



Новые парадигмы и перспективы реабилитации населения в постковидную эру: неврологические заболевания, фармабиотики и нутригеномика микробиомом.

В.Н.Даниленко¹, А.В.Девяткин², М.У.Шибилова³, В.И.Шмырев⁴

¹ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, Россия, E-mail: valerid@vigg.ru

²ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой» УДП РФ, Москва, Россия, E-mail: dav-med@yandex.ru

³ФГБУ «Поликлиника № 1» УДП РФ, Москва, Россия, E-mail: shibilova@mail.ru

⁴ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» УДП РФ, Москва, Россия, E-mail: alexvasiliev@mail.ru

**«Инновационные технологии в неврологии и смежных специальностях»
6 октября 2021г.**

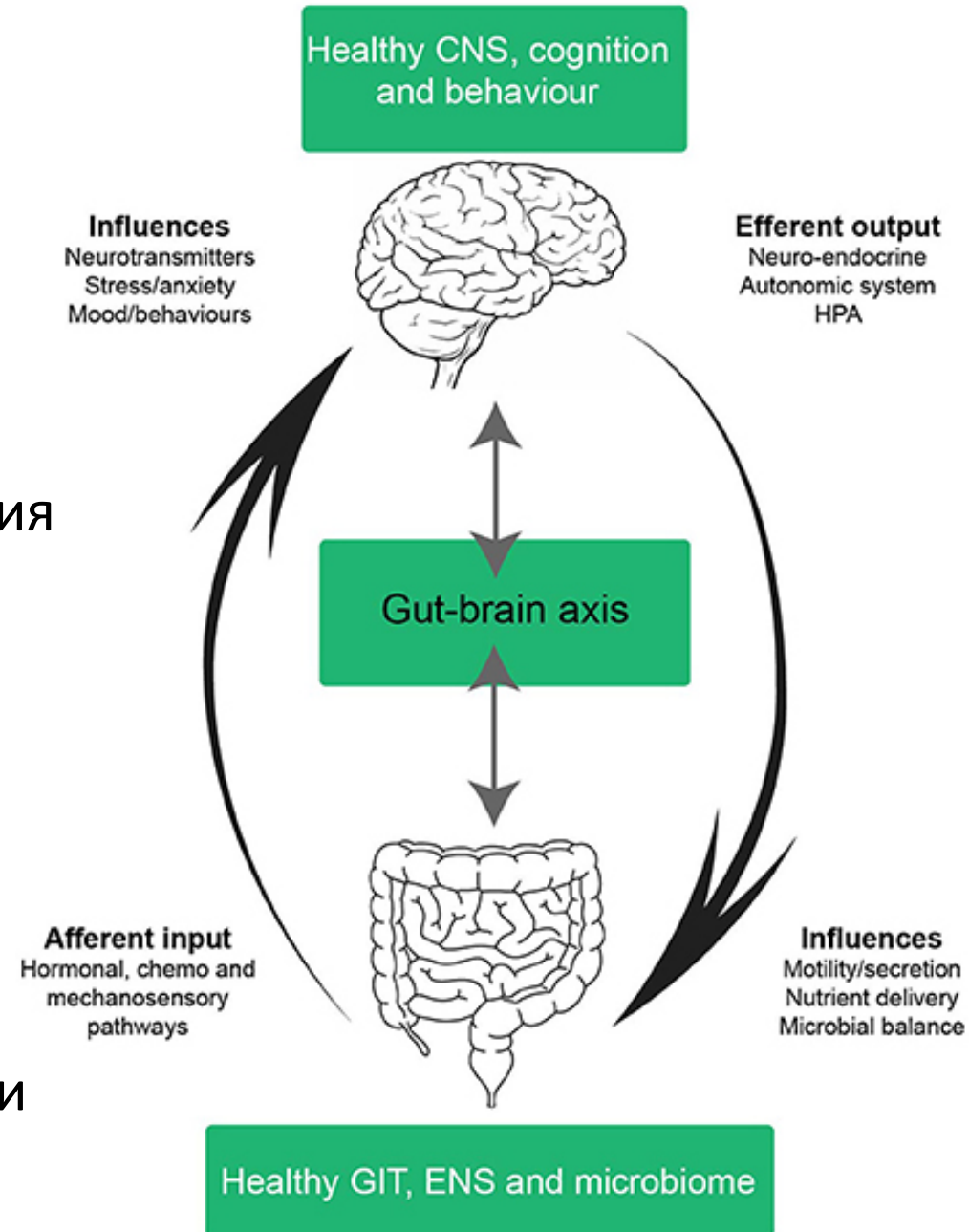
Пандемия COVID-19: вызовы и перспективы для биомедицинской науки.

- Проверена пригодность и состояние медицины в различных государствах противостоять эпидемии.
- Мобилизованы научные сообщества и государственные структуры на разработку вакцин и лекарственных препаратов, способных ее остановить.
- Многопрофильные и неожиданные последствия COVID-19 заставляют принимать экстренные меры для реабилитации десятков миллионов переболевших.
- Неврологические заболевания, включая депрессивные состояния и Паркинсонизм, всё заметнее проявляют себя на фоне COVID-19.
- Дисбактериоз микробиоты сопровождает протекание COVID-19 и является триггером многих заболеваний, включая неврологические.
- Установлены некоторые общие механизмы воспалительных деструктивных процессов при протекании COVID-19 и Паркинсонизме.
- Микробиом ЖКТ стал объектом таргетной терапии с использованием фармабиотиков при лечении Паркинсонизма, депрессивных состояний.

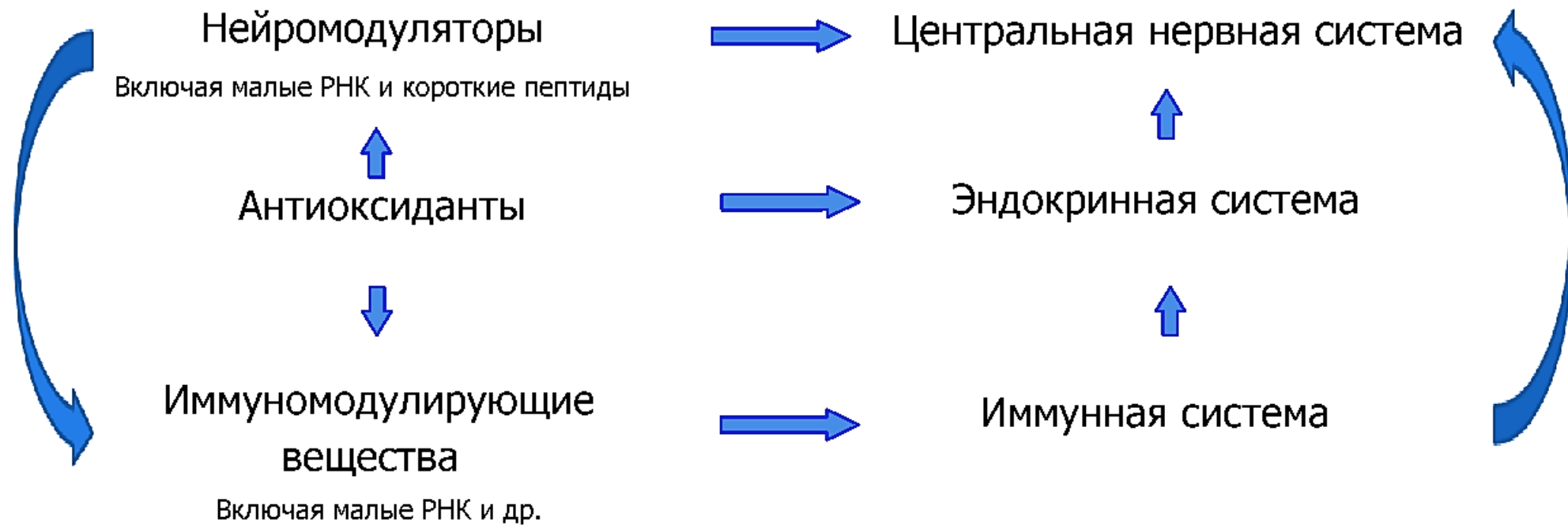
Что же предлагает биомедицинская наука для решения проблем в клинической медицине?

Микробиота – новый эндокринный орган.

- Симбиотическая связь с организмом хозяина
- Ось кишечник-мозг, **ось кишечник-легкие**
- Воздействует не только на клетки кишечного эпителия и энтеральную нервную систему, но и на развитие и функционирование различных органов и систем, включая центральную нервную систему (ЦНС).
- Какова роль кишечной микробиоты в развитии неврологических заболеваний, **в том числе Паркинсонизма и депрессии?**
- Установлено взаимодействие между микробиотой дыхательных путей и кишечника путем транслокации бактерий или их продуктов в составе экзосом.



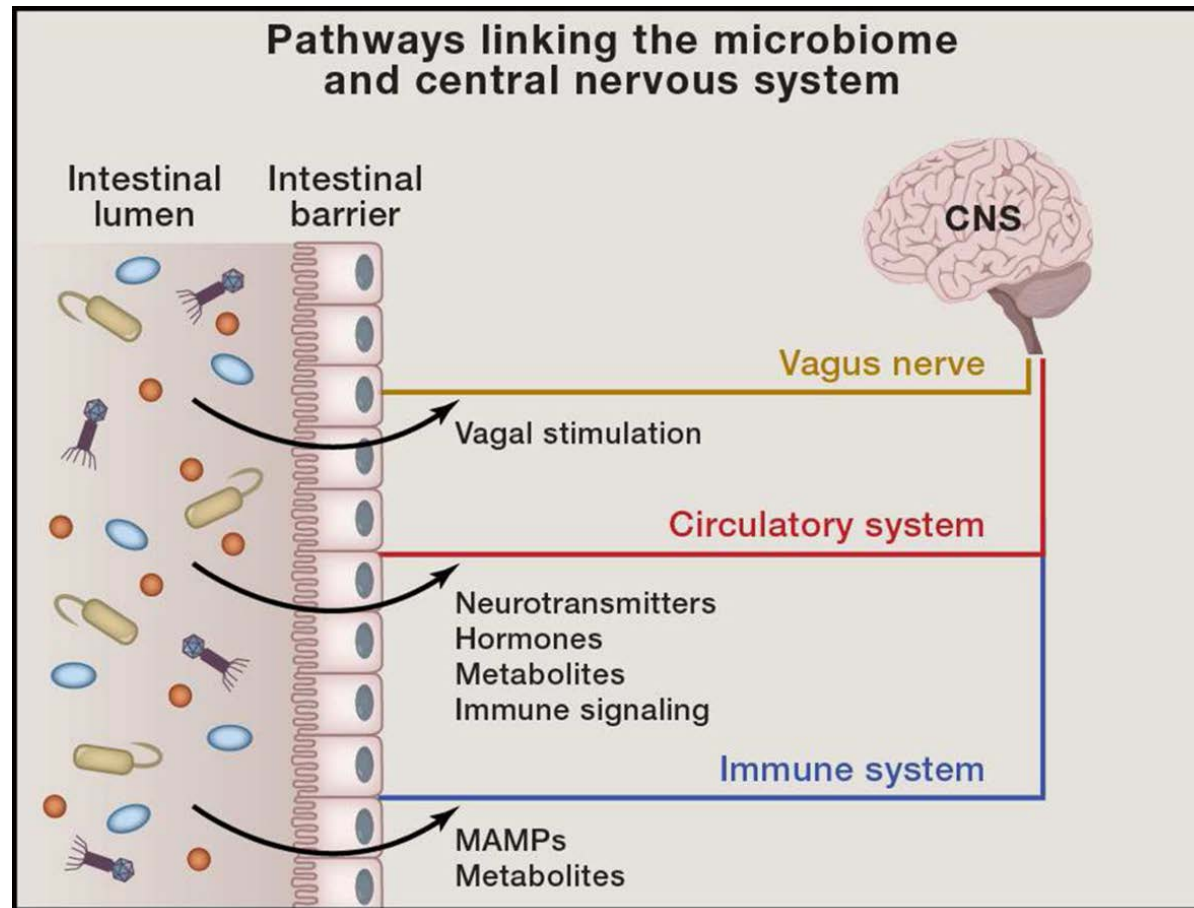
Микробиота кишечника оказывает влияние на организм хозяина благодаря своей способности синтезировать различные биологически активные соединения.



- **Вся система функционирует, как единая сеть**
- **Нарушение в одном звене приводит к сбою всей системы**

Пути связи микробиомом с ЦНС и другими органами человека включая легкие.

Недавнее открытие: экзосомы клеток человека и везикулы кишечных бактерий переносчики разнообразного биологического и генетического материала: возможно РНК вирусов, включая Covid-19



Микробиота: иммунный, антиоксидантный статус и предрасположенность к заболеваниям.

- Микробиом и конкретные его компоненты, в том числе лакто- и бифидобактерии, определяют становление и поддержание врожденного и приобретенного иммунитета, а также антиоксидантного потенциала.
- Нарушение композиции (сигнатуры) микробиоты – дисбиозис, приводит к повышенной чувствительности к инфекционным и неврологическим заболеваниям.
- Иммунный статус различных групп населения имеет различные показатели: в первую очередь больных диабетом II типа, аутоиммунные заболевания, СПИД и др.
- Стрессовые условия (социальные, физические, химические, изменение питания) всегда приводят к дисбиозу микробиоты и понижению иммунного гомеостаза
- Анализ состояния микробиоты – важный биомаркер состояния иммунной системы и восприимчивости к неврологическим и инфекционным заболеваниям (COVID-19).

1. *Nezametdinova, V.Z.; Yunes, R.A.; Dukhinova, M.S.; Alekseeva, M.G.; Danilenko, V.N. The Role of the PFNA Operon of Bifidobacteria in the Recognition of Host's Immune Signals: Prospects for the Use of the FN3 Protein in the Treatment of COVID-19. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 9219.*
2. *Averina, O. V.; Poluektova, E.U.; Marsova, M.V.; Danilenko, V. N. Biomarkers and Utility of the Antioxidant Potential of Probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria as Representatives of the Human Gut Microbiota. Biomedicines 2021, 9, 1340*
3. *Poluektova, E., Yunes, R., Danilenko, V., 2021. The putative antidepressant mechanisms of probiotic bacteria: relevant genes and proteins. Nutrients. 13 (5), 1591.*

Общие механизмы воспалительных процессов при неврологических заболеваниях и COVID-19.

- Ренин-ангиотензиновая система (РАС) - ключевой игрок воспалительных процессов, затрагивающих микробиом, протекание COVID-19 и неврологических заболеваний.
- ACE2 - белок и его рецепторные участки пересекающиеся биомишени при кишечной инфекции SARS-CoV-2 и проявлении паркинсонизма.
- Кишечный ACE2 участвует в транспорте аминокислот, регулируя состав и функции микробиоты.
- Универсальная роль РАС системы в формировании воспалительных процессов, приводящих к многим хроническим заболеваниям сопровождающихся воспалительными процессами требуют дальнейшего изучения и более критического анализа в постковидную эру.
- Персистирующий после заболевания COVID-19 дисбактериоз может быть фактором мультисистемного воспалительного синдрома зачастую с непредсказуемыми последствиями у переболевших пациентов.

Пробиотики в терапии паркинсонизма и других неврологических заболеваний.

Способность отдельных штаммов пробиотических бактерий снижать окислительный стресс широко известна и доказана *in vitro* и *in vivo*.

Антиоксидантный эффект пробиотиков обусловлен продукцией :

- антиоксидантных белков и пептидов (супероксиддисмутаза, тиоредоксин, глутатион, др.);
- белков, хелатирующих свободные ионы Fe^{2+} и Cu^{2+} ;
- витаминов (B1, B12 и другие);
- короткоцепочечных жирных кислот;
- осуществляющих рефолдинг поврежденных стрессом белков;
- модуляцией видового состава кишечной микробиоты и др.

Averina, O. V. et al. Biomarkers and Utility of the Antioxidant Potential of Probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria as Representatives of the Human Gut Microbiota. Biomedicines 2021, 9, 1340

За рубежом опубликовано несколько патентов **на препараты-пробиотики**, для профилактического применения **при нейродегенеративных** расстройствах, включая болезнь Паркинсона (WO 2013190068 A1; US 20160199425; A1; WO 2011083354 A1; WO 2003002131 A1).

Наши патенты в России: «Применение клеток штамма *Lactobacillus fermentum* U-21 и биологически активных веществ, полученных из них» (RU2019 141 103A) приоритет от 11.06.2021г., «Штамм *Lactobacillus fermentum* U-21, продуцирующий комплекс биологически активных веществ, осуществляющих нейтрализацию супероксид-аниона, индуцируемого химическими агентами» (RU2 705 250C2) приоритет от 06.11.2019г.

Научный задел института общей генетики им.Н.И.Вавилова РАН, позволивший приступить к разработке препаратов фармабиотиков.

- Реализовано инфраструктурное обеспечение грамотного сбора образцов биологического материала, их последующего секвенирования и анализа
- Создан биобанк, содержащий коллекцию образцов микробиома здорового человека. Секвенировано и проанализировано по нейромодулирующим, иммуномодулирующим и антиоксидантным маркерам около 200 метагеномов ЖКТ и более 50 геномов симбионтов лактобацилл и бифидобактерий
- Разработаны уникальные алгоритмы и подходы биоинформатического анализа микробиома ЖКТ для отбора штаммов и генов с заданными свойствами.
- На основе уникальных штаммов бифидобактерий и лактобацилл, продуцентов ГАМК, создается препарат психобиотик для снятия депрессивных состояний.
- Проводятся доклинические исследования препаратов «Супербакт» и «Лактовирин» на основе фармабиотика *Limosilactobacillus (Lactobacillus) fermentum* U-21 для нейтрализации оксидативного стресса и его последствий при различных заболеваниях, включая COVID-19
- Разрабатывается препарат нейтрализующий фактор некроза опухоли TNF α на основе фибронектиновых доменов бифидобактерий FN3 белка для снятия воспалительных процессов, в том числе при COVID-19

Препарат «Супербакт» на основе штамма *Limosilactobacillus (Lactobacillus) fermentum* U-21.

- **Штамм** *L.fermentum* U-21 выделен в 2010 г из фекалий здорового мужчины, жителя центрально-европейской части РФ, космонавта.
- По биохимическим, морфологическим и генетическим признакам, включая секвенирование ДНК, определена видовая **штаммовая принадлежность**.
- **Фармакокинетика** - штамм обнаруживался в фекалиях получавших его животных (мышей)
- Штамм *L.fermentum* U-21 отобран на системе «***E.coli*-паракват**», по высокой способности нейтрализовать оксидативный стресс вызванный супероксид-анионом.
- На модели «**нематода *C.elegans* – паракват**», установлено, что препарат Супербакт увеличил медианную продолжительность жизни почвенной нематоды на 25%
- На стандартной модели «**Мыши линии C57BL6 – паракват**» показано, что препарат Супербакт:
 - в поведенческом тесте «спуск с шеста» полностью восстанавливает двигательную активность
 - оказывает протекторное действие в отношении допаминергических нейронов черной субстанции мозга мышей.
- С использованием омиксных технологий **установлены гены, белки и ферменты**, участвующие в рефолдинге нарушенных белков и понижении концентрации Fe²⁺.

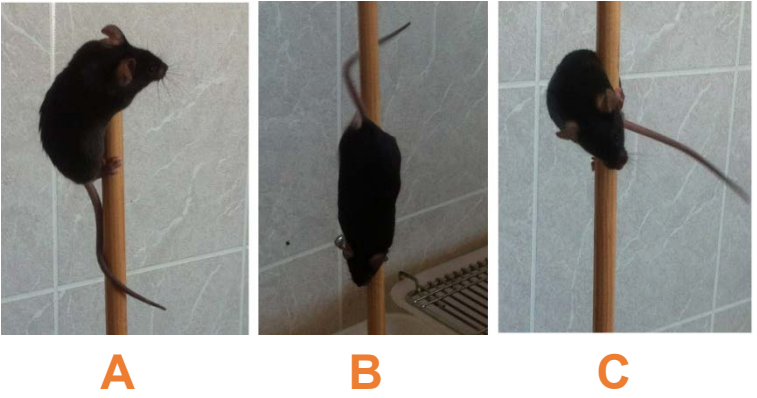
Тестирование препарата «Супербакт» *L.fermentum* U-21 на мышах линии C57BL6.



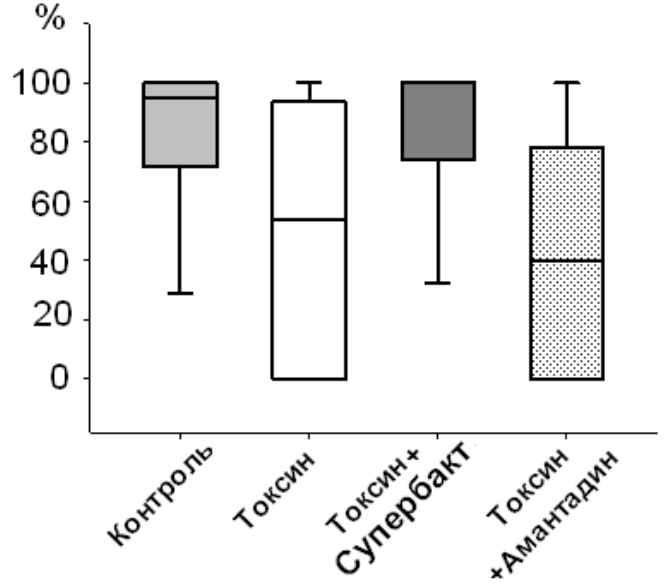
Амантадин (препарат сравнения) – препарат, увеличивающий концентрацию допамина и чувствительность к нему

Препарат «Супербакт».

Поведенческий тест с вертикальным шестом.



- A.** Начальное положение мыши
- B.** Вертикальный спуск у мыши («Контроль»)
- C.** Спуск «боком» у мыши («Токсин»)



Медиана и квартили (25 – 75%) максимальной процентной доли длительности вертикального спуска с шеста (%) в группах мышей

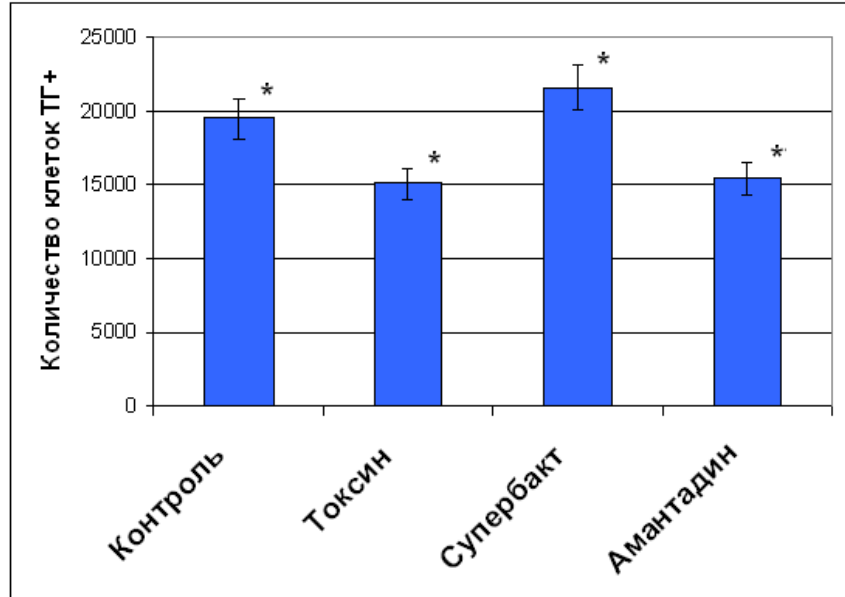
Группы (Условия)	Контроль (NaCl /NaCl)	Токсин (Паракват/ NaCl)	Супербакт Паракват/ <i>L.fermentum</i>	Амантадин (Паракват/ Амантадин)
Смертность, %	18	30	<10	25
Вертикальный спуск, %	95	54	100	40

*Результаты обработаны с помощью пакета «SAS JMP Statistical Discovery Pro 13.2.1» с использованием рангового критерия Краскела – Уоллиса; при попарных апостериорных множественных сравнениях использовался тест Вилкоксона.

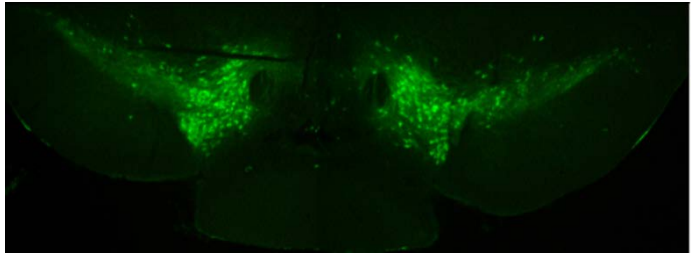
Препарат «Супербакт».

Гистохимический анализ черной субстанции головного мозга.

Поражение головного мозга мышей при развитии БП, оценивали посредством подсчета допаминэргических нейронов



- **Тирозингидроксилаза (ТГ)** – ключевой фермент биосинтеза катехоламинов
- При развитии **паркинсонизма** количество ТГ-позитивных клеток в мозге **уменьшается**
- **Количество ТГ-позитивных** клеток определяли подсчетом иммуногистохимически окрашенных моноклональными мышинными антителами фронтальных срезов черной субстанции



Группы (Условия)	Контроль (NaCl /NaCl)	Токсин (Паракват/ NaCl)	Супербакт Паракват/ <i>L.fermentum</i>	Амантадин (Паракват/ Амантадин)
Кол-во ТГ+ клеток *	19 520	15 104	21 600	15 424

*Различия достоверны по Манну-Уитни (p<0,05)

**Подсчет клеток осуществляли с использованием программы "Cell"

Препарат «ЛАКТОВИРИН» (*L.fermentum* U-21), пример двойного назначения.

«Разработка препарата на основе штамма-фармабиотика *Limosilactobacillus (Lactobacillus) fermentum* U-21, синтезирующего комплекс веществ с антиоксидантной активностью, на паракват- индуцированных моделях, воспроизводящих деструкцию легких, индуцируемого вирусом Saus-Cov-2 (Covid-19)»

Требования к идеальному препарату для минимизации цитокинового «шторма» и оксидативного стресса, вызываемого COVID-19

- Комплексное воздействие на врожденную иммунную и антиоксидантную системы организма человека и антиоксидантную активность прямого действия;
- Быть природным и / или дополняющим компонентом микробиоты кишечника человека
- Обладать способностью «мягкой» мобилизации антиоксидантного потенциала целевых клеток организма хозяина;
- Обладать способностью регулировать концентрацию активных форм кислорода (АФК) в целевых органах организма, например, в легких.
- Обладать способностью детоксификации поврежденных АФК липидов, белков и других компонентов в клетках организма, в первую очередь – в митохондриях.
- Способствовать восстановлению кишечного и гематоэнцефалического барьеров, препятствующих проникновению токсинов в кровяное русло и головной мозг.
- Способствовать восстановлению микробиома кишечника, как значимого органа, определяющего иммуномодулирующий и антиоксидантный потенциал хозяина.

В значительной степени такими свойствами обладает препарат «Лактовирин».

Состояние внутренних органов опытных животных получивших паракват и антидот «Лактовирин».



А. Внутренние органы крыс, получивших паракват одновременно со штаммом *L.fermentum* U-21

Выживаемость животных 70%



В. Внутренние органы крыс, получивших только паракват

Выживаемость животных 10%

Токсическое действие параквата в первую очередь влияет на состояние легких и печени.

А. Внутренние органы в основном соответствуют физиологической норме: **печень** несколько увеличена в размерах, равномерной окраски, правильной формы, гладкая, края долей острые; **легкие, сердце** без признаков патологических изменений;

в брюшной полости выпота нет.

В. **Печень** сильно увеличена и неоднородна, окраска неравномерная, поверхность с белесыми пятнами, края долей сглажены, закруглены;

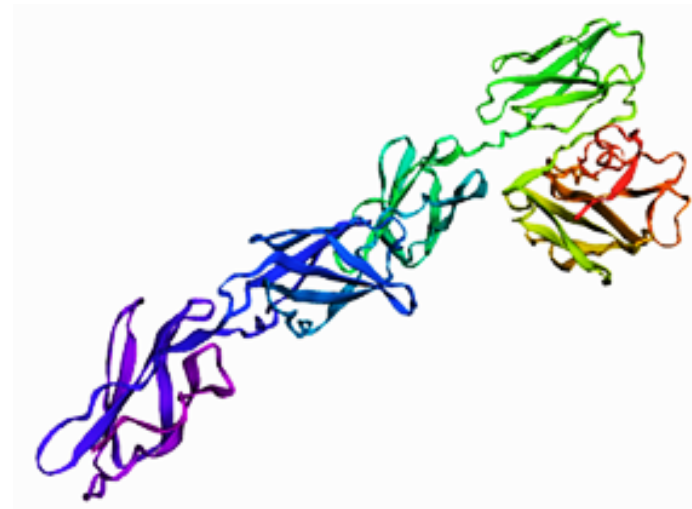
легкие неправильной формы, со следами фиброзных изменений (бугристая поверхность, спавшиеся в размере, бурые пятна, следы кровоизлияний);

сердце несколько увеличено в размерах, **в брюшной полости** присутствует выпот.

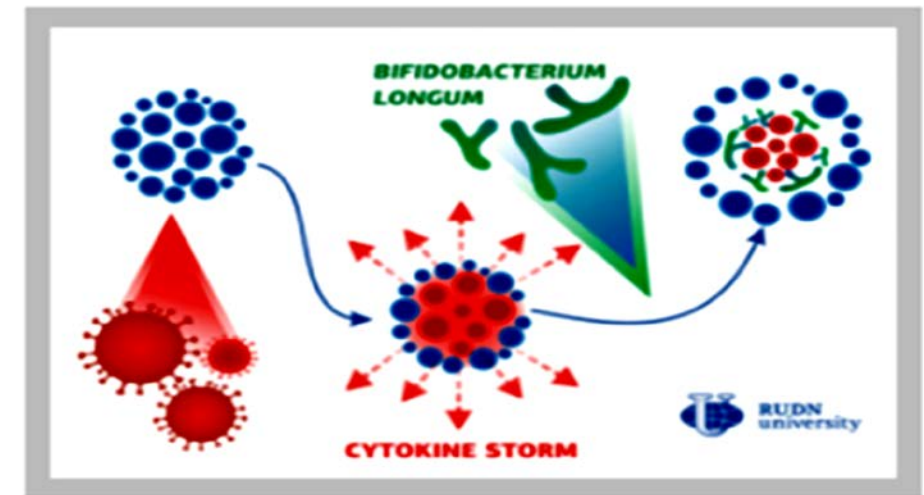
Фибронектиновые домены FN3 белка – пример возможного использования для снятия цитокинового шторма при воспалительных процессах и вирусных инфекциях.

Бифидобактерии: источник селективных интерлейкин-связывающих белков

- Хорошо отработана технология нейтрализации цитокина TNF-альфа с помощью моноклональных антител.
- в настоящее время проводятся исследования по созданию цитокин-связывающего белка на основе десятого домена FN3 человеческого белка фибронектина для нейтрализации TNF-альфа.
- На наш взгляд, фибронектин-содержащие белки бифидобактерий могут быть эффективным и оптимальным решением для нейтрализации TNF-альфа.



Третичная структура
FN3 белка



Бифидобактерии могут быть использованы для создания противовоспалительных препаратов при лечении COVID-19 и других заболеваний.

Препарат «Охотник за цитокиновым штормом 2»

Разработка препаратов психобиотиков в ИОГен РАН.

Пробиотические свойства штаммов *B.adolescentis* 150 и *L.plantarum* 90sk

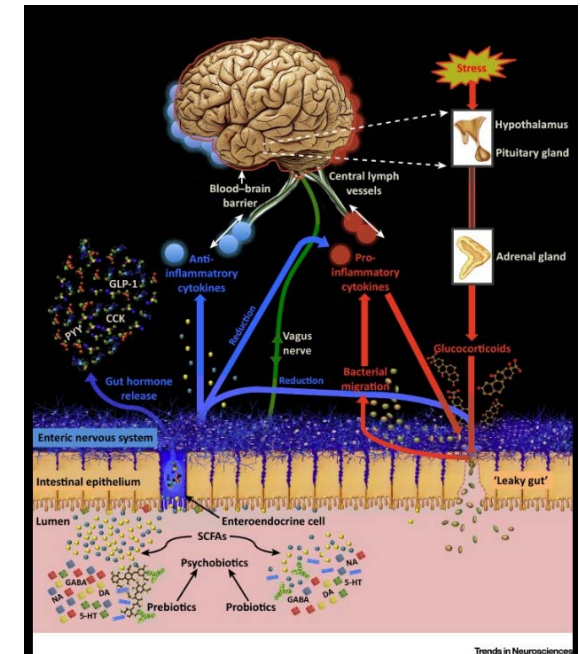
1. **Обладают основными пробиотическими свойствами** (антагонистической активностью по отношению к условно-патогенным штаммам, необходимым уровнем адгезии и чувствительности к антибиотикам).
2. **Способны синтезировать и выделять в среду ГАМК.**
3. **Адреналин увеличивает рост штаммов на 2-4 порядка.**
4. **Обладают антиоксидантными свойствами** (родуцируют глутатион, каталазу)
5. **ДНК штаммов секвенирована** (GenBank LBHQ01 и JXAX01).

Показано наличие генов синтеза ГАМК, отсутствие генов патогенности и генов антибиотикоустойчивости, локализованных на мобильных генетических элементах.

Идентифицированы гены контролирующие иммуномодуляцию и антиоксидантные свойства.

6. **В опытах на животных (крысах) в условиях стресса** штамм *L.ptantarum* 90sk достоверно увеличивает в крови животных содержание ГАМК и **уменьшает количество гормона пролактина**, снижает воспалительные процессы при стрессе.

7. **Введение психобиотика на основе штаммов *B.adolescentis* 150 и *L.plantarum* 90sk** мышам линии Balb\с снижает продолжительность иммобилизации животных в тесте принудительного плавания, что говорит о его антидепрессивном эффекте.



Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria-Gut-Brain Signals. Amar Sarkar, Soili M Lehto, Siobhán Harty, Timothy G Dinan, John F Cryan, Philip W J Burnet

Нутригеномика микробиома – основа создания фармакологически активных ингредиентов для реабилитации населения в постковидную эру.

С уверенностью можно говорить о формировании нового направления науки – «Нутригеномика микробиома». Импульсом к формированию и последующему развитию направления нутригеномика микробиома послужили следующие результаты:

- ✓ Конкретизированы биологически активные ингредиенты микробиома человека, как объекта исследований и компоненты персонализированных продуктов: пребиотики, парабиотики, постбиотики и аутопробиотики (фармабиотики). Сложилось их классификационное разделение на основе функциональных свойств – иммуномодулирующие, нейромодулирующие и антиоксидантные. Установлено влияние биологически активных ингредиентов на транскрипционную, протеомную и метаболомную активность определенных групп генов микробиомом.
- ✓ Выявлены глобальные регуляторные гены, значимые регуляторные системы клеток организма человека, воспринимающие иммуномодулирующую, нейромодулирующую и антиоксидантную активность конкретных биологически активных ингредиентов.
- ✓ Получены данные, указывающие на значимую роль фармабиотиков в коррекции состава микробиом и сигнатуры композиции определенных генов и штаммов бактерий их содержащих.
- ✓ Разрабатываются препараты фармабиотиков с заданными характеристиками: психобиотики, иммунобиотики, антиоксибиотики, которые найдут применение при лечении неврологических заболеваний и реабилитации в постковидную эру.

Успехов новой науке и ее трансляции в практическую медицину.



Благодарю за внимание

Прошу задавать вопросы на email: valerid@vigg.ru

Презентация размещена на сайте ИОГен РАН (vigg.ru) в разделе новостей