

Центр изучения микробиома: фундаментальные и прикладные исследования



Елена Михаленко,
ведущий научный сотрудник
лаборатории экологической
генетики и биотехнологии
Института генетики и
цитологии НАН Беларуси,
кандидат биологических наук



Елена Гузенко,
заместитель директора по
научной и инновационной
работе Института генетики
и цитологии НАН Беларуси,
кандидат биологических наук



Александр Кильчевский,
главный научный сотрудник
лаборатории экологической
генетики и биотехнологии
Института генетики и
цитологии НАН Беларуси,
академик



XXI век является веком биологии. По сути дела сбывается предсказание великого физика Нильса Бора, который в 50-х гг. прошлого столетия неоднократно заявлял, что в ближайшем будущем наиболее интенсивное проникновение в тайны природы станет прерогативой не физики, а именно биологии. Наиболее продуктивной в этом отношении оказалась молекулярная генетика, что стало возможным благодаря новым методологическим подходам и технологиям.

Именно развитие технологий секвенирования 16S рибосомальной РНК, а также полногеномного секвенирования позволило успешно реализовать

несколько проектов по изучению микробиома человека (Human Microbiome Project и Metagenomics of Human Intestinal Tract) [1]. Получена обширная по своим масштабам и значению информация о составе и метаболической активности микробиоты различных сред организма. Признано, что микробное сообщество является фундаментальным фактором, определяющим физиологическое состояние организма-хозяина [2, 3]. Например, микробиота кишечника представляет собой сложную экосистему, которая выполняет множество важных функций в организме, таких как пищеварение, иммунитет,

производство витаминов и других важных метаболитов, а также воздействует на высшие нервные функции [4, 5]. Однако это влияние не одностороннее: микробиом не просто определяет некоторые характеристики организма-хозяина, но также зависит от ряда факторов [3], воздействие которых эмпирически можно разделить на три категории (рис. 1): внутренние факторы хозяина (генетика, пол, возраст); внешние факторы хозяина (физическая активность, диета, привычки); факторы окружающей среды.

Именно идентификация механизмов взаимодействия генома хозяина и микробиома, а также

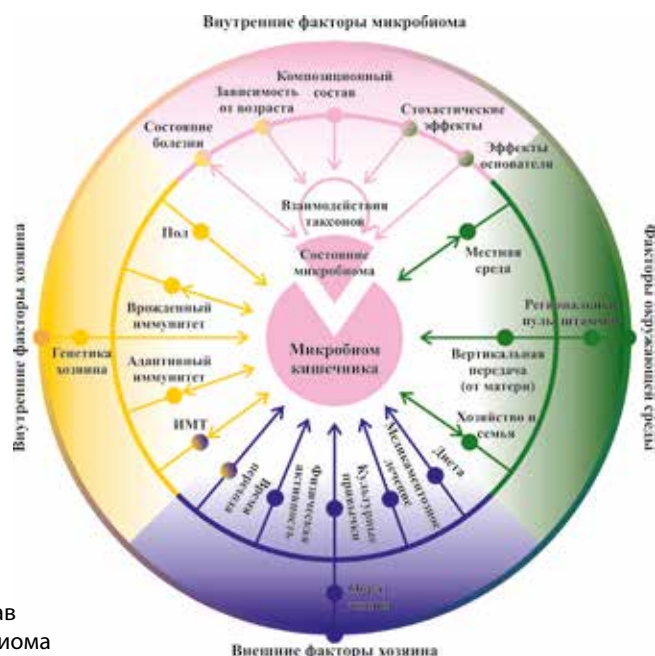


Рис. 1. Факторы, влияющие на состав и функции микробиома
Источник: адаптировано из [3]

использование этих знаний для решения задач фундаментальной биологии и практической медицины – основная цель работ Республиканского центра изучения микробиома, созданного на базе Института генетики и цитологии НАН Беларуси по поручению Председателя Президиума НАН Беларуси В.Г. Гусакова (открытие состоялось 7 декабря 2021 г.).

Основными направлениями фундаментальных и прикладных исследований Республиканского центра изучения микробиома являются:

- изучение особенностей микробиома у долгожителей и его влияния на реализацию отдельных молекулярно-генетических характеристик генома человека;
- изучение микробиома человека в норме и при патологии, его роли в поддержании здоровья и в патогенезе заболеваний;
- разработка метагеномных технологий определения микробиома человека и почвы для решения задач судебной экспертизы;

- исследование микробиома почвы для решения задач сельского хозяйства;
- анализ микробиоты желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных, ее корреляции с показателями здоровья и продуктивности, рационом кормления.

Реализация данных направлений будет осуществляться совместно с другими заинтересованными учреждениями Национальной академии наук Беларуси, Министерства здравоохранения, Министерства сельского хозяйства и продовольствия, Министерства образования и др.

Изучение особенностей генома и микробиома у долгожителей Беларуси

Несмотря на большое количество теорий, пытающихся объяснить процессы старения, полностью понять его механизмы до сих пор не удалось. Наибольшую популярность имеют инте-

гративные теории, описывающие этот феномен как многофакторное явление, включающее в себя сложные взаимодействия на молекулярном и клеточном уровнях [6]. В этой связи уже сейчас понятно, что в поиске биомаркеров возрастных изменений не удастся выделить какой-то один простой показатель, позволяющий оценивать происходящие изменения, а для определения биологического возраста разумнее рассматривать комплекс различных характеристик организма, включая особенности генома и микробиома человека [7].

Основным постулатом при изучении вклада генетических особенностей человека и его микробиома в процессы старения является предположение, что сходный фенотипический эффект может быть достигнут как за счет собственных генетических особенностей, так и за счет функционирования генетической системы, составляющей микробиом [8].

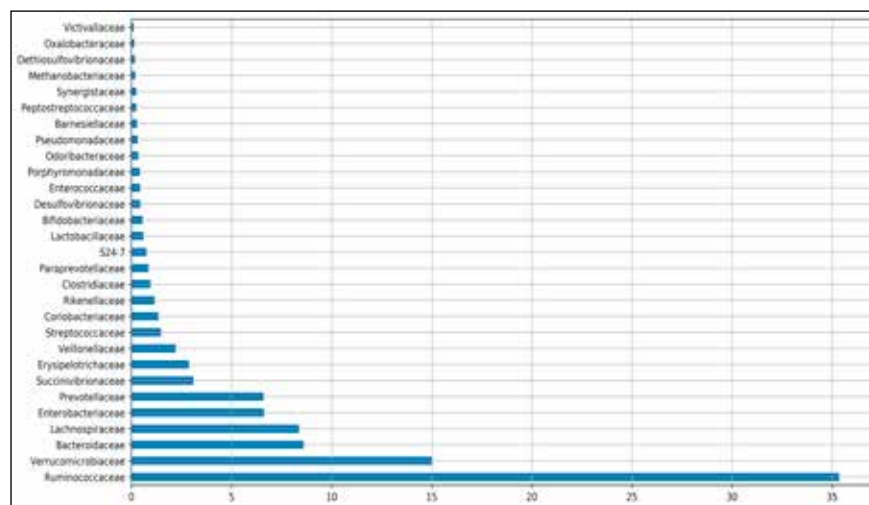
Сотрудники Центра совместно с коллегами из БелМАПО участвуют в выполнении проекта НАН Беларуси «Роль микробиома в реализации особенностей генома долгожителей Беларуси». В ходе работы обследованы добровольцы старших возрастных групп (в возрасте 60–89 лет) и долгожителей (старше 90 лет), изучены их клинично-фенотипические показатели с оценкой антропометрических (рост, масса тела и ее индекс), клинично-функциональных данных, а также анализа некоторых средовых факторов (место проживания, состав семьи, наследственность, хобби, вредные привычки, социальное взаимодействие). Изучение микробиома кишечника у добровольцев проводили с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования компании Illumina.

Выявлено, что наиболее стабильный компонент в исследованных образцах микробиома составляли представители семейств *Ruminococcaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Bacteroidaceae* и *Lachnospiraceae* (рис. 2). С увеличением возраста уменьшается количество бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, а также наблюдается тенденция к сокращению количества бактерий семейства *Erysipelotrichaceae*. При иерархической кластеризации образцов микробиома добровольцев выделяется кластер, в котором доминировали виды бактерий рода *Akkermansia* (от 5,89 до 52,86%).

Изучение микробиома человека при патологических состояниях и различных заболеваниях

лиз [8]. До последнего времени изучение состава и функциональной активности микробиоты человека было крайне ограничено в связи с невозможностью культивирования подавляющего большинства микроорганизмов на питательных средах. Эту проблему позволяют решить современные методы диагностики, при этом в клинической практике все активнее используется метагеномный анализ по технологии высокопроизводительного секвенирования (табл. 1).

вания – серьезная проблема для детского здравоохранения [8, 12].



недавно описанный патоген, фенотипически неотличимый от *E. coli*, который смогли выделить только с появлением новых метагеномных технологий [13]. Эти результаты позволили правильно скорректировать схему лечения.

Метагеномное секвенирование ДНК из биопсийного материала толстой кишки позволяет определить совокупность микробиомного сообщества, которое невозможно выявить классическими методами, используемыми в медицине. Полученные данные о распространенности кишечных патогенов у детей с недифференцированными колитами, их этиологической значимости, клиническом течении позволят разработать метод дифференциальной диагностики инфекционной патологии толстой кишки у пациентов детского возраста.

Эти исследования проводятся совместно с сотрудниками кафедры детских инфекционных заболеваний Белорусского государственного медицинского университета в рамках выполнения

задания «Разработать и внедрить метод дифференциальной диагностики инфекционной патологии толстой кишки у пациентов детского возраста с недифференцированными колитами» (2022–2024 гг.) подпрограммы «Инновационные биотехнологии» (задача 5) ГП «Наукоемкие технологии и техника» на 2021–2025 гг.

Метагеномные исследования микробиома кишечника медоносной пчелы

Медоносная пчела *Apis mellifera* – вид общественных насекомых с уникальным комплексом приспособлений к неблагоприятным условиям внешней среды. Характеристики их колонии – результат симбиотической связи посредством химических сигналов организма насекомого с микробиомным сообществом его кишечника, который считается дополнительным органом, состоящим из небольшого анаэробного

сообщества грамотрицательных (роды *Apibacter*, *Bartonella*, *Commensalibacter*, *Gilliamella*, *Parasaccharibacter*, *Saccharibacter*, *Serratia*, *Snodgrassella*, *Frischella*) и грамположительных (роды *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) видов бактерий. Они прошли длительную коэволюцию с пчелами и накопили уникальные гены, обеспечивающие иммунитет, адаптацию и детоксикацию ксенобиотиков и пестицидов [14]. Микробиом кишечника медоносных пчел способствует ускорению роста, увеличению массы тела и продолжительности жизни особей, лучшему усвоению ими пищи. Микроорганизмы синтезируют биологически активные вещества, участвуют в метаболизме некоторых соединений, способствуя усвоению питательных веществ. Все это свидетельствует о том, что геном медоносной пчелы и метагеном кишечного микробиома объединены в единый, функционально связанный сложный геном. Метагеномный анализ кишечного микробиома

Метод	Бактериологический метод	Метод ПЦР	Секвенирование по Сэнгеру	Метод метагеномного анализа
Длительность выполнения методики	1 образец Время 3–6 дней	24 образца Время – 2,5 часа	8 образцов Время – 3,5 дня	384 образца Время – 2 дня
Количество детектируемых микроорганизмов	можно идентифицировать лишь ограниченную долю существующих кишечных микробов ПКФ (около 5) Селективные среды (1)	один вид	секвенировании одного геномного участка микроорганизма	несколько сотен видов в каждом исследуемом образце (метагеномный анализ всего бактериального микробиома)
Условия выполнения метода	наличие среды для культивирования	наличие праймеров для детекции микроорганизмов. Одна ПЦР – только один микроорганизм	наличие праймеров для детекции микроорганизмов. Одна ПЦР – только один микроорганизм	наличие специального набора реагентов
Культивирование	да	нет	нет	нет
Количество микроорганизмов в образце для детекции	значимо	минимальное	минимальное	минимальное
Анаэробные бактерии	не детектирует	детектирует	детектирует	детектирует

Таблица 1. Сравнительный анализ методов исследования микроорганизмов

медоносных пчел, обитающих в Беларуси, будет проведен в рамках проекта «Изучение микробиоценоза желудочно-кишечного тракта медоносной пчелы *Apis mellifera mellifera* с целью повышения естественного иммунитета и продуктивности», который подан для формирования научной программы кластера по пчеловодству.

Метагеномные технологии определения микробиома для решения задач судебной экспертизы

В настоящее время формируется новая научно-техническая программа Союзного государства «Разработка инновационных технологий генетической идентификации криминалистически значимых биологических объектов для повышения эффективности раскрытия преступлений» («ДНК-идентификация-2»). Одно из ее мероприятий – «Разработка метагеномной технологии определения микробиомов человека и почвы для решения задач судебной экспертизы». Поставлена задача – получить эффективную и конкурентоспособную технологию анализа метагеномных данных микробиома человека для определения принадлежности биологического материала конкретному индивиду. Предполагается, что генетические маркеры микробиома кожи и слизистых, а также кишечника предоставляют дополнительную генетическую информацию, которую можно использовать независимо или в сочетании с генетическими маркерами человека для идентификации индивида. Наличие индивидуальных сигнатур микробиома позволяет приме-

нять технологии профилирования микробиома для решения судебно-криминалистических задач [11, 15]. В результате будет создана референсная база данных выявленных микробиомных маркеров, на которых основывается разработка методического руководства для определения принадлежности биологического материала конкретному лицу.

Современные достижения биологии и физики позволяют получать информацию для идентификации места преступления. Для решения этой задачи будут проводиться научные исследования по выявлению качественного и количественного состава почвенного микробиома различных экосистем, а также определению гранулометрического состава почв и почвогрунтов. Планиру-

ется создать технологию в виде прикладной компьютерной программы, содержащей базы метаданных микробиома почв из различных географических регионов и экосистем, а также картографических схем с указанием на них территорий наиболее и наименее вероятного происхождения представленного образца микробиома почвы для повышения эффективности проведения розыскных действий.

Таким образом, Республиканский центр изучения микробиома Института генетики и цитологии НАН Беларуси, являясь многопрофильным учреждением, совместно с заинтересованными организациями Национальной академии наук успешно решает фундаментальные и прикладные задачи различных отраслей. ■

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project / J. Lloyd-Price [et.al.] // Nature. 2017. Vol. 550(7674). P. 61–66. doi: 10.1038/nature23889.
2. Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome / S. Abubucker [et.al.] // PLoS Comput Biol. 2012; 8: e1002358.
3. Schmidt TS, Raes J, Bork P. The human gut microbiome: from association to modulation // Cell. 2018. Vol. 72 (6). P. 1198–1215. doi:10.1016/j.cell.2018.02.044.
4. Gomaa E.Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review // Antonie Van Leeuwenhoek. 2020. Vol. 113(12). P. 2019–2040. doi: 10.1007/s10482–020–01474–7.
5. Adak A., Khan M.R. An insight into gut microbiota and its functionalities / A. Adak, M.R. Khan // Cell Mol Life Sci. 2019. Vol. 76(3). P. 473–493. doi: 10.1007/s00018–018–2943–4.
6. Weiner B.T., Timiras P.S. Invited review: Theories of aging / B.T. Weiner, P.S. Timiras // J. Appl. Physiol. 2003. Vol. 95. P. 1706–1716.
7. Elon R.D. Perspectives on the future of geriatric medicine / R.D. Elon // J. Am. Med. Dir. Assoc. 2006. Vol. 7 (3). P. 197–200.
8. The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease/ Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium // Cell Host Microbe. 2014. Vol. 16(3). P. 276–89. doi: 10.1016/j.chom.2014.08.014.
9. Y. Naito, K. Uchiyama, T. Takagi. A next-generation beneficial microbe: *Akkermansia muciniphila* / Y. Naito, K. Uchiyama, T. Takagi // J. Clin. Biochem. Nutr. 2018. Vol. 63. P. 33–35. doi.org/10.3164/jcbn.18–57.
10. Gut microbiota and extreme longevity / E. Biagi [et.al.] // Curr. Biol. 2016. Vol. 26. P. 1480–1485.
11. Human Gut Microbiome Aging Clock Based on Taxonomic Profiling and Deep Learning / F. Galkin [et.al.] // iScience. 2020. Vol. 23(6):101199. doi: 10.1016/j.isci.2020.101199.
12. The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: A tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions / S.M. Vindigni [et.al.] // Therapeuti Advances in Gastroenterology. 2016. Vol. 9. P. 606–625.
13. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli* / Denamur E. [et.al.] // Nat Rev Microbiol. 2021;19(1):37–54. doi: 10.1038/s41579–020–0416–x.
14. Review of the expression of antimicrobial peptide defensin in honey bees *Apis mellifera* L. R.A. Ilyasov [et.al.] // Journal of Apicultural Science. 2012. Vol. 56(1). P. 115–124. doi: 10.2478/v10289–012–0013–y.
15. Human gut microbiome aging clocks based on taxonomic and functional signatures through multi-view learning / Y. Chen [et.al.] // Gut Microbes. 2022. Vol. 14(1):2025016. doi: 10.1080/19490976.2021.2025016.