



**2-я Международная научно-практическая
Конференция «Функциональные продукты
питания: научные основы разработки,
производства и потребления»**

Аверина Ольга Викторовна -

***доктор биологических наук,
профессор, старший научный сотрудник отдела
генетических основ биотехнологии***

Института общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова

**«Микробиота и подходы к ее
коррекции при различных
функциональных состояниях
организма»**



Микробиота и подходы к ее коррекции при различных функциональных состояниях

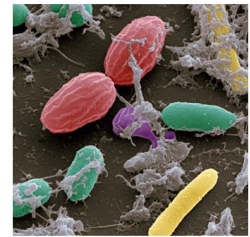
д.б.н. Даниленко В.Н., к.б.н. Аверина О.В.,
Лаборатория Генетики Микроорганизмов
Институт Общей Генетики
им. Н.И.Вавилова РАН, Москва, Россия

<http://www.vigg.ru/>
E-mail:valerid@vigg.ru
olgavr06@mail.ru

2-я Международная научно-практическая конференция
«Функциональные продукты питания: научные основы разработки, производства и
потребления» ФПП-2018

21-22 ноября 2018, Москва, Россия

Микробиота кишечника как ключевой регулятор здоровья и болезней человека



- Включает все микроорганизмы пищеварительного тракта человека
- Насчитывает в суммарной численности 10^{14} клеток микроорганизмов с массой более 2 кг. Общий геном бактерий, «микробиом», включает 400 тыс. генов, что в 12 раз больше генома человека
- Трактуются как новый сателлитный орган, играющий ключевую роль в становлении и поддержании иммунитета человека и как «эндокринный орган» за способность производить сотни гуморальных агентов
- У здорового человека микробиота кишечника сбалансирована и поддерживает общий гомеостаз организма
- Профиль кишечной микробиоты у каждого человека уникален и определяется его геномом. Стабилен по основному видовому составу. Стабильность формируется на самых ранних этапах жизни человека и обусловлена наличием хозяйской иммунологической толерантности к микроорганизмам, заселяющим кишечник сразу после рождения

Факторы, определяющие композицию кишечной микробиоты

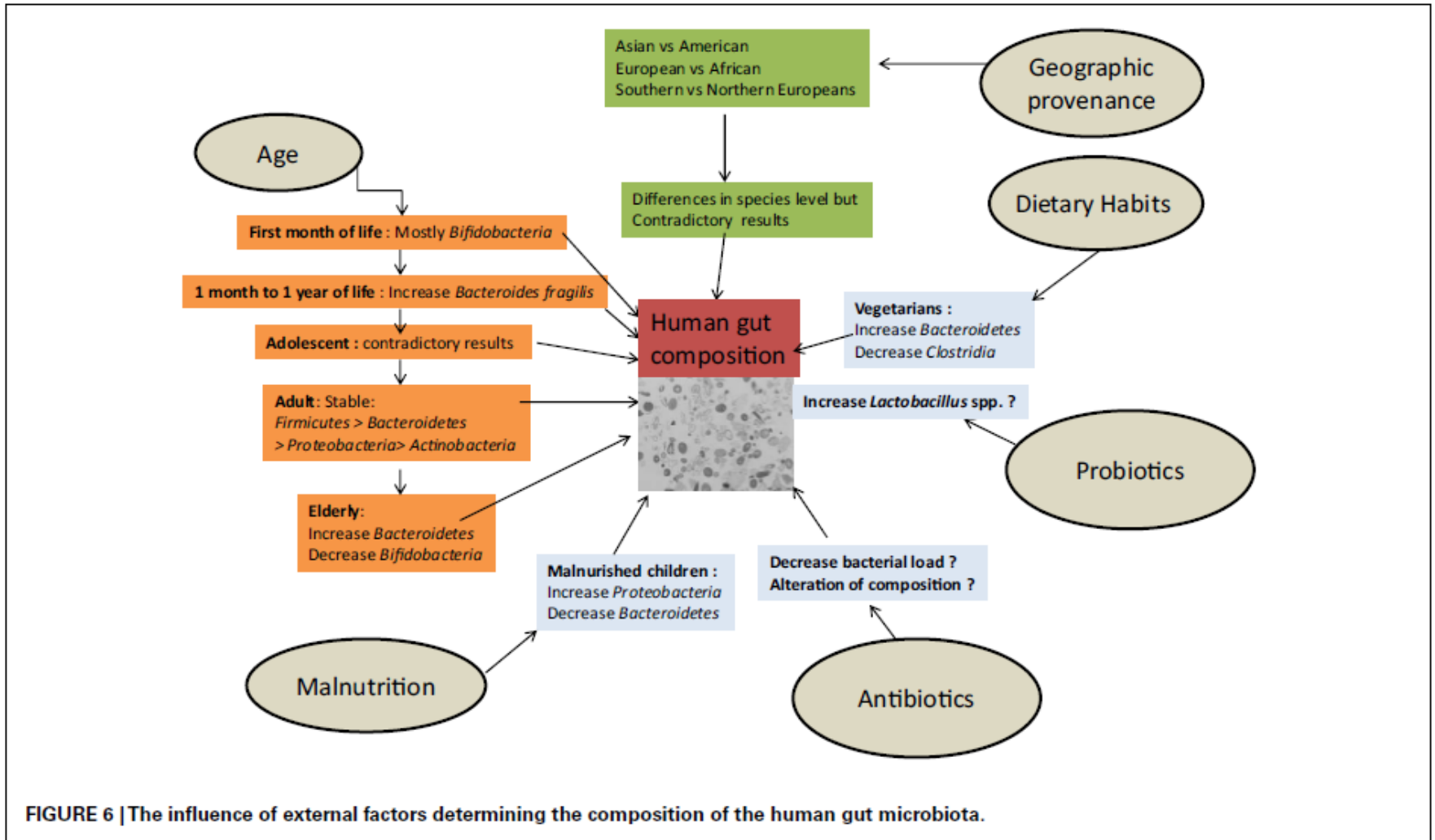
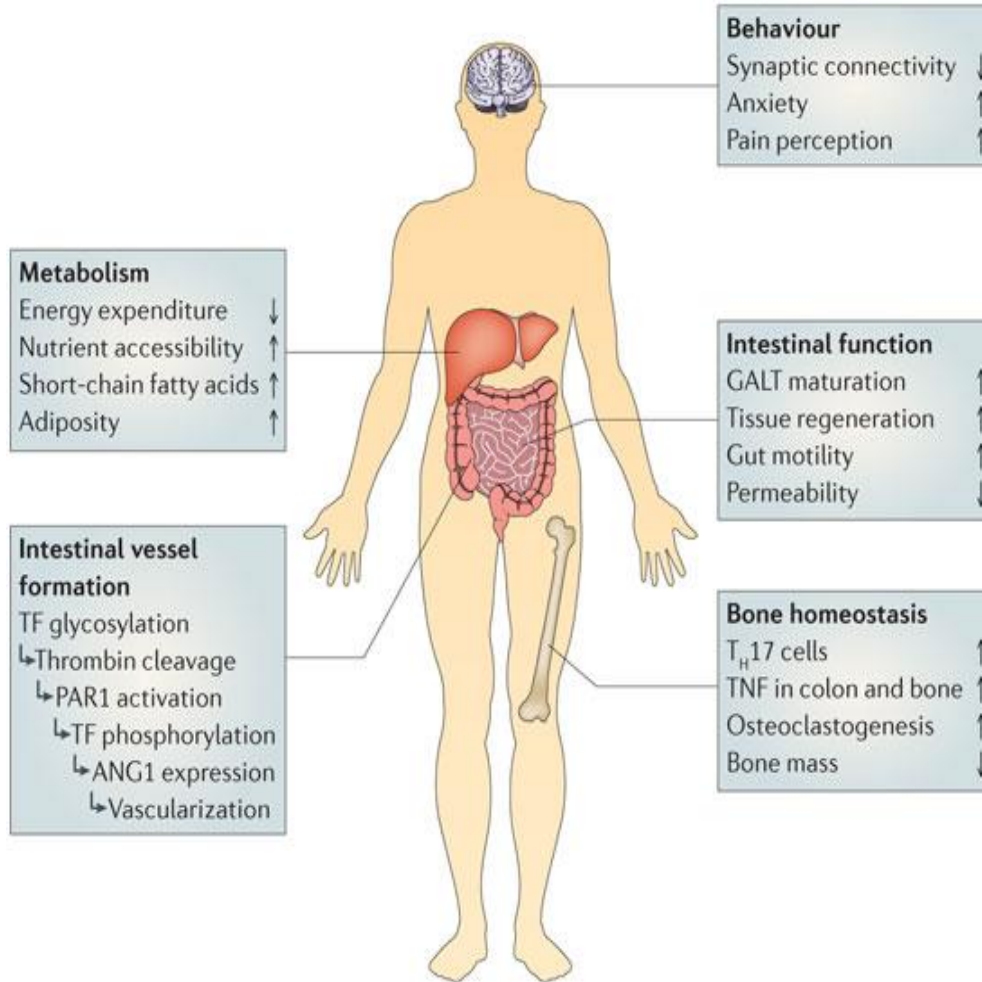


FIGURE 6 | The influence of external factors determining the composition of the human gut microbiota.

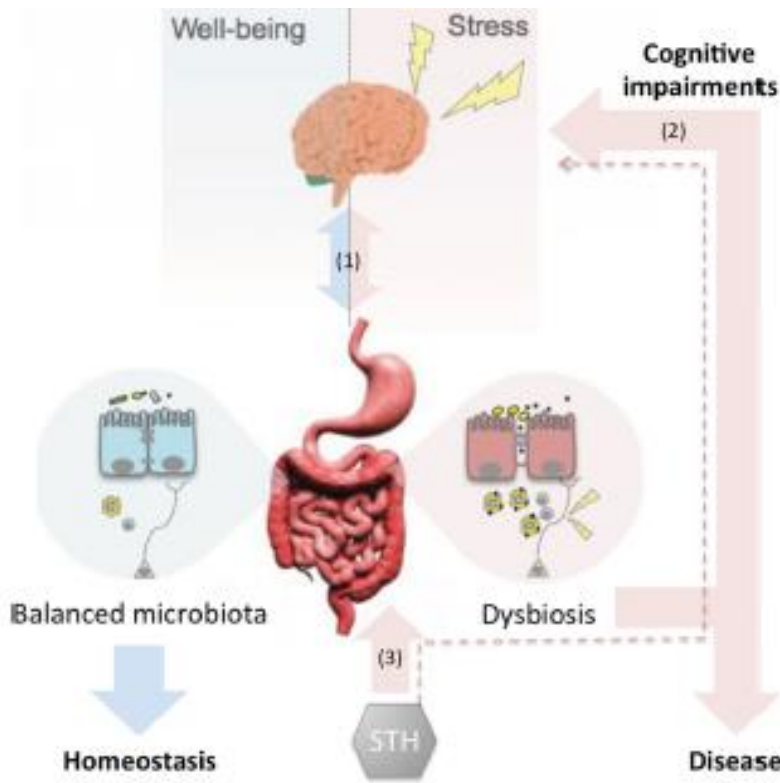
Значение микробиоты кишечника для организма



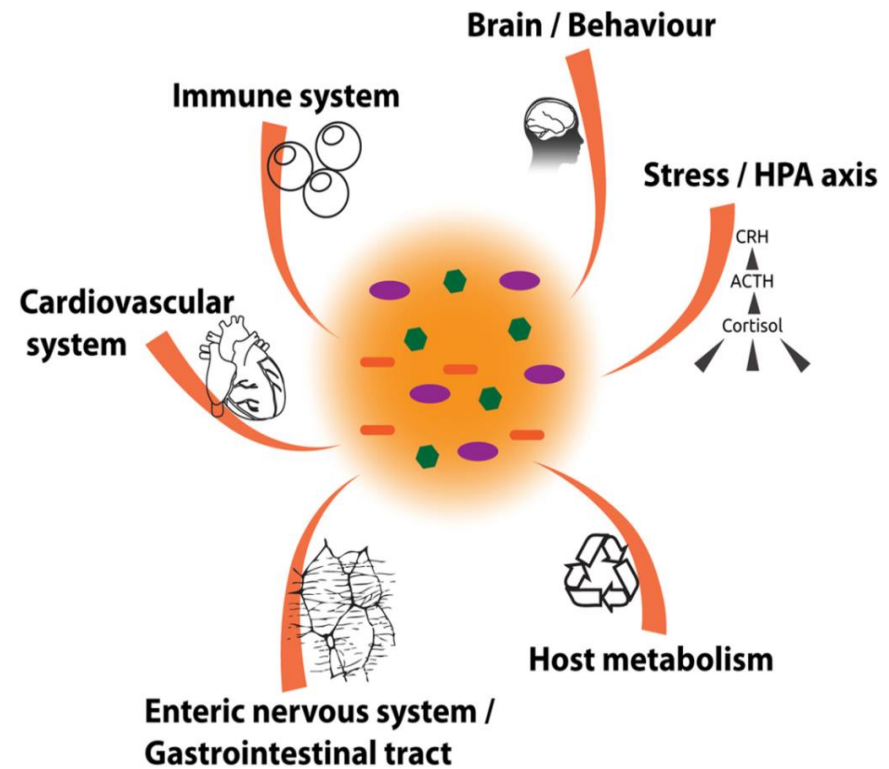
- **Метаболическая функция**
- **Защитная функция**
- **Структурная и регуляторная функции**
- **Работа ЖКТ**
- **Поведение, восприятие боли, чувствительность к стрессу**
- **Костный гомеостаз**

Nature Reviews | Microbiology

Изменения в биоразнообразии и высокая временная нестабильность микробиоты (дисбиоз) характерны для ряда желудочно-кишечных заболеваний, болезней обмена веществ, нейродегенеративных заболеваний и когнитивных нарушений



Guernier et al., 2017



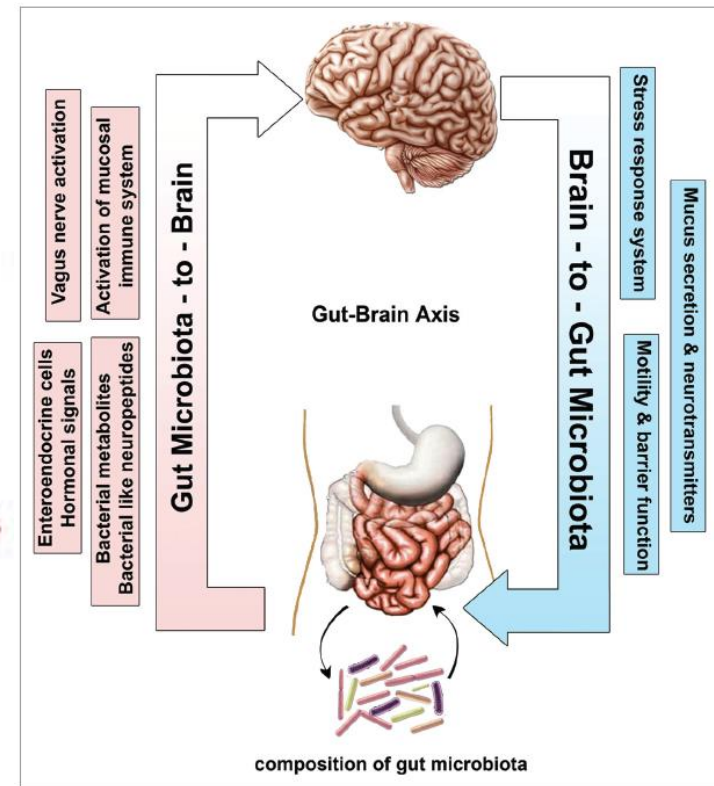
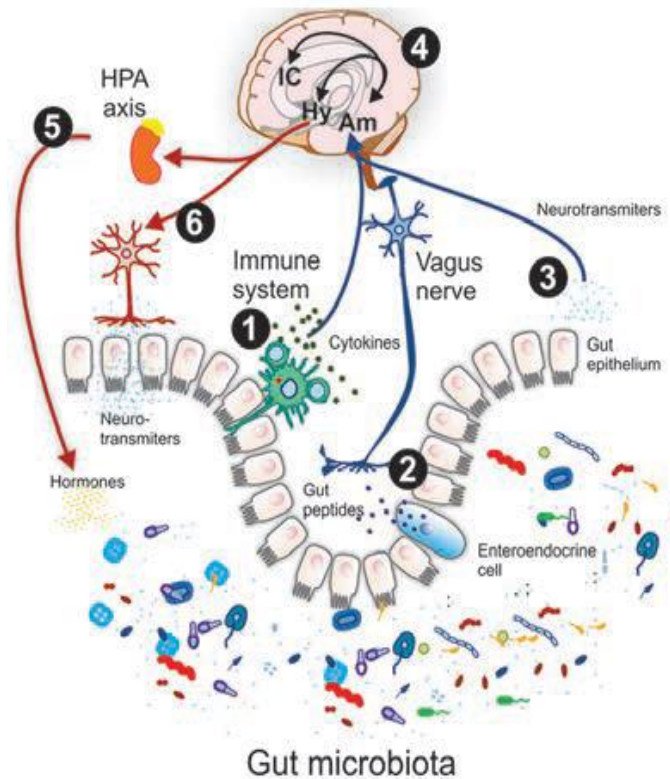
Clarke et al., 2014

Ось микробиота-кишечник-мозг

Представляет сложную сеть коммуникаций между кишечником, кишечной микробиотой и мозгом и охватывает функции иммунной, эндокринной, нервной систем

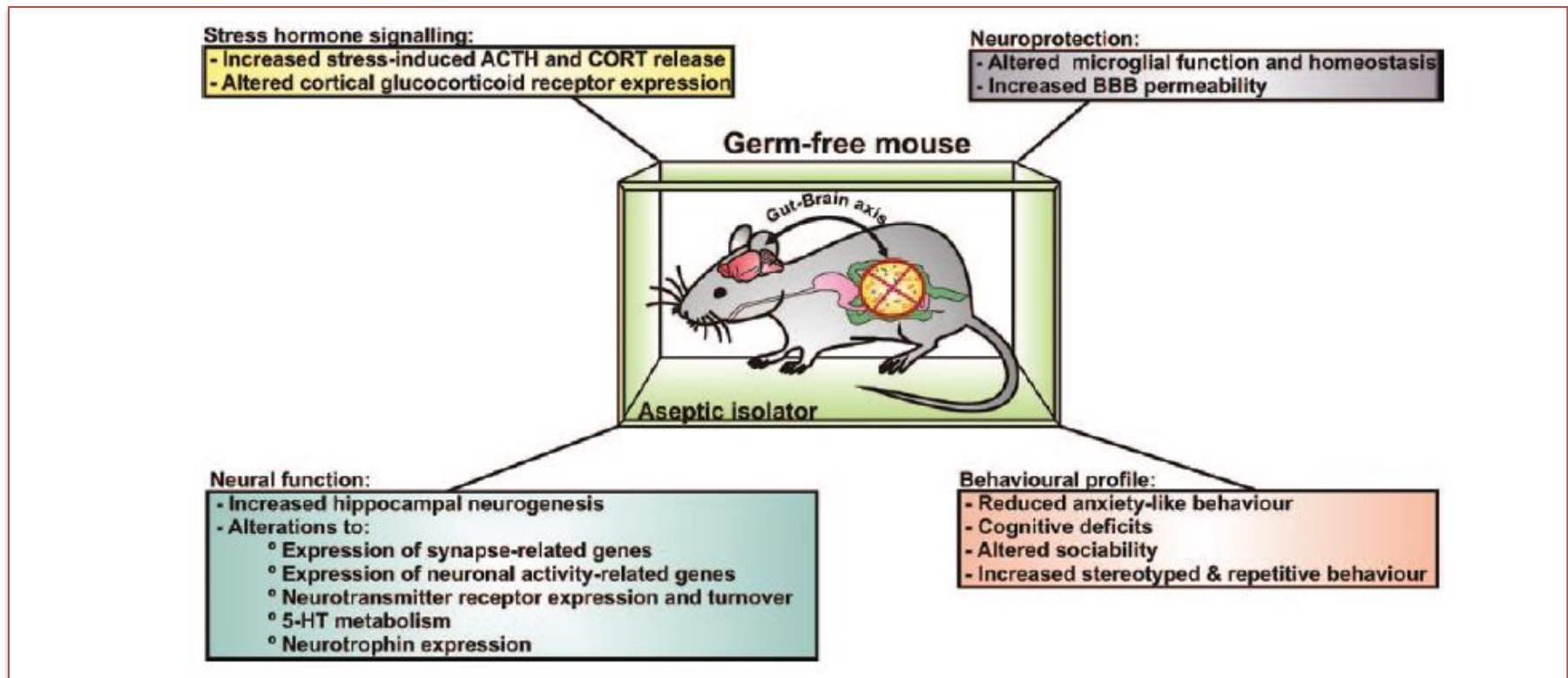
Механизмы коммуникации микробиоты с ЦНС реализуются через ее метаболиты и поверхностные структуры, воздействующие на:

блуждающий нерв, напрямую связывающий различные части кишечника с мозгом; чувствительные нервные окончания периферической нервной системы; хемосенсоры просветного эпителия; энтерохромоаффинные клетки; иммунную систему кишечника



Модели исследования роли микробиоты кишечника в коммуникации с нервной системой

Проведены многочисленные исследования роли микробиоты кишечника в коммуникации с нервной системой на различных моделях животных, включающих изучение влияния на поведение, способность к обучению и память, на уровень тревожности и депрессии, реакцию на эмоциональные стимулы, устойчивость к стрессам



Влияние диеты на состав микробиоты и поведение

Диета	Вид	Длительность вмешательства	Изменения в микробиоте	Результаты поведения
Высоко жировая диета	мыши	13 недель	↑ Firmicutes (в основном Ruminococcaceae и Lachnospiraceae) ↓ Bacteroidetes (S24-7)	↓ Исследовательские навыки ↓ Память
Диета с высоким содержанием сахара	мыши	2-5 недель	↑ Clostridiales, Lactobacillus, Enterococcus, Lactococcus ↓ Bacteroides	↓ Обучение, когнитивные дефициты, память
Диета с содержанием мяса	мыши	3 месяца	↑ бактериальное разнообразие	↑ Рабочая и ассоциативная память ↓ Тревожное поведение
Западная диета с высоким содержанием жиров	мыши	21 день	↑ Соотношение Firmicutes/Bacteroidetes ↑ Proteobacteria и Spirochaetes	Измененное тревожное поведение
Диета с добавлением пребиотиков	люди	8 недель	Повышенное содержание Bifidobacteria	Снижение тревоги

Микробиота кишечника способна оказывать влияние на организм хозяина благодаря своей способности либо синтезировать, либо стимулировать выработку различных биологически активных соединений

Нейромодуляторы

(включая малые РНК и короткие пептиды)

Центральная

нервная система

Иммуномодулирующие вещества

(включая малые РНК и др.)

Иммунная система

Антиоксиданты

Эндокринная

система

Нейроактивные вещества, синтезируемые бактериями микробиоты ЖКТ



Lyte et al., 2010

Аверина О.В., Даниленко В.Н., 2017

Пути изучения микробиоты человека в лаборатории

- **Метагеномный анализ**
 - Выделение тотальной ДНК из фекалий
 - Полный метагеномный сиквенс выделенной ДНК
 - Сиквенс ПЦР-ампликонов гена 16S рРНК выделенной ДНК
 - Определение филогенетического разнообразия с помощью доступных программ
 - С помощью разработанных биоинформатических подходов выявление сигнатуры микробиоты
 - **Выделение культивируемых бактерий**
 - Бифидобактерий
 - Лактобацилл
- Отбор пробиотических штаммов с направленным действием

Метагеномная сигнатура – совокупность важных родов и ферментов, характеризующая состояние микробиоты кишечника человека

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*)

Алгоритм определения метагеномной сигнатуры



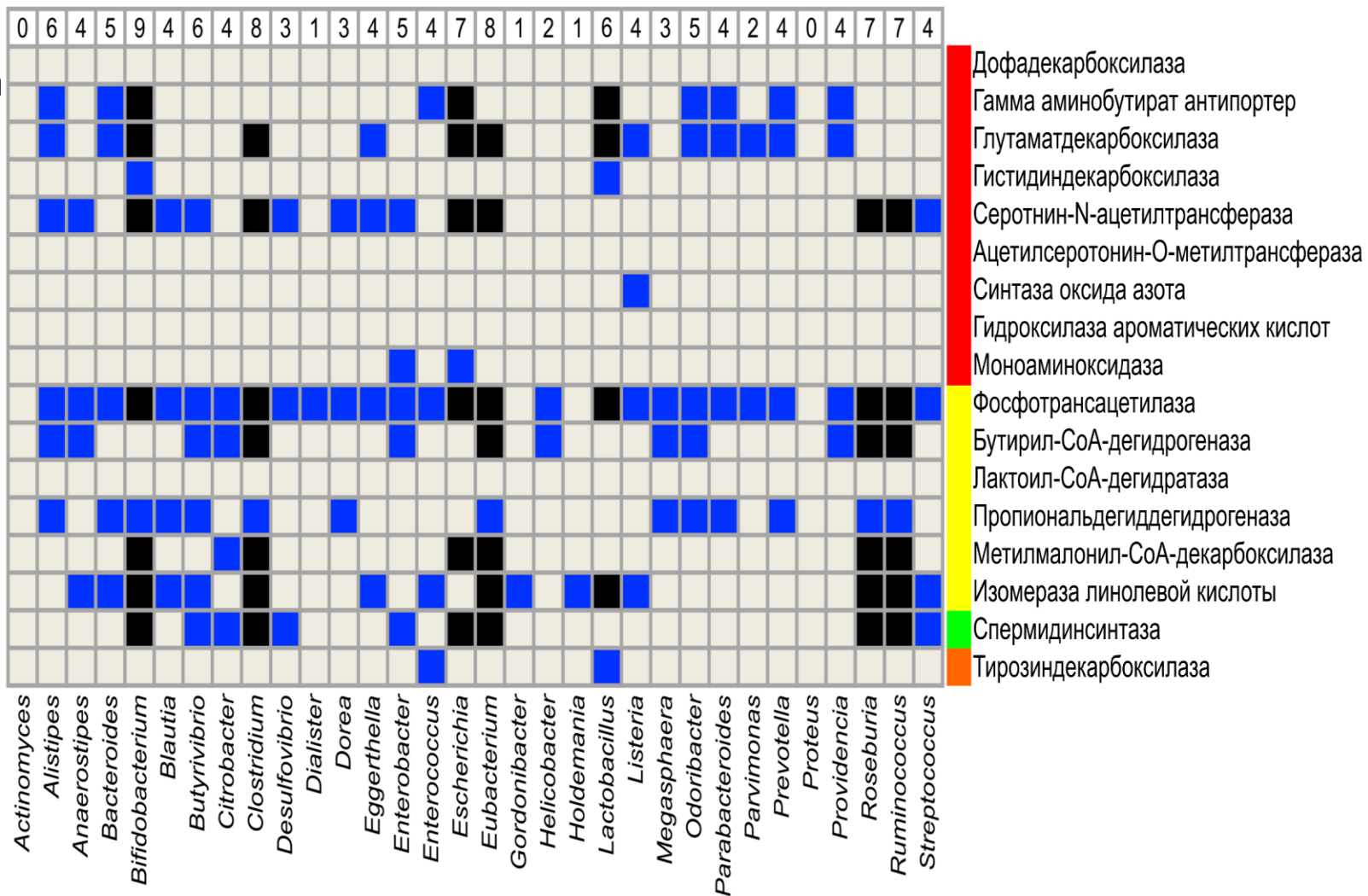
Определение метагеномной сигнатуры микробиоты кишечника в норме

- **Определение 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)**

Метагеномная сигнатура микробиоты кишечника

Легенда

- Нейромедиаторы
- Жирные кислоты
- Спермидин
- Тирозин



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

- Подбор диеты
- Применение пробиотиков нового поколения: психобиотиков, иммунобиотиков и др.
- Применение пребиотиков
- Применение антибиотиков
- Применение фекальной трансплантации
- Применение селективных препаратов бактериофагов
- Редактирование бактериальных геномов с помощью CRISPR/Cas технологий



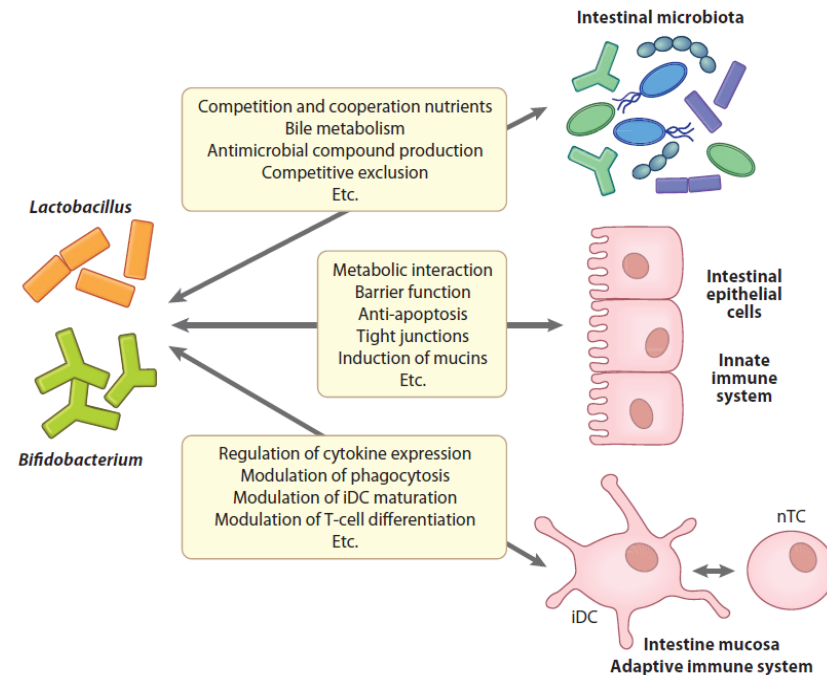
Пластичность микробиоты создает возможность использования воздействия различных внешних факторов для изменения ее структуры и функциональности и как следствие улучшение здоровья человека

Пробиотики — это живые микроорганизмы, которые при применении в адекватных количествах вызывают улучшение здоровья организма хозяина

ВОЗ, 2001

Действие пробиотиков направлено на:

- Поддержание и коррекцию баланса кишечной микробиоты, а именно, ингибирование роста потенциально вредных микроорганизмов и стимуляция роста полезных представителей индигенной флоры;
- Повышение иммунного статуса;
- Осуществление биологического контроля в организме;
- Коррекция метаболизма



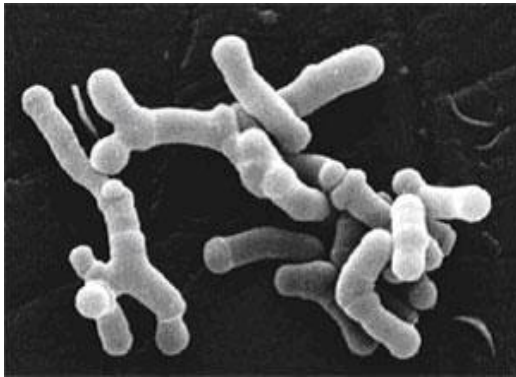
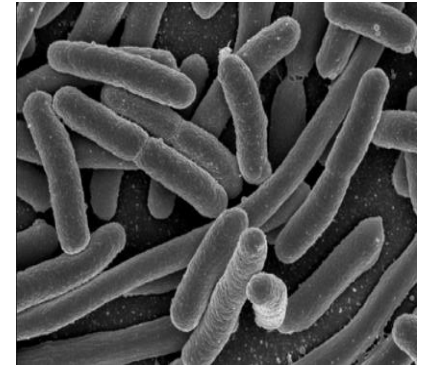
Основное направление рынка пробиотиков – продукты функционального питания (более 50% мирового рынка)

Создание пробиотиков нового поколения

- С использованием методов сравнительной геномики, метагеномики, протеомики, метаболомики и микробной эндокринологии выявление новых генов и продуктов метаболизма пробиотических бактерий, важных для профилактики и лечения целого ряда заболеваний человека и поддержания общего гомеостаза организма
- Селективный отбор штаммов с направленным действием против иммунных, онкологических, нейродегенеративных и нейродепрессивных болезней, коррелирующих и часто обусловленных нарушениями в функционировании микробиоты кишечника человека

Бифидобактерии и лактобациллы как основные пробиотические бактерии

Эффект от применения **лактобацилл** в качестве пробиотиков основан на ингибировании патогенов, восстановлении микробного гомеостаза, антиоксидантной активности, моделировании иммунного ответа и нейромодуляции



Пробиотическая роль **бифидобактерий** заключается в регуляции деятельности кишечника, поддержание микробного гомеостаза, проявление антагонизма к патогенным бактериям, преобразование различных питательных компонентов в биологически активные молекулы, стабилизация и сохранение кишечного барьера, модуляция местного и системного иммунитета, нейромодуляция

Создание пробиотиков с определенными свойствами таргетного действия

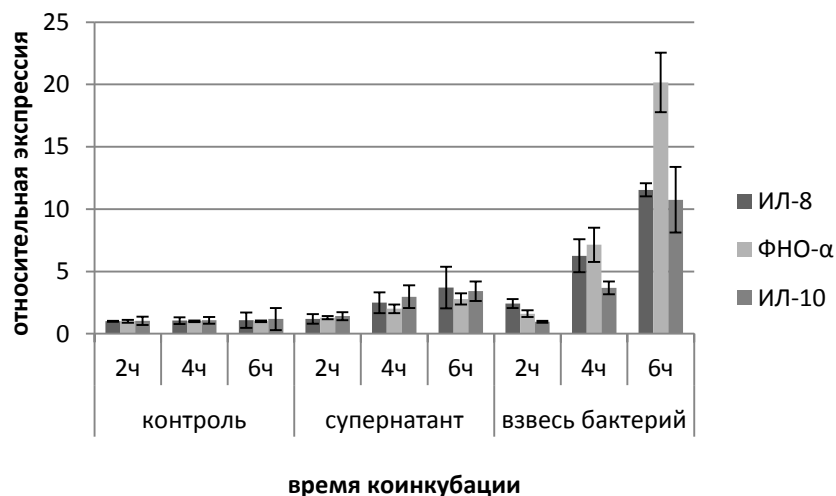
- **С иммуномодулирующими свойствами**
 - Направлены на коррекцию иммунных нарушений, опосредованных изменениями в составе микробиоты кишечника человека
- **С антидепрессантной активностью (психобиотики)**
 - Направлены на восстановление психического здоровья человека
- **С антиоксидантной активностью**
 - Направлены на восстановление здоровья человека в стрессовых условиях

Пробиотические штаммы с иммуномодулирующей активностью

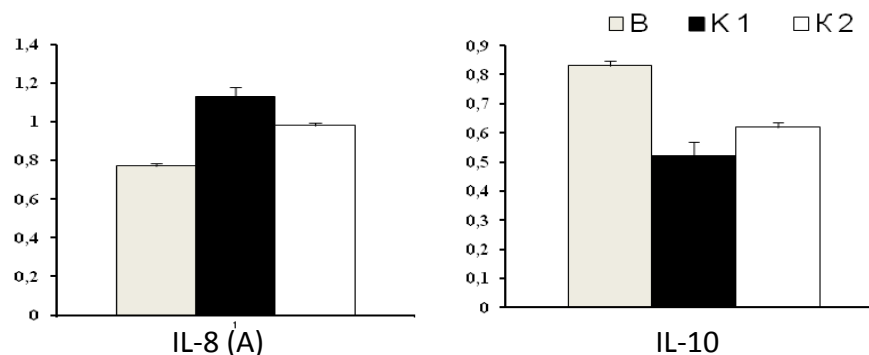
Иммуномодулирующая активность пробиотических бактерий делится на:

- **Иммуностимулирующую:** проявляется в стимуляции клеточного звена иммунного ответа, индукции синтеза интерферонов, интерлейкинов и иммуноглобулинов
- **Иммуносупрессирующую:** проявляется в устранении патогенных бактерий, вызывающих воспаление, за счет проявления штаммом антагонистической активности и способности к адгезии

Штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* GT15 с иммуномодулирующей активностью

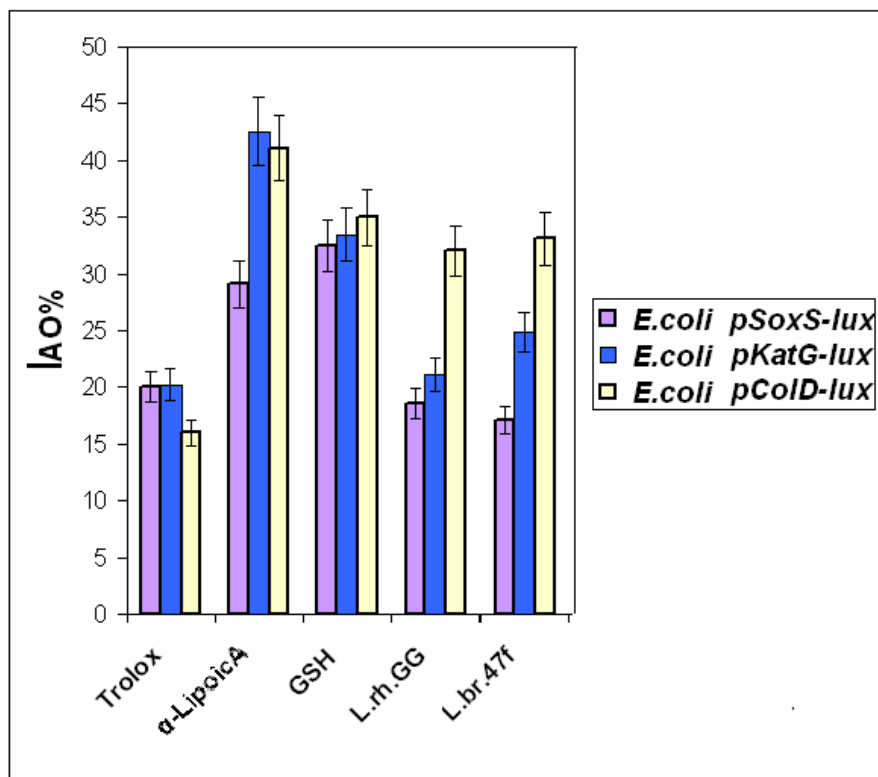


Изменение экспрессии генов цитокинов в клетках линии THP-1 при коинкубации с супернатантом и взвесью живых бактерий штамма *B. longum* subsp. *longum* GT15 через 2, 4 и 6 часов



Уровень экспрессии IL-8 и IL-10 в брыжеечных узлах крыс различных групп. K1- после введения животным антимикробных препаратов и фосфатного буфера, K2- интактные животные, B – введенные бифидобактерии

Штамм *Lactobacillus brevis* 47f с антиоксидантной активностью



Эффективность антиоксидантного действия (I_{AO}%) штамма *L.brevis* 47f в сравнении с активностью контрольных веществ и пробиотического штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG, определенная в биолюминесцентной тест-системе *Escherichia coli*.

Gene	Protein	Locus-tag
<i>sod</i>	Superoxide dismutase	–
<i>kat</i>	Catalase haem-dependent	AAX72_13115 (part of the gene on the contig flank)
	Peroxidase	AAX72_RS07920
<i>gshA</i>	Glutamate-cysteine ligase (γ-glutamylcysteine synthetase)	AAX72_RS03165
<i>gshB</i>	Glutathione synthetase	–
<i>gshF(AB)</i>	Bifunctional glutamate-cysteine ligase/glutathione synthetase	–
<i>gpo</i>	Glutathione peroxidase	AAX72_RS08620
<i>gshR/gor</i>	Glutathione reductase	AAX72_RS12425
<i>grx</i>	Glutaredoxin	–
<i>tpx</i>	peroxiredoxin	AAX72_RS06165 AAX72_RS09335
<i>trxA</i>	Thioredoxin	AAX72_RS01725 AAX72_RS06600 AAX72_RS05795 AAX72_RS08800
<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	AAX72_RS04745

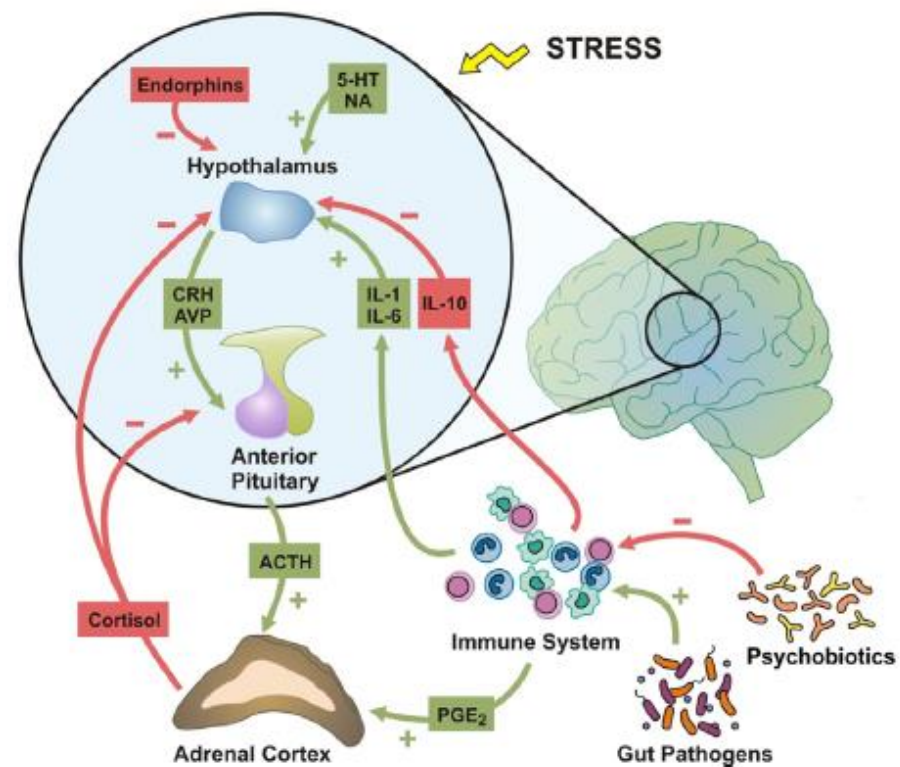
Наличие генов синтеза и метаболизма соединений, обладающих антиоксидантной активностью в геноме штамма *L.brevis* 47f

Психобиотики - единичные виды и штаммы бактерий, обладающие психотропными свойствами, и в достаточных количествах способные оказывать благоприятное воздействие на здоровье пациентов, страдающих психическими заболеваниями (Dinan et al., 2013)

Показана эффективность психобиотиков в борьбе с симптомами депрессии и синдрома хронической усталости

Психобиотики могут оказывать седативный эффект и снижать тревожное состояние

Действие психобиотиков сходно с фармакологическим эффектом антидепрессантов



Исследование влияния пробиотических штаммов–психобиотиков на животных и людей

Вид бактерий	Эффект действия психобиотика в стрессовых условиях	Модели исследования	Ссылка
<i>L.rhamnosus</i>	- изменение активности ГАМКергических рецепторов в различных отделах мозга; - восстановление нормального уровня кортикостерона в крови; - положительная динамика в поведенческих тестах.	Мыши BALB/C	Bravo et al., 2011
<i>L.helveticus</i>	-положительная динамика в поведенческих тестах; - снижение показателей стресса.	Крысы Вистар Люди-добровольцы	Messaoudi et al., 2011 a, b
<i>L.acidophilus</i>	- положительная динамика в поведенческих тестах.	Крысы Вистар	Singh et al., 2012
<i>L.brevis</i> синтезирует ГАМК	- положительная динамика в тесте принудительного плавания.	Крысы Спрег-Доули	Ko et al., 2013
<i>L.brevis</i> синтезирует ГАМК	- положительная динамика в поведенческих тестах.	Крысы Спрег-Доули	Stanton et al., 2013
<i>B.animalis</i> <i>L.bulgaricus</i>	-активизация р-нов мозга, контролирующих эмоции и ощущения.	Люди-добровольцы	Tillish et al., 2013
<i>B.longum, B.breve</i>	-уменьшают депрессивное состояние и встревоженность в поведенческих тестах.	Мыши BALB/C	Savignac et al., 2014
<i>B.bifidum, B.lactis, L.acidophilus, L.brevis, L.casei, L.salivarius</i>	- уменьшение признаков плохого настроения	Люди-добровольцы	Steenbergen et al., 2015
<i>L.plantarum</i>	- уменьшение симптомов тревожности в поведенческих тестах; - увеличение содержания серотонина, дофамина в стриатуме.	Мыши-гнотобионты C57BL/6JNarl	Liu et al., 2016

Бифидобактерии и лактобациллы являются активными продуцентами гамма-аминомасляной кислоты – важного нейротрансмиттера

Штаммы	Уровень ГАМК, µg/мл	Штаммы	Уровень ГАМК, µg/мл	Штаммы	Уровень ГАМК, µg/мл
<i>Lactobacillus plantarum</i>		42/2	120	48-2	2052
119 sk	99	38/1	47	108	916
106 zv	36	19/1A	32	174	234
8-PA-3	105	14/4	27	150	5611
90 sk	210	7/1	68	110	2130
29 sk	257	3/1	66	152	5016
46 sk	62	57/1	149	277	2887
75sk	19	56/1	104	104	782
32sk	184	52/1	68	191	257
K9L	78	50/2	13	282	1489
CS396	74	<i>Lactobacillus brevis</i>		Km4	2765
36st	30	47st	100	Km5-1	4942
29st	6	52st	50	S14	2333
46k	110	15f	675	S11	854
191g	133	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		Tv29	3214
50st3	87	56	19	<i>Bifidobacterium angulatum</i>	
K13	18	57	3023	102	3469
43/5	176	76	850	334-1	2616
43/4	185	44	2302	212	3214
43/3	92	44-2	2966	<i>Bifidobacterium dentium</i>	
43/2	101	48	3090	9	2465

Штаммы *B.adolescentis* 150 и *L.plantarum* 90sk как психобиотики

1. **Обладают основными пробиотическими свойствами** (антагонистической активностью по отношению к условно-патогенным штаммам, необходимым уровнем адгезии и чувствительности к антибиотикам)
2. **Способны синтезировать** и выделять в среду **ГАМК** в количестве **5,6** и **0,9** мг/мл соответственно
3. **Адреналин увеличивает рост штаммов** на 2-4 порядка
4. **Обладают антиоксидантными свойствами**
5. **ДНК штаммов секвенирована** (GenBank LBHQ01 и JXAX01). Подтверждена видовая идентификация штаммов, показано наличие генов синтеза ГАМК, отсутствие генов патогенности и генов антибиотикоустойчивости, локализованных на мобильных генетических элементах. Идентифицированы гены **иммуномодуляции** и важные **пробиотические гены**
6. **В предварительных опытах на животных** (крысах) **в условиях стресса** штамм *L.plantarum* 90sk достоверно **увеличивает** в крови животных содержание **ГАМК** и уменьшает **количество гормона пролактина**
7. **Введение штаммов *L.plantarum* 90sk и *B.adolescentis* 150** мышам линии Balb\с снижает продолжительность иммобилизации животных в тесте принудительного плавания, что свидетельствует о их **антидепрессантного эффекта**

ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКТ: probiotic food

Это функциональный пищевой продукт, содержащий в качестве физиологически функционального пищевого ингредиента специально выделенные штаммы полезных для человека (непатогенных и нетоксикогенных) живых микроорганизмов, которые благоприятно воздействуют на организм человека через нормализацию микрофлоры пищеварительного тракта

Основным механизмом специализированного действия пробиотических функциональных пищевых продуктов является их положительное влияние на такие процессы, как повышение физической выносливости, иммунитета, улучшение функции пищеварения и регуляция аппетита, в частности, его снижение и другие

Использование пробиотических функциональных пищевых продуктов с направленным профилактическим и терапевтическим эффектом для различных групп индивидуумов

- для людей, подверженных долгосрочному воздействию различных стрессовых факторов
- спортсменов современного силового спорта, где доминируют высокие физические и стрессовые нагрузки
- контингента граждан, чья деятельность происходит в стрессовых климатических условиях крайнего Севера (Арктика)
- для детей и подростков во время учебного процесса

Стратегия создания пробиотических функциональных пищевых продуктов

- В разработке поликомпонентных продуктов, включающих два и более штаммов пробиотических бактерий
- В создании комплексных продуктов, в состав которых входят вместе с бактериями антиоксиданты, витамины, минеральные вещества, микроэлементы, флавоноиды и другие компоненты
- В разработке продуктов, включающих бактерии и пребиотики, которые стимулируют развитие бактерий в составе кишечной микрофлоры
- В разработке различных форм доставки пробиотического компонента – в жидком виде, в виде порошка, пасты или компонентов клеток пробиотических бактерий



Спасибо за внимание!