

УДК 579.65

Метагеномный анализ динамики изменений состава микробиома кишечника участников эксперимента «МАРС-500», имитирующего длительный космический полет

А. В. Марданов¹, М. М. Бабыкин², А. В. Белецкий¹, А. И. Григорьев³, В. В. Зинченко², В. В. Кадников¹, М. П. Кирпичников², А. М. Мазур^{1,2}, А. В. Недолужко¹, Н. Д. Новикова³, Е. Б. Прохорчук^{1,2}, Н. В. Равин^{1,2}, К. Г. Скрыбин^{1,2}, С. В. Шестаков^{2*}

¹Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 1

²Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

³Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76А

*E-mail: shestakovgen@mail.ru

Поступила в редакцию 26.12.2012

РЕФЕРАТ Проведен метагеномный анализ динамики изменений состава микробиоты кишечника пяти участников эксперимента «МАРС-500». Анализировали препараты ДНК из проб фекалий, взятых до начала эксперимента, через 14, 30, 210, 363, 510 дней пребывания испытуемых в изолированном модуле и через 2 недели после выхода из него. Таксономический состав микробиоты определяли по результатам пиросеквенирования амплифицированных фрагментов генов 16S рибосомной РНК. У одного участника с помощью полногеномного секвенирования по технологии SOLiD определяли таксономический и функциональный состав микробиоты. Каждый участник имел индивидуальный состав микробиоты, относящийся к одному из трех энтеротипов. Для двух участников характерен энтеротип I с преобладанием *Bacteroides*, у двух других выявлен энтеротип II с доминированием *Prevotella*. У одного участника состав микробиоты относится к смешанному типу. Установлено, что (1) в ходе эксперимента таксономический состав микробиоты каждого из участников изменялся, но без смены энтеротипа; (2) изменения в соотношении различных таксонов наблюдались через 14–30 дней, что могло быть следствием влияния стрессовых факторов уже на первом этапе эксперимента; (3) через 2 недели после выхода из модуля отмечена тенденция к восстановлению исходного состава микробиоты, однако полного восстановления не происходило. Метагеномный анализ микробиоты одного из участников показал, что, несмотря на изменения в таксономическом составе, сохранялось постоянство генного состава по большинству функциональных категорий. Предполагается, что в экосистеме кишечника каждого из участников происходила адаптивная перестройка таксономического состава микробиоты, отражающая индивидуальный ответ на воздействия условий эксперимента. При этом формировался новый сбалансированный таксономический состав микробиоты с функциональной компенсацией на уровне поддержания устойчивого генного состава в целостном сообществе без негативных последствий для состояния здоровья участников эксперимента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метагеномика, микробиота кишечника, стрессовые воздействия, энтеротипы.

ВВЕДЕНИЕ

Метагеномные исследования микробиома человека, проводимые в рамках масштабных международных научных программ [1–3], направлены на выяснение роли микроорганизмов в жизнедеятельности человека, на разработку методов диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний. Таксо-

номический и генный состав микробиоты, обитающей в кишечнике, является одним из критериев оценки здоровья человека [4–6]. В экосистеме кишечника доминируют представители пяти филумов бактерий, составляющих более 95% микробиоты, но соотношение таксонов на родовом и видовом уровне индивидуально для каждого человека [2, 7, 8], что обусловлено

генетическими особенностями индивидов, доминирующим типом питания и спецификой взаимодействия микробов в целостной экосистеме. Вместе с тем каждому «здоровому» индивиду свойствен собственный сбалансированный и постоянный состав метабенома [8–10], который может существенно изменяться при заболеваниях [5, 7, 11, 12], действии лекарственных средств [7, 13, 14]. Выявлена взаимосвязь между состоянием резидентной микробиоты и типом питания [15–17], психофизиологическими, нейрогуморальными факторами [18–20]. Стрессовые физические и эмоциональные перегрузки влияют на состав микробиоты. Отклонения от привычного образа жизни (например, длительные поездки) могут приводить к дисбалансу в соотношении различных таксонов в микробиоте [11] и нередко сопровождаются болезненными симптомами (диарея, запоры и т.д.). Условия космических полетов могут оказывать на космонавтов как физическое, так и психологическое стрессовое воздействие [21, 22], влияя на функционирование микробиоты кишечника [23–25].

В Институте медико-биологических проблем РАН проведен эксперимент «МАРС-500», имитирующий некоторые условия длительного межпланетного полета. Испытатели находились 510 дней в изолированном модуле в целях изучения возможного влияния условий «космического полета» на физиологическое и психическое состояние испытуемых. В качестве одного из медико-биологических тестов был исследован состав микробиоты кишечника пяти испытуемых, у которых в ходе эксперимента «МАРС-500» периодически брали пробы фекалий. Выделенные из них препараты ДНК использовали для секвенирования с последующим определением таксономического и генного состава микробиоты.

В результате исследования установлено, что длительное пребывание в замкнутом модуле привело к изменениям в составе микробиоты. Динамика изменений была индивидуальной для каждого из участников. По-видимому, происходила адаптивная перестройка экосистемы кишечника, отражавшая индивидуальный ответ участников на влияние условий эксперимента (психоэмоциональный стресс, смена типа питания, прием пробиотиков и т.п.). Эти воздействия не оказали заметного негативного влияния на здоровье испытуемых, о чем свидетельствуют итоги медико-биологического мониторинга состояния каждого из участников [26, 27].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Отбор образцов для метагеномного анализа

Среди участников эксперимента «МАРС-500» были представители четырех стран (России, Италии,

Франции, КНР) в возрасте от 28 до 38 лет, отобранные для включения в экипаж с учетом позитивных данных медицинского и психологического тестирования. В ходе эксперимента отбирали пробы фекалий в нулевой точке (непосредственно перед заходом в замкнутый модуль), через 14, 30, 210, 363, 510 дней пребывания в модуле и через 2 недели после выхода из модуля (524 дня). Пробы фекалий хранили при -80°C ; препараты ДНК выделяли с помощью наборов QIAamp DNA stool Mini Kit (Qiagen, Германия), широко используемых для анализа микробиоты в фекалиях. Качество препаратов ДНК проверяли методом электрофореза в агарозном геле. Отметим, что использованный метод выделения ДНК может приводить к занижению доли актинобактерий и завышению доли Bacteroidetes [28], однако сравнительный метагеномный анализ на разных этапах эксперимента правомерен, поскольку одинаковую методику применяли для всех проб.

Аmplификация и пиросеквенирование фрагментов генов 16S рибосомной РНК

Для ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК, включающего вариабельные участки V3–V5, использовали бар-кодированные «универсальные» праймеры PRK341F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG) и PRK806R (5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT). ПЦР проводили в объеме 50 мкл, содержащем 2.5 ед. GoTaq-ДНК-полимеразы (Promega), 0.2 мМ MgCl_2 , по 0.1 мкМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, по 1 мкМ каждого праймера и 0.1 мкг метагеномной ДНК. Реакцию проводили на амплификаторе Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Германия) по следующей программе: начальная денатурация в течение 2 мин при 96°C , затем 30 циклов ($96^{\circ}\text{C} - 40\text{ с}$, $58^{\circ}\text{C} - 40\text{ с}$, $72^{\circ}\text{C} - 1\text{ мин}$), последняя элонгация в течение 10 мин при 72°C . ПЦР-фрагменты очищали с помощью электрофореза в агарозном геле. Образцы для пиросеквенирования подготавливали по стандартной методике (исключая стадию фрагментации ДНК), используя набор реагентов GS Rapid Library Prep Kit. Для эмульсионной ПЦР использовали набор реактивов GS Titanium LV emPCR Kit (Lib-L) v2, пиросеквенирование на GS FLX (Roche) проводили по протоколу Titanium с использованием GS Titanium Sequencing Kit XLR70. Для дальнейшего анализа отбирали чтения длиной более 350 нуклеотидов. Таким образом, было получено 549668 независимых последовательностей фрагментов генов 16S рРНК, которые выравнивали и фильтровали с помощью пакета программ Mothur [29], версия 1.23.1. Химерные последовательности удаляли с помощью Chimera.uchime [30], входящей в состав пакета Mothur. Не прошедшие фильтрацию чтения составляли в разных образцах

до 10% от общего числа. Таксономическую классификацию прошедших фильтрацию чтений проводили с использованием метода Wang et al. [31], реализованного в программе RDP Classifier. Анализ результатов повторного секвенирования четырех препаратов ДНК, взятых у участников № 1 и № 5 на разных этапах эксперимента, показал, что различия между параллельными пробами (по критерию соотношения долей основных таксонов) составляли не более 3% от всего микробного сообщества. Это свидетельствует о методической корректности результатов, представленных на диаграммах.

Секвенирование метабеномов по технологии SOLiD
Библиотеки фрагментов из образцов метабеномной ДНК готовили по стандартной методике, используя набор реагентов SOLiD Fragment Library Construction Kit. Размеры библиотек измеряли, ис-

пользуя Agilent BioAnalyzer DNA1000 kit. Длина фрагментов варьировала от 183 до 254 п.н. Эмульсионную ПЦР проводили по стандартным протоколам, рекомендованным компанией Applied Biosystems, используя EZ Bead System. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК проводили чтениями по 50 п.н. на секвенаторе SOLiD 4.0 (Applied Biosystems). Объем секвенирования после фильтрации по качеству чтения составлял от 1.8 до 3.4 млрд н. на образец. После фильтрации чтения собирали в контиги с помощью параллельной версии Abyss 1.2.5 [32]. Поиск генов в контигах и их функциональную и таксономическую классификацию проводили на сервере MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>) для автоматической аннотации и анализа метабеномных данных. Эта программа предсказывает гены в контигах на основе FragGeneScan [33], а затем проводит поиск их гомологов с помощью BLAT [34] в соб-

Таблица 1. Энтеротипы микробиот участников в начальной точке эксперимента

Таксономическая принадлежность	Участник, №				
	1	2	3	4	5
Firmicutes					
Lachnospiraceae	8.63	12.33	7.59	19.11	15.07
Negativicutes	2.33	4.88	10.35	2.75	7.18
Ruminococcaceae	3.06	19.99	13.66	20.41	5.45
Другие	0.60	2.98	3.47	5.60	1.31
Bacteroidetes					
Prevotellaceae	75.25	< 0.01	35.78	9.63	0.03
Rikenellaceae	0.56	1.62	2.77	1.82	1.72
Porphyromonadaceae	0.58	1.23	2.87	5.34	1.31
Bacteroidaceae	2.57	53.36	17.16	28.92	63.82
Другие	0.96	0.26	4.62	5.60	0.83
Минорные группы					
Proteobacteria	5.09	0.72	1.14	0.15	2.50
Actinobacteria	0.08	0.07	0.02	< 0.01	0.04
Fusobacteriaceae	< 0.01	2.06	< 0.01	< 0.01	0.37
Verrucomicrobia	< 0.01	< 0.01	0.31	0.07	< 0.01
Другие микроорганизмы	0.28	0.5	0.27	0.61	0.36
Итого					
Число чтений до фильтрации	5450	4883	6253	4929	7882
Число чтений после фильтрации	5321	4567	5886	4610	7545
Энтеротип	II	I	II	III	I

Примечание. Показаны доли (%) просеквенированных последовательностей 16S рРНК, отнесенных к соответствующим таксономическим группам.

ственной базе данных M5NR, которая интегрирует несколько баз данных – GenBank, KEGG, COG, The SEED [35], UniProt [36]. При таксономической классификации каждый ген относили к семейству наиболее близкого гомолога из GenBank. Генам, имеющим совпадения в базе KEGG, были присвоены несколько категорий KEGG, соответствующих разным уровням иерархии.

Поскольку при функциональной и таксономической классификации MG-RAST не учитывается кратность прочтения генов, результаты анализа корректировали с учетом покрытия. Нуклеотидное покрытие предсказанных генов определяли в результате наложения индивидуальных чтений на собранные контиги с использованием программы Bowtie [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономический состав микробиома кишечника на основе результатов пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК

В микробиоте кишечника участников эксперимента «МАРС-500» методами метагеномики с использованием в качестве маркера 16S рРНК выявлено более 40 родов бактерий, большинство из которых относятся к четырем филумам: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria и Actinobacteria, что соответствует сведениям о составе кишечной микробиоты здоровых взрослых [38, 39]. Выявлены также представители некоторых других филумов, включая Fusobacteria, Verrucomicrobia и Synergistia. У двух участников обнаружены метаногенные археи рода *Methanobrevibacter*.

Сравнительный таксономический анализ микробиоты в пробах фекалий у пяти участников в начальной точке эксперимента (перед входом в закрытый модуль) выявил существенные индивидуальные различия между участниками по составу микробиоты. Полученные результаты (табл. 1) позволили определить принадлежность микробиоты к определенным энтеротипам согласно предложенной в 2011 году классификации [40, 41]. Энтеротипами обозначают специфические кластеры микробов с доминированием определенного таксона. Эти кластеры контролируют трофические связи в микробном сообществе и его взаимодействие с хозяином, имеющим индивидуальные генотипические характеристики.

Участники № 1 и № 3 обладают энтеротипом II, в котором доминирует *Prevotella* в сочетании с фирмикутами *Faecalibacterium*, *Coprococcus*, *Blautia*. В кишечной микробиоте участника № 3 обнаружены минорные группы *Akkermansia* (*Verrucomicrobia*)

и β-протеобактерий, тогда как участнику № 1 свойственна высокая доля γ-протеобактерий.

Микробиота участников № 2 и № 5 относится к энтеротипу I с преобладанием *Bacteroides* в кластере с *Parabacteroides*, *Faecalibacterium* и некоторыми группами Ruminococcaceae, Lachnospiraceae. У этих участников обнаружены также *Fusobacteria*. Особенностью состава микробиоты участника № 5 является относительно высокое содержание β-протеобактерий, а также преобладание рода *Phascolarctobacterium* среди Negativicutes, тогда как у участника № 2 доминирует род *Dialister*.

Иная картина таксономического состава микробного сообщества выявлена у участника № 4. В исходной точке эксперимента нет выраженного доминирования филогрупп, определяющих энтеротипы I и II, но высока доля Ruminococcaceae (включая неклассифицированные филотипы), Lachnospiraceae, а также Paraprevotella. Среди Negativicutes доминирует род *Dialister*, как и у участника № 2. Для микробиоты участника № 4 характерно наличие археи *Methanobrevibacter*. Таким образом, микробное сообщество кишечника этого участника отличается и может быть отнесено к смешанному типу, близкому к энтеротипу III [41]. Такой смешанный состав можно рассматривать скорее в ракурсе представлений о градиенте состава микробиома, чем концепции дискретных энтеротипов [42, 43].

Результаты метагеномного исследования показали, что длительное пребывание в закрытом модуле оказало влияние на таксономический состав микробиоты каждого из участников (рис. 1). Динамика изменений имела индивидуальный характер, что отражало различия в исходном составе микробных сообществ и разную реакцию участников на действие условий/факторов эксперимента. Как видно из рис. 1А–Г, не наблюдалось единого для всех участников однонаправленного тренда в изменениях состава микробиоты от начала до завершения эксперимента. Вариабельность изменений, по-видимому, можно связать с различиями в условиях эксперимента на разных его этапах. Это касается приема пробиотика *Enterococcus faecium* (в виде таблеток в первые 180 дней) и препаратов Эубикор и Витафлор в последние месяцы, смены диеты, выполнения некоторыми из членов экипажа специальных работ, связанных с выходом из основного модуля на условную поверхность Марса (после 210 дней, но до отбора проб через 363 дня). Все участники принимали одинаковые пробиотики и пребиотики в течение одного периода. Из модуля на условную поверхность Марса выходили в скафандрах участники № 2, № 3, № 5.

Об индивидуальном характере ответа каждого из участников свидетельствуют данные по динамике

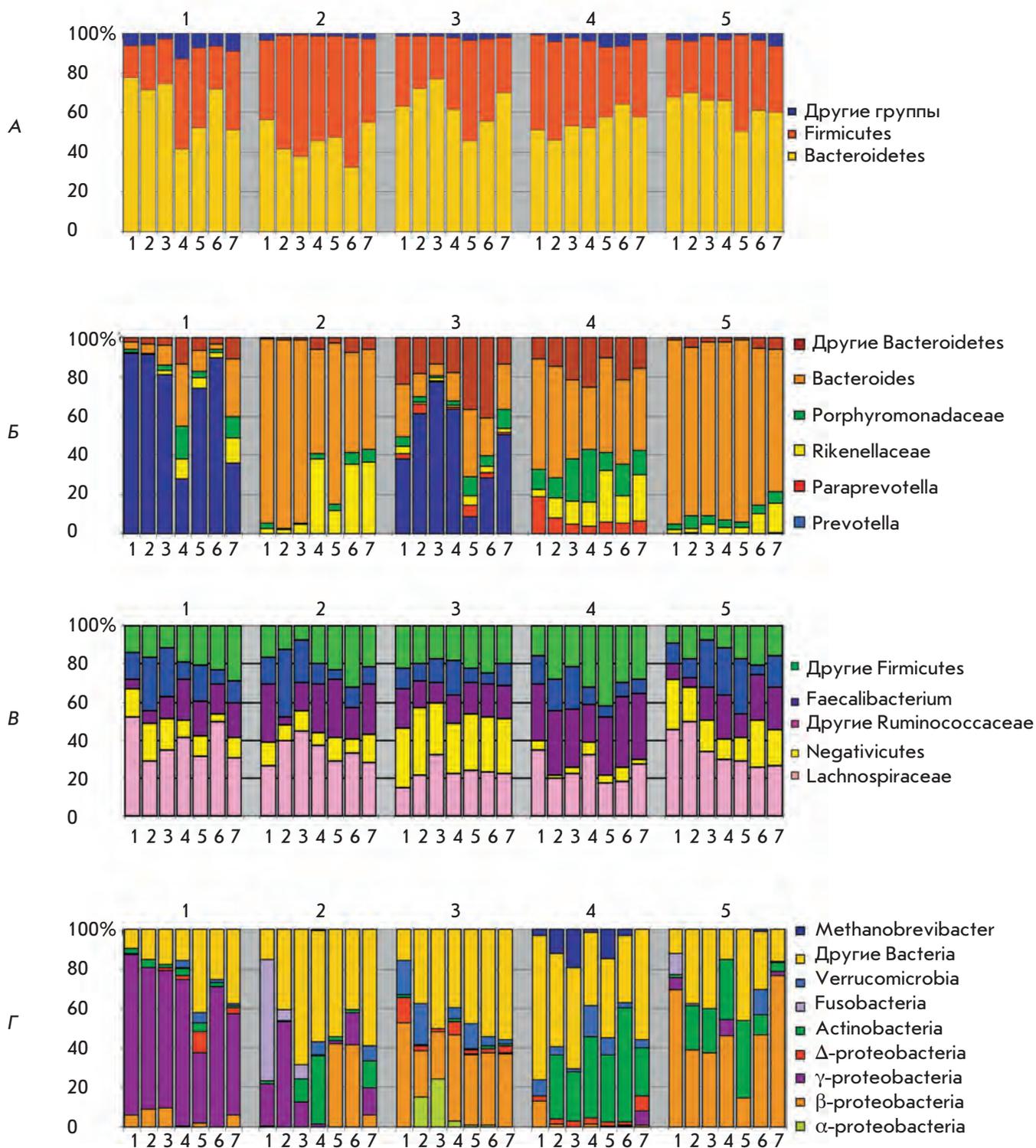


Рис. 1. Динамика изменения микробиоты кишечника участников эксперимента «МАРС-500». А – Основные группы микроорганизмов; Б – микроорганизмы филума Bacteroidetes; В – микроорганизмы филума Firmicutes; Г – минорные группы микроорганизмов. По оси ординат указана доля последовательностей, отнесенных к соответствующей таксономической группе (%), по оси абсцисс – номер образца (1 – 0, 2 – 14, 3 – 30, 4 – 210, 5 – 363, 6 – 510 и 7 – 524 дня). Сверху указаны идентификационные номера участника проекта

изменений в микробиоте на родовом и видовом уровне, а также по такому показателю, как соотношение основных филумов, Firmicutes (F) и Bacteroidetes (B). В микробиоте участников № 1, № 2, № 3 соотношение F/B заметно изменялось, а у участников № 4 и № 5 оставалось относительно стабильным на протяжении всего эксперимента (рис. 1А). Если у участника № 1 соотношение F/B существенно увеличивалось только к этапу 210 дней пребывания в модуле, то у участника № 2 повышение этого показателя наблюдалось уже через 2 недели, но после 210 дней начинало снижаться. У участника № 3, напротив, в первый месяц соотношение F/B уменьшалось, но затем снова повышалось. В ряде работ было показано, что резкие изменения в соотношении Firmicutes/Bacteroidetes встречаются при некоторых гастроэнтерологических [13, 44] и других заболеваниях [45, 46]. Однако ни у кого из участников эксперимента «МАРС-500» в ходе пребывания в модуле не были зарегистрированы симптомы такого рода заболеваний.

В течение всего эксперимента не происходили замены базового энтеротипа, хотя в микробиоте заметно изменялось долевое содержание отдельных таксонов. У участника № 1 с этапа 210 дней увеличилась доля неидентифицированных бактерий, представителей Firmicutes (рис. 1В) и протеобактерий (рис. 1Г) при сохранении высокого уровня *Prevotella*, *Faecalibacterium* и *Coprococcus* (рис. 1В). У участника № 2 обнаружена утрата фузобактерий уже на 14 день эксперимента (рис. 1Г) и колебания в относительном содержании определяющих энтеротип II бактерий рода *Bacteroides* (рис. 1Б). В первые недели отмечено некоторое увеличение доли *Faecalibacterium* (с последующим снижением) и уменьшение доли *Roseburia* при увеличении минорных видов *Alistipes* (*Rikenellaceae*) и представителей *Lachnospiraceae*. В микробиоте участника № 3 отмечено незначительное уменьшение доли

Bacteroides в первые недели при одновременном повышении относительного содержания *Prevotellaceae* (рис. 1Б) и доли γ -протеобактерий, а также *Megamonas* (*Negativicutes*) и неклассифицированных групп бактерий. В картине изменений состава большинства видов и родов кишечной микробиоты участника № 4 отсутствовали большие колебания (рис. 1), но явно прослеживалось увеличение относительного содержания *Faecalibacterium prausnitzii* (рис. 1В) в первые недели эксперимента и *Roseburia* на этапе 210 дней, а также повышение доли актинобактерий (рис. 2). Не выявлено существенных изменений в составе микробиоты (кроме протеобактерий) участника № 5 (рис. 1А), у которого, однако, обнаружена тенденция к снижению доли *Bacteroides* к концу пребывания в модуле (рис. 1Б).

При детальном сравнительном анализе профилей микробиоты выявлены определенные закономерности в динамике содержания актинобактерий и *Negativicutes*. В исходных пробах микробиоты у всех участников содержание актинобактерий минимально, что, возможно, связано с особенностями методики выделения ДНК и/или использованием праймеров, малоэффективных для получения фрагментов 16S рРНК бифидобактерий. Как видно на рис. 2, в пробах, взятых на разных этапах эксперимента, увеличено относительное содержание актинобактерий, особенно в микробиоте участника № 4. Такое повышение доли актинобактерий обусловлено, возможно, приемом пробиотиков, которые могут стимулировать рост бифидобактерий. Не исключено, однако, что такое возрастание доли актинобактерий определяется их более активной диссоциацией от поверхности эпителия, где осуществляется колонизация. Если состав *Negativicutes* на уровне рода не изменялся существенно в ходе эксперимента у участников № 2, № 4 и № 5, то в микробиоте участника № 3 обнаружено последовательное замещение рода *Phascolarctobacter* бак-

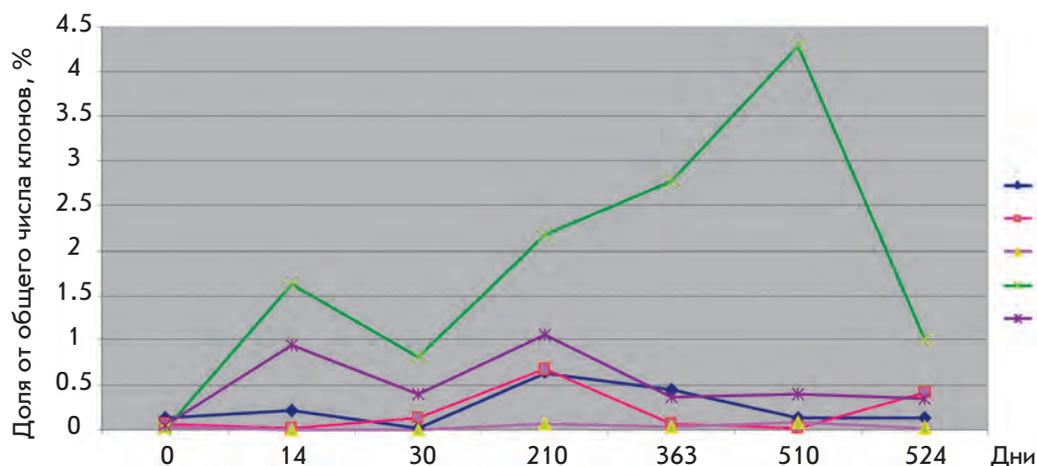


Рис. 2. Динамика изменения относительного содержания актинобактерий в микробиоте участников эксперимента «МАРС-500»

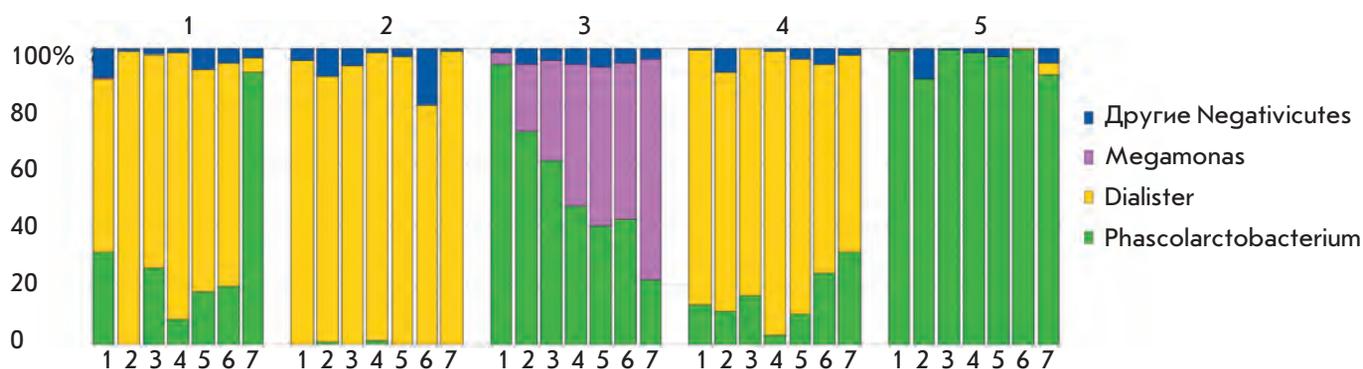


Рис. 3. Динамика изменения состава фирмикут Negativicutes в микробиоте участников эксперимента «МАРС-500». По оси ординат указана доля последовательностей, отнесенных к соответствующей таксономической группе (%); по оси абсцисс – номер образца (1 – 0, 2 – 14, 3 – 30, 4 – 210, 5 – 363, 6 – 510 и 7 – 524 дня). Сверху указаны идентификационные номера участника проекта

териями рода *Megamonas* (рис. 3) без восстановления исходного состава Negativicutes через 2 недели после выхода из модуля.

Анализируя динамику изменений состава кишечной микробиоты в ходе эксперимента, можно отметить следующие тенденции. Во-первых, воздействие условий/факторов эксперимента проявляется уже в первые недели, хотя и в разной степени у разных участников. Можно полагать, что быстрые изменения вызваны первой психоэмоциональной реакцией на непривычные стрессовые условия пребывания в изолированном модуле. Во-вторых, прослеживается тенденция к частичному восстановлению начального состава микробиоты по отдельным группам таксонов после завершения эксперимента. Однако ни у одного из участников исходный состав не восстановился полностью через 2 недели после выхода из модуля. Известно, что после применения антибиотиков, вызывающих резкие сдвиги в составе микроб-

ного сообщества в кишечнике, исходный состав начинает восстанавливаться после прекращения приема лекарственного средства [14], но даже для неполного восстановления состава индигенной микробиоты требуется длительное время [47].

Определение генного состава микробиоты участника № 2

Представленные выше результаты анализа таксономического состава микробиома по последовательностям генов 16S рРНК не дают прямой информации о наборе функциональных генов в микробном метабеноме. Поэтому нами определен генный состав образцов микробиоты участника № 2, у которого наблюдались заметные изменения в таксономическом составе микроорганизмов в ходе эксперимента.

При анализе результатов секвенирования образцов метабеномов ДНК по технологии SOLiD (табл. 2) следует учитывать, что 1) средняя длина контигов

Таблица 2. Результаты секвенирования метабеномов микробиоты кишечника участника № 2 на геномном анализаторе SOLiD

Этап эксперимента, дни	Число чтений, млн шт.	Объем секвенирования, млрд н.	N50 контига, нуклеотиды	Суммарная длина контигов, млн н.
0	42.0	2.0	185	26
14	57.7	2.8	157	23
30	68.7	3.3	147	23
210	38.6	1.8	155	26
363	68.9	3.3	152	34
524	70.6	3.3	159	32

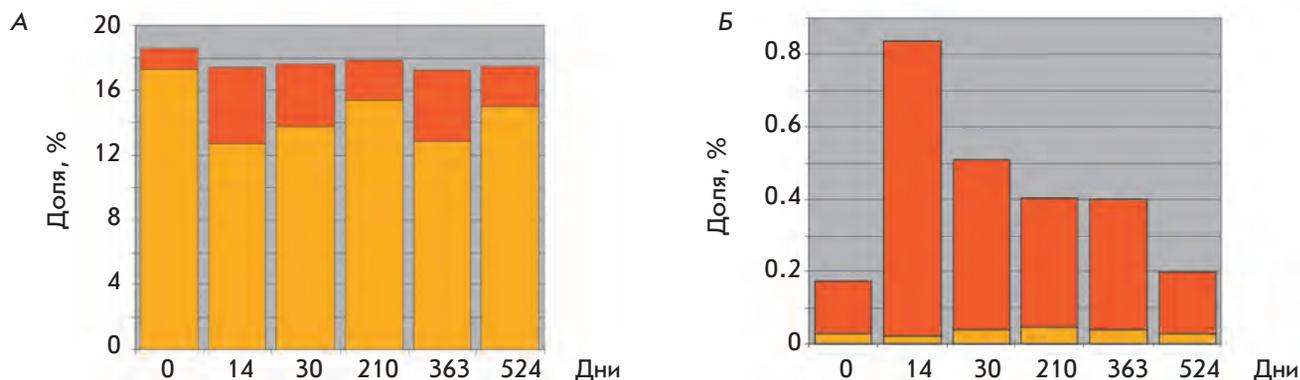


Рис. 4. Динамика изменений доли генов, отнесенных к функциональным категориям KEGG «Carbohydrates metabolism» (А) и «Cell motility» (Б) в метагеноме микробиоты кишечника участника № 2. По оси ординат указана доля генов соответствующей категории (%), по оси абсцисс – номер образца (1, 14, 30, 210, 363 и 524 дня). Желтым указаны доли генов, отнесенные к Bacteroidetes, оранжевым – к Firmicutes

для разных точек не превышала 200 нуклеотидов, т.е. была существенно меньше среднего размера бактериального гена; 2) присутствовавшие в микробиоме Bacteroidetes были представлены в основном родом *Bacteroides*, у многих видов которого определены полные геномные последовательности. Бактерии филума Firmicutes филогенетически более разнообразны. Поэтому таксономическая идентификация контигов, относящихся к Bacteroidetes, была более полной, в то время как многие контиги, в действительности принадлежащие Firmicutes, не удалось классифицировать из-за отсутствия близких гомологов в базах данных. Это привело к занижению доли Firmicutes в метагеноме по сравнению с результатами анализа по 16S рРНК. Тем не менее динамика изменений в соотношении Bacteroidetes и Firmicutes сохранялась.

Была охарактеризована количественная представленность генов определенных функциональных категорий в метагеноме (по классификации KEGG, [34]) и их принадлежность к различным таксономическим группам бактерий. В целом по основным функциональным категориям генов существенных изменений в микробиоте участника № 2 на протяжении эксперимента отмечено не было. Так, на категорию KEGG «Carbohydrates metabolism», одной из важнейших для функционирования кишечной микробиоты, на разных этапах эксперимента приходилось от 16.7 до 18.6% идентифицированных генов (рис. 4А). Однако относительный вклад различных таксонов Bacteroidetes и Firmicutes менялся в гораздо более широком диапазоне, о чем свидетельствуют результаты «таксономической» классификации этих генов и данные, полученные на основе таксономического анализа по 16S рРНК. Можно предполо-

жить, что в процессе перестройки таксономического состава микробиома происходило замещение генов, определяющих метаболизм углеводов, у различных представителей Bacteroidetes и Firmicutes, но общая доля этой функциональной категории в метагеноме почти не менялась.

Иная картина получена при анализе динамики изменений доли генов категории KEGG «Cell motility», контролирующей подвижность клеток (рис. 4Б). Большинство генов этой категории относились к Firmicutes и соответственно их доля в метагеноме изменялась при изменении относительного содержания Firmicutes и, возможно, Proteobacteria в сообществе. Эти данные согласуются с малым числом генов, определяющих подвижность клеток, в секвенированных геномах представителей рода *Bacteroides*. Признак подвижности клеток у Firmicutes и Proteobacteria контролируется большим числом генов [48]. Жгутики обеспечивают не только подвижность, но и сенсорные функции и межклеточные коммуникации в экосистемах [49]. Возможно, «востребованность» функции подвижности клеток определяет увеличение доли некоторых фило типов Firmicutes при перестройке микробного сообщества в ходе эксперимента.

Можно предполагать, что в процессе эксперимента «МАРС-500» происходила адаптивная перестройка микробного сообщества в ответ на стрессовые воздействия факторов длительной изоляции и формировался новый, сбалансированный таксономический состав микробиоты, обеспечивающий поддержание нормального функционирования гено-метаболических сетей как в самом микробном сообществе кишечника, так и в системе взаимодействий микробиоты с орга-

низмом хозяина. Такой адаптивный переход на новое сочетание таксонов с сохранением оптимального генного состава в целом сообществе может быть обеспечен за счет избыточности большинства категорий генов и функциональной взаимозаменяемости бактериальных филотипов из различных таксономических групп. Одним из механизмов такой взаимозаменяемости может быть обмен генами путем горизонтального переноса [50], который потенциально возможен при участии вирусов, мобильных элементов и конъюгативных плазмид, присущих многим микробам, обитающим в кишечнике.

ВЫВОДЫ

Результаты метагеномного анализа микробиоты кишечника у участников эксперимента «МАРС-500», имитирующего некоторые условия длительных межпланетных полетов, свидетельствуют о том, что при пребывании в закрытом модуле в микробиоте происходят заметные изменения в составе микробного сообщества. Эти изменения индивидуальны для каждого из участников, что определяется как различиями в исходном составе микробиоты, так и различным характером ответа на воздействие условий эксперимента в зависимости от генетических и физиолого-биохимических особенностей каждого из участников.

Факторами, влияющими на таксономический состав микробиоты, являются психологический стресс, обусловленный сменой образа жизни, переход на иной тип питания, прием пробиотиков. Мониторинг динамики изменений в микробиоте показал, что (1) заметные изменения в таксономическом составе начинают проявляться уже на первых этапах эксперимента; (2) несмотря на большую вариабельность, в составе отдельных таксономических групп смены энтеротипов не происходит, т.е. сохраняется базовый состав кишечной экосистемы; (3) через 2 недели после выхода из модуля наблюдается тенденция возврата к исходному составу микробиоты, но ни у одного из участников не происходит полного восстановления начального состава микробного сообщества. Возможно, двухнедельного периода «реабилитации» просто недостаточно для восстановления.

Поскольку в ходе эксперимента ни у одного из участников не было отмечено симптомов заболеваний, при которых состав микробиоты может существенно изменяться [6, 11, 12], то можно предпо-

ложить, что в экосистемах кишечника происходила перестройка таксономического состава, отражающая индивидуальный ответ на воздействие условий эксперимента, и формировалось новое сбалансированное сообщество. В пользу этого предположения свидетельствуют данные анализа генного состава микробиоты участника № 2. Генный состав метабенома кишечной микробиоты у этого участника мало изменялся на разных этапах эксперимента, что могло быть обусловлено компенсаторным замещением одних видов/штаммов другими, способными выполнять функции, связанные с обеспечением «нормального» взаимодействия микробного сообщества с организмом хозяина.

Таким образом, можно полагать, что мощное стрессовое воздействие длительного пребывания в изолированном модуле не оказалось для состояния микробиоты кишечника «драматическим» и не привело к заметным негативным последствиям для здоровья участников эксперимента. Очевидно, что изоляция при длительных космических полетах является лишь одним из стрессовых факторов, действие которых может потенциально влиять на космонавтов. При правильном отборе и подготовке экипажа этот фактор, по-видимому, не является решающим. Более существенными могут быть невесомость, радиация и некоторые специфические условия работы в корабле. Эти факторы, трудно воспроизводимые в условиях наземного эксперимента, могут увеличить вероятность нарушения функций желудочно-кишечного тракта, иммунной и других систем организма, что может вызвать развитие дисбиоза, который будет выражаться в существенных изменениях таксономического и генного состава микробиоты кишечника. Полученные в данной работе сведения об изменениях в составе микробиоты кишечника участников эксперимента «МАРС-500» следует рассматривать в плане возможностей использования методов метагеномного анализа микробиоты как одного из способов тестирования состояния здоровья участников реальных космических полетов и кандидатов для выполнения работ в экстремальных условиях действия сильных стрессовых факторов. ●

Работа поддержана программой развития ФГОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» до 2020 года.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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., et al. // Nature. 2012. V. 486. P. 207–214.

2. Methe B.A., Nelson K.E., Pop M., Creasy H.H., Giglio M.G., Huttenhower C., Gevers D., Petrosino J.F., Abubucker S., Badger J.H., et al. // Nature. 2012. V. 486. P. 215–221.
3. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S.,

- Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., et al. // *Nature*. 2010. V. 464. P. 59.
4. Kinross J.M., von Roon A.C., Holmes E., Darzi A., Nicholson J.K. // *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2008. V. 464. P. 396–403.
 5. Shestakov S.V. // *Biol. Bull. Rev.* 2011. V. 1. № 2. P. 83–93.
 6. Blumberg R., Powrie F. // *Sci. Translational Med.* 2012. V. 4. № 137. P. 137rv7.
 7. Claesson M.J., Cusack S., O’Sullivan O., Greene-Diniza R., de Weerd H., Flannery E., Marchesi J., Falush D., Dinanb T., Fitzgerald G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. Suppl. 1. P. 4586–4591.
 8. Turnbaugh P.J., Quince C., Faith J.J., Yatsunenko T., Niaz F., Affourtit J., Egholm M., Henrissat B., Knight R., Gordon J.I., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 7503–7508.
 9. Jalanka-Tuovinen J., Salonen A., Nikkila J., Immonen Q., Kekkonen R., Lahti L., Palva A., de Vos W. // *PLoS One*. 2011. V. 6. e23035.
 10. Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J.-P., Ugarte E., Munoz-Tamayo R., Paslier D.L.E., Nalin R., Dore J., Leclerc M. // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. № 10. P. 2574–2584.
 11. Willing B.P., Dicksved J., Halvorson J., Andersson A.F., Lucio M., Zheng Z., Jarnerot G., Tysk C., Jansson J.K., Engstrand L. // *Gastroenterology*. 2010. V. 139. P. 1844–1854.
 12. Frank D.N., St. Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 13780–13785.
 13. Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L., Relman D.A. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. e280.
 14. Dethlefsen L., Relman D.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 4554–4561.
 15. Robinson C.J., Bohannan B.J.M., Young V.B. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010. V. 74. № 3. P. 453–476.
 16. Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y.-Y., Keilbaugh S.A., Bewtra M., Knights D., Walters W.A., Knight R., et al. // *Science*. 2011. V. 334. P. 105–108.
 17. Claesson M.J., Jeffery I.B., Conde S. Power S.E., O’Connor E.M., Cusack S., Harris H.M.B., Coakley M., Lakshminarayanan M., O’Sullivan O., et al. // *Nature*. 2012. V. 488. P. 178–184.
 18. Lutgendorff F., Akkermans L.M.A., Soderholm J.D. // *Curr. Mol. Med.* 2008. V. 8. P. 282–298.
 19. Phillips M.L. // *Environm. Hlth Perspect.* 2009. V. 117. P. 199–205.
 20. Sharkey K.A., Mawe G.M. // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012. V. 9. P. 74–76.
 21. Лебедев В.В. // *Вест. РАН*. 2010. Т. 80. № 11. С. 1000–1004.
 22. Григорьев А.И., Егоров А.Д. Человек в космическом полете. М.: Наука, 1997. Т. 2. С. 368–447.
 23. Lizko N.N. // *Nahrung*. 1987. V. 31. P. 443–447.
 24. Лизько Н.Н. // *Вест. РАМН*. 1996. № 8. С. 31–34.
 25. Ильин В.К., Батов А.Б., Новикова Н.Д., Мухамедиева Л.Н., Поддубко С.В., Гегенава А.В., Марданов Р.Г., Соловьева З.О., Скедина М.А. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2010. Т. 44. № 4. С. 52–57.
 26. Ушаков И.Б. // *Abst. Intern. Symp. Results of the experiments simulating manned mission to Mars (MARS-500)*. Moscow: RAS, 2012. P. 64–65.
 27. Моруков Б.В., Белаковский М.С., Демин Е.П., Суворов А.В. // *Abst. Intern. Symp. Results of the experiments simulating manned mission to Mars (MARS-500)*. Moscow: RAS, 2012. P. 44.
 28. Salonen A., Nikkila J., Jalanka-Tuovinen J., Immonen O., Rajilic-Stojanovic M., Kekkonen R.A., Palva A., de Vos W. // *J. Microbiol. Methods*. 2010. V. 81. P. 127–134.
 29. Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 7537–7541.
 30. Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2194–2200.
 31. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 5261–5267.
 32. Simpson J.T., Wong K., Jackman S.D., Jones S.J.M., Birol I. // *Genome Res.* 2009. V. 19. № 6. P. 1117–1123.
 33. Rho M., Tang H., Ye Y. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 20. E191.
 34. Kent W.J. // *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 656–664.
 35. Overbeek R., Begley T., Butler R.M., Choudhuri J.V., Chuang H.-Y., Cohoon M., de Crecy-Lagard V., Diaz N., Disz T., Edwards R., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 17. P. 5691–5702.
 36. Apweiler R., Martin M.J., O’Donovan C., Magrane M., Alam-Faruque J., Antunes R., Barrell D., Bely B., Bingley M., Binns D. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. D214–219.
 37. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. // *Genome Biol.* 2009. V. 10. R25.
 38. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. // *Science*. 2005. V. 308. P. 1635–1668.
 39. Claesson M.J., O’Sullivan O., Wang Q., Nikkila J., Marchesi J.R., Smidt H., de Vos W.M., Ross R.P., O’Toole P.W. // *PLoS One*. 2009. V. 4. e6669.
 40. O’Toole P.W., Claesson M.J. // *Intern. Dairy J.* 2010. V. 20. P. 281–291.
 41. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.-M., et al. // *Nature*. 2011. V. 473. P. 174–180.
 42. Huse S.M., Ye Y., Zhou V., Fodor A.A. // *PLoS One*. 2012. V. 7. e34242.
 43. Jeffrey I.B., Claesson J., O’Toole P.W. // *Nat. Microbiol. Rev.* 2012. V. 10. P. 591–592.
 44. Frank D.N., Pace N.R. // *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008. V. 24. P. 4–10.
 45. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I. // *Nature*. 2006. V. 444. P. 1022–1023.
 46. Schwiertz A., Taras D., Schafer K., Beijer S., Bos N.A., Donus C., Hardt P.D. // *Obesity*. 2009. V. 18. P. 190–195.
 47. Jereberg C., Lofmark S., Edlund C., Jansson J.K. // *ISME J.* 2007. V. 1. P. 55–61.
 48. Bratlie M., Johansen J., Sherman B.T., Huang D.W., Lempicki R.A., Drablos F. // *BMC Genomics*. 2010. V. 11. P. 588.
 49. Anderson J.K., Smith T.G., Hoover T.R. // *Trends Microbiol.* 2010. V. 18. № 1. P. 30–37.
 50. Smillie C.S., Smith M.B., Friedman J., Cordero O.X., David L.A., Alm E.J. // *Nature*. 2011. V. 480. P. 241–244.