

КОРЕКЦІЯ МІКРОБІОМУ ТА ПЕРСОНІФІКОВАНА РЕАБІЛІТАЦІЯ У ВІЙСЬКОВИЙ ТА МИРНИЙ ЧАС

Представлено Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАНУ

Автори: Сафронова Л.А., Фоміна М.О., Кривцова М.В., Гармашева І.Л., Бабенко Л.П., Бубнов Р.В., Біла В.В., Демченко О.М.

Актуальність роботи.

Мікробіом (сукупність мікроорганізмів, що населяють певні біотопи організму) має величезний вплив на здоров'я та розвиток численних захворювань людини та тварин. Кишковий мікробіом відіграє найбільш вагомий роль для організму господаря як в нормі, так і при патології, допомагаючи контролювати травлення, підтримуючи імунний гомеостаз, енергетичний метаболізм та багато інших аспектів здоров'я. Існують численні докази того, що розвиток багатьох імуноопосередкованих, метаболічних і неврологічних захворювань пов'язані зі змінами складу та функції кишкової мікробіоти, тобто дисбактеріозом. Сучасні дослідження вказують на важливість та перспективність застосування пробіотиків для корекції мікробіому, а також у лікуванні та профілактиці інфекційних та запальних захворювань, підтримці здоров'я та реабілітації пацієнтів, зокрема, військовослужбовців.

Впровадження інноваційних підходів до корекції мікробіому є особливо актуальним в умовах військового часу, що спричинено також нагальною потребою попередження трансформації мікробіому у напрямку домінування патогенних мікроорганізмів з високим рівнем антибіотикорезистентності. Своєчасна профілактика таких станів попереджає розвиток хронічних персистуючих запальних процесів, ускладнень за умов поранень та прискорює одужання. Тому надзвичайно актуальним сьогодні є розробка та впровадження в медичну практику широкого спектру мікробіота-асоційованих маркерів для стратифікації пацієнтів на основі фенотипових даних, а також індивідуалізованого протоколу терапії пробіотиками для корекції мікробіому, з урахуванням характеристик пацієнта та супутніх захворювань, в тому числі набутих за період участі в бойових діях, що є основою персоналізованого лікування різних патологічних станів.

Персоналізована реабілітація та корекція мікробіому є важливим підходом до оздоровлення організму, який базується на розумінні фізіологічних особливостей пацієнтів та їхнього мікробіому. Ці стратегії можуть у значній мірі забезпечити оптимальні умови для швидкого відновлення військовослужбовців та повернення до бойової діяльності.

Мета роботи. Метою роботи є вивчення ролі мікробіому в розвитку різних захворювань та розроблення сучасних методів його корекції для персоналізованого лікування та реабілітації пацієнтів у військовий та мирний час.

Наукова новизна. Для корекції мікробіому створено пул таксономічно різноманітних пробіотичних штамів мікроорганізмів, сучасне систематичне

положення та біологічні властивості яких встановлено за використання новітніх мікробіологічних, біохімічних і молекулярно-генетичних методів.

Обґрунтовано і експериментально доведено комплексний підхід до розробки основ ефективної взаємодії пробіотиків з макроорганізмом, що базується на безпечності препаратів і антимікробної, біосинтетичної, імуномодулювальної і активностей штамів мікроорганізмів, що є їх основою.

Розроблено стратегія застосування антимікробних засобів для корекції факультативної мікробіоти ротової порожнини з метою подолання медикаментозної стійкості мікроорганізмів та підвищення ефективності лікування. Створено нові підходи до лікування інфекційно-запальних захворювань сечостатевої системи шляхом використання пробіотичних та імуномодулювальних засобів.

Отримано нові дані щодо високого потенціалу пробіотиків та пребіотиків у лікуванні та профілактиці різних захворювань. Встановлено нові можливості корекції мікробіому для поліпшення здоров'я та інноваційні підходи до персоніфікованої медицини та реабілітації поранених військових. На основі отриманих результатів досліджень, які виходять за межі стандартних уявлень про застосування пробіотиків, запропоновано нові підходи до трансляції результатів біологічних досліджень.

Обґрунтовано доцільність використання пробіотиків як ефективного засобу лікування не лише у шлунково-кишковому тракті, але і в інших системах організму, таких як урогенітальна, дихальна, імунна, серцево-судинна та нервова, що відкриває сучасні перспективи у застосуванні пробіотиків у медицині та ветеринарії.

Показана ефективність персоніфікованого лікування пробіотиками різних медичних сценаріїв від метаболічних порушень до реабілітації військових. Розроблено широкий спектр мікробіота-асоційованих маркерів для стратифікації пацієнтів на основі фенотипових даних, що є основою персоніфікованого лікування різних захворювань. До пріоритетних досягнень роботи на світовому рівні є створення холистичної концепції "Персоніфікована реабілітація поранених військових на різних етапах", яка охоплює фізичний, психологічний та біологічний аспекти. Комплексна реабілітація військових включає застосування пробіотиків разом з нейром'язовою реабілітацією на основі прецизійних втручань.

Розроблено інноваційні підходи до персоніфікованої реабілітації пацієнтів, які об'єднує новітні методи, такі як таргетні ультразвуков-керовані втручання та індивідуалізована терапія пробіотиками

Розроблений комплексний індивідуалізований протокол терапії пробіотиками, що враховує фенотип господаря і бере до уваги інші характеристики пацієнта та супутні захворювання, що отримані за бойових умов.

Короткий зміст роботи.

У першому розділі проведено відбір пробіотичних штамів молочнокислих бактерій та сахароміцетних дріжджів. Встановлено, що штами виявляють широкий спектр біологічної активності та відповідають міжнародним вимогам, що висуваються до пробіотичних культур (Рис. 1).

Створена унікальна колекція культур молочнокислих бактерій та сахароміцетних дріжджів з пробіотичними властивостями, ізольованих з

традиційних ферментованих продуктів і шлунково-кишкового тракту здорових довгожителів.



Рис. 1. Схема послідовного відбору пробіотичних мікроорганізмів

Ретроспективний аналіз особливостей мікробіому кишківника здорових і фізично активних абхазських довгожителів у порівнянні з молодшими членами їх сімей підтвердив підвищену кількість і різноманітність молочнокислих бактерій і сахароміцетних дріжджів. Відповідно до сучасної таксономії підтверджена видова приналежність штамів МКБ, що входять до складу біопрепаратів, яка була визначена раніше з використанням традиційних мікробіологічних методів, зокрема для штамів *Enterococcus faecium* 77Д (входить до складу закваски «Стрептосан»), що використовується для отримання кисломолочного продукту «Геролакт»), *E. faecium* К-50 (входить до складу біопрепарату «Лактин»), і *Lactobacillus plantarum* 11/16 (входить до складу закваски для виготовлення «Бурякового напою»).

Для поповнення колекції, використавши сучасні традиційні ферментовані продукти харчування та шлунково-кишковий тракт здорових довгожителів як джерело мікроорганізмів з корисними властивостями, було виявлено і класифіковано молекулярно-генетичними методами низку молочнокислих бактерій і дріжджів з оздоровчим потенціалом.

Дослідження широкого спектру біологічної активності дозволило відібрати ряд перспективних для практичного використання культур МКБ і дріжджів. Вперше було виявлено загальну закономірність впливу сахароміцетних дріжджів на біоплівкоутворення розповсюджених агентів гнійних і запальних ранових процесів - бактерій роду *Pseudomonas*, що узгоджується з сучасними уявленнями про агрегативну поведінку бактерій.

З кисломолочних продуктів були виділені три бактеріоциногенні штами ентерококів, які продукують термостабільні метаболіти білкової природи з антилістерійною активністю та містять комбінації генів ентероцинів В/Р і А/Р і є перспективними для практичного використання як продуцентів бактеріоцинів з антагоністичною активністю щодо *Listeria monocytogenes*.

Зібрана унікальна колекція культур МКБ і дріжджів з автентичних ферментованих продуктів поповнила об'єкт Нацнадбання - Українську Колекцію Мікроорганізмів і є ресурсом для створення функціональних продуктів харчування і препаратів з пробіотичними властивостями. Серед досліджених культур були відібрані штами МКБ, що здатні синтезувати фенольні та тіолові сполуки і які є перспективними для використання у складі функціональних продуктів харчування для підсилення їх антиоксидантної активності. Дослідження ферментативної активності дозволило відібрати культури МКБ, які можуть бути застосовані для виготовлення кисломолочних продуктів. В результаті багатоетапного скринінгу за технологічними і пробіотичними властивостями відібрані культури МКБ, на основі яких розроблено закваску «ЛактоКап» для заквашування овочевої сировини. Штами МКБ, що входять до її складу, виявляють широкий спектр антагоністичної активності до умовнопатогенних мікроорганізмів, антиоксидантну активність, є стійкими до умов шлунково-кишкового тракту. Ферментовані овочі, виготовлені з використанням препарату «ЛактоКап», мають підвищені функціональні властивості та подовжений термін зберігання.

У другому розділі представлено результати поліфазного таксономічного аналізу, дослідження нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК штамів УКМ В-5139 УКМ В-5140 - компонентів пробіотика Ендоспорину, а також повного сиквенсу геному штаму УКМ В-5140. На підставі отриманих результатів штами, раніше віднесені до виду *Bacillus subtilis*, рекласифіковано до виду *B. amyloliquefaciens ssp. plantarum*

Порівняльний аналіз генів штаму УКМ В-5140 з генами інших сиквендованих штамів *Bacillus amyloliquefaciens*, а також аналітичні дослідження його метаболітів з використанням методів HPLC і MALDI-TOF-MS показали, що штам синтезує антибіотики сурфактин, фенгіцин, бацилаєн, макролактин, дифіцидин і сидерофор бацилибактин.

Доведено, що досліджені культури *B. amyloliquefaciens ssp. plantarum* УКМ В-5139 і УКМ В-5140 характеризуються пробіотичними властивостями: мають антагоністичну активність до широкого спектра умовно патогенних мікроорганізмів, синтезують комплекс біологічно активних метаболітів – антибіотиків, позаклітинних бактеріолітичних і дріжджолітичних ферментів, протеаз, полісахаридів, амінокислот і виявляють виражену імуномодулювальну та антиоксидантну дію. З культуральної рідини штамів виділено новий комплексний ферментний препарат із широким спектром протеолітичних активностей: фібринолітичної, еластазної, колагеназної, казеїнолітичної, що є перспективним для ефективного загоєння ран і опіків.

Отримано нові дані щодо імуномодулювальної активності й протипухлинних властивостей препарату Ендоспорин.

Встановлено високу ефективність Ендоспорину для лікування і профілактики післяпологових гнійно-катаральних ендометритів та затриманні посліду у сільськогосподарських тварин. Показано, що використання пробіотика Ендоспорину в годуванні курчат бройлерів і дорослих птахів є ефективним способом підвищення інтенсивності їх росту, розвитку та збереження поголів'я.

У досліджах *in vivo* на моделях метастазуючої КЛЛ і солідної форми саркоми-37 уперше отримано дані щодо здатності препарату Субалін підвищувати ефективність протипухлинної вакцини, виготовленої із сингенних пухлинних клітин і цитотоксичного лектину - продукту метаболізму штаму *B. subtilis* В-7025.

Доведено безпечність і ефективність Біоспорину для лікування дітей з перинатальною патологією з метою корекції порушень мікробіоценозу кишечника.

Уперше обґрунтовано застосування Біоспорину в комплексному лікуванні дітей, хворих на хронічний рецидивуючий афтозний стоматит.

Доведено ефективну дію Субаліну для корекції синдрому ендогенної інтоксикації у дітей, хворих на хронічний гепатит. Обґрунтовано доцільність призначення Субаліну для комплексного імунореабілітаційного лікування хронічної обструктивної хвороби легень (Рис. 2).



Рис. 2. Препарат на основі пробіотичних спорових бактерій «Субалін».

У третьому розділі встановлено, що у ротовій порожнині при запальних захворюваннях пародонту, підтвердженого клінічними симптомами та наявністю парадонтопатогенів *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Candida albicans*, підвищується рівень умовнопатогенних мікроорганізмів, які формують асоціації з декількох представників, характеризуються підвищеною резистентністю до антибіотиків та здатні до утворення біоплівки. На основі отриманих даних показано, що ротова порожнина хворих в умовах хронічного пародонтиту є осередком персистування антибіотикорезистентних анаеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів.

Персистенція мікробних асоціацій, що є представниками факультативної мікробіоти, з переважанням видів, які володіють факторами патогенності та вірулентності, обумовлюють доцільність розробки алгоритму корекції мікробіому ротової порожнини в умовах запальних захворювань пародонту.

Обґрунтовано комплексний підхід до використання антимікробних засобів, що базується на визначенні антимікробної та антибіоплівкотвірної активності антимікробних перепаратів до мікроорганізмів домінуючих асоціацій. Такий підхід забезпечує зниження персистенції умовно-патогенних мікроорганізмів, пролонгацію ремісії та створює передумови для попередження розвитку антибіотикорезистентності.

Встановлено, що використання фітосептика з пробіотиком забезпечує нормалізацію показників індигенної мікробіоти. Розроблені засоби догляду за ротовою порожниною на основі рослинної сировини, що мають антибіоплівкотвірні властивості, для місцевого застосування, з урахуванням домінуючих асоціантів в умовах запального процесу.

Отримані результати розширюють уявлення щодо можливості використання інтервального застосування пробіотиків та антимікробних препаратів на основі рослинної сировини для корекції мікробіоти ротової порожнини в умовах запальних захворювань пародонту.

У четвертому розділі проведено теоретичне узагальнення і запропоновано нове вирішення наукового завдання щодо підвищення ефективності лікування інфекційно-запальних захворювань сечостатевої системи шляхом удосконалення методів діагностики та комплексного лікування, які передбачають використання препаратів інтерферона та їх індукторів у поєднанні з кріодеструкцією на основі визначення зв'язку між характером перебігу патологічного процесу і станом імунореактивності організму.

Створено науково обґрунтовані стратегії до індивідуалізації терапевтичної тактики комплексного лікування хворих, з урахуванням процесів інтерфероноутворення, а також інших показників імунореактивності на локальному та системному рівнях. Встановлено вплив пробіотичних штамів лактобацил та біфідобактерій на спектр мікробіоти урогенітального тракту (УГТ) та кишкового вмісту, а також на показники імунореактивності організму за умов фізіологічної норми та експериментальної урогенітальної стафілококової інфекції.

Розроблено нові науково обґрунтовані підходи до відбору потенційно пробіотичних штамів лактобацил і біфідобактерій для створення пробіотичних препаратів з метою корекції мікробіоти та показників імунореактивності організму при інфекційно-запальних захворюваннях УГТ, які передбачають проведення комплексних досліджень пробіотичних властивостей штамів мікроорганізмів з обов'язковим визначенням як їх антибактеріальної, так і імуномодулювальної активності. Штами *L. casei* IMB B-7280, *B. animalis* VKL та *B. animalis* VKB рекомендовано для створення препаратів для профілактики порушень та корекції мікробіоти піхви та кишечника, а також показників імунітету при інфекційно-запальних захворюваннях УГТ.

Під час проведення обмежених клінічних досліджень обстежено 40 хворих жінок репродуктивного віку ($32,5 \pm 13,5$ років) з дисбіозами піхви та вагінозами. У хворих жінок з дисбіозами, які отримували суспензію штаму *L. casei* IMB B-7280, після пробіотикотерапії виявлено тенденцію до підвищення кількості лакто- та біфідобактерій, а також – зникнення або зниження кількості

умовнопатогенних мікроорганізмів, які можуть індукувати виникнення запалення слизової оболонки піхви, вагініти та кольпіти різної етіології.

Результати цитологічного дослідження слизової оболонки піхви хворих жінок з дисбіозом показали, що після пробіотикотерапії відбувалась нормалізація показників у 100 % випадків.

Отримані дані свідчать, що пробіотики можуть використовуватись самостійно при лікуванні хворих із дисбіозами піхви та вагінозами, але у більшості випадків з метою профілактики подальшого загострення при рецидивуючого перебігу захворювання вони повинні бути супроводом антибактеріальної терапії. При призначенні пробіотикотерапії при дисбіозах та вагінітах слід враховувати: спектр піхвової мікробіоти, кількість умовнопатогенних мікроорганізмів та наявність у хворих жінок соматичних захворювань.

П'ятий розділ присвячено дослідженню властивостей пробіотиків та пребіотиків для їх індивідуалізованого застосування для корекції метаболічних порушень.

Створено наукові основи для індивідуалізованого та персоніфікованого застосування пробіотичних та пребіотичних засобів для корекції патологічних метаболічних станів (MetC). Встановлено ефективність пробіотичної терапії у зниженні ожиріння та покращенні мікробіологічних показників кишкового вмісту. Вивчено фізіологічні особливості протікання MetC та запропоновано діагностичні фенотипові маркери для хворих з MetC.

Досліджено та застосовано персоніфіковане модифікування мікробіому у медицині з урахуванням розробленого алгоритму індивідуального підбору пробіотичних штамів.

Проведено широкий спектр клінічних досліджень з застосуванням розробленого алгоритму, де мікробіом розглядається як ключовий аспект для діагностики та лікування, враховуючи частину фенотипу (феномікс) у сфері персоналізованої, персоніфікованої та прогностичної медицини..

Доведено ефективність персоніфікованого лікування пробіотиками подагри та подагричної нефропатії. Дослідження показали, що короткотермінова індивідуалізована пробіотична терапія ефективна у лікуванні проявів метаболічного синдрому та гіперурікемії. Також було спостережено, що пробіотична терапія успішно відновлює функцію та структуру ушкодженої нирки.

Показано ефективність застосування пробіотиків при метаболічних порушеннях при синдромі Фламмера, також ефективність пробіотиків підтверджена при зниженні ваги.

Розроблено фенотипові сурогатні маркери для осі "кишечник-мозок" (gut-brain axis) та запропоновано принципи стратифікації хворих та алгоритм індивідуалізованого призначення пробіотичних та пребіотичних засобів для корекції патологічних станів (Рис. 3).

У шостому розділі представлено розроблену холістичну концепцію "Персоніфікована реабілітація поранених військових на різних етапах", яка охоплює фізичний, психологічний та біологічний аспекти. Комплексна стратегія

реабілітації військових включає застосування пробіотиків у поєднанні з нейром'язовою реабілітацією на основі прецизійних втручань.

Проведено діагностика та лікування нейропатичного болю, відновлення руху та боротьба з вертиго та болями у поранених та після контузій. Показано, що багатопараметричне ультразвукове дослідження (УЗД) дає змогу діагностувати невротатії, виявляє тригерні точки, спастичність, оцінює функції м'язів, нервів, сухожилів і фасцій. УЗД допомагає виявити зони стиснення нервів та спрямовує лікування, включаючи суху голкову терапію. Розроблено персоналізований протокол пробіотичної терапії на основі фенотипу пацієнта та оцінено його терапевтичну ефективність. Відстежено зміни в органах за допомогою багатопараметричних УЗД. Встановлено, що корекція дисбалансу мікробіому є важливою складовою для реабілітації військових. За використання УЗД оцінки стану органів та систем пробіотикотерапія показала перспективні результати. Персоналізований підхід до реабілітації покращує відновлення військових, враховуючи фізичні та психологічні аспекти.

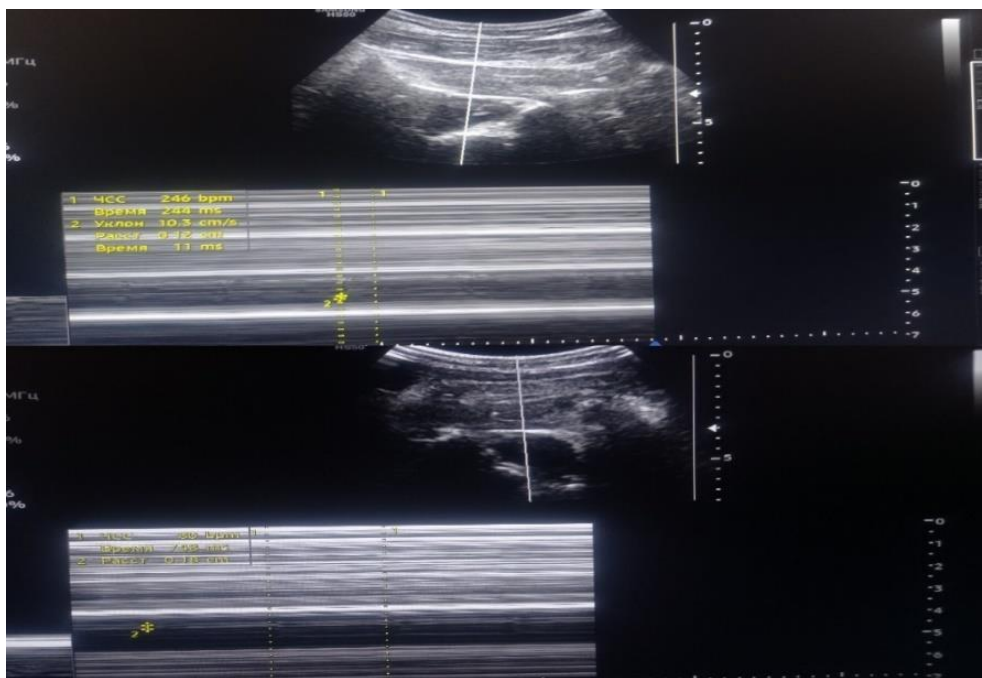


Рис. 3. Приклад розробленого фенотипового маркера для стратифікації господаря та моніторингу ефекту. Рухи передніх та задніх рогів спинного мозку в порожнинні спинномозкового каналу (реєстрація за допомогою УЗД на рівні верхньо-шийного відділу) є сурогатним фенотиповим маркером впливу на gut-brain axis. До (вгорі) та після (внизу) інтервенції: частота вібрації структур змінилась від 240 до 80 за хвилину.

Практична реалізація роботи. Розширено сферу застосування пробіотика Біоспорину для лікування дітей з кишковими інфекціями і дисбактеріозами, у стоматологічній практиці при лікуванні стоматиту у дітей; отримано дозвіл на застосування Субаліну в комплексному лікуванні дітей, хворих на хронічний вірусний гепатит; обґрунтовано доцільність призначення Субаліну для комплексного імунореабілітаційного лікування хворих із хронічною обструктивною хворобою легень.

Налагоджено виробництво Біоспорину та Субаліну на біотехнологічному підприємстві ПраТ «Біофарма» (Київ).

Для ветеринарної медицини розроблено та зареєстрований препарат Ендоспорин для лікування і профілактики післяпологових гнійно-катаральних ендометритів та затриманні посліду, кишкових та гнійних інфекцій у сільськогосподарських тварин та як кормова добавка для птахівництва. Налагоджено виробництво препарату на Херсонському державному підприємстві - біологічній фабриці.

Підписано 7 Ліцензійних угод на препарати Біоспорин з ООО "Биофарма", Субалін, Біоспорин з ПраТ «Біофарма» (м. Київ); Субалін з ДП "Ензим"; Ендоспорин з ТОВ «Бактеріальні препарати» (м. Київ) та Lature s.r.o. (Чехія); штам *Lactobacillus plantarum* 47см (ІМВ В-7565) для заквашування овочевої сировини - Lature s.r.o. (Чехія).

Розроблена і затверджено науково-технічна документація: ТУ У на Ендоспорин; регламент на виробництво Ендоспорину; аналітична нормативна документація – Субалін сухий; протокол клінічного випробування препарату Субалін при лікуванні дітей, хворих на хронічний гепатит; протокол клінічного випробування препарату Біоспорин при лікуванні верхніх відділів травного каналу в дітей; свідоцтво України на товарний знак Ендоспорин для товарів і послуг; ТУ У «Композиція штамів молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* «ЛактоКап»; Лабораторний регламент на виробництво композицій штамів молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* «ЛактоКап»; Лабораторний регламент на заквашування капусти препаратом «ЛактоКап».

Створена унікальна колекція культур молочнокислих бактерій і сахароміцетних дріжджів, ізольованих з традиційних ферментованих продуктів і шлунково-кишкового тракту здорових довгожителів, на їх основі розроблено препарати для приготування ферментованих продуктів з підвищеними функціональними властивостями.

Отримані у роботі результати впроваджені у практику лікарів-стоматологів (акти-впровадження), а також в практику роботи Київського міського пологового будинку № 7 (КНП Перинатальний центр м. Києва) - автореферат дисертації к.м.н. Демченко О. М., жіночих консультацій № 1 і №2 Голосіївського та №1 Солом'янського районів м. Києва, методичну роботу кафедри акушерства та гінекології №1 Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця (Інформаційний лист «Застосування пробіотика Діалак з вмістом штаму *Lactobacillus casei* ІМВ В- 7280 при бактеріальних вагінозах»).

Розроблена авторами холистична концепція "Персоніфікована реабілітація поранених військових на різних етапах" впроваджена в клінічну практику (Клінічна лікарня «Феофанія»).

Висновки.

1. Отримано і науково обґрунтовано нові теоретичні і експериментальні результати комплексного дослідження пробіотичних властивостей штамів мікроорганізмів різної родової приналежності як компонентів ефективних препаратів, встановлено сучасне таксономічне положення цих мікроорганізмів.
2. Створені пробіотики для корекції мікробіому різних біотопів організму, доведено їх ефективність для профілактики та лікування різних патологічних станів.

3. Розроблено інноваційні методи персоніфікованого лікування пробіотиками різних медичних сценаріїв від метаболічних порушень до реабілітації військових.
4. Встановлено нові можливості корекції мікробіому для поліпшення здоров'я та інноваційні підходи до персоніфікованої медицини та реабілітації поранених військових.

Кількість публікацій: загалом публікацій **178**, в тому числі **6** монографій, **2** підручники (посібники), **2** методичні рекомендації, **168** статей (з них **44** у зарубіжних виданнях). Згідно з базою даних Web of Science загальна кількість посилань на публікації авторів, представлених в роботі, складає **1151**, h-індекс (за роботою) **47**; за базою даних Scopus, загальна кількість посилань на публікації авторів, представлених в роботі, складає **1609**, h-індекс (за роботою) **79**; за базою даних Google Scholar загальна кількість посилань складає **2653**, h-індекс (за роботою) **101**. Новизну та конкурентоспроможність технічних рішень захищено **8** патентами.

Автори:

Сафронова Л.А.



Фоміна М.О.



Кривцова М.В.



Гармашева І.Л.

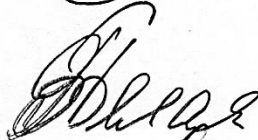


Бабенко Л.П.

Бубнов Р.В.



Біла В.В.



Демченко О.М.

