

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 579.61 + 613.81 + 615.917'262

©Коллектив авторов

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

**В.Б. Дубинкина^{1*}, А.В. Тяхт^{1,2}, Е.Н. Ильина², Д.С. Ищенко^{1,2},
Б.А. Коварский², К.С. Ярыгин¹, А.В. Павленко^{1,2}, А.С. Попенко²,
Д.Г. Алексеев^{1,2}, А.Е. Тараскина³, Р.Ф. Насырова³, Е.М. Крупицкий³,
Л.О. Скородумова², А.К. Ларин², Е.С. Кострюкова^{1,2}, В.М. Говорун^{1,2}**

¹Московский физико-технический институт (государственный университет),

41700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9;

факс: +7 (495) 408-42-54; эл. почта: dubinkina@phystech.edu

²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России,

отдел молекулярной биологии и генетики, ул. Малая Пироговская, 1а, 119435 Москва;

факс: +7 (499) 246-4409; эл. почта: niihfm@fmbamail.ru

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт

имени В.М. Бехтерева, ул. Бехтерева, 3, 192019 Санкт-Петербург;

факс: +7 (812) 412-71-28; эл. почта: nry@bekhterev.ru

Проведено первое метагеномное исследование микробиоты кишечника у пациентов с синдромом алкогольной зависимости (САЗ) в полногеномном (англ. “shotgun”) формате. Таксономический анализ выявил изменения в относительной представленности преобладающих бактерий, ассоциированные с воспалением (в том числе повышение уровня видов *Ruminococcus gnavus* и *R. torques*, а также понижение уровня родов *Faecalibacterium* и *Akkermansia*). В микробиоте пациентов с САЗ обнаружено присутствие оппортунистических патогенов, редко детектируемых в метагеномах здоровых индивидов из разных стран мира. Согласно изменениям относительной представленности групп генов KEGG Orthology, сравнительный анализ метаболического потенциала выявил повышение уровня путей, ассоциированных с ответом на окислительный стресс. У пациентов с САЗ обнаружено повышение двух специфичных групп генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме алкоголя, а также факторы вирулентности. Предположительно, микробиота кишечника больных алкоголизмом, демонстрирующая изменения как таксономического, так и функционального состава, играет роль в модуляции воздействия алкоголя на организм хозяина.

Ключевые слова: метагеном, микробиота кишечника, синдром алкогольной зависимости, метаболический потенциал, микробный метаболизм алкоголя, факторы вирулентности

DOI: 10.18097/PBMC20156106742

ВВЕДЕНИЕ

Большинство исследований синдрома алкогольной зависимости (САЗ) посвящено его нейрофизиологическим [1] последствиям и влиянию на функционирование печени и других органов человека, тогда как вопрос воздействия потребления алкоголя на микрофлору кишечника человека остаётся малоизученным [2]. Поскольку диета является одним из основных факторов, оказывающих влияние на видовой состав и функциональную активность

микробиоты, можно предположить, что алкоголь и продукты его деградации будут существенно модулировать состояние кишечной микрофлоры. На сегодняшний день наиболее исчерпывающую качественную и количественную характеристику таксономического состава микробиоты, в том числе некультивируемых видов, даёт метагеномное секвенирование [3]. В настоящее время опубликованы всего четыре работы по изучению особенностей структуры кишечного сообщества у пациентов с алкоголизмом, выполненные с помощью наиболее

* - адресат для переписки

распространённого формата этого подхода – секвенирования генов 16S рРНК [4-7]. Согласно их данным, в микробиоте таких пациентов, особенно при алкогольном синдроме печени (АЦП), повышается представленность *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* на фоне снижения *Clostridia*, *Bacteroidetes*, *Ruminococcaceae*, пробиотических *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Понижение уровня симбиотических бактерий, таких как *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lachnospiraceae*, *Roseburia*, *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium* и *Blautia*, способствует увеличению проницаемости стенки кишечника, что приводит к повышению уровня эндотоксинов в кровотоке и запуску воспалительных каскадов, по-видимому, индуцирующих поражение печени [2].

В РФ такие исследования не проводились, хотя проблема алкоголизма является социально-значимой для нашей страны: уровень потребления алкоголя в РФ – один из самых высоких на душу населения [8] и представляет собой главный фактор преждевременной смертности [9]. В данной работе мы впервые провели метагеномное исследование образцов кала от пациентов с САЗ, используя формат полногеномного секвенирования библиотек фрагментов ДНК (англ. “shotgun”, WGS, whole-genome sequencing). Анализ этих данных позволил выявить особенности не только таксономического состава микробиоты, но и её функционального потенциала – на уровне относительной представленности генов, кодирующих белки, включенные в метаболические пути и определяющие фенотипические признаки микроорганизмов.

МЕТОДИКА

В исследование были включены 20 мужчин с историей злоупотребления алкогольными напитками не менее 8 лет, повторно госпитализированные с диагнозом “синдром алкогольной зависимости”, в возрасте от 25 до 45 лет (средний возраст 37 ± 7 лет, здесь и далее среднее \pm стандартное отклонение; клинические данные приведены в доп. табл. 1). В число критериев исключения вошли: наличие тяжёлых сопутствующих заболеваний, в том числе АЦП, а также приём антибиотиков либо нестероидных противовоспалительных средств менее чем за 4 недели до забора материала. Каждый пациент перед началом исследования подписал информированное согласие на участие в данном проекте.

Забор кала у пациентов и выделение тотальной ДНК осуществляли согласно методике, разработанной в рамках выполнения работ по соглашению № 14.604.21.0119 при поддержке Минобрнауки РФ [10]. Подготовку фрагментных (“shotgun”) библиотек и их секвенирование с использованием генетических анализаторов SOLiD 4 и SOLiD 5500 (“Life Technology”, США) с длиной прочтения 50 пар нуклеотидов (п.н.) осуществляли согласно рекомендациям производителя.

Полученные для каждого образца прочтения картировали на референсные каталоги из 353 геномов и 3,3 млн. генов микробиоты кишечника человека [10], в результате чего получали векторы относительной представленности микробных видов и групп генов согласно номенклатуре KEGG Orthology (KO) [11]. В качестве основной контрольной группы использовали набор метагеномов кишечника здорового населения РФ ($n=96$ образцов) [12]. Дополнительно проводили сравнение с метагеномами кишечника населения США ($n=137$) [13], Китая ($n=69$) [14] и Дании ($n=85$) [15]. Альфа-разнообразие, то есть богатство сообщества в одном метагеноме, оценивали по индексу Шеннона [16]. Для подсчёта попарных расстояний между метагеномами по видовому составу использовали меру Брея-Кёртиса (числовой индекс, вычисляемый на основании анализа сходства долей видов, присутствующих в обоих образцах). Сравнительный анализ относительной представленности микробных родов и метаболических путей между экспериментальной и контрольной группами проводили как описано ранее [12]. Статистический анализ выполняли в среде R (версия 3.1.0).

В качестве дополнительного алгоритма таксономического профилирования метагенома использовали программный пакет MetaPhlAn версии 1.7.7 [17] (параметры запуска программы: `-t rel_ab --tax_lev s`, для выравнивания применяли программный пакет Bowtie [18]).

Относительную представленность генов, кодирующих факторы вирулентности, оценивали с использованием базы данных VFDB (Virulence Factors Database), включающей нуклеотидные последовательности 2245 генов [19], путём суммирования значений относительной представленности схожих с ними генов из указанного выше референсного каталога (критерий сходства: при выравнивании с помощью алгоритма BLASTn $e\text{-value} < 10^{-5}$, процент идентичности $\geq 80\%$ при совпадении на $\geq 80\%$ длины).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка таксономического состава микробиоты кишечника у пациентов с САЗ

В ходе определения таксономического состава было идентифицировано, то есть успешно картировано на референсный каталог геномов ($28,0 \pm 8,2\%$ прочтений (для контрольной группы ($23,9 \pm 6,5\%$)). Доля идентифицированных прочтений при определении функционального состава также не отличалась от нормы: ($44,2 \pm 5,4\%$) против ($47,4 \pm 6,4\%$) для контроля. Доля прочтений, картированных на геном человека, составила ($0,25 \pm 0,27\%$) (против ($0,47 \pm 0,91\%$) в контрольной группе).

Согласно проведённому картированию метагеномных данных на референсный каталог, в микробиоте пациентов с САЗ выявлено присутствие 218 видов бактерий, относящихся к 67 родам (см. доп. табл. 2, 3). Уровень альфа-разнообразия,

отражающий богатство сообщества, у пациентов статистически не отличается от такового у здоровых россиян (индекс Шеннона $3,3 \pm 0,6$ против $3,3 \pm 0,6$, $p=0,96$, t -критерий Уэлча). Набор преобладающих видов в целом соответствует наблюдаемому по контрольным метабеномам как от населения РФ, так и других стран (рис. 1). В пяти образцах наиболее представленным ($>20\%$) является род *Bacteroides*, в четырёх образцах – *Prevotella*. В терминологии энтеротипов (устойчивых дискретных типов структуры кишечного сообщества [20]), данные виды являются основными компонентами изначально обнаруженных энтеротипов 1 и 2, соответственно. В большинстве оставшихся образцов преобладают филогенетически близкие рода *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* и *Blautia*, а также неклассифицированные рода из семейства *Lachnospiraceae*.

Визуализация разброса таксономического состава метабеномов пациентов с САЗ в контексте мировых данных (см. рис. 2) показала, что их основная часть локализуется в области контрольной группы РФ. Однако, имеются образцы, формирующие выбросы на карте MDS. Так, в образце A17 значительно снижено альфа-разнообразие микробного сообщества (индекс Шеннона 1,45), что отражается в доминирующем содержании (77%) бактерий-комменсалов рода *Prevotella*. В образцах A054 и A066 наблюдается повышенное (26% и 51%, соответственно) содержание

бактерий рода *Escherichia/Shigella*, преимущественно за счёт вида *E. coli*, что на 1-2 порядка превышает долю этих микроорганизмов в микробиоте здоровых людей и потенциально указывает на наличие воспалительных процессов в кишечнике. С другой стороны, *E. coli* может проявлять толерантность к этанолу и даже использовать его в качестве источника энергии [21]. Интересно, что в том же образце A054 значительно повышен уровень рода *Bifidobacterium* (9,7% вид *B. adolescentis*). Хотя бифидобактерии традиционно считаются ассоциированными со здоровым кишечником и используются как пробиотики, недавно было показано, что их уровень в микробиоте кишечника может повышаться при язвенном колите [22]. В другом образце, формирующем выброс, – A046 – наиболее представленным видом оказался *Methanobrevibacter smithii* (19%) – одна из немногих архей, типичных для кишечника человека, представленность которой в контрольной выборке не превышает 12%. В том же образце существенно повышена доля условного патогена *Enterobacter cloacae* (0,9%), присутствующего менее чем у 1% контрольной выборки.

Интересно, что для трёх пациентов (A054, A066 и A046), образцы от которых формируют перечисленные выбросы, в анкете в качестве одного из мотивов потребления указано “похмельные” –

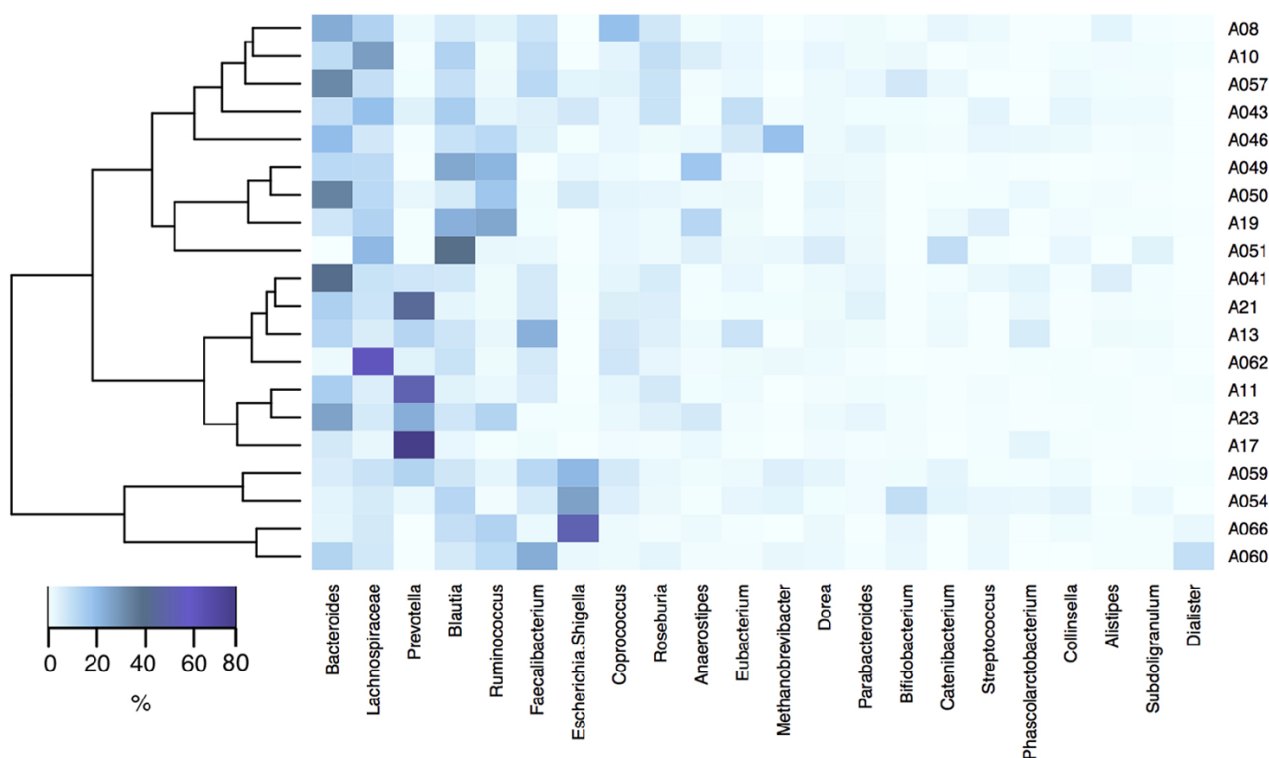


Рисунок 1. Тепловая карта относительной процентной представленности бактериальных родов в образцах микробиоты пациентов с САЗ. Интенсивность цвета отражает величину относительной представленности (чем темнее цвет, тем больше доля бактерии в данном образце). Приведены данные по родам, составляющим $\geq 1\%$ от общей относительной представленности бактерий хотя бы в одном образце. Строки соответствуют образцам, иерархически кластеризованным по сходству родового состава (метод Уорда, метрика различия Брея-Кертиса). Столбцы соответствуют бактериальным таксонам, упорядоченным в порядке убывания средней представленности в образцах слева направо.

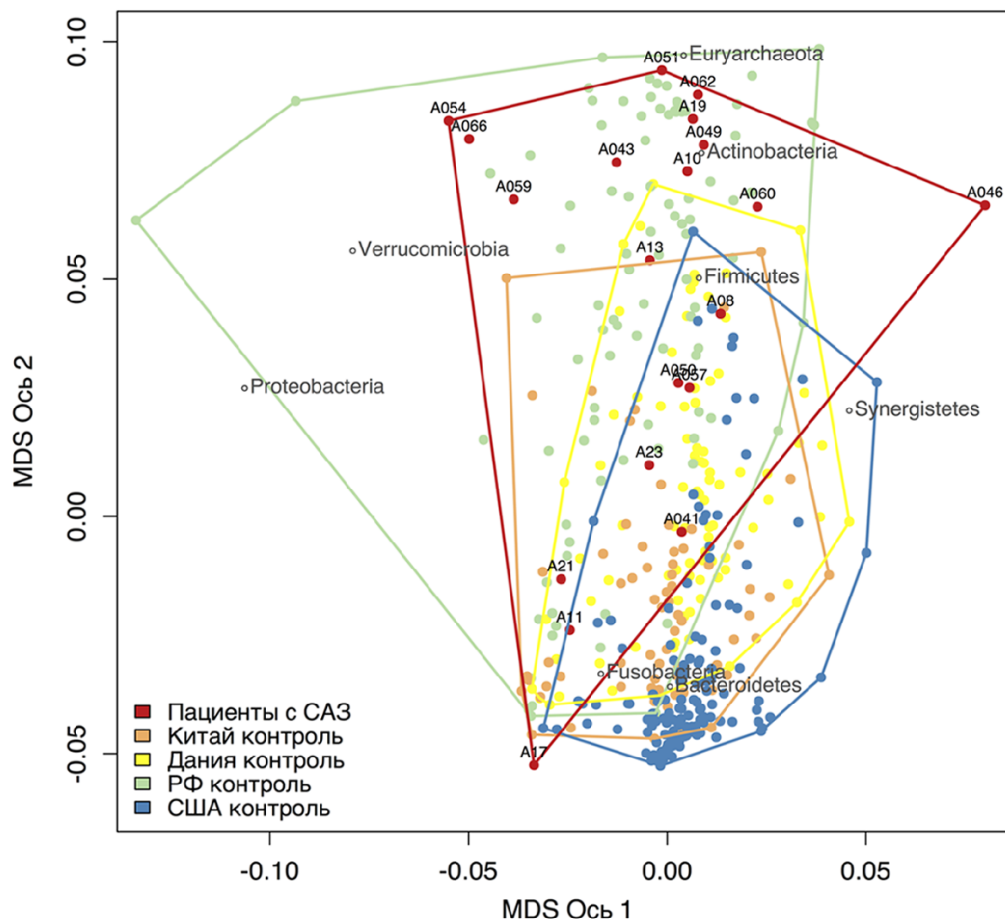


Рисунок 2. Карта видового разнообразия образцов. Понижение размерности и вычисление координат точек получено с помощью алгоритма многомерного шкалирования [MDS] по метрике мера Брея-Кертиса, с отражением выпуклой оболочки для каждой из групп метагеномов (всего $n=387$). Надписи указывают направление увеличения в метагеномах доли бактерий соответствующего отдела по отношению к началу координат. Для наглядности на рисунке отображены лишь микробные отделы, идентифицированные не менее чем в 5 метагеномах.

притом, что среди всех 20 пациентов такая запись имеется лишь у шести. Возможно, индивидуальные особенности метаболизма алкоголя, приводящие к тяжёлому похмельному синдрому, вызывают также формирование аномального состава микробиоты кишечника, с преобладанием видов, толерантных к токсичным производным алкоголя.

Статистический анализ относительной представленности отдельных бактериальных видов в группе пациентов с САЗ по сравнению с контрольной группой населения РФ показал повышение доли для 4 видов и понижение – для 6 видов. При сравнении с контрольными группами из других стран список различающихся родов был значительно выше, что указывает на высокую степень сходства пациентов с САЗ с контрольной группой РФ (результаты по наиболее представленным видам бактерий показаны на доп. рисунке 1; полностью – в доп. табл. 4).

По сравнению с микробиотой здорового населения РФ, у пациентов с САЗ была значимо повышена доля 3 видов бактерий рода *Ruminococcus* (в том числе *R. gnavus*, *R. torques*) и 1 вида *Blautia* ($p<0,05$). Примечательно, что, хотя многие известные

виды-представители кишечного рода *Ruminococcus* являются комменсалами, лишь некоторые из них обладают свойством активно расщеплять муцин стенки кишечника, и это именно *R. gnavus* и *R. torques*. Ряд исследований показал повышение доли этих двух видов при воспалительных заболеваниях кишечника, в том числе были прояснены некоторые механизмы их участия в этом. Так, у *R. gnavus* был выявлен ген фермента транс-сиалидазы, обеспечивающей адаптацию бактерий к существованию в слизи [23, 24].

С другой стороны, у пациентов была значимо понижена доля видов *Akkermansia muciniphila*, *Coprococcus eutactus*, *Faecalibacterium prausnitzii* и *Clostridium* sp. L2-50. Такие же наблюдения были в опубликованных исследованиях микробиоты пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника [25, 26]. Часть из указанных видов, в том числе *F. prausnitzii* и *Coprococcus* spp., – важные для кишечника производители бутирата – метаболита, который служит источником энергии для колоноцитов, а также обладает противовоспалительным и противораковым эффектом [27].

Дополнительно к количественному сравнительному анализу, была произведена оценка на качественном уровне – присутствия/отсутствия отдельных микробных видов. У пациентов с САЗ были обнаружены оппортунистические патогены, редко наблюдаемые у здорового населения РФ, в том числе: виды из рода *Enterobacter* (*cloacae*, *cancerogenus*, *asburiae*), *Fusobacterium* (*ulcerans*, *varium*, *mortiferum*) и ряд других (см. доп. табл. 5). Один из таких микроорганизмов – *Clostridium* sp. 7 2 43FAA – был идентифицирован у 5 из 20 пациентов с САЗ и ни у одного индивида из контрольной группы.

В недавнем исследовании метагенома кишечника у пациентов с декомпенсированным циррозом печени было отмечено значительное присутствие бактериальных видов, которые у здоровых индивидов обычно населяют ротовую полость; авторы связали этот факт с нарушением функций печени, в том числе секреции желчи [28]. Мы решили оценить степень выраженности этого эффекта у исследуемых пациентов с САЗ, у которых наблюдалась начальная стадия цирроза печени. Таксономическое профилирование методом MetaPhlAn, позволяющим детектировать виды не только кишечные, но и из других сред (см. раздел “Методика”), не выявило доминирования указанных бактерий у пациентов с САЗ: только в 3 образцах (A19, A054 и A060) их максимальная совокупная доля достигала лишь 2% за счёт видов *Veillonella parvula*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus anginosus*, *parasanguinis*, *salivarius* и *vestibularis*.

Функциональные особенности микробиоты кишечника пациентов с САЗ в сравнении с контрольной группой

Полученные метагеномные данные были использованы для оценки метаболического потенциала микробиоты путём сопоставления представленности генов, продукты которых

задействованы в тех или иных обменных процессах, происходящих в микробной клетке. По сравнению с микробиотой здорового населения РФ у больных с САЗ была понижена относительная представленность генов, входящих в состав восьми метаболических путей согласно классификации базы данных KEGG и повышена – для двух (табл. 1). Большая часть избыточно представленных метаболических путей ассоциирована с ответом на окислительный стресс и удалением продуктов деградации алкоголя.

Отдельно была проанализирована представленность генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме алкоголя (согласно биохимическим реакциям из базы KEGG). У пациентов с САЗ значимо повышен уровень групп генов, кодирующих альдегид-дегидрогеназы (K00138, K00128, K04021 и K04072) по сравнению с контрольной группой из числа населения РФ. Подобное изменение можно рассматривать как компенсаторный механизм, способствующий более быстрому расщеплению токсичного ацетальдегида микрофлорой кишечника [29]. По сравнению с контрольными группами из других стран мира, значимое повышение наблюдается для ещё большего числа генов, среди которых гены алкогольдегидрогеназы и другие (рис. 3).

Для оценки совокупного патогенного потенциала микробиоты при алкоголизме, был произведён анализ генов, кодирующих факторы вирулентности. Всего по каталогу было найдено 211 генов, схожих с генами базы VFDB. Из них в исследуемой выборке было детектировано присутствие 111 генов вирулентности, 88% из которых принадлежали видам *E. coli* и *Shigella* spp.. Представленность восьми генов была достоверно выше в группе пациентов с САЗ по отношению к контролю (см. табл. 2). Среди них преимущественно гены, кодирующие поверхностные структуры бактериальной клетки – пили, способствующие адгезии бактерий на клетках эпителия, а также энтеротоксины.

Таблица 1. Метаболические пути, относительные представленности генов которых значимо отличаются в микробиоте пациентов с САЗ от контрольной группы РФ ($p < 0,01$).

Название пути в базе KEGG	KEGG идентификатор пути	Число генов в пути	Предст-ть пути повышена или понижена при САЗ	Число пониженных по предс-ти генов	Число повышенных по предс-ти генов
ABC транспортеры	ko02010	325	повышена	19	79
Фосфотрансферазная система (PTS)	ko02060	75	повышена	1	22
Биосинтез убихинона и других терпеноидных хинонов	ko00130	39	повышена	7	2
Деградация полисахаридов	ko00511	16	повышена	7	0
Биосинтез О-полисахаридов	ko00514	28	повышена	2	0
Деградация глюкозаминогликанов	ko00531	14	повышена	8	0
Биосинтез липополисахаридов	ko00540	30	повышена	15	2
Метаболизм сфинголипидов	ko00600	40	повышена	6	2
Биосинтез аминокислот-тРНК	ko00970	64	повышена	18	10
Двухкомпонентные системы регуляции ответа	ko02020	322	повышена	43	47

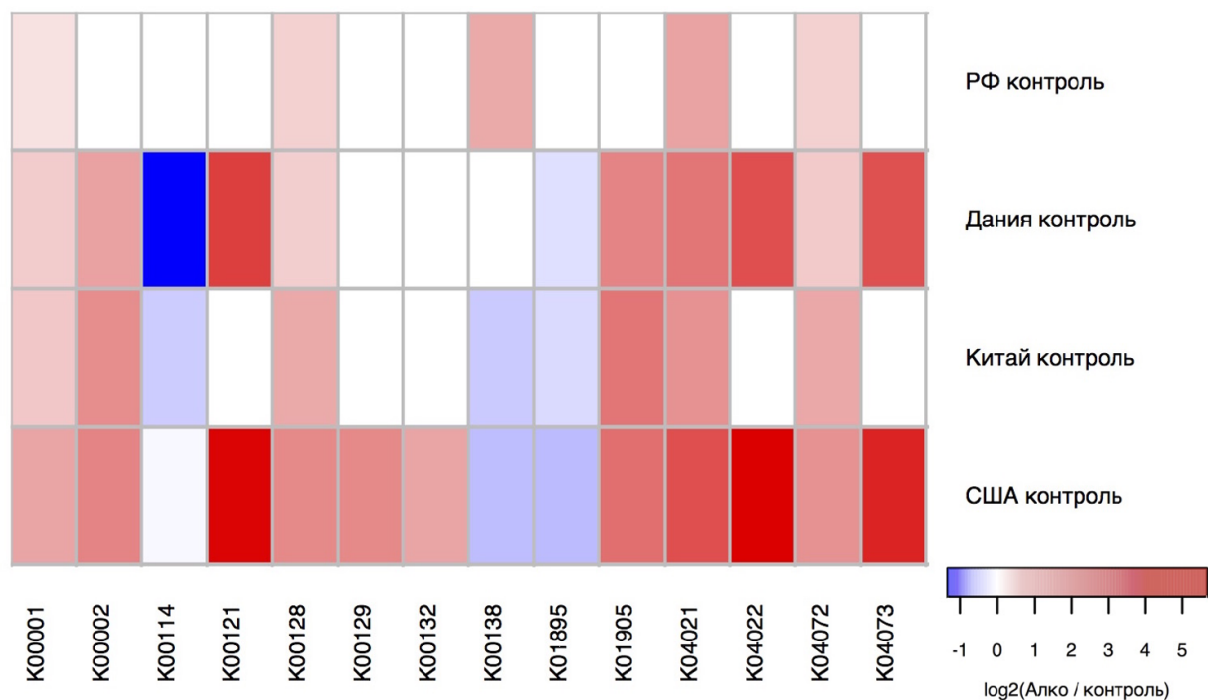


Рисунок 3. Различия в относительной представленности путей метаболизма этанола у пациентов с САЗ и различными контрольными группами. Отображены только отношения средних значений для КО групп с $p \leq 0,05$. Алкоголь-дегидрогеназы: K00001, K00002, K04022, K00121; альдегиддегидрогеназы и ацетальдегиддегидрогеназы: K00114, K00138, K00128, K00129, K00132, K04021, K04072, K04073; ацетил-Co-A-синтетазы: K01895, K01905; пируватдекарбоксилаза: K01568.

Таблица 2. Гены вирулентности, представленность которых значимо повышена у пациентов с САЗ по сравнению с контрольной группой населения РФ.

Идентификатор гена в базе VFDB	Описание	Бактериальный вид-источник (согласно VFDB)	Средняя отн. предст-ть, пациенты с САЗ	Средняя отн. предст-ть, РФ контроль	p-значение
G01422	Эффиктор системы секреции 3 типа espR1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933	6,65E-009	3,90E-009	0,04
G01479	Эффиктор системы секреции 3 типа EspX5	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933	2,93E-009	2,75E-009	0,027
VFG0877	Предшественник белка FimF	<i>Escherichia coli</i>	1,04E-008	3,08E-009	0,049
VFG0880	Регуляторный белок PapI	<i>Escherichia coli</i>	2,02E-009	4,09E-010	0,009
VFG0883	Субъединица пилей PapH	<i>Escherichia coli</i>	2,61E-009	2,31E-010	0,043
VFG0904	Гемоглобин-протеаза	<i>Escherichia coli</i>	1,93E-009	2,59E-010	0,004
VFG0911	Периплазматический шаперон FIC	<i>Escherichia coli</i>	5,31E-010	1,09E-010	0,04
VFG1827	Энтеротоксин	<i>Shigella boydii</i>	6,41E-009	1,99E-010	0,012

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Проведённое нами пилотное исследование – первое метагеномное исследование микробиоты кишечника человека при алкоголизме в полногеномном (“shotgun”) формате, как в РФ, так и в мире. Таксономический анализ показал, что в целом микробиота пациентов с САЗ схожа с микробиотой здоровой российской популяции по основным видовым компонентам сообщества. Однако, были идентифицированы изменения представленности

отдельных родов, ассоциированные с кишечным воспалением. У ряда пациентов обнаружены оппортунистические патогены, в том числе низко представленные, редко встречающиеся у здоровых людей. Анализ особенностей метаболического потенциала показал повышение относительной представленности для ряда путей, ассоциированных с ответом на окислительный стресс, а также повышение уровня генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме алкоголя, и факторы вирулентности. Полученные результаты свидетельствуют о том,

что микробиота пациентов с САЗ претерпевает существенные изменения как на уровне структуры сообщества, так и на уровне генов, предположительно, модулируя воздействие алкоголя и его метаболитов на организм человека.

Данное исследование осуществлялось за счёт средств государственного контракта № RFMEFI60414X0119 при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки РФ, с использованием оборудования Междисциплинарного ЦКП Казанского Федерального (Приволжского) Университета (ГК № 14.594.21.0003, уникальный идентификатор RFMEFI59414X0003).

ЛИТЕРАТУРА

- Gilpin N.W., Koob G.F. (2008) Alc. Res. Health: J. Nat. Inst. Alc. Abuse and Alcoholism, **31**(3), 185.
- Leclercq S., Matamoros S., Cani P.D., Neyrinck A.M., Jamar F., Stärkel P., Windey K., Tremarolig V., Bäckhed F., Verbeke K., de Timaraya P., Delzenne N.M. (2014) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **111**(42), E4485-E4493.
- Fraher M.H., O'Toole P.W., Quigley E.M. (2012) Nature Rev. Gastroenterol. Hepatol., **9**(6), 312-322.
- Mutlu E.A., Gillevet P.M., Rangwala H., Sikaroodi M., Naqvi A., Engen P.A., Kwasny M., Lau C.K., Keshavarzian A. (2012) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., **302**(9), G966-G978.
- Queipo-Ortuño M.I., Boto-Ordóñez M., Murri M., Gomez-Zumaquero J.M., Clemente-Postigo M., Estruch R. et al. (2012) Am. J. Clin. Nutr., **95**(6), 1323-1334.
- Bull-Ottersson L., Feng W., Kirpich I., Wang Y., Qin X., Liu Y., Gobejishvili L., Joshi-Barve S., Ayvaz T., Petrosino J., Kong M., Barker D., McClain C., Barve S. (2013) PLoS ONE, **8**(1), e53028.
- Bajaj J.S., Heuman D.M., Hylemon P.B., Sanyal A.J., White M.B., Monteith P., Noble N.A., Unser A.B., Daita K., Fisher M.R. et al. (2014) J. Hepatol., **60**(5), 940-947.
- World Health Organization (2014) World Health Organization.
- Zaridze D., Lewington S., Boroda A., Scélo G., Karpov R., Lazarev A., Konobeevskaya I., Igitov V. et al. (2014) Lancet, **383**(9927), 1465-1473.
- Кострюкова Е.С., Карпова И.Ю., Ларин А.К., Попенко А.С., Тяхт А.В., Ильина Е.Н. (2014) Биомед. химия, **60**(6), 695-701.
- Kanehisa M. (2002) Silico Sim. Biol. Proc., **247**, 91-103.
- Tyakht A.V., Kostryukova E.S., Popenko A.S. et al. (2013) Nat. Commun., **4**, 2469.
- Human Microbiome Project Consortium (2012) Nature, **486**(7402), 207-214.
- Qin J., Li Y., Cai Z. et al. (2012) Nature, **490**(7418), 55-60.
- Qin J., Li R., Raes J. et al. (2010) Nature, **464**(7285), 59-65.
- Hill T.C.J., Walsh K.A., Harris J.A., Moffett B.F. (2003) FEMS Microbiology Ecology, **43**(1), 1-11.
- Segata N., Waldron L., Ballarini A., Narasimhan V., Jousson O., Huttenhower C. (2012) Nature Methods, **9**(8), 811-814.
- Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. (2009) Genome Biol., **10**, R25.
- Chen L., Xiong Z., Sun L., Yang J., Jin Q. (2011) Nucleic Acid Res., gkr989.
- Arumugam M., Raes J., Pelletier E. et al. (2011) Nature, **473**, 174-180.
- Goodarzi H., Bennett B.D., Amini S., Reaves M.L., Hottes A.K., Rabinowitz J.D., Tavazoie S. (2010) Molecular Sys. Biol., **6**(1), 378.
- Wang W., Chen L., Zhou R., Wang X., Song L., Huang S. et al. (2014) J. Clin. Microbiol., **52**(2), 398-406.
- Png C.W., Lindén S.K., Gilshenan K.S., Zoetendal E.G., McSweeney C.S., Sly L.I. (2010) Am. J. Gastroenterol., **105**(11), 2420-2428.
- Tailford L.E., Owen C.D., Walshaw J., Crost E.H., Hardy-Goddard J., Le Gall G. (2015) Nature communications, **6**, 7624.
- Gevers D., Kugathasan S., Denson L.A., Vázquez-Baeza Y., Van Treuren W., Ren B. (2014) Cell Host & Microbe, **15**(3), 382-392.
- Belzer C., de Vos W.M. (2012) ISME J., **6**(8), 1449-1458.
- Hamer H.M., Jonkers D.M.A.E., Venema K., Vanhoutvin S.A.L.W., Troost F.J., Brummer R.J. (2008) Aliment. Pharmacol. Ther., **27**(2), 104-119.
- Qin N., Yang F., Li A., Prifti E., Chen Y., Shao L. (2014) Nature, **513**, 59-64.
- Nosova T., Jokelainen K., Kaihovaara P., Heine R., Jousimies-Somer H., Salaspuro M. (1998) Alc. Alcoholism, **33**(3), 273-280.

Поступила: 06. 10. 2015.

**METAGENOMIC ANALYSIS OF TAXONOMIC AND FUNCTIONAL CHANGES
IN GUT MICROBIOTA OF PATIENTS WITH ALCOHOLIC DEPENDENCE SYNDROME**

***V.B. Dubinkina¹, A.V. Tyakht^{1,2}, E.N. Ilina², D.S. Ischenko^{1,2}, B.A. Kovarsky², K.S. Yarygin¹, A.V. Pavlenko^{1,2},
A.S. Popenko², D.G. Alexeev^{1,2}, A.E. Taraskina³, R.F. Nasyrova³, E.M. Krupitski³, L.O. Skorodumova²,
A.K. Larin², E.S. Kostryukova^{1,2}, V.M. Govorun^{1,2}***

¹Moscow Institute of Physics and Technology (State University),

9 Institutskii Per., Moscow Region, Dolgoprudny 141700 Russia; fax: +7(495)408-42-54; e-mail info@mipt.ru

²Scientific Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Department of Molecular Biology and Genetics,
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; fax: +7(499)246-4409; e-mail: niifhm@fmbamail.ru

³Saint-Petersburg Bekhterev Psychoneurological Research Institute,

3 Bekhterev str., Saint-Petersburg, 192019 Russia; fax: +7 (812) 412-71-28; e-mail: npy@bekhterev.ru

Here we present the first metagenomic study of gut microbiota in patients with alcohol dependence syndrome (ADS) performed in the whole-genome (“shotgun”) format. Taxonomic analysis highlighted changes in community “drivers” abundance previously associated with inflammatory processes (including increase in *Ruminococcus gnavus* and *torques*, as well as decrease in *Faecalibacterium* and *Akkermansia*). Microbiota of alcoholics manifested presence of specific opportunistic pathogens rarely detected in healthy control subjects of the world. Differential analysis of metabolic potential basing on changes in KEGG Orthology groups abundance revealed increase in pathways associated with response to oxidative stress. Analysis of two specific gene groups – alcohol metabolism and virulence factors – also showed increase in comparison with the control groups. We suggest that gut microbiota distinct in alcoholics by both taxonomic and functional composition plays role in modulating the effect of alcohol on host organism.

Key words: metagenome, gut microbiota, alcohol dependence syndrome, metabolic potential, microbial alcohol metabolism, virulence factors