

Кишечная микробиота: современные представления о видовом составе, функциях и методах исследования

А.А. Кожевников¹, К.В. Раскина², Е.Ю. Мартынова², к.б.н. А.В. Тяхт³, А.В. Перфильев⁴, член-корр. РАН О.М. Драпкина⁵, член-корр. РАН Д.А. Сычев⁶, И.Р. Фатхутдинов⁴, С.В. Мусиенко³, Д.А. Никогосов³, И.О. Жегулина⁴, Л.Г. Бавыкина⁴, к.м.н. А.В. Каршиева⁴, к.м.н. К.С. Селезнева⁴, к.б.н. Д.Г. Алексеев^{3,7}, к.м.н. Ю.Е. Потешкин^{1,4}

¹ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

²ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России

³Биомедицинский холдинг «Атлас», Москва

⁴ООО «Медицинский центр Атлас», Москва

⁵ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России, Москва

⁶ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва

⁷ФГАУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

РЕЗЮМЕ

Кишечная микробиота – это совокупность различных видов микроорганизмов, населяющих кишечник человека. По последним данным, число ее представителей не меньше, чем клеток в человеческом организме, а число родов и видов, по оценкам, превышает 50 и 500 соответственно. В ходе обширного исследования европейской (MetaHIT) и американской (HMP) популяций было выяснено, что доминируют в составе микробиоты микроорганизмы типов *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. В настоящее время активно обсуждается концепция энтеротипов кишечной микробиоты, которая постулирует существование устойчивых кластеров ключевых родов бактерий в организме человека, не являющихся континент- и популяционно-специфичными – это энтеротипы с преобладанием *Bacteroides*, *Prevotella* и *Ruminococcus*. Доминирование тех или иных видов зависит во многом от возраста макроорганизма. Имеются данные о том, что микроорганизмы могут заселять пищеварительный тракт плода еще до рождения. Микробиота кишечника выполняет защитную функцию, участвует в регуляции иммунной, нервной и эндокринной систем, является важным участником пищеварительных процессов, синтезирует витамины групп В и К, местные антибиотики, короткоцепочечные жирные кислоты, играет важную роль в нейтрализации лекарств и ксенобиотиков. В статье приводятся краткое описание и сравнение особенностей традиционных и современных методов исследования микробиоты.

Ключевые слова: микробиота, точная медицина, энтеротип, культуральный метод, секвенирование, полимеразная цепная реакция, ПЦР, ПЦР в реальном времени, масс-спектрометрия, 16s рРНК, shotgun-sequencing, RT-Q-PCR.

Для цитирования: Кожевников А.А., Раскина К.В., Мартынова Е.Ю. и др. Кишечная микробиота: современные представления о видовом составе, функциях и методах исследования // РМЖ. 2017. № 17. С. 1244–1247.

ABSTRACT

Intestinal microbiota: modern concepts of the species composition, functions and diagnostic techniques

Kozhevnikov A.A.¹, Raskina K.V.², Martynova E.Yu.², Tyakht A.V.³, Perfiliev A.V.⁴, Drapkina O.M.⁵, Sychev D.A.⁶, Fatkhutdinov I.R.⁴, Musienko S.V.³, Nikogosov D.A.³, Zhegulina I.O.⁴, Bavykina L.G.⁴, Karshieva A.V.⁴, Selezneva K.S.⁴, Alekseev D.G.^{3,7}, Poteshkin Yu.E.^{1,4}

¹Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow; ²First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov;

³Biomedical Holding «Atlas», Moscow; ⁴«Atlas Medical Center», Moscow; ⁵National Medical Research Center for Preventive Medicine, Moscow; ⁶Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow; ⁷Novosibirsk State National Research University

Intestinal microbiota is a community of different types of microorganisms inhabiting the human intestine. According to the latest data, the number of its representatives is not less than the number of cells in the human body, and the number of genera and species is estimated to exceed 50 and 500, respectively. In the course of an extensive study of the European (MetaHIT) and American (HMP) populations, it was found that *Bacteroidetes* and *Firmicutes* are the dominant types of microorganisms in microbiota. Currently, the concept of the intestinal microbiota enterotypes is actively discussed. It postulates the existence of stable clusters of key bacterial genera in the human body that are not continent-specific and population-specific: they are enterotypes with the predominance of *Bacteroides*, *Prevotella* and *Ruminococcus*. The dominance of these or other species depends largely on the age of the individual. There is evidence that microorganisms can colonize the digestive tract of the fetus even before birth. The intestinal microbiota performs a protective function, participates in the regulation of the immune, nervous and endocrine systems, is an important participant in the digestive processes, synthesizes B and K vitamins, local antibiotics, short-chain fatty acids, plays an important role in neutralizing drugs and xenobiotics. The article briefly describes and compares the features of traditional and modern methods of microbiota research.

Key words: microbiota, precision medicine, enterotype, culture method, sequencing, polymerase chain reaction, PCR, real-time PCR, mass spectrometry, 16s rRNA, shotgun-sequencing, RT-Q-PCR.

For citation: Kozhevnikov A.A., Raskina K.V., Martynova E.Yu. et al. Intestinal microbiota: modern concepts of the species composition, functions and diagnostic techniques // RMJ. 2017. № 17. P. 1244–1247.

Введение

Актуальность данного обзора обусловлена появлением в настоящее время новых сообщений, касающихся взаимосвязи кишечной микробиоты и заболеваний человека, а также распространением более точных методов диагностики и формированием открытых баз данных, в которых регистрируется информация о генетическом составе и функциях микробиоты. Возрастающий интерес к обитателям кишечника находит отражение в динамике числа публикаций на информационном ресурсе PubMed: по запросу «gut microbiota» можно найти всего 8 статей, датированных 2000 годом, 531 статью – 2011-м, и уже 3189 статей – 2016-м. Открываются новые перспективы использования

микробиоты в клинической практике в качестве точки приложения терапевтического вмешательства. Принимая во внимание тот факт, что состав микробиоты является индивидуальным для каждого человека, ее исследование как нельзя лучше вписывается в набирающую силу концепцию точного медицинского подхода. Данная статья – первая из цикла обзоров, посвященных наиболее актуальным особенностям микробиоты кишечника – знакомит читателей с составом микробиоты, ее основными функциями, а также представляет традиционные и инновационные методы исследования.

Кишечная микробиота (далее – микробиота) представляет собой множество различных видов микроорганизмов, населяющих кишечник человека. Это более 50 родов и более 500 видов бактерий, количество которых в ЖКТ человека превышает 10^{14} , что на один порядок больше числа клеток человеческого организма [1]. Данные некоторых молекулярно-филогенетических исследований свидетельствуют о наличии в человеческом кишечнике от 15 до 36 (!) тысяч видов бактерий [2]. Тем не менее дискуссии о количестве микробов в организме человека не утихают до сих пор. В 2016 г. были опубликованы результаты исследования израильских и канадских ученых, согласно которым микроорганизмов в человеческом теле примерно столько же, сколько и клеток ($3,9 \times 10^{13}$ и $3,0 \times 10^{13}$ соответственно) [3].

Численность микробиоты постепенно увеличивается по ходу кишечника, составляя в тонкой кишке $10^2 - 10^7$ КОЕ/г [4] и достигая максимального значения в толстой кишке – до 10^{11} КОЕ/г [5]. Такая разница может объясняться нали-

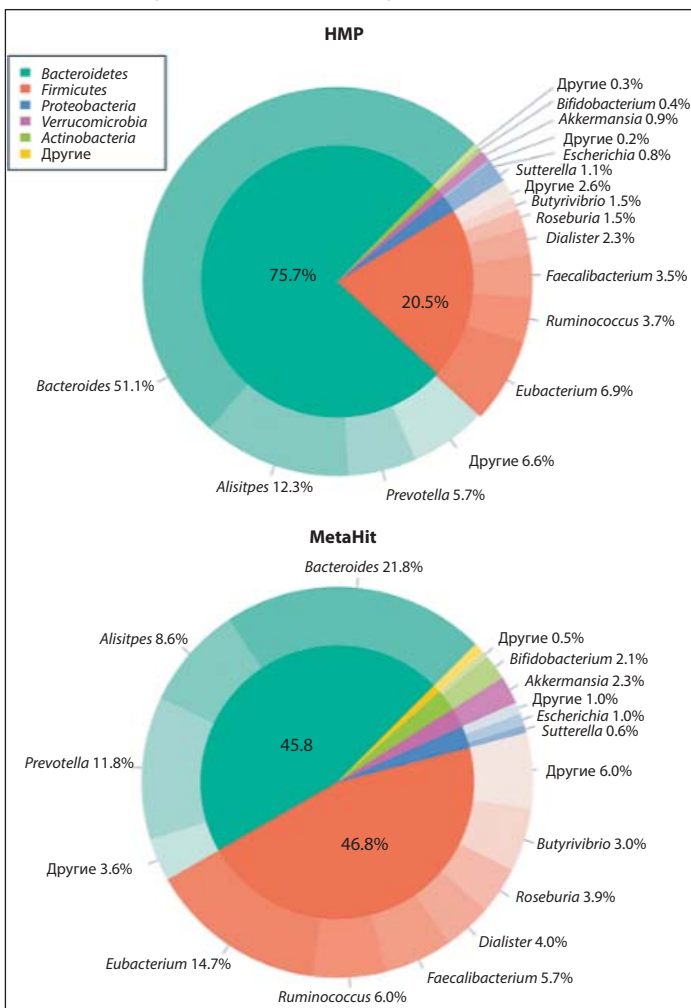


Рис. 1. Сравнение качественного состава кишечной микробиоты по данным проектов исследования микробиоты здоровой американской (HMP) и европейской (MetaHit) популяции. По Arora T. & VKckhed F. (12)

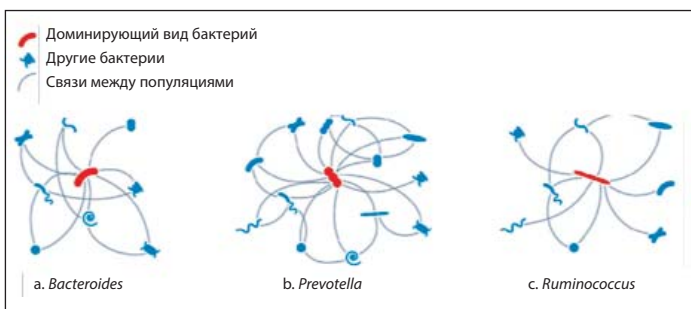


Рис. 2. Три энтеротипа кишечной микробиоты человека

Таблица 1. Функции кишечной микробиоты

Основные функции	Описание
Пищеварение	Расщепление пищевых волокон и синтез КЦЖК, участие в обмене желчных кислот и синтезе пищеварительных ферментов
Защитная функция	Синтез колоницинами иммуноглобулина А и интерферонов, фагоцитарная активность моноцитов, пролиферация плазматических клеток, формирование колонизационной резистентности кишечника, стимуляция развития лимфоидного аппарата кишки у новорожденных и пр.
Синтетическая функция	Синтез витаминов: группы К (участвует в синтезе факторов свертывания крови); В ₁ (катализирует реакцию декарбоксилирования кетокислот, является переносчиком альдегидных групп); В ₂ (переносчик электронов с НАДН); В ₃ (перенос электронов к O ₂); В ₅ (предшественник коэнзима А, участвует в обмене липидов); В ₆ (переносчик аминокислот в реакциях с участием аминокислот); В ₁₂ (участие в синтезе дезоксирибозы и нуклеотидов); синтез аминокислот (аргинина, глутамина), КЦЖК (ацетат, бутират, пропионат и др.), антибиотиков
Дезинтоксикационная функция	в т.ч. нейтрализация некоторых видов лекарств и ксенобиотиков: ацетаминофена [16], азотсодержащих веществ, билирубина, холестерина и пр.
Регуляторная функция	Регуляция иммунной, эндокринной и нервной систем (последней – через так называемую «gut-brain axis» – кишечно-мозговую ось)

чем в верхних отделах кишечника более агрессивной среды из-за поступающего кислого содержимого желудка, действия пищеварительных ферментов, быстрого продвижения химуса. Преобладающих в тонкой кишке аэробов по мере движения вниз по ЖКТ сменяют факультативные, а затем облигатные анаэробы. Это связано со снижением парциального давления кислорода в дистальных отделах ЖКТ.

Микробиота включает облигатных представителей (постоянно присутствующих в организме хозяина) и транзитных (поступающих из внешней среды и неспособных к длительному существованию в здоровом организме). Находиться микробы могут в просвете кишечника (полостная микрофлора) и в пристеночной слизи (пристеночная, мукозная микрофлора).

По типу метаболизма различают протеолитические бактерии, осуществляющие гидролиз белков (кишечная палочка, бактероиды, протей, клостридии), и сахаролитические (бифидобактерии, лактобактерии, энтерококки), получающие энергию из углеводов [6].

Считается, что бактерии начинают заселять кишечник человека сразу после рождения. В основном это обитатели вагинального тракта матери [7]. Тем не менее имеются данные о возможности более раннего попадания микробов в ЖКТ человека: исследование М. Mshvildadze показало наличие бактериальной ДНК в меконии здоровых новорожденных [8]. По мере развития ребенка увеличивается разнообразие и стабильность его микробиоты: если с первых дней жизни преобладают *B. bifidum* и *Lactobacillus*, то

Таблица 2. Методы исследования кишечной микробиоты

Метод исследования	Описание	Преимущества	Недостатки
Культуральные методы	Используются различные среды для селективного выращивания бактерий. В качестве источника бактерий могут выступать кал, аспират и биоптаты слизистой тонкой или толстой кишки	Высокая распространенность, опыт работы с ними лабораторных работников, возможность диагностировать наличие основных патогенных микроорганизмов	Трудоемкость, дороговизна, исключительная долговременность: до 10 сут для получения результата [6], лишь небольшая фракция бактерий может быть культивирована [17]
Молекулярно-генетические методы идентификации видовых представителей микробиоты по определению последовательности ДНК или РНК в образце, взятом из кишечника			
ПЦР	Репликация ДНК-полимеразой нуклеотидной последовательности, характерной для определенного вида микроорганизмов → ↑ количества фрагментов ДНК с такой последовательностью	Высокая чувствительность и специфичность, возможность автоматизации и быстрого получения результата	Вероятность ложноположительных результатов (из-за высокой чувствительности), ложноотрицательных результатов (амплификация погибшего микроорганизма), констатация лишь присутствия/отсутствия микробных тел, поэтому трудно однозначно рассматривать с точки зрения клинической практики [18]
RT-Q-PCR	Интеркалирующие красители/ДНК-зонды → соединение с цепочкой НК флуоресцентное свечение, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации продукта ПЦР → количественная оценка микрофлоры	Высокая точность (<2% стандартного отклонения) [19], высокая скорость метода (менее 10 мин [20]) ↓ вероятность ложноположительных результатов (проводится одновременно с амплификацией → исключение пост-ПЦР этапов)	—
Секвенирование генов 16S рибосомальной РНК (от англ. <i>sequence</i> – последовательность)	Метод определения последовательности азотистых оснований в генах 16S рРНК (встречаются в геномах всех прокариот и мало подвержены мутациям). Считается «золотым стандартом» определения видовой принадлежности бактерий [21]	Дешевизна и простота в исполнении [22], использование универсальных праймеров для ПЦР-амплификации, 16S рРНК последовательности описаны для многих видов культивированных бактерий и природных изолятов, по переменным участкам можно проследить пути эволюции, наличие компьютерных баз данных для сравнения полученного результата	Ошибки, свойственные ПЦР, широкий разброс оценок разнообразия видов (феномен передачи генов 16S рРНК «по горизонтали» между родственными видами), неспособность оценить биологические функции изучаемых микроорганизмов [23]
Полногеномное секвенирование (<i>shotgun-sequencing</i> , полный шот-ган сиквенс генома, метод «дробовика»)	Изучение последовательности отдельно разрезанных «кусочков» (ридов) всех ДНК, выделенных от некультивированной микрофлоры	Возможность не только идентифицировать микроб за счет считывания таксономических генов (включая 16S рРНК гены), но и определить биологические функции, закодированные в геноме, что формирует более полную картину представления о виде	Высокая стоимость, объем и относительная сложность анализа полученной информации, отсутствие полных баз данных по некоторым таксонам микробиоты ограничивает широкое применение метода в клинической практике [23]
Исследования, основанные на метаболомике – дисциплине, которая анализирует низкомолекулярные метаболитические соединения в определенной системе (клетка, организм и т. п.) в определенный момент времени			
Масс-спектрометрия	Оценивает время пролета частицы вещества через матрицу анализатора и создает спектр масс специфических белков («метаболический отпечаток»), по которому происходит идентификация видов микроорганизмов	Универсальность подготовки материала для спектрометра, высокая чувствительность и быстрота выполнения анализа	Идентификация микроорганизмов ограничивается только теми белками, которые были определены у ранее секвенированных микробов [24]

затем наблюдается относительное снижение представительства молочнокислой флоры, а среди *Bifidobacterium* начинают преобладать *longum*, *breve*, *adolescentis* [9]. Ко второму году жизни ребенка его микробиота напоминает микробиоту взрослого организма [10].

Рождение путем кесарева сечения негативно влияет на состав кишечной микробиоты у младенцев: ее разнообразие снижено, редуцировано представительство *Bacteroidetes*, а также ослаблен иммунный ответ, связанный с Т-хелперами 1-го типа [11]. Эти изменения сохраняются на протяжении первых двух лет жизни.

По данным исследования американской Human Microbiome Project (HMP) и европейской Metagenomics of human intestinal tract (MetaHIT) популяции, у взрослых кишечная микрофлора представлена двумя преобладающими типами бактерий: *Bacteroidetes* и *Firmicutes* (рис. 1) [12]. При этом был введен термин «энтеротипы» – это устойчивые кластеры на основе микробного состава в образцах из кишечника человека, которые определяются преобладанием тех или иных ключевых родов бактерий [13] и не являются популяционно- и континент-специфичными [14]. В энтеротипе-1 доминируют представители рода *Bacteroides*, в энтеротипе-2 – *Prevotella*, в энтеротипе-3 – *Ruminococcus* (рис. 2). Однако четкие критерии определения энтеротипов отсутствуют; кроме того, результаты ряда исследований указывают на незначительное преобладание в биотопах организма ключевых бактериальных родов, а не отдельных кластеров, в связи с чем требуется проведение дальнейших наблюдений, касающихся данного феномена [13]. Наличие четко опреде-

ленных энтеротипов не было доказано и при метагеномном исследовании кишечной микробиоты добровольцев из городской и сельской местности России: в основном в микробных сообществах не отмечалось доминирования *Prevotella* или *Bacteroides*, а в 50% случаев наблюдалось преобладание большого набора троек микрорганов (в основном *Firmicutes*, компанию которым составляли *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Tenericutes* и *Archaea*) [15].

В таблице 1 представлены функции кишечной микробиоты, в таблице 2 – методы ее исследования.

Заключение

Изучение интестинального микромира представляет собой важный научный и практический интерес. Имеющиеся данные предполагают, что состав микробиоты кишечника у каждого человека индивидуален. Это может стать ключом к разгадке причины различий, наблюдающихся в метаболических процессах у людей со сходными физиологическими данными. Более широкое внедрение в клиническую практику рассмотренных современных методов исследования, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью, а также отвечающих требованиям концепции точной медицины, может снизить стоимость проведения подобных обследований, а также получить большой массив данных для изучения и решения насущных научно-клинических проблем.

Список литературы Вы можете найти на сайте <http://www.rmj.ru>

Реклама

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ НЕДЕЛЯ

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦПМБ Роспотребнадзора)

III НАЦИОНАЛЬНЫЙ КОНГРЕСС БАКТЕРИОЛОГОВ

16-17 ноября 2017



Место проведения конгресса: Москва, здание Мэрии г. Москвы (ул. Новый Арбат, 36).
Проезд: до ст. метро «Арбатская», «Смоленская», «Краснопресненская».



Конгресс организован в рамках XI Съезда Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» (ВНПОЭМП).



Мероприятие подано на аккредитацию в системе НМО.
Дополнительная информация и регистрация на сайте: www.expodata.info



ТЕХНИЧЕСКИЙ ОРГАНИЗАТОР:

ООО «Экспо пресс», т/ф.: +7(495) 617-36-43/44, моб.: +7(962) 935-70-50 - Львов Михаил Геннадьевич
E-mail: lvov.m.g@inbox.ru; vk.com/expodata; www.expodata.info

ПО ВОПРОСАМ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОГРАММЫ:

+7 (916) 334-55-26 - Домотенко Любовь Викторовна, E-mail: domotenko@obolensk.org

