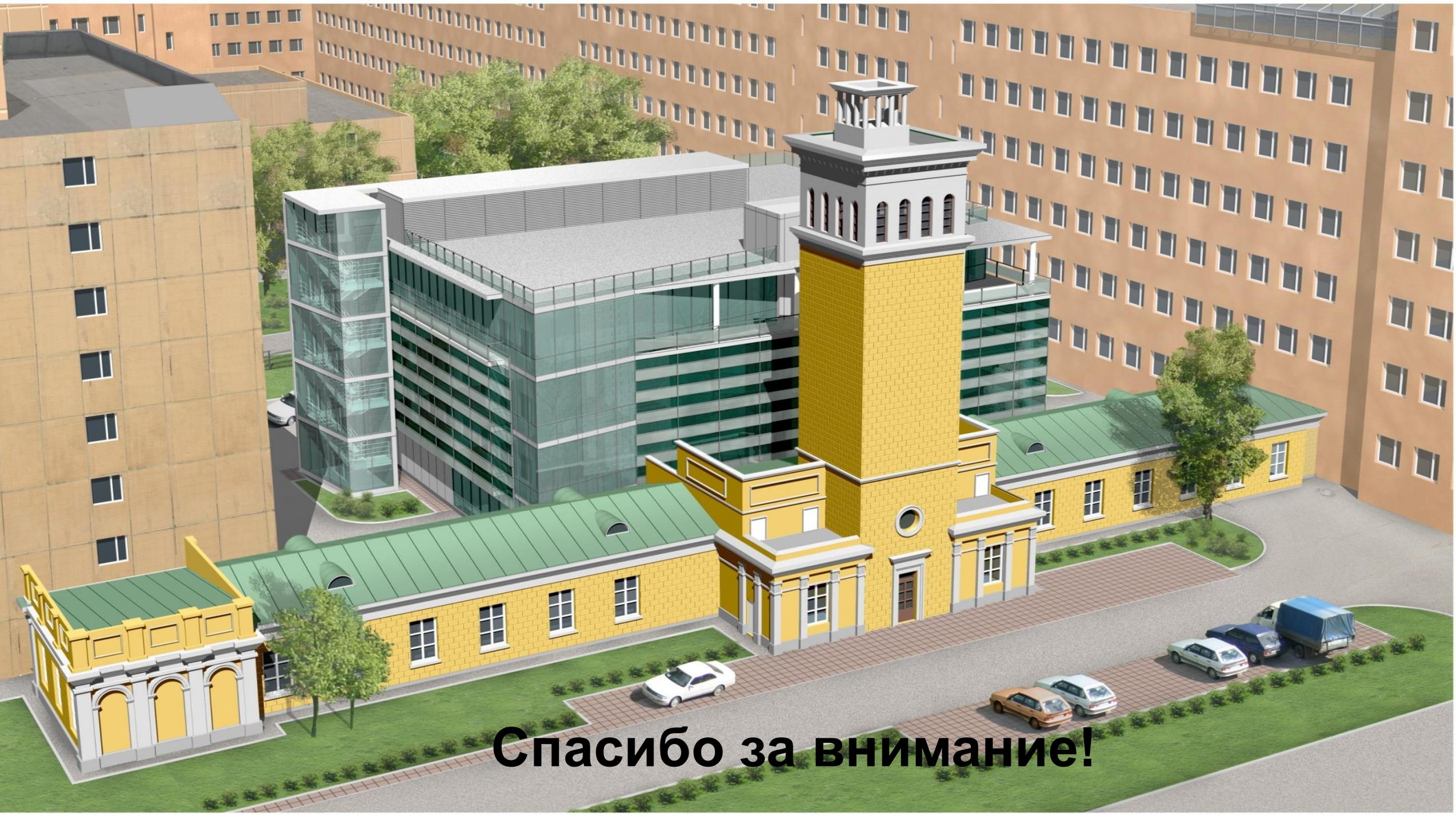
Марсова М.В. и др. 2018

Выводы и рекомендации

- **Охарактеризовать состояние микробиоты в норме (компонентный состав, композиция генов).**
- **Выявить генетические, функциональные маркеры коррелирующие с ключевыми заболеваниями.**
- **Разработать стратегии восстановления микробиоты.**
- **На основе полученных знаний и технологий о микробиоте разработать функциональное питание для конкретных групп населения и индивидуумов.**

Почему Россия может быть лидером в создании фармабиотиков

- **Переход от эры классических пробиотиков (продолжающейся около 100 лет после их открытия Мечниковым) к эре фармабиотиков основан на новых парадигмах и технологиях.**
- **Создание фармабиотиков основано на комплексном подходе использования мировых научных и технологических достижений последних лет в области микробиоты (микробиом) человека.**
- **Принципиально важным является понимание того факта что препараты должны создаваться для каждой крупной культурно-региональной популяции людей. Это основано на открытие у бифидобактерий и лактобацилл большой группы важных генов характерных только для популяции Российских жителей.**
- **Впервые в мире в рамках программы «ФАРМА 2020» проведено доклиническое изучение фармпрепаратов для лечения язвенного колита и антиоксидантного препарата снимающего воспалительные процессы ЖКТ**
- **Впервые в мире (в России ИОГен РАН) сформирован каталог генов микробиоты кишечника, обладающих нейромодулирующей активностью и алгоритмом для выявления основных параметров (комбинаций) характеризующих микробиоту в норме и при некоторых заболеваниях.**
- **Программа ФАРМА 2030 позволит создать линейку препаратов: психобиотиков, иммунобиотиков, антиоксибиотиков и др. для таргетного лечения различных заболеваний в том числе путем коррекции микробиоты.**



Спасибо за внимание!