

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ



**ЖЕБРАКОВСКИЕ
ЧТЕНИЯ
X**

**ПРЕОБРАЗОВАНИЕ
ГЕНОМОВ**

Минск
2021

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
ОО «Белорусское общество генетиков и селекционеров»

ЖЕБРАКОВСКИЕ ЧТЕНИЯ
X
ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ГЕНОМОВ

**Микробиом. Фармабиотики. Нутригеномика. Перспективы
использования в постковидную эру**

Даниленко В. Н., Ильясов Р. А., Юнес Р. А.

Микробиота как ключ к стратегии выживания человека

Суворов А. Н.

Минск
2021

Ответственный редактор
академик А. В. Кильчевский

*Ученый совет ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН
Беларуси» постановил в ознаменование неоценимого вклада
академика А. Р. Жебрака в развитие биологической науки раз в два
года проводить чтения, посвященные его памяти*

Десятые Жебраковские чтения состоялись 7–9 декабря 2021 года

Жебраковские чтения X / В. Н. Даниленко, Р. А. Ильясов, Р. А. Юнес, А. Н. Суворов /
отв. ред. А. В. Кильчевский. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Белару-
си. – 2021. – 68 с. – ISBN 978-985-90552-4-9

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Даниленко В. Н., Ильясов Р. А., Юнес Р. А.</i> Микробиом. Фармабиотики. Нутригеномика. Перспективы использования в постковидную эру	4
<i>Суворов А. Н.</i> Микробиота как ключ к стратегии выживания человека	44

Микробиом. Фармабиотики. Нутригеномика. Перспективы использования в постковидную эру

Даниленко Валерий Николаевич (д.б.н., профессор),
Ильясов Рустем Абузарович (д.б.н.), Юнес Роман Абдаллаевич (к.б.н.)
ФГБУН «Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова»
Российской академии наук, Москва

РЕЗЮМЕ

Сегодня всем известны этапы разработки антибактериальных препаратов, включая антибиотики, успехи и проблемы их применения в медицине. Первоначально усилиями ученых всего мира были созданы антибиотики на основе природных продуцентов почвенного происхождения. Широкомасштабное и, порой, нерациональное применение антибактериальных препаратов способствовало появлению и широкому распространению патогенов, устойчивых к большинству антибиотиков. Такая же ситуация складывалась и в области разработки противовирусных и иммуномодулирующих препаратов. Стало очевидным, что человек проигрывает гонку бактериям. Появилась необходимость в создании новых подходов и парадигм в разработке технологий и выбора источников лекарственных средств, в первую очередь противоифекционных. Успехи последнего десятилетия в области изучения микробиоты человека открыли перед нами много возможностей. Современные знания о структуре и функциях кишечной микробиоты человека и концептуальное объединение знаний о комменсальных микроорганизмах, включая пробиотические, полученные молекулярно-генетическими, транскриптомными, протеомными и метаболомными методами, позволили сформировать понятие фармабиотиков. Создание фармабиотиков на основе микроорганизмов, населяющих различные полости тела человека, включая кишечник, является новым, интенсивно развивающимся направлением фармакологической науки. Поставленные задачи в этой области могут быть решены при условии комплексного решения ряда фундаментальных задач, обеспечивающих создание эффективных и безопасных фармпрепаратов и ингредиентов для них. Пандемия COVID-19 заставила ученых и правительства всех стран мобилизовать усилия для создания новых противовирусных препаратов, изучения механизмов протекания вирусных инфекций и функционирования иммунной и антиоксидантной систем человека. Роль микробиома и фармабиотиков, как селективных модуляторов иммунной системы человека, в первую очередь клеточного иммунитета, а также антиоксидантной системы становится все более очевидной. В течение последнего десятилетия в лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН интенсивно проводятся исследования микробиома кишечника человека и разработки препаратов на его основе с нейромодулирующей, иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью.

Microbiome. Pharmbiotics. Nutrigenomics. Prospects for use in the post COVID era

V. Danilenko (D.Sc. in Biology, Professor),
R. Ilyasov (D.Sc. in Biology), R. Younes (PhD (Biology))
Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia

SUMMARY

Today, everyone knows the stages in the development of antibacterial drugs, including antibiotics, and the successes and problems of their use in medicine. Initially, through the efforts of scientists around the world, antibiotics were created based on the natural producers of soil. Large-scale and irrational use of antibacterial drugs has contributed to the emergence and widespread distribution of pathogens resistant to most antibiotics. The same situation appeared in the development of antiviral and immunomodulatory drugs. It is obvious that humanity is losing the struggle against bacteria. There is a need to create new approaches and paradigms in the development of technologies and the selection of sources of drugs, primarily anti-infectious drugs. The successes of the last decade in the study of the human microbiota have opened up many opportunities for us. Modern knowledge about the structure and functions of the human intestinal microbiota and the conceptual combination of knowledge about commensal microorganisms, including probiotic ones, obtained by molecular genetic, transcriptomic, proteomic, and metabolic methods, allowed us to form the concept of pharmbiotics. The creation of pharmbiotics based on microorganisms inhabiting various cavities of the human body, including the intestine, is a new, intensively developing area of pharmacological science. The tasks set in this area can be solved by ensuring the creation of effective and safe pharmaceuticals and ingredients for them. The COVID-19 pandemic has forced scientists and governments of all countries to mobilize efforts to create new antiviral drugs and study the mechanisms of viral infections and the functioning of the human immune and antioxidant systems. The role of the microbiome and pharmbiotics as selective modulators of the human immune system, primarily cellular immunity, as well as the antioxidant system, is becoming more and more evident. Over the past decade, the laboratory of genetics of microorganisms of the Institute of Genetics of the Russian Academy of Sciences has been intensively conducting research on the human intestinal microbiome and the development of drugs based on it with neuromodulatory, immunomodulatory, and antioxidant activity.

Введение

Прорыв последних лет в области комплексного изучения микробиома человека привел к открытию новых возможностей и перспектив создания лекарственных препаратов нового поколения — фармабиотиков. Метамикробиом — это совокупность генов, полученная в результате полногеномного секвенирования микробиоты и его последующего метагеномного анализа. По существующей терминологии к фармабиотикам относят живые штаммы комменсальных бактерий кишечника человека, их компоненты (клеточные стенки, полисахариды) и ингредиенты (белки, пептиды, ферменты, специфические фрагменты ДНК, малые РНК) и другие биологически активные вещества, проявляющие фармакологическую активность и безопасные в использовании. Термины фармабиотики, постбиотики по существу являются близкими по содержанию и были введены различными группами ученых. Метабиотики — это компоненты фармабиотиков, обладающих фармакологической активностью.

Микробиота человека в последние годы рассматривается как один из альтернативных источников получения фармакологически активных ингредиентов для нового поколения фармпрепаратов в первую очередь с иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью (рис. 1).

Микробиота – новый эндокринный орган

- Симбиотическая связь с организмом хозяина
- Ось микробиота-кишечник-мозг
- Воздействует не только на клетки кишечного эпителия и энтеральную нервную систему, но и на функционирование различных органов и систем, включая центральную нервную систему (ЦНС).
- Микробиота представлена более 50 родами бактерий способными синтезировать вещества с иммуномодулирующей и нейромодулирующей активностью
- Установление и изучение компонентов регулирующих гомеостаз иммунной системы одна из ключевых задач

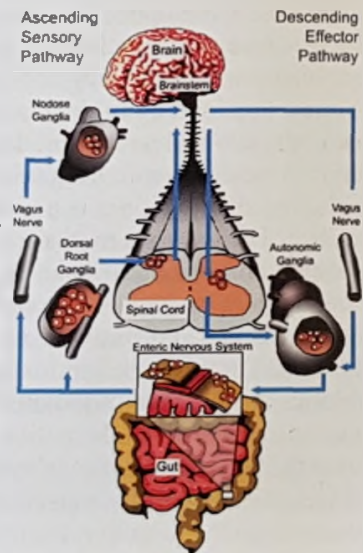


Рис. 1. Симбиотическая связь микробиоты с организмом хозяина (Danilenko et al., 2021).

Около 10 лет назад было сформулировано положение о микроорганизмах, населяющих кишечник человека, как новом нейроэндокринном виртуальном органе (рис. 1), понятие gut-brain axis (Lyte, 2014), и в последующем, как органе, интегрирующем взаимодействие и гомеостаз практически всех

систем и органов человека (Evans et al., 2013) (рис. 2). Знания об иммуномодулирующем и антиоксидантном потенциале микробиома и носителях этих свойств — конкретных комменсальных бактериях, позволят более рационально использовать уже существующие противoinфекционные и другие препараты. Возможность полного и глубокого метагеномного анализа микробиома кишечника позволяет выявить в его составе бактерии, содержащие заданные гены и их комбинации, определяющие их потенциальную иммунобиологическую и антиоксидантную активность (рис. 2). Вся система функционирует как единая сеть. Нарушение в одном звене приводит к сбою всей системы и, как следствие, к дисбактериозу.

С использованием определенных процедур искомые бактерии, не содержащие генов патогенности, лекарственной устойчивости, и несущие необходимые комбинации нужных генов, могут быть выделены из биологических образцов (фекалий) для дальнейшего исследования. В настоящее время в мире существуют Биобанки образцов микробиоты и комменсальных бактерий, выделенных из них. Вместе с тем следует учитывать регионально-культуральные особенности состава микробиома и высокие штаммоспецифические способности продуцировать те или иные фармакологически активные вещества. Учитывая, что в России отсутствуют такие Биобанки, представляется целесообразным сформировать когорты здоровых молодых людей, представляющих основные регионы России, для отбора образцов микробиоты.

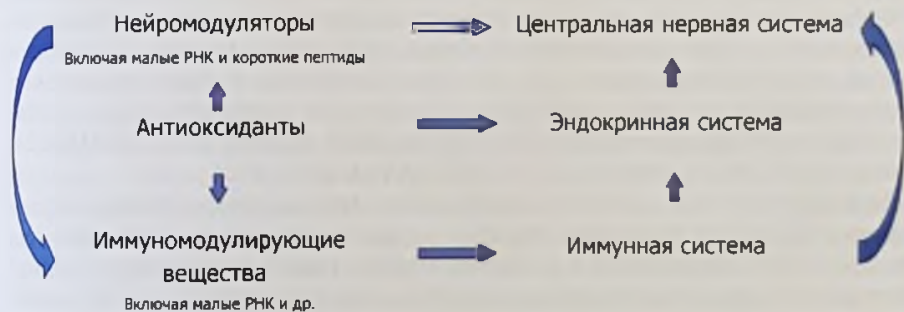


Рис. 2. Влияние микробиоты кишечника на организм хозяина при помощи синтеза различных биологически активных соединений (Averina et al., 2017, 2020, 2021; Poluektova et al., 2021; Belkina et al., 2021)

В ИОГен РАН (<http://www.vigg.ru/>) сформирована коллекция микробиом и коллекция лактобацилл и бифидобактерий, выделенных из микробиоты здоровых людей. Данный биобанк пополняется в рамках проводимых проектов и используется для поиска (с помощью омиксных технологий) штаммов с селективной иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью. Лаборатория генетики микроорганизмов ИОГен РАН

располагает большим опытом и заделами для развития этого нового, по мировым меркам, направления, а именно разработка фармабиотиков на основе микробиома. 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. 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, направленности и механизмов действия препаратов, в том числе при COVID-19.

При создании новых лекарственных препаратов для лечения заболеваний различных этиологий — онкологических, кардиологических, аутоиммунных, нейропсихиатрических, нейродегенеративных и, в первую очередь, инфекционных, в последние годы возникают определенные трудности. Пандемия COVID-19 и возможные последствия перенесенного заболевания обострили ситуацию и мобилизовали мировые научные и бизнес-сообщества на разработку новой концепции поиска и создания новых лекарств (противовоспалительных). В первую очередь препаратов с иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью. Создание лекарственных препаратов, имеющих минимальные побочные эффекты и естественно встроенных в функционирование человеческого организма, а также селективно мобилизующих его иммунную и антиоксидантную защитную систему, становится все более востребованным (Akour, 2020; Averina et al., 2020, 2021; Jabczyk et al., 2021; Danilenko et al., 2021; Singh et al., 2021).

Бурное развитие в последнее десятилетие междисциплинарного направления «микробиом человека» открыло новые глобальные перспективы для поиска новых биомишеней и разработки лекарственных средств различной направленности. Сегодня хорошо известно, что практически все заболевания коррелируют с нарушением (дисбиозисом) композиции и функционирования микробиома кишечного тракта. При многих заболеваниях дисбиозис сопровождается нарушением функционирования иммунной системы и воспалительными процессами от локальных до системных, охватывающих все органы и системы человека (Vijay et al., 2021).

Известна роль микробиома и его основных бактериальных компонентов (пробиотических бактерий) в становлении и поддержании иммунитета. Изучается антиоксидантный потенциал пробиотических бактерий, в первую очередь лактобацилл и бифидобактерий. Классические пробиотические бактерии известны со времен их открывателя Мечникова и широко используются в пищевой и медицинской промышленности (MacKowiak et

al., 2013). В последние годы формулируется новая концепция разработки и применения полезных комменсальных бактерий микробиома и их ингредиентов (компонентов) для профилактики и лечения заболеваний различных этиологий. В последние годы в мировой науке идет интенсивное обсуждение преимуществ и недостатков применения живых пробиотических бактерий и фармабиотиков, в первую очередь постбиотиков (Salminen et al., 2021). В любом случае, как при применении в фармакологии, так и при разработках лечебных продуктов питания, указывается на необходимость проведения комплекса медико-биологических исследований не только по безопасности, но и по эффективности, нозологической направленности и механизмов действия препаратов. Как правило, источниками фармабиотиков (мета- и постбиотиков) являются микробиом кишечника человека и пробиотические бактерии, выделенные из него. Разрабатываются новейшие технологии поиска и изучения перспективных свойств фармабиотиков. Формируется новая парадигма создания фармпрепаратов на основе фармабиотиков, в том числе противoinфекционных. Учитывая высокий иммуномодулирующий и антиоксидативный потенциал фармабиотиков, планируется их использование для повышения активности антибиотиков, вакцин и других существующих лекарственных препаратов. Фармабиотики селективного действия рассматриваются как новое поколение препаратов для коррекции микробиома с целью восстановления иммунного гомеостаза организма и снятия воспалительных процессов, вызванных оксидативным стрессом (Patterson et al., 2014). С целью ускоренного создания таргетных фармабиотиков исследования ведутся параллельно и комплексно по нескольким направлениям. Проведение фундаментальных исследований по изучению механизмов действия уже отобранных фармабиотиков и метабиотиков, разработка концепции и новых генетических и биоинформатических технологий для поиска фармабиотиков в заданных метагеномах здоровых людей, в том числе стрессоустойчивых, и последующий отбор и характеристика отобранных уникальных штаммов с помощью омиксных технологий. Это тот глобальный путь, по которому движется современная наука, как основа здоровья человека.

Вместе с тем требуется постоянно расширять и концептуально обосновывать научную базу использования микробиоты кишечника человека в качестве источника фармакологически активных компонентов фармабиотиков, метабиотиков для последующего создания лекарственных препаратов. Понимая всю важность и необходимость изучения концепции в этом направлении, следует учитывать регионально-культуральные особенности формирования микробиоты различных групп населения как источника создания фармабиотиков.

Микробиом: источник фармакологически активных ингредиентов (ФАИ) для фармакологии и лечебных продуктов питания

Современное состояние исследований по поиску новых фармабиотиков и других ФАИ в микробиоме человека

Использование микробиома (микробиоты) человека в терапевтических целях (поиски новых лекарственных препаратов и создание диагностикумов) — стремительно развивающееся в мире направление. Более 250 компаний и 800+ исследовательских проектов заявили себя в базе данных Microbiome Drug Database <https://www.microbiometimes.com/drug-database-2/>. Ведется поиск уникальных штаммов бактерий (фармабиотиков) и их продуктов (метабиотиков — постбиотиков) с целью лечения и профилактики различных патологий, включая инфекционные. Большое внимание уделяется разработке препаратов с иммунокорректирующей (модулирующей) и антиоксидантной активностью. Создан ряд компаний, официально заявивших о себе и продвигающих свои продукты на мировом рынке.

Все коммерческие компании, присутствующие на рынке, можно разделить на две основные группы: компании, которые рассматривают микробиом как источник фармабиотиков и компании, которые рассматривают микробиом как биомишень для коррекции с использованием различных препаратов и технологий.

Компании и их продукты в области микробиома как источника фармабиотиков:

1. Компания Evelo Biosciences (NASDAQ:EVLO, основана в 2014 году, США). Evelo Biosciences — биотехнологическая компания, разрабатывающая биопрепараты, которые действуют на клетки тонкой кишки с системным терапевтическим эффектом. Клетки тонкого кишечника играют центральную роль в управлении иммунной, метаболической и неврологической системами. На сегодняшний момент компания имеет целый ряд препаратов, которые находятся на различных стадиях клинических испытаний. Препарат EDP1815 находится на 2 фазе клинических испытаний в качестве вспомогательного препарата при лечении COVID-2019 (<https://evelobio.com/portfolio/>). EDP1815 — это штамм *Prevotella histicola* из двенадцатиперстной кишки человека-донора, который обладает системным противовоспалительным действием. Разработчики препарата отдельно уточняют, что EDP1815 не колонизирует и нежизнеспособен в кишечнике, а его фармакологический эффект основан на прямом взаимодействии с клетками тонкого кишечника. Также компания имеет ряд потенциальных вспомогательных препаратов для лечения онкологических заболеваний и нарушений метаболизма. EDP1503 — это штамм *Bifidobacterium animalis lactis*, который при пероральном приеме демонстрирует эффективные доклинические противоопухолевые ответы за счет активации врожденных и адаптивных иммунных механизмов. Эффект EDP1503 обусловлен взаимодействием с множественными рецепторами, вызывающими провоспалительный ответ в человеческих клетках PBMC

и активацию продукции IFN γ в клетках CD8 и NK, а также увеличения цитолитической активности.

2. Компания Genome and Company (Южная Корея, основана в 2015 году) занимается разработкой пероральных микробиомных препаратов. Несколько препаратов находятся на I стадии клинических исследований (<http://genomesom.co.kr/pipeline/>). Партнерами компании являются LG, Pfizer, Merck. Основным активом компании является препарат GEN-001. Он состоит из бактерий одного штамма, выделенных из кишечника здоровых людей-добровольцев, который, как было показано, обладает иммуномодулирующей активностью с помощью активации дендритных клеток, макрофагов и Т-клеточного ответа. Недавно FDA США приняло заявку на регистрацию GEN-001 для лечения солидного рака совместно с препаратом авелумаб (BAVENCIO). Также компания занимается разработкой препарата SB-121, который нацелен на расстройства, связанные с осью кишечник-мозг, такие как расстройство аутистического спектра (РАС), а также на расстройства, связанные с повреждением кишечника, такие, как некротический энтероколит (НЭК), который поражает недоношенных детей. SB-121 — это терапевтический препарат *Lactobacillus reuteri*, полученный из бактерий грудного молока.

Метамикробиом кишечного тракта — источник фармабиотиков и ФАИ с иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью

Микробиота кишечника (МК) рассматривается сегодня, как совокупность микробов, населяющих ЖКТ, которые не уступают по своей численности количеству эукариотических клеток организма хозяина (DeKoruah et al., 2020). Микробиота кишечника вносит жизненно важный вклад в энергетический гомеостаз, обмен веществ, состояние кишечного эпителия, иммунологическую активность организма, включая его реагирования на инфекционные заболевания.

Благодаря накопленным на сегодняшний день данным по микробиоте (микробиому), можно судить о роли МК в развитии различных заболеваний (психических, онкологических, аутоиммунных и инфекционных) (Blumberg et al, 2012; Gilbert et al., 2016; Levy et al., 2017). Микробиомика представляет собой развивающуюся область исследований, целью которой является выявление компонентов микробиоты, анализ микробиома, характеристика взаимодействия между микробиотой и хозяином и определение влияния на состояние здоровья человека. МК 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 и иммунную систему. МК начинает формироваться после рождения и сопровождает человека на протяжении всей его жизни, поддерживая нормальное функционирование иммунной системы через различные механизмы (Belkaid et al., 2017) (Averina et al., 2021). Так как 70% иммунной системы расположено в кишечной лимфоидной ткани, микроаспирация кишечных

бактерий или перемещение сенсibilизированных иммунных клеток через лимфу или кровоток существенно влияет на иммунный ответ в других органах. Например, метаболиты, вырабатываемые микроорганизмами ЖКТ, влияют на такой дистальный орган, как легкие (Wang et al., 2017, Dang et al., 2019). Сегодня развитие многих заболеваний связывают с нарушениями в функционировании иммунной системы.

Зафиксировано, что 60% заболевших COVID-19 имеют проблемы с расстройством кишечных функций (Jin et al., 2020; Ng et al., 2020), то есть заболевание протекает как вирусно-кишечное расстройство. Это подводит к более глубокому и детальному изучению роли микробиоты кишечного тракта и конкретных бактерий в этиологии новой коронавирусной инфекции, сопровождающейся дисбиотическими нарушениями. Важно, что прием пробиотических препаратов улучшает симптомы диареи. При диарее целостность кишечного барьера может нарушаться, что ведет к росту системного воспаления и оксидативного стресса. Возможными последствиями этого процесса могут стать развитие вторичных кишечных инфекционных заболеваний, вызванных нарушением микробиома и снижением иммунитета. Несмотря на более тяжелое течение COVID-19 у пациентов с кишечными симптомами, их присоединение не ухудшает прогноз летальности, вероятные предикторы которой — повышенный уровень ферритина и интерлейкина IL-6, а также корреляция с вирусно-обусловленным гипервоспалением (Mehta et al., 2020). Иммунный ответ организма на инфекцию COVID-19 подробно описан в обзорах Катанзаро (Catanzaro et al., 2020) и Флориндо (Florindo et al., 2020).

Одной из важнейших характеристик микробиоты, делающей ее важным фактором в регуляции огромного количества процессов в человеческом организме (иммуномодуляция, нейромодуляция, антиоксидантная активность) (Averina et al., 2017, 2020, 2021), является способность составляющих ее бактерий синтезировать огромное количество различных активных соединений. Функциональный потенциал микробиоты кишечника может быть описан через разнообразие и относительную представленность бактериальных генов. С развитием методов высокопроизводительного секвенирования стал возможен анализ совокупного генетического материала бактерий микробиоты — метагенома. Как результат, на сегодняшний день наблюдается стремительный рост числа метагеномных исследований (Laudadio et al., 2019; Martin et al., 2018; Kovtun et al., 2018; Chiu et al., 2019; Averina et al., 2020). Секвенирование полного метагенома позволяет проводить поиск определенных бактериальных генов для более глубокого понимания функционального потенциала микробиоты. Однако проведение подобного анализа невозможно без хорошо составленного референсного каталога генов и проведения функциональной аннотации метагенома. Для этого используют множество аннотированных последовательностей генов, например, базу данных RefSeq (O'Leary et al., 2016) и базы данных метаболических путей, таких как KEGG (Kanehisa et al., 2016) или MetaCyc (Caspi et al., 2018). Также можно исполь-

зовать определенные гены, обеспечивающие определенный функционал микробиоты. Для этого используются специализированные референсные каталоги, собранные вручную. Основой данного подхода является подробный анализ опубликованных данных с целью получения наиболее достоверного набора референсных бактериальных генов. Такие каталоги могут быть использованы для описания определенных функциональных свойств микробиоты, например, ее нейромодулирующего, иммуномодулирующего, антиоксидантного потенциала и т.д. Первый каталог был разработан Ковтуном и соавт. и использован для определения коровой метагеномной сигнатуры микробиоты кишечника в норме (Kovtun et al., 2018). Метагеномная сигнатура — один из способов описания метагенома. Она представляет собой матрицу, содержащую в себе информацию не только о генах, но и в каких бактериях они присутствуют. Второй каталог также был использован для описания функциональных изменений в микробиоте кишечника детей с расстройством аутистического спектра (Averina et al., 2020). Подобный каталог был разработан группой Валлес-Коломер и соавт. (Valles-Colomer et al., 2019). Его эффективно использовали в работах по описанию изменений микробиоты кишечника при депрессии (Valles-Colomer et al., 2019) и шизофрении (Zhu et al., 2020).

Сегодня опубликовано много работ по изучению иммуномодулирующего действия пробиотических бактерий лактобацилл и бифидобактерий (Belkina et al., 2021; Shimizu et al., 2021; Varsha et al., 2021). Как представители комменсальной микрофлоры эти бактерии способны селективно стимулировать реакции врожденного иммунитета и оказывать влияние на формирование адаптивного иммунного ответа, влияя на изменения профилей секреции как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Исследование иммуномодулирующей активности штаммов бактерий проводится на клеточных культурах из клеток кишечника (Caco-2, HT-29) и иммунцитов (ЕС-6, ТНР- 1) и лабораторных животных (здоровых, с дефектами иммунной системы, гнотобионтов, а также с экспериментальной инфекционной и неинфекционной патологией желудочно-кишечного тракта) (Fedorova, Danilenko, 2014). При исследовании влияния живых и разрушенных (прогреванием или ультрафиолетовым воздействием) штаммов бактерий и их метаболитов на иммунитет анализируются особенности кластерной дифференцировки иммунокомпетентных клеток и уровень продукции цитокинов при помощи иммунологических и генетических методов (Munoz-Quezada et al., 2013). С использованием различных методических подходов показано, что разные штаммы бифидобактерий, лактобацилл и их компоненты оказывают различный по степени выраженности иммуномодулирующий эффект (Khokhlova et al., 2012; Averina et al., 2015). Экспериментальные исследования *in vitro* и на животных показывают, что специфические штаммы пробиотиков способны обеспечивать защиту от вирусных инфекций путем стимуляции противовирусных, цитокиновых и хемокиновых реакций в респираторных и желудочно-кишечных эпителиальных клетках или иммунных клетках. Бифидо-

бактерии и лактобациллы способны проявлять противовирусное действие, частично за счет усиления врожденного иммунитета путем модуляции иммунной системы кишечника. А также способны усиливать выработку цитокинов в легких или сыворотке крови (Bozkurt et al., 2020).

Другим важным свойством пробиотических бактерий является проявление антиоксидантной активности, в том числе способность к продукции антиоксидантов (Mishra et al., 2015; Nowak et al., 2018; Marsova et al., 2018; Averina et al., 2021). Антиоксидантами (АО) являются молекулы, которые взаимодействуют со свободными радикалами, генерируемыми в клетках, и прекращают цепную реакцию, вызванную активными формами кислорода и приводящую к нарушению функционирования клетки. Вещества, обладающие антиоксидантными свойствами, играют ключевую роль в поддержании общего здоровья человека (Firuzi et al., 2011; Averina et al., 2021). Когда у человека естественные механизмы нейтрализации возникающих в процессе нормального метаболизма активных форм кислорода не справляются со своей задачей, развивается патологическое состояние — оксидативный (окислительный) стресс (ОС). Способность отдельных штаммов пробиотических бактерий снижать окислительный стресс доказана различными *in vitro* и *in vivo* экспериментами (Amaretti et al., 2013). Механизмы действия таких штаммов достаточно многообразны и включают в себя: хелатирование токсичных ионов (Fe^{2+} и Cu^{2+}), синтез ферментов-антиоксидантов (каталаза, супероксиддисмутазы), пептидов и тиолов (тиоредоксин, глутатион), веществ с антиокислительными свойствами (витамины В1 и В12, короткоцепочечные жирные кислоты), воздействие на клеточные рецепторы и регуляцию внутренних систем сигнальной трансдукции эукариотических клеток и активацию транскрипции ферментов, нейтрализующих свободные радикалы (Nrf2-Keap1-ARE, NFκB, MAPK, PKC), модуляцию видового состава КМ и другие (Amaretti et al., 2013; Wang et al., 2017). Образуемые бактериальные низкомолекулярные АО, в том числе тиолы, играют в клетке важную роль: участвуют в поддержании клеточного редокс-статуса, в работе системы детоксикации, в синтезе эйкозаноидов, в регуляции многих механизмов клеточного сигналинга, регуляции клеточного цикла, экспрессии генов и апоптоза (Mishra et al., 2015). Многие пробиотические бактерии являются продуцентами таких антиоксидантных веществ как аминокислоты (метионин, цистин, цистеин), витамины (ниацин (PP), С, К). Для применения в качестве пробиотиков с антиоксидантными свойствами, способность производить фолиевую кислоту активно исследуется в различных пробиотических штаммах (Rossi et al., 2011). Пробиотики могут проявлять антиоксидантное действие через метаболические пути освобождения от окислительных соединений или профилактики их образования в кишечнике (Azcarate-Peril et al., 2011). Способность некоторых пробиотических бактерий к продукции антиокислительных ферментов и метоболитов делает их самыми перспективными из всех средств борьбы со свободными радикалами (Danilenko et al., 2021).

Недавние исследования показали, что, в дополнение к классическим пробиотическим видам, другие кишечные комменсальные микроорганизмы, часто доминирующие в здоровых популяциях и истощенные у людей с заболеваниями, также могут положительно взаимодействовать с иммунной системой хозяина и, таким образом, могут представлять собой перспективные пробиотики следующего поколения, способствующие укреплению здоровья (O'Toole et al., 2017). К ним можно отнести *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides fragilis*, *Faecalibacterium prausnitzii* (Delgado et al., 2020). Идентификация биологически активных фракций из таких микроорганизмов дает новые возможности для использования их оздоровительных свойств.

Внеклеточные или поверхностно-ассоциированные белковые молекулы комменсальных кишечных микроорганизмов выполняют важнейшие функции во взаимодействии с хозяином и представляют собой важные микроб-ассоциированные молекулярные паттерны (MAMPs), приводящие к активации специфических сигнальных путей при распознавании рецепторами опознания (PRRs) (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017; Ruiz et al., 2016). Среди специфических клеточных компонентов, которые могут вызвать иммунную реакцию в организме хозяина, сегодня известны: пили (Turroni et al., 2013; Ottman et al., 2017), флагеллины (Eggestol et al., 2020), белки 75 и P40 (Yan et al., 2007), иммуноглобулин связывающие суперантигенные белки IbpA и IbpB (Arumugam et al., 2011), белки с пептидом STp с высоким содержанием серина и треонина (Al-Hassi et al., 2014; Bernardo et al., 2012), белки с пептидами FR-16 и LR-17 (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017, Blanco-Míguez et al., 2017), экзополисахариды: цвиттерионные (Round et al., 2011), с β -глюканами (Kamiya et al., 2018), гетерополимерные (Hidalgo-Cantabrana et al., 2014), моносахаридные (Hidalgo-Cantabrana et al., 2014); секретируемые компоненты клеточной стенки (Gorska et al., 2016), тейхоевые кислоты, липотейхоевые кислоты (Xie et al., 2012), короткоцепочечные жирные кислоты (Rios-Covián et al., 2016), индол-3-альдегид, индол-3-пропионат, индол-3-уксусная кислота (Venkatesh et al., 2014; Zelante et al., 2013), 3-индолакриловая кислота (Włodarska et al., 2017), D-триптофан, кинуреновая кислота, ниацин, никотиновая кислота (Thorburn et al., 2014), глутамин, гистидин и производные глицина (Hirata et al., 2017). Они являются медиаторами иммуномодуляции, оказываемой различными комменсальными видами, включая как классические пробиотические лактобациллы или бифидобактерии, так и другие виды бактерий (Delgado et al., 2020). Использование микробных биологически активных соединений, а не живых микроорганизмов может быть особенно важно при работе с уязвимыми иммунокомпрометированными или иммунодефицитными популяциями и препятствовать распространению генов лекарственной устойчивости и патогенности (Salminen et al., 2021). В разделе 5 подробно изложены перспективы использования недавно открытого широко распространенного у бифидобактерий белка FN3 *B. longum* GT15, селективно связывающегося с TNF α .

Изучение микробиома кишечного тракта человека является глобальным

междисциплинарным направлением исследований в мировой науке последнего десятилетия. В последние годы стало очевидно, что микробиом здорового человека может служить источником получения фармабиотиков и ФАИ для профилактики и лечения заболеваний различной этиологии, в первую очередь характеризующихся нарушением функционирования иммунной системы и сопровождающихся локальными и генерализованными воспалительными процессами. Установлены белковые и пептидные внеклеточные компоненты лакто- и бифидобактерий, потенциально ответственные за иммуномодулирующий и антиоксидантный потенциал. Вместе с пищей и водой в кишечник поступают различные патогены, включая вирусы животных и растений. Микробиом может нейтрализовать вирусы (CRISPR/Cas системы), а может способствовать их мутированию (системы репарации—рекомбинации).

Оксидативные процессы и системное воспаление — причины и последствия большинства инфекционных и хронических заболеваний

Характеристика оксидативного стресса

Соединения с антиоксидантными (АО) свойствами условно можно разделить по принципу воздействия на антиоксиданты (АО) прямого и косвенного действия. АО прямого действия обладают непосредственными антиоксидательными свойствами, инактивируя или восстанавливая различные формы АФК и активных радикалов. В основном, это вещества и ферменты антиоксидантной защиты клетки. Например, глутатион и ферменты его синтеза и метаболизма, тиоредоксиновая система, каталаза и прочее. Способность противостоять окислительному стрессу у различных групп лактобацилл зависит от уровней экспрессии и синтеза антиоксидантов. Количества таких веществ могут быть определены стандартными биохимическими методами в тестах *in vitro* (Dias et al., 2013; Rao and Gershon, 2016; Wang N. et al., 2017; Sun M.-F. et al., 2018; Wanchao et al., 2018).

АО косвенного действия способны снижать количество АФК только в биологических объектах — от клеточных органелл до целого организма. Эти механизмы не связаны с АО защитой бактериальной клетки, но оказывают АО действие в организме хозяина. Такие условные антиоксиданты неэффективны *in vitro*, однако в живых системах встраиваются в метаболические цепи организма, поддерживая его способность адаптироваться к неблагоприятным условиям. Например, через сохранение целостности мембран, стимулирование собственной антиоксидантной системы клеток, восполнение дефицита SH-групп и молекул-переносчиков и т.п. (Jung K-A. et. al, 2010, Sies and Jones, 2020). Таким действием могут обладать поверхностные структуры клеточной оболочки; белки с хелатирующей активностью; молекулы, воспринимаемые клетками организма хозяина, как сигнальные.

Наличие и содержание АО косвенного действия можно определить только в тестах *in vivo* (Averina et al 2021).

Очевидно, что в большинстве случаев имеет место комплексное АО действие одновременно через осуществление нескольких механизмов с большим или меньшим вкладом каждого. Было продемонстрировано, что пробиотики проявляют антиоксидантную активность, модулируя окислительно-восстановительный статус организма путем удаления свободных радикалов, хелатирования ионов металлов, через модуляцию микробиоты кишечника (Diaz-Ropero, 2007; Yang, Y., 2017; Saadat, 2019, Averina et al 2021). Также показано, что антиоксидантная активность лактобацилл проявляется в организме хозяина путем индукции детоксицирующих ферментов, через активацию ядерного фактора транскрипции эритроида 2-связанного фактора 2 (Nrf2) (Wang, L.-X., 2013; Saeedi, 2020). Другие регуляторные пути, включающие Sirt1, MAPK, и PKC, которые могут вызывать диссоциацию Nrf2 или усиливать гомеостаз клеток, а также участвовать в регуляции их антиоксидантного действия (Averina et al 2021). Каждый из этих процессов невозможно рассматривать изолированно, все они имеют множество взаимопересекающихся последствий (рис. 3).

Оксидативный стресс — триггер различных заболеваний

В соответствии с современными представлениями, большая часть патологических процессов в организме и многие «возрастные» заболевания связаны с воздействием активных форм кислорода (АФК). Образование АФК происходит как в процессе нормальной жизнедеятельности клетки, так и при протекании свободнорадикального окисления (СРО) биомолекул — белков, липидов, нуклеиновых кислот (Watson et al., 2013). Состояние, при котором количество образующихся АФК превышает антиоксидантные возможности системы, развивается в состоянии окислительного стресса (ОС). Состояние ОС может быть индуцировано инфекциями и негативными факторами внешней среды, такими как гербициды, что приводит к повышенной проницаемости кишечного барьера, что способствует проникновению в кровь эндотоксинов и бактериальной транслокации (Marsova et al., 2018; Marsova et al., 2020a).

Процессы воспаления и оксидативного стресса тесно взаимосвязаны и каждый из них способен служить фактором индукции и активации другого, порождая каскад окислительно-воспалительных реакций и усугубляя течение патологического процесса. Микробиом играет в жизнедеятельности организма огромную роль, непосредственно и многосторонне влияя на здоровье и развитие организма. Пробиотические микроорганизмы, составляющие кишечную микробиоту, выполняют многочисленные функции, в том числе иммуномодулирующую (Jandhyala, 2015 Marchesi et al., 2015) и антиоксидантную (Kullisaar et al., 2012). Способность модулировать видовой состав КМ также вносит значительный вклад: снижение системного воспаления и оксидативного стресса за счет поддержания нормальной про-

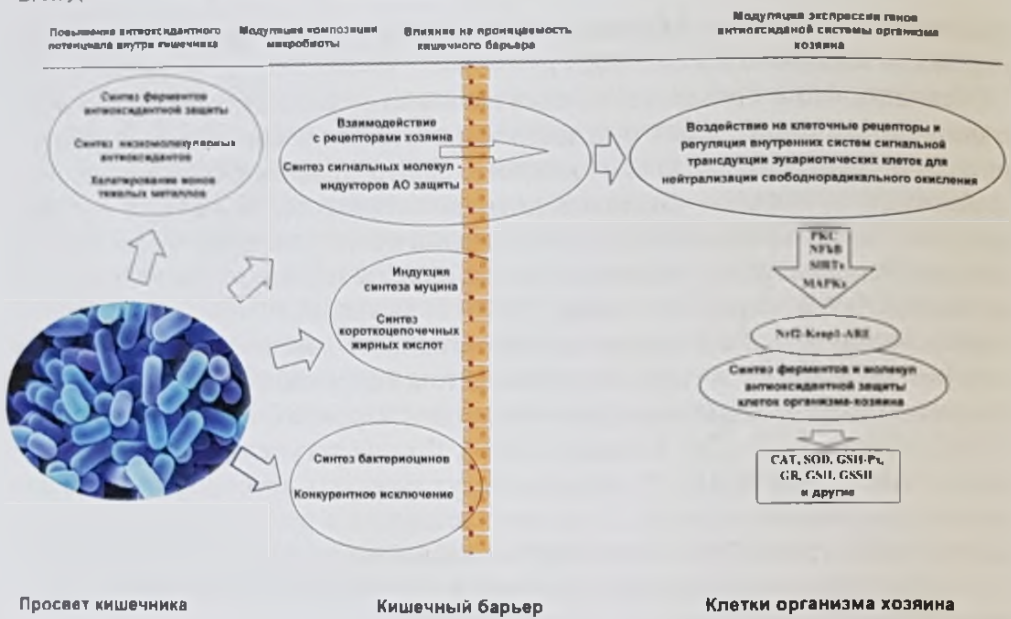


Рис. 3. Механизмы антиоксидантного действия лактобацилл в организме хозяина.

NFkB — ядерный фактор kB, фактор транскрипции эукариот, реагирующий на маркеры оксидативного стресса; SIRT6 — семейство НАД-зависимых белковых деацетилаз, которые играют важную роль в АО у млекопитающих; PKC — протеинкиназа C, выполняет фосфорилирование белков, участник сигнальных каскадов; MAPKs — активируемая митогеном протеинкиназа, MAPK-сигнальные пути, контролирующе транскрипцию генов, метаболизм, пролиферацию и подвижность клеток, апоптоз и другие процессы; SOD — супероксиддисмутаза; CAT — каталаза; GSH — восстановленный глутатион; GSSH — окисленный глутатион; GSH-PX — глутатионпероксидаза; GR — глутатионредуктаза; NRF2-сигнальная система KEAP-ARE — ответственная за экспрессию антиоксидант-чувствительного элемента (ARE-генов), активируется при диссоциации фактора транскрипции NRF2 с белком-супрессором Keap1

нищаемости кишечного барьера и снижения нагрузки на иммунную систему.

Микробиота кишечника тесно взаимодействует с иммунной системой слизистой оболочки (Dang et al., 2019; Katmarkar and Rock, 2013), иммунными клетками, и играет решающую роль в ответ на бактериальные инфекции легких (Dumas et al., 2018). Микробиота легких в настоящее время признана краеугольным камнем в физиопатологии многочисленных респираторных заболеваний (Soret et al., 2020). Иммуномодулирующая активность КМ проявляется в стимуляции клеточного звена иммунного ответа, индукции синтеза интерферонов, интерлейкинов и иммуноглобулинов. Все эти взаимодействия убедительно указывают на важную роль так называемой оси «кишечник–легкие» в развитии респираторных заболеваний (He et al., 2016; Danilenko et al., 2021b).

Пробиотические микроорганизмы с высокой антиоксидантной активностью имеют ряд преимуществ перед другими способами повышения анти-

оксидантного статуса организма. В частности, более высокая эффективность за счет комплексного действия и их относительная безвредность и физиологичность по сравнению с химическими препаратами. Высокий антиоксидантный потенциал пробиотических бактерий обеспечивается продукцией: низкомолекулярных веществ, белков и ферментов с антиоксидантными свойствами, молекул, способных хелатировать ионы тяжелых металлов. Значительный вклад в снижение системного воспаления достигается путем регуляции состава КМ и восстановления кишечного барьера, а также за счет регуляции внутренних систем сигнальной трансдукции и активации транскрипции ферментов эукариотических клеток, нейтрализующих свободные радикалы (сигнальный путь Nrf2-Keap1-ARE, через факторы NFκB, MAPK и PKC) (Achuthan et al., 2012; Mishra et al., 2015; Falony et al., 2016; Tang W. et al., 2017; Marsova et al., 2018).

Цитокиновый шторм (цитокиновый каскад) — это потенциально летальная реакция иммунной системы, развивающаяся в некоторых случаях при инфекции вирусом SARS-CoV-2. Цитокиновый профиль, ассоциированный с тяжестью заболевания COVID-19 характеризуется повышенным уровнем интерлейкинов IL-2 и IL-7, гранулоцитарного стимулирующего фактора (GM-CSF), индуцибельного белка интерферона-γ 10 (IP-10), моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1) и макрофагального воспалительного белка 1-α (MIP-1α), а так же фактора некроза опухоли-α (TNF-α). При этом повышенные уровни ферритина, интерлейкина IL-6 и С-реактивного белка (СРБ) коррелируют с вирусно-обусловленным гипервоспалением и в клинике служат предиктором летальности (Danilenko et al., 2018; Danilenko et al., 2019; Danilenko et al., 2020; Danilenko et al., 2021a; Danilenko et al., 2021b).

Идеальный препарат для минимизации оксидативного стресса и цитокинового шторма должен обладать рядом свойств: быть природным и/или дополняющим компонентом микробиоты кишечника человека и способствовать ее восстановлению, способствовать восстановлению кишечного барьера; комплексно воздействовать на врожденную иммунную и антиоксидантную системы организма человека: обладать собственной антиоксидантной активностью прямого действия и способствовать «мягкой» мобилизации антиоксидантного потенциала таргетных клеток организма хозяина через системы иммунного сигналинга. Такой препарат, разрабатывается на основе штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21 (Marsova et al., 2018; Marsova et al., 2020a; Marsova et al., 2020b; Danilenko et al., 2018; Danilenko et al., 2019; Danilenko et al., 2020; Danilenko et al., 2021b).

Фармабиотик на основе штамма *Limosilactobacillus fermentum* U21 (*Lactobacillus*); перспективы использования для снятия оксидативного стресса и его последствий при инфекционных и неврологических заболеваниях

Характеристика штамма *L. fermentum* U21

Пробиотический штамм *L. fermentum* U21, обладающий доказанными антиоксидантными свойствами (Marsova et al., 2018, Marsova et al., 2020), был выделен из кишечника здорового человека — жителя центрально-европейской части РФ, депонирован в международной коллекции ВКПМ (Москва) под номером В-12075 от 08.10.14; была определена нуклеотидная последовательность ДНК штамма и депонирована в базе данных GenBank NCBI под № PNBB00000000.

Совместно с коллегами из НИИ Фармакологии им. Закусова, Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, Института биологии гена РАН и Отделом исследований мозга Научного центра неврологии, мы провели ряд исследований штамма *L. fermentum* U21 направленных на определение его антиоксидантной и протекторной активности на различных биологических моделях.

Штамм *L. fermentum* U-21 был отобран из коллекции микроорганизмов ИОГе РАН по проявлению высокой антиоксидантной активности в трех тест-системах на основе трансгенных штаммов *E.coli* K12 MG1655 по снижению индуцированной биолюминесценции, а так же стандартными биохимическими методами была подтверждена антиоксидантная активность культуральной жидкости штамма (Marsova et al., 2018).

In vivo культура штамма *L. fermentum* U-21 проявила высокую антиоксидантную и протекторную активность, продлевая жизнь свободноживущей почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* в условиях паракват-индуцированного ОС на 25–30% (Marsova et al., 2020) (рис. 4).

Для выявления и характеристики антиоксидантных и протекторных свойств культуры клеток штамма *L. fermentum* U-21 в отношении допаминергических нейронов мозга в условиях оксидативного стресса (ОС) *in vivo* были использованы методы и системы индуцированного ОС у грызунов, описанные в патентах и научных статьях, успешно применяемые в исследованиях.

В модели паракват-индуцированной модели болезни Паркинсона (БП) у мышей линии C57/BL6 и у крыс линии Вистар ежедневный пероральный прием лioфильно-высушенной культуры штамма *L. fermentum* U-21 в дозе 108 КОЕ эффективно предотвратил характерные симптомы, в том числе:

1. Развитие моторных дисфункций. Координация движений мыши оценивалась по стандартной методике в тесте «спуск по вертикальному шесту». По результатам исследования выявлено, что различия в медianaх максимальной процентной доли длительности вертикального спуска с шеста между мышами из групп «Контроль», «Токсин» и «Токсин + U-21», достоверно

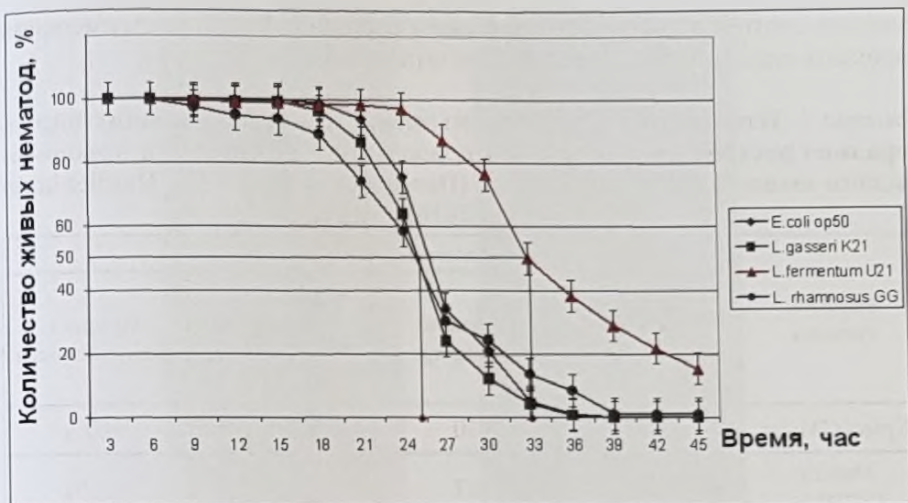


Рис. 4. Продолжительность жизни *C. elegans* в 50 мМ растворе параквата в присутствии разных видов лактобацилл в качестве корма по сравнению со стандартным кормом (*E. coli* op50) (Marsova et al., 2020)

различались при оценке по Манну-Уитни ($p < 0,05$) и составили 54% и 100% от показателя интактной группы соответственно, что свидетельствует о предотвращении двигательных дисфункций у мышей, получавших препарат штамма *L. fermentum* U-21.

2. Снижение числа тирозингидроксилаза (ТГ)-позитивных клеток в черной субстанции мозга. ТГ является ключевым ферментом биосинтеза катехоламинов, в том числе допамина. При развитии паркинсонизма, количество ТГ-позитивных клеток в мозге уменьшается, вызывая ряд характерных дисфункций. Количество ТГ-позитивных клеток в черной субстанции мозга, обработанных паракватом мышей, определяли подсчетом иммуногистохимически окрашенных антителами фронтальных срезов черной субстанции. По результатам исследования выявлено, что количество ТГ-позитивных клеток в мозге мышей из групп «Токсин» и «Токсин + U-21» достоверно различались (по Манну-Уитни, $p < 0,05$) и, в среднем по выборке, составили 15,1 и 21,6 тысяч на образец соответственно (т.е. животные, получавшие пробиотический препарат, сохранили на 30% больше допаминергических нейронов), что свидетельствует о протекторном действии препарата штамма *L. fermentum* U-21 в отношении допаминергических нейронов черной субстанции.

3. Смертность в опытной группе животных: применение препарата одновременно с инъекциями параквата снизило смертность мышей по сравнению с контрольными группами на 8% и 20% и крыс — на 60%; в группе интактных мышей смертность составила 18%, в группе получавших паракват — 30%, в группе одновременно получавших паракват и штамм *L. fermentum* U-21 смертность составила менее 10%. На модели крыс смертность при при-

менении соответствующих доз параквата составила 90%, при применении параквата одновременно с препаратом штамма — 30%. (табл. 1).

Таблица 1. Изменения смертности мышей и крыс, получавших паритерально раствор параквата, при пероральном применении пробиотического штамма *L. fermentum* U21 (Danilenko et al., 2019b; Danilenko et al., 2020)

Условия/ система	Доля выживших животных, %			
	Контроль (NaCl/NaCl)	Паракват 10mg/kg	Паракват (10mg/kg) + <i>L. fermentum</i> (10 ⁸ CFU)	Прирост выживаемости
Крысы Wistar	100	10	70	+60%
Мыши C57BL/6	82	67	92	+25%

4. Изменения внутренних органов опытных животных (мышей и крыс) при воздействии параквата. Вскрытие животных из группы получавших паракват показало изменения в состоянии внутренних органов (следы фиброза, кровоизлияний), особенно в легких и печени. Применение культуры штамма *L. fermentum* U-21 позволило предотвратить большинство патологических изменений органов и сократить проявления таких изменений (рис. 5).

5. Поведение крыс в модели 6-ГДА индуцированного паркинсонизма. В компактную часть черной субстанции мозга вводили нейротоксин, 6-гидроксидофамин (6-ГДА), в дозе 12 мкг в 3 мкл физиологического раствора. Данные манипуляции приводят к значительному изменению поведения животных — повышение тревожности, нарушение координации движений. В группах крыс, получавших одновременно 6-ГДА и препарат исследуемого штамма, показано снижение токсического воздействия нейротоксина 6-ГДА по сравнению с контрольной группой, в частности, улучшение краткосрочной памяти в тесте УРПИ, улучшение координации движений в тесте «Сужающаяся дорожка», восстановление индекса кишечного транзита.

Возможные механизмы антиоксидантного и иммуномодулирующего действия штамма *L. fermentum* U21

В соответствии с современными представлениями, большая часть патологических процессов в организме и многие «возрастные» заболевания связаны с воздействием активных форм кислорода (АФК). Образование АФК происходит как в процессе нормальной жизнедеятельности клетки, так и при протекании свободнорадикального окисления (СРО) биомолекул — белков, липидов, нуклеиновых кислот (Watson, 2013). Если количество образующихся АФК превышает антиоксидантные возможности системы, развивает-

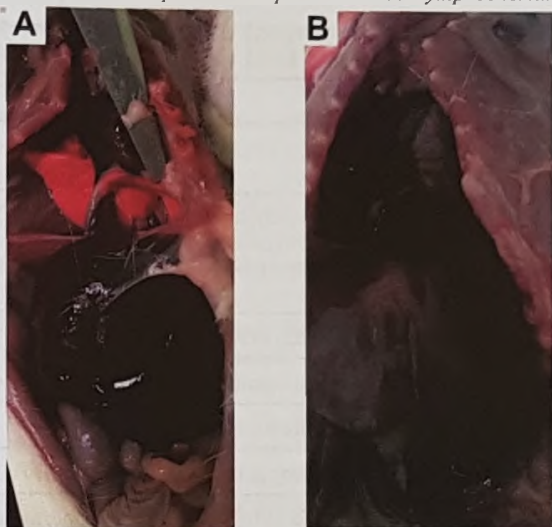


Рис. 5. Изменения внутренних органов мышей при воздействии параквата

А — органы мышей, одновременно получавших паракват и штамм *L. fermentum* U-21 (группа «U-21»); В — органы мышей, получавших паракват (группа «Токсин»)

ся состояние окислительного стресса (ОС). Состояние ОС может быть индуцировано негативными факторами внешней среды, такими как некоторые инфекции, гербициды, а также повышенной проницаемостью кишечного барьера, что способствует проникновению в кровь эндотоксинов и бактериальной транслокации.

Процессы воспаления и оксидативного стресса тесно взаимосвязаны и каждый из них способен служить фактором индукции и активации другого, порождая каскад окислительно-воспалительных реакций и усугубляя течение патологического процесса.

Пробиотические микроорганизмы с высокой антиоксидантной активностью имеют ряд преимуществ перед другими способами повышения антиоксидантного статуса организма. В частности — более высокая эффективность за счет комплексного действия и их относительная безвредность и физиологичность по сравнению с химическими препаратами.

В ходе исследований осуществлен геномный, протеомный и метаболомный анализ штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21. В геноме штамма *L. fermentum* U-21 идентифицированы гены белков с антиоксидантными свойствами (гены белков тиоредоксинового комплекса), а также ряд генов, не характерных для других штаммов *L. fermentum*, способных оказывать влияние на проявления антиоксидантных свойств (гены белков, хелатирующих ионы тяжелых металлов (железа и меди)) (табл. 2).

Таблица 2. Гены и их продукты, присутствующие в геноме штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21 (Danilenko et al., 2019b)

Белки тиоредоксинного комплекса	Пероксидаза
	trxA/тиоредоксин trxC/тиоредоксин
	Trx (aphC)/пероксицероксин (субъединица С щелочной гидропероксид редуктазы) aphF/щелочная гидропероксид редуктаза, субъединица F оперон
	trxB/тиоредоксин редуктаза
Белки метаболизма и утилизации тяжелых ионов	Предполагаемая гем-зависимая пероксидаза (оперон)
	Copper oxidase, Cupredoxin
	CopY/TcrY family copper transport repressor
	Транспортер — MFS (Major Facilitator Superfamily) оперон
	Феррохелатаза (оперон)
Дезагрегазная активность — реактивация белков	Казеинолитическая пептидаза В (ClpB) — АТФ-зависимый шаперон

Учитывая специфику проявления антиоксидантных свойств штамма на различных моделях оксидативного стресса, можно предположить наличие иммуномодулирующих механизмов, обеспеченных эмиссией низкомолекулярных активных компонентов, действующих посредством регуляции внутренних систем сигнальной трансдукции эукариотических клеток. При таком адаптивном ответе происходит активация транскрипции ферментов с антиоксидантной активностью, способных нейтрализовать свободные радикалы (сигнальный путь Nrf2-Keap1-ARE, через факторы NFκB, MAPK и PKC) непосредственно в клетках-мишенях эукариотического организма (Indirapriyadarsini et al., 2018). Значительный вклад в снижение системного воспаления достигается также путем регуляции состава кишечной микробиоты и восстановления кишечного барьера.

Возможные молекулярные мишени действия штамма L. fermentum U21

Основной мишенью действующего вещества являются активные формы кислорода и, в частности, супероксид анион. Антиоксидантное действие штамма *L. fermentum* U-21 обусловлено нейтрализацией активных форм кислорода белками тиоредоксинового комплекса (тиоредоксином, тиоредоксин редуктазой, пероксицероксином). Сравнительные геномные и протеомные исследования позволили выявить несколько внеклеточных белков, в том числе

СрВ, участвующих в рефолдинге повреждаемых при оксидативном стрессе продуктов клетки, а также белок LysM с инкорпорированным в него серин-треониновым пептидом STpLfU21 с потенциальной иммуномодулирующей активностью. Обнаруженные белки, пептиды и их комплексы могут активировать антиоксидантные и иммунные системы человека.

Анализ экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов клеточной линии острого моноцитарного лейкоза человека THP-1 в присутствии штамма *L. fermentum* U-21 (живые и мертвые клетки) и культуральной жидкости показал значительное изменение экспрессии провоспалительных цитокинов IL-6, TNF α и противовоспалительного IL-10, что свидетельствует о потенциальной иммуномодулирующей активности.

Таким образом, молекулярными мишенями, через которые штамм *L. fermentum* U21 воздействует на организм хозяина, может быть, ряд сигнальных путей иммунной и антиоксидантной системы человека. Уточнение и изучение этих механизмов — предмет настоящего исследования. Предлагаемый препарат не укладывается в классические представления одно вещество — одна основная биомшень. Мы на новом уровне знаний возвращаемся к теме природоподобных технологий. Только комплексное воздействие может решить проблему оксидативного стресса при ряде заболеваний, включая паркинсонизм.

Паракват индуцированная модель оксидативного стресса, возможность использования для отбора фармабиотиков для лечения COVID-19 и паркинсонизма

Паракват (PQ) — гербицид, системный токсикант, является одним из стандартных препаратов для моделирования внутриклеточного и системного оксидативного стресса (Tyagi N. et. al. 2019). В клетках, в присутствии кислорода PQ действует как редокс-циклирующий агент и является мощным индуктором окислительного стресса. Основным действующим метаболитом при индукции ОС паракватом, является супероксид-анион радикал — наиболее активная и нестабильная частица, вызывающая каскад окислительных и радикальных процессов в клетке (рис. 6).

На цитозольном уровне паракват увеличивает пероксидацию липидов, уменьшает уровни антиоксидантов, повреждает митохондриальную функцию. Паракват-индуцированный ОС является признанной моделью для изучения различных патологий, спровоцированных, либо сопровождающихся, повышенным образованием АФК и развитием ОС. Легкие являются одной из основных мишеней — в тканях легких паракват активно поглощается и накапливается в эпителиальных клетках альвеолярного типа I и II, благодаря механизму транспорта моноаминов и используется при моделировании легочных болезней, сопряженных с воспалением.

При остром введении (однократно большими дозами), паракват вызывает легочное и системное воспаление, увеличивает уровни экспрессии генов воспалительного ответа, таких как интерлейкин IL-1, IL-6, IL-8, фактор не-

•Молекула параквата в живой клетке становится продуктом супероксид-аниона ($O_2^{\bullet-}$).

•Поврежденные митохондрии так же становятся источниками активных форм кислорода

Схема составлена на основании ряда публикаций
(Ved et al., 2005; Kumar et al., 2016; Zhou et al., 2016; Zhao et al., 2017).

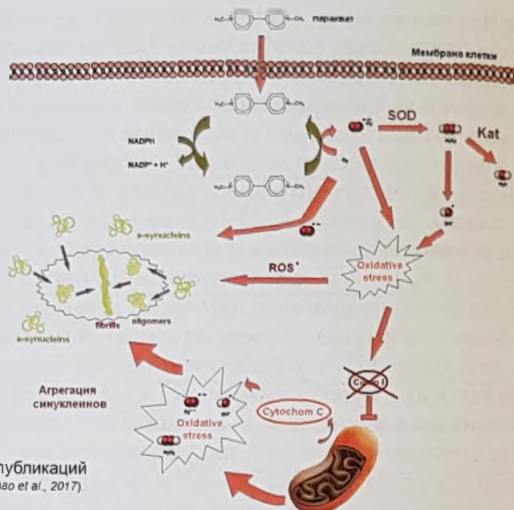


Рис. 6. Схема предполагаемой мишень-супероксид-аниона

кроза опухоли TNF- α , TNF- β , интерферон-1; рекрутирует воспалительные клетки, такие как нейтрофилы, макрофаги и лимфоциты, способствующие развитию ОС и воспалению путем генерации АФК. Происходит активация транскрипционных факторов: трансформирующего фактора роста (TGF)- β NF- κ B и активатора белка-1 (ap-1), происходит изменение воспалительного статуса, измеряемого по общему количеству лимфоцитов, уровню TNF- α и С-реактивного белка.

Эти изменения во многом сходны со специфической реакцией иммунной системы на активность вируса SARS-CoV2, так называемым цитокиновым штормом — потенциально летальной реакцией иммунной системы, развивающейся в некоторых случаях при инфекции вирусом SARS-CoV-2. При этом повышенные уровни ферритина, интерлейкина IL-6 и С-реактивного белка (СРБ) коррелируют с вирусно-обусловленным гипервоспалением и в клинике служат предиктором летальности. Осуществление паракват-индуцированной модели ОС на культуре клеток легких BEAS-2B, полученных из нормального бронхиального эпителия, было успешно проведено Podder B., что может являться также суррогатной моделью развития ОС при COVID-19.

Благодаря способности проникать через гематоэнцефалический барьер, небольшие регулярные дозы параквата провоцируют окислительное повреждение нервной ткани и способны вызывать те же изменения в мозге, что наблюдаются при болезни Паркинсона, включая увеличенную продукцию и агрегацию α -синуклеина. Существуют документально подтвержденные факты, что продолжительный контакт с паракватом достоверно повышает заболеваемость людей БП. У мышей, обработанных паракватом, фиксируется

ся снижение двигательной активности, дозозависимая потеря допаминергических нервных волокон в стриатуме и повышенная экспрессия и агрегация α -синуклеина в черной субстанции компактной области мозга.

Токсिनсовая (паракватная) модель развития паркинсонизма — олигомеризация синуклеинов под воздействием активных форм кислорода, приводящая к отмиранию допаминергических нейронов в черной субстанции мозга. Показано, что контакт с паракватом достоверно увеличивает риск заболеваемости паркинсонизмом у людей. В легких происходит деструкция тканей. Биохимические изменения при воздействии параквата приведены в таблице 3. В представленной таблице видно, что паракват индуцируемые модели оксидативного стресса могут быть использованы для первичного отбора препаратов широкого спектра применения: при паркинсонизме и вирусных заболеваниях, включая COVID-9 (табл. 3).

Таблица 3. Биохимические изменения при воздействии параквата

	Индикатор и изменения		Источник
1	Карбонилированные белки	Возрастает	Attia et.al. 2017
2	GM-CSF гематопозитический колониестимулирующий фактор — конц. увеличивается	Возрастает	Hayley et al, 2015
3	Кортикостерон в крови — возрастает	Возрастает	Rudyk et.al, 2017
4	Кортикостерон в плазме — увеличивается	Возрастает	Hayley et al, 2015
5	IL-6 уровень увеличивается	Возрастает	Hayley et al, 2015
6	α -синуклеин — олигомеризация и гибель нейронов	Возрастает	Kumar et.al 2016
7	Цитохром C — в цитозоле (видимо пероксидазная активность цитохрома способствует олигомеризации синуклеинов)	Возрастает	Kumar A et.al. 2016
8	Активность моноаминов 5-HT, NE (норэпинефрин) и DA в гиппокампе и префронтальной коре — Возрастает	Возрастает	Hayley et al., 2015
9	Белок глюкокортироидного рецептора в гиппокампе (вестерн-блоттинг) — увеличивалась; его активная форма — не увеличивалась	Возрастает	Rudyk et.al, 2017
10	Гомованилиновая кислота (HVA) в прилегающем ядре и полосатом теле	Возрастает	Hayley et al., 2015
11	Норэпинефрин прилегающем ядре и полосатом теле	Возрастает	Hayley et al., 2015

Перспективы применения штамма *L. fermentum* U21 при паркинсонизме и COVID-19

Имеющиеся данные позволяют полагать, что штамм *L. fermentum* U21 обладает комплексом характеристик, позволяющих на его основе разрабатывать препараты, снимающие оксидативный стресс и его последствия как при паркинсонизме, так и при COVID-19 (Danilenko et al., 2021).

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. Установление конкретных белков, ферментов, пептидов и других биологически активных молекул позволит приступить к созданию препаратов фармабиотиков на основе этих фармакологически активных ингредиентов.

FN3-цитокинсвязывающий белок бифидобактерий: перспективы для создания препаратов, модулирующих состояние иммунной системы

Открытие и характеристика PFNA видоспецифического оперона бифидобактерий и FN3 белка в его составе, отвечающего за коммуникацию с организмом человека

Бифидобактерии — анаэробные бактерии, существовавшие на планете Земля до появления на ней кислорода и после его появления, заселившие анаэробные полости практически всех представителей животного мира от насекомых до человека. Предполагается, что бифидобактерии, представленные на сегодня 99 видами рода *Bifidobacterium*, участвовали в формировании иммунной системы своих хозяев. Хорошо известно, что виды *B. longum* и *B. bifidum* первыми после рождения заселяют кишечник человека и формируют иммунную систему ребенка. Интенсивно исследуется роль бифидобактерий и их компонентов (метаболитов) в коммуникации кишечник–мозг и кишечник–иммунная система. Относительно хорошо изучены метаболиты и компоненты клеток бифидобактерий, модулирующие с помощью тех или иных механизмов активность иммунной системы. Вместе с тем практически

ничего не известно о сигнальных системах (белках, рецепторах и др.), способных воспринимать сигналы иммунной системы, в том числе осуществлять взаимодействия с цитокинами.

Ученые лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН открыли и исследовали видоспецифический оперон PFNA бифидобактерий, ответственный за такие взаимодействия. PFNA оперон, присутствующий практически у всех видов бифидобактерий, содержит 5 основных генов: *pkb2*, *fn3*, *aaa-atp*, *duf58*, *igm*. По крайней мере три из них: *pkb2* (серин-треониновая протеинкиназа), *fn3* (белок, содержащий фиброниктиновые домены) и *igm* (трансглутаминаза), обладают лиганд-связывающей способностью (рис. 7).

FN3 цитокин TNF α -связывающий белок *B.longum* GT15: структура и функции

Была более подробно изучена структура и функции FN3 белка PFNA оперона штамма *B. longum subsp. longum* GT15 (рис. 8А). Основываясь на полученных данных, предложена область практического применения FN3 белка в качестве противовоспалительного препарата при коронавирусной инфекции. Впервые в мире было показано, что FN3 белок этого оперона способен селективно связываться с факторами некроза опухоли TNF α (рис. 8В).

FN3 белок включает два фибронектиновых домена, содержащих цитокин-связывающие мотивы. Прогностическое построение 3D-структуры данного белка из различных видов бифидобактерий позволило обнаружить в них потенциальные цитокин-связывающие карманы. Полученные научные результаты помимо фундаментальной значимости представляют большой практический интерес (Alekseeva et al., 2019).

Различные виды бифидобактерий потенциально могут быть источником белков, селективно связывающихся и про- и противовоспалительными цитокинами человека. Это открывает огромные возможности для создания панели препаратов белков, способных регулировать уровень цитокинов в различных органах и тканях человека, подвергшегося воспалительным процессам.

COVID-19 и его последствия

Пандемия COVID-19 мобилизовала научное сообщество, бизнес и государственные структуры всего мира на разработку вакцин и лекарственных препаратов, способных ее остановить и уменьшить социально-экономические последствия ее воздействия (<https://covid19.nhp.gov.in/>) (Wilén et al., 2020). Несмотря на успехи в разработке и применении вакцин, количество заболевших продолжает увеличиваться. Очень тревожными являются данные о высоком риске проявления заболеваний различной этиологии у переболевших. В первую очередь это касается неврологических заболеваний (Li Y. C. et al., 2020; Baig et al., 2020). Их уже окрестили как NEUROCOVID-19. Ведутся интенсивные поиски причин и механизмов, приводящих к неврологическим заболеваниям, таким как паркинсонизм и депрессивные со-

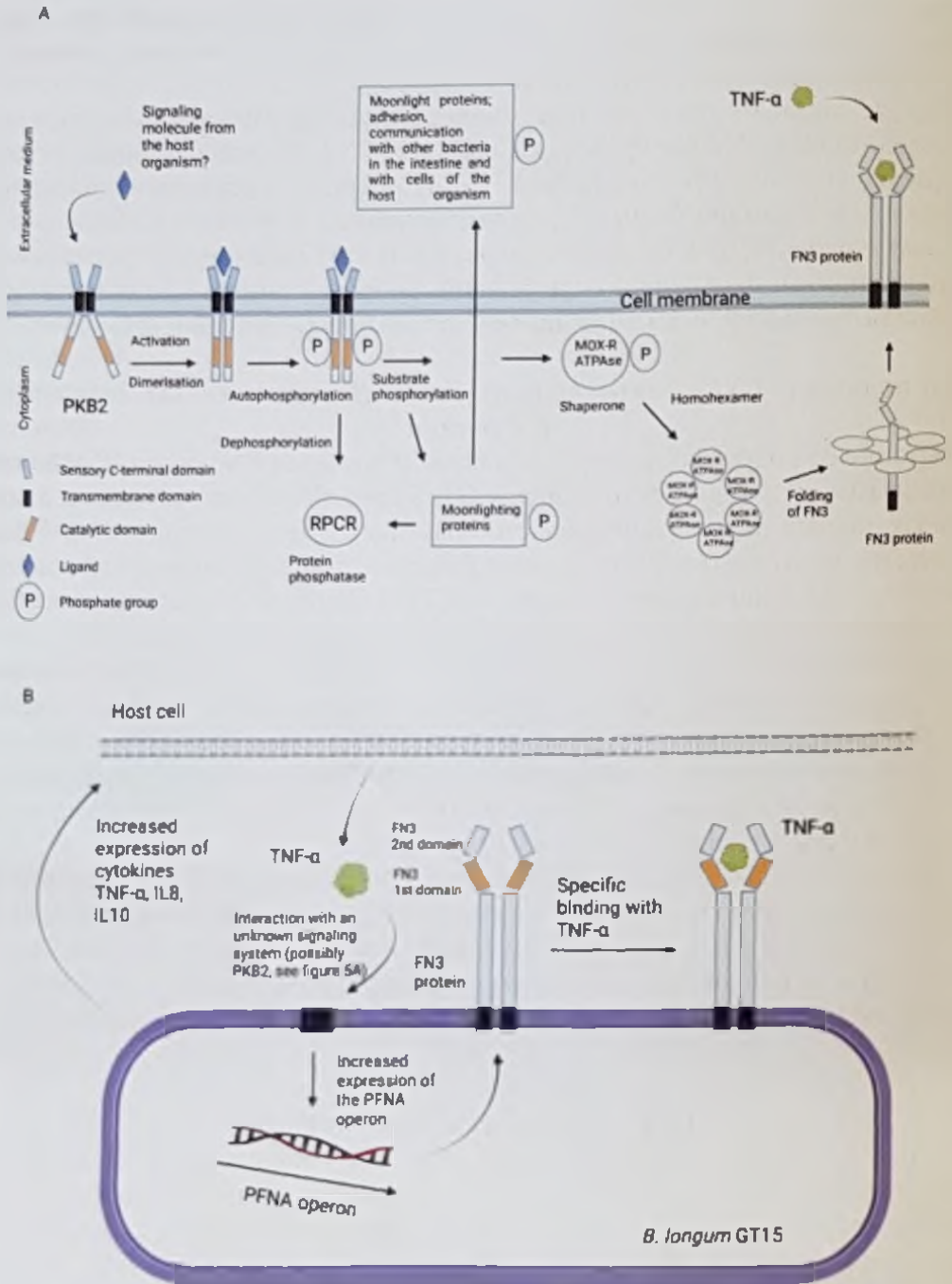
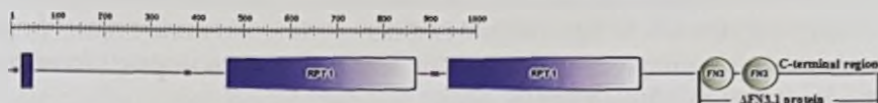


Рис. 7. Гипотетическое схематическое изображение роли оперона PFNA во взаимодействии бифидобактерий с иммунной системой хозяина (А) Активация сигнальной системы PKB2. Серин-треониновая протеинкиназа (PKB2), следующая его активация неизвестным лигандом, аутофосфорилатами и фосфорилированием других субстратов. (Б) Штамм *B. longum* GT15 увеличивает экспрессию цитокинов TNF- α , IL8 и IL10 в клетках человека (Nezametdinova V.Z. et al., 2021)

A

С помощью Программы SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)



Размер белка – 1994 а.а.

Доменная структура белка:

- Сигнальный пептид - 1-45 а.а;
- Трансформированный регион - 19-31 а.а;
- Регион RPT1 (1) – 468-885 а.а;
- Регион RPT1 (2) – 951-1373 а.а;
- Регион FN3 (1) – 1494-1581 а.а;
- Регион FN3 (2) – 1586-1671 а.а.

RT1 (internal repeat 1) — это внутренние повторы, обнаруженные программой Prodigal. Гомология между RT1 (1) и RT1 (2) у штамма *B. longum* GT15 высокая и составляет: идентичность 21,7%, сходство 34,2%.

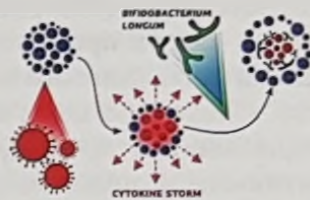
Сходство с повторами из FN3 белков других видов бифидобактерий 76-77%.

Белок ΔFN3.1 – 1494-1994 а.а.

С-терминальный регион – 1672-1994 а.а.

Мотивы цитоклинового взаимодействия в FN3 (1) и FN3 (2):

- У FN3-белка штамма *B. longum* GT15: WSXPS и WXXES;
- У FN3-белка штамма *B. bifidum* 791: WSXPS и EGXPS;
- У FN3-белка штамма *B. angulatum* GT102: WSXYV и SGXQA.



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

B

ΔFN3.1 *B. longum* GT15

ΔFN3.1 *B. bifidum* 791

ΔFN3.1 *B. angulatum* GT102



Рис. 8. (A) Структура и функции FN3 белка PFNA оперона штамма *B. longum subsp. longum* GT15. (B) Предсказание 3D структур ΔFN3.1 белков бифидобактерий с помощью программы trRosetta (Alekseeva et al.)

стояния. Важное участие в этих процессах отводится недавно открытому, виртуальному органу — микробиому кишечника человека. Микробиом, населенный сотнями видов симбиотических бактерий, находящихся в динамичном равновесии, как внутри собственной структуры, так и с организмом хозяина, интегрирует взаимодействие сигналов внешней среды, других органов человека и передает эту информацию в ЦНС (мозг) (Ma Q. et al., 2019; Fung T. C., 2020; Averina et al., 2021).

Установлено, что при инфекции SARS-CoV-2 часто наблюдается изменение состава микробиома, характеризующееся как дисбактериоз (Gu S. et al., 2020; Tao W. et al., 2020; Yamamoto et al., 2021). Персистирующий после заболевания COVID-19, дисбактериоз может быть фактором мультисистемного воспалительного синдрома. Хорошо известно, что микробиом кишечного

тракта способен синтезировать комплекс веществ с нейромодулирующей, иммуномодулирующей и противовоспалительной активностью, формируя показатели, характеризующие состояние микробиома в норме (Averina et al., 2021; Danilenko et al., 2021).

Пандемия COVID-19 стимулировала нашу междисциплинарную команду исследователей рассматривать возможности использовать уже имеющиеся наработки для их применения по новому назначению, а именно для регулирования цитокинового «шторма» и снятия последствий оксидативного стресса. Сделанное нами открытие способности FN3 белка, содержащего фибронектиновые домены, активно связывать цитокин TNF- α , может быть эффективным и оптимальным решением для нейтрализации цитокинового «шторма» (Dyakov et al., 2020; Veselovsky et al., 2020). Есть основание полагать, что FN3 белки из других видов бактерий будут селективно связывать другие провоспалительные и противовоспалительные цитокины (Dyakov et al., 2020; Veselovsky et al., 2020). На наш взгляд, большим успехом является обнаружение уникального штамма *L. fermentum* U-21, обладающим комплексом антиоксидантных свойств (Marsova et al., 2018; Marsova et al., 2020a; Marsova et al., 2020b). Препарат «Лактоантивир», на основе этого штамма, первоначально продвигался и исследовался на моделях паракват индуцируемого паркинсонизма. Сходство процессов и механизмов, лежащих в основе воспалительных процессов паркинсонизма и вирусных инфекций, включая COVID-19 (Averina et al., 2021), позволяет его позиционировать как препарат снимающий оксидативный стресс (Danilenko et al., 2018; Danilenko et al., 2019; Danilenko et al., 2020; Danilenko et al., 2021b).

В основе разработки перечисленных препаратов лежат успехи, достигнутые в последние годы в области изучения микробиома человека. Сегодня микробиом человека и животных рассматривается как источник генетических ресурсов и фармабиотиков для фармацевтики, ветеринарии и фарманутриентов для лечебного питания (<https://www.microbiometimes.com/drug-database-2/>). Все это особо важно в свете необходимости лечения и реабилитации населения в постковидную эру (Dyakov et al., 2020; Veselovsky et al., 2020).

Нутригеномика микробиома: глобальная перспектива профилактики и лечения системных воспалительных процессов

В последние годы рождается новое междисциплинарное направление в науке «Нутригеномика микробиома». Импульсом к формированию и последующему развитию направления послужили следующие результаты: конкретизированы биологически активные ингредиенты микробиома человека, как объекта исследований и компоненты персонализированных продуктов: пребиотики, парабиотики, постбиотики и автопробиотики; сложилось их классификационное разделение на основе функциональных свойств

— иммуномоделирующие, нейромоделирующие и антиоксидантные; установлено влияние биологически активных ингредиентов на транскрипционную, протеомную и метаболомную активность определенных групп генов; выявлены глобальные регуляторные гены, значимые регуляторные системы клеток организма человека, воспринимающие иммуномоделирующую, нейромоделирующую и антиоксидантную активность конкретных биологически активных ингредиентов; получены данные, указывающие на значимую роль пробиотиков, парапробиотиков, постбиотиков и автопробиотиков в коррекции состава микробиома и сигнатуры композиции определенных генов и штаммов бактерий их содержащих; разрабатываются препараты фармабиотиков с заданными характеристиками: психобиотики, иммунобиотики, антиоксибиотики. Глобальные успехи в области изучения микробиома человека и переход от классических пробиотиков — БАДов к фармабиотикам — полноценным лекарственным препаратам, безопасным и с известными механизмами действия, открывает новые горизонты в персонализированной медицине (<https://www.microbiometimes.com/drug-database-2/>).

Пандемия COVID-19 и ее последствия, коснувшись сотен миллионов людей, требуют скорейших мер по реабилитации переболевшего населения. Последствия COVID-19 для десятков миллионов переболевших людей до конца не изучены научным сообществом, не осознаны обществом и государственным структурами, призванными этим заниматься. Наиболее очевидные и значимые это неврологические заболевания, включая депрессивные состояния (Averina et al., 2021, Poluektova et al. 2021, Danilenko et al., 2021). В более широком плане, эти заболевания, сопровождающиеся дисбиозом микробиом и системными воспалительными процессами организма (Averina et al., 2021). Современные препараты на основе лактобацилл с антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами, в том числе в качестве ингредиентов функциональных продуктов питания, крайне необходимы в этой реабилитации.

Федеральный закон № 492-ФЗ от 30 декабря 2020 года требует принятия неотложных мер по реализации его основных положений. В законе дано определение микробиоты (микробиома) как важнейшего объекта (органа), требующего изучения и защиты. В статье 8.5 закон относит к основным биологическим угрозам нарушение нормальной микробиоты человека, приводящее к возникновению и распространению связанных с этим заболеваний. К таким социально значимым заболеваниям относятся инфекционные и онкологические заболевания. Микро-, макроэкологические и социальные факторы, воздействующие на организм человека (стрессы, неконтролируемое применение антибиотиков, загрязненные канцерогенами и ксенобиотиками продукты питания и др.) приводят к изменению (дисбактериозу) микробиома. Сегодня хорошо установлено, что изменение композиции микробиома приводит к снижению иммунного и антиоксидантного потенциала организма человека и, как следствие, к снижению устойчивости к инфекционным заболеваниям, включая COVID-19, и пониженной эффективности применения

лекарственных препаратов, в том числе при онкоиммуноterapiи. Экология человека, стрессы, иммунитет — все это завязано на нормальное функционирование нового виртуального органа — микробиом кишечника человека.

Микробиом ЖКТ человека — двуликый Янус, с одной стороны содержащий симбиотические бактерии, например, лакто и бифидобактерии, способные продуцировать биологически активные вещества, поддерживающие гомеостаз организма и здоровье человека, с другой стороны резервуар генов лекарственной устойчивости и патогенности. Определение параметров, характеризующих микробиом в норме, в настоящее время только формируется. Российские ученые принимают в этом активное участие. В законе о биологической безопасности четко указано для чего следует изучать биологическое (генетическое) разнообразие микробиома:

1. Обеспечение научных исследований микробиоты и ее влияние на состояние здоровья человека.

2. Разработка средств и методов профилактики, диагностики и лечения заболеваний, связанных с нарушениями нормальной работы микробиоты.

3. Использование генетического и биохимического потенциала микробиоты человека при разработке новых средств и биологических технологий, в том числе персонализированных продуктов питания и лекарственных препаратов.

Для работы в этом направлении в России по инициативе ИОГен РАН создан междисциплинарный консорциум «Нутригеномика микробиома». Нутригеномика — это наука, изучающая влияние биологически активных пищевых добавок на экспрессию генов человека и его здоровье, которая возникла 15–20 лет тому назад (Magnum, 2020). Интенсивное исследование микробиома человека и его роли в утилизации продуктов питания сегодня позволяет сформировать понятие «нутригеномика микробиома». Глобальной практической задачей данного направления науки должно быть формирование и реализация Проекта «фармакобионутриенты».

Заключение

Очевидно, что для успеха в разработке препаратов на основе микробиома кишечника человека с нейромодулирующей, иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью необходимо расширить и концептуально обосновать научную базу использования микробиома человека, животных и растений в качестве источника фармакологически активных ингредиентов с иммуномодулирующей, антиоксидантной, нейромодулирующей активностью и другими полезными свойствами. Необходимо получение новых знаний о композиции генов и бактерий микробиома, определяющих иммуномодулирующую и антиоксидантную активность.

В течение последнего десятилетия в лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН разработаны биоинформатические алгоритмы анализа метамикробиома кишечника и сформирована концепция поиска в микробиоте

редких штаммов бактерий с помощью комбинаций заданных генов. Создан каталог ортологов бактериальных генов, продукты которых обладают иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью и алгоритм использования для биоинформатической идентификации в метагеномах кишечника штаммов комменсальных бактерий, содержащих комбинации заданных генов. Выявлена коровая метагенная сигнатура кишечной микробиоты здорового человека, отражающая нейромодулирующий, иммуномодулирующий и антиоксидантный потенциал. Разработаны подходы для выделения и культивирования штаммов комменсальных анаэробных бактерий кишечной микробиоты с потенциальными свойствами фармабиотиков. Создан биобанк образцов микробиоты и коллекция штаммов потенциальных фармабиотиков для последующего использования в научных и практических целях. Получены штаммы фармабиотиков и данные об их белках, пептидах и ферментах с иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами, отобранные с использованием подходов сравнительного геномного, транскриптомного и протеомного анализов. Проверены иммуномодулирующие и антиоксидантные свойства отобранных штаммов и их ингредиентов, проверенные на адекватных системах клеточных культур и лабораторных животных. Разработаны принципиально новые и инновационные технологии создания фармакологически активных компонентов на основе микробиома здоровых людей. Отобраны кандидаты для иммуномодулирующих и антиоксидантных препаратов с противовоспалительной, иммуномодулирующей и нейромодулирующей активностью, предназначенные для реабилитации пациентов, переболевших COVID-19. Проведены клинические исследования отобранных препаратов и организовано опытно-промышленное производство фармабиотиков.

Список использованных источников

1. Achuthan, A. A., Duary, R. K., Madathil, A., Panwar, H., Kumar, H., Batish, V. K., et al., 2012. Antioxidative potential of lactobacilli isolated from the gut of Indian people. *Molecular Biology Reports* 39 (8), 7887-7897. doi: 10.1007/s11033-012-1633-9.
2. Akour, A., 2020. Probiotics and COVID-19: is there any link? *Lett Appl Microbiol* 71 (3), 229-234. doi: 10.1111/lam.13334.
3. Alekseeva, M. G., Boyko, K. M., Nikolaeva, A. Y., Mavletova, D. A., Rudakova, N. N., Zakharevich, N. V., et al., 2019. Identification, functional and structural characterization of novel aminoglycoside phosphotransferase APH(3 ϕ)-Id from *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 671, 111-122. doi: 10.1016/j.abb.2019.06.008.
4. Al-Hassi, H. O., Mann, E. R., Sanchez, B., English, N. R., Peake, S. T. C., Landy, J., et al., 2014. Altered human gut dendritic cell properties in ulcerative colitis are reversed by *Lactobacillus plantarum* extracellular encrypted peptide STp. *Molecular Nutrition & Food Research* 58 (5), 1132-1143. doi: 10.1002/mnfr.201300596.
5. Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., Bordoni, A., 2013. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Appl Microbiol*

Biotechnol 97 (2), 809-17. doi: 10.1007/s00253-012-4241-7.

6. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., et al., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473 (7346), 174-180. doi: 10.1038/nature09944.

7. Averina, O., Alekseeva, M., Shkorporov, A., Danilenko, V., 2015. Functional analysis of the type II toxin antitoxin systems of the MazEF and Rein families in *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* ATCC 15697. *Anaerobe* 35, 59-67. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.07.007.

8. Averina, O. V., Danilenko, V. N., 2017. Human intestinal microbiota: role in development and functioning of the nervous system. *Microbiology* 86 (1), 1-18. doi: 10.1134/S0026261717010040.

9. Averina, O. V., Kovtun, A. S., Polyakova, S. I., Savilova, A. M., Rebrikov, D. V., Danilenko, V. N., 2020. The bacterial neurometabolic signature of the gut microbiota of young children with autism spectrum disorders. *Journal of Medical Microbiology* 69 (4), 558-571. doi: 10.1099/jmm.0.001178.

10. Averina, O. V., Poluektova, E. U., Marsova, M. V., Danilenko, V. N., 2021. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* as representatives of the human gut microbiota. *Biomedicines* 9 (10), 1340. doi: 10.3390/biomedicines9101340.

11. Azcarate-Peril, M. A., Sikes, M., Bruno-Barcena, J. M., 2011. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301 (3), G401-24. doi: 10.1152/ajpgi.00110.2011.

12. Baig, A. M., Khaleeq, A., Ali, U., Syeda, H., 2020. Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. *ACS Chem Neurosci* 11 (7), 995-998. doi: 10.1021/acscemneuro.0c00122.

13. Belkaid, Y., Harrison, O. J., 2017. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* 46 (4), 562-576. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.008.

14. Belkina, T. V., Averina, O. V., Savenkova, E. V., Danilenko, V. N., 2021. Human intestinal microbiome and the immune system: the role of probiotics in shaping an immune system unsusceptible to COVID-19 infection. *Biology Bulletin Reviews* 11 (4), 523-539. doi: 10.1134/S2079086421040034.

15. Bernardo, D., Sanchez, B., Al-Hassi, H. O., Mann, E. R., Urdaci, M. C., Knight, S. C., et al., 2012. Microbiota/host crosstalk biomarkers: regulatory response of human intestinal dendritic cells exposed to *Lactobacillus* extracellular encrypted peptide. *PloS one* 7 (5), e36262. doi: 10.1371/journal.pone.0036262.

16. Blanco-Miguez, A., Gutierrez-Jacome, A., Fdez-Riverola, F., Lourenco, A., Sanchez, B., 2017. MAHMI database: a comprehensive MetaHit-based resource for the study of the mechanism of action of the human microbiota. *Database : the journal of biological databases and curation* 2017, baw157. doi: 10.1093/database/baw157.

17. Blumberg, R., Powrie, F., 2012. Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey. *Sci Transl Med* 4 (137), 137rv7. doi: 10.1126/scitranslmed.3004184.

18. Bozkurt, H. S., Quigley, E. M., 2020. The probiotic *Bifidobacterium* in the management of Coronavirus: A theoretical basis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 34, 2058738420961304. doi: 10.1177/2058738420961304.

19. Caspi, A., Moffitt, T. E., 2018. All for One and One for All: Mental Disorders in One Dimension. *American Journal of Psychiatry* 175 (9), 831-844. doi: 10.1176/appi.ajp.2018.17121383.

20. Catanzaro, M., Fagiani, F., Racchi, M., Corsini, E., Govoni, S., Lanni, C., 2020. Immune

response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Signal Transduct Target Ther* 5 (1), 84. doi: 10.1038/s41392-020-0191-1.

21. Chiu, C. Y., Miller, S. A., 2019. Clinical metagenomics. *Nature Reviews Genetics* 20 (6), 341-355. doi: 10.1038/s41576-019-0113-7.

22. Dang, A. T., Marsland, B. J., 2019. Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. *Mucosal Immunology* 12 (4), 843-850. doi: 10.1038/s41385-019-0160-6.

23. Danilenko, V. N., Devyatkin, A. V., Marsova, M. V., Shibilova, M. U., Ilyasov, R. A., Shmyrev, V. I., 2021b. Common inflammatory mechanisms in COVID-19 and Parkinson's diseases: the role of microbiome and probiotics in their prevention. *Journal of Inflammation Research* 14, (In press). doi: 10.2147/JIR.S333887.

24. Danilenko, V. N., Marsova, M. V., Poluektova, E. U., 2019a. The use of cells of the *Lactobacillus fermentum* U-21 strain and biologically active substances obtained from them. Patent No. 2019141103/20 (080350) by 11.12.2019, 1-24.

25. Danilenko, V. N., Marsova, M. V., Poluektova, E. U., 2019b. The use of cells of the *Lactobacillus fermentum* U-21 strain for the prevention of pathological changes in tissues caused by oxidative stress. Patent No. 2757118 by 11.12.2019, 1-16.

26. Danilenko, V. N., Marsova, M. V., Poluektova, E. U., 2021a. The use of cells of the strain *Lactobacillus fermentum* U-21 and biologically active substances obtained from them. Patent No. RU2019141103A by 11.06.2021, 1-26.

27. Danilenko, V. N., Marsova, M. V., Poluektova, E. U., Odorskaya, M. V., Yunes, R. A., 2018. *Lactobacillus fermentum* U-21 strain, which produces complex of biologically active substances which neutralize superoxide anion induced by chemical agents. Patent No. 2705250 by 05.02.2018, 1-16.

28. Danilenko, V. N., Stavrovskaya, A. V., Voronkov, D., Gushchina, A. S., Marsova, M., Yamshchikova, N. G., et al., 2020. The use of a probiotic based on the *Lactobacillus fermentum* U-21 strain to modulate the neurodegenerative process in an experimental model of Parkinson's disease. *Annals of Clinical and Experimental Neurology* 14, 62-69. doi: 10.25692/ACEN.2020.1.7.

29. Delgado, B., Bach, A., Guasch, I., Gonzalez, C., Elcoso, G., Pryce, J.E., et al., 2020. Whole rumen metagenome sequencing allows classifying and predicting feed efficiency and intake levels in cattle (vol 9, 11, 2019). *Scientific Reports* 10 (1), 2875. doi: 10.1038/S41598-020-60003-8.

30. Dias, V., Junn, E., Mouradian, M. M., 2013. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease* 3 (4), 461-491. doi: 10.3233/jpd-130230.

31. Diaz-Ropero, M. P., Martin, R., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Rodriguez, J. M., Xaus, J., et al., 2007. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *Journal of Applied Microbiology* 102 (2), 337-343. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03102.x.

32. Dumas, A., Bernard, L., Poquet, Y., Lugo-Villarino, G., Neyrolles, O., 2018. The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cellular microbiology* 20 (12), e12966. doi: 10.1111/cmi.12966.

33. Dyakov, I. N., Mavletova, D. A., Chernyshova, I. N., Snegireva, N. A., Gavrilova, M. V., Bushkova, K. K., et al., 2020. FN3 protein fragment containing two type III fibronectin domains from *B. longum* GT15 binds to human tumor necrosis factor alpha in vitro. *Anaerobe* 65, 102247. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102247.

34. Eggestol, H. O., Lunde, H. S., Haugland, G. T., 2020. The proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-6 in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) -identification, molecular characterization, phylogeny and gene expression analyses. *Dev Comp Immunol* 105, 103608. doi: 10.1016/j.

doi.2020.103608.

35. Evans, J. M., Morris, L. S., Marchesi, J. R., 2013. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *The Journal of Endocrinology* 218 (3), R37-47. doi: 10.1530/JOE-13-0131.
36. Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., et al., 2016. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 352 (6285), 560-564. doi: 10.1126/science.1230350.
37. Fedorova, I. A., Danilenko, V. N., 2014. Immunogenic properties of a probiotic component of the human gastrointestinal tract microbiota. *Biology Bulletin Reviews* 4 (6), 457-466.
38. Firuzi, O., Miri, R., Tavakkoli, M., Saso, L., 2011. Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects. *Current Medicinal Chemistry* 18 (25), 3871-3888. doi: 10.2174/092986711803414368.
39. Florindo, H. F., Kleiner, R., Vaskovich-Koubi, D., Acurcio, R. C., Carreira, B., Yeini, E., et al., 2020. Immune-mediated approaches against COVID-19. *Nature Nanotechnology* 15 (8), 630-645. doi: 10.1038/s41565-020-0732-3.
40. Fung, T. C., 2020. The microbiota-immune axis as a central mediator of gut-brain communication. *Neurobiology of Disease* 136, 104714. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104714.
41. Gilbert, J. A., Quinn, R. A., Debelius, J., Xu, Z. Z., Morton, J., Garg, N., et al., 2016. Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature* 535 (7610), 94-103. doi: 10.1038/nature18850.
42. Gorska, S., Dylus, E., Rudawska, A., Brzozowska, E., Srutkova, D., Schwarzer, M., et al., 2016. Immunoreactive Proteins of *Bifidobacterium longum* ssp *longum* CCM 7952 and *Bifidobacterium longum* ssp *longum* CCDM 372 Identified by Gnotobiotic Mono-Colonized Mice Sera, Immune Rabbit Sera and Non-immune Human Sera. *Frontiers in Microbiology* 7, 1537. doi: 10.3389/fmicb.2016.01537.
43. Gu, S., Chen, Y., Wu, Z., Chen, Y., Gao, H., Lv, L., et al., 2020. Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza. *Clin Infect Dis* 71 (10), 2669-2678. doi: 10.1093/cid/ciaa709.
44. He, X., Slupsky, C. M., Dekker, J. W., Haggarty, N. W., Lonnerdal, B., 2016. Integrated Role of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Supplementation in Gut Microbiota, Immunity, and Metabolism of Infant Rhesus Monkeys. *mSystems* 1 (6), e00128-16. doi: 10.1128/mSystems.00128-16.
45. Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Sanchez, B., Margolles, A., 2017. *Bifidobacteria* and Their Health-Promoting Effects. *Microbiol Spectr* 5 (3), 1. doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016.
46. Hidalgo-Cantabrana, C., Sanchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P., 2014. Genomic Overview and Biological Functions of Exopolysaccharide Biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (1), 9-18. doi: 10.1128/Aem.02977-13.
47. Hirata, S.-I., Kunisawa, J., 2017. Gut microbiome, metabolome, and allergic diseases. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 66 (4), 523-528. doi: 10.1016/j.alit.2017.06.008.
48. Indirapriyadarsini, K., Raghunath, V., Naidu, B. V., Ramakrishna, B. B., Tangudu, A., Lokesh, K. V., 2018. Immunohistochemical expression of osteonectin, matrix metalloproteinases-9 and Ki-67 in ameloblastoma. *J Oral Maxillofac Pathol* 22 (3), 446. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_271_17.
49. Jabczyk, M., Nowak, J., Hudzik, B., Zubelewicz-Szkodzinska, B., 2021. Diet, Probiotics and

Their Impact on the Gut Microbiota during the COVID-19 Pandemic. *Nutrients* 13 (9), 3172. doi: 10.3390/Nu13093172.

50. Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Nageshwar Reddy, D., 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 21 (29), 8787-8803. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.

51. Jin, X., Lian, J. S., Hu, J. H., Gao, J. B., Zheng, L., Zhang, Y. M., et al., 2020. Epidemiological, clinical and virological characteristics of 74 cases of coronavirus-infected disease 2019 (COVID-19) with gastrointestinal symptoms. *Gut* 69 (6), 1002-1009. doi: 10.1136/gutjnl-2020-320926.

52. Jung, K.-A., Kwak, M.-K., 2010. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* 15 (10), 7266-7291. doi: 10.3390/molecules15107266.

53. Kamiya, T., Watanabe, M., Hara, H., Mitsugi, Y., Yamaguchi, E., Itoh, A., et al., 2018. Induction of Human-Lung-Cancer-A549-Cell Apoptosis by 4-Hydroperoxy-2-decenoic Acid Ethyl Ester through Intracellular ROS Accumulation and the Induction of Proapoptotic CHOP Expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (41), 10741-10747. doi: 10.1021/acs.jafc.8b04424.

54. Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K., 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of molecular biology* 428 (4), 726-731. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006.

55. Karmarkar, D., Rock, K. L., 2013. Microbiota signalling through MyD88 is necessary for a systemic neutrophilic inflammatory response. *Immunology* 140 (4), 483-92. doi: 10.1111/imm.12159.

56. Kovtun, A. S., Averina, O. V., Zakharevich, N. V., Kasianov, A. S., Danilenko, V. N., 2018. In silico Identification of Metagenomic Signature Describing Neurometabolic Potential of Normal Human Gut Microbiota. *Russian Journal of Genetics* 54 (9), 1101-1110. doi: 10.1134/S1022795418090089.

57. Kullisaar, T., Songisepp, E., Zilmer, M., 2012. Probiotics and oxidative stress. In: Lushchak, V. ed. *Oxidative stress — environmental induction and dietary antioxidants*. IntechOpen, London, UK, pp. 203-222. isbn: 978-953-51-0553-4.

58. Laudadio, I., Fulci, V., Stronati, L., Carissimi, C., 2019. Next-Generation Metagenomics: Methodological Challenges and Opportunities. *Omics-a Journal of Integrative Biology* 23 (7), 327-333. doi: 10.1089/omi.2019.0073.

59. Levy, M., Blacher, E., Elinav, E., 2017. Microbiome, metabolites and host immunity. *Current opinion in microbiology* 35, 8-15. doi: 10.1016/j.mib.2016.10.003.

60. Li, Y. C., Bai, W. Z., Hashikawa, T., 2020. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *J Med Virol* 92 (6), 552-555. doi: 10.1002/jmv.25728.

61. Lyte, M., 2014. Microbial endocrinology and the microbiota-gut-brain axis. *Advances in experimental medicine and biology* 817, 3-24. doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_1.

62. Ma, Q., Xing, C., Long, W., Wang, H. Y., Liu, Q., Wang, R. F., 2019. Impact of microbiota on central nervous system and neurological diseases: the gut-brain axis. *J Neuroinflammation* 16 (1), 53. doi: 10.1186/s12974-019-1434-3.

63. Mackowiak, P. A., 2013. Recycling metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in public health* 1, 52. doi: 10.3389/fpubh.2013.00052.

64. Marchesi, J. R., Ravel, J., 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31. doi: 10.1186/s40168-015-0094-5.

65. Marcum, J. A., 2020. Nutrigenetics/Nutrigenomics, Personalized Nutrition, and Precision Healthcare. *Current Nutrition Reports* 9 (4), 338-345. doi: 10.1007/s13668-020-00327-z.
66. Marsova, M., Abilev, S., Poluektova, E., Danilenko, V., 2018. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of *Lactobacillus* strains from human microbiota. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 34 (2), 27. doi: 10.1007/s11274-018-2410-2.
67. Marsova, M., Odorskaya, M., Novichkova, M., Polyakova, V., Abilev, S., Kalinina, E., et al., 2020b. The *Lactobacillus brevis* 47 f Strain Protects the Murine Intestine from Enteropathy Induced by 5-Fluorouracil. *Microorganisms* 8 (6), 876. doi: 10.3390/microorganisms8060876.
68. Marsova, M., Poluektova, E., Odorskaya, M., Ambaryan, A., Revishchin, A., Pavlova, G., et al., 2020a. Protective effects of *Lactobacillus fermentum* U-21 against paraquat-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* and mouse models. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 36 (7), 104. doi: 10.1007/s11274-020-02879-2.
69. Martin, C. R., Osadchiy, V., Kalani, A., Mayer, E. A., 2018. The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 6 (2), 133-148. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.04.003.
70. Mehta, P., Mcauley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., Manson, J. J., 2020. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet* 395 (10229), 1033-1034. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
71. Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., Prajapati, J., 2015. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (14), 3615-3626. doi: 10.1021/jf506326t.
72. Munoz-Quezada, S., Chenoll, E., Vieites, J. M., Genoves, S., Maldonado, J., Bermudez-Brito, M., et al., 2013. Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *Br J Nutr* 109 Suppl 2, S51-62. doi: 10.1017/S0007114512005211.
73. Nezametdinova, V. Z., Yunes, R. A., Dukhinova, M. S., Alekseeva, M. G., Danilenko, V. N., 2021. The role of the PFNA operon in the recognition of host's immune signals: prospects for the use of the FN3 protein in the treatment of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 9219. doi: 10.3390/ijms22179219.
74. Ng, S. C., Tilg, H., 2020. COVID-19 and the gastrointestinal tract: more than meets the eye. *Gut* 69 (6), 973-974. doi: 10.1136/gutjnl-2020-321195.
75. Nowak, A., Paliwoda, A., Blasiak, J., 2018. Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: a review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59 (21), 3456-3467. doi: 10.1080/10408398.2018.1494539.
76. O'leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Mcveigh, D. H. R., Rajput, B., et al., 2016. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research* 44 (D1), D733-D745. doi: 10.1093/nar/gkv1189.
77. O'toole, P. W., Marchesi, J. R., Hill, C., 2017. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature Microbiology* 2 (5), 17057. doi: 10.1038/Nmicrobiol.2017.57.
78. Ottman, N., Geerlings, S. Y., Aalvink, S., De Vos, W. M., Belzer, C., 2017. Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease. *Best practice & re-*

search *Clinical gastroenterology* 31 (6), 637-642. doi: 10.1016/j.bpg.2017.10.001.

79. Patterson, E., Cryan, J. F., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Dinan, T. G., Stanton, C., 2014. Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. *The Proceedings of the Nutrition Society* 73 (4), 477-89. doi: 10.1017/S0029665114001426.

80. Poluektova, E., Yunes, R., Danilenko, V., 2021. The Putative Antidepressant Mechanisms of Probiotic Bacteria: Relevant Genes and Proteins. *Nutrients* 13 (5), 1591. doi: 10.3390/Nu13051591.

81. Rao, M., Gershon, M. D., 2016. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 13 (9), 517-528. doi: 10.1038/nrgastro.2016.107.

82. Rios-Covian, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De Los Reyes-Gavilan, C. G., Salazar, N., 2016. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in Microbiology* 7, 185. doi: 10.3389/Fmicb.2016.00185.

83. Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S., 2011. Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients* 3 (1), 118-134. doi: 10.3390/nu3010118.

84. Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., et al., 2011. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science (New York, N.Y.)* 332 (6032), 974-7. doi: 10.1126/science.1206095.

85. Ruiz, L., Hidalgo, C., Blanco-Miguez, A., Lourenco, A., Sanchez, B., Margolles, A., 2016. Tackling probiotic and gut microbiota functionality through proteomics. *Journal of proteomics* 147, 28-39. doi: 10.1016/j.jprot.2016.03.023.

86. Saadat, Y. R., Khosroushahi, A. Y., Gargari, B. P., 2019. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 217, 79-89. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.025.

87. Saeedi, B. J., Liu, K. H., Owens, J. A., Hunter-Chang, S., Camacho, M. C., Eboka, R. U., et al., 2020. Gut-Resident Lactobacilli Activate Hepatic Nrf2 and Protect Against Oxidative Liver Injury. *Cell Metab* 31 (5), 956-968 e5. doi: 10.1016/j.cmet.2020.03.006.

88. Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., et al., 2021. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18 (9), 649-667. doi: 10.1038/s41575-021-00440-6.

89. Shimizu, K., Ojima, M., Ogura, H., 2021. Gut Microbiota and Probiotics/Synbiotics for Modulation of Immunity in Critically Ill Patients. *Nutrients* 13 (7), 2439. doi: 10.3390/Nu13072439.

90. Sies, H., Jones, D. P., 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21 (7), 363-383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.

91. Singh, K., Rao, A., 2021. Probiotics: A potential immunomodulator in COVID-19 infection management. *Nutrition Research* 87, 1-12. doi: 10.1016/j.nutres.2020.12.014.

92. Soret, P., Vandenborgh, L. E., Francis, F., Coron, N., Enaud, R., Avalos, M., et al., 2020. Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *Scientific Reports* 10 (1), 3589. doi: 10.1038/S41598-020-60015-4.

93. Sun, M.-F., Zhu, Y.-L., Zhou, Z.-L., Jia, X.-B., Xu, Y.-D., Yang, Q., et al., 2018. Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- α signaling pathway. *Brain, Behavior, and Immunity* 70, 48-60. doi: 10.1016/j.bbi.2018.02.005.

94. Tang, W., Xing, Z., Li, C., Wang, J., Wang, Y., 2017. Molecular mechanisms and in vitro an-

tioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. *Food Chemistry* 221, 1642-1649. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.124.

95. Tao, W., Zhang, G., Wang, X., Guo, M., Zeng, W., Xu, Z., et al., 2020. Analysis of the intestinal microbiota in COVID-19 patients and its correlation with the inflammatory factor IL-18. *Med Microecol* 5, 100023. doi: 10.1016/j.medmic.2020.100023.

96. Thorburn, A. N., Macia, L., Mackay, C. R., 2014. Diet, metabolites, and «western-lifestyle» inflammatory diseases. *Immunity* 40 (6), 833-42. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.014.

97. Turrone, F., Serafini, F., Foroni, E., Duranti, S., Motherway, M.O., Taverniti, V., et al., 2013. Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (27), 11151-11156. doi: 10.1073/pnas.1303897110.

98. Tyagi, A., Singh, B., Billekallu Thammegowda, N. K., Singh, N. K., 2019. Shotgun metagenomics offers novel insights into taxonomic compositions, metabolic pathways and antibiotic resistance genes in fish gut microbiome. *Archives of microbiology* 201 (3), 295-303. doi: 10.1007/s00203-018-1615-y.

99. Valles-Colomer, M., Falony, G., Darzi, Y., Tigchelaar, E. F., Wang, J., Tito, R. Y., et al., 2019. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nature microbiology* 4 (4), 623-632. doi: 10.1038/s41564-018-0337-x.

100. Varsha, K. K., Maheshwari, A. P., Nampoothiri, K. M., 2021. Accomplishment of probiotics in human health pertaining to immunoregulation and disease control. *Clinical Nutrition Espen* 44, 26-37. doi: 10.1016/j.clnesp.2021.06.020.

101. Venkatesh, R., Karunakaran, K., 2014. Oxidation of Aromatic Anils by Sodium Perborate in Aqueous Acetic Acid Medium. *Asian Journal of Chemistry* 26 (3), 739-744. doi: DOI 10.14233/ajchem.2014.15506.

102. Veselovsky, V. A., Dyachkova, M. S., Menyaylo, E. A., Polyayeva, P. S., Olekhovich, E. I., Shitikov, E. A., et al., 2020. Gene networks underlying the resistance of *Bifidobacterium longum* to inflammatory factors. *Frontiers in Immunology* 11, 595877. doi: 10.3389/fimmu.2020.595877.

103. Vijay, A., Valdes, A. M., 2021. Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review. *European Journal of Clinical Nutrition* 1 (1), 1. doi: 10.1038/s41430-021-00991-6.

104. Wanchao, S., Chen, M., Zhiguo, S., Futang, X., Mengmeng, S., 2018. Protective effect and mechanism of *Lactobacillus* on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 51 (7), e7172. doi: 10.1590/1414-431x20187172.

105. Wang, L. X., Liu, K., Gao, D. W., Hao, J. K., 2013. Protective effects of two *Lactobacillus plantarum* strains in hyperlipidemic mice. *World J Gastroenterol* 19 (20), 3150-6. doi: 10.3748/wjg.v19.i20.3150.

106. Wang, N., Song, G., Yang, Y., Yuan, W., Qi, M., 2017. Inactivated *Lactobacillus* promotes protection against myocardial ischemia-reperfusion injury through NF- κ B pathway. *Bioscience Reports* 37 (6), BSR20171025. doi: 10.1042/bsr20171025.

107. Watson, A. J. M., Hall, L. J., 2013. Regulation of host gene expression by gut microbiota. *Gastroenterology* 144 (4), 841-4. doi: 10.1053/j.gastro.2013.02.028.

108. Watson, J., 2013. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol* 3 (1), 120144. doi: 10.1098/rsob.120144.

109. Wilen, C. B., Trypsteen, W., Van Cleemput, J., Snippenberg, W. V., Gerlo, S., Vandekerckhove, L., 2020. On the whereabouts of SARS-CoV-2 in the human body: a systematic review. *PLOS*

Pathogens 16 (10), e1009037. doi: 10.1371/journal.ppat.1009037.

110. Wlodarska, M., Luo, C., Kolde, R., Dhennezel, E., Annand, J.W., Heim, C.E., et al., 2017. Indoleacrylic Acid Produced by Commensal Peptostreptococcus Species Suppresses Inflammation. *Cell Host Microbe* 22 (1), 25-37 e6. doi: 10.1016/j.chom.2017.06.007.

111. Xie, L., Zhang, L., Zhong, Y., Liu, N., Long, Y., Wang, S., et al., 2012. Profiling the meta-transcriptome of the protistan community in *Coptotermes formosanus* with emphasis on the ligno-cellulolytic system. *Genomics* 99 (4), 246-55. doi: 10.1016/j.ygeno.2012.01.009.

112. Yamamoto, S., Saito, M., Tamura, A., Prawisuda, D., Mizutani, T., Yotsuyanagi, H., 2021. The human microbiome and COVID-19: A systematic review. *PLoS One* 16 (6), e0253293. doi: 10.1371/journal.pone.0253293.

113. Yan, J., Yoon, H., Kumar, S., Ramanathan, M.P., Corbitt, N., Kutzler, M., et al., 2007. Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther* 15 (2), 411-21. doi: 10.1038/sj.mt.6300036.

114. Yang, T., Xu, C., 2017. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. *J Am Soc Nephrol* 28 (4), 1040-1049. doi: 10.1681/ASN.2016070734.

115. Zelante, T., Iannitti, R. G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., et al., 2013. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 39 (2), 372-85. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.003.

116. Zhu, F., Ju, Y. M., Wang, W., Wang, Q., Guo, R. J., Ma, Q. Y., et al., 2020. Metagenome-wide association of gut microbiome features for schizophrenia. *Nature Communications* 11 (1), 1612. doi: 10.1038/S41467-020-15457-9.