



Том № 2

6

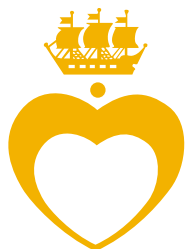
2022

РОССИЙСКИЙ ЖУРНАЛ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

RUSSIAN JOURNAL FOR PERSONALIZED MEDICINE

Главный редактор
Академик РАН
Шляхто Евгений Владимирович





Том № 2 | 6 | 2022

РОССИЙСКИЙ ЖУРНАЛ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

RUSSIAN JOURNAL FOR PERSONALIZED MEDICINE

Главный редактор
Академик РАН
Шляхто Евгений Владимирович

ОСНОВНЫЕ ТЕМАТИКИ (РУБРИКИ)

- Генетические риски и причины заболеваний
- Эпигенетика
- Биомаркеры болезни и здоровья
- Микробиота и антимикробная терапия
- Таргетная терапия заболеваний
- Фармакогенетика и фармакогеномика
- Генная терапия и технологии редактирования генома
- Искусственный интеллект и машинное обучение как инструмент персонализированной медицины



ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский
центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России

РОССИЙСКИЙ ЖУРНАЛ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР: Шлякто Е. В.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА: Конради А. О.

ОТВ. СЕКРЕТАРЬ: Пospelова М. Л.

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ

Бабенко А. Ю. (Санкт-Петербург)
Бухановский А. В. (Санкт-Петербург)
Вавилова Т. В. (Санкт-Петербург)
Васин А. В. (Санкт-Петербург)
Васичкина Е. С. (Санкт-Петербург)
Дмитриев А. В. (Санкт-Петербург)
Ильин И. В. (Санкт-Петербург)
Каприн А. Д. (Москва)
Копылов Ф. Ю. (Москва)
Максимов А. С. (Санкт-Петербург)
Мокрышева Н. Г. (Москва)
Омельяновский В. В. (Москва)
Пармон Е. В. (Санкт-Петербург)
Самочерных К. А. (Санкт-Петербург)
Секачева М. И. (Москва)
Созинов А. С. (Казань)
Стародубова А. В. (Москва)
Суворов А. Н. (Санкт-Петербург)
Сычев Д. А. (Москва)
Филаретова Л. П. (Санкт-Петербург)
Хатьков И. Е. (Москва)
Шевцов М. А. (Санкт-Петербург)
Шелудько В. Н. (Санкт-Петербург)
Jeroen J. Vax (Нидерланды)
Roberto Ferrari (Италия)
Michel Komajda (Франция)
Gilbert Massard (Люксембург)
Fausto J. Pinto (Португалия)
Panos Vardas (Греция)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Alberico Catapano (Италия)
Giuseppe Faggian (Италия)
Luigi Fontana (Австралия)
Omry Koren (Израиль)
Béla Merkely (Венгрия)
Mark Pitkin (США)
Noam Shomron (Израиль)
Petr Widimský (Чешская республика)
Гринева Е. Н. (Санкт-Петербург)
Дячук В. А. (Санкт-Петербург)
Закьян С. М. (Новосибирск)
Костарева А. А. (Санкт-Петербург)
Костик М. М. (Санкт-Петербург)
Малашичева А. Б. (Санкт-Петербург)
Моисеева О. М. (Санкт-Петербург)
Моисеенко В. М. (Санкт-Петербург)
Первунина Т. М. (Санкт-Петербург)
Попова П. В. (Санкт-Петербург)
Софронов Г. А. (Санкт-Петербург)
Ткачук В. А. (Москва)
Ульрих Е. А. (Санкт-Петербург)
Успенский В. Е. (Санкт-Петербург)
Чехонин В. П. (Москва)
Школьникова М. А. (Москва)
Янишевский С. Н. (Санкт-Петербург)

18+

Журнал зарегистрирован в Государственном
комитете РФ по печати.
Свидетельство о рег. ПИ № ФС77-80730
от 29 марта 2021 г.

Периодичность — 6 выпусков в год.
Тираж — 1100 экземпляров.

Тематическая рассылка по специалистам.

Верстка — Попова Л. П.
Корректурa — Медведева А. В.
Издатель: «ФОНД АЛМАЗОВА»

Адрес: 197341, Санкт-Петербург,
ул. Аккуратова, д. 2
Телефон издательства: + 7 (812) 702-37-16

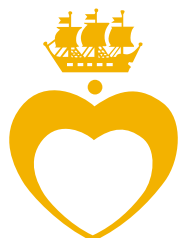
Подача рукописей и переписка с авторами,
размещение рекламы и подписка —
e-mail: pm@almazovcentre.ru

Подписка по каталогу агентства «Роспечать»:
подписной индекс 79638

Архив номеров: [http://www.almazovcentre.ru/
?page_id=78357](http://www.almazovcentre.ru/?page_id=78357)

Все права защищены. © 2022.

Полное или частичное воспроизведение
материалов, опубликованных в журнале,
допускается только с письменного
разрешения редакции.
Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных материалов.



Federal State Budgetary Institution
“Almazov National Medical Research Centre”
of the Ministry of Health of the Russian Federation

RUSSIAN JOURNAL FOR PERSONALIZED MEDICINE

CHIEF EDITOR: Prof. Evgeny Shlyakhto

DEPUTY CHIEF EDITOR: Alexandra Konradi

EXECUTIVE SECRETARY: Maria Pospelova

EDITORIAL BOARD

A. Yu. Babenko (St. Petersburg)
A. V. Bukhanovsky (St. Petersburg)
A. V. Dmitriev (St. Petersburg)
L. P. Filaretova (St. Petersburg)
I. V. Ilyin (St. Petersburg)
A. D. Kaprin (Moscow)
I. E. Khatkov (Moscow)
F. Yu. Kopylov (Moscow)
A. S. Maksimov (St. Petersburg)
N. G. Mokrysheva (Moscow)
V. V. Omelyanovskiy (Moscow)
E. V. Parmon (St. Petersburg)
K. A. Samochernykh (St. Petersburg)
M. I. Sekacheva (Moscow)
V. N. Sheludko (St. Petersburg)
M. A. Shevtsov (St. Petersburg)
A. S. Sozinov (Kazan)
A. V. Starodubova (Moscow)
A. N. Suvorov (St. Petersburg)
D. A. Sychev (Moscow)
E. S. Vasichkina (St. Petersburg)
A. V. Vasin (St. Petersburg)
T. M. Vavilova (St. Petersburg)
Jeroen J. Bax (Netherlands)
Roberto Ferrari (Italy)
Michel Komajda (France)
Gilbert Massard (Luxembourg)
Fausto J. Pinto (Portugal)
Panos Vardas (Greece)

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

Alberico Catapano (Italy)
Giuseppe Faggian (Italy)
Luigi Fontana (Austria)
Omry Koren (Israel)
Béla Merkely (Hungary)
Mark Pitkin (USA)
Noam Shomron (Israel)
Petr Widimský (Czech Republic)
V. P. Chekhonin (Moscow)
V. A. Dyachuk (St. Petersburg)
E. N. Grineva (St. Petersburg)
A. A. Kostareva (St. Petersburg)
M. M. Kostik (St. Petersburg)
A. B. Malashicheva (St. Petersburg)
O. M. Moiseeva (St. Petersburg)
V. M. Moiseenko (St. Petersburg)
T. M. Pervunina (St. Petersburg)
P. V. Popova (St. Petersburg)
M. A. Shkolnikova (Moscow)
G. A. Sofronov (St. Petersburg)
V. A. Tkachuk (Moscow)
E. A. Ulrikh (St. Petersburg)
V. E. Uspensky (St. Petersburg)
S. N. Yanishevsky (St. Petersburg)
S. M. Zakiyan (Novosibirsk)

18+

The Journal is registered by the State Press Committee of the Russian Federation.

Registration Certificate PI No. ΦC77-80730 dated March 29, 2021.

Publication frequency: 6 issues per year.
Circulation: 1,100 copies.

Distribution to specialists.

Layout designer: L.P. Popova,
proofreader: A.V. Medvedeva.

Publisher: ALMAZOV FOUNDATION

Address: 2 Akkuratova street,
Saint Petersburg, 197341
Phone: + 7 (812) 702-37-16

For submission, correspondence, advertisement and subscription, please email your inquiry to pm@almazovcentre.ru.

The subscription code in the Rospechat catalogue is 79638.

Previous issues: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=78357

All rights reserved. © 2022.

Materials published in this Journal should not be reproduced, in full or in part, without the written permission of the publisher.

The editorial board bears no responsibility whatsoever for the contents of advertisements.

СОДЕРЖАНИЕ

ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ

6 ИНФОРМАЦИЯ КАК ВАЖНЕЙШИЙ ИНСТРУМЕНТ РАЗВИТИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ. КАК НАУЧИТЬСЯ ЕЙ УПРАВЛЯТЬ НА БЛАГО ПАЦИЕНТА. НАУКА О «БОЛЬШИХ ДАННЫХ»
Шляхто Е. В., Конради А. О., Курапеев Д. И.

16 ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ В КАРДИОЛОГИИ: СРАБОТАЛ ЛИ ОН?
Йео К. К.

23 МОДЕЛИ ОБЪЯСНЕНИЯ ДИАГНОЗА КАК ЭЛЕМЕНТ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫХ СИСТЕМ ДИАГНОСТИКИ В МЕДИЦИНЕ: КРАТКИЙ ОБЗОР
Уткин Л. В., Крылова Ю. И., Константинов А. В.

ОБЗОРЫ

33 100 ЛЕТ ВИТАМИНУ D. УРОВЕНЬ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ВИТАМИНОМ D В ПАНДЕМИЮ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
Головатюк К. А., Лагутина Д. И., Михайлова А. А., Черникова А. Т., Каронова Т. Л.

42 ВЫСОКАЯ ТЕМПЕРАТУРА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА
Муртазин А. А., Максютлов Н. Ф., Усенко А. Б., Изотов А. А., Мальсагова К. А., Буткова Т. В., Степанов А. А., Петров А. А., Балакин Е. И.

54 СОЗДАНИЕ КАПСУЛИРОВАННЫХ ФОРМ АУТОПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ *LACTOBACILLUS SPP.* И *ENTEROCOCCUS SPP.*
Цапиева А. Н., Морозова А. О., Карасева А. Б., Новикова Н. С., Суворов А. Н.

64 РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАКЦИННЫЕ КАНДИДАТЫ С ИНТЕГРИРОВАННЫМИ АДЬЮВАНТАМИ КАК СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ ЭФФЕКТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Леонтьева Г. Ф., Крамская Т. А., Грабовская К. Б., Гупалова Т. В., Дмитриев А. В., Суворов А. Н.

78 НАРУШЕНИЯ МИКРОБИОТЫ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОМ ВАГИНОЗЕ И ВОЗМОЖНОСТИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОБИОТИКОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)
Климов Н. А., Шамова О. В.

91 НАБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЭНТЕРОКОККОВЫХ БАКТЕРИОФАГОВ
Ткачев П. В., Кулешевич Е. В., Гончаров А. Е.

98 АУТОПРОБИОТИЧЕСКИЕ ЭНТЕРОКОККИ КАК КОМПОНЕНТ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА
Алфёрова Л. С., Ермоленко Е. И., Черникова А. Т., Новикова Н. С., Анопова А. Д., Васюкова Е. А., Цапиева А. Н., Демченко Е. А., Гладышев Н. С., Гладышева Н. П., Симаненкова А. В., Попова П. В., Дмитриев А. В., Каронова Т. Л., Суворов А. Н.

CONTENT

ARTIFICIAL INTELLIGENCE

6 INFORMATION AS A TOOL FOR PERSONALIZED MEDICINE DEVELOPMENT. HOW TO RULE FOR PATIENT BENEFIT. BIG DATA SCIENCE

Shlyakhto E. V., Konradi A. O., Kurapeev D. I.

16 ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN CARDIOLOGY: DID IT TAKE OFF?

Yeo K. K.

23 EXPLANATION MODELS AS A COMPONENT OF THE INTELLIGENT COMPUTER-AIDED DIAGNOSIS SYSTEMS IN MEDICINE: A BRIEF REVIEW

Utkin L. V., Krylova Y. I., Konstantinov A. V.

REVIEWS

33 DI100 YEARS OF VITAMIN D. THE IMPACT OF VITAMIN D LEVEL IN THE TIME OF COVID-19 PANDEMIC

Golovatyuk K. A., Lagutina D. I., Mikhailova A. A., Chernikova A. T., Karonova T. L

42 INFLUENCE OF TEMPERATURE ON HEART RATE VARIABILITY PARAMETERS

Murtazin A. A., Maksjutov N. F., Usenko A. B., Izotov A. A., Malsagova K. A., Butkova T. V., Stepanov A. A., Petrov A. A., Balakin E. I.

54 DEVELOPMENT OF CAPSULATED AUTOPROBIOTICS BASED ON *LACTOBACILLUS SPP.* AND *ENTEROCOCCUS SPP.*

Tsapieva A. N., Morozova A. O., Karaseva A. B., Novikova N. S., Suvorov A. N.

64 RECOMBINANT VACCINE CANDIDATES WITH INTEGRATED ADJUVANTS PROVIDE STIMULATION OF AN EFFECTIVE IMMUNE RESPONSE AGAINST BACTERIAL INFECTIONS

Leontieva G. F., Kramskaya T. A., Grabovskaya K. B., Gupalova T. V., Dmitriev A. V., Suvorov A. N.

78 MICROBIOTA DISORDERS IN BACTERIAL VAGINOSIS AND THE POSSIBILITY OF PERSONALIZED THERAPY OF THE DISEASE WITH THE USE OF PROBIOTICS (REVIEW)

Klimov N. A., Shamova O. V.

91 PRIMER SET FOR DETECTING ENTEROCOCCAL BACTERIOPHAGES

Tkachev P. V., Kuleshevich E. V., Goncharov A. E.

98 AUTOPROBIOTIC ENTEROCOCCI AS A COMPONENT OF METABOLIC SYNDROME COMPLEX THERAPY

Alferova L. S., Ermolenko E. I., Chernikova A. T., Novikova N. S., Anopova A. D., Vasyukova E. A., Tsapieva A. N., Demchenko E. A., Gladyshev N. S., Gladysheva N. P., Simanenkova A. V., Popova P. V., Dmitriev A. V., Karonova T. L., Suvorov A. N.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 61:004.418

ИНФОРМАЦИЯ КАК ВАЖНЕЙШИЙ ИНСТРУМЕНТ РАЗВИТИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ. КАК НАУЧИТЬСЯ ЕЙ УПРАВЛЯТЬ НА БЛАГО ПАЦИЕНТА. НАУКА О «БОЛЬШИХ ДАННЫХ»

Шляхто Е. В., Конради А. О., Курапеев Д. И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Конради Александра Олеговна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: konradi@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 03.11.2022
и принята к печати 21.11.2022.

РЕЗЮМЕ

Обзор содержит информацию о современном состоянии применения аналитики больших данных в медицине, включая анализ омиксных данных. Обсуждаются вызовы, особенности больших данных в здравоохранении, причины недостаточно быстрого внедрения аналитики больших данных и алгоритмов искусственного интеллекта, источники данных и перспективы применения в ближайшие годы.

Ключевые слова: большие данные, омиксные данные, персонализированная медицина, электронное здоровье.

Для цитирования: Шляхто Е.В., Конради А.О., Курапеев Д.И. Информация как важнейший инструмент развития персонализированной медицины. Как научиться ей управлять на благо пациента. Наука о «больших данных». Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(6):6-15. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-6-15.

INFORMATION AS A TOOL FOR PERSONALIZED MEDICINE DEVELOPMENT. HOW TO RULE FOR PATIENT BENEFIT. BIG DATA SCIENCE

Shlyakhto E. V., Konradi A. O., Kurapeev D. I.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Konradi Aleksandra O.,
Almazov National Medical Research Center,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: konradi@almazovcentre.ru

Received 03 November 2022; accepted
21 November 2022.

ABSTRACT

The article summarizes modern approaches of big data analytics implementation in healthcare, including OMIC's data. The existing challenges for big data in medicine, barriers for implementation, reasons for slow development of practical usage of big data analytics and artificial intelligence in healthcare are discussed as well as perspective for the nearest future.

Key words: big data, e-health, omics, personalized medicine.

For citation: Shlyakhto EV, Konradi AO, Kurapeev DI. Information as a tool for personalized medicine development. How to rule for patient benefit. Big data science. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):6-15. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-6-15.

ВВЕДЕНИЕ

XXI век стал веком информационных технологий, и медицина не является исключением в ряду всех происходящих в мире эволюционных процессов. Накопление данных и современные методы их обработки создают беспрецедентные возможности для выхода здравоохранения на принципиально иные результаты и показатели эффективности. Тем не менее, корректный сбор информации, доступ к ней, алгоритмы обработки и все виды анализа, а также практическое внедрение потенциала data science (науки о данных) и технологий искусственного интеллекта (ИИ) являются одновременно и ведущими вызовами современности. Объемы производимых и потенциально применимых для нужд здравоохранения данных настолько велики, что они требуют модернизации всех подходов к хранению, аналитике и использованию этих данных [1].

В частности, одним из таких вызовов является хранение и обработка геномных и других омиксных данных. Объем данных полногеномного секвенирования занимает примерно столько же места, как 100 кинофильмов с самым высоким разрешением или 150 гигабайт информационного хранилища [2]. В результате любое практическое внедрение концепции персонализированной медицины на основе геномных данных требует модернизации информационной инфраструктуры и создания дополнительных сервисов. Кроме того, ситуацию осложняет дефицит специалистов, способных извлекать из этих данных клинически значимую информацию и осуществлять ее корректную интерпретацию.

Информатизация здравоохранения началась достаточно давно, и на сегодняшний день большинство медицинских организаций в мире уже пользуется теми или иными сервисами, в первую очередь медицинскими информационными системами. Однако движение от простого хранения данных и использования минимальных аналитических функций к предсказательному моделированию и системам поддержки принятия решений происходит крайне медленно. Развитие возможностей аналитики больших данных и технологий ИИ превышает по скорости процессы внедрения во много раз. В целом на сегодняшний день медицинские организации и медицинские работники еще не готовы в полной мере к активному применению информационных технологий нового поколения. Основными барьерами к их внедрению являются:

- Отсутствие должных навыков и знаний у медицинского персонала;

- Отсутствие возможности для систематизированного получения, хранения, архивирования и обработки медицинских данных;

- Низкое качество данных и низкая цифровая культура в медицинских организациях;

- Дефицит средств и единой концепции по формированию корректной и современной информационной инфраструктуры учреждений;

- Сложности при защите персональных данных и этические вопросы доступа к ним;

- Консервативность медицины как отрасли и отсутствие готовности организации к полной транспарентности данных [3].

Кроме того, развитие возможности информационных систем и генерация новых знаний происходят настолько быстро, что ни концепции развития, ни медицинские работники, ни бизнес-сообщество не успевают адаптироваться под эту лавину новых знаний и сервисов. Постоянно наблюдается как идеологическое, так и техническое отставание медицины от ряда других отраслей экономики, где внедрение нового происходит быстрее и менее болезненно.

Тем не менее, необходимость такого внедрения и максимально быстрой адаптации медицины к растущим возможностям и новым вызовам очевидны. Это потребует в ближайшее время комплексных изменений, включающих смену инфраструктуры, идеологии управления медицинской помощью, подготовки новых кадров и смены самой структуры распределения рабочего времени медицинских работников, вовлечения новых игроков в получение и обработку данных и реализации новых моделей здравоохранения, таких как пациент-центричность, ценностное здравоохранение и персонализированная медицина [4–5]. При этом очень важно понимать, что данные сами по себе, даже очень «большие» и очень качественные, еще ничего не объясняют и не помогают в работе врача. Важно выстроить не просто сбор данных и их упорядочивание, а суметь определить пути поиска нужных связей и корреляций, сформировать корректные алгоритмы обработки и интерпретации, которые дают конкретную выгоду в клинических или управленческих решениях. Именно эта работа представляет собой самую большую сложность, так как ее результат требует валидации в разных условиях, проверки на практике и интеграции с существующими бизнес-процессами медицинских организаций.

Данные, генерируемые здравоохранением, растут в объеме примерно на 50 % ежегодно, и их общий объем давно превысил 2000 гэксабайт [6]. Если представить себе образно, что все данные о здоровье людей будут представлены в виде столбика монет,

то уже в 2020 году он оказался бы высотой более 82 тысяч километров, что составляет одну треть расстояния до Луны, тогда как еще в 2013 году это было всего лишь 3 % от этого расстояния [7]. Согласно оценкам IBM, в периоды между записями в официальных медицинских картах каждый человек оставляет след более 1 миллиона гигабайт в виде разного рода дополнительных данных, имеющих отношение к здоровью [7]. Эти данные, генерируемые интернетом вещей, социальной активностью, мобильными телефонами и носимыми устройствами, сегодня в принципе мало используются медицинскими организациями, хотя представляют собой неоценимый банк для динамического наблюдения за лицами с факторами риска и хронической патологией [8–9].

ПОНЯТИЕ «БОЛЬШИХ ДАННЫХ»

Ориентированная на пациента медицинская помощь, или так называемая пациент-центричная модель медицины не может игнорировать постоянное нарастание медицинских данных с точки зрения не только их объема, но и разнообразия, и скорости получения, что настойчиво подталкивает медицину к новой парадигме, которая носит широко употребляемое название «большие данные» (БД, Big data) [10]. Анализ огромного объема, в том числе неоднородных, данных и данных, генерируемых с большой скоростью, что и подразумевает наука о больших данных или аналитика больших данных (АБД), позволяет извлечь максимальную ценность из данных и успешно анализировать связи между различными переменными, описывающие жизненные функции пациента и способные повлиять на его здоровье [11]. Именно эта возможность и является драйвером того, что передовые медицинские организации вкладывают сегодня значительные средства в анализ данных, чтобы облегчить в дальнейшем принятие клинических и управленческих решений [12, 13]. Интеграция данных об уникальных характеристиках человека, клинических симптомах и фенотипе, информация, полученная от диагностической визуализации и при проведении лабораторных анализов, медицинские записи в истории болезни, а также данные генома позволяют развиваться прецизионной медицине для достижения целей прогнозирования исходов и истинной профилактики [14]. Наличие большого количества данных имеет решающее значение сегодня также в интенсивной терапии, в том числе они позволяют быстро ставить диагнозы и предлагать конкретные методы лечения для редких патологий или необычного течения болезни, что невозможно сделать только человеческими ресурсами [15].

В последние годы достаточно быстро распространяются персонализированная диагностика и терапия, в том числе за счет развития АБД и использования интернета вещей, который позволяет собирать разного рода данные, генерируемые огромным количеством устройств, и делать их доступными через интегрированные системы, облегчающие передачу информации [16]. В итоге АБД представляет собой большой набор данных из различных источников, не только здравоохранения, который позволяет проводить более персонализированное лечение, оценивать его эффективность и улучшать процессы в медицинской организации, уменьшая риски, связанные с медицинской помощью, за счет инновационных способов управления и контроля происходящих процессов [17–19].

Современные технологии геномики и постгеномики также позволяют получать огромные объемы необработанных данных о сложных биохимических и регуляторных процессах в живом организме. Эти цифровые данные нередко неоднородны, хранятся в разных форматах. Медицинские данные также чаще всего представлены в разнородных форматах. Они могут быть структурированными, полуструктурированными или неструктурированными; дискретными или непрерывными. Наука о больших данных как раз и занимается такими сложными данными, которые трудно анализировать с помощью традиционного программного или аппаратного обеспечения. АБД охватывает интеграцию разнородных данных, контроль качества данных, их анализ, моделирование, интерпретацию и валидацию [20]. АБД в здравоохранении позволяет анализировать большие наборы данных от тысяч и миллионов пациентов, выявлять кластеры и корреляции между наборами данных, а также разрабатывать прогностические модели с использованием методов интеллектуального анализа данных. АБД в медицине и здравоохранении объединяет компетенции нескольких научных областей, таких как биоинформатика, медицинская визуализация, сенсорная информатика, медицинская информатика и информатизация системы здравоохранения.

Согласно определению Еврокомиссии по регулированию исследований и инноваций в области здравоохранения, под «большими данными» в медицине понимают данные большого объема и разнообразия, включающие биологическую информацию, информацию об образе жизни и окружающей среде, а также клинические данные конкретных индивидуумов и больших когорт в соотношении с их статусом здоровья и благополучия в различные временные точки [21]. Очень важно понимать, что понятию АБД соответствует не число пара-

метров или число испытуемых, а свойства самих данных, которые характеризуют не только объем, но и сложность формата, что не позволяет для их анализа использовать стандартные подходы.

АБД характеризуется целым рядом важных свойств, важных для понимания их сути, которые в литературе принято называть 3Vs [22]:

- **Volume** — объем: количество данных, генерируемых каждую секунду;
- **Variety** — разнообразие: генерируются, накапливаются и используются различные типы данных, даже неструктурированные или полуструктурированные;
- **Velocity** — скорость: относится к генерации данных (которая всегда увеличивается с течением времени).

К этим первым 3V позже были добавлены еще 3V [23]:

- **Veracity** — правдивость или неопределенность данных;
- **Value** — ценность: технологии АБД повышают ценность данных, превращая их в действительно полезную информацию;
- **Variability** — вариабельность: данные по одной и той же теме могут иметь различия, связанные с их форматом или способом получения, и это часто является большой проблемой обработки (различные лабораторные единицы измерения, методики расчета).

В последующем добавились еще 2V [24]:

- **Visualization** — возможность визуализации данных в виде сводных графиков и схем;
- **Virality** — жизнеспособность (наличие смысла и пригодность для анализа).

Недавно была введена дополнительная характеристика АБД [25]:

- **Complexity** — сложность: чем больше размер набора данных, а также их разнообразие и неопределенность, тем выше сложность этих данных для анализа.

В современном мире до 90 % медицинских данных являются неструктурированными, что само по себе определяет сложность их обработки.

Конечно, наиболее ценными и надежными источниками для получения АБД в здравоохранении являются медицинские записи (например, электронные медицинские карты, системы поддержки принятия клинических решений, биомедицинские данные и т. д.) [26]. Велика также ценность внешних источников (лаборатории, аптеки, биометрические и другие данные, полученные непосредственно от пациентов, и др.). Дополнительные источники данных становятся все более доступными, такие как данные, полученные в результате использования

интернета (социальных сетей) и интеллектуальных приложений [27–28]. Для управления и обработки этих данных чаще всего используются облачные вычисления. Разнородные данные при правильной интеграции с медицинскими данными позволяют осуществлять мониторинг состояния здоровья пациентов в различных условиях (больницы, дома престарелых, на дому, в условиях реабилитации и даже в поездках) [29–30]. Этот аспект использования БД считается наиболее важным, поскольку основные ошибки, которые могут привести к ошибочному диагнозу и летальному исходу, происходят вследствие отсутствия мониторинга жизненно важных параметров, а также несоблюдения режима лечения [31]. Следует сказать, что использование облачных вычислений и других инструментов и методов АБД сталкивается с рядом трудностей, связанных с сетевыми сбоями, проблемами безопасности и конфиденциальности данных пациентов [32]. Все это в сочетании с консервативностью здравоохранения как отрасли существенно тормозит практическое использование АБД в медицине. Но, тем не менее, примеры успешного внедрения нарастают огромными темпами.

Вторым огромным направлением АБД в медицине является генерация и анализ так называемых омиксных данных [33]. Омиксные данные — большие массивы данных, собранные на разных уровнях биологических процессов. Термин происходит от английского Omics и включает в себя целый ряд новых биологических дисциплин, характеризующихся общим подходом к методологии изучения биообъектов, а именно: изучение не отдельных молекул и биохимических путей, а всего комплекса данных. Омиксные данные — это совокупность всех молекул определенного уровня, отражающая состояние организма или его части. Омиксные технологии используют высокопроизводительные методы анализа, что ведет за собой генерацию больших массивов данных, анализом которых тоже занимаются data scientists. Это породило создание новой дисциплины на стыке биологии, статистики и компьютерной науки — биоинформатики. Следующим этапом стало применение методов машинного обучения для решения биологических задач, что активно развивается в настоящее время.

Практическое использование омиксных данных сегодня уже достаточно велико. Ведущим направлением является новая идеология создания лекарственных препаратов. Анализ омиксных данных, в том числе с применением ИИ, позволяет выявить новые механизмы развития заболевания и выбрать мишени без заранее сформированной гипотезы о тех сигнальных путях, которые задействованы в развитии забо-

Таблица 1. Основные понятия омиксных данных и их характеристика (адаптировано и дополнено из [33])

Наименование	Краткое описание
Геномика	Все данные, характеризующие геном. В настоящее время предметом изучения в основном являются некодирующие последовательности и их роль.
Эпигеномика	Все эпигеномные модификации генома в ядре и в клетке. Регуляция экспрессии генов.
Транскриптомика	Оценка уровня экспрессии генов в конкретной клетке или клеточной популяции.
Протеомика	Оценка всех возможных взаимодействий, которые осуществляются между белками, весь набор белков, который кодируется геномом в конкретном типе клеток и на уровне всего организма, в том числе в зависимости от конкретных условий и конкретного периода времени.
Метаболомика	Изучение спектра метаболитов (малых молекул) в клетке, в органеллах, в органе или на уровне всего организма.
Интерактомика	Изучение прямых и косвенных взаимодействий между белками и иными молекулами внутри конкретной клетки и оценка последствий таких взаимодействий. Описание этих процессов в виде биологических сетей.
Фармакогеномика	Комбинация геномики и фармакологии с анализом роли генома в индивидуальном ответе на лекарство.
Феномика	Описание фенотипа с его бесчисленными количественными и качественными характеристиками.
Болезнеомика (diseasomics)	Описание всех существующих болезней и их характеристик, чаще всего в контексте генетических причин.
Микробиомика	Данные о генотипе и фенотипе населяющих организм человека микроорганизмов и их взаимодействиях.

левания. Иными словами, сравнение экспрессии генов в норме и патологии дает основания, например, определять мишени воздействия, не понимая заранее их функциональную значимость. Далее биоинформатика помогает провести валидацию мишеней, определить точный механизм действия кандидата, а также вычислить его токсичность, что в конечном итоге позволяет сделать drug-дизайн более быстрым и персонализированным [34].

ЭЛЕКТРОННОЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЕ

Сегодня медицинские и научные исследования в области медицины уже проводятся не только с использованием традиционных устройств, но и, например, с помощью так называемых интеллектуальных устройств, которые все больше становятся

неотъемлемыми элементами повседневной жизни [35–36]. Продукт технологической революции, которая началась до 2000 года с резкого скачка значимости интернета, а позже и с огромным распространением подключенных к нему устройств нового поколения (IoT), — это и есть электронное здравоохранение. На самом деле электронное здравоохранение обладает огромным потенциалом для повышения эффективности всей системы здравоохранения (сокращение расходов) и эффективности самого лечебного процесса (качество медицинской помощи) [37–39]. Электронное здравоохранение представляет собой основу так называемого Здравоохранения 4.0 [40]. Именно применение новых интеллектуальных технологий, интернета вещей [37], обмена данными между различными областями и системами, робототехники и облачных вы-

числений [41] может привести к улучшению оказания медицинской помощи в будущем.

Развитие электронного здравоохранения идет уже достаточно давно и включает в себя ряд стратегически важных сервисов и организационных решений. Утверждение новых технологий определило создание стандартов цифровой обработки изображений и стандартов передачи данных в медицине (DICOM), определяющих правила хранения и обмен изображениями, выходящий за рамки старого поколения аналоговых машин. Следующим важным рубежом стало создание методологии и правил ведения электронных медицинских карт (EHR), которые через несколько лет полностью заменят бумажные носители. На этой основе сформировались в целом требования и стандарты для медицинских информационных систем. В РФ также утверждены приказом Минздрава Требования к государственным информационным системам в сфере здравоохранения субъектов Российской Федерации, медицинским информационным системам медицинских организаций и информационным системам фармацевтических организаций (<https://base.garant.ru/72217630/>). Более того, последовательно принято 6 частей в Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 59921.1-2022 «Системы искусственного интеллекта в клинической медицине», которые регламентируют процессы тестирования и внедрения подобных систем в здравоохранение. Однако до сих пор не решены вопросы применения в реальном здравоохранении обособленного ИИ.

СУЩЕСТВУЮЩИЕ ПРОБЛЕМЫ АНАЛИТИКИ БОЛЬШИХ ДАННЫХ В МЕДИЦИНЕ

Одной из основных технических проблем является интеграция данных, наличие пропусков и ошибок и сложность стандартизации медицинских данных [42]. Если для омиксных данных ведущей проблемой является разнородность форматов и сложности интерпретации [33], то для данных из медицинских карт основные проблемы связаны с деятельностью медицинского персонала — пропуски в записях, ошибки ввода, некорректная интерпретация и др. Кроме этого, до сих пор не решены задачи стандартизации единиц измерения и норм для лабораторных и инструментальных данных и многие другие, которые затрудняют анализ даже не самых сложных массивов данных [42].

С точки зрения технологий анализа, в том числе технологий искусственного интеллекта, есть проблема применимости ряда алгоритмов машинного обучения к медицинским данным, а также большая проблема восприятия заключений, формируемых

на основе алгоритмов ИИ медицинскими работниками. Следом за этим встают юридические проблемы персональной ответственности за медицинские решения, принимаемые на основе таких алгоритмов, и иные вопросы права, касающиеся регулирования применения подобных систем в здравоохранении, которые подпадают под определение «изделие медицинского назначения».

Важной этической и организационной проблемой является защита персональных данных и безопасность данных [43–44]. В первом случае необходим четкий протокол доступа к персональным данным и мониторинг согласия пациента на предоставление к ним доступа, в том числе третьим лицам, что сегодня не всегда хорошо отработано в медицинских организациях. Во втором случае — глобальная защита данных от их скачивания и использования в нелегальных целях. Во всем мире и в России предпринимаются достаточно большие усилия по обеспечению безопасности, существует строгое законодательство, но, тем не менее, утечка данных и их использование, в том числе в корыстных или даже криминальных целях, остается реальным фактором риска.

В отношении анализа омиксных данных тоже существуют технические сложности, которые складываются из наличия «шума» в данных, необходимости стандартизации условий эксперимента, особенностей биообразцов, технологий и др. В связи с этим кажущаяся легкость объединения данных и применения алгоритмов анализа нередко сталкивается с необходимостью сложного процессинга данных, их «чистки» и устранения шумов, прежде чем они будут пригодны для реального анализа, визуализации закономерностей, кластеризации и классификации, что предполагает наука о больших данных. Еще одной сложностью омиксных данных является то, что число параметров (белков, генов, метаболитов), как правило, намного больше, чем число обследованных индивидуумов, что затрудняет построение классических связей и визуализацию данных, свойственных АБД [33].

Классические алгоритмы анализа больших данных включают [45]:

Bayesian classification — *Байесовский классификатор*;

Neural network algorithm — *нейросетевой алгоритм*;

Decision tree induction — *деревья решений*;

Rule based classification — *классификация, основанная на правилах*;

Support vector machine — *машина опорных векторов*;

K-Nearest neighbor classifier — *классификация по методу k-ближайших соседей*;

Rough set approach — подход, основанный на теории неточных множеств;

Genetic algorithm — генетический алгоритм;

Fuzzy set approach — подход, основанный на теории нечетких множеств.

Каждый алгоритм имеет свою область применения в машинном обучении, что определяется спецификой данных и поставленными задачами. Чаще всего используются первые три алгоритма, особенно в системах компьютерного зрения.

ОБЛАСТИ УСПЕШНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИЙ БОЛЬШИХ ДАННЫХ И ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА В БЛИЖАЙШЕМ БУДУЩЕМ

1. **Профилактика.** Считается, что анализ больших данных и соединение вместе омиксных данных и сведений по популяции и индивидуумам, с точки зрения поведения и факторов риска, приведет к существенному прогрессу в осознании механизмов развития заболеваний и формировании стратегий персонализированной профилактики. На этих данных также будет базироваться так называемая прецизионная профилактика, выделяющая группы риска на основании генотип-фенотипических взаимодействий.

2. **Экстренная медицина.** Анализ больших данных и ИИ могут уже в ближайшее время совершить революцию в неотложной терапии, позволяя на основании сбора данных с различного рода датчиков и устройств и интеграции данных с имеющейся информацией о пациенте, в том числе в социальных сетях и иных сферах, а также анализа изображений ускорить дифференциальный диагноз неотложных состояний и сформировать системы поддержки выбора тактики лечения.

3. **Управление популяционным здоровьем.** Прогнозирование динамики развития заболеваний, эпидемий, предиктивная и прескриптивная аналитика для планирования медицинской помощи и расходов.

4. **Мобильное здоровье (mobile health)** — мониторинг различных параметров здоровья и формирование поддержки клинических решений в пациент-центричной модели здравоохранения.

5. **Управление медицинской организацией,** регуляция потоков пациентов, предсказательное моделирование загрузки и работы персонала и оборудования. Повышение экономической эффективности медицинской помощи.

6. **Управление качеством** медицинской помощи и ее интегральная оценка. Снижение числа

ошибок и управление системой повышения квалификации медицинских работников.

7. **ИИ и анализ изображений.** Компьютерное зрение.

8. **Новые технологии drug-design.** Создание лекарств и проведение их испытаний на основе моделирования.

9. **Нанотехнологии и роботические технологии.**

10. **Формирование системы персонализированной медицины** на основе всех типов данных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ больших данных в медицине — это многообещающий инструмент, который позволит интегрировать между собой данные различных источников и систем, включая данные социальных сетей и носимых устройств. В результате будут развиваться новые отрасли знаний и компетенций, такие как биоинформатика, сенсорная информатика, вычислительная медицина и информатика здоровья. На этой основе будут развиваться новые сервисы и приложения, которые смогут управлять большими данными и строить на их основании клинические и организационные решения.

Персонализация медицины, сокращение сроков госпитализации и эффективность работы системы здравоохранения, в том числе снижение стоимости медицинской помощи, являются важнейшими целями модернизации здравоохранения, и они тесно связаны с цифровизацией и применением аналитики больших данных. Но внедрение новых технологий медицинской аналитики требует комплексного решения целого ряда проблем, начиная с технологических и заканчивая идеологией развития медицины в сторону уменьшения госпитальной помощи, вопросами этики и изменений законодательства. Безусловно, со временем налаживание системы обмена данными и построение предиктивной аналитики не только на уровне одного учреждения или конкретного пациента, а на уровне системы здравоохранения региона, страны сделает систему более устойчивой и прозрачной и будет способствовать повышению качества и безопасности медицинской помощи. Для успешного внедрения технологии БД и ИИ необходимо вовремя создавать инфраструктуру и готовить специалистов, способных воспринять инновации и быстро встроить их в клиническую работу [46–47].

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Aceto G, Persico V, Pescapé A. The role of Information and Communication Technologies in healthcare: Taxonomies, perspectives, and challenges. *J. Netw. Comput. Appl.* 2018;107:125–154. DOI: 10.1016/j.jnca.2018.02.008.
2. Workgroup for Electronic Data Interchange. Maximizing the potential of genomic information to improve care coordination and health outcomes <https://www.wedi.org/docs/publications/a-white-paper-by-the-genomics-workgroup.pdf?sfvrsn=0>.
3. Fatt QK; Ramadas A. The Usefulness and Challenges of Big Data in Healthcare. *J. Healthc. Commun.* 2018, 3, 1–4.
4. Aarathi S; Vasundra S. Impact of healthcare predictions with big data analytics and cognitive computing techniques. *Int. J. Recent Technol. Eng.* 2019, 8, 4757–4762.
5. Lhotska L. Application of industry 4.0 concept to health care. *Stud. Health Technol. Inform.* 2020, 273, 23–37.
6. EMC digital universe with research & analysis by IDC Healthcare. <http://www.emc.com/analyst-report/digital-universe-healthcare-vertical-report-ar.pdf>.
7. IDC. Driving data growth in healthcare. <https://image.slidesharecdn.com/emckeyssuccessfactorsr ioitahealth2015-150829140335-lva1-app6892/95/healthcare-it-transformation-key-success-factors-2-638.jpg?cb=1440858718>)
8. Hansen MM, Miron-Shatz T, Lau AYS, Paton C. Big Data in Science and Healthcare: A Review of Recent Literature and Perspectives. Contribution of the IMIA Social Media Working Group. *Yearb. Med. Inform.* 2014, 9, 21–26.
9. Thuemmler C, Bai C. Health 4.0: How Virtualization and Big Data Are Revolutionizing Healthcare; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; ISBN 9783319476179.
10. Lee I. Big data: Dimensions, evolution, impacts, and challenges. *Bus. Horiz.* 2017, 60, 293–303.
11. Chinnaswamy A, Papa A, Dezi L, Mattiacci A. Big data visualisation, geographic information systems and decision making in healthcare management. *Manag. Decis.* 2019, 57, 1937–1959.
12. Sumarsono, Anshari M, Almunawar MN. Big Data in Healthcare for Personalization Customization of Healthcare Services. In Proceedings of the 2019 International Conference on Information Management and Technology Jakarta/Bali, Indonesia, 19–20 August 2019; Volume 1, pp. 73–77.
13. Chen HC, Chiang RH. Business intelligence and analytics: From big data to big impact. *MIS Q.* 2012, 36, 1165–1188.
14. Tran TQB, du Toit C, Padmanabhan S. Artificial intelligence in healthcare-the road to precision medicine. *J. Hosp. Manag. Health Policy* 2021, 5, 29.
15. Weaver CA, Ball MJ, Kim GR, Kiel JM. Healthcare information management systems: Cases, strategies, and solutions: Fourth edition. In *Healthcare Information Management Systems: Cases, Strategies, and Solutions*, 4th ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; pp. 1–600. ISBN 9783319207650.
16. Firouzi F, Rahmani AM, Mankodiya K, Badaroglu M, Merrett GV, Wong P, Farahani B. Internet-of-Things and big data for smarter healthcare: From device to architecture, applications and analytics. *Future Gener. Comput. Syst.* 2018, 78, 583–586.
17. Agrawal D, Madaan J. A structural equation model for big data adoption in the healthcare supply chain. *Int. J. Product. Perform. Manag.* 2021.
18. Macpherson A, Holt R. Knowledge, learning and small firm growth: A systematic review of the evidence. *Res. Policy* 2007, 36, 172–192.
19. Choi TM. Incorporating social media observations and bounded rationality into fashion quick response supply chains in the big data era. *Transp. Res. Part E Logist. Transp. Rev.* 2018, 114, 386–397.
20. Kharbouch A, Naitmalek Y, Elkhouchi H, Bakhouya M, De Florio V, El Ouadghiri MD, Latre S, Blondia C. IoT and big data technologies for monitoring and processing real-time healthcare data. *Int. J. Distrib. Syst. Technol.* 2019, 10, 17–30.
21. Auffray C, Balling R, Barroso I, Bencze L, Benson M, Bergeron J, Bernal-Delgado E, Blomberg N, Bock C, Conesa A. Making sense of big data in health research: Towards an EU action plan. *Genome Med.* 2016, 8, 1–13.
22. Normandeau K. Beyond Volume, Variety and Velocity is the Issue of Big Data Veracity. *Inside Big Data* 2013. Available online: <https://insidebigdata.com/2013/09/12/beyond-volume-variety-velocity-issue-big-data-veracity/> (accessed on 18 January 2022).
23. Gandomi A, Haider M. Beyond the hype: Big data concepts, methods, and analytics. *Int. J. Inf. Manag.* 2015, 35, 137–144.
24. Diebold FX, Cheng X, Diebold S, Foster D, Halperin M, Lohr S, Mashey J, Nickolas T, Pai M, Pospiech M. A Personal Perspective on the Origin (s) and Development of “Big Data”: The Phenomenon, the Term, and the Discipline*. 25. Dash S, Shakyawar SK, Sharma M, Kaushik, S. Big data in healthcare: Management, analysis and future prospects. *J. Big Data* 2019, 6, 54.
26. Wang Y, Hajli N. Exploring the path to big data analytics success in healthcare. *J. Bus. Res.* 2017, 70, 287–299.
27. Yin Y, Zeng Y, Chen X, Fan Y. The internet of things in healthcare: An overview. *J. Ind. Inf. Integr.* 2016, 1, 3–13.

28. Oliver N, Arnesht T, Tak I. Smart hospital services: Health 4.0 and opportunity for developing economies. In *Proceedings of the Towards the Digital World and Industry X.0—Proceedings of the 29th International Conference of the International Association for Management of Technology, IAMOT 2020, Cairo, Egypt, 13–17 September 2020*; pp. 345–361.
29. Wang Y, Kung LA, Byrd TA. Big data analytics: Understanding its capabilities and potential benefits for healthcare organizations. *Technol. Forecast. Soc. Chang.* 2018, 126, 3–13.
30. Nalluri S, Sasikala R. An insight into application of big data analytics in healthcare. *Int. J. Data Min. Model. Manag.* 2020, 12, 87–117.
31. Singh K, Jahnke I, Mosa A, Calyam P. The Winding Road of Requesting Healthcare Data for Analytics Purposes: Using the One-Interview Mental Model Method for Improving Services of Health Data Governance and Big Data Request Processes. *J. Bus. Anal.* 2021, 1–18.
32. Singh RK, Agrawal S, Sahu A, Kazancoglu Y. Strategic issues of big data analytics applications for managing health-care sector: A systematic literature review and future research agenda. *TQM J.* 2021.
33. Hassan M, Awan FM, Naz A, et al. Innovations in Genomics and Big Data Analytics for Personalized Medicine and Health Care: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 4645. <https://doi.org/10.3390/ijms23094645>
34. Cirillo D, Valencia A. Big data analytics for personalized medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019, 58, 161–167.
35. Lee J. *Industrial AI: Applications with Sustainable Performance*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020.
36. Martínez-Rojas M, del Carmen Pardo-Ferreira M, Rubio-Romero JC. Twitter as a tool for the management and analysis of emergency situations: A systematic literature review. *Int. J. Inf. Manag.* 2018, 43, 196–208.
37. Bates DW, Saria S, Ohno-Machado L, Shah A, Escobar G. Big data in health care: Using analytics to identify and manage high-risk and high-cost patients. *Health Aff.* 2014, 33, 1123–1131.
38. Zolbanin HM, Delen D, Sharma SK. The strategic value of big data analytics in health care policy-making. *Int. J. E-Bus. Res.* 2018, 14, 20–33.
39. Feldman B, Martin E, Skotnes T. Big data in healthcare: Hype and hope. Dr. Bonnie 360 degree (Business Development for Digital Health). 2012. Available online: <http://www.riss.kr/link?id=A99883549> (accessed on 12 February 2022).
40. Basile LJ, Carbonara N, Pellegrino R, Panniello U. Business intelligence in the healthcare industry: The utilization of a data-driven approach to support clinical decision making. *Technovation* 2022, 102482.
41. Patel S, Patel A. A Big Data Revolution in Health Care Sector: Opportunities, Challenges and Technological Advancements. *Int. J. Inf. Sci. Tech.* 2016, 6, 155–162.
42. Murdoch TB, Detsky AS. The inevitable application of big data to health care. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* 2013, 309, 1351–1352.
43. Rumsfeld JS, Joynt KE, Maddox TM. Big data analytics to improve cardiovascular care: Promise and challenges. *Nat. Rev. Cardiol.* 2016, 13, 350–359.
44. Senthilkumar SA, Rai BK, Meshram AA, Gunasekaran A, Chandrakumarmangalam S. Big Data in Healthcare Management: A Review of Literature. *Am. J. Theor. Appl. Bus.* 2018, 4, 57–69.
45. Weng C, Kahn MG. Clinical Research Informatics for Big Data and Precision Medicine. *Yearb. Med. Inform.* 2016, 25, 211–218.
46. Tariq MA, Hoyle DC. Translating the Machine: Skills that Human Clinicians Must Develop in the Era of Artificial Intelligence. *Ophthalmol. Ther.* 2022, 11, 69–80.
47. De Mauro A, Greco M, Grimaldi M, Ritala P. Human resources for Big Data professions: A systematic classification of job roles and required skill sets. *Inf. Process. Manag.* 2018, 54, 807–817.

Информация об авторах:

Шляхто Евгений Владимирович, д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Конради Александра Олеговна, д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий кафедрой организации, управления и экономики здравоохранения Института медицинского образования, заместитель генерального директора по научной работе ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Курапеев Дмитрий Ильич, заместитель генерального директора по информационным технологиям и проектному управлению ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Shlyakhto Evgeny V., MD, PhD, Professor, Academician of RAS, Director General of the Almazov National Medical Research Centre;

Konradi Aleksandra O., Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Organization, Management and Economics of Healthcare of the Institute of Medical Education, Deputy Director General on Research of the Almazov National Medical Research Center;

Kurapeev Dmitry I., Deputy Director General for Information Technology and Project Management of the Almazov National Medical Research Centre.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 004.8:612.17

ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ В КАРДИОЛОГИИ: СРАБОТАЛ ЛИ ОН?

Йео К. К.

Национальный кардиологический центр Сингапура, Сингапур

Контактная информация:

Профессор Кхунг Кеонг Йео,
Отделение кардиологии, Национальный
кардиологический центр Сингапура,
5 Больничный проезд, Сингапур, 169609.

Статья поступила в редакцию 20.11.2022 и
принята к печати 10.12.2022.

РЕЗЮМЕ

Искусственный интеллект (ИИ) позиционируется как технология, меняющая парадигму и «правила игры» в медицине. Существует ли он в кардиологии? В этой статье мы обсудим некоторые области кардиологии, в которых достигнут определенный прогресс во внедрении технологий искусственного интеллекта. Несмотря на перспективы искусственного интеллекта, сохраняются проблемы, включая кибербезопасность, трудности с внедрением и управлением изменениями. В этой статье обсуждается использование ИИ, встроенного в качестве технологии «черного ящика» в существующие диагностические и интервенционные инструменты, ИИ в качестве дополнения к диагностическим инструментам, таким как ЭХО, компьютерная томография или МРТ, ИИ в коммерчески доступных мобильных устройствах и ИИ в чат-ботах и других технологиях взаимодействия с пациентами. При этом, несмотря на определенный прогресс, правовая, нормативная, финансовая и этическая базы по-прежнему находятся в процессе эволюции на национальном и международном уровнях.

Ключевые слова: болезни сердечно-сосудистой системы, искусственный интеллект, кардиология, кибербезопасность, новые диагностические возможности, пациент-ориентированный интерфейс, смарт-технологии.

Для цитирования: Йео К.К. Искусственный интеллект в кардиологии: сработал ли он? Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(6):16-22. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-16-22.

ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN CARDIOLOGY: DID IT TAKE OFF?

Yeo K. K.

National Heart Centre Singapore, Singapore

Corresponding author:

Prof. Khung Keong Yeo,
Department of Cardiology, National Heart
Centre Singapore,
5 Hospital Drive, Singapore, 169609.

Received 20 November 2022; accepted
10 December 2022.

ABSTRACT

Artificial intelligence (AI) has been touted as a paradigm shifting, game-changing development in medicine. Did AI in cardiology take off? In this paper, we discuss some areas within cardiology in which there has been progress in the implementation of AI technologies. Despite the promise of AI, challenges remain including cybersecurity, implementation and change management difficulties. This paper discusses the use of AI embedded as a ‘black box’ technology in existing diagnostic and interventional tools, AI as an adjunct to diagnostic tools such as echo or CT or MRI scans, AI in commercially available wearables, and AI in chatbots and other patient-facing technologies. Lastly, while there has been some progress, the legal, regulatory, financial and ethical framework remains a work in evolution at national and international levels.

Key words: artificial intelligence, cardiology, cardiovascular disease, cybersecurity, new diagnostic capabilities, patient-oriented interface, smart-technologies.

For citation: Yeo KK. Artificial intelligence in cardiology: did it take off? Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):16-22. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-16-22.

INTRODUCTION

Artificial intelligence (AI) has been touted as a paradigm shifting, game-changing development in medicine. It was supposed to make diagnoses, facilitate tests, chat with patients better than real doctors can, automate difficult processes and even power robots to operate without humans. Of course, no one expected this to happen overnight. Yet with the increasing use of AI and related technologies in other industries eg. Weather prediction, self-driving cars, detection of fraud, hotel booking chatbots, the question is: where are we in medicine specifically in cardiology? Did AI in cardiology take off?

WHAT DOES AI NEED FOR IT TO WORK?

For AI to work, first, there has been to large amounts of data; more precisely, large amounts of good quality and accurate data. Second, there needs to be access to significant computing processing power. Currently, such massive compute power is easily available — most smart phones have compute capabilities that exceed most computers a decade ago. Related to these two key ingredients are second-order needs that directly affect the promise of AI: (1) storage capacity, (2) access to the Cloud, (3) cybersecurity and patient confidentiality/privacy needs, (4) integration or connectivity with hospital operational systems including electronic health records, pharmacy systems and administrative systems, and (5) requisite regulatory, legal and societal landscape. As large volumes of data are processed, storage costs increase. The need for immediacy and to be ‘online’ or near-online most times add to the cost. The Cloud is a natural solution to this need with scalable and elastic resources and use-dependent costing. However, use of the Cloud for healthcare is significantly regulated in most developed countries. These regulations often require that the Cloud server be hosted in the home country. Lastly, cyberattacks by all sorts of actors have made cybersecurity a major consideration in the use of AI, cloud computing and even the mechanism of data storage [1–3]. Cyberattacks can range from malware that corrupt databases and algorithms, denial-of-service attacks, exfiltration of personal, operational and research data, implantation of fake data that corrupt algorithms, adversarial attacks, amongst others. It should be noted that cybersecurity issues are already a known problem with implantable cardiac devices [4–7]. The need to defend from cyberattacks and other nefarious activities significantly impedes the deployment of AI in hospital systems. The need for integration with hospital operational systems, when taken in the context of cybersecurity, is an increasingly complex and expensive process.

Importantly, an accurate AI algorithm does not necessarily make a successful AI deployment. AI, like any tool, needs to be implemented at the right place, by the right people and at the right time. This entire process of change management, implementation and validation is both an art and a science. For AI to work, it has to be embedded into clinical care processes. The new workflow must not incur additional work for nurses, doctors, allied health staff or administrators; and if it does, it has to be so easy, so logical that the healthcare provider will do so intuitively. AI solutions that do not fit into the normal workflow or which incurs additional effort on the part of the care provider will be doomed to failure [8].

To illustrate the use of AI in cardiology, we will describe several use cases. These include AI embedded as a ‘black box’ technology in existing diagnostic and interventional tools, AI as an adjunct to diagnostic tools such as echo or CT or MRI scans, AI in commercially available wearables, and AI in chatbots and other patient-facing technologies. Of note, AI is used in other healthcare related activities such as back-end processes for operational, claims and other financial purposes. However, these use cases are not specific to cardiology and will not be discussed.

AI AS EMBEDDED AS A BLACK BOX IN EXISTING DIAGNOSTIC AND INTERVENTIONAL TOOLS

AI as complex algorithms guiding procedural imaging is already embedded in software platforms such as those by Philips Echo-Navigator [9]. The Echo-Navigator allows real time fusion and overlap of trans-esophageal echo images with fluoroscopy. Such technology allows an interventionalist to better understand the anatomical relationships of cardiac structures so as to guide structural heart valve procedures. However, usage of such technologies have not been main stream yet. Other than the cost of adoption, most proceduralists have internalized the procedures and adding on a layer creates an unnecessary overlay. Of course, the hope is that this technology will improve the safety and procedural speed for less experienced proceduralists as the underpinning structural heart intervention becomes more common place. In the case of Echo-Navigator, the underlying AI works, but the adoption of the technology is limited by the lack of compelling need.

On the other hand, the use of algorithms and AI in intravascular optical coherence tomography (OCT) is so well embedded and internalized that most people do not even think of the underlying intelligence processing the images [10]. When OCT was first introduced, it produced stunning images at high resolution beyond what

intravascular ultrasound could generate. Now, newer generations of OCT can create 3-dimensional reconstructions of the vessel wall including stent struts and identifying areas of malapposition. The speed at which the acquired light signals are processed into these clear images is only possible because of the underlying algorithms and processing power. In this instance, the use of AI is invisible to users, and the AI has been so well embedded that users do not have to activate the AI to use it — it is already automatic. Such use of the AI represents successful use of AI in a way that improves the useability of the base technology to physicians without any significant burden of additional effort.

AI AS AN ADJUNCT TO DIAGNOSTIC TECHNOLOGIES

Perhaps one of the most studied use cases for AI is in the field of cardiovascular imaging [11]. In CT [12, 13] and in cardiac MRI, AI is already embedded to automate many of the processes. For example, in cardiac MRI, multiple machine learning algorithms have been developed that can do segmentation of cardiac chambers [14–17]. Industry has embedded AI into their technology and this includes CT scans and MRI machines, amongst others [18–20]. Where this is successfully done, it is usually behind the scenes and not obvious to the users. In that sense, this would represent successful integration of AI technologies into everyday imaging platforms.

Where the use of AI requires changes in workflow (as opposed to automation of existing processes), it becomes much harder to execute. In the sphere of echocardiography, many companies have attempted to do so. Technology by Caption (Caption Guidance), GE Healthcare (Vivid Ultra Edition), Ultramics (EchoGo), and US2.AI are all FDA approved for use in facilitating echocardiography [21]. In September 2021, the US2.AI technology received FDA clearance for the first fully automated solution measuring both 2D and Doppler cardiac ultrasound images to produce a complete patient report. The company now has to work with hospitals and clinics to determine the workflow for such a technology. There are several important questions and considerations: (1) will the technology work in the patient population? How should validation be performed?; (2) in what scenarios will the technology be inaccurate, and therefore trigger human intervention? What imaging quality is required? (3) what kind of training is required for the echocardiographer and what is the role of the echocardiographer? (4) who is responsible for the echo report? (5) what is required for audit? In a paper by Tromp et. al., the authors describe some of the underlying technology for US2.AI, including the use of

automated deep learning-based workflow to automate the view classification, annotation, and interpretation of cardiac volumes, LVEF, and E/e' ratio [9].

AI IN COMMERCIALLY AVAILABLE WEARABLES

One of the greatest promises for AI in cardiology is its use to facilitate wearable sensor technology. Of course, the use of wearables to measure steps has been around for some time. Smart watches and wearables are also useful for the measurement of physical activity intensity, step counts and heart rate. Studies have shown comparable accuracy for the Apple watch, Fitbit for heart rate and step counts but appeared to underestimate moderate-to-vigorous activity minutes [22].

However, commercial consumer technology companies like Apple, Fitbit, and Samsung have incorporated ECG recordings into the smart watches. Apple was able to demonstrate for the first time that such consumer grade technology was able to detect irregular heart rhythms and the possible presence of atrial fibrillation. Among participants in the Apple Heart Study who received notification of an irregular pulse, 34 % had atrial fibrillation on subsequent ECG patch readings and 84 % of notifications were concordant with atrial fibrillation [23]. Initially, there was both hope and consternation: hope that such technology would make for much easier detection of atrial fibrillation; and consternation that doctors' offices and emergency rooms would be flooded with worried patients having an 'irregular heart rhythm'. As it turned out, the truth is probably somewhere in between. In clinical practice, the Apple Watch identified and alerted some patients of their AF and this resulted in the necessary and appropriate care. But these numbers were not huge and there was no tidal wave of worried patients. Nonetheless, this illustrated the challenge of such technology: how can it be embedded in routine daily use, operate in the background and yet provide accurate information to the patient and the care providers when needed.

AI IN CHATBOTS, MEDICAL CONSULTATIONS AND OTHER PATIENT-FRONTING TECHNOLOGIES

Chatbots are used by banks, airports, governments, airlines, helpdesks, technology companies and a multitude of other industries. Some of them are intuitive and helpful, while others frustrate users. Regardless, chatbots and other patient-fronting human interfaces are here to stay, with several in the marketplace [24]. They can have several functions, from making or changing medical appointments, to triaging or facilitation of

medical consultations based on urgency or clinical presentation. However, for these technologies to function properly, there are two key requirements. One: the ability to interact with the human either in terms of typed or keyed data or spoken language. This means that the technology must be able to have different types of data input. In certain countries, this limits the usability of the technology. Of course, this is by no means a show-stopper as such a technology is never meant for everyone. Clinics and hospitals would need to provide multiple channels for communication. There is a possibility of duplication of work and need for multiple channels to coordinate —whether appointment slots or follow through of medical complaints. The second requirement is for the underlying intelligence embodied by the AI to be ‘smart’ enough to make the right decision, whether in triaging, ordering tests, or setting up appointments to see the right doctor. This underlying AI requires massive data for training, and there may be customization specific for each healthcare ecosystem when utilizing AI developed elsewhere.

Perhaps the most impressive demonstration of how AI has been used to transform healthcare is by China’s Ping An’s Good Doctor platform which has an entire ecosystem of online healthcare services from medical teleconsultation, pharmacy, laboratory testing [25–28]. As of June 2021, the platform reported more than 400 million users [26, 28].

For cardiology, there are various studies describing the use of machine learning algorithms to triage patients with chest pain [29, 30]. However, implementing such algorithms is a more complex problem and it remains unclear how it can fit into regular workflow in primary care or the emergency room.

AI IN ELECTRONIC HEALTH RECORDS

Integration of AI in electronic health records (EHR) represents an area of huge promise [31]. AI has the potential to support clinical documentation and data entry, real-time monitoring, clinical decision support, data extraction, data organization and risk prediction. However, these tools are not specific to cardiology. Nonetheless, in a study of gastroenterologists, AI optimization was felt to save physicians time in extracting relevant clinical information from EHRs [32]. Together with advancements in monitoring sensors, AI-based technologies have also made inroads with algorithms that provide near-real-time diagnosis [33]. The use of biosensors can also offer the potential to detect deteriorating patients, especially when couple with algorithms that harness data from EHRs. However, in this entire area, much remains to be done. Integration of AI into EHR processes with feedback loops; integration of data

from biosensors and subsequent AI analysis etc, has yet to enter mainstream practice.

REGULATORY AND LEGAL FRAMEWORK, INTERNATIONAL RULES REQUIRED

For AI to truly take-off, there has to be the right regulatory framework within each hospital, country and globally. This includes legal, ethical, insurance and financial considerations. Who certifies an AI algorithm fit for use? What standards apply? Are the standards and approvals interchangeable across nations? Are algorithms required to continuously improved? What are the quality control and audit requirements? Do physicians have the final say? Do patients and care providers understand the limitations and useability of AI? In Jan 2021, the US Food and Drug Administration published the “*Artificial Intelligence/Machine Learning (AI/ML)-Based Software as a Medical Device (SaMD) Action Plan*” from the Center for Devices and Radiological Health’s Digital Health Center of Excellence [34]. The Action Plan is a direct response to stakeholder feedback to the April 2019 discussion paper, “Proposed Regulatory Framework for Modifications to Artificial Intelligence/Machine Learning-Based Software as a Medical Device” and outlines five actions the FDA intends to take. These include (abbreviated):

1. Develop an update to the proposed regulatory framework presented in the AI/ML-based SaMD discussion paper, including through the issuance of a Draft Guidance on the Predetermined Change Control Plan.
2. Strengthen FDA’s encouragement of the harmonized development of Good Machine Learning Practice (GMLP) through additional FDA participation in collaborative communities and consensus standards development efforts.
3. Support a patient-centered approach by continuing to host discussions on the role of transparency to users of AI/ML-based devices.
4. Support regulatory science efforts on the development of methodology for the evaluation and improvement of machine learning algorithms, including for the identification and elimination of bias, and on the robustness and resilience of these algorithms to withstand changing clinical inputs and conditions.
5. Advance real-world performance pilots in coordination with stakeholders and other FDA programs, to provide additional clarity on what a real-world evidence generation program could look like for AI/ML-based SaMD.

Other than the US FDA, other countries have also put forth their own guidelines, for example in EU, Australia and Singapore [35–37]. In many ways, the field

has progressed at a pace faster than current laws and regulations. Nonetheless, for AI in cardiology to truly take-off, there will have to be greater clarity on regulations and appropriate laws to govern its use and misuse.

SUMMARY

AI is a reality in our lives. It has permeated many industries including medicine. However challenges remain in the implementation of AI technologies in medicine as a whole, and in the field of cardiology. For there to be successful AI implementation, the laws and regulations must catch up and society as a whole must learn to adapt to this new disruptive, yet enabling technology.

Conflict of interest

The authors stated that there is no potential conflict of interest.

Funding

Abbott Vascular, Boston Scientific, Astra Zeneca, Amgen, Shockwave, Bayer, Nestle, Novartis, ConnectedLife, Google, Amazon, Holmusk, Biofourmis.

Acknowledgements

Shockwave Medical, Abbott Vascular, Boston Scientific, Medtronic, Philips, Alvimedica, Bayer, Biotronik, Orbus Neich, Shockwave Medical, Amgen, Novartis, Astra Zeneca.

REFERENCES

1. <https://www.forbes.com/sites/forbestechcouncil/2021/06/07/increased-cyberattacks-on-healthcare-institutions-shows-the-need-for-greater-cybersecurity/?sh=58c657145650> (accessed 31 Dec 2021).
2. <https://www.cisecurity.org/blog/cyber-attacks-in-the-healthcare-sector/> (accessed 31 Dec 2021).
3. <https://www.weforum.org/agenda/2021/11/healthcare-cybersecurity/> (accessed 31 Dec 2021).
4. Kramer DB, Fu K. Cybersecurity Concerns and Medical Devices: Lessons From a Pacemaker Advisory. *JAMA* 2017;318(21):2077–2078. DOI: 10.1001/jama.2017.15692.
5. Baranchuk A, Refaat MM, Patton KK, et al. Cybersecurity for Cardiac Implantable Electronic Devices: What Should You Know? *J Am Coll Cardiol* 2018;71(11):1284–1288. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.01.023.
6. Stern AD, Gordon WJ, Landman AB, Kramer DB. Cybersecurity features of digital medical devices: an analysis of FDA product summaries. *BMJ Open* 2019;9(6):e025374. DOI: 10.1136/bmjopen-2018-025374.
7. Das S, Siroky GP, Lee S, Mehta D, Suri R. Cybersecurity: The need for data and patient safety with cardiac implantable electronic devices. *Heart Rhythm* 2021;18(3):473–481. DOI: 10.1016/j.hrthm.2020.10.009.
8. <https://www.forbes.com/sites/forbestechcouncil/2020/10/14/why-do-most-ai-projects-fail/?sh=1dad757a8aa3> (accessed 29 Dec 2021).
9. Tromp J, Seekings PJ, Hung CL, et al. Automated interpretation of systolic and diastolic function on the echocardiogram: a multicohort study. *Lancet Digit Health* 2022;4(1):e46–e54. DOI: 10.1016/S2589-7500(21)00235-1.
10. Chu M, Jia H, Gutierrez-Chico JL, et al. Artificial intelligence and optical coherence tomography for the automatic characterisation of human atherosclerotic plaques. *EuroIntervention* 2021;17(1):41–50. DOI: 10.4244/EIJ-D-20-01355.
11. Dey D, Slomka PJ, Leeson P, et al. Artificial Intelligence in Cardiovascular Imaging: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 2019;73(11):1317–1335. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.12.054.
12. Hampe N, Wolterink JM, van Velzen SGM, Leiner T, Isgum I. Machine Learning for Assessment of Coronary Artery Disease in Cardiac CT: A Survey. *Front Cardiovasc Med* 2019;6:172. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00172.
13. Muscogiuri G, Van Assen M, Tesche C, et al. Artificial Intelligence in Coronary Computed Tomography Angiography: From Anatomy to Prognosis. *Biomed Res Int* 2020;2020:6649410. DOI: 10.1155/2020/6649410.
14. Bai W, Sinclair M, Tarroni G, et al. Automated cardiovascular magnetic resonance image analysis with fully convolutional networks. *J Cardiovasc Magn Reson* 2018;20(1):65. DOI: 10.1186/s12968-018-0471-x.
15. Tan LK, McLaughlin RA, Lim E, Abdul Aziz YF, Liew YM. Fully automated segmentation of the left ventricle in cine cardiac MRI using neural network regression. *J Magn Reson Imaging* 2018;48(1):140–152. DOI: 10.1002/jmri.25932.
16. Chen C, Qin C, Qiu H, et al. Deep Learning for Cardiac Image Segmentation: A Review. *Front Cardiovasc Med* 2020;7:25. DOI: 10.3389/fcvm.2020.00025.
17. Upendra RR, Dangi S, Linte CA. Automated Segmentation of Cardiac Chambers from Cine Cardiac MRI Using an Adversarial Network Architecture. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 2020;11315. DOI: 10.1117/12.2550656.
18. <https://www.philips.com.sg/healthcare/resources/landing/ct-precise-suite> (Accessed 29 Dec 2021).
19. <https://www.gehealthcare.com/article/ai-at-the-point-of-care-x-ray-and-ct> (accessed 29 Dec 2021).
20. <https://new.siemens.com/global/en/company/stories/research-technologies/artificial-intelligence/artificial-intelligence-imaging-techniques.html> (accessed 29 Dec 2021).

21. Quer G, Arnaout R, Henne M, Arnaout R. Machine Learning and the Future of Cardiovascular Care: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 2021;77(3):300–313. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.030.
22. Bai Y, Tompkins C, Gell N, Dione D, Zhang T, Byun W. Comprehensive comparison of Apple Watch and Fitbit monitors in a free-living setting. *PLoS One* 2021;16(5):e0251975. DOI: 10.1371/journal.pone.0251975.
23. Perez MV, Mahaffey KW, Hedlin H, et al. Large-Scale Assessment of a Smartwatch to Identify Atrial Fibrillation. *N Engl J Med* 2019;381(20):1909–1917. DOI: 10.1056/NEJMoa1901183.
24. <https://medicalfuturist.com/top-12-health-chatbots/> (accessed 29 Dec 2021).
25. <https://finance.yahoo.com/news/ping-good-doctor-unveils-strategic-090800676.html> (accessed 29 Dec 2021).
26. https://finance.yahoo.com/news/halfway-2021-ping-good-doctor-062000451.html?guccounter=1&guce_referrer=aHR0cHM6Ly93d3cuZ29vZ2x1LmNvbS8&guce_referrer_sig=AQAAAHoOoR0XlmmwEDb1blzzEH8BU23gTixRPUZP7IRAeLG0fb3Kma4G3cOGF40Vm10CnTYdvK5au0f04gWuprz36l0z0E0UhiKtykh8Yml7dYphMrbsYLe_1r6hOG6QstH4xw9MmiDTGHZ7cEZxvuWGbPpnvdfG31zYnParEXtbDAFD (accessed 29 Dec 2021).
27. <https://www.scmp.com/business/article/3050074/ping-good-doctor-chinas-largest-health-care-platform-reports-jump-users>.
28. <https://group.pingan.com/media/news/News-2020/Ping-An-Unveils-Health-Care-Ecosystem-Strategy.html>.
29. Zhang PI, Hsu CC, Kao Y, et al. Real-time AI prediction for major adverse cardiac events in emergency department patients with chest pain. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2020;28(1):93. DOI: 10.1186/s13049-020-00786-x.
30. Stewart J, Lu J, Goudie A, et al. Applications of machine learning to undifferentiated chest pain in the emergency department: A systematic review. *PLoS One* 2021;16(8):e0252612. DOI: 10.1371/journal.pone.0252612.
31. <https://hbr.org/2018/12/using-ai-to-improve-electronic-health-records> (accessed 31 Dec 2021).
32. Chi EA, Chi G, Tsui CT, et al. Development and Validation of an Artificial Intelligence System to Optimize Clinician Review of Patient Records. *JAMA Netw Open* 2021;4(7):e2117391. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.17391.
33. Krittanawong C, Rogers AJ, Johnson KW, et al. Integration of novel monitoring devices with machine learning technology for scalable cardiovascular management. *Nat Rev Cardiol* 2021;18(2):75–91. DOI: 10.1038/s41569-020-00445-9.
34. <https://www.fda.gov/medical-devices/software-medical-device-samd/artificial-intelligence-and-machine-learning-software-medical-device> (accessed 31 Dec 2021).
35. [https://www.moh.gov.sg/docs/librariesprovider5/eguides/1-0-artificial-in-healthcare-guidelines-\(aihgle\)_publishedoct21.pdf](https://www.moh.gov.sg/docs/librariesprovider5/eguides/1-0-artificial-in-healthcare-guidelines-(aihgle)_publishedoct21.pdf) (accessed 31 Dec 2021).
36. <https://ec.europa.eu/futurium/en/ai-alliance-consultation.1.html> (accessed 31 Dec 2021).
37. <https://www.industry.gov.au/data-and-publications/australias-artificial-intelligence-ethics-framework> (accessed 31 Dec 2021).

Информация об авторах:

Профессор Йео Кхунг Кеонг, FAHA, FESC, FACC, FAPSC, FAMS, FAPSIC, отделение кардиологии, Национальный кардиологический центр Сингапура.

Author information:

Prof. Yeo Khung Keong, FAHA, FESC, FACC, FAPSC, FAMS, FAPSIC, Department of Cardiology, National Heart Centre Singapore.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 61:004.85

МОДЕЛИ ОБЪЯСНЕНИЯ ДИАГНОЗА КАК ЭЛЕМЕНТ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫХ СИСТЕМ ДИАГНОСТИКИ В МЕДИЦИНЕ: КРАТКИЙ ОБЗОР

Уткин Л. В., Крылова Ю. И., Константинов А. В.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Уткин Лев Владимирович,
ФГАОУ ВО СПбПУ,
ул. Политехническая, д. 29, Санкт-Петербург, Россия, 195251.
E-mail: lev.utkin@gmail.com.

Статья поступила в редакцию 20.10.2022
и принята к печати 03.11.2022.

РЕЗЮМЕ

В работе рассмотрены наиболее важные и эффективные подходы и модели объяснения и интерпретации результатов диагностики, получаемых с использованием интеллектуальных систем диагностики. Необходимость их использования обусловлена тем, что сама интеллектуальная система диагностики является «черным ящиком» и для врача важно не только получить диагноз пациента, но и понять, почему получен такой диагноз, какие элементы информации о пациенте наиболее значимы с точки зрения диагноза. Приведены обзоры основных подходов к объяснению предсказаний моделей машинного обучения в целом и применительно к медицине. Показано, как различная исходная информация о пациенте влияет на выбор моделей объяснения. Рассмотрены модели при наличии визуальной и табличной информации. Также рассмотрены модели объяснения примерами. Цель работы — обзор основных моделей объяснения и их зависимости от вида информации о пациенте.

Ключевые слова: диагноз, интеллектуальная система диагностики, машинное обучение, объяснительный интеллект, персонализированная медицина.

Для цитирования: Уткин Л.В., Крылова Ю.И., Константинов А.В. Модели объяснения диагноза как элемент интеллектуальных систем диагностики в медицине: краткий обзор. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(6):23-32. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-23-32.

EXPLANATION MODELS AS A COMPONENT OF THE INTELLIGENT COMPUTER-AIDED DIAGNOSIS SYSTEMS IN MEDICINE: A BRIEF REVIEW

Utkin L. V., Krylova Y. I., Konstantinov A. V.

Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University

Corresponding author:

Utkin Lev V.,
Peter the Great Saint-Petersburg
Polytechnic University,
Politechnicheskaya str., 29, Saint
Petersburg, Russia, 195251.
E-mail: lev.utkin@gmail.com.

Received 20 October 2022; accepted
03 November 2022.

ABSTRACT

The paper considers the most important and effective approaches and models for explaining and interpreting diagnostic results obtained using intelligent computer-aided diagnosis systems. The need to use them is due to the fact that the intelligent computer-aided diagnosis system itself is a “black box” and it is important for the doctor not only to get the patient’s diagnosis, but also to understand why such a diagnosis is stated, what elements of the patient information are the most significant from the point of view of the diagnosis. Reviews of the main approaches to explain predictions of machine learning models applied to general areas as well as to medicine are presented. It is shown how different types of the initial patient information impact on the choice of explanation models. Models are considered when visual or tabular information is available. Example-based explanation models are also studied. The purpose of the work is to review the main explanation models and their dependence on types of information about the patient.

Key words: diagnosis, explainable artificial intelligence, intelligent computer-aided diagnosis system, machine learning, personalized medicine.

For citation: Utkin LV, Krylova YI, Konstantinov AV. Explanation models as a component of the intelligent computer-aided diagnosis systems in medicine: a brief review. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):23-32. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-23-32.

Список сокращений: ИИ — искусственный интеллект, ИСД — интеллектуальные системы диагностики.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие и внедрение интеллектуальных систем диагностики (ИСД) заболеваний в настоящее время является одной из наиболее интенсивно развивающихся областей применения искусственного интеллекта (ИИ), что связано с быстрым ростом объемов обучающих данных по различным заболеваниям, с разработкой новых эффективных моделей машинного обучения (глубоких нейронных сетей, трансформеров и др.), а главное — с пониманием того, насколько ИСД в паре с врачом позволят снизить долю ошибочных диагнозов и решений. В то же время, несмотря на признание значимости ИСД в медицине, существует ряд препятствий для дальнейшего внедрения ИИ в реальные медицинские учреждения, ключевым из которых является тот факт, что ИСД имеют природу «черного ящика», что означает практическую закрытость для врача, использующего ИСД, механизма получения диагноза системой. Отсутствие четкого понимания у врача, почему система поставила тот или иной диагноз определенному пациенту, а также возможные ошибки ИСД, ее уязвимость по отношению к внешним воздействиям не позволяют специалисту доверять в полной мере диагнозу, поставленному системой, что в целом тормозит внедрение ИИ в медицине.

Для преодоления этого препятствия в последние годы интенсивно развивается направление ИИ, связанное с объяснением или интерпретацией решений, получаемых с использованием моделей машинного обучения, которое имеет различные определения и названия: объяснительный интеллект (eXplainable Artificial Intelligence — XAI), интерпретация предсказаний (prediction interpretability), просто модели объяснения (explainable models). Что позволяет, если говорить в медицинских терминах, ответить на следующие вопросы: какие элементы на снимке КТ говорят о конкретном диагнозе, что общего у пациента с другими пациентами с таким же диагнозом, почему выбранное лечение оптимально, каких симптомов не хватает, чтобы поставить другой диагноз, и т. д. Другими словами, цель такой дополнительной подсистемы, которую мы будем называть просто моделью объяснения, заключается в предоставлении врачу или другому пользователю ИСД полного объяснения выданного диагноза. И если в научной и инженерной среде отношение к использованию систем объяснительно-

го интеллекта в различных областях неоднозначно, то все сходится к единому мнению о необходимости применения этого компонента интеллектуальной поддержки в медицине.

Здесь также необходимо отметить, что ИИ в медицине не ограничивается диагностикой. Более интересные и одновременно более сложные задачи, которые также могут быть решены при помощи ИИ, заключаются в выборе оптимального лечения (оптимальной дозы лекарства, оптимального режима лечения и т. д.) с учетом характеристик пациента. Это как раз и есть реализация задачи персонализированной медицины. Однако создание самих моделей машинного обучения в рамках этого направления находится на начальной стадии, что также ограничивает и развитие соответствующих моделей объяснения. Поэтому ниже будут рассмотрены в основном модели объяснения ИСД, то есть модели объяснения в медицине.

Следует уточнить, что количество публикаций, так или иначе посвященных проблематике моделей объяснения ИСД, в настоящее время превышает все мыслимые пределы, и их полный обзор не представляется возможным. Например, обзоры, полностью посвященные моделям объяснения в самых различных областях, приведены в [1–15]. Обзоры, которые рассматривают только различные аспекты применения моделей объяснения в медицине, приведены в [16–28]. Следующие публикации могут рассматриваться как примеры использования моделей объяснения в радиологии [29], гистопатологии [30], кардиологии [31], онкологии [32–37].

Поэтому цель статьи — не делать детальный обзор всех моделей объяснения в медицине, а рассмотреть основные типы моделей объяснения, основные подходы, которые используются в медицине для объяснения и интерпретации диагноза, рассмотреть само понятие объяснения, что подразумевается под объяснением в различных моделях и при различной информации о пациенте. Кроме того, мы ограничимся рассмотрением *локальных* моделей объяснения, которые основаны на определении значимых признаков или факторов, влияющих на решение ИСД как «черного ящика» только для одного пациента. Этот случай является более интересным, так как в медицинской практике важно иметь объяснение диагноза конкретного пациента с его характеристиками. *Глобальные* модели объяснения, в отличие от локальных, определяют наиболее значимые факторы, влияющие на диагностику всех пациентов в обучающей выборке. Если говорить о медицине, то их область применения ограничена в основном задачами эпидемиологии.

ЛОКАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ОБЪЯСНЕНИЯ ДЛЯ ДАННЫХ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Локальные модели объяснения и методы представления объяснения во многом определяются типом данных, на которых обучена ИСД. Если данные получены в результате использования КТ, МРТ, УЗИ и других методов диагностики, результатом которых является 2D или 3D изображение, то одним из наиболее популярных методов представления является карта значимости (saliency map), которая представляет собой закрашивание определенных участков изображения (пикселей, вокселей), объясняющих поставленный ИСД диагноз, различными цветами, например, красным цветом выделяются самые важные участки с точки зрения объяснения. Пример карты значимости как результата функционирования модели объяснения показан на рисунке 1, где ИСД диагностировала гранулему на рентгеновском снимке, и модель объяснения выдала объяснение в виде карты значимости. Такая визуализация позволяет сразу увидеть, что является причиной диагноза. Однако и такой подход имеет недостаток. Он не позволяет увидеть некоторые скрытые элементы объяснения, которые могут быть более значимыми по сравнению с видимыми элементами. Соответствующими моделями объяснения, позволяющими получить карты значимости, являются Class Activation Mapping (CAM) [38], Gradient-weighted CAM (Grad-CAM) [39], DeepLIFT [40] и ряд других моделей. Создание карт значимости с применением этих моделей основано на использовании линейной комбинации выходных данных последнего слоя сверточной нейронной сети, реализующей ИСД.



Рис. 1. Иллюстрация карты значимости на выходе модели объяснения (МО)

Недостатком этого подхода является то, что «черный ящик» в виде нейронной сети частично «приоткрывается», то есть для реализации подхода необходима информация на последнем слое сети. Поэтому модели не могут быть реализованы как отдельные модели объяснения для готовых ИСД, доступ к программному обеспечению которых закрыт. В то же время такие модели объяснения могут быть встроены в ИСД как элемент. В таких случаях говорят об объясняемой ИСД в целом, а не о модели объяснения как отдельной метамодели.

Несмотря на достаточно широкое распространение моделей объяснения на основе карт значимости, они часто могут давать неоднозначные объяснения, что затрудняет их качественную оценку. Поэтому большой интерес привлекли модели, предоставляющие текстовые объяснения. Именно текстовые объяснения во многих случаях предпочтительнее визуальных объяснений, поскольку они по своей природе понятны людям. А совместные визуальные и текстовые объяснения позволят с большей степенью доверия относиться к решениям ИСД [41]. Такие объяснения основаны на генерации фраз, описывающих диагнозы, поставленные ИСД. В большинстве моделей объяснения генерация осуществляется в два этапа:

1. На основе произвольной модели объяснения выделяются значимые факторы (признаки, пиксели, воксели) или группы значимых факторов.
2. Группам ставится в соответствие объяснение на естественном языке. Это осуществляется с использованием языковых моделей машинного обучения или при помощи специальных словарей, в которых описывается такое соответствие, что зачастую более эффективно, особенно, когда количество вариантов текстового описания диагноза мало.

Это один из наиболее перспективных подходов для объяснения диагноза заболевания в медицине. Однако методы текстовых объяснений являются наиболее сложными с точки зрения реализации и требуют использования других методов объяснения в качестве предварительного анализа, которые выделяют значимые факторы, что позволяет устанавливать соответствие между этими факторами и фразами естественного языка. Однако, несмотря на сложность реализации, модели объяснения с текстовыми объяснениями представляют собой наиболее перспективную группу моделей, что также продиктовано возможностью использования новых языковых моделей на основе трансформеров [42]. Примером реализации модели объяснения с применением трансформеров является представленная в работе [43] модель объяснения, генериру-

ющая диагностический отчет, который содержит информацию по рентгенограмме грудной клетки.

Еще одним интересным подходом в рамках объяснения на естественном языке является использование концептов в объяснении, которые представляют собой ограниченный набор фраз-примитивов, описывающих диагнозы [44, 45]. Например, в работе [45] систематизирован список концептов, описывающих новообразование в легком, следующим образом:

- по типу: очаг, узловое образование, консолидация;
- по форме: сферическая, треугольная, неправильная;
- по структуре: солидная, частично солидная, матовое стекло;
- по включению: кальций, некроз, воздушная полость, жир, воздушная бронхограмма, гомогенная структура;
- по контуру: ровный, неровный, четкий, нечеткий, спикурообразный.

Для каждого диагноза формируется наиболее вероятное подмножество концептов в соответствии с приведенной классификацией.

ЛОКАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ОБЪЯСНЕНИЯ ДЛЯ ТАБЛИЧНЫХ ДАННЫХ

В настоящее время инструменты визуализации, например, рентгеновские снимки, компьютерная томография, ультразвук, являются одной из наиболее активных областей применения объяснительного интеллекта. Однако многие медицинские диагностические исследования также основаны на других типах данных, таких как табличные данные и данные временных рядов, которые могут быть получены из клинической информации, например, в виде электронных медицинских карт. Табличные данные и временные ряды требуют совершенно других методов объяснения. Более того, объяснение диагноза, выделяя в таких данных подмножества значимых атрибутов или факторов, является намного более важной задачей, особенно если количество данных о пациенте достаточно большое (демографические данные, клиническая информация, результаты анкетирования, лабораторные тесты, измерения основных показателей жизнедеятельности), и врачу требуется, соответственно, большее время, чтобы выделить эти подмножества самостоятельно, исходя из своего опыта. Развитие систем мобильного здравоохранения, телемедицины предлагает все больше возможностей для удаленного мониторинга состояния здоровья и накопления информации о состоянии пациента.

Интеграция между источниками данных и моделями ИИ может внести фундаментальный вклад в оказание ранней, персонализированной и высококачественной помощи. В этих условиях модели объяснения становятся важнейшей составляющей для получения эффективных объяснений как опытными врачами-экспертами, так и начинающими практикующими врачами.

Основная идея, лежащая в основе моделей объяснения для ситуации табличных данных, заключается в аппроксимации некоторой сложной неявной функции, отображающей, грубо говоря, характеристики пациента в диагноз и реализуемой при помощи ИСД, некоторой простой функцией, которая принадлежит множеству объясняемых функций. Одной из таких функций является линейная функция атрибутов или признаков данных о пациентах. Фактически мы заменяем сложную и неизвестную функцию ИСД линейной функцией в точке в пространстве признаков, определяемой конкретным пациентом, диагноз которого объясняется. Почему именно линейная функция? Потому что значения коэффициентов линейной функции являются как раз численной мерой значимости соответствующих признаков данных о пациенте. Если коэффициент при первом признаке больше коэффициента при втором признаке, то, соответственно, значимость первого признака больше, чем второго. Это выполняется, если все признаки нормированы.

Одним из самых популярных методов локальной интерпретации, основанным на линейной аппроксимации, является метод «Local Interpretable Model-agnostic Explanations» (LIME) [46]. Согласно методу LIME, модель, которая должна быть объяснена, аппроксимируется линейной моделью в локальной области вокруг интерпретируемого примера. Параметры полученной линейной модели используются для определения степени важности признаков анализируемого примера. Для этого, в соответствии с LIME, в окрестности интерпретируемого примера осуществляется генерация случайных примеров. Далее при помощи ИСД определяются метки классов сгенерированных примеров. Полученная обучающая выборка из этих примеров с их метками классов используется для построения линейной разделяющей функции, которая и является той линейной аппроксимацией, по которой можно определить значимость признаков.

Рисунок 2 иллюстрирует, как функционирует метод LIME для примеров с двумя признаками: плотность очага в легком и диаметр очага, по которым определяется наличие Covid-19. Обучающая выборка состоит из заболевших Covid-19 (треугольники) и не заболевших Covid-19 (круги). Раз-

деляющая функция между примерами из различных классов представлена в виде сплошной кривой и реализуется ИСД. Необходимо объяснить, почему пациент, изображенный в виде ромба, не болен Covid-19, то есть необходимо определить: диаметр очага или его плотность в большей степени повлияли на то, что ИСД поставила такой диагноз этому пациенту. Окрестность вокруг примера на рисунке 2 увеличена, и показаны сгенерированные примеры пациентов. Штриховая прямая (искомая линейная аппроксимация) также показана в увеличенной окрестности. Эта прямая явно соответствует большему коэффициенту для плотности очага, что соответствует его большему влиянию на то, что ИСД поставила для этого пациента диагноз «не Covid-19».

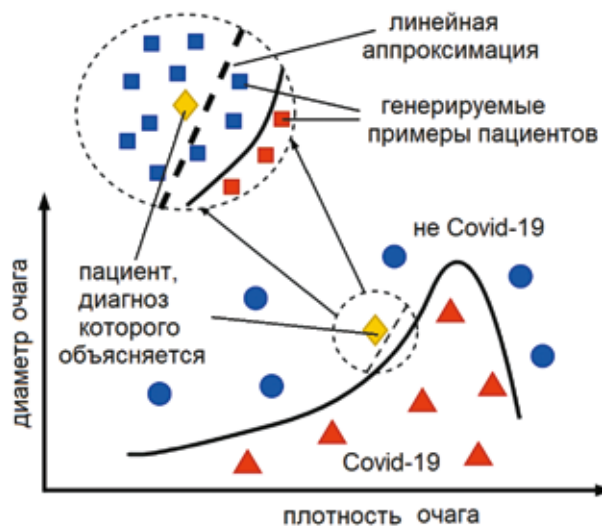


Рис. 2. Объяснение метода LIME

Выбор простой разреженной линейной модели может привести к существенным ошибкам, если функция, реализуемая ИСД, в объясняемых примерах существенно нелинейная. Кроме того, объяснения возникают из-за случайных возмущений исходного входного пространства, которые могут не отражать пример для объяснения. В то же время эффективность LIME привела к созданию целой серии модификаций метода, например, ALIME [47], DLIME [48], Anchor LIME [49], SurvLIME [50]. Одним из интересных обобщений LIME является метод Neural Additive Model (NAM) [51], который основан не на линейной аппроксимации, а на аппроксимации с использованием обобщенной аддитивной модели. В соответствии с этой моделью, аппроксимирующая функция представляется в виде суммы функций отдельных признаков. Основная идея NAM заключается в том, чтобы реализовать

эти функции в виде нейронных сетей с одним входом каждая так, что этот вход соответствует одному из признаков. Результатом функционирования NAM является набор функций, каждая из которых показывает, насколько быстро изменяется диагноз пациента при изменении определенного признака. Чем выше скорость изменения функции, тем больше значимость соответствующего признака. На рисунке 3 показана нейронная сеть, обученная на имеющейся обучающей выборке, пациенты в которой имеют признаки (пульс, давление, ..., возраст) и диагноз «атеросклероз» или его отсутствие. Функции $g_1, g_2, \dots, g_m$, реализованные обученными нейронными сетями, показывают, как изменяется вероятность атеросклероза в зависимости от каждого признака. Скорость изменения в точках со значениями пульса, давления, возраста конкретного пациента объясняет поставленный ИСД диагноз. В работе [52] предложен метод объяснения, аналогичный NAM, но вместо нейронных сетей предлагается использование моделей градиентного бустинга, что позволило значительно повысить точность объяснения для ряда баз данных.

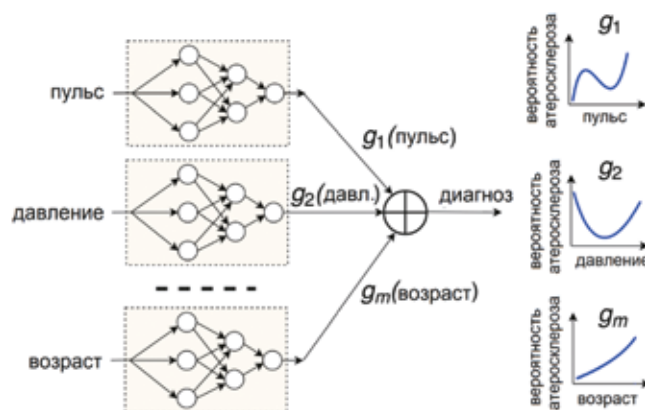


Рис. 3. Иллюстрация метода объяснения NAM

Еще один популярный метод объяснения и анализа значимости признаков объясняемого примера основан на ранжировании признаков с точки зрения их влияния на диагноз, поставленный ИСД, называется метод чисел Шепли или метод SHapley Additive exPlanations (SHAP) [53, 54]. Этот метод строит линейную регрессионную модель, коэффициенты которой определяются с применением чисел Шепли и теоретико-игрового подхода. Метод SHAP требует перебора всех возможных комбинаций признаков. Собственно, он и основан на суммарном сравнении диагнозов, выдаваемых ИСД для пар подмножеств признаков. Поэтому SHAP имеет два существенных недостатка. Во-первых,

полный перебор комбинаций признаков является вычислительно сложной задачей, и при числе признаков больше 20 использование метода не представляется возможным. Во-вторых, ИСД обучена на данных определенной размерности, и рассмотрение подмножеств признаков требует доопределения оставшихся признаков, не входящих в очередное подмножество. Решение этой задачи неоднозначно и может привести к некорректным результатам. Первую проблему частично решают модификации SHAP, например, Kernel SHAP [54] или Random SHAP [55] с сокращенным перебором подмножеств. Однако эти модификации не всегда дают гарантированное корректное объяснение.

Вышеперечисленные МО позволяют объяснять, выделяя наиболее значимые признаки, атрибуты, части изображений. Однако существуют также и другие модели, которые используют аналогичных пациентов с точки зрения их характеристик и диагноза. Такие модели называются моделями объяснения примерами или моделями, основанными на примерах.

МОДЕЛИ ОБЪЯСНЕНИЯ ПРИМЕРАМИ

Стратегия, заложенная в основной идее моделей объяснения примерами, используется в медицине врачами для объяснения причин, почему было принято определенное решение. Один из подходов, используемый в ряде моделей объяснения примерами, заключается в рассуждении на *основе прецедентов (case-based reasoning)*. При анализе диагноза нового пациента в таких моделях объяснения осуществляется поиск пациентов из базы данных с наиболее близким изображением очага, опухоли, другого региона изображения в соответствии с картой значимости, если диагноз ставится по изображению, или с наиболее близкими табличными характеристиками, если исходные данные о пациенте — табличные. Успешные примеры реализации моделей объяснения на основе прецедентов при объяснении диагнозов различных заболеваний представлены в работах [56–58].

Второй подход к реализации моделей объяснения примерами позволяет получить объяснение, основанное на противопоставлении (counterfactual explanation) [59]. Подход состоит в контролируемом возмущении данных пациента таким образом, чтобы измененные характеристики пациента «перевели» его в другой класс, то есть ИСД поставила бы другой диагноз. Оптимальные возмущения как раз и указывают те признаки, которые позволяют получить объяснение, основанное на противопоставлении. Интуиция подхода заключается в том,

что зачастую проще объяснить, чего не хватает пациенту с точки зрения его характеристик, чтобы он имел другой диагноз. Если характеристики пациента представлены в виде изображений (КТ, УЗИ и т. д.), то для реализации моделей объяснения используются порождающие нейронные сети (вариационные автокодировщики, GAN), которые фактически и осуществляют контролируемые возмущения [60, 61]. Для случая табличных данных о пациенте обзор многих моделей объяснения, основанных на противопоставлении, представлен в работе [62].

Третий подход в рамках моделей объяснения примерами основан на использовании прототипов — пациентов с определенным диагнозом, структура данных которых является «типичной» для этого диагноза и одновременно близка структуре данных объясняемого пациента. Обоснование этого подхода заключается в том, что во время обучения различные части изображения (КТ, МРТ и др.) выступают в качестве прототипов, представляющих диагнозы. Когда новое изображение необходимо оценить на этапе тестирования, сеть находит прототипы, наиболее похожие на части тестового изображения. Этот подход послужил основой для ряда моделей объяснения [63–65].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе рассмотрена только малая часть большого числа подходов и моделей объяснения и интерпретации результатов диагностики, получаемых с использованием ИСД. Сегодня модели объяснительного интеллекта являются одним из направлений в машинном обучении и ИИ, которое наиболее интенсивно развивается, что обусловило огромный рост числа публикаций, обзоров, программных продуктов, поддерживающих и реализующих соответствующие модели. Поэтому цель работы заключалась в рассмотрении нескольких наиболее важных, эффективных и популярных подходов и моделей, которые в основном перекрывают практически все направления. Было приведено большое количество современных обзоров как по моделям объяснительного интеллекта в целом, так и применительно к медицине. Так как работа ориентирована прежде всего на врача, то математического обоснования всех методов и их особенностей с точки зрения машинного обучения не было рассмотрено.

Необходимо отметить, что целый ряд моделей объяснения не был затронут. Это касается данных временных рядов и моделей выживаемости, когда ИСД анализирует время до некоторого события (рецессии, смерти и т. д.), связанного с пациентом в условиях цензурированности выборки. Важной

особенностью этих моделей является то, что ИСД выдает не диагноз, а вероятностные характеристики времени до события в виде некоторой вероятностной функции времени, например, в виде функции риска или функции выживаемости. В таких задачах объяснение, почему конкретный пациент имеет определенную функцию выживаемости, приобретает новый смысл. Анализ моделей объяснения для таких ситуаций является задачей для дальнейших исследований. Другой важный пласт проблем связан с проблемой оценки эффективности лечения для конкретного пациента. Объяснение, почему для этого пациента необходима определенная доза лекарства, а не какая-то другая, является также важнейшей задачей для дальнейших исследований.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-11-00116). / This work is supported by the Russian Science Foundation under grant 21-11-00116.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Adadi A, Berrada M. Peeking inside the black-box: a survey on explainable artificial intelligence (XAI) // IEEE Access. 2018; 6:52138–52160.
2. Angelov PP, Soares EA, Jiang R, et al. Explainable artificial intelligence: an analytical review // Wiley Interdisciplinary Reviews: Data Mining and Knowledge Discovery. 2021; 11(5):1424.
3. Bodria F, Giannotti F, Guidotti R, et al. Benchmarking and survey of explanation methods for black box models // arXiv:2102.13076. 2021 Feb.
4. Burkart N, Huber, MF. A survey on the explainability of supervised machine learning // Journal of Artificial Intelligence Research. 2021; 70:245–317.
5. Cambria E, Malandri L, Mercorio F, et al. A survey on XAI and natural language explanations // Information Processing & Management. 2023; 60(1): 103111.
6. Carvalho DV, Pereira EM, Cardoso JS. Machine learning interpretability: A survey on methods and metrics // Electronics. 2019; 8(8):832.
7. Guidotti R, Monreale A, Ruggieri S, et al. A survey of methods for explaining black box models // ACM Computing Surveys. 2019; 51(5):1–42.
8. Krenn M, Pollice R, Guo SY, et al. On scientific understanding with artificial intelligence // Nature Reviews Physics. 2022 Oct 11:1–9.
9. Li Z, Zhu Y and Matthijs van Leeuwen. A Survey on Explainable Anomaly Detection // arXiv:2210.06959 (2022).
10. Marcinkevics R and Vogt JE Interpretability and explainability: A machine learning zoo mini-tour // arXiv:2012.01805. Jan 2020.
11. Minh D, Wang HX, Li Y, et al. Explainable artificial intelligence: a comprehensive review // Artificial Intelligence Review. 2021:1–66.
12. Sahakyan M, Aung Z, Rahwan T. Explainable artificial intelligence for tabular data: A survey // IEEE Access. 2021; 9:135392–135422.
13. Schwalbe G, Finzel B. XAI method properties: A (meta-) study // arXiv:2105.07190. 2021 May.
14. Sejr JH, Schneider-Kamp A. Explainable outlier detection: What, for Whom and Why? // Machine Learning with Applications. 2021; 6:100172.
15. Zhang Q, Zhu SC. Visual interpretability for deep learning: a survey // Frontiers of Information Technology & Electronic Engineering. 2018; 19(1):27–39.
16. Di Martino F, Delmastro F. Explainable AI for clinical and remote health applications: a survey on tabular and time series data // Artificial Intelligence Review. 2022:1–55.
17. Holzinger A, Langs G, Denk H, et al. Causability and explainability of artificial intelligence in medicine // WIREs Data Mining and Knowledge Discovery. 2019; 9(4): 1–13.
18. Jin D, Sergeeva E, Weng W-H, et al. Explainable deep learning in healthcare: A methodological survey from an attribution view // WIREs Mechanisms of Disease. 2022; Vol.14(3):1–25.
19. Loh HW, Ooi CP, Seoni S, et al. Application of Explainable Artificial Intelligence for Healthcare: A Systematic Review of the Last Decade (2011–2022) // Computer Methods and Programs in Biomedicine. 2022 Sep 27:107161.
20. Mohanty A, Mishra S. A Comprehensive Study of Explainable Artificial Intelligence in Healthcare // Augmented Intelligence in Healthcare: A Pragmatic and Integrated Analysis. Springer, Singapore. 2022: 475–502.
21. Patricio C, Neves JC, Teixeira LF. Explainable Deep Learning Methods in Medical Imaging Diagnosis: A Survey // arXiv:2205.04766, May, 2022.
22. Payrovnaziri SN, Chen Z, Rengifo-Moreno P, et al. Explainable artificial intelligence models using real-world electronic health record data: a systematic scoping review // Journal of the American Medical Informatics Association. 2020; 27(7):1173–1185.
23. Singh A, Sengupta S, Lakshminarayanan V. Explainable Deep Learning Models in Medical Image Analysis // Journal of Imaging. 2020 Jun 20; 6(6):52.
24. Slijepcevic D, Horst F, Lapuschkin S, et al. Explaining machine learning models for clinical

gait analysis // *ACM Transactions on Computing for Healthcare (HEALTH)*. 2021; 3(2):1–27.

25. Tjoa E, Guan C. A survey on explainable artificial intelligence (XAI): Toward medical XAI // *IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems*. 2020; 32(11): 4793–4813.

26. Tonekaboni S, Joshi S, McCradden MD, et al. What clinicians want: contextualizing explainable machine learning for clinical end use // *Machine Learning for Healthcare Conference*. PMLR. 2019:359–380.

27. Utkin LV, Meldo AA, Kovalev MS, et al. A Review of Methods for Explaining and Interpreting Decisions of Intelligent Cancer Diagnosis Systems // *Scientific and Technical Information Processing*. 2021; Vol. 48(5):398–405.

28. Yang CC. Explainable Artificial Intelligence for Predictive Modeling in Healthcare // *Journal of Healthcare Informatics Research*. 2022; 6(2):228–239.

29. Reyes M, Meier R, Pereira S, et al. On the interpretability of artificial intelligence in radiology: challenges and opportunities // *Radiology: Artificial Intelligence*. 2020 May 27; 2(3):e190043.

30. Abdelsamea MM, Zidan U, Senousy Z, et al. A survey on artificial intelligence in histopathology image analysis // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Data Mining and Knowledge Discovery*. 2022:e1474.

31. Sakai A, Komatsu M, Komatsu R, et al. Medical professional enhancement using explainable artificial intelligence in fetal cardiac ultrasound screening // *Biomedicine*. 2022; 10(3):551.

32. Lamy JB, Sekar B, Guezennec G, et al. Explainable artificial intelligence for breast cancer: A visual case-based reasoning approach // *Artificial intelligence in medicine*. 2019; 94:42–53.

33. Rodríguez-Sampaio M, Rincón M, Valladares-Rodríguez S, et al. Explainable Artificial Intelligence to Detect Breast Cancer: A Qualitative Case-Based Visual Interpretability Approach // *International Work-Conference on the Interplay Between Natural and Artificial Computation*. Springer, Cham. 2022:557–566.

34. Hauser K, Kurz A, Haggenmüller S, et al. Explainable artificial intelligence in skin cancer recognition: A systematic review // *European Journal of Cancer*. 2022; 167: 54–69.

35. Alsinglawi B, Alshari O, Alorjani M, et al. An explainable machine learning framework for lung cancer hospital length of stay prediction // *Scientific Reports*. 2022; 12(1):1–10.

36. Kobylińska K, Orłowski T, Adamek M, et al. Explainable Machine Learning for Lung Cancer Screening Models // *Applied Sciences*. 2022; 12(4):1926.

37. Pintelas E, Liaskos M, Livieris IE, et al. Explainable machine learning framework for image classification problems: case study on glioma cancer prediction // *Journal of Imaging*. 2020; 6(6):37.

38. Zhou B, Khosla A, Lapedriza A, et al. Learning Deep Features for Discriminative Localization // *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. 2016:2921–2929.

39. Selvaraju RR, Cogswell M, Das A, et al. Grad-CAM: Visual Explanations from Deep Networks via Gradient-based Localization // *Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV)*. 2017:618–626.

40. Shrikumar A, Greenside P, Kundaje A. Learning Important Features Through Propagating Activation Differences // *Proceedings of the International Conference on Machine Learning (ICML)*. 2017; Vol. 70:3145–3153.

41. Gale W, Oakden-Rayner L, Carneiro G, et al. Producing Radiologist-Quality Reports for Interpretable Deep Learning // *Proceedings of the IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*. 2019:1275–1279.

42. Vaswani A, Shazeer N, Parmar N, et al. Attention Is All You Need // *Advances in Neural Information Processing Systems*. 2017:5998–6008.

43. Chen Y, Song Z, Chang TH, Wan X. Generating Radiology Reports via Memory-driven Transformer // *Proceedings of the Conference on Empirical Methods in Natural Language Processing (EMNLP)*. 2020:1439–1449.

44. Graziani M, Andrearczyk V, Marchand-Maillet S, Müller H. Concept attribution: Explaining CNN decisions to physicians // *Computers in Biology and Medicine*. 2020; 123:103865.

45. Meldo AA, Utkin LV, Kovalev MS, et al. The natural language explanation algorithms for the lung cancer computer-aided diagnosis system // *Artificial Intelligence in Medicine*. 2020; 108:1–10.

46. Ribeiro MT, Singh S, Guestrin C. Why should I trust you? Explaining the predictions of any classifier // *arXiv:1602.04938*, Aug 2016.

47. Shankaranarayana SM, Runje D. Alime: Autoencoder based approach for local interpretability // *International Conference on Intelligent Data Engineering and Automated Learning*. Springer. 2019:454–463.

48. Zafar MR, Khan NM. DLIME: A deterministic local interpretable model-agnostic explanations approach for computer-aided diagnosis systems // *arXiv:1906.10263*, Jun 2019.

49. Ribeiro MT, Singh S, Guestrin C. Anchors: High-precision model-agnostic explanations // *AAAI Conference on Artificial Intelligence*. 2018:1527–1535.

50. Kovalev MS, Utkin LV, Kasimov EM. SurvLIME: A method for explaining machine learning survival models // *Knowledge-Based Systems*. 2020; 203:106164.

51. Agarwal R, Melnick L, Frosst N, et al. Neural additive models: Interpretable machine learning with neural nets // *Advances in Neural Information Processing Systems*. 2021; 34:4699–4711.

52. Konstantinov AV, Utkin LV. Interpretable machine learning with an ensemble of gradient boosting machines // Knowledge-Based Systems. 2021; 222:1–16.
53. Strumbel E, Kononenko I. An efficient explanation of individual classifications using game theory // Journal of Machine Learning Research. 2010; 11:1–18.
54. Lundberg SM, Lee S-I. A unified approach to interpreting model predictions // Advances in Neural Information Processing Systems. 2017:4765–4774.
55. Utkin LV, Konstantinov AV. Ensembles of Random SHAPs // arXiv:2103.03302, Mar., 2021.
56. Tschandl P, Argenziano G, Razmara M, et al. Diagnostic Accuracy of Content Based Dermatoscopic Image Retrieval with Deep Classification Features // British Journal of Dermatology 181. 2019; 1 (2019):155–165.
57. Barata C and Santiago C. Improving the Explainability of Skin Cancer Diagnosis Using CBIR // Proceedings of the International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI). 2021:550–559.
58. Sadeghi M, Chilana PK, Atkins MS. How Users Perceive Content-based Image Retrieval for Identifying Skin Images // Understanding and Interpreting Machine Learning in Medical Image Computing Applications. 2018:141–148.
59. Fong RC, Vedaldi A. Interpretable explanations of black boxes by meaningful perturbation // Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision, IEEE. 2017:3429–3437.
60. Schutte K, Moindrot O, Hérent P, et al. Using StyleGAN for Visual Interpretability of Deep Learning Models on Medical Images // arXiv:2101.07563, Jan (2021).
61. Kim J, Kim M, Ro YM. Interpretation of Lesional Detection via Counterfactual Generation // Proceedings of the IEEE International Conference on Image Processing (ICIP). 2021:96–100.
62. Guidotti R. Counterfactual explanations and how to find them: literature review and benchmarking // Data Mining and Knowledge Discovery. 2022 Apr 28:1–55.
63. Kim S, Seo M, Yoon S. XProtoNet: Diagnosis in Chest Radiography with Global and Local Explanations // Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR). 2021:15719–15728.
64. Ming Y, Xu P, Qu H, et al. Interpretable and steerable sequence learning via prototypes // Proceedings of the 25th ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery & Data Mining. 2019:903–913.
65. Oscar L, Hao L, Chaofan C, et al. Deep learning for case-based reasoning through prototypes: A neural network that explains its predictions // Proceedings of the AAAI Conference on Artificial Intelligence (AAAI). 2018; 32:3530–3537.

Информация об авторах:

Уткин Лев Владимирович, д.т.н., профессор Высшей школы искусственного интеллекта ФГАОУ ВО СПбПУ;

Крылова Юлия Игоревна, аспирант ФГАОУ ВО СПбПУ;

Константинов Андрей Владимирович, аспирант ФГАОУ ВО СПбПУ.

Author information:

Utkin Lev V., Ph.D., Dr.Sci., Professor, the Higher School of Artificial, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University;

Krylova Julia Y., PhD Student, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University;

Konstantinov Andrei V., PhD Student, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 577.161.2:578.834.1

100 ЛЕТ ВИТАМИНУ D. УРОВЕНЬ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ВИТАМИНОМ D В ПАНДЕМИЮ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

**Головатюк К. А., Лагутина Д. И., Михайлова А. А., Черникова А. Т.,
Каронова Т. Л.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Головатюк Ксения Андреевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: ksgolovatiuk@gmail.com

Статья поступила в редакцию 02.11.2022
и принята к печати 26.11.2022.

РЕЗЮМЕ

В 2022 году отмечается 100 лет с момента открытия витамина D, и, по данным эпидемиологических исследований, его недостаток и дефицит остаются широко распространенным явлением как в России, так и во всем мире. В то время как новая коронавирусная инфекция представляет собой серьезный вызов для мирового здравоохранения, появляется все больше данных, позволяющих рассматривать дефицит витамина D как модифицируемый фактор, ухудшающий течение COVID-19. В настоящем обзоре приведены возможные механизмы, обуславливающие иммуномодулирующие эффекты витамина D, а также обсуждаются данные, отражающие связь между уровнем обеспеченности витамином D и течением новой коронавирусной инфекции. Кроме того, рассмотрены результаты исследований, посвященных возможностям терапии препаратами витамина D у больных COVID-19.

Ключевые слова: витамин D, COVID-19, SARS-CoV-2, 25(OH)D.

Для цитирования: Головатюк К.А., Лагутина Д.И., Михайлова А.А., Черникова А.Т., Каронова Т.Л. 100 лет витамину D. Уровень обеспеченности витамином D в пандемию новой коронавирусной инфекции. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(6):33-41. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-33-41.

100 YEARS OF VITAMIN D. THE IMPACT OF VITAMIN D LEVEL IN THE TIME OF COVID-19 PANDEMIC

Golovatyuk K. A., Lagutina D. I., Mikhailova A. A., Chernikova A. T., Karonova T. L.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Golovatyuk Ksenia A.,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: ksgolovatiuk@gmail.com

Received 02 November 2022; accepted
26 November 2022.

ABSTRACT

The year 2022 marks the 100th anniversary of the vitamin D discovery, however, vitamin D insufficiency and deficiency is globally widespread both in Russia and around the world. At the same time, the COVID-19 pandemic poses a serious challenge to global health. To date, more and more evidence is emerging to consider vitamin D deficiency as a modifiable COVID-19 severe course risk factor. Current review presents possible mechanisms behind the immunomodulatory effects of vitamin D, as well as shows the relationship between the vitamin D level and the course of COVID-19. In addition, the therapeutic potential of cholecalciferol supplementation to standard therapy for COVID-19 is being discussed.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, 25(OH)D, vitamin D.

For citation: Golovatyuk KA, Lagutina DI, Mikhailova AA, Chernikova AT, Karonova TL. 100 years of vitamin D. The impact of vitamin D level in the time of COVID-19 pandemic. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):33-41. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-33-41.

Список сокращений: НКВИ — новая коронавирусная инфекция, 25(OH)D — 25-гидроксивитамин D, 1,25(OH)₂D — 1,25-дигидроксиколекальциферол, CYP27B1 — 1-альфа-гидроксилаза, IFN — интерферон, Ig — иммуноглобулин, IL — интерлейкин, Th — Т-хелперы, TLR — толл-подобные рецепторы, TNF — фактор некроза опухоли, VDR — рецептор витамина D.

ВВЕДЕНИЕ

В 2022 году отмечается 100 лет с тех пор, как биохимики Элмер Макколлум и Маргарит Дэвис с коллегами сообщили об открытии «антирахитического» вещества, впоследствии получившего название «витамин D». Вскоре после того, как в 1922 году был описан витамин D, за расшифровку его свойств и структуры Адольфу Виндаусу была присуждена Нобелевская премия по химии, что еще больше увеличило интерес к исследованиям данного нутриента [1]. Несмотря на активное изучение витамина D, наличие клинических рекомендаций, направленных на профилактику и лечение его дефицита, на сегодняшний день остается широко распространенной проблема недостаточной обеспеченности им как в России, так и во всем мире [2, 3]. Результаты исследований, выполненных с момента начала пандемии новой коронавирусной инфекции (НКВИ), показали, что дефицит витамина D может представлять собой модифицируемый фактор риска заболеваемости и тяжелого течения COVID-19 [4]. Целью обзора является анализ накопленных на сегодня данных о связи между уровнем обеспеченности витамином D и течением, прогнозом COVID-19, а также о возможности применения колекальциферола у больных COVID-19.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ВИТАМИНЕ D

Витамин D относится к классу жирорастворимых витаминов и играет важную роль не только в регуляции кальций-фосфорного обмена, но и в поддержании здоровья многих систем и органов. Сам колекальциферол образуется в коже под действием ультрафиолетовых лучей В-типа, а также поступает с пищей или в качестве добавок. В организме витамин D подвергается дальнейшим преобразованиям. В первую очередь, с участием 25-гидроксилазы в печени происходит образование неактивной транспортной формы витамина D — 25-гидроксивитамина D (25(OH)D), который далее превращается в активную форму — кальцитриол, или 1,25-дигидроксиколекальциферол (1,25(OH)₂D) при участии 1-альфа-гидроксилазы [5].

Именно активная форма витамина D посредством связывания с ядерными рецепторами (VDR) приводит к транскрипции широкого спектра генов и реализации ряда функций [6]. Вскоре после открытия витамина D была изучена его связь с паратиреоидным гормоном и его роль в регуляции минерального и костного гомеостаза, а добавки витамина D показали свою эффективность в профилактике и лечении рахита у детей и остеопороза у взрослых [7]. Сегодня витамин D является одним из самых исследуемых нутриентов, а его дефицит рассматривается с позиции вовлеченности в патогенетические аспекты развития многих социально значимых заболеваний, включая сахарный диабет, ожирение, онкологические и аутоиммунные заболевания. За последние десятилетия накоплены знания и об иммуномодулирующих эффектах витамина D [8, 9], вкладе его недостатка и дефицита в течение и прогноз инфекционных заболеваний, включая респираторные вирусные инфекции [10] и, что особенно актуально, COVID-19 [4].

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ВИТАМИНА D

Результаты ранее проведенных исследований показали, что витамин D является участником как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа, что обусловлено наличием в иммунных клетках VDR и экспрессией гена CYP27B1, кодирующего фермент 1-альфа-гидроксилазу, посредством которого, как описано выше, происходит превращение циркулирующей формы в активный D гормон [11–13]. Одна из функций витамина D связана с распознаванием макрофагами патогенных микроорганизмов. Так, при активации вирусами специфических Toll-подобных и RIG-I-подобных рецепторов происходит увеличение экспрессии CYP27B1, что позволяет локально повышать концентрацию кальцитриола и индуцировать синтез антимикробных пептидов — дефензинов [13] и кателицидина LL-37 [14]. Также посредством повышения синтеза ингибитора транскрипционного фактора NF-κB витамин D способствует подавлению пролиферации и дифференцировки Т-хелперов (Th) со снижением уровня Th17 и изменением баланса с преобладанием Th2 по отношению к Th1, что приводит к уменьшению экспрессии генов провоспалительных цитокинов и синтезу противовоспалительных цитокинов [15] (рис. 1).

Анализ популяционных исследований показал высокую распространенность низкого уровня 25(OH)D в сыворотке крови в зимние и весенние месяцы [2], что совпадает с пиком заболеваемо-

сти острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ) и может косвенно свидетельствовать о наличии между ними связи. Результаты предыдущих исследований продемонстрировали снижение заболеваемости и тяжести течения ОРВИ у лиц с нормальным уровнем обеспеченности витамином D или дополнительно получающих препараты колекальциферола [10, 16–18]. В Великобритании в ходе исследования, включившего 6789 участников, выявлено, что увеличение уровня 25(OH)D на каждые 10 нмоль/л уменьшает риск заболеваемости ОРВИ на 7 % [19]. Также в плацебо-контролируемом исследовании школьники, получавшие колекальциферол в дозе 1200 МЕ/сут, имели более низкую заболеваемость гриппом в зимний период [20]. Применение высоких доз колекальциферола (100 000 МЕ/мес.) было ассоциировано со снижением заболеваемости ОРВИ по сравнению со стандартными дозами у пожилых пациентов [21]. В то же время результаты интервенционного исследования здоровых взрослых в Новой Зеландии не показали клинического преимущества приема 200 000 МЕ колекальциферола в течение двух месяцев с последующим

переходом на прием 100 000 МЕ /мес. по сравнению с приемом плацебо [22].

Таким образом, принимая во внимание известные иммуномодулирующие эффекты витамина D, имеющиеся на сегодня данные о положительном влиянии терапии колекальциферолом позволяют рассматривать дефицит витамина D как дополнительный модифицируемый фактор, оказывающий влияние на течение НКВИ.

СТЕПЕНЬ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ВИТАМИНОМ D У БОЛЬНЫХ COVID-19

За последние 3 года появились работы, демонстрирующие эффекты витамина D как антагониста избыточной иммунной реакции, определяющей тяжелое течение COVID-19 [23–25]. Результаты большинства наблюдательных исследований и метаанализов продемонстрировали высокую распространенность дефицита витамина D у больных, госпитализированных с COVID-19 [26–28]. Так, результаты ретроспективного анализа тестов методом полимеразной цепной реакции на SARS-CoV-2 у 191 779 участников с известным уровнем 25(OH)D

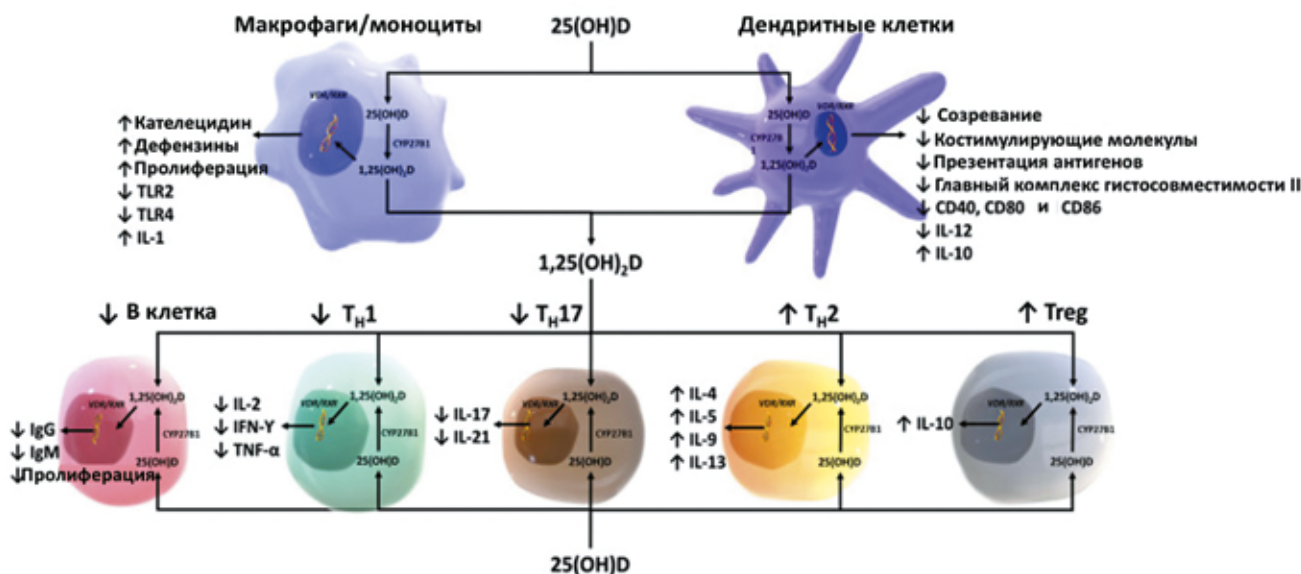


Рис. 1. Влияние витамина D и его метаболитов на врожденную и адаптивную иммунную систему.

Адаптировано из [Charoenngam N, Shirvani A, Holick MF. Vitamin D and Its Potential Benefit for the COVID-19 Pandemic. *Endocr Pract.* 2021 May;27(5):484–493. DOI: 10.1016/j.epracs.2021.03.006.]

Примечание: IFN — интерферон; Ig — иммуноглобулин; IL — интерлейкин; TLR — толл-подобные рецепторы; TNF — фактор некроза опухоли; VDR — рецептор витамина D; 25(OH)D — 25-гидроксивитамин D; 1,25(OH)₂D — 1,25-дигидроксиколекальциферол; CYP27B1 — 1-альфа-гидроксилаза.

показали более высокую заболеваемость COVID-19 у лиц с низким уровнем обеспеченности витамином D [29]. Такие же результаты были получены и в других работах [30, 31]. В то же время данные британского исследования подобную закономерность не продемонстрировали [32].

В некоторых странах уровень 25(OH)D менее 12 нг/мл был ассоциирован с более высоким риском применения инвазивной вентиляции легких [33], и в 2,58 раза увеличивал риск летального исхода [34]. Результаты метаанализа, проведенного М. О. Кауа и соавторами, включившего 205 869 больных, показали, что недостаток и дефицит 25(OH)D в сыворотке крови в 1,64 раза повышает заболеваемость COVID-19, а уровень менее 20 нг/мл увеличивает риск тяжелого течения в 2,42 раза [27]. Схожие результаты показаны и в метаанализе М. Pereira и соавторов, где низкий уровень 25(OH)D был ассоциирован с более тяжелым течением COVID-19, увеличением длительности госпитализации (OR = 1,81, 95 % CI = 1,41–2,21) и риска летального исхода (OR = 1,82, 95 % CI = 1,06–2,58) [35]. О. D'Ecclesiis и коллеги при анализе данных 15 исследований также показали связь между дефицитом витамина D и более высоким риском летального исхода при COVID-19 [36]. Однако имеются и противоположные результаты. Так, например, А. Pizzini и соавторы, несмотря на подтвержденную высокую распространенность дефицита витамина D у госпитализированных пациентов с COVID-19, не выявили его влияния на исход заболевания [37].

Результаты пилотного исследования, проведенного в НМИЦ им. В. А. Алмазова в конце весны 2020 года, оказались сопоставимыми с данными мировой литературы. В ходе исследований была продемонстрирована высокая распространенность дефицита витамина D у госпитализированных пациентов. Среди 311 больных COVID-19 средней и тяжелой степени тяжести только 69 (22,2 %) пациентов имели нормальный уровень 25(OH)D в сыворотке крови, 185 (59,5 %) — недостаток, а 57 (18,3 %) — дефицит витамина D. Авторами установлено, что у пациентов с дефицитом/недостатком витамина D чаще наблюдалось тяжелое течение COVID-19 по сравнению с больными с нормальным уровнем 25(OH)D — 50,4 % и 8,7 % соответственно ($p < 0,001$). Также оказалось, что пациенты с дефицитом/недостатком витамина D чаще получали лечение в условиях ОРИТ и имели большую продолжительность госпитализации в сравнении с лицами с нормальным уровнем 25(OH)D в сыворотке крови ($p < 0,05$). Проведенный статистический анализ показал, что уровень 25(OH)D менее 11,4 нг/мл ассоциирован с увеличением риска летальности при COVID-19 [38].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ВИТАМИНОМ D

На основании вышепредставленных данных можно предположить, что нормализация уровня обеспеченности витамином D может рассматриваться как один из способов влияния на инфицирование SARS-CoV-2, а также применяться в качестве дополнительной терапии при COVID-19.

Исследования эффективности применения добавок витамина D в остром периоде COVID-19 в настоящее время имеют неоднозначные результаты. Многоцентровое исследование, проведенное в Великобритании, продемонстрировало снижение смертности больных при ежедневном использовании колекальциферола как в дозировке 800–2000 МЕ/сут, так и 300 000 МЕ, разделенной на несколько приемов [35]. Результаты популяционного исследования в Испании показали снижение риска заражения SARS-CoV-2 при достижении уровня 25(OH)D в сыворотке крови ≥ 30 нг/мл на фоне терапии колекальциферолом. В целом, использование болюсных доз колекальциферола в остром периоде COVID-19 показало свою эффективность у пациентов с исходно низким уровнем 25(OH)D при достижении значений выше 30 нг/мл, а наиболее хорошие результаты — при значениях в диапазоне 40–60 нг/мл. Тем не менее, прием колекальциферола в дозе 200 000 МЕ однократно в исследовании I. H. Mugaí не оказал влияния на длительность госпитализации [39].

Эти данные явились предпосылкой к инициации интервенционного исследования на базе инфекционного отделения НМИЦ им. В. А. Алмазова. Сто десять больных были рандомизированы методом таблицы случайных чисел на две группы. Больным первой группы ($n = 56$) к основной терапии COVID-19 был добавлен болюсный прием колекальциферола в дозе 50 000 МЕ на 1-й и 8-й дни госпитализации (суммарная доза 100 000 МЕ), больные второй группы ($n = 54$) — терапию колекальциферолом не получали. Исходный уровень 25(OH)D в сыворотке крови у больных, госпитализированных в инфекционный стационар и включенных в интервенционное исследование, не различался ($p = 0,08$). Интересно, что при анализе показателя 25(OH)D на 9-й день госпитализации на фоне приема колекальциферола отмечалось повышение концентрации показателя на 40,7 % [14,0;78,4], а в группе без терапии — снижение на 18,2 % [-28,8;0].

Дополнительно в группе, получившей 100 000 МЕ колекальциферола, по сравнению с группой

контроля на 9-й день госпитализации отмечались более высокие показатели нейтрофилов ($p = 0,04$), лимфоцитов ($p = 0,02$) и более низкий уровень СРБ ($p = 0,02$). Исследователями отмечена отрицательная корреляционная связь ($r = -0,28$, $p = 0,02$) между уровнем СРБ и 25(OH)D. В то же время анализ количества летальных исходов у больных, включенных в интервенционное исследование, не показал различий между группами. Следует отметить тот факт, что доза колекальциферола не оказалась достаточной для достижения нормального уровня витамина D, с чем авторы и связывают полученные результаты [40].

Для более быстрого достижения нормальной концентрации 25(OH)D рядом исследователей было предложено использование кальцифедиола, прием которого показал свою эффективность по отношению к длительности госпитализации и частоте летальных исходов у больных с COVID-19. Так, в исследовании, проведенном М. Entrenas-Castilo, применение кальцифедиола в дозе 0,266 мг на 3-й и 7-й дни лечения в стационаре снижало риск госпитализации в ОПИТ [41]. Кроме того, снижение смертности от COVID-19 было установлено и при использовании кальцифедиола в дозе 0,532 мг в день поступления в инфекционный стационар, с последующим приемом 0,266 мг на 3-й, 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни госпитализации [42].

Учитывая роль витамина D в активации и моделировании иммунного ответа, положительный эффект от его приема при вирусных инфекциях делает перспективным использование данных препаратов в дополнение к основной терапии в условиях пандемии новой коронавирусной инфекции. Принимая во внимание тот факт, что российская Ассоциация эндокринологов в настоящее время для коррекции недостатка и дефицита витамина D рекомендует использование колекальциферола в дозе 50 000 МЕ/нед или 6000–8000 МЕ/сут в течение 4 и 8 недель соответственно, или 200 000 МЕ однократно в течение одного или двух месяцев, что соответствует международным стандартам, эти рекомендации могут быть оправданы и для больных COVID-19 [43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в период пандемии COVID-19 преобладающее количество исследований, в том числе выполненных на территории России, продемонстрировали высокую распространенность дефицита и недостатка витамина D как в общей популяции, так и у большинства госпитализированных больных, инфицированных SARS-CoV-2.

Накопленные данные свидетельствуют о том, что низкие значения 25(OH)D в сыворотке крови ассоциированы с тяжелым течением и риском летального исхода от новой коронавирусной инфекции. Результаты интервенционных исследований показали клиническое преимущество добавок витамина D. Полученные нами результаты также демонстрируют положительное влияние приема колекальциферола в дополнение к стандартной терапии при COVID-19 на клиническое течение заболевания и уровень воспалительных маркеров.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022). / This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2022-301).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Jones G. 100 YEARS OF VITAMIN D: Historical aspects of vitamin D. *Endocr Connect.* 2022;11(4):e210594. DOI:10.1530/EC-21-0594.
2. Suplotova LA, Avdeeva VA, Pigarova EA, et al. The first Russian multicenter non-interventional registry study to study the incidence of vitamin D deficiency and insufficiency in Russian Federation. *Terapevticheskii archiv.* 2021;93(10):1209–1216. In Russian [Суплотова Л.А., Авдеева В.А., Пигарова Е.А., Трошина Е.А. и др. Первое российское многоцентровое неинтервенционное регистровое исследование по изучению частоты дефицита и недостаточности витамина D в Российской Федерации у взрослых. *Терапевтический архив.* 2021; 93 (10): 1209–1216.] DOI: 10.26442/00403660.2021.10.201071.
3. Cashman KD. Global differences in vitamin D status and dietary intake: a review of the data. *Endocr Connect.* 2022;11(1):e210282. DOI:10.1530/EC-21-0282.
4. Carpagano GE, Di Lecce V, Quaranta VN, et al. Vitamin D deficiency as a predictor of poor prognosis in patients with acute respiratory failure due to COVID-19. *J Endocrinol Invest.* 2021;44(4):765–771. DOI:10.1007/s40618-020-01370-x.
5. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline

[published correction appears in J Clin Endocrinol Metab. 2011 Dec;96(12):3908. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(7):1911–1930. DOI:10.1210/jc.2011-0385.

6. Pike JW, Meyer MB, Lee SM, et al. The vitamin D receptor: contemporary genomic approaches reveal new basic and translational insights. *J Clin Invest.* 2017;127(4):1146–1154. DOI:10.1172/JCI88887.

7. Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, et al. Skeletal and Extraskeletal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. *Endocr Rev.* 2019;40(4):1109–1151. DOI:10.1210/er.2018-00126.

8. Hewison M, Freeman L, Hughes SV, et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170(11):5382–5390. DOI:10.4049/jimmunol.170.11.5382.

9. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med.* 2009;169(4):384–390. DOI:10.1001/archinternmed.2008.560.

10. Pham H, Rahman A, Majidi A, Waterhouse M, Neale RE. Acute Respiratory Tract Infection and 25-Hydroxyvitamin D Concentration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(17):3020. Published 2019 Aug 21. DOI:10.3390/ijerph16173020.

11. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311(5768):1770–1773. DOI:10.1126/science.1123933.

12. Adams JS, Ren S, Liu PT, et al. Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J Immunol.* 2009;182(7):4289–4295. DOI:10.4049/jimmunol.0803736.

13. Agier J, Efenberger M, Brzezińska-Błaszczuk E. Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(2):225–235. DOI:10.5114/cej.2015.51359.

14. Barlow PG, Svoboda P, Mackellar A, et al. Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37. *PLoS One.* 2011;6(10):e25333. DOI:10.1371/journal.pone.0025333.

15. Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)2D regulation of T cells. *Nutrients.* 2015;7(4):3011–3021. Published 2015 Apr 22. DOI:10.3390/nu7043011.

16. Preventive effects of vitamin D on seasonal influenza a in infants: a multicenter, randomized, open, controlled clinical trial / J. Zhou, et al. // *Pediatr Infect Dis J.* — 2018. — Vol. 37, № 8. — P. 749–754. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001890>

17. Effects of vitamin D supplements on influenza A illness during the 2009 H1N1 pandemic: A randomized controlled trial / M. Urashima, H. Mezawa, M. Noya, C. A. Camargo Jr // *Food Funct.* — 2014. — Vol. 5, № 9. P. 2365–2370. <https://doi.org/10.1039/c4fo00371c>. 52

18. High-dose monthly vitamin D for prevention of acute respiratory infection in older longterm care residents: a randomized clinical trial / A.A. Ginde, et al. // *J Am Geriatrics Society.* — 2017. — Vol. 65, № 3. — P. 496–503. <https://doi.org/10.1111/jgs.14679>

19. Berry D, Hesketh K, Power C, Hyppönen E. (2011). Vitamin D status has a linear association with seasonal infections and lung function in British adults. *British Journal of Nutrition*, 106(9), 1433–1440. DOI:10.1017/S0007114511001991.

20. Urashima M, Segawa T, Okazaki M, et al. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr.* 2010 May;91(5):1255–60. DOI: 10.3945/ajcn.2009.29094. Epub 2010 Mar 10. PMID: 20219962.

21. Ginde AA, Blatchford P, Breese K, et al. High-Dose Monthly Vitamin D for Prevention of Acute Respiratory Infection in Older Long-Term Care Residents: A Randomized Clinical Trial. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2017;65:496–503. DOI: 10.1111/jgs.14679. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

22. Murdoch DR, Slow S, Chambers ST et al. Effect of vitamin D3 supplementation on upper respiratory tract infections in healthy adults: the VIDARIS randomized controlled trial. *JAMA.* 2012 Oct 3;308(13):1333–9. DOI: 10.1001/jama.2012.12505. PMID: 23032549.

23. Putative roles of vitamin D in modulating immune response and immunopathology associated with COVID-19 / R. Kumar, et al. // *Virus Res.* — 2021. — Vol. 292. — P. 198235. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198235>

24. Pre-infection 25-hydroxyvitamin D3 levels and association with severity of COVID-19 illness / A. A. Dror, et al. // *PloS one.* — 2022. — Vol. 17, № 2. — P. e0263069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263069>,

25. Bikle DD. Vitamin D regulation of immune function during COVID-19 / D.D. Bikle // *Rev Endocr Metab Disord.* — 2022. — Vol. 23, № 2. P. 279–285. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09707-4>

26. Infante M, Buoso A, Pieri M et al. (2022). Low Vitamin D Status at Admission as a Risk Factor for Poor Survival in Hospitalized Patients With COVID-19: An Italian Retrospective Study, *Journal of the American Nutrition Association*, 41:3, 250–265. DOI: 10.1080/07315724.2021.1877580.

27. Kaya MO, Pamukçu E, Yakar B. The role of vitamin D deficiency on COVID-19: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Epidemiol Health.* 2021;43:e2021074. DOI: 10.4178/epih.e2021074. Epub 2021 Sep 23. PMID: 34607398; PMCID: PMC8769802.

28. Chiodini I, Gatti D, Soranna D, et al. Vitamin D Status and SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Clinical Outcomes. *Front Public Health*. 2021 Dec 22;9:736665. DOI: 10.3389/fpubh.2021.736665. PMID: 35004568; PMCID: PMC8727532.
29. Kaufman HW, Niles JK, Kroll MH, et al. SARS-CoV-2 positivity rates associated with circulating 25-hydroxyvitamin D levels. *PLoS ONE*. 2020;15(9):e0239252. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239252>.
30. D'Avolio A, Avataneo V, Manca A, et al. 25-Hydroxyvitamin D Concentrations Are Lower in Patients with Positive PCR for SARS-CoV-2. *Nutrients*. 2020 May 9;12(5):1359. DOI: 10.3390/nu12051359. PMID: 32397511; PMCID: PMC7285131^ 74.
31. Meltzer DO, Best TJ, Zhang H, et al. Association of Vitamin D Status and Other Clinical Characteristics With COVID-19 Test Results. *JAMA Netw Open*. 2020 Sep 1;3(9):e2019722. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2020.19722. PMID: 32880651; PMCID: PMC7489852.
32. Hastie CE, Mackay DF, Ho F, et al. Vitamin D concentrations and COVID-19 infection in UK Biobank. *Diabetes Metab Syndr*. 2020 Jul-Aug;14(4):561–565. DOI: 10.1016/j.dsx.2020.04.050. Epub 2020 May 7. Erratum in: *Diabetes Metab Syndr*. 2020 Sep – Oct;14(5):1315–1316. PMID: 32413819; PMCID: PMC7204679.
33. Radujkovic A, Hippchen T, Tiwari-Heckler S, Dreher S, Boxberger M, Merle U. Vitamin D Deficiency and Outcome of COVID-19 Patients. *Nutrients*. 2020 Sep 10;12(9):2757. DOI: 10.3390/nu12092757. PMID: 32927735; PMCID: PMC7551780.
34. AlSafar H, Grant WB, Hijazi R, et al. COVID-19 Disease Severity and Death in Relation to Vitamin D Status among SARS-CoV-2-Positive UAE Residents. *Nutrients*. 2021 May 19;13(5):1714. DOI: 10.3390/nu13051714. PMID: 34069412; PMCID: PMC8159141.
35. Pereira M, Damascena A D, Galvão Azevedo L M, et al. (2022). Vitamin D deficiency aggravates COVID-19: systematic review and meta-analysis, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62:5, 1308–1316, DOI: 10.1080/10408398.2020.1841090.
36. D'Ecclesiis O, Gavioli C, Martinoli C, et al. Vitamin D and SARS-CoV2 infection, severity and mortality: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2022;17(7):e0268396. Published 2022 Jul 6. DOI:10.1371/journal.pone.0268396.
37. Pizzini A, Aichner M, Sahanic S, et al. Impact of Vitamin D Deficiency on COVID-19-A Prospective Analysis from the CovILD Registry. *Nutrients*. 2020;12(9):2775. Published 2020 Sep 11. DOI:10.3390/nu12092775.
38. Karonova TL, Kudryavtsev IV, Golovatyuk KA, et al. Vitamin D Status and Immune Response in Hospitalized Patients with Moderate and Severe COVID-19. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(3):305. Published 2022 Mar 2. DOI:10.3390/ph15030305.
39. Murai IH, Fernandes AL, Sales LP, et al. Effect of a Single High Dose of Vitamin D3 on Hospital Length of Stay in Patients With Moderate to Severe COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021;325(11):1053–1060. DOI:10.1001/jama.2020.26848.
40. Karonova TL, Golovatyuk KA, Kudryavtsev IV, et al. Effect of Cholecalciferol Supplementation on the Clinical Features and Inflammatory Markers in Hospitalized COVID-19 Patients: A Randomized, Open-Label, Single-Center Study. *Nutrients*. 2022;14(13):2602. Published 2022 Jun 23. DOI:10.3390/nu14132602.
41. Entrenas Castillo M, Entrenas Costa LM, Vaquero Barrios JM, et al. "Effect of calcifediol treatment and best available therapy versus best available therapy on intensive care unit admission and mortality among patients hospitalized for COVID-19: A pilot randomized clinical study". *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020;203:105751. DOI:10.1016/j.jsbmb.2020.105751.
42. Alcalá-Díaz JF, Limia-Pérez L, Gómez-Huelgas R, et al. Calcifediol Treatment and Hospital Mortality Due to COVID-19: A Cohort Study. *Nutrients*. 2021;13(6):1760. Published 2021 May 21. DOI:10.3390/nu13061760.
43. Клинические рекомендации: дефицит витамина D у взрослых: диагностика, лечение и профилактика / Е. А. Пигарова и др. — Москва, 2015.

Информация об авторах:

Головатюк Ксения Андреевна, лаборант-исследователь НИЛ клинической эндокринологии Института эндокринологии, врач-эндокринолог эндокринологического отделения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Лагутина Дарья Ивановна, лаборант-исследователь НИЛ новой коронавирусной инфекции и постковидного синдрома НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ординатор кафедры эндокринологии ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Михайлова Арина Алексеевна, лаборант-исследователь НИЛ новой коронавирусной инфекции и постковидного синдрома НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ординатор кафедры эндокринологии ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Черникова Алёна Тимуровна, младший научный сотрудник НИЛ клинической эндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Каронова Татьяна Леонидовна, д.м.н., заведующий НИЛ новой коронавирусной инфекции и постковидного синдрома НЦМУ «Центр персонализирован-

ной медицины», главный научный сотрудник НИЛ клинической эндокринологии Института эндокринологии, профессор кафедры эндокринологии ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Golovatyuk Ksenia A., MD, laboratory research assistant of Clinical Endocrinology Laboratory of the Institute of Endocrinology of Almazov National Medical Research Centre;

Mikhailova Arina A., laboratory research assistant of New Coronavirus Infection and Postcovid Syndrome Laboratory of World-Class Research Centre for Personalized Medicine, resident of the Department of Endocrinology, specialty "Endocrinology" of Almazov National Medical Research Centre;

Lagutina Daria I., laboratory research assistant of New Coronavirus Infection and Postcovid Syndrome Laboratory of World-Class Research Centre for Personalized Medicine, resident of the Department of Endocrinology, specialty "Endocrinology" of Almazov National Medical Research Centre;

Chernikova Alena T., MD, junior researcher of Clinical Endocrinology Laboratory of the Institute of Endocrinology of Almazov National Medical Research Centre;

Karonova Tatiana L., MD, D. Sc. (Med.), head of New Coronavirus Infection and Postcovid Syndrome Laboratory of World-Class Research Centre for Personalized Medicine, chief researcher of Clinical Endocrinology Laboratory, professor of the Department of internal medicine of Almazov National Medical Research Centre.

ISSN 2782-3806

ISSN 2782-3814 (Online)

УДК [613.166+612.17]:159.944.4

ВЫСОКАЯ ТЕМПЕРАТУРА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА

Муртазин А. А.¹, Максютлов Н. Ф.¹, Усенко А. Б.¹, Изотов А. А.²,
Мальсагова К. А.², Буткова Т. В.², Степанов А. А.², Петров А. А.¹,
Балакин Е. И.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна», Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича», обособленное подразделение «Научно-практический образовательный центр», Москва, Россия

Контактная информация:

Мальсагова Кристина Ахмедовна,
ОП «Научно-практический образовательный центр» Института биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича,
Большой Николоворобинский пер., 7,
стр. 5, Москва, Россия, 109028.
E-mail: kristina.malsagova86@gmail.com

Статья поступила в редакцию 20.11.2022
и принята к печати 05.12.2022.

РЕЗЮМЕ

Оценка вариабельности сердечного ритма (ВСР) широко применяется в современной спортивной медицине для определения функционального состояния организма, планирования тренировочных циклов и реабилитационных программ. Этот метод отличается не только своей доступностью и универсальностью, но и высокой чувствительностью к условиям внешней среды. В данной статье была рассмотрена возможность использования параметров ВСР для оценки степени адаптации организма к тепловому стрессу, а также степени стрессового воздействия высокой температуры, для описания основных механизмов адаптации и физиологических процессов при тепловом стрессе. Проведен анализ литературных источников, в которых оценивалось воздействие высокой температуры и ВСР на организм человека.

Ключевые слова: адаптация, ВСР, стресс, температура, функциональное состояние организма.

Для цитирования: Муртазин А.А., Максютлов Н.Ф., Усенко А.Б., Изотов А.А., Мальсагова К.А., Буткова Т.В., Степанов А.А., Петров А.А., Балакин Е.И. Высокая температура окружающей среды и вариабельность сердечного ритма. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(6):42-53. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-42-53.

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON HEART RATE VARIABILITY PARAMETERS

**Murtazin A. A.¹, Maksjutov N. F.¹, Usenko A. B.¹, Izotov A. A.²,
Malsagova K. A.², Butkova T. V.², Stepanov A. A.², Petrov A. A.¹,
Balakin E. I.¹**

¹ State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical, Moscow, Russia

Corresponding author:

Malsagova Kristina A.,
V. N. Orekhovich Research Institute of
Biomedical,
Bol'shoi Nikolovorobinskiy per., 7/5,
Moscow, Russia, 109028.
E-mail: kristina.malsagova86@gmail.com

Received 20 November 2022; accepted
05 December 2022.

ABSTRACT

Assessment of heart rate variability (HRV) is widely used in modern sports medicine to determine the functional state of the body, planning of training cycles and rehabilitation programs. This method is distinguished not only by its accessibility and versatility, but also by its high sensitivity to environmental conditions. In this article we decided to consider the possibility of using HRV parameters to assess the degree of body adaptation to heat stress. The article considers the impact of high temperature from the position of stress, gives a description of the basic mechanisms of adaptation and physiological processes under heat stress and considers the main works in which the impact of high temperature and HRV appears.

Key words: adaptation, functional state of the body, HRV, stress, temperature.

For citation: Murtazin AA, Maksjutov NF, Usenko AB, Izotov AA, Malsagova KA, Butkova TV, Stepanov AA, Petrov AA, Balakin EI. Influence of temperature on heart rate variability parameters. *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2022;2(6):42-53. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-42-53.

Список сокращений: ВНС — вегетативная нервная система, ВСР — вариабельность сердечного ритма, ЧСС — частота сердечных сокращений, ФСО — функциональное состояние организма.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема адаптации организма к экстремальной температурной среде всегда была актуальна как для спортсменов, которым часто приходится выступать и тренироваться в условиях неоптимальных температур, так и для представителей профессий, чья работа часто связана с преодолением вызовов внешней среды. Также в последнее время в связи с глобальным изменением климата и регулярно возникающими в разных частях света так называемыми тепловыми волнами (Heat waves), уносящими жизни огромного числа людей, эта проблема становится чрезвычайно важной и для широких слоев населения [1, 2]. Поэтому достаточно остро стоит вопрос поиска инструментов для определения толерантности организма к тепловому стрессу, оценки последствий воздействия высоких температур на организм человека.

Учитывая вышеописанную актуальность, рассмотрена возможность решения этой задачи методом оценки функционального состояния организма с помощью анализа параметров вариабельности сердечного ритма (ВСР).

Анализ ВСР основан на определении последовательности R-R интервалов электрокардиограм-

мы (рис. 1). ВСР — это колебание временных интервалов между идущими друг за другом ударами сердца. ВСР возникает вследствие взаимодействия между сердечно-сосудистой и нервной системами и отражает баланс между симпатической и парасимпатической частями вегетативной нервной системы (ВНС).

ВСР отражает способность сердца реагировать на различные физиологические стимулы. Низкая ВСР связана с нарушением регуляторных и гомеостатических функций вегетативной нервной системы (ВНС), которое снижает способность организма справляться с внутренними и внешними стрессорами. Таким образом, можно предположить, что параметры ВСР могут отражать уровень стресса [3].

СТРЕСС И МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА

Стресс — это реакция организма на нетипичное воздействие внешней среды [4, 5]. Ответ организма на стресс проявляется в виде адаптации, которая может быть срочной или длительной в зависимости от типа воздействия [6, 7]. Нейрофизиологический механизм ответа на стресс реализуется за счет работы вегетативной нервной системы и связан с активностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, а также с изменением в работе иммунной системы [8].

Адаптация к стрессу происходит за счет многочисленных реакций в организме [9], описываемых



Рис. 1. Вариабельность сердечного ритма (R-R интервал).

Обозначения на рисунке: P — возбуждение обоих предсердий (деполяризация); Q — реполяризация предсердий и деполяризация межжелудочковой перегородки; R — деполяризация боковых стенок и верхушки желудочков; S — деполяризация оснований желудочков; T — реполяризация желудочков

теорией аллостаза, которая в дополнение к теории гомеостаза, подразумевающей поддержание постоянства внутренней среды организма, предполагает наличие постоянных изменений в работе физиологических систем для обеспечения адаптации к внешним воздействиям [10]. В рамках этой теории существует понятие аллостатической нагрузки — кумулятивных негативных изменений в работе адаптивных систем организма, связанных с чрезмерной активностью работы нервных и гуморальных регуляторных систем. Эти изменения вызывают нарушение адаптивных процессов в организме человека [11, 12].

Адаптационные возможности организма зависят от функционального состояния организма (ФСО) [13] и складываются из нескольких факторов:

- 1) наличия ресурсов организма для осуществления адаптации;
- 2) эффективности расходования этих ресурсов;
- 3) эффективности восстановительных процессов организма;
- 4) регуляторных механизмов, обеспечивающих распределение, перераспределение, расходование, восстановление и накопление ресурсов в зависимости от потребностей организма [14].

Одной из важнейших функций организма, подвержающейся контролю ВНС, является работа сердечно-сосудистой системы, а именно: сокращение сердечной мышцы. Со стороны симпатического отдела ВНС этот процесс контролируется через выброс медиатора норадреналина, который связывается с β_1 -адренорецептором, расположенным на мембране клеток синоатриального узла. Этот процесс в свою очередь запускает аденилатциклазный (цАМФ-зависимый) сигнальный каскад, формирующий приток Na^+ , Ca^{2+} в клетки и следующее за ним ускорение формирования потенциала действия, и таким образом способствует учащению сердцебиения [15]. Парасимпатическая регуляция осуществляется через вагусный нерв путем выброса медиатора ацетилхолина, связывающегося с М2-мускариновым рецептором, который, напротив, блокирует аденилатциклазный каскад и, замедляя формирование потенциала действия в клетках, снижает частоту сердечных сокращений [16].

Динамический баланс ВНС характеризуется постоянными изменениями длины R-R интервалов сердечного ритма. Поскольку снабжение тканей кислородом через кровь лежит в основе работы всех органов и систем организма, ВСР может отражать регуляцию вегетативного баланса, артериального давления, газообмена, работы кишечника, сердца, тонуса сосудов и служить универсальным методом оценки состояния ВНС [17].

Следующим важным аспектом гомеостаза является терморегуляция, которая представляет собой способность организма поддерживать температуру тела в определенных пределах в изменяющихся условиях окружающей среды [18]. При этом стоит отметить, что оба параметра (ВСР и температура) являются взаимозависимыми, и это формирует сложные взаимодействия всех систем организма в ходе поддержания баланса, а также представляет дополнительный интерес для изучения.

МЕХАНИЗМЫ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ ПРИ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Организм человека использует следующие физические механизмы для автономной регуляции температуры тела в случае внешнего воздействия высоких температур:

- испарение воды с поверхности кожи в виде пота, а также с выдыхаемым воздухом. Это очень эффективный механизм рассеивания избыточного тепла в организме, он является основным для спортсменов, тренирующихся в жаркой среде.
- излучение, то есть рассеяние электромагнитных волн в инфракрасном диапазоне. Такая передача энергии не требует прямого контакта или движения воздуха.
- конвекция, то есть передача тепла газу или жидкости, движущейся над телом. Теплоотдача происходит, когда газ или жидкость холоднее тела, и особенно важна для спортсменов. Важными параметрами в этом процессе являются скорость циркуляции воздуха и площадь поверхности тела.
- теплопередача (прямая передача тепла соседнему более холодному объекту) [19].

Последние три механизма напрямую связаны с расширением сосудов кожи, то есть с выносом тепла к поверхности тела. В результате возрастает нагрузка на сердечно-сосудистую систему. Вклад каждого из механизмов зависит от внешних факторов. Эффективность излучения и конвекции падает при высоких температурах окружающей среды. Испарение происходит труднее при высокой влажности, а теплопередача возможна только при прямом контакте с более холодным объектом (например, специальными охлаждающими накладками со льдом). Контроль автономных механизмов терморегуляции осуществляется с помощью терморепрепторов, расположенных как в коже, так и во внутренних органах, которые посылают сигналы к центру терморегуляции в гипоталамусе. В ответ на эти сигналы запускаются компенсаторные механизмы, направленные на усиление теплоотдачи: возрастает потоотделение, расширяются перифери-

ческие сосуды кожи, увеличивается интенсивность кровотока в органах [20, 21].

Также существуют поведенческие механизмы терморегуляции, которые выражаются в избегании теплового воздействия, поиске тени, подборе правильной одежды, потреблении холодных жидкостей и т. д. [22].

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

При высокой температуре у человека растет объем сердечного выброса, который в обычном состоянии может составлять около 5 л/мин, а при тепловом стрессе может увеличиться в 2,5 раза для полного насыщения кожных капилляров. Это происходит в том числе за счет увеличения частоты сердечных сокращений (ЧСС) в условиях жаркой температуры [23].

Контроль и регуляция работы сердца во время теплового стресса определяются прямым воздействием температуры на клетки синоатриального и атриовентрикулярного узлов, составляющих проводящую систему сердца, а также симпатическими и парасимпатическими воздействиями на них [24]. В дополнение к положительному хронотропному эффекту (увеличение частоты сокращений), повышенная температура увеличивает скорость проведения сигнала клеток водителей ритма к соседним кардиомиоцитам за счет влияния температуры на проводимость щелевых контактов [25].

Со стороны автономного контроля тепловой стресс вызывает значительное усиление симпатической активности и, как следствие, увеличение общего количества катехоламинов, циркулирующих в крови [26]. Парасимпатическое влияние на сердце при этом уменьшается [24]. Такое смещение вегетативного баланса в сторону симпатотонии приводит к увеличению ЧСС. Симпатическая стимуляция имеет хорошо документированный эффект увеличения сократимости миоцитов как предсердий, так и желудочков, однако это не влияет на объем сердечного выброса [27].

Сочетание высокой температуры окружающей среды и выполняемой физической работы может приводить к дополнительным рискам для здоровья в связи с дополнительной термогенерацией в мышцах [28, 29].

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДИКИ АНАЛИЗА ВСР

Наиболее точным и научно обоснованным методом получения хронокардиограммы (записи периодов сердечных сокращений) является запись ЭКГ, и следует пользоваться этим методом в ситуациях, где это возможно. В частности, при учете способа записи ритмограммы в экстремальных температурных условиях, анализ параметров variability ритма сердца на фоне высокой температуры окружающей среды показал наибольшую

Таблица 1. Основные линейные параметры

Величина	Единицы измерения	Принцип формирования
RMSSD	мс	Квадратный корень из суммы квадратов разности величин последовательных пар интервалов NN (нормальных интервалов RR), часто используется значение линейного логарифма этого параметра (LnRMSSD)
ЧСС	удары в минуту	Частота сердечных сокращений
SDNN	мс	Стандартное отклонение всех интервалов N-N
SDANN	мс	Стандартное отклонение средних значений интервалов N-N для каждого 5-минутного сегмента 24-часовой записи ЭКГ
pNN50	%	Процент последовательных интервалов R-R, отличающихся более чем на 50 мс
HR Max - HR Min	удары в минуту	Средняя разница между самой высокой и самой низкой частотой сердечных сокращений во время каждого дыхательного цикла

разницу между значениями ВСП и вариабельностью пульса, который определяется большинством фотоплетизмографических датчиков. Эта разница не объясняется высоким уровнем белого шума вследствие возникающих помех при измерении, а является результатом трансформации транзита пульса во времени, находящейся в прямой зависимости от дыхательной активности [30]. Показано, что при температурах 17, 25 и 38 °C разница для большинства параметров ритмограммы между ВСП и вариабельностью пульса становится статистически значимой [31].

Для оценки ФСО при физических нагрузках широко используется метод анализа ВСП [32–36], в котором к настоящему времени остаются утвержденными три основных группы параметров — линейные, волновые и нелинейные [37].

Линейные или статистические параметры отражают величину вариабельности во времени между следующими друг за другом ударами сердца (R-R интервалами) [38]. Эти величины могут быть выражены в абсолютном значении или логарифмированы для достижения нормального распределения. Основные линейные параметры представлены в таблице 1.

Волновые параметры показывают распределение общей или относительной мощности спектра по различным частотным полосам [39] (рис. 2).

Кроме абсолютной и относительной мощности различных спектральных компонентов ВСП важным параметром является отношение коротких частот (low frequency, LF) к высоким частотам (high frequency, HF), которое характеризует баланс активности симпатической и парасимпатической частей вегетативной нервной системы [40].

Нелинейные параметры отражают непредсказуемость временного ряда R-R интервалов [41]. Основным инструментом при нелинейном анализе является график Пуанкаре, который получается путем сопоставления каждого R-R интервала с предыдущим интервалом, в результате чего об-

разуется диаграмма рассеяния. Нелинейные индексы коррелируют с измерениями в частотных и временных параметрах, если они генерируются одними и теми же процессами [40]. Основные параметры нелинейной области представлены в таблице 2.

Подбор рассматриваемых параметров и продолжительности измерений зависит от задачи исследования. При рассмотрении работ, посвященных влиянию внешней температуры на параметры ВСП, необходимо учитывать характер этого воздействия: краткосрочное (погружение в ванну или специальную камеру), длительное (рабочий день в определенных условиях) проживание в условиях экстремальных температур.

СВЯЗЬ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ, СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВСП

Динамика показателей ВСП напрямую зависит от функционального состояния организма [42], на которое оказывают воздействие факторы окружающей среды [39], в первую очередь температура и влажность.

Регуляция гомеостаза направлена на поддержание нормальной температуры тела, незначительное изменение которой может привести к флуктуации показателей ВСП. Например, показано, что повышение или понижение температуры тела способствует значимому изменению ВСП. По данным Mowery, низкая (< 36 °C) и высокая (> 39 °C) температура тела вызывает серьезное уменьшение вариабельности ритма у пациентов, поступавших в отделение интенсивной терапии травматологических отделений, которое авторы оценивали с помощью стандартного отклонения длины интервалов, а не классических параметров ВСП. Авторы заключают, что низкая ВСП отражает дисфункцию системы вегетативного контроля работы сердечно-сосудистой системы [43].



Рис. 2. Характеристики волновых параметров

Таблица 2. Основные параметры нелинейной области

Величина	Единицы измерения	Принцип формирования
SD1	мс	Стандартное отклонение ширины облака графика Пуанкаре
SD2	мс	Стандартное отклонение длины облака графика Пуанкаре
SD1/SD2	%	Отношение SD1 к SD2
ApEn	–	Приближенная энтропия, измеряющая регулярность и сложность временного ряда R-R интервалов
SampEn	–	Выборочная энтропия, которая измеряет регулярность и сложность временного ряда R-R интервалов
DFA α_1	–	Детрендрованный флуктуационный анализ, который описывает краткосрочные колебания
DFA α_2	–	Детрендрованный флуктуационный анализ, описывающий долгосрочные флуктуации.
D2	–	Корреляционная размерность, оценивающая минимальное количество переменных, необходимых для построения системы динамической модели

В работе Abellán-Aynés и соавторов рассматривалось, как BCP может изменяться в зависимости от температуры окружающей среды при 19 °C и 35 °C. Эксперимент проводился с участием контрольной группы, запись ритмограммы проходила в лежачем положении, длительность записи 10 минут, были отдельно вычислены значения параметров BCP для первых 5 минут воздействия и 5 минут оставшейся записи. Авторы отмечают уменьшение значений RMSSD и SDNN в условиях высокой температуры, уменьшение параметра HFnu и увеличение LFnu. Параметр SD1 в этой работе не рекомендуется к использованию, так как он идентичен по своей сути RMSSD, также авторы заключают, что соотношение SD2/SD1 не является столь четким показателем вегетативного баланса.

По мнению авторов, уменьшение вариабельности в условиях высокой температуры происходит за счет снижения влияния парасимпатического контура регуляции автономной нервной системы, а не увеличения активности симпатического отдела нервной системы, что выражается в отсутствии изменений в значении параметра стресс-индекса [44].

Существуют противоречивые данные об изменении некоторых показателей BCP в разных темпера-

турных условиях. Так, например, отношение LF/HF, называемое показателем вегетативного баланса, показывает достаточно противоречивую динамику в разных исследованиях.

Некоторые исследователи связывают показатели BCP с субъективными так называемыми ощущениями термального комфорта, то есть того, как сами испытуемые описывают свои ощущения от температурного режима, в котором они находятся. В частности, показано, что отношение LF/HF снижается, а мощность HF увеличивается при повышении температуры окружающей среды и характеризуется статистически значимой ($p < 0,05$) сильной корреляционной связью с ее колебаниями от 21 °C до 30 °C и субъективными ощущениями испытуемых [45].

Другими исследователями было отмечено повышение средних значений отношения LF/HF в результате воздействия высокой и низкой температуры на организм обследуемых лиц. Эти данные также были подтверждены в других исследованиях, где нейтральное состояние характеризовалось значениями LF/HF близкими к единице [46]. Результаты этих исследований, где авторы фокусируются на параметре LF/HF, который увеличивается при достижении высокой (некомфортной) температу-

ры [45], противоречат выводам других ученых, показавших, что все параметры ВСР, особенно: VLF (очень короткие волновые частоты, рис. 2), pNN20 и SampEn, кроме спектральной мощности LF, HF и отношения LF/HF, имеют статистически значимые различия между нейтральной (26 °C) и жаркой (30 °C) температурой окружающей среды [47]. Возможно, это объясняется разницей в диапазоне температур.

Возможность использования параметров ВСР и важность анализа отношения LF/HF в оценке уровня термального комфорта были подтверждены работой научной группы в другом исследовании, где рассматривалась температура в транспортном средстве [48]. Также подтверждена значимая корреляционная связь параметра LF/HF с ощущением термального комфорта в экспериментальном исследовании воздействия температурных колебаний на организм испытуемых в зимний период времени [49].

ПОКАЗАТЕЛИ ВСР ПРИ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ ВОЗДУХА И ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

Большинство клинико-экспериментальных исследований с участием спортсменов или специалистов экстремальных профессий в условиях высокой температуры демонстрируют значимое увеличение ЧСС [50]. Это связано с высоким значением температурного градиента между телом человека и окружающей средой, и такое соотношение приводит к нарушению процессов терморегуляции организма посредством конвекции и излучения [18].

Регулярные физические тренировки в высокотемпературных условиях способствуют увеличению функциональных резервов и физической работоспособности организма [51], а также повышению показателей объема потребления кислорода (VO_2) на уровне аэробного и анаэробного порогов, с ростом интенсивности выполняемой работы при экстремальных условиях [52]. Данные изменения связаны с увеличением объема плазмы крови, оптимизацией процессов поддержания баланса жидкости в организме, усилением потоотделения и кожного кровотока, снижением интенсивности метаболических процессов при физической нагрузке и приобретением тепловой устойчивости через реакцию теплового шока. Это способствует улучшению стабильности работы сердечно-сосудистой системы и, соответственно, физической работоспособности во время теплового стресса [53].

В одном из исследований при наблюдении работников старшего возраста (от 53 до 64 лет) исследователями было отмечено отсутствие изменения как

в сердечном ритме, так и в различных параметрах ВСР после длительной (7,5 часов) рабочей нагрузки, хотя при этом отмечалось изменение температуры тела. Это может свидетельствовать о снижении адаптационных возможностей организма с возрастом [54].

В еще одном научном исследовании D. Flouris и коллеги проводили динамическое обследование испытуемых лиц методикой ВСР в период выполнения протокола по акклиматизации организма в условиях высокой температуры (40 °C, 20 % влажность), и было показано, что на пике адаптационных реакций регистрируются значимые изменения в показателях ВСР по сравнению с фоновым обследованием [55].

Другим авторам в рамках клинико-экспериментального исследования удалось построить предиктивную модель на основе методов машинного обучения, которая определяла уровень термального комфорта организма, основываясь на значениях ВСР [56]. Таким образом, можно видеть, что существует возможность для построения корреляционной связи между параметрами ВСР и ФСО применительно к температурному стрессу.

Длительное воздействие высокой температуры на организм человека, несомненно, является фактором экзогенного стресса, увеличивающим риски возникновения кардиореспираторных, эндокринных патологий и заболеваний мочевыделительной системы [57]. В связи с этим на первое место встает решение проблемы тепловой акклиматизации организма. В этом может помочь поиск новых способов метаболической поддержки для облегчения предвартительной адаптации и снижения заболеваемости лиц, деятельность которых связана с работой в условиях жаркого климата [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре рассмотрено влияние теплового стресса на ФСО, которое отражается на значениях параметров ВСР. Исследования подтверждают влияние высокой внешней температуры как фактора стресса, который уменьшает ВСР. Однако также наблюдается непостоянство изменений параметров в этих исследованиях: параметры меняются в одних исследованиях, а в других, похожих по дизайну, — авторы не отмечают изменений этих параметров. Также зачастую изменения связаны с близким к предельному значению p-value. Вероятно, это говорит о недостаточной, на наш взгляд, достоверности и отсутствии единообразия в дизайне этих исследований, и, хотя косвенно нам удалось подтвердить гипотезу о возможности использования параметров

ВСП для оценки степени влияния теплового стресса на организм, для установления четких критериев и значений параметров ВСП следует провести дополнительные исследования по оценке параметров ВСП в условиях высокой температуры.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-305). / The work was carried out within the framework of the project on the creation and development of world-class scientific centers “Digital Design and personalized healthcare” with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2022-305).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Rossati A. Global Warming and Its Health Impact. *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2017;8(1):7–20.
- Stillman JH. Heat Waves, the New Normal: Summertime Temperature Extremes Will Impact Animals, Ecosystems, and Human Communities. *Physiology* (Bethesda, Md.). 2019;34(2):86–100.
- Kim HG, Cheon EJ, Bai DS, et al. Stress and Heart Rate Variability: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *Psychiatry Investigation*. 2018;15(3):235–245.
- Самойлов А.С., Никонов Р.В., Пустовойт В.И. Стресс в экстремальной профессиональной деятельности: монография ФГБУ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России. — Москва, 2022. — С. 84.
- Dong SY, Lee M, Park H, et al. Stress Resilience Measurement With Heart-Rate Variability During Mental And Physical Stress. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference*. 2018;2018:5290–5293.
- Пустовойт В.И., Балакин Е.И., Максютин Н.Ф. и др. Изменение функционального состояния спортсменов экстремальных видов спорта в ответ на экзогенный стресс. *Человек. Спорт. Медицина*. 2022; S2:22–29.
- Eston RG, Felix Z. Meerson “Adaptation, Stress and Prophylaxis”. *British Journal of Sports Medicine*. 1984;18(4):267.
- Пустовойт В.И., Никонов Р.В., Самойлов А.С. и др. Цитологические и биохимические показатели крови при развитии различных неспецифических адаптационных реакций у спортсменов экстремальных видов спорта. *Курортная медицина*. 2021;2:85–91.
- Пустовойт В.И., Самойлов А.С., Никонов Р.В. Особенности инфекционной патологии у спортсменов-дайверов в сложных климатических условиях. *Спортивная медицина: наука и практика*. 2020;10(1):67–75.
- Romero LM, Dickens MJ, Cyr NE. The Reactive Scope Model — a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Hormones and Behavior*. 2009;55(3):375–389.
- Crews DE, Tuggle AC. What is health? Allostasis and the evolution of human design. Peter Sterling Cambridge, MA: The MIT Press, 2020. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council*. 2022;34(5):e23698.
- Logan JG, Barksdale DJ. Allostasis and allostatic load: expanding the discourse on stress and cardiovascular disease. *Journal of Clinical Nursing*; 2008;17(7B):201–208.
- Пустовойт В.И., Самойлов А.С. Разработка основных критериев для оценки степени адаптации организма спортсменов-альпинистов к условиям горного климата. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2019;(73):42–48.
- McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;840:33–44.
- Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198–205.
- Michael SK, Graham S, Davis GM. Cardiac Autonomic Responses during Exercise and Post-exercise Recovery Using Heart Rate Variability and Systolic Time Intervals — A Review. *Frontiers in Physiology*. 2017;8.
- Tiwari R, Kumar R, Malik S, et al. Kumar Analysis of Heart Rate Variability and Implication of Different Factors on Heart Rate Variability. *Current Cardiology Reviews*. 2021;17(5):e160721189770.
- Périard JD, Travers GJS, Racinais S, et al. Cardiovascular adaptations supporting human exercise-heat acclimation. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*. 2016;196:52–62.
- Périard JD, Travers GJS, Racinais S, et al. Cardiovascular adaptations supporting human exercise-heat acclimation. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2016;196:52–62.
- Brengelmann GL, Savage MV. Temperature regulation in the neutral zone. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1997;813:39–50.

21. Schlader ZJ, Vargas NT. Regulation of Body Temperature by Autonomic and Behavioral Thermoeffectors. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2019;47(2):116–126.
22. Flouris AD, Schlader ZJ. Human behavioral thermoregulation during exercise in the heat. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2015;25 Suppl 1:52–64.
23. Kobayashi M, Godin D, Nadeau R. Sinus node responses to perfusion pressure changes, ischaemia and hypothermia in the isolated blood-perfused dog atrium. *Cardiovascular Research*. 1985;19 (1):20–26.
24. Crandall CG, Wilson TE. Human cardiovascular responses to passive heat stress. *Comprehensive Physiology*. 2015;5(1):17–43.
25. Chen YH, DeHaan RL. Temperature dependence of embryonic cardiac gap junction conductance and channel kinetics. *The Journal of Membrane Biology*. 1993;136(2):125–134.
26. Rowell LB. Hyperthermia: a hyperadrenergic state. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*. 1990;15(5):505–507.
27. Jose AD, Stitt F, Collison D. The effects of exercise and changes in body temperature on the intrinsic heart rate in man. *American Heart Journal*. 1970;79(4):488–498.
28. Bedno SA, Li Y, Han W, et al. Niebuhr Exertional heat illness among overweight U.S. Army recruits in basic training Aviation, Space, and Environmental Medicine. 2010;81(2):107–111.
29. Trangmar SJ, González-Alonso J. Heat, Hydration and the Human Brain, Heart and Skeletal Muscles. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*. 2019;49(Suppl 1):69–85.
30. Schäfer A, Vagedes J. How accurate is pulse rate variability as an estimate of heart rate variability? A review on studies comparing photoplethysmographic technology with an electrocardiogram. *International Journal of Cardiology*. 2013;166(1):15–29.
31. Shin H. Ambient temperature effect on pulse rate variability as an alternative to heart rate variability in young adult. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*. 2016;30(6):939–948.
32. Baevskiy RM, Chernikova AG. Analysis of heart rate variability: physiological bases and main methods of conducting. *Cardiometry*. 2017;10:66–76. In Russian [Баевский Р.М., Черникова А.Г. Анализ вариабельности сердечного ритма: физиологические основы и основные методы проведения. *Кардиометрия*. 2017;10:66–76.]
33. Земцовский Э.В. Современные представления о стрессорной кардиомиопатии у спортсменов. 2008;2:69–92.
34. Пустовойт В.И., Ключников М.С., Никонов Р.В. и др. Характеристика основных показателей вариабельности сердечного ритма у спортсменов циклических и экстремальных видов спорта. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*. 2021;1:26–30.
35. Пустовойт В.И., Ключников М.С., Назарян С.Е. и др. Вариабельность сердечного ритма как основной метод оценки функционального состояния организма спортсменов, принимающих участие в экстремальных видах спорта. *Современные вопросы биомедицины*. 2021;15(2).
36. Пустовойт В.И. Скрининг-диагностика психоэмоционального состояния спортсменов экстремальных видов спорта методом электроэнцефалографии. *Современные вопросы биомедицины*. 2022;6(1).
37. Catai AM, Pastre CM., de Godoy MF, et al. Heart rate variability: are you using it properly? Standardisation checklist of procedures. *Brazilian Journal of Physical Therapy*. 2020;24(2):91–102.
38. Баевский Р.М. Вариабельность сердечного ритма: Теоретические аспекты и возможности клинического применения. *Ультразвуковая и функциональная диагностика*. 2001;3:108–127.
39. Самойлов А.С., Никонов Р.В., Пустовойт В.И. и др. Применение методики анализа вариабельности сердечного ритма для определения индивидуальной устойчивости к токсическому действию кислорода. *Спортивная медицина: наука и практика*. 2020;10(3):73–80.
40. Shaffer F, Ginsberg JP. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Frontiers in Public Health*. 2017;5.
41. Yaduraj SR, Sudarshan BG, Prasanna Kumar SC, et al. Analysis of Linear and Non-linear parameters of HRV for opting optimum parameters in wearable device. *Materials Today: Proceedings*. 2018;5:10644–10651.
42. Земцовский Э.В. Спортивная кардиология: Монография. — СПб, 2005. — С. 448.
43. Mowery NT, Morris JA, Jenkins JM, et al. Core temperature variation is associated with heart rate variability independent of cardiac index: a study of 278 trauma patients. *Journal of Critical Care*. 2011;26(5):534.e9-534.e17.
44. Abellán-Aynés O, Manonelles P, Alacid F. Cardiac Parasympathetic Withdrawal and Sympathetic Activity: Effect of Heat Exposure on Heart Rate Variability. *International journal of environmental research and public health*. 2021;18(11).
45. Zhu H, Wang H, Liu Z, et al. Experimental study on the human thermal comfort based on the heart rate variability (HRV) analysis under different environments. *The Science of the Total Environment*. 2018;616–617:1124–1133.
46. Liu W, Lian Z, Liu Y. Heart rate variability at different thermal comfort levels. *European Journal of Applied Physiology*. 2008;103(3):361–366.

47. Wu G, Liu H, Wu S, et al. Can Heart Rate Variability (HRV) Be Used as a Biomarker of Thermal Comfort for Mine Workers? *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(14):7615.

48. Gwak J, Shino M, et al. Interaction between Thermal Comfort and Arousal Level of Drivers in Relation to the Changes in Indoor Temperature. *International Journal of Automotive Engineering*. 2018;9(2):86–91.

49. Xiong J, Lian Z, Zhang H. Physiological response to typical temperature step-changes in winter of China. *Energy and Buildings*. 2017;138:687–694.

50. Brenner IK, Thomas S, Shephard RJ. Autonomic regulation of the circulation during exercise and heat exposure. Inferences from heart rate variability. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*. 1998;26(2):85–99.

51. Tyler CJ, Reeve T, Hodges GJ, et al. The Effects of Heat Adaptation on Physiology, Perception and Exercise Performance in the Heat: A Meta-Analysis. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*. 2016;46(11):1699–1724.

52. Lorenzo S, Halliwill JR, Sawka MN. Heat acclimation improves exercise performance. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*. 2010;109(4):1140–1147.

53. Rizzo L, Thompson MW. Cardiovascular adjustments to heat stress during prolonged exercise. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 2018;58(5):727–743.

54. Macartney MJ, Notley SR, Meade RD. Heart rate variability in older men on the day following prolonged work in the heat. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2020;17(9):383–389.

55. Flouris AD, Poirier MP, Bravi A, et al. Changes in heart rate variability during the induction and decay of heat acclimation. *European Journal of Applied Physiology*. 2014;114(10):2119–2128.

56. Nkurikiyeyezu KN, Suzuki Y, Lopez GF. Heart rate variability as a predictive biomarker of thermal comfort. *Journal of Ambient Intelligence and Humanized Computing*. 2018;9(5):1465–1477.

57. Périard JD, Racinais S, Sawka MN. Adaptations and mechanisms of human heat acclimation: Applications for competitive athletes and sports. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2015;25 Suppl 1:20–38.

58. Ihsan M, Périard JD, Racinais S. How to integrate recovery during heat acclimation. *British Journal of Sports Medicine*. 2021;55(4):185–186.

Информация об авторах:

Муртазин Артур Амирович, младший научный сотрудник лаборатории больших данных и прецизионной спортивной медицины центра спортивной медицины и реабилитации ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России;

Максютов Наиль Фанисович, младший научный сотрудник лаборатории больших данных и прецизионной спортивной медицины центра спортивной медицины и реабилитации ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России;

Усенко Анна Борисовна, к.м.н., научный сотрудник лаборатории больших данных и прецизионной спортивной медицины ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России;

Изотов Александр Александрович, научный сотрудник Группы биобанкинга обособленного подразделения «Научно-практический образовательный центр» Института биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича;

Мальсагова Кристина Ахмедовна, к.б.н., научный сотрудник Группы биобанкинга обособленного подразделения «Научно-практический образовательный центр» Института биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича;

Буткова Татьяна Владимировна, к.м.н., научный сотрудник Группы биобанкинга обособленного подразделения «Научно-практический образовательный центр» Института биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича;

Степанов Александр Александрович, научный сотрудник Группы биобанкинга обособленного подразделения «Научно-практический образовательный центр» Института биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича;

Петров Александр Александрович, младший научный сотрудник лаборатории больших данных и прецизионной спортивной медицины ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России;

Балакин Евгений Игоревич, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории больших данных и прецизионной спортивной медицины ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России.

Author information:

Murtazin Artur A., junior researcher in the Big Data and Precision Sports Medicine Laboratory, Sports Medicine and Rehabilitation Center, State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency;

Maksjutov Nail' F., junior researcher in the Big Data and Precision Sports Medicine Laboratory, Sports Medicine and Rehabilitation Center, State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency;

Usenko Anna B., PhD, researcher, Laboratory of Big Data and Precision Sports Medicine, Laboratory, Sports Medicine and Rehabilitation Center, State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency;

Izotov Alexander A., research fellow of the Biobanking Group, V. N. Orekhovich research Institute of Biomedical Chemistry;

Malsagova Kristina A., PhD, research fellow of the Biobanking Group, V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, resident physician in Peoples' Friendship University of Russia;

Butkova Tatyana V., MD, PhD, research fellow of the Biobanking Group, V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry;

Stepanov Aleksander A., research fellow of the Biobanking Group, V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry;

Petrov Alexander Alexandrovich, Junior Researcher, Laboratory of Big Data and Precision Sports Medicine, Sports Medicine and Rehabilitation Center, State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency;

Balakin Evgenii I., MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Big Data and Precision Sports Medicine, State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 615.014.67:615.3

СОЗДАНИЕ КАПСУЛИРОВАННЫХ ФОРМ АУТОПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ *LACTOBACILLUS SPP.* И *ENTEROCOCCUS SPP.*

Цапиева А. Н., Морозова А. О., Карасева А. Б., Новикова Н. С.,
Суворов А. Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Научно-образовательный центр «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Цапиева Анна Николаевна,
НОЦ «Молекулярные основы
взаимодействия микроорганизмов
и человека» НЦМУ «Центр
персонализированной медицины»
ФГБНУ «ИЭМ»,
ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-
Петербург, Россия, 197376.
E-mail: anna.tsapieva@gmail.com

Статья поступила в редакцию 03.10.2022
и принята к печати 10.11.2022.

РЕЗЮМЕ

Для расширения ассортимента форм выпуска аутопробиотиков, повышения потребительской привлекательности, увеличения срока хранения и возможностей транспортировки был разработан протокол получения их капсулированной формы. Были проведены испытания капсулированных форм индигенных бактерий родов *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* с целью оценки жизнеспособности клеток бактерий после лиофилизации и хранения в различных условиях. Было проведено исследование влияния криопротекторов различного состава на сохранение жизнеспособности лиофилизатов индигенных *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* Полученные результаты показали, что применение 10 % сахарозы и 1 % желатина в составе защитной среды сохраняет исходные свойства бактериальных штаммов, способствуя их выживанию в процессе криоконсервации и лиофилизации. Было установлено, что наиболее благоприятным условием хранения капсулированных аутопробиотиков на основе *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* является температурный режим до 25 °С с предельным сроком годности 1 год.

Ключевые слова: аутопробиотики, инкапсуляция, лиофилизация, пробиотики, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*

Для цитирования: Цапиева А.Н., Морозова А.О., Карасева А.Б., Новикова Н.С., Суворов А.Н. Создание капсулированных форм аутопробиотиков на основе *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(6):54-63. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-54-63.

DEVELOPMENT OF CAPSULATED AUTOPROBIOTICS BASED ON *LACTOBACILLUS SPP.* AND *ENTEROCOCCUS SPP.*

**Tsapieva A. N., Morozova A. O., Karaseva A. B., Novikova N. S.,
Suvorov A. N.**

Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Tsapieva Anna N.,
Institute of Experimental Medicine,
Academician Pavlov str., 12, Saint
Petersburg, Russia, 197376.
E-mail: anna.tsapieva@gmail.com

Received 03 October 2022; accepted
10 November 2022.

ABSTRACT

In order to expand the range of autoprobiotic release forms, increase consumer attractiveness, prolongate product's shelf life and transportation possibilities, a protocol for obtaining an encapsulated form of autoprobiotics was developed. Tests were carried out on encapsulated forms of indigenous bacteria in order to assess the viability of bacterial cells after lyophilization and storage under various conditions. The effect of various cryoprotectants on the lyophilized *Lactobacillus spp.* and *Enterococcus spp.* cells viability was studied. The results obtained showed that the use of 10 % sucrose and 1 % gelatin as part of a protective medium retains the original properties of bacterial strains, contributing to their survival during cryopreservation and lyophilization. The most favorable storage conditions and expiration dates for encapsulated autoprobiotics based on *Lactobacillus spp.* and *Enterococcus spp.* were determined.

Key words: autoprobiotics, encapsulation, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, lyophilization, probiotics.

For citation: Tsapieva AN, Morozova AO, Karaseva AB, Novikova NS, Suvorov AN. Development of capsulated autoprobiotics based on *Lactobacillus spp.* and *Enterococcus spp.* Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):54-63. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-54-63.

Список сокращений: БАД — биологически активная добавка, ЖКТ — желудочно-кишечный тракт, ФБС — фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Необходимость разработки и поиска новых форм аутопробиотических препаратов обусловлена несколькими факторами, главным из которых является продление срока хранения продукта и увеличение эффективности аутопробиотической терапии. Надлежащая терапевтическая эффективность и биодоступность могут быть обеспечены путем подбора подходящей лекарственной формы, состава и технологии производства.

Предпосылками для создания персонализированного пробиотического продукта стали недостатки применения промышленных пробиотиков и представление об уникальности микробиоценоза организма каждого индивидуума [1, 2].

Очевидно, что значительная часть пробиотических бактерий теряет свою активность вследствие гибели микроорганизмов при хранении жидкой формы в течение 2–4 недель, иногда раньше. Кроме того, достоверно показано, что в процессе прохождения через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека большая часть микроорганизмов погибает и до кишечника доходит лишь незначительная их часть. Причинами этого являются низкие значения pH, влияние соляной кислоты и пепсина желудочного сока [3]. Пробиотические препараты, содержащие лиофильно высушенную биомассу, сохраняют лечебные свойства при значительно большем сроке хранения, чем жидкие формы пробиотиков [4].

Одним из наиважнейших факторов для сохранения жизнеспособности бактериальных клеток при лиофилизации, кроме подбора условий сушки, является подбор эффективного криопротектора. Наиболее часто в качестве криопротекторов применяют глицерин, сахарозу, глюкозу, желатин, агар-агар. Криопротектор должен быть нетоксичным, не оказывать влияние на потребительские свойства и должен защищать клетки от повреждающего действия замораживания. Углеводы обычно применяют в сочетании с другими криопротекторами, чаще всего желатином, для достижения максимальной выживаемости бактерий в процессе сушки. Углеводы проникают в клетки и создают осмотическое давление, чем препятствуют образованию кристаллов льда и разрушению клетки в процессе замораживания; желатин, в свою очередь, не проникает в клетки, увеличивает стабилизирующее действие среды, позволяет хранить высушенные микроорганизмы без создания вакуума [5].

Капсулирование — рутинная технология, которая нашла широкое применение в различных отраслях промышленности и является хорошим примером использования микротехнологий в науке о пище и биотехнологии. Широкое распространение получило капсулирование пробиотических бактерий, применяемых как в виде препаратов-пробиотиков, так и в виде БАДов, для их защиты при транзите через агрессивную среду различных отделов ЖКТ [3]. Применение капсулирования также увеличивает разнообразие доступных форм пробиотиков, повышает удобство использования вне дома, в путешествиях и делает доступным длительное хранение препарата без потери активности входящих в его состав микроорганизмов. Но главным значением инкапсуляции пробиотиков является защита клеток от неблагоприятной окружающей среды верхних отделов ЖКТ и последующее их высвобождение в жизнеспособном и метаболически активном состоянии в кишечнике [6].

Основным материалом для изготовления капсул является желатин (натуральный продукт гидролиза коллагенсодержащего сырья), реже используют капсулы, изготовленные из растительного сырья — гидроксипропилметилцеллюлозы. Капсулы на основе полимеров неживотного происхождения широко используются пациентами, имеющими аллергии, а также вегетарианцами. Кроме материала капсул немаловажной является их оболочка, именно она делает капсулы кислотоустойчивыми, благодаря технологии пленочного покрытия, которое может быть нанесено на любой тип капсул. Капсулы, имеющие такое покрытие, называют кишечнорастворимыми. Преимуществом таких капсул является возможность безопасно и эффективно доставлять их содержимое в кишечник за счет длительного растворения (1–2 часа), в то время как обычные желатиновые капсулы без покрытия растворяются в ЖКТ в течение 20 минут [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микроорганизмов. Материалом исследования являлись полученные в отделе микробной терапии НЦМУ штаммы индигенных энтерококков и лактобацилл, выделенные в период 2020–2021 гг. от пациентов. В исследование вошло 17 штаммов энтерококков: *E. faecium* (n = 10), *E. hirae* (n = 5), *E. durans* (n = 2) и 15 штаммов лактобацилл: *L. fermentum* (n = 3), *L. paracasei* (n = 4), *L. rhamnosus* (n = 5), *L. plantarum* (n = 2) и *L. delbreuckii* (n = 1), полученных и идентифицированных до вида согласно протоколам, описанным в патентах № 2460778 и № 2546253 РФ [7, 8].

Условия культивирования и хранения. Культивирование лактобацилл проводили на селективной питательной среде для лактобацилл МРС (Hi-media, Индия; Conda, Испания), Лактобакагар (Оболensk, Россия), 5 % белково-витаминном концентрате Супро Плюс (ООО «Протеин», Санкт-Петербург) при 37–40 °C в аэробных и анаэробных условиях в течение 24–48 часов. Энтерококки культивировали на селективной питательной среде Энтерококкагар (Оболensk, Россия). Для создания анаэробных условий использовали анаэрогат (Schnett-biotech GmbH, Германия) и газогенерирующие пакеты для создания микроаэрофильных/анаэробных условий Анаэрогаз (ИНКО, Россия).

Хранение микроорганизмов осуществляли в морозильной камере при -70 °C (New Brunswick Scientific, США). Для этого чистые культуры микроорганизмов, выращенные в жидкой питательной среде до стационарной фазы роста, концентрировали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 минут. Отбирали 50–80 % надосадочной жидкости и добавляли 10 % (по объему) стерильного 20 % глицерина. Затем перемешивали на вортексе. Хранение материала осуществляли в течение 6–12 месяцев с проверкой жизнеспособности микроорганизмов каждые 6 месяцев.

Получение биомассы. Чистые культуры микроорганизмов, находящиеся на хранении в криобанке, были рассеяны до отдельных колоний, после чего были использованы для получения посевного материала. Для этого отдельную колонию вносили в 10 мл стерильного 5 % Супро Плюс и инкубировали при 37 °C в течение 24 часов. Далее вносили 1 % посевного материала в 500 мл стерильного 5 % Супро Плюс и культивировали в течение 18 часов при 37 °C. Затем биомассу центрифугировали при 4500 об/мин (Eppendorf, Германия) при 4 °C в течение 20 минут, надосадок сливали, а осадок ресуспендировали в сахарозо-желатиновой защитной среде с/без NaCl, фосфатно-солевого буфера в соотношении 1:2 согласно [9]. Перед сублимационной сушкой проводили оценку общего количества бактерий в 1 мл биомассы. Для этого осуществляли посев всех образцов на плотную питательную среду методом десятикратных серийных разведений. Общее количество бактерий в 1 мл биомассы находилось в диапазоне $5 \cdot 10^7$ – $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. После подготовки биомассу с криопротектором разливали в стерильные флаконы слоем не более 1 см и проводили высушивание в лиофильной сушке FreeZone (Labconco, США) согласно протоколу.

Подготовка и стандартизация лиофилизата. Инкапсуляция. Диспергирование лиофилизата

бактерий проводили с помощью лабораторной мельницы IKA Basic 1 (IKA, Германия). Использовали мельницу с режимом «пульс» для предотвращения гибели клеток при интенсивном механическом и термическом воздействии. Для обеспечения стандартности гранулометрического состава получаемых образцов измельчение биомассы проводили путем протирания через сетку с размером ячеек 0,25 мм, смешивание измельченной биомассы со вспомогательными веществами проводили в герметичной емкости. Для наполнения капсул использовали ручной полуавтоматический капсулятор MC-100 (MC100, Беларусь) с загрузкой на 100 капсул, размер капсул «1», с ориентирующим устройством и трамбовочным инструментом. Использовали кислотоустойчивые капсулы DRcaps™ (Lonza, Россия). DRcaps™ выполнены из гидроксипропилметилцеллюлозы с кислотоустойчивым покрытием.

Контроль качества. Готовую для высушивания биомассу до внесения криопротектора проверяли на отсутствие посторонней микрофлоры, высевая 100 мкл продукта на чашку Петри с СПА (Оболensk, Россия). Лиофилизат после высушивания также проверяли на отсутствие посторонней микрофлоры, для этого 1 г порошка растворяли в 9 мл стерильной воды, перемешивали до растворения и высевали 100 мкл продукта на чашку Петри с СПА и агаром Сабура («ХайМедиа», Индия). Для оценки количества жизнеспособных клеток и наличия контаминации проводили счетный высеv методом последовательных десятикратных разведений с последующим высевом на плотные питательные среды. Для посева использовали СПА, агар Сабура (Лактобакагар (Оболensk, Россия), Энтерококкагар (Оболensk, Россия), хромогенный агар HiCrome Coliform Agar («ХайМедиа», Индия)). Результаты учитывали через 24–72 часа культивирования. Для готовых капсул после наполнения лиофилизатом проводили контроль фармакопейных показателей, таких как: внешний вид на наличие вмятин, трещин, средняя масса содержимого и содержание. Для контроля качества и оценки микробиологической чистоты готовых капсул, капсулы растворяли в физиологическом растворе внесением капсулы в соотношении 1:10 и перемешивали на вортексе до полного растворения. Для оценки количества жизнеспособных клеток в капсуле и наличия контаминации также проводили счетный высеv методом последовательных десятикратных разведений с последующим высевом на вышеперечисленные плотные питательные среды. Результаты учитывали через 24–72 часа культивирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С использованием материалов и методов, описанных ранее, была получена биомасса, содержащая живые аутопробиотические штаммы энтерококков и лактобацилл для последующей сублимационной сушки с добавлением криопротектора различного состава. Готовую биомассу аутопробиотика после центрифугирования и отделения надосадка ресуспендировали в сахарозо-желатиновой защитной среде с/без NaCl, агар-агара, фосфатно-солевого буфера в соотношении 1:2 по объему и высушивали в лиофильной сушке FreeZone согласно протоколу. Результаты проверки количества жизнеспособных микроорганизмов до и после высушивания представлены в таблице 1.

Выживаемость индигенных штаммов после лиофилизации при применении сахарозо-желатиновой защитной среды и без нее была выражена в процентах, результаты представлены в таблице 2. Установлено, что нет достоверных отличий в количестве жизнеспособных микроорганизмов при высушивании в присутствии криопротекторов на основе сахарозы и желатина при добавлении солей натрия и без их добавления. Достоверные отличия наблюдаются при высушивании биомассы без добавления криопротектора, выживаемость клеток при таком высушивании снижается до 40 %, однако абсолютные конечные титры не снижаются ниже 5×10^7 , что является также высоким показателем для количества микроорганизмов в составе пробиотического препарата.

После высушивания лиофилизат крайне неоднородный, потому производили диспергирование полученного лиофилизата согласно методике, описанной выше. После измельчения лиофилизат помещали в отдельную стерильную герметичную емкость для дальнейшего использования. К подготовленному лиофилизату добавляли каолин и магния стеарат. Стеарат магния используется в большинстве рецептур и обеспечивает достаточные скользящие свойства, а каолин обеспечивает необходимые технологические свойства (уменьшает липкость, слеживаемость порошка и увеличивает его текучесть), также обладает обволакивающими и детоксикационными свойствами [11]. Объем капсулы типоразмера «1» равен 0,5 мл. Для заполнения капсулы использовали 130 мг лиофилизата индигенных бактерий *Enterococcus faecium*/*Lactobacillus spp.*, 30 мг каолина и 1,5 мг магния стеарата.

Контроль качества капсул и содержимого проводили согласно методике, описанной в материалах и методах, сразу после получения капсул. Все капсулы прошли контроль качества, посторонней

микрофлоры обнаружено не было. Для оценки возможностей хранения капсулированного аутопробиотика и установления срока годности капсул с лиофилизированными индигенными бактериями контроль количества жизнеспособных микроорганизмов, отсутствия посторонней микрофлоры и общий контроль качества капсул осуществляли через 3, 6 и 12 месяцев хранения. Результаты представлены в таблице 3. Посев осуществлялся методом серийных десятикратных разведений на плотные питательные среды: хромогенный агар, агар Сабуро (для выявления дрожжей и плесеней) и селективную питательную среду для индигенных бактерий — Энтерококкагар для энтерококков и МРС агар для лактобацилл. Все образцы прошли микробиологический контроль, на посевах наблюдались исключительно целевые микроорганизмы. Хранение капсулированных аутопробиотиков осуществляли при температуре 20–25 °С в герметично закрытых емкостях.

В процессе контроля заложенных на хранение образцов сухой биомассы все контролируемые биологические параметры оставались в пределах нормы. Количество жизнеспособных бактерий оставалось на высоком уровне в течение одного года наблюдений — не менее 10^7 КОЕ/г. Контроль фармакопейных показателей капсул в течение срока наблюдения обнаружил, что через 12 месяцев наблюдается потеря исходных свойств капсул в 30 % случаев — часть капсул становилась хрупкой, изменяла цвет, появлялись трещины.

Дополнительно, для оценки влияния неблагоприятных условий хранения капсулированных аутопробиотиков проводили определение жизнеспособности микроорганизмов в капсулах при хранении в условиях повышенной температуры окружающей среды. Для эксперимента были отобраны капсулы с аутопробиотиками на основе разных видов микроорганизмов. Капсулы хранили в термостате при температуре +50 °С в течение 3 и 7 дней. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.

В результате проведенного эксперимента было установлено, что количество жизнеспособных микроорганизмов при воздействии высокой температуры снижалось для всех представленных образцов. Однако некоторые штаммы в составе капсул оставались жизнеспособными даже после 7 суток хранения при 50 °С. Таким образом, можно заключить, что аутопробиотики в капсулированной форме являются удобной альтернативой жидкой формы, более удобны для хранения и транспортировки, не требуют специальных температурных режимов содержания.

Таблица 1. Общее количество жизнеспособных бактерий

Номер образца	Вид микроорганизма	Количество жизнеспособных микроорганизмов, КОЕ/г			
		Биомасса	Лиофилизат СЖ	Лиофилизат СЖ+0,9 % NaCl	Лиофилизат СЖ+ФБС
1.	<i>E. faecium</i>	5×10^7	9×10^8	1×10^9	1×10^9
2.	<i>E. faecium</i>	1×10^8	1×10^9	2×10^9	2×10^9
3.	<i>E. faecium</i>	5×10^7	1×10^9	1×10^9	2×10^9
4.	<i>E. faecium</i>	5×10^7	7×10^8	8×10^8	8×10^8
5.	<i>E. faecium</i>	5×10^7	1×10^9	1×10^9	1×10^9
6.	<i>E. faecium</i>	7×10^7	2×10^9	1×10^9	2×10^9
7.	<i>E. faecium</i>	1×10^8	2×10^9	2×10^9	2×10^9
8.	<i>E. faecium</i>	1×10^8	2×10^9	2×10^9	2×10^9
9.	<i>E. faecium</i>	1×10^8	1×10^9	2×10^9	2×10^9
10.	<i>E. faecium</i>	5×10^7	1×10^9	1×10^9	1×10^9
11.	<i>E. hirae</i>	5×10^7	1×10^9	1×10^9	1×10^9
12.	<i>E. hirae</i>	6×10^7	2×10^9	1×10^9	2×10^9
13.	<i>E. hirae</i>	6×10^7	1×10^9	2×10^9	2×10^9
14.	<i>E. hirae</i>	1×10^8	2×10^9	2×10^9	2×10^9
15.	<i>E. hirae</i>	5×10^7	2×10^9	1×10^9	2×10^9
16.	<i>E. durans</i>	1×10^8	3×10^9	2×10^9	2×10^9
17.	<i>E. durans</i>	1×10^8	2×10^9	3×10^9	3×10^9
18.	<i>L. fermentum</i>	3×10^6	4×10^7	6×10^7	6×10^7
19.	<i>L. fermentum</i>	6×10^7	2×10^9	2×10^9	2×10^9
20.	<i>L. fermentum</i>	7×10^7	1×10^9	1×10^9	1×10^9
21.	<i>L. paracasei</i>	1×10^8	2×10^9	2×10^9	2×10^9
22.	<i>L. paracasei</i>	1×10^8	2×10^9	2×10^9	2×10^9
23.	<i>L. paracasei</i>	7×10^8	6×10^9	8×10^9	8×10^9
24.	<i>L. paracasei</i>	1×10^8	2×10^9	2×10^9	2×10^9
25.	<i>L. rhamnosus</i>	2×10^8	3×10^9	3×10^9	3×10^9
26.	<i>L. rhamnosus</i>	1×10^8	1×10^9	2×10^9	2×10^9
27.	<i>L. rhamnosus</i>	3×10^8	5×10^9	5×10^9	5×10^9
28.	<i>L. rhamnosus</i>	5×10^8	8×10^9	8×10^9	8×10^9
29.	<i>L. rhamnosus</i>	2×10^8	4×10^9	4×10^9	4×10^9
30.	<i>L. plantarum</i>	5×10^8	8×10^9	8×10^9	8×10^9
31.	<i>L. plantarum</i>	1×10^8	2×10^9	2×10^9	2×10^9
32.	<i>L. delbreuckii</i>	1×10^7	2×10^8	2×10^8	2×10^8

* СЖ — сахарозо-желатиновая защитная среда (10 % сахара, 1 % желатин); ФБС — фосфатно-солевой буфер.

Таблица 2. Выживаемость индигенных штаммов после лиофилизации при применении сахарозо-желатиновой защитной среды

Криопротектор	Выживаемость клеток после лиофилизации
10 % сахароза, 1 % желатин	80 ± 2 %
10 % сахароза, 1 % желатин в фосфатно-солевом буфере	80 ± 2 %
10 % сахароза, 1 % желатин в 0,9 % растворе NaCl	80 ± 2 %
Без криопротектора	37 ± 8 %

Таблица 3. Изменение количества жизнеспособных микроорганизмов в капсулированных аутопробиотиках с течением времени

Номер образца	Вид микроорганизма	Количество жизнеспособных микроорганизмов, КОЕ/г		
		1 неделя	3 месяца	6 месяцев
1.	<i>E. faecium</i>	9×10 ⁸	8,5×10 ⁸	8,5×10 ⁸
2.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	9×10 ⁸
3.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	9×10 ⁸
4.	<i>E. faecium</i>	7×10 ⁸	7×10 ⁸	6,5×10 ⁸
5.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁹	9,5×10 ⁸	9,5×10 ⁸
6.	<i>E. faecium</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	1,5×10 ⁹
7.	<i>E. faecium</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
8.	<i>E. faecium</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
9.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	9,5×10 ⁸
10.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁹	9,5×10 ⁸	9,5×10 ⁸
11.	<i>E. hirae</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	1×10 ⁹
12.	<i>E. hirae</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
13.	<i>E. hirae</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	9×10 ⁸
14.	<i>E. hirae</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
15.	<i>E. hirae</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
16.	<i>E. durans</i>	3×10 ⁹	3×10 ⁹	2,5×10 ⁹
17.	<i>E. durans</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	1,5×10 ⁹
18.	<i>L. fermentum</i>	4×10 ⁷	4×10 ⁷	3×10 ⁷
19.	<i>L. fermentum</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	1,5×10 ⁹
20.	<i>L. fermentum</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	1×10 ⁹
21.	<i>L. paracasei</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
22.	<i>L. paracasei</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
23.	<i>L. paracasei</i>	6×10 ⁹	5,5×10 ⁹	5,5×10 ⁹

24.	<i>L. paracasei</i>	2×10^9	2×10^9	2×10^9
25.	<i>L. rhamnosus</i>	3×10^9	3×10^9	3×10^9
26.	<i>L. rhamnosus</i>	1×10^9	1×10^9	9×10^8
27.	<i>L. rhamnosus</i>	5×10^9	$4,5 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$
28.	<i>L. rhamnosus</i>	8×10^9	8×10^9	7×10^9
29.	<i>L. rhamnosus</i>	4×10^9	$3,5 \times 10^9$	3×10^9
30.	<i>L. plantarum</i>	8×10^9	$7,5 \times 10^9$	$7,5 \times 10^9$
31.	<i>L. plantarum</i>	2×10^9	$1,5 \times 10^9$	1×10^9
32.	<i>L. delbreuckii</i>	2×10^8	2×10^8	2×10^8

Таблица 4. Влияние высокой температуры на жизнеспособность микроорганизмов в составе капсул с аутопробиотиками

Вид микроорганизма	КОЕ/мл, до эксперимента	КОЕ/мл, 3 дня	КОЕ/мл, 7 дней
<i>Enterococcus spp.</i>			
<i>E. faecium</i>	2×10^9	4×10^7	3×10^6
<i>E. faecium</i>	4×10^8	1×10^6	---
<i>E. hirae</i>	2×10^8	5×10^3	---
<i>E. hirae</i>	5×10^8	4×10^7	3×10^6
<i>E. durans</i>	2×10^9	7×10^7	1×10^6
<i>Lactobacillus spp.</i>			
<i>L. fermentum</i>	4×10^6	1×10^4	---
<i>L. paracasei</i>	2×10^8	---	---
<i>L. rhamnosus</i>	2×10^8	3×10^4	3×10^3
<i>L. plantarum</i>	2×10^8	7×10^6	1×10^6

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инкапсуляция является современным способом выпуска биологически активных добавок к пище, различных пробиотических препаратов с возможностью прогнозирования и планирования заданных потребительских свойств и качественных характеристик жизнеспособности микроорганизмов в составе продукта. Мы успешно апробировали метод капсулирования штаммов аутопробиотиков и показали сохранение стабильности биологических свойств аутопробиотических культур при лиофилизации и последующем хранении. В работе мы использовали классическую композицию, состоящую из сахарозы и желатина, что позволило нам получить высокую степень выживаемости

клеток бактерий как после процесса лиофилизации, так и после экспериментов по ускоренному старению образцов капсул. Метод может быть применен для рутинного получения аутопробиотиков в форме капсул со сроком хранения 1 год.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors stated no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования РФ. Соглашение № 075-15-2022-302 (20.04.2022). / The study was supported by the Ministry of Science

and Higher Education of the Russian Federation, Agreement No. 075-15-2022-302 (20.04.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Патент № 2126043 Российская Федерация, МПК С 12 N 1/20, А 61 К 35/74. Способ получения банка аутохтонных штаммов микроорганизмов для восстановления кишечного микробиоценоза человека / Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г.; заявители и патентообладатели Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г. — 97112279/13; заявл. 29.07.1997; опубл. 10.02.1999.
2. Соловьева О.И. Использование пробиотиков и аутопробиотиков в лечении синдрома раздраженной толстой кишки / О. И. Соловьева, В. И. Симаненков, А. Н. Суворов, Е. И. Ермоленко, И. А. Шумихина, Д. А. Свиридо. //Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2017. — № 7 (143). — С. 115–120.
3. Капсулирование пробиотиков в гидрофильные полимеры: сборник статей Международной научно-практической конференции «Биотехнология и общество в XXI в.», 15–18 сентября 2015 г. / редкол. А. А. Ильичев [и др.]. — Барнаул: Алтайский государственный университет, 2015. — 176–179 с.
4. Гордиенко П.А. Научное обоснование создания новых лекарственных форм пробиотиков (обзор литературы и результаты собственных экспериментов) / П. А. Гордиенко, В. И. Чуешов, А. Д. Гордиенко, Е. В. Кудокочева // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. — 2015. — № 22. (219). — С. 121–127.
5. Frolova MD. Osobennosti razrabotki liofilizirovannykh zakvasok // Molochnaya promyshlennost'. 2008. — № 6. — S. 70–71.
6. Технологии инкапсуляции в пищевой промышленности: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых «Научные исследования и разработки к внедрению в АПК», 29–30 марта 2018 г.: / редкол.: Г. О. Такаландзе [и др.]. — Иркутск: ИрГСХА, 2018. — 456 с.
7. Патент № 2460778 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А61К 35/74, А23С 9/127. Способ получения аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина / Суворов А.Н., Симаненков В.И., Сундукова З.Р., Ермоленко Е.И., Цапиева А.Н., Донец В.Н., Соловьева О.И.; заявители и патентообладатели Суворов А.Н., Симаненков В.И. — № 2010154822/10; заявл. 30.12.2010; опубл. 10.09.2012, Бюл. № 16. — 7 с.
8. Патент № 2546253 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, С12Q 1/68, А61К 35/74, А23С 9/123. Способ получения персонифицированного аутопробиотического продукта и способ лечения синдрома раздраженной кишки с использованием этого про-

дукта / Симаненков В.И., Суворов А.Н., Соловьева О.И., Ермоленко Е.И., Цапиева А.Н., Сундукова З.Р.; заявители и патентообладатели Симаненков В.И., Суворов А.Н. — № 2013120765/10; заявл. 25.04.2013; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 10. — 18 с.

9. Кузьмина О.М. Конструирование защитных сред для криоаморазивания молочнокислых бактерий // Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ-80 лет): Сборник научных трудов. — М.: ВНИМИ, 2009. — С. 228–232.

10. Похиленко В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В. Д. Похиленко, А. М. Баранов, К. В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. — 2009. — № 4(12). — С. 99–121.

11. Государственная фармакопея СССР. Издание XI. Вып. 2: Общие методы анализа, лекарственное растительное сырье. // М.: Медицина, — 1989. — 398 с.

Информация об авторах:

Цапиева Анна Николаевна, к.б.н., научный сотрудник отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Морозова Анастасия Олеговна, младший научный сотрудник отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Карасева Алена Борисовна, научный сотрудник отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Новикова Надежда Сергеевна, научный сотрудник отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Суворов Александр Николаевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ».

Author information:

Tsapieva Anna N., research fellow at Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine;

Morozova Anastasia O., junior researcher at Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine;

Karaseva Alena B., research associate at Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine;

Novikova Nadezhda S., research associate fellow at Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine;

Suvorov Alexander N., PhD, Dr. Med. Sci., professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of Microbial therapy Department of Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616-022.7:616-08

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАКЦИННЫЕ КАНДИДАТЫ С ИНТЕГРИРОВАННЫМИ АДЬЮВАНТАМИ КАК СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ ЭФФЕКТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Леонтьева Г. Ф., Крамская Т. А., Грабовская К. Б., Гупалова Т. В.,
Дмитриев А. В., Суворов А. Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт
экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Леонтьева Галина Федоровна,
ФГБНУ «ИЭМ»,
ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-
Петербург, Россия, 197022.
E-mail: galeonte@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 02.10.2022
и принята к печати 23.10.2022.

РЕЗЮМЕ

Применение рекомбинантных белков в качестве вакцинных препаратов ограничивается их слабой иммуногенностью, которую можно усилить за счет использования адъювантов, разработка которых является важной и актуальной проблемой современной вакцинологии. Существенно, что адъюванты в качестве добавок к вакцинным препаратам вызывают озабоченность клиницистов. С этой точки зрения идея включения в структуру молекулы рекомбинантного белка внутреннего адъюванта представляет несомненный интерес.

Ранее нами были синтезированы и изучены два рекомбинантных вакцинных препарата, специфичных в отношении *S. agalactiae* (Su4) и *S. pneumoniae* (PSPF). Каждый из них представлял собой тандем из нескольких иммуногенных участков поверхностных бактериальных белков в сочетании с дополнительным адъювантным участком. В качестве внутреннего адъюванта выступала аминокислотная последовательность, идентичная флагеллину *S. typhimurium*. В настоящей работе мы исследовали возможность дополнительного усиления иммунной реакции организма на иммунизацию рекомбинантными белками Su4 и PSPF за счет одновременного введения внешнего адъюванта — карбоксиметилхитозана или Imject Alum.

Исследования показали, что дополнительное введение указанных адъювантов в состав вакцинного препарата не оказывало влияния на иммуногенность белков Su4 и PSPF, в состав которых входил внутренний адъювант флагеллин. Протективная эффективность иммунного ответа на все варианты иммунизации была сопоставимой.

Таким образом, включение в состав рекомбинантных белков флагеллиновой вставки в качестве внутреннего адъюванта обеспечивает развитие максимально возможного уровня иммунного ответа и его протективную эффективность в отношении соответствующих возбудителей бактериальной инфекции.

Ключевые слова: адъюванты, химерные рекомбинантные белки, хитозан, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*.

Для цитирования: Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Грабовская К.Б., Гупалова Т.В., Дмитриев А.В., Суворов А.Н. Рекомбинантные вакцинные кандидаты с интегрированными адъювантами как способ стимуляции эффективного иммунного ответа против возбудителей бактериальных инфекций. *Российский журнал персонализированной медицины*. 2022;2(6):64-77. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-64-77.

RECOMBINANT VACCINE CANDIDATES WITH INTEGRATED ADJUVANTS PROVIDE STIMULATION OF AN EFFECTIVE IMMUNE RESPONSE AGAINST BACTERIAL INFECTIONS

Leontieva G. F., Kramskaya T. A., Grabovskaya K. B., Gupalova T. V., Dmitriev A. V., Suvorov A. N.

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Leontieva Galina F.,
Institute of Experimental Medicine,
Academician Pavlov str., 12, Saint
Petersburg, Russia, 197022.
E-mail: galeonte@yandex.ru

Received 02 October 2022; accepted
23 October 2022.

ABSTRACT

The use of recombinant proteins as vaccine preparations is limited by their weak immunogenicity, which can be enhanced by the use of adjuvants, the development of which is an important and urgent problem of modern vaccinology. Significantly, adjuvants as additives to vaccine preparations are of concern to clinicians. From this point of view, the idea of including an internal adjuvant into the structure of a recombinant protein molecule is of undoubted interest. Previously, we synthesized and studied two recombinant vaccine preparations specific for *S. agalactiae* (Su4) and *S. pneumoniae* (PSPF). Each of them was a tandem of immunogenic bacterial surface proteins in combination with an additional adjuvant site. The amino acid sequence identical to flagellin acted as an internal adjuvant. In this work, we investigated the possibility of additional enhancement of the body's immune response to immunization with

recombinant Su4 and PSPF proteins due to the simultaneous administration of an external adjuvant, carboxymethylchitosan or Imject Alum.

Studies have shown that the additional introduction of these adjuvants into the composition of the vaccine preparation did not affect the immunogenicity of the Su4 and PSPF proteins, which included the internal adjuvant flagellin. The protective efficacy of the immune response to all immunization options was comparable.

Thus, the inclusion of a flagellin insert as an internal adjuvant into the composition of recombinant proteins ensures the development of the highest possible level of the immune response and its protective efficacy against the corresponding pathogens of a bacterial infection.

Key words: *adjuvants, chimeric recombinant proteins, chitosan, S. agalactiae, S. pneumonia.*

For citation: Leontieva GF, Kramskaya TA, Grabovskaya KB, Gupalova TV, Dmitriev AV, Suvorov AN. Recombinant vaccine candidates with integrated adjuvants provide stimulation of an effective immune response against bacterial infections. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):64-77. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-64-77.

Список сокращений: КМХ — карбоксиметилхитозан, ФФБ — физиологический раствор.

ВВЕДЕНИЕ

Использование рекомбинантных аналогов поверхностных белков патогенных стрептококков в качестве вакцинных препаратов для профилактики стрептококковых инфекций стало предметом многих современных исследований в области иммунопрофилактики [1]. Десятки белков исследованы, получены экспериментальные доказательства их иммуногенности и защитной эффективности иммунного ответа. В последние годы предприняты попытки синтеза химерных рекомбинантных белковых структур, то есть искусственных молекул, имеющих несколько антигенных специфичностей, идентичных различным поверхностным белкам стрептококков [2–5].

Применение рекомбинантных белков в качестве вакцинных препаратов ограничивается их слабой иммуногенностью [6]. Иммунный ответ можно усилить за счет применения адъювантов, выбор которых чрезвычайно велик [7], если речь идет о решении экспериментальных задач, и очень незначителен для использования в практическом здравоохранении [8], поскольку адъюванты, введенные в состав профилактической вакцины, должны давать минимальные побочные реакции, что не всегда соответствует действительности [9]. С этой точки зрения может представлять интерес

идея включения в состав молекулы рекомбинантного белка полипептидных последовательностей, обладающих потенциалом иммуностимуляции. Вакцинный препарат с такими свойствами не требует использования дополнительных адъювантов.

Нами были синтезированы два рекомбинантных вакцинных препарата, специфичных в отношении *S. agalactiae* (Su4) и *S. pneumoniae* (PSPF). Каждый из них представлял собой тандем иммуногенных эпитопов поверхностных бактериальных белков с дополнительным участком, повторяющим аминокислотную последовательность флагеллина [3]. Бактериальный белок флагеллин является лигандом рецептора TLR5, способного распознавать ассоциированные с патогенами молекулярные структуры [10]. Таким образом, флагеллин посредством стимуляции механизмов врожденного иммунитета усиливает адаптивные иммунные реакции.

Иммуногенные свойства обеих химерных рекомбинантных конструкций были изучены ранее [2, 11].

В настоящей работе мы изучили возможность дополнительного усиления иммунной реакции организма на иммунизацию рекомбинантными белками, имеющими внутренний адъювант на основе флагеллина, за счет одновременного добавления внешнего адъюванта — карбоксиметилхитозана или Imject Alum.

Природный биополимер хитозан и ряд его химических производных могут быть интересны

в качестве безопасных и биodeградируемых адъювантов в составе профилактических вакцин для человека и животных. Входящие в состав Imject Alum соли алюминия широко используются в экспериментальной практике.

Исследования показали, что дополнительное введение адъювантов в состав вакцинного препарата не оказывало влияния на иммуногенность белков Su4 и PSPF, в состав которых входил внутривенный адъювант флагеллин. Протективная эффективность иммунного ответа на все варианты иммунизации была сопоставимой.

Таким образом, включение в состав рекомбинантных белков внутренних адъювантов обеспечивает развитие максимально возможного уровня иммунного ответа и его протективную эффективность в отношении соответствующих возбудителей бактериальной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования выполнены на беспородных мышах-самках с массой 16–18 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово». Работа проводилась с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986 г.). Животных выводили из опыта с использованием эфирного наркоза.

Адъюванты. В качестве адъювантов использовали коммерческий препарат Alum-адъюванта (Sigma) и 1,5 % (вес/объем) взвесь карбоксиметилхитозана (КМХ) в физиологическом растворе (ФФБ). КМХ — О-карбоксиметил-(1,4-2-амино-2 дезокси)-β-D-глюкан, амфифильное производное, с заряженными гидрофильно-карбоксиметильными группами. Необходимое количество стерильного порошка КМХ взвешивали в ФФБ и оставляли для полного растворения в течение 18–20 часов.

Вакцинные белки. Использовали препараты рекомбинантных химерных белков PSPF (56 kDa) и Su4 (60 kDa), полученные в отделе молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ». Вакцинные препараты готовили смешиванием раствора белка и адъюванта в соотношении 2:1 и последующей инкубацией в течение часа при комнатной температуре для достижения лучшей сорбции антигенов на адъювантах.

Иммунизация мышей. Иммунизацию осуществляли двукратно с интервалом в 3 недели путем подкожных инъекций или интраназальной аппли-

кации белков Su4 и PSPF в дозе 20 мкг/мышь в разнообразных комбинациях с адъювантами. Состав вакцинных препаратов и наименования экспериментальных групп указаны в таблицах 1–3.

Через 21, 35 и 42 дня после начала иммунизации у экспериментальных животных проводили отбор крови из подчелюстной вены для контроля иммунного ответа.

Анализ протективной эффективности вакцинации. Через три недели после окончания вакцинации у мышей, иммунизированных PSPF, и контрольных животных вызывали пневмококковую инфекцию путем интраназального заражения *S. pneumoniae* 3 серотипа, штамм 73, из коллекции ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА» (Санкт-Петербург), в дозе 6,0 lg КОЕ/мышь, в объеме 30 мкл. Через 24 и 48 часов от начала инфекции у мышей получали легкие для последующего анализа бактериальной нагрузки на орган.

У мышей, иммунизированных белком Su4, через три недели после окончания вакцинации вызывали стрептококковую инфекцию путем интраназального заражения *S. agalactiae* 1ab серотипа, штамм H36, из коллекции ФГБНУ «ИЭМ» (Санкт-Петербург), в дозе 8,0 lg КОЕ/мышь, в объеме 30 мкл. Через 3 и 5 часов от начала инфекции у мышей получали легкие для последующего анализа бактериальной нагрузки на орган. Количественную оценку выполняли методом счетного высева последовательных десятикратных разведений гомогената легких на плотную среду агара Шедлера для пневмококков и кровяного агара для СГВ.

Иммунологические методы. В сыворотке крови определяли суммарные IgG в общепринятом ИФА с применением коммерческих козьих конъюгатов анти IgG мыши с пероксидазой хрена (Sigma).

Статистический анализ. Значимость различий оценивали с использованием критерия достоверности Стьюдента (t), критическое значение уровня значимости принималось равным 5 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ адъювантных свойств КМХ в составе интраназальной вакцины на основе химеры PSPF

Однократная интраназальная вакцинация мышей пневмохимерой без адъюванта и в присутствии КМХ не приводила к накоплению специфических IgG в сыворотке крови. Только у одной из шести мышей в каждой из двух сравниваемых групп уровень PSPF-специфических антител отличался от контроля (рис. 1).

Таблица 1. Экспериментальные группы для анализа адъювантных свойств КМХ в составе мукозальной (интраназальной) вакцины на основе химеры PSPF

Группы	PSPF	КМХ	ФФБ
Контроль ФФБ (n = 6)	-	-	+
Контроль КМХ (n = 6)	-	1,5 %	+
PSPF + ФФБ (n = 6)	20 мкг/мышь	-	+
PSPF+ КМХ (n = 6)	20 мкг/мышь	1,5 %	+

Таблица 2. Экспериментальные группы для анализа адъювантных свойств в составе парентеральной (подкожной) вакцины на основе PSPF

Группы	PSPF	КМХ	Alum	ФФБ
Контроль ФФБ (n = 6)	-	-	-	+
Контроль КМХ (n = 6)	-	1,5 %	-	+
Контроль Alum (n = 6)	-	-	50 мкг/мышь	+
Контроль Alum+ КМХ (n = 6)	-	1,5 %	50 мкг/мышь	+
PSPF +ФФБ	20 мкг/мышь	-	-	+
PSPF+ КМХ (n = 6)	20 мкг/мышь	1,5 %	-	+
PSPF+ Alum (n = 6)	20 мкг/мышь	-	50 мкг/мышь	+
PSPF+ Alum+ КМХ (n = 6)	20 мкг/мышь	1,5 %	50 мкг/мышь	+

Таблица 3. Экспериментальные группы для анализа адъювантных свойств КМХ в составе парентеральной (подкожной) вакцины на основе Su4

Группы	Su4	КМХ	ФФБ
Контроль ФФБ (n = 6)	-	-	+
Контроль КМХ (n = 6)	-	1,5 %	+
Su4 + ФФБ (n = 6)	20 мкг/мышь	-	+
Su4 +КМХ (n = 6)	20 мкг/мышь	1,5 %	+

Повторная иммунизация стимулировала накопление специфических антител. К 35 и 42 дню от начала вакцинации в сыворотке крови содержание специфических IgG продолжало постепенно нарастать, однако не было выявлено достоверных различий между иммуногенностью пневмохимеры в свободном виде и в присутствии карбоксиметилхитозана (рис. 1).

Сравнительный анализ протективной эффективности иммунизации различными вариантами вакцин выявил две различные тенденции в развитии экспериментальной инфекции в сравниваемых группах. При интраназальном заражении мышей, вакцинированных пневмохимерой без КМХ, через 48 часов от на-

чала инфекции наблюдали накопление пневмококка в легких контрольных мышей и отсутствие возбудителя в легких иммунных животных (рис. 2). Это свидетельствовало о защитной эффективности сформированного иммунного ответа.

После интраназальной вакцинации пневмококковой вакциной в присутствии КМХ не только у иммунных, но даже у контрольных мышей, получавших интраназально только препарат КМХ, не было отмечено какого-либо существенного накопления

пневмококка в легких через 24 и 48 часов после заражения (рис. 3).

Таким образом, КМХ в составе мукозальной интраназальной вакцины не обеспечивал адъювантного эффекта в отношении гуморального IgG иммунного ответа на пневмохимеру PSPF. Следует отметить, что двукратное введение КМХ мышам способствовало повышению их общей устойчивости к пневмококковой инфекции по сравнению с мышами, получавшими интраназально обыкновенный физиологический раствор.

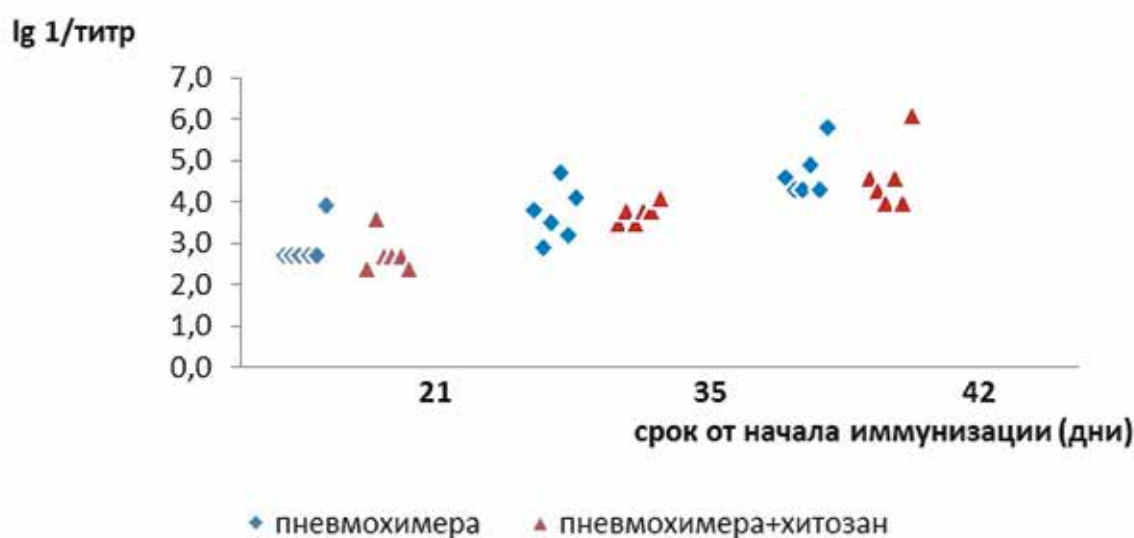


Рис. 1. Уровень специфических IgG в сыворотке крови после интраназальной иммунизации мышей пневмохимерой в свободном виде и при наличии хитозана

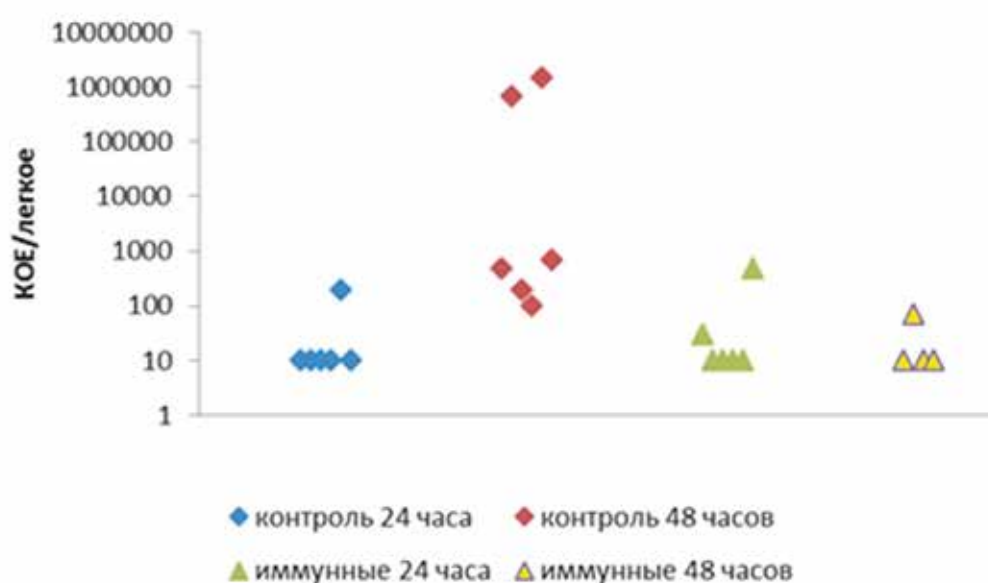


Рис. 2. Содержание пневмококков в легких в динамике инфекции у мышей, иммунизированных интраназальной химерой PSPF в свободной форме

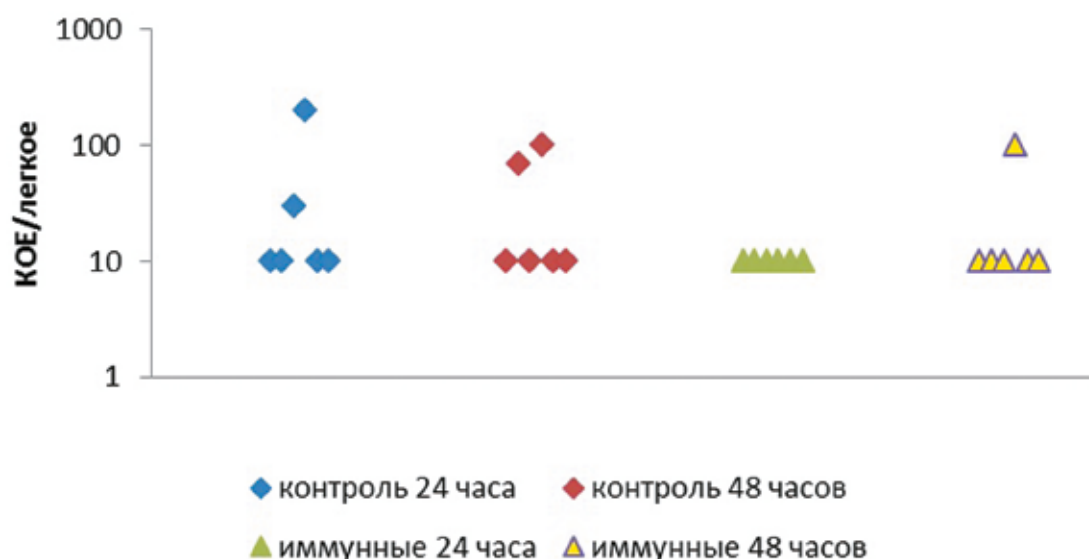


Рис. 3. Содержание пневмококков в легких в динамике инфекции у мышей, иммунизированных интраназально химерой PSPF при наличии КМХ

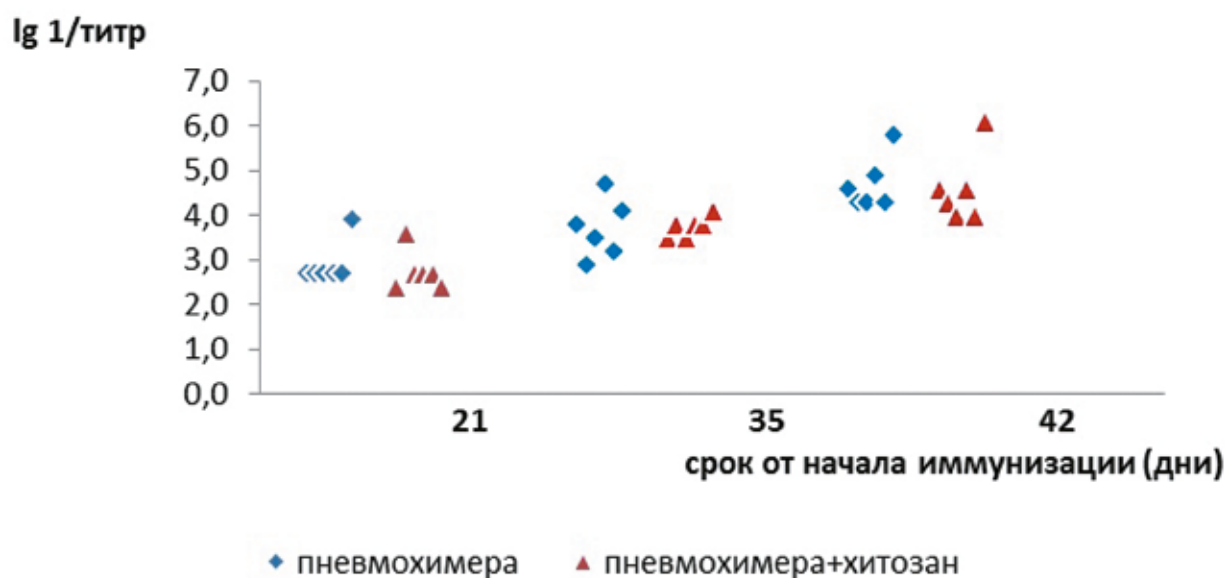


Рис. 4. Уровень специфических IgG в сыворотке крови после подкожной иммунизации мышей пневмохимерой в свободном виде и при наличии КМХ

Анализ адъювантных свойств КМХ и Alum в составе парентеральной (подкожной) вакцины на основе химеры PSPF

Подкожное введение пневмохимеры PSPF индивидуально и в сочетании с коммерческим адъювантом Alum и КМХ показало, что во всех исследуемых группах специфический гуморальный иммунный ответ развивается после однократного введения антигена. Повторная вакцинация обеспе-

чивала дальнейшую стимуляцию антителогенеза, о чем свидетельствовал подъем уровня PSPF-специфических IgG в сыворотке крови через 35 и 42 дня после начала вакцинации (рис. 4, 5).

Достоверных отличий в силе иммунного ответа между группами сравнения не было выявлено. Пневмохимера в свободной форме оказалась таким же сильным антигеном, как и в комбинации с адъювантом Alum и КМХ. Адъювантный эффект

КМХ не был зарегистрирован. Следует заметить, что к 42 дню отмечается даже тенденция к снижению содержания IgG антител в группе с КМХ. Вместе с тем отсутствовал и адъювантный эффект коммерческого препарата Alum.

Заражение иммунных мышей пневмококком в сублетальной дозе выявило закономерности, аналогичные тем, что были отмечены при интраназальной вакцинации. В контрольной группе,

получавшей подкожно ФФБ, отмечали тенденцию к нарастанию содержания пневмококков в легких через 48 часов после заражения. Иммунные животные были защищены и свободны от возбудителя полностью (рис. 6).

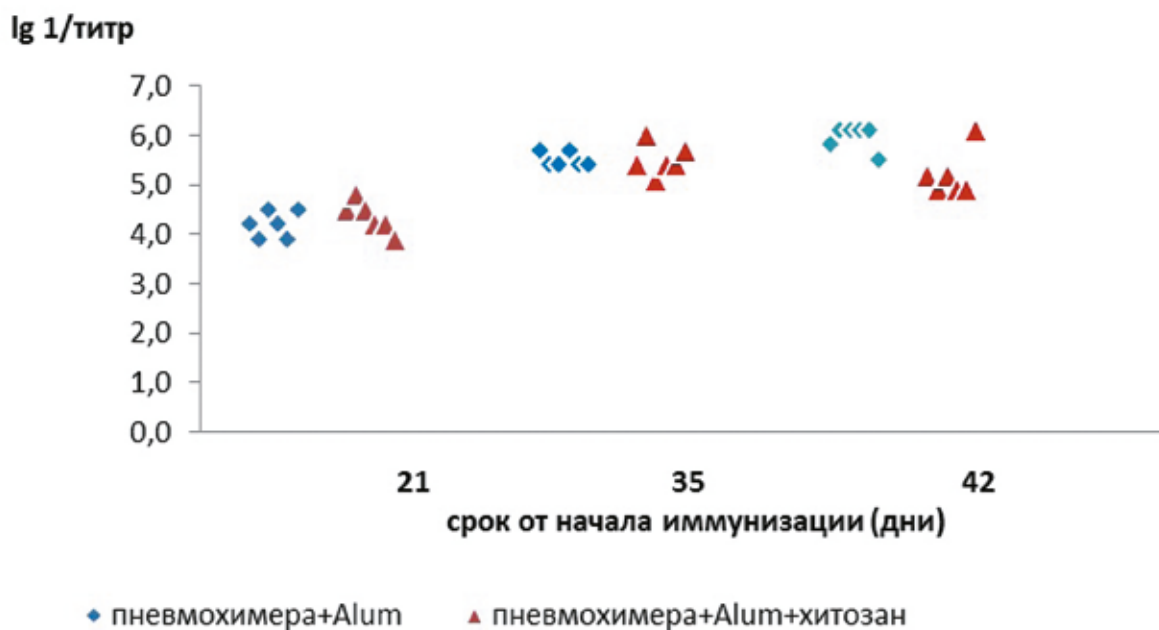


Рис. 5. Уровень специфических IgG в сыворотке крови после подкожной иммунизации мышей пневмохимерой в сочетании с Alum или смеси Alum и KMX

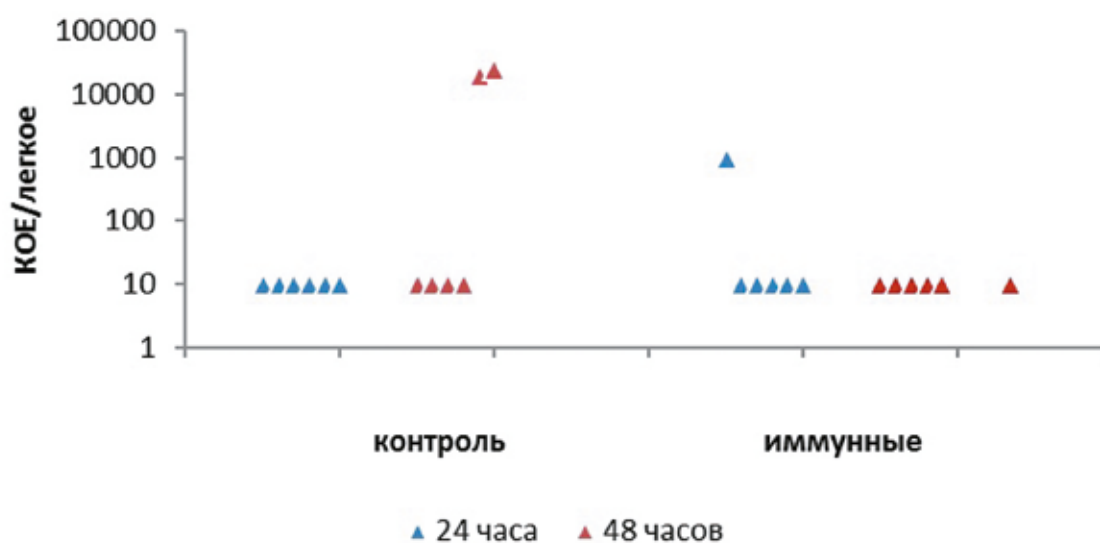


Рис. 6. Содержание пневмококков в легких в динамике инфекции у мышей, иммунизированных подкожно химерой PSPF в свободной форме

шей, вакцинированных препаратом Su4, содержащим карбоксиметилхитозан (рис. 8).

Через две недели после повторной вакцинации (42 дня) в обеих группах уровень специфических антител в сыворотке крови животных, вакцинированных Su4 как в свободной форме, так и с КМФ, был одинаковым (рис. 9 и 10).

Клиническую эффективность вакцинации оценивали в процессе инфекции животных после интраназального введения стрептококка группы В серотипа Iab, штамм H36, в дозе 8,0 lg КОЕ.

Мыши, иммунизированные Su4, через 24 часа были свободны от возбудителя в обеих иммунных группах, имеющих в качестве контроля либо ФФБ, либо КМХ, тогда как у неиммунных животных СГВ выделяли из легких в высоком титре (рис. 11, 12).

Отличий в устойчивости животных к СГВ между сравниваемыми группами Su4 в смеси с КМХ и Su4 в смеси с ФФБ не было выявлено (рис. 11 и 12).

Следует отметить, что и в этой серии экспериментов контрольные мыши, дважды получавшие

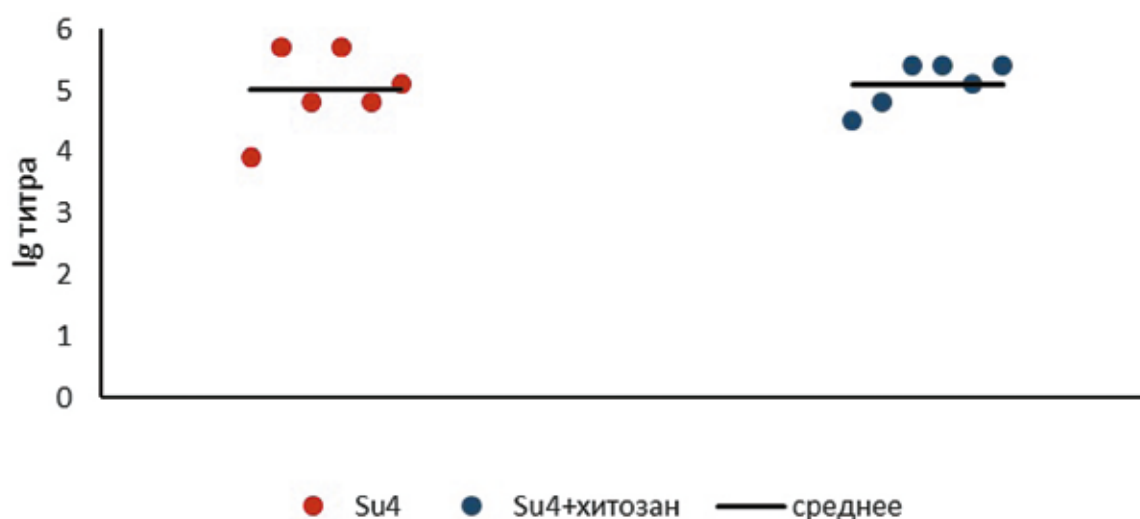


Рис. 9. Уровень Su4-специфических IgG в сыворотке крови через 35 дней после начала иммунизации полипептидом Su4

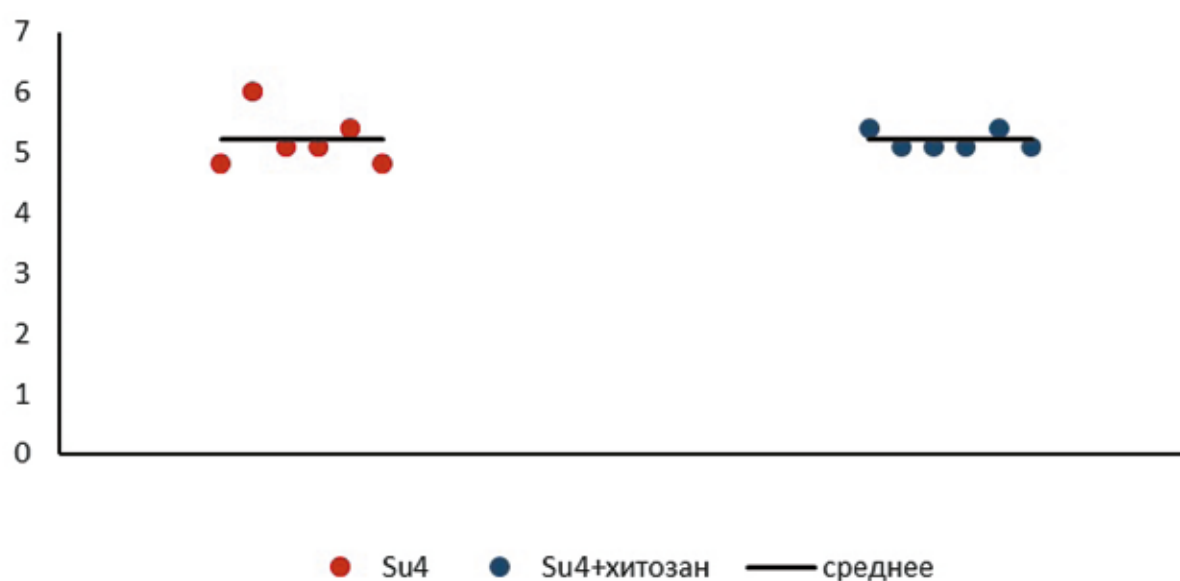


Рис. 10. Уровень Su4-специфических IgG в сыворотке крови через 42 дня после начала иммунизации полипептидом Su4

КМХ подкожно, демонстрировали тенденцию более быстрого освобождения от СГВ по сравнению с мышами, получившими ФФБ в том же режиме.

В смеси со стрептохимерой Su4 КМХ обеспечивал достоверный адъювантный эффект в уровне гуморального ответа только после однократной вакцинации. Повторная вакцинация нивелировала различия между группами. Протективный потенциал иммунной защиты, вызванной Su4, в присутствии КМХ и в свободной форме, не отличался, обе группы животных освобождались от возбудителя с одинаковой скоростью.

ОБСУЖДЕНИЕ

Адъювантные свойства солей и оксидов алюминия хорошо известны. Препарат Alum, основой которого является гидроокись алюминия, наиболее широко применяется в качестве вакцинного адъюванта [12]. Считается, что адъювантный эффект достигается за счет формирования «депо» белков и продолжительного поступления антигенов в циркуляцию, а также за счет размеров частиц ($< 10 \mu\text{m}$) с адсорбированными вакцинными антигенами, способными оптимальным образом представлять антигены иммунокомпетентным клеткам [13].

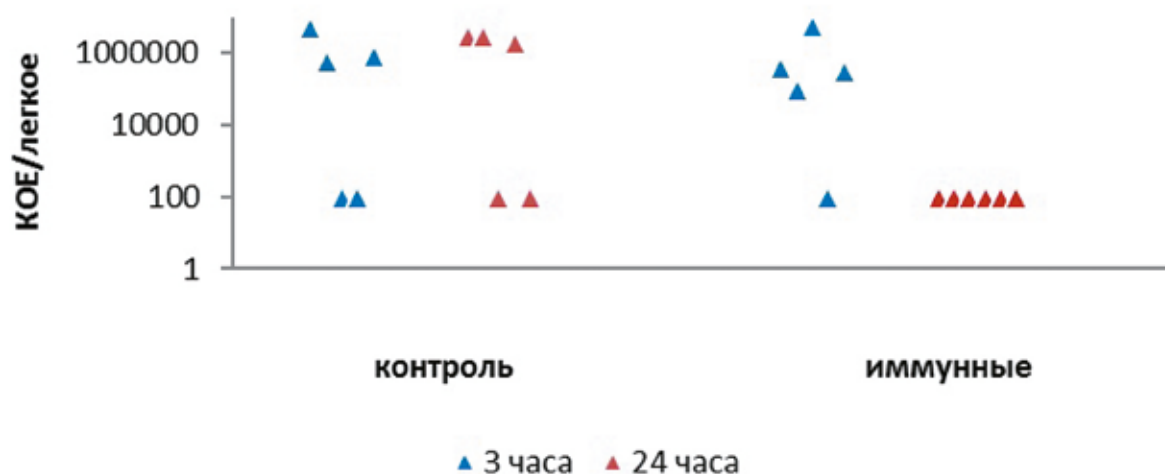


Рис. 11. Содержание бактерий в легких мышей, иммунизированных Su4, через 3 и 24 часа после заражения СГВ

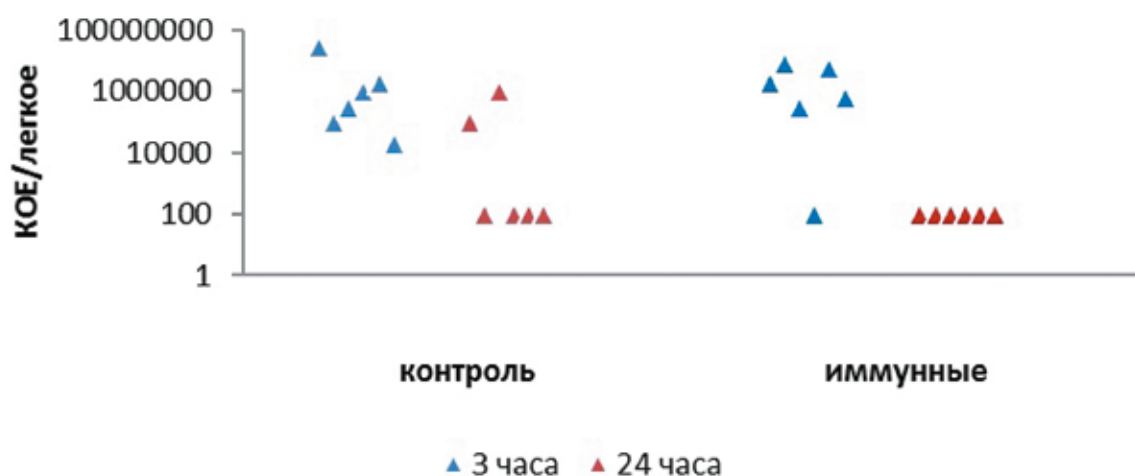


Рис. 12. Содержание бактерий в легких мышей, иммунизированных Su4 в смеси с КМХ, через 3 и 24 часа после заражения СГВ

Благодаря наличию большого количества гидрофильно-карбоксиметильных групп КМХ также обладает высокими адгезивными свойствами, способностью менять заряд в зависимости от pH среды, а значит, в разной степени взаимодействовать с молекулами белка, общий заряд которых зависит от кислотности среды. Вероятно, сила взаимодействия КМХ и белковых молекул играет решающую роль в способности КМХ проявлять адьювантный эффект [14].

Исследование дополнительного адьювантного эффекта препарата карбоксиметилхитозана и Alum Inject было проведено на модели иммунного ответа на вакцинацию двумя различными рекомбинантными химерными белками, экспериментальными вакцинными препаратами для профилактики бактериальных инфекций.

На модели химерного рекомбинантного белка PSPF изучен адьювантный потенциал КМХ в составе мукозальной и парентеральной вакцины, а также исследована его возможная активность в роли коадьюванта совместно со стандартным адьювантом Alum. Не было обнаружено различий в силе специфического гуморального IgG ответа на PSPF вакцину, введенную без адьювантов или совместно с каждым адьювантом или их смесью. Мукозальная и парентеральная формы PSPF вакцины стимулировали формирование клинически эффективной иммунной защиты против пневмококковой инфекции независимо от состава вакцины и пути вакцинации.

По отношению к белку Su4 КМХ проявил адьювантные свойства только после первой иммунизации. Усиление IgG иммунного ответа было достоверно зарегистрировано через 21 день после начала введения Su4-вакцины (рис. 11). Повторная вакцинация Su4 приводила к выравниванию показателей гуморального иммунного ответа в сравниваемых экспериментальных группах. Протективная эффективность иммунной защиты была изучена после второй вакцинации на фоне одинакового иммунного ответа. Соответственно, процесс очищения от СГВ инфекции не отличался у мышей, получавших вакцину с КМХ и без него.

В работе показано, что при наличии КМХ и/или адьюванта Alum иммуногенность белка PSPF не менялась. Ранее нами была установлена относительно высокая иммуногенность белка PSPF. Возможно, отсутствие дополнительной стимуляции при добавлении адьювантов связано с максимально возможной интенсивностью иммунного ответа на собственно белок PSPF. Поскольку адьювантный эффект производных хитозана и Alum обусловлен его химической полимерной струк-

турой и способностью формировать антигенное депо, можно предположить, что PSPF в силу наличия в молекуле внутреннего адьюванта добивается максимальной иммунной реакции за счет других механизмов, в частности запуска реакций врожденного иммунитета через взаимодействие флагеллинового фрагмента с TLR5. Синергия механизмов врожденного и адаптивного иммунитета является условием развития эффективного иммунного ответа на антиген [15].

В качестве дополнительного наблюдения следует отметить важную закономерность, связанную с использованием собственно препарата КМХ. Зарегистрировано, что устойчивость к инфекции у контрольных мышей, получавших КМХ двукратно в виде инъекций под кожу или аппликаций на слизистую носа, была выше, чем у мышей, получавших физиологический раствор. Доказательства специфической достоверности полученных результатов, которые заслуживают внимания, требуют дополнительных исследований на большем численном основании. В литературе имеются данные относительно антивирусной [16, 17] и антибактериальной [18, 19] активности хитозана и его производных. Вероятно, что данный феномен обусловлен способностью хитозана неспецифически активировать реакции врожденного иммунитета [20].

Итогом проделанной работы является вывод о том, что дополнительное введение двух известных и широко используемых в практике адьювантов в состав вакцинного препарата не оказывало влияния на иммуногенность белков Su4 и PSPF, кандидатных вакцинных препаратов, в структуру которых входил внутренний адьювант флагеллин, а также на протективную эффективность сформированного иммунного ответа в отношении исследованных бактериальных инфекций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследование двух химерных белковых препаратов, содержащих в своей структуре флагеллин в качестве внутреннего адьюванта, показало, что включение в структуру рекомбинантных белков внутренних адьювантов является перспективной стратегией повышения иммуногенности и эффективности рекомбинантных белков в качестве компонентов профилактических вакцинных препаратов.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / The authors declares no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Christodoulides M, Jolley KA, Heckels JE. Recombinant proteins in vaccine development. *Methods Mol Med.* 2001;66:167–80. DOI: 10.1385/1-59259-148-5:167. PMID: 21336755.
2. Suvorov A, Dukhovlinov I, Leontieva G, et al. Chimeric Protein PSPF, a Potential Vaccine for Prevention Streptococcus pneumoniae Infection January 2015 *Journal of Vaccines and Vaccination* 06(06) DOI: 10.4172/2157-7560.1000304.
3. Laiño J, Villena J, Suvorov A, et al. Nasal immunization with recombinant chimeric pneumococcal protein and cell wall from immunobiotic bacteria improve resistance of infant mice to Streptococcus pneumoniae infection. *PLoS One.* 2018 Nov 5;13(11):e0206661. DOI: 10.1371/journal.pone.0206661. PMID: 30395582; PMCID: PMC6218053.
4. Hu MC, Walls MA, Stroop SD, et al. Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. *Infect Immun.* 2002;70(4):2171–7.
5. Dale JB, Walker MJ. Update on group A streptococcal vaccine development. *Curr Opin Infect Dis.* 2020 Jun;33(3):244–250. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000644.
6. Shan P, Wang Z, Li J, et al. A New Nano Adjuvant of PF3 Used for an Enhanced Hepatitis B Vaccine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 May 10;10:903424. DOI: 10.3389/fbioe.2022.903424. PMID: 35620473; PMCID: PMC9127465.
7. Guan LJ, Pei SX, Song JJ, et al. Screening immune adjuvants for an inactivated vaccine against Erysipelothrix rhusiopathiae. *Front Vet Sci.* 2022 Jul 26;9:922867. DOI: 10.3389/fvets.2022.922867. PMID: 35958306; PMCID: PMC9360596.
8. Kwissa M, Kasturi SP, Pulendran B. The science of adjuvants. *Expert Rev Vaccines.* 2007 Oct;6(5):673–84. DOI: 10.1586/14760584.6.5.673. PMID: 17931149.
9. Petrovsky N. Comparative Safety of Vaccine Adjuvants: A Summary of Current Evidence and Future Needs. *Drug Saf.* 2015 Nov;38(11):1059–74. DOI: 10.1007/s40264-015-0350-4.
10. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099–1103.
11. Filimonova VYu, Dukhovlinov IV, Kramskaya TA, et al. Chimeric proteins based on immunogenic epitopes of surface pathogenicity factors of streptococci as a vaccine for the prevention of infection caused by group B streptococci. *Academic Medical Journal*, 2016, vol. 16, No. 3, 82–89. In Russian [Филимонова В.Ю., Духовлинов И.В., Крамская Т.А. и др. Химерные белки на основе иммуногенных эпитопов поверхностных факторов патогенности стрептококков в качестве вакцины для профилактики инфекции, вызванной стрептококками группы В. Медицинский академический журнал, 2016, т. 16, № 3, 82–89.]
12. Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J Med Microbiol.* 2012 Jul;61(Pt 7):927–934. DOI: 10.1099/jmm.0.038943-0.
13. RK Gupta 1 Aluminum compounds as vaccine adjuvants *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Jul 6;32(3):155–172. DOI: 10.1016/s0169-409x(98)00008-8).
14. Zhao K, Han J, Zhang Y, et al. Enhancing Mucosal Immune Response of Newcastle Disease Virus DNA Vaccine Using N-2-Hydroxypropyl Trimethylammonium Chloride Chitosan and N,O-Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles as Delivery Carrier. *Mol Pharm.* 2018 Jan 2;15(1):226–237. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00826. Epub 2017 Dec 6. PMID: 29172532.
15. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7:179–190. DOI: 10.1038/nri2038.
16. Kulikov SN, Chirkov SN, Ilyin AV. Influence of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Applied biochemistry and microbiology.* — 2006. — T. 42. — No. 2. — S. 224–228. In Russian [Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В. Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях. Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42. — № 2. — С. 224–228.]
17. Makimura YY, Watanabe S, Suzuki T., et al. Chemoenzymatic synthesis and application of a sialoglycopolymer with a chitosan backbone as a potent inhibitor of human influenza virus hemagglutination. *Carbohydr Res.* — 2006. — Vol. 341. — P. 1803–1808.
18. Lim SH, Hudson SM. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *J. Macromol. Sci.* — 2003. — Vol. 43. — N. 2. — P. 223–269.
19. Lin SB, Lin YC, Chen HH. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: characterisation and antibacterial activity. *Food Chemistry.* — 2009. — Vol. 116. — N. 1. — P. 47–53.
20. Moine L, Canali MM, Porporatto C, Correa SG. Reviewing the biological activity of chitosan in the mucosa: Focus on intestinal immunity. *Int J Biol Macromol.* 2021 Oct 31;189:324–334. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.098.

Информация об авторах:

Леонтьева Галина Федоровна, к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Крамская Татьяна Анатольевна, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Грабовская Корнелия Борисовна, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Гупалова Татьяна Виталиевна, д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Дмитриев Александр Валентинович, д.б.н., директор ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Суворов Александр Николаевич, д.м.н., заведующий отделом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Author information:

Leontieva Galina F., Cand. Sc. (Biology), Leading Researcher, Institute of Experimental Medicine;

Kramskaya Tatyana A., Cand. Sc. (Biology), Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine;

Grabovskaya Kornelia B., Cand. Sc. (Biology), Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine;

Gupalova Tatyana V., D.Sc. (Biology), Leading Researcher, Institute of Experimental Medicine;

Dmitriev Alexander V., D.Sc. (Medicine), director, Institute of Experimental Medicine;

Suvorov Alexander N., D.Sc. (Medicine), Head of Department, Institute of Experimental Medicine.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 618.15-022.7:616-08

НАРУШЕНИЯ МИКРОБИОТЫ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОМ ВАГИНОЗЕ И ВОЗМОЖНОСТИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОБИОТИКОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Климов Н. А., Шамова О. В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Научный центр мирового уровня
«Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Шамова Ольга Валерьевна,
ФГБНУ «ИЭМ»,
ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-
Петербург, Россия, 197022.
E-mail: shamova@iemspb.ru

Статья поступила в редакцию 13.10.2022
и принята к печати 14.11.2022.

РЕЗЮМЕ

В обзоре представлены литературные данные об этиологии и лечении бактериального вагиноза. Бактериальный вагиноз обусловлен сменой протективной микробиоты нижнего отдела женского репродуктивного тракта на патогенную. Данное заболевание имеет широкое распространение в мире, в ряде случаев протекает бессимптомно, но сопровождается осложнениями, к которым относятся хориоамниониты, воспалительные заболевания органов малого таза, цервициты, преждевременные роды. В других случаях это заболевание характеризуется возвратным течением, требующим персонифицированного лечения.

Ключевые слова: бактериальный вагиноз, лечение, микробиота, персонифицированная медицина, этиология.

Для цитирования: Климов Н.А., Шамова О.В. Нарушения микробиоты при бактериальном вагинозе и возможности персонализированной терапии заболевания с применением пробиотиков (обзор литературы). Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(6):78-90. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-78-90.

MICROBIOTA DISORDERS IN BACTERIAL VAGINOSIS AND THE POSSIBILITY OF PERSONALIZED THERAPY OF THE DISEASE WITH THE USE OF PROBIOTICS (REVIEW)

Klimov N. A., Shamova O. V.

Institute of Experimental medicine, World-Class Research Center for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Shamova Olga V.,
Institute of Experimental medicine,
Academician Pavlov str., 12, Saint
Petersburg, Russia, 197022.
E-mail: shamova@iems.spb.ru

Received 13 October 2022; accepted
14 November 2022.

ABSTRACT

The review presents data on the etiology and treatment of bacterial vaginosis. Bacterial vaginosis is caused by the replacement of a protective microbiota in a lower part of a female reproductive tract with the pathogenic one. This disease is widespread in a world, in some cases it is asymptomatic, but is accompanied by complications, which include chorioamnionitis, inflammatory diseases of the pelvic organs, cervicitis, premature birth. In some cases, the disease is characterized by a recurrent course that requires a personalized treatment.

Key words: bacterial vaginosis, etiology, microbiota, personalized medicine, treatment.

For citation: Klimov NA, Shamova OV. Microbiota disorders in bacterial vaginosis and the possibility of personalized therapy of the disease with the use of probiotics (review). Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):78-90. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-78-90.

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ВАГИНОЗ

Список сокращений: БАБВ — бактерии, ассоциированные с бактериальным вагинозом, БВ — бактериальный вагиноз, КОЕ — колониеобразующие единицы, МИК — минимальная ингибирующая концентрация, ПЦР — полимеразная цепная реакция, СТ — цервикотип.

ВВЕДЕНИЕ

Микробиота представляет собой совокупность микроорганизмов, колонизирующих организм человека. Нарушение состава микробиоты лежит в основе патогенеза широкого спектра заболеваний, а коррекция этих нарушений является одним из важнейших путей персонализированной терапии данных заболеваний.

Бактериальный вагиноз (БВ) является дисбиозом вагинальной микробиоты [1], при котором непатогенная микробиота нижнего отдела женского репродуктивного тракта, в которой преобладают протективные лактобациллы, замещается на патогенную микробиоту.

БВ является самым распространенным заболеванием у женщин репродуктивного возраста. В разных популяциях от 20 % до 50 % женщин болеют БВ [2, 3]. Распространенность БВ у европейских женщин составляет от 5 % до 15 %, женщин Азии — 20–30 %, испаноязычных женщин — 30 % и у женщин черной расы — 45–55 % [1].

Симптомами БВ являются гомогенные водянистые вагинальные выделения, часто с неприятным запахом, увеличение содержания в вагинальных секретах слущенных эпителиальных клеток [4], покрытых бактериями и называемых ключевыми клетками (clue cells), болезненные ощущения (зуд). У части женщин данное заболевание может протекать бессимптомно.

БВ определяет развитие ряда патологий, к которым относятся хориоамниониты, воспалительные заболевания органов малого таза, цервициты, преждевременные роды и рождение недоношенных детей. Женщины с БВ также обладают более высокой подверженностью к инфекциям, вызываемым *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, вирусом иммунодефицита человека и вирусом простого герпеса 2-го типа, чем здоровые женщины [5–8].

При бессимптомном течении заболевания диагноз ставится по наличию хотя бы трех из четырех признаков по Амселу, к которым относятся: гомогенные вагинальные выделения, вагинальный pH > 4,5, появление характерного «рыбного» запаха при

добавлении КОН к вагинальной жидкости и наличие ключевых клеток при микроскопии влажного вагинального мазка [9]. Также применяется подсчет по Нугенту соотношения характерных для БВ и отличающихся по морфологии от лактобацилл бактериальных клеток к лактобациллам после окраски вагинального мазка по Граму. При соотношении 0–3 пациентка считается здоровой, при 4–6 — состояние промежуточное, при 7–10 ставится диагноз бактериального вагиноза [10]. В последнее время развиваются молекулярные методы диагностики, основанные на пиросеквенировании участков гена рибосомной 16S рРНК, либо на пиросеквенировании полных геномов множества вагинальных бактерий. Анализ и подсчет генов или их фрагментов или целых геномов позволяет точно определить преобладание в микробиоме женщины протективной либо патогенной микрофлоры, а также подсчитать содержание каждого из основных членов микробного сообщества в образце [8, 11–14].

ВАГИНАЛЬНАЯ МИКРОБИОТА ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН

Содержание бактерий в вагинальной жидкости, которая выделяется в объеме от 1 до 4 мл/сутки [15], составляет примерно 10^8 бактерий/г [16]. А. Дедерлайн в 1892 году впервые описал наличие в вагинальной жидкости здоровых женщин репродуктивного возраста Грам⁽⁺⁾ бацилл, а также ее повышенную кислотность [17]. Позднее было показано, что к вагинальным лактобациллам здоровых женщин относятся не менее 20 видов [1].

Методом пиросеквенирования образцов вагинальных ДНК было показано, что вагинальная микробиота большинства здоровых женщин репродуктивного возраста в Европе, США и Бразилии характеризуется преобладанием лактобацилл, к которым относятся *Lactobacillus crispatus*, а также *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. vaginalis*. Реже встречаются (в разных сочетаниях) *L. ruminis*, *L. mucosae*, *L. paracasei*, *L. coleohomnis* и другие [8, 14, 18, 19], а всего у здоровых женщин было обнаружено не менее 250 видов вагинальных бактерий [20].

Исследования образцов ДНК здоровых женщин в США позволили выделить 5 групп (I–V) вагинальных микробных сообществ, названных на основании преобладающего таксона: I — *L. crispatus*; II — *L. gasseri*; III — *L. iners*; IV — гетерогенная группа анаэробных бактерий с низким содержанием лактобацилл и преобладанием анаэробных бактерий, относящихся к родам *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*,

Sneathia, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Finegoldia*, *Mobiluncus* и др.; V — *L. jensenii* [14].

Было показано, что сообщество I обладает наибольшими защитными свойствами против патогенов, а сообщество IV — наименьшими, сообщество III занимает промежуточную позицию. Показано, что сообщество IV, несмотря на то, что является стабильным сообществом у части здоровых женщин, связано с повышенным риском заражения заболеваниями, передаваемыми половым путем, включая ВИЧ-инфекцию [21]. Например, при исследовании 394 женщин инфекция *Trichomonas vaginalis* в 72 % случаев была обнаружена у женщин с сообществом IV, в 18 % — у женщин с сообществом III (преобладает *L. iners*), и только 9 % инфицированных женщин относились к сообществу I, в котором преобладает *L. crispatus* [22]. Позднее сообщество IV разделили на IV-A, в котором наблюдается умеренное снижение содержания лактобацилл в сочетании с относительно низким содержанием строгих анаэробов, относящихся к *Anaerococcus*, *Corinebacterium*, *Finegoldia*, *Streptococcus*, и IV-B, в котором повышается содержание бактерий рода *Atopobium* в сочетании с *Prevotella*, *Parvimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella*, *Mobiluncus*, *Peptoniphilus* и ряда других бактерий. Хотя многие из бактерий, обнаруживаемых в сообществе IV-B, встречаются при БВ, авторы относят женщин как с сообществами IV-A, так и IV-B к здоровым [23].

С помощью ПЦР в реальном времени было показано, что примерно равное число копий 16S рДНК *L. iners* обнаруживалось у женщин как с высоким, так и низким числом по Нугенту. Очевидно, *L. iners* присутствует у женщин с БВ, по-видимому, без подавления БАБВ, и наоборот, БАБВ способны сожительствовать совместно с *L. iners* [13, 24].

Исследование микробиомов женщин Италии показало следующее распределение сообществ: I — 21 %, II — 15 %, III — 33 %, IV — 25 %, сообщества V не обнаружили, в остальных 6 % превалировали либо *L. gasseri* + *L. crispatus*, либо *L. crispatus* + *L. iners*, либо бифидобактерии [25].

Обследование микробиомов молодых женщин Южной Африки [26] позволило выделить в данной популяции 4 типа микробных сообществ, которые несколько отличались от сообществ, характерных для жительниц США, Бразилии и стран Европы, и были обозначены авторами как цервикотипы (СТ): в сообществе СТ1 превалировали лактобациллы, но не *L. iners*, в сообществе СТ2 доминировали *L. iners*, в СТ3 — *Gardnerella* sp., а также содержалась значительная фракция *Atopobium vaginae*, в СТ4 отсутствовали превалирующие виды бактерий, но всегда присутствовали

Prevotella bivia, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Fusobacterium* sp. В исследованной когорте женщин Южной Африки сообщества с доминированием лактобацилл (СТ1 + СТ2) составили всего 37 %. Примерно у половины женщин с СТ3 и СТ4 с помощью диагностики по Нугенту был поставлен диагноз БВ, а другая половина женщин оказалась здоровой. Считается, что вагинальные лактобациллы путем продукции молочной кислоты, H_2O_2 , бактериоцинов, оккупации поверхности эпителиальных клеток подавляют пролиферацию патогенной анаэробной микрофлоры [27], однако у части африканских женщин отсутствие доминирования лактобацилл не приводит к развитию БВ [26].

Вышеприведенные данные указывают на значительную разницу в распространенности вагинальных бактерий в разных географических районах и на существование, помимо патогенной анаэробной микрофлоры, также и непатогенной анаэробной микрофлоры, обладающей протективными или симбиотическими свойствами. В частности, показано, что не только лактобациллы, но и ряд бактерий родов *Atopobium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Megasphaera*, *Leptotrichia* способны продуцировать молочную кислоту и обеспечивать защиту от патогенной микрофлоры [24].

ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

При бактериальных вагинозах содержание вагинальных лактобацилл снижается в среднем в 12 раз, а содержание патогенных бактерий — увеличивается не менее чем в 10 раз. Бактерии, связанные с бактериальным вагинозом, обозначают термином bacterial vaginosis associated bacteria (BVAB), в русском переводе — бактерии, ассоциированные с бактериальным вагинозом (БАБВ), причем некоторые из них, обнаруженные путем геномных исследований, еще предстоит выделить в виде чистых культур [8, 28].

Важнейшим представителем патогенных бактерий является *Gardnerella vaginalis*, Грам-вариабельная полиморфная бактерия, являющаяся факультативным анаэробом [29] и присутствующая в 95–100 % случаев бактериального вагиноза, которую ранее считали единственным этиологическим агентом БВ [30]. Впоследствии было установлено, что в вагинальных микробиомах при БВ также присутствуют *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis* и представители родов *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroids*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, *Megasphaera*, *Leptotrichia*, *Dialister* и другие бактерии [13, 28, 31].

Не было обнаружено бактерий, которые бы присутствовали у всех женщин с БВ, однако *Gardnerella vaginalis* обнаруживалась у 98 % из них, *Atopobium vaginae* — у 92 %, *Lactobacillus iners* — у 86 % и *Eggerthella species* — у 85 %.

Содержание *Gardnerella vaginalis* в микробном сообществе при БВ возрастает многократно. *G. vaginalis* обладает рядом патогенных свойств: связывается с клетками вагинального эпителия, образует биопленки, продуцирует факторы патогенности: вагинолизин, обладающий цитотоксическим и гемолитическим действием, сиалидазу, пролидазу, а также источник специфического для БВ запаха — путресцин.

Количество бактерий *Atopobium vaginae* также многократно повышается при БВ [8, 32], этот микроорганизм обнаруживается в составе биопленки, составляя от 1 до 40 % ее массы [33].

Бактерии родов *Prevotella* и *Porphyromonas* выявлены практически у всех женщин, как у здоровых, так и у пациенток с БВ. Между тем, содержание *Prevotella spp.* коррелирует с оценкой по Нугенту, при этом средняя концентрация *Prevotella spp.* у женщин с БВ ($10^{8.42}$ КОЕ/г вагинальных выделений) почти на 4 порядка превышает данный показатель у здоровых женщин ($10^{4.73}$ КОЕ/г) [16]. Показано, что выработка аммония клетками *Prevotella* усиливает рост *G. vaginalis*, которые, в свою очередь, продуцируют вещества, которые используются *Prevotella*, таким образом, *Prevotella spp.* и *G. vaginalis* находятся в симбиотических отношениях [34]. *Prevotella* также находится в симбиотических отношениях с другой БАБВ, *Peptostreptococcus anaerobius*, посредством аминокислот, продуцируемых *Prevotella spp.* и усиливающих рост *P. anaerobius* [35]. *P. bivia* и *P. disiens* продуцируют сиалидазу и пролидазы, которые приводят к разрушению мукуса, а также коллагеназу и фибринолизину, которые могут разрушать поверхность и межклеточные связи клеток эпителия [36].

Анаэробные грамположительные кокки, относящиеся к родам *Finegoldia*, *Parvimonas*, *Gallicola*, *Peptoniphilus* и *Anaerococcus* (ранее их всех относили к роду *Peptostreptococcus*), являются естественными обитателями кожи и слизистых человека. Они обнаруживаются у всех здоровых женщин и женщин с БВ, однако при БВ их содержание значительно больше — средняя бактериальная концентрация пептострептококков составляет $10^{4.86}$ КОЕ/г вагинальных выделений в группе здоровых женщин и $10^{7.62}$ КОЕ/г в группе женщин с БВ [16].

Род *Peptoniphilus* включает виды, продуцирующие бутират, и связан с персистирующими случаями БВ. Бактерии *Peptoniphilus spp.* были обнаружены

у 36 % женщин, у которых лечение БВ оказалось безуспешным. Также было показано, что бактерии данного рода эффективно прилипают к эпителиальным клеткам влагалища [37]. Известно, что анаэробные кокки продуцируют ряд факторов вирулентности и часто демонстрируют устойчивость к пенициллинам, клиндамицину и метронидазолу [38].

Бактерии рода *Mobiluncus* обнаруживаются у 38 % здоровых женщин и у 84,5 % женщин с БВ. *M. mulieris* был преобладающим видом у здоровых женщин, в то время как *M. curtisii* был обнаружен в 65,3 % случаев БВ. Преобладание *M. curtisii* в микробиоме влагалища было также ассоциировано с неудачным лечением БВ [28, 39].

Mycoplasma hominis и *Mycoplasma genitalium* были выделены из половых путей женщин. Было обнаружено, что *M. genitalium* играет определенную роль в возникновении симптоматического цервицита или уретрита, тогда как *M. hominis* ассоциируется с наличием БВ [40]. С помощью культивирования *M. hominis* были обнаружены в 24–75 % случаев БВ и у 13–22 % женщин без БВ [41]. В другом исследовании было показано, что *M. hominis* присутствовали в небольших количествах у здоровых женщин, но их содержание было увеличено в 10 000 раз у женщин с БВ [42].

Ureaplasma urealyticum обнаруживается у женщин с БВ и у здоровых женщин и, по-видимому, нет связи между этим видом и возникновением БВ [40]. Тем не менее, *U. urealyticum* проявляет гемолитическую активность, выделяет эластазу и протеазу, расщепляющую IgA, фосфолипазу C и уреазу, гидролизующую мочевины до цитотоксического аммиака [36]. Все эти факторы указывают на вклад *U. urealyticum* в патогенез БВ.

БАБВ, обозначенные BVAB1, BVAB2 и BVAB3, относятся к порядку *Clostridiales* и, более конкретно, к типу *Clostridium*. Эти бактерии обнаруживаются при микроскопическом изучении вагинальных мазков женщин с БВ в прикрепленном к вагинальным эпителиальным клеткам состоянии, то есть они присутствуют на ключевых клетках, характерных для БВ.

BVAB1 ассоциируется с положительным тестом на запах, указывая на выработку полиаминов этой бактерией. BVAB1 тесно связан с BVAB3 и *Prevotella*, что может указывать на возможные синергические отношения между этими бактериями [28].

КОНЦЕПЦИЯ ПАТОГЕНЕЗА БВ

В соответствии с современной концепцией патогенеза бактериальных вагинозов [12, 31, 43], данное заболевание развивается в несколько этапов.

В норме на поверхности эпителиальных клеток половых органов и в мукусе располагаются протективные лактобациллы, продуцирующие важный защитный фактор — молочную кислоту, обеспечивающую в вагинальной жидкости $\text{pH} < 4,5$.

На первом этапе при попадании вирулентных *G. vaginalis*, например, при сексуальном контакте, данные патогены с высокой эффективностью прикрепляются к клеткам эпителия с вытеснением вагинальных лактобацилл и формированием биопленки [44]. Сравнение свойств различных бактерий, связанных с бактериальными вагинозами, показало, что *G. vaginalis* обладают наиболее высокой способностью к связыванию с поверхностью клеток HeLa (клетки карциномы шейки матки) и образованию биопленок, причем клетки *G. vaginalis*, растущие в составе биопленок, наиболее устойчивы к действию молочной кислоты и H_2O_2 , чем клетки, растущие в суспензии. Формирование биопленки, вследствие наличия в ней градиента концентрации кислорода, обеспечивает более благоприятные условия для жизни анаэробных бактерий [44–48]. Среднее содержание клеток *G. vaginalis* в вагинальной жидкости здоровых женщин составляет от 10^2 до 10^4 КОЕ/мл, но увеличивается до 10^5 – 10^8 КОЕ/мл у женщин с БВ [49].

На втором этапе в нижних слоях биопленки, образованной *Gardnerella vaginalis*, поселяются бактерии, относящиеся к роду *Prevotella*, в частности, *Prevotella bivia*, непрямой участник патогенного микробного сообщества при бактериальных вагинозах [50]. Установлено, что при совместном культивировании *in vitro* *Gardnerella vaginalis* и *Prevotella bivia* являются симбионтами [34]. В результате протеолиза, вызванного *G. vaginalis*, происходит образование аминокислот, что усиливает рост *Prevotella bivia*, а аммоний, продуцируемый *P. bivia*, в свою очередь, стимулирует рост *G. vaginalis*. Совместная пролиферация данных бактерий стимулирует дальнейшее вытеснение лактобацилл и усиление образования биопленки [51].

На третьем этапе гликозидазы и, в первую очередь, сиалидаза, выделяемая, главным образом *G. vaginalis* и *Prevotella bivia*, обеспечивают разрушение защитного муцинового слоя вагинального эпителия [52]. Другие представители рода *Prevotella* также продуцируют сиалидазу, но в меньших количествах, чем *G. vaginalis* и *P. bivia*.

На четвертом этапе потеря защитного муцинового слоя вагинального эпителия приводит к усиленному внедрению других патогенных бактерий, включая *Atopobium vaginae*, что приводит к формированию полимикробной биопленки и повышению значения pH ($\text{pH} > 4,5$) [12].

Таким образом, патогенные микроорганизмы, участвующие в развитии бактериальных вагинозов, можно разделить на ранние, или первичные (*G. vaginalis* и *P. bivia*) и поздние, или вторичные (*A. vaginae*, *Sneathia spp.* и др.). [12].

Первичные колонизаторы эпителия не индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов, в отличие от ряда вторичных патогенных микроорганизмов. Микробиом при БВ приобретает стабильность и мало изменяется во время менструаций [53].

Роль *G. vaginalis* в этиологии БВ в качестве первичного патогена была установлена, в том числе, в прямых экспериментах. В работе [54] использовали вагинальные выделения женщин, страдающих БВ, для прививки во влагалища 15 здоровым добровольцам. У одиннадцати из этих добровольцев (73 %) развился симптоматический БВ, который не проходил самопроизвольно в течение четырех месяцев. В следующем эксперименте группу из 29 беременных (!) женщин заражали чистой культурой *G. vaginalis*. У 7 из них (24 %) развился БВ [55] (в настоящее время проведение подобных экспериментов невозможно по этическим причинам). Также было показано, что БАБВ могут попадать в мочеполовую систему мужчин — половых партнеров женщин с БВ и вновь переноситься к женщинам вместе со спермой, в том числе в виде фрагментов биопленок [56]. Таким образом, возникновение БВ может быть вызвано прямым переносом в вагину *G. vaginalis* либо штаммов *G. vaginalis*, обладающих высокой патогенностью, либо (что наиболее эффективно) сообществом БАБВ, то есть БВ является заболеванием, передающимся половым путем [57, 58].

ЛЕЧЕНИЕ БВ

В настоящее время стандартное лечение БВ осуществляется путем антибиотикотерапии, закисления pH и приема пробиотиков. Применяются антибиотики группы 5-нитроимидазолов (метронидазол, тинидазол, секнидазол и др.) и макролиды (клиндамицин), *per os* или *per vaginum*, в последнем случае обычно в виде вагинального геля, в течение 5–7 дней. В процессе и сразу же после окончания курса лечения у 80–90 % больных происходит улучшение клинической картины [59], сопровождаемое изменением микробных сообществ. Подсчет содержания геномов бактерий, выполненный с помощью количественного ПЦР, показал, что в результате лечения содержание геномов БАБВ: *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Megasphaera spp.*, *Prevotella spp.* в микробиомной ДНК у большинства больных снижается на 2–4 порядка.

В другой работе было показано, что после курса антибиотикотерапии содержание лактобацилл восстанавливается медленно и сначала происходит за счет пролиферации *L. iners* [60].

Возвратное течение БВ за период 12 недель после окончания курса антибиотикотерапии наблюдалось более чем у 50 % женщин [61]. В другой работе через три месяца после курса антибиотикотерапии у примерно 30 % больных наблюдался возвратный БВ [59], а в течение полугода после курса лечения возвратный БВ был зафиксирован у 76 % больных [62]. Таким образом, применяемое в настоящее время лечение БВ недостаточно эффективно, а терапия возвратного БВ представляет собой серьезную проблему [63]. Несмотря на эффективное подавление патогенной анаэробной микрофлоры, наблюдаемое в большинстве случаев при антибиотикотерапии, содержание протективных лактобацилл восстанавливается (кроме *L. iners*, обладающей слабыми протективными свойствами) медленно и лечение БВ часто заканчивается рецидивом заболевания.

ПРИЧИНЫ ЗАТРУДНЕНИЙ В ТЕРАПИИ БВ

Высокую частоту возвратного течения БВ и устойчивости к лечению антибиотиками связывают с тремя неблагоприятными факторами [64]:

- с широким распространением штаммов бактерий, устойчивых к антибиотикам [65];
- с повышенной устойчивостью бактерий, растущих в составе биопленок, по сравнению с планктонно растущими бактериями;
- с необходимостью одновременного лечения половых партнеров женщин с БВ, поскольку у данных партнеров патогенные бактерии могут сохраняться и передаваться женщинам после окончания курса лечения.

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

Патогенные бактерии, устойчивые к различным антибиотикам, широко распространены, в том числе они присутствуют в микробиомах здоровых женщин и женщин с БВ. Так, с помощью пиросеквенирования ДНК вагинальной микрофлоры было установлено, что гены устойчивости к макролидам, линкозамидам и тетрациклинам присутствовали в 8–12 % геномов бактерий, выделенных от здоровых женщин, а у женщин с БВ они содержались в 35–58 % геномов [66].

Устойчивость к антибиотикам изолятов *G. vaginalis*, полученных от женщин с БВ, неоднократно

проходивших стандартное лечение метронидазолом, была исследована в работе [67]. У женщин, не проходивших ранее лечения БВ, 88–100 % изолятов были чувствительны к метронидазолу, однако после первого курса лечения чувствительными оказались 76–82 % изолятов, после второго курса лечения — 53–82 %, третьего курса — 36 %, наконец, четвертого — 0 %. Данные результаты показывают, что резистентность, по-видимому, связана с отбором и накоплением резистентных штаммов, а не с реинфекцией [67]. Данные другой работы [68] также показывают высокую распространенность устойчивых к антибиотикам вагинальных бактерий. В частности, из 50 штаммов *G. vaginalis*, изолированных от женщин с возвратным течением БВ, 68 % оказались резистентными к метронидазолу и 24 % — к клиндамицину.

ВЛИЯНИЕ БИОПЛЕНОК

Биопленки задерживают либо связывают часть молекул антибиотиков, не допуская их до патогенных бактерий, а также переводят бактерии, находящиеся в биопленке, в метаболически неактивное, «спящее» состояние, позволяющее бактериям пережить атаку антибиотиков [69–71]. Так, соотношение МИК роста в биопленках/МИК планктонного роста составили от 1 до 512 для метронидазола и от 1 до 2048 для клиндамицина, причем данные соотношения были максимальными для изолятов, показавших себя наиболее сильными продуцентами биопленок [72].

Таким образом, благодаря биопленкам БАБВ могут быть устойчивыми к высоким концентрациям антибиотиков, даже если они не обладают ферментативными либо транспортными системами, определяющими антибиотикоустойчивость.

НЕОБХОДИМОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ ПОЛОВОГО ПАРТНЕРА (ПАРТНЕРОВ)

Необходимость одновременного лечения половых партнеров была показана в ряде исследований [73, 74]. БАБВ могут передаваться половому партнеру, сохраняться в его мочеполовой системе и передаваться вместе со спермой обратно женщине, в том числе в виде кусочков биопленок [75–77].

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКОВ

С целью коррекции состава микробиоты при лечении БВ было предложено использование пробиотиков, которые должны подавлять рост патогенной микрофлоры, не действуя на протективные лакто-

бациллы, подавлять образование биопленок и разрушать существующие биопленки, образованные патогенными бактериями, и колонизировать поверхность вагинального эпителия. Пробиотические бактерии также должны быть безопасными и хорошо переносимыми. В настоящее время поиски эффективных пробиотиков проводятся многими коллективами во многих странах мира.

В работе [78] изложены результаты клинических испытаний, в которых после курса лечения БВ (использовалось вагинальное введение геля с 0,75 % метронидазола) участницам испытаний еженедельно в течение 24 недель также вагинально вводили по 2×10^9 КОЕ пробиотика *Lactobacillus crispatus* CTV-05, известного под коммерческим названием Lactin-V. Первое введение осуществляли в течение 48 часов после окончания приема метронидазола. Через 12 недель после начала приема пробиотика в опытной группе у 30 % участниц испытаний наблюдали возвратное течение БВ, а в контрольной группе (плацебо) данный показатель составил 45 %. У участниц испытаний с отсутствием БВ на 12-й неделе, продолжавших регулярный прием пробиотика, в последующем, на 24-й неделе, частота возвратного течения заболевания составила: в опытной группе — 12 %, в группе плацебо — 17 %. У 79 % женщин, принимавших пробиотик, было обнаружено наличие *L. crispatus* CTV-05 на 12-й неделе, и у 48 % — на 24-й неделе.

Женщинам с БВ, у которых прежде наблюдалось не менее двух случаев возвратного течения БВ, назначали стандартный курс лечения (метронидазол, 1 г per os в день в течение 7 дней), после которого они ежедневно принимали пробиотик Physioflor1 (*Lactobacillus crispatus* IP174178, 10^9 КОЕ) вагинально, в капсулах, в течение четырех менструальных циклов. Число возвратных случаев БВ за 4 месяца приема пробиотика составило 20,5 % по сравнению с группой плацебо — 41 % [79].

Таким образом, длительное применение пробиотиков после курса антибиотикотерапии дало положительный результат — за 6 месяцев лечения частота возвратного течения БВ уменьшилась в полтора-два раза по сравнению с контролем (антибиотик без пробиотика), вместе с тем, следует отметить как наличие значительного числа случаев возвратного БВ в опытной группе, так и постепенное удаление пробиотика *L. crispatus* CTV-05 из вагинального микробного сообщества, несмотря на поддерживающую терапию, что может привести к новому возврату БВ в последующем.

Заслуживает интереса сообщение о лечении 5 женщин с устойчивым к лечению либо возвратным БВ [80] с помощью переноса микробиома, взя-

того у здоровых женщин. У 4 из 5 женщин такая пересадка вызвала длительную ремиссию, сопровождавшуюся преобладанием лактобацилл в микробном сообществе, которую наблюдали в течение 5–21 месяца. У одной из женщин применение нового метода оказалось безуспешным. Впоследствии у трех женщин наблюдали возврат БВ, и им снова сделали пересадку микробиома, причем одной из них — со сменой донора, после чего вновь наступила ремиссия.

С целью улучшить действие пробиотиков были предложены пробиотики, содержащие несколько (от 2 до 10) штаммов протективных бактерий, однако не все они оказались успешными.

Например, пробиотик (Feminine Support™) представляет собой смесь 8 видов лактобацилл и 2 видов бифидобактерий. Для испытаний пробиотика была отобрана группа женщин с показателем по Нугенту 4–6 и pH > 4,5. Участницы испытаний принимали ежедневно per os по $2,5 \times 10^{10}$ КОЕ пробиотической смеси бактерий в течение 24–42 дней. Результатом явилось временное снижение показателя по Нугенту и pH вагинальной жидкости с последующим возвратом к прежним значениям к концу срока приема пробиотика [81]. Возможно, данный пробиотик будет более эффективным при лечении БВ, если его сочетать с антибиотиком, вводить вагинально, а также, возможно, увеличить дозу бактерий.

Анализируя ряд проведенных ранее клинических испытаний, часть авторов приходит к выводу, что лечение БВ пробиотиками, в том числе при их совместном применении с антибиотиками, при несомненном краткосрочном эффекте, вызывает сомнения при рассмотрении долгосрочного эффекта [82–84]. Действительно, ни один из испытываемых в последние годы пробиотиков не показал эффективность, приближающуюся к 100 % [78, 79, 81, 85, 86]. Очевидно, снижение эффективности пробиотиков в отдаленные сроки после начала лечения может быть связано с их вытеснением представителями «местной» вагинальной микрофлоры, а также, возможно, бактериями, проникающими в вагину из кишечника. Также становится понятным, что лечение возвратного БВ с применением пробиотиков, эффективное у одних женщин и безуспешное у других, требует персонализированного подхода.

ПЕРСНИФИЦИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ВОЗВРАТНОГО БВ

Таким образом, возвратное течение БВ, представляющее собой пролиферацию патогенной микробиоты и вытеснение/замещение ею протективных лактобацилл, плохо поддается лечению у не

менее чем 50 % больных. Для повышения эффективности терапии возвратного БВ требуется персонифицированная терапия, которая может заключаться в следующем:

Оценка состояния вагинального микробного сообщества с помощью пиросеквенирования участка гена малой рибосомальной РНК либо с помощью количественного ПЦР в реальном времени в образце ДНК, выделенном из вагинальной жидкости. С помощью данных исследований можно оценить соотношение числа геномов патогенов (*G. vaginalis* и *A. vaginae*) и числа геномов протективных лактобацилл (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. Acidophilus*).

Проведение курса стандартной антибиотикотерапии БВ и назначение пробиотика на основе лактобацилл.

Длительный прием пробиотика с регулярным пиросеквенированием либо проведением ПЦР для оценки изменений микробиоты. При снижении содержания лактобацилл и увеличении содержания патогенных БАБВ — увеличение дозы пробиотика. При продолжении роста содержания патогенных БАБВ — смена пробиотика с продолжением периодического мониторинга микробиоты. Таким образом, регулярное исследование содержания геномов важнейших патогенных и протективных бактерий позволит отследить изменения вагинальной микробиоты персонально у каждой больной и при развитии угрозы возвратного течения заболевания вовремя произвести замену пробиотика или повторить курс лечения с последующим продолжением мониторинга микробиоты.

Результатом предлагаемой схемы лечения будет являться индивидуальный подбор наиболее эффективного пробиотика и повышение эффективности лечения возвратного БВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В отличие от инфекционных заболеваний, вызываемых одним инфекционным агентом, БВ представляет собой замещение микробиоты, характерной для здоровых женщин, на патогенную микробиоту. Для лечения возвратного БВ предлагается использовать персонифицированный подход, включающий антибиотикотерапию в сочетании с применением пробиотика с периодическим мониторингом вагинальной микрофлоры с помощью пиросеквенирования или ПЦР в реальном времени ДНК, выделенной из влагалища больной. Мониторинг микробиоты позволит определить эффективность пробиотика, а также произвести его замену на другой в случае необходимости.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Aldunate M, Srbinovski D, Hearps A, et al. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front. Physiol.* 2008. 6: 164. DOI: 10.3389/fphys.2015.00164.
2. Kenyon C, Colebunders R, Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2013. 209(6): 505–523. DOI: 10.1016/j.ajog.2013.05.006.
3. Coudray M, Madhivanan P. Bacterial vaginosis — a brief synopsis of the literature. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2020. 245: 143–148. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2019.12.035.
4. Amegashie CP, Gilbert NM, Peipert JF, et al. Relationship between Nugent score and vaginal epithelial exfoliation. *PLoS One.* 2017. 12: e0177797. DOI: 10.1371/journal.pone.0177797.
5. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, et al. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS.* 2008. 22: 1493–1501. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3283021a37.
6. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. *J. Infect. Dis.* 2010. 202: 1907–1915. DOI: 10.1086/657320.
7. Han Y, Liu Z, Chen T. Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions. *Front. Microbiol.* 2021. 12: 643422. DOI: 10.3389/fmicb.2021.643422.
8. Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age — sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? // *PLoS One.* 2013. 8: e60670. DOI: 10.1371/journal.pone.0060670.
9. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, et al. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am. J. Med.* 1983. 74: 14–22. DOI: 10.1016/0002-9343(83)91112-9.
10. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J. Clin. Microbiol.* 1991. 29: 297–301. DOI: 10.1128/jcm.29.2.297-301.1991.
11. Lamont RF, van den Munckhof EH, Luef BM, et al. Recent advances in cultivation-independent

molecular based techniques for the characterization of vaginal eubiosis and dysbiosis. *Fac. Rev.* 2020. 9: 21. DOI: 10.12703/r/9-21.

12. Muzny CA, Łaniewski P, Schwebke JR, et al. Host-vaginal microbiota interactions in the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2020. 33: 59–65. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000620.

13. Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, et al. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 2010. 48:1812–1819. DOI:10.1128/JCM.00851-09.

14. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. 108(Suppl 1): 4680–4687. DOI: 10.1073/pnas.1002611107.

15. Valore EV, Park CH, Igreti SL, et al. Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2002. 187:561–558. DOI: 10.1067/mob.2002.125280.

16. Delaney ML, Onderdonk AB. Nugent score related to vaginal culture in pregnant women. *Obstet. Gynecol.* 2001. 98:79–84. DOI: 10.1016/s0029-7844(01)01402-8.

17. Döderlein A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. *Zentbl. Bakteriologie. Hyg. Abt. 1892.* 11:699.

18. Pendharkar S, Magopane T, Larsson P-G, et al. Identification and characterisation of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Inf. Dis.* 2013. 13:43. DOI:10.1186/1471-2334-13-43.

19. Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, et al. The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome. *Clin. Lab. Med.* 2014. 34:747–761. DOI:10.1016/j.cll.2014.08.006.

20. Mendling W. Vaginal Microbiota. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. 902:83–93. DOI: 10.1007/978-3-319-31248-4_6.

21. Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J. Physiol.* 2017. 595:451–463. DOI: 10.1113/JP271694.

22. Brotman RM, Bradford LL, Conrad M, et al. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sex. Transm. Dis.* 2012. 39:807–812. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e3182631c79.

23. Gajer P, Brotman RM, Bai G, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci. Transl. Med.* 2012. 4:132ra52. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003605.

24. Petrova MI, Reid G, Vaneechoutte M, et al. *Lactobacillus iners*: Friend or Foe? *Trends Microbiol.* 2017. 25: S0966842X16301810. DOI: 10.1016/j.tim.2016.11.007.

25. De Seta F, Campisciano G, Zanolta N, et al. The Vaginal Community State Types Microbiome-Immune

Network as Key Factor for Bacterial Vaginosis and Aerobic Vaginitis. *Front. Microbiol.* 2019. 10:2451. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02451.

26. Anahtar MN, Byrne EH, Doherty KE, et al. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity.* 2015. 42:965–976. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.04.019.

27. Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, et al. The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome. *Clin. Lab. Med.* 2014. 34:747–761. DOI: 10.1016/j.cll.2014.08.006.

28. Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016. 29:223–238. DOI: 10.1128/CMR.00075-15.

29. Catlin BW. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992. 5:213–237. DOI:10.1128/CMR.5.3.213.

30. Eschenbach DA. History and review of bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1993. 169(Pt 2):441–445. DOI: 10.1016/0002-9378(93)90337-i.

31. Muzny CA, Blanchard E, Taylor CM, et al. Identification of Key Bacteria Involved in the Induction of Incident Bacterial Vaginosis: A Prospective Study. *J. Infect. Dis.* 2018. 218: 966–978. DOI: 10.1093/infdis/jiy243.

32. Menard JP, Fenollar F, Henry M, et al. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin. Infect. Dis.* 2008. 47:33–43. DOI:10.1086/588661.

33. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, et al. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008. 198:97.e1–6. DOI: 10.1016/j.ajog.2007.06.039.

34. Pybus V, Onderdonk AB. Evidence for a commensal, symbiotic relationship between *Gardnerella vaginalis* and *Prevotella bivia* involving ammonia: potential significance for bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 1997. 175:406–413. DOI: 10.1093/infdis/175.2.406.

35. Pybus V, Onderdonk AB. A commensal symbiosis between *Prevotella bivia* and *Peptostreptococcus anaerobius* involves amino acids: potential significance to the pathogenesis of bacterial vaginosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1998. 22:317–327. DOI: 10.1111/j.1574-695X.1998.tb01221.

36. Africa CW, Nel J, Stemmet M. Anaerobes and bacterial vaginosis in pregnancy: virulence factors contributing to vaginal colonization. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2014. 11:6979–7000. DOI:10.3390/ijerph110706979.

37. Marrazzo JM, Thomas KK, Fiedler TL, et al. Relationship of specific vaginal bacteria and bacterial

vaginosis treatment failure in women who have sex with women. *Ann. Intern. Med.* 2008. 149:20–28. DOI: 10.7326/0003-4819-149-1-200807010-00006.

38. Murphy EC, Frick IM. Gram-positive anaerobic cocci—commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 2013. 37:520–553. DOI:10.1111/1574-6976.12005.

39. Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am. J. Med. Sci.* 2012. 343:2–9. DOI: 10.1097/MAJ.0b013e31823ea228.

40. Patel MA, Nyirjesy P. Role of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* species in female lower genital tract infections. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2010. 12:417–422. DOI: 10.1007/s11908-010-0136-x.

41. Spiegel CA. Bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991. 4:485–502. DOI: 10.1128/CMR.4.4.485.

42. Taylor-Robinson D., Rosenstein IJ. Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen? *Sex Transm. Infect.* 2001. 77:302. DOI: 10.1136/sti.77.4.302-a.

43. Schwebke JR, Muzny CA, Josey WE. Role of *Gardnerella vaginalis* in the pathogenesis of bacterial vaginosis: a conceptual model. *J. Inf. Diseases.* 2014. 210:338–343. DOI:10.1093/infdis/jiu089.

44. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet. Gynecol.* 2005. 106:1013–1023. DOI: 10.1097/01.AOG.0000183594.45524.d2.

45. Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, et al. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology.* 2010. 156:392–399. DOI: 10.1099/mic.0.034280-0.

46. Alves P, Castro J, Sousa C, et al. *Gardnerella vaginalis* outcompetes 29 other bacterial species isolated from patients with bacterial vaginosis, using in an in vitro biofilm formation model. *J. Infect. Dis.* 2014. 210:593–596. DOI: 10.1093/infdis/jiu131.

47. Beebout CJ, Eberly AR, Werby SH, et al. Respiratory Heterogeneity Shapes Biofilm Formation and Host Colonization in Uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio.* 2019. 10:e02400–18. DOI: 10.1128/mBio.02400-18.

48. Machado A, Cerca N. Influence of Biofilm Formation by *Gardnerella vaginalis* and Other Anaerobes on Bacterial Vaginosis. *J. Infect. Dis.* 2015. 212:1856–1861. DOI: 10.1093/infdis/jiv338.

49. Garcia EM, Kraskauskiene V, Koblinski JE, et al. Interaction of *Gardnerella vaginalis* and Vaginolysin with the Apical versus Basolateral Face of a Three-Dimensional Model of Vaginal Epithelium. *Infect. Immun.* 2019. 87:e00646–18. DOI: 10.1128/IAI.00646-18.

50. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with

bacterial vaginosis. *New Engl. J. Med.* 2005. 353:1899–1911. DOI: 10.1056/NEJMoa043802.

51. Castro J, Machado D, Cerca N. Unveiling the role of *Gardnerella vaginalis* in polymicrobial Bacterial Vaginosis biofilms: the impact of other vaginal pathogens living as neighbors. *ISME J.* 2019. 13:1306–1317. DOI: 10.1038/s41396-018-0337-0.

52. Gilbert NM, Lewis WG, Li G, et al. *Gardnerella vaginalis* and *Prevotella bivia* Trigger Distinct and Overlapping Phenotypes in a Mouse Model of Bacterial Vaginosis. *J. Infect. Dis.* 2019. 220:1099–1108. DOI: 10.1093/infdis/jiy704.

53. Lopes dos Santos Santiago G, Tency I, Verstraelen H, et al. Longitudinal qPCR Study of the Dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A.vaginae*, (Sialidase Positive) *G.vaginalis*, and *P.bivia* in the Vagina. *PLoS ONE.* 2012. 7:e45281. DOI: 10.1371/journal.pone.0045281.

54. Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1955. 69:962–976.

55. Criswell BS, Ladwig CL, Gardner HL, et al. *Haemophilus vaginalis*: vaginitis by inoculation from culture. *Obstet. Gynecol.* 1969. 33:195–199.

56. Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, et al. *Gardnerella* biofilm involves females and males and is transmitted sexually. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2010. 70:256–63. DOI: 10.1159/000314015.

57. Muzny CA, Schwebke JR. Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: Discussion of Current Hypotheses. *J. Infect. Dis.* 2016. 214:S1–S5. DOI: 10.1093/infdis/jiw121.

58. Mendling W. Vaginal Microbiota. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. 902:83–93. DOI: 10.1007/978-3-319-31248-4_6.

59. Polatti F. Bacterial vaginosis, *Atopobium vaginae* and nifuratel. *Curr. Clin. Pharmacol.* 2012. 7:36–40. DOI: 10.2174/157488412799218824.

60. Joag V, Obila O, Gajer P, et al. Impact of Standard Bacterial Vaginosis Treatment on the Genital Microbiota, Immune Milieu, and Ex Vivo Human Immunodeficiency Virus Susceptibility. *Clin. Infect. Dis.* 2019. 68:1675–1683. DOI: 10.1093/cid/ciy762.

61. Mtshali A, San JE, Osman F, et al. Temporal Changes in Vaginal Microbiota and Genital Tract Cytokines Among South African Women Treated for Bacterial Vaginosis. *Front. Immunol.* 2021. 12:730986. DOI: 10.3389/fimmu.2021.730986.

62. Javed A, Parvaiz F, Manzoor S. Bacterial vaginosis: An insight into the prevalence, alternative treatments regimen and it's associated resistance patterns. *Microb. Pathog.* 2019. 127:21–30. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.11.046.

63. Hay P. Recurrent bacterial vaginosis. *Current Opinion in infectious diseases.* 2009. 22:82–86. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32832180c6.

64. Muzny CA, Sobel JD. The Role of Antimicrobial Resistance in Refractory and Recurrent Bacterial Vaginosis and Current Recommendations for Treatment. *Antibiotics*. 2022. 11:500. DOI: 10.3390/antibiotics11040500.
65. Rossolini GM, Arena F, Pecile P, et al. Update on the antibiotic resistance crisis *Curr. Opin. Pharmacol.* 2014. 18:56–60. DOI: 10.1016/j.coph.2014.09.006.
66. Bostwick DG, Woody J, Hunt C, et al. Antimicrobial resistance genes and modelling of treatment failure in bacterial vaginosis: clinical study of 289 symptomatic women. *J. Med. Microbiol.* 2016. 65:377–386. DOI: 10.1099/jmm.0.000236.
67. Bannatyne RM, Smith AM. Recurrent bacterial vaginosis and metronidazole resistance in *Gardnerella vaginalis*. *Sex Transm Infect.* 1998. 74:455–456.
68. Nagaraja P. Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* in recurrent bacterial vaginosis. *Indian J. Med. Microbiol.* 2008. 26:155–157. DOI: 10.4103/0255-0857.40531.
69. Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, et al. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv. Microb. Physiol.* 2002. 46:202–256.
70. Kwan BW, Valenta JA, Benedik MJ, et al. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. 57:1468–1473. DOI: 10.1128/AAC.02135-12.
71. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, et al. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008. 198:97.e1–6. DOI: 10.1016/j.ajog.2007.06.039.
72. Li T, Zhang Z, Wang F, et al. Antimicrobial Susceptibility Testing of Metronidazole and Clindamycin against *Gardnerella vaginalis* in Planktonic and Biofilm Formation. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2020. 2020:1361825. DOI: 10.1155/2020/1361825.
73. Plummer EL, Vodstrcil LA, Doyle M, et al. A Prospective, Open-Label Pilot Study of Concurrent Male Partner Treatment for Bacterial Vaginosis. *mBio*. 2021.12:e0232321. DOI: 10.1128/mBio.02323-21.
74. Vodstrcil LA, Muzny CA, Plummer EL, et al. Bacterial vaginosis: drivers of recurrence and challenges and opportunities in partner treatment. *BMC Med.* 2021. 19:194. DOI: 10.1186/s12916-021-02077-3.
75. Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, et al. Desquamated epithelial cells covered with a polymicrobial biofilm typical for bacterial vaginosis are present in randomly selected cryo-preserved donor semen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010 59:399–404. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00688.x.
76. Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, et al. *Gardnerella* biofilm involves females and males and is transmitted sexually. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2010. 70:256–63. DOI: 10.1159/000314015.
77. Verstraelen H, Swidsinski A. The biofilm in bacterial vaginosis: implications for epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2013. 26:86–89. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32835c20cd.
78. Cohen CR, Wierzbicki MR, French AL, et al. Randomized Trial of Lactin-V to Prevent Recurrence of Bacterial Vaginosis. *N. Engl. J. Med.* 2020. 382:1906–1915. DOI: 10.1056/NEJMoa1915254.
79. Bohbot J, Daraï E, Bretelle F, et al. Efficacy and safety of vaginally administered lyophilized *Lactobacillus crispatus* IP 174178 in the prevention of bacterial vaginosis recurrence. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* 2018. 47:81–86. DOI: 10.1016/j.jogoh.2017.11.005.
80. Lev-Sagie A, Goldman-Wohl D, Cohen Y. et al. Vaginal microbiome transplantation in women with intractable bacterial vaginosis. *Nat. Med.* 2019. 25:1500–1504. DOI: 10.1038/s41591-019-0600-6.
81. Martoni CJ, Frederiksen AKS., Damholt A, et al. Effects of a 10-Strain Oral Probiotic on Parameters of Vaginal Health and Microbial Community: A Pilot Clinical Study. *Int. J. Womens Health.* 2022. 14:29–39. DOI: 10.2147/IJWH.S341046.
82. Van de Wijgert J, Verwijs MC. Lactobacilli-containing vaginal probiotics to cure or prevent bacterial or fungal vaginal dysbiosis: A systematic review and recommendations for future trial designs. *BJOG.* 2020. 127:287–299. DOI: 10.1111/1471-0528.15870.
83. Senok AC, Verstraelen H, Temmerman M, et al. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009. 4:CD006289. DOI: 10.1002/14651858.CD006289.pub2.
84. Wang Z, He Y, Zheng Y. Probiotics for the Treatment of Bacterial Vaginosis: A Meta-Analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2019. 16:3859. DOI: 10.3390/ijerph16203859.
85. Han Y, Liu Z, Chen T. Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions. *Front. Microbiol.* 2021. 12:643422. doi: 10.3389/fmicb.2021.643422.
86. Wu S, Hugerth LW, Schuppe-Koistinen I, et al. The right bug in the right place: opportunities for bacterial vaginosis treatment. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2022. 8:34. DOI: 10.1038/s41522-022-00295-y.

Информация об авторах:

Климов Николай Анатольевич, к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Шамова Ольга Валерьевна, д.б.н., член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, заведующий отделом общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», заведующий НИЛ аль-

тернативных антимикробных биопрепаратов НЦМУ
«Центр персонализированной медицины».

Author information:

Klimov Nikolai A., PhD, Leading Researcher,
Department of General Pathology and Pathophysiology,
Institute of Experimental medicine;

Shamova Olga V., PhD, corr. member RAS — Deputy
Director, Head of the Department of General Pathology
and Pathophysiology, Institute of Experimental medicine,
Head of the laboratory of alternative antimicrobial
biopreparations, World-Class Research Center for
Personalized Medicine.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616-078:578.7

НАБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЭНТЕРОКОККОВЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Ткачев П. В., Кулешевич Е. В., Гончаров А. Е.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Ткачев Павел Владимирович,
ФГБНУ «ИЭМ»,
ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-Петербург, Россия, 197376.
E-mail: weaver.paul94@gmail.com

Статья поступила в редакцию 23.11.2022
и принята к печати 04.12.2022.

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Разработка и применение терапевтических препаратов на основе вирусов бактерий, или бактериофагов, является перспективным направлением борьбы с бактериальными инфекциями. Состав фаговых препаратов должен постоянно обновляться, что требует поиска новых вирусов посредством скрининга биологического материала и образцов из окружающей среды. **Цель.** Разработка метода поиска и идентификации вирулентных энтерококковых бактериофагов, основанного на полимеразной цепной реакции (ПЦР). **Материалы и методы.** Известное разнообразие вирусов энтерококков было изучено по базам данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV). Подбор праймеров осуществляли при помощи программ NCBI PrimerBlast и Primer3. Тестирование праймеров проводилось на семи коммерческих фаговых коктейлях и 46 образцах биоматериала. Специфичность ПЦР была подтверждена определением нуклеотидных последовательностей ПЦР-продуктов. **Результаты.** Описанные в литературе облигатно вирулентные энтерококковые бактериофаги относятся к пяти утвержденным ICTV родам: *Copernicovirus*, *Efquatrovirus*, *Kochikohdavirus*, *Saphexavirus* и *Schiekvirus*. Представители шестого рода, *Phifelvirus*, обладают умеренным жизненным циклом. Разработанная нами схема ПЦР предназначена для специфичной амплификации фрагментов гена основного белка капсида упомянутых родов бактериофагов. В коммерческих фаговых коктейлях с ее помощью были выявлены представители всех пяти родов вирулентных энтерококковых бактериофагов. В образцах биологического материала были выявлены вирусы — представители родов *Efquatrovirus*, *Kochikohdavirus*, *Saphexavirus* и *Schiekvirus*. **Заключение.** Представленная в настоящей работе схема ПЦР позволяет выявлять в фаголизатах и образцах биологического материала все описанные к настоящему времени облигатно вирулентные бактериофаги, инфицирующие *Enterococcus* spp., а также может быть использована для определения родовой принадлежности вирусов.

Ключевые слова: бактериофаги, детекция, полимеразная цепная реакция, *Enterococcus* spp.

Для цитирования: Ткачев П.В., Кулешевич Е.В., Гончаров А.Е. Набор праймеров для детекции энтерококковых бактериофагов. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(6):91-97. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-91-97.

PRIMER SET FOR DETECTING ENTEROCOCCAL BACTERIOPHAGES

Tkachev P. V., Kuleshevich E. V., Goncharov A. E.

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Tkachev Pavel V.,
Institute of Experimental Medicine,
Academician Pavlov str., 12, Saint
Petersburg, Russia, 197376.
E-mail: weaver.paul94@gmail.com

Received 03 October 2022; accepted
10 November 2022.

ABSTRACT

Introduction. The development and use of therapeutic drugs based on bacterial viruses, or bacteriophages, is a promising direction in the fight against bacterial infections. The composition of phage preparations must be constantly updated, which requires the search for new viruses through the screening of biological material and samples from the environment. **Purpose.** Development of a method for the search and identification of virulent enterococcal bacteriophages based on the polymerase chain reaction (PCR). **Materials and methods.** The known diversity of enterococcal viruses was assessed by database searches of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Primers were selected using the NCBI PrimerBlast and Primer3 programs. Primers were tested on seven commercial phage cocktails and 46 biomaterial samples. The specificity of PCR was confirmed by determining the nucleotide sequences of PCR products. **Results.** The obligately virulent enterococcal bacteriophages described in the literature belong to five ICTV approved genera: *Copernicovirus*, *Efquatrovirus*, *Kochikohdavirus*, *Saphexavirus*, and *Schiekvirus*. Representatives of the sixth genus, *Phifelvirus*, have a temperate life cycle. The PCR scheme developed by us is intended for specific amplification of fragments of the gene of the main capsid protein of the mentioned genera of bacteriophages. It was used to identify representatives of all five genera of virulent enterococcal bacteriophages in commercial phage cocktails. In samples of biological material, we identified representatives of the genera *Efquatrovirus*, *Kochikohdavirus*, *Saphexavirus* and *Schiekvirus*. **Conclusion.** The PCR scheme presented in this work makes it possible to detect all currently described obligately virulent bacteriophages infecting *Enterococcus* spp. in phagolysates and samples of biological material, and can also be used to determine the genera of viruses.

Key words: bacteriophages, detection, *Enterococcus* spp., polymerase chain reaction.

For citation: Tkachev PV, Kuleshevich EV, Goncharov AE. Primer set for detecting enterococcal bacteriophages. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):91-97. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-91-97.

ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Enterococcus*, в частности, *E. faecium* и *E. faecalis*, относятся к числу ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций. Глобальной проблемой здравоохранения стало распространение полирезистентных штаммов энтерококков, устойчивых к гликопептидам, включая ванкомицин, а также к линезолиду [1]. В данной связи представляется актуальным поиск альтернатив классическим антимикробным препаратам, применяемым для борьбы с энтерококковой инфекцией. К подобным альтернативам относится использование бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике [2].

В России выпускается широкий спектр фаговых препаратов для лечения бактериальных инфекций различной этиологии, включая энтерококковые. Однако изменчивость популяционной структуры возбудителя требует постоянного совершенствования состава препаратов, включая поиск и использование новых бактериофагов, обладающих тропизмом к циркулирующим вариантам возбудителя.

Определение таксономической принадлежности бактериофагов является необходимым условием для их включения в состав лечебных препаратов [3], при этом референтным методом признано полногеномное секвенирование [4]. В то же время задачи массового скрининга штаммов — кандидатов для практического использования, а также масштабные исследования фаговых виромов в различных местообитаниях требуют развития более простых и быстрых методов молекулярной идентификации отдельных таксономических групп вирусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Известное разнообразие облигатно вирулентных вирусов энтерококков было оценено посредством поиска в базах данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV). Подбор праймеров осуществлялся к консервативным участкам последовательностей гена основного белка головки капсида (major capsid protein), общего для геномов представителей шести родов облигатно вирулентных энтерококковых бактериофагов *Copernicovirus*, *Efquatrovirus*, *Kochikohdavirus*, *Phifelvirus*, *Saphexavirus* и *Schiekvirus*. Выбор данной молекулярной мишени был обусловлен ее эволюционной консервативностью [5, 6]. Подбор праймеров осуществляли при помощи программ NCBI PrimerBlast и Primer3. Последовательности праймеров приведены в таблице 1.

Для апробации предложенного набора праймеров использовали коллекцию образцов ДНК, выделенных из нескольких комплексных бактериофаговых препаратов (бактериофаговых коктейлей), произведенных НПО «Микроген» (Россия), и 46 образцов биологического материала (фекалии), полученных от людей. ДНК выделяли с помощью набора ДНК-Сорб-В («Интерлабсервис», Россия) согласно инструкции производителя. Кроме того, в качестве контрольного образца использовалась ДНК секвенированного ранее энтерококкового бактериофага GVEsP-1, отнесенного к роду *Schiekvirus* (номер доступа Генбанк MZ333462.1) [7]. Амплификация ДНК выполнялась на термоциклере ТП4-ПЦР-01-«Терцик» («ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: первичная денатурация — 95 °С, 3 мин; 34 цикла, включающих денатурацию — 95 °С, 1 мин, отжиг — 59 °С, 1 мин, элонгацию — 72 °С, 1 мин; финальная элонгация — 72 °С, 5 мин. Детекцию результатов проводили методом электрофореза в 1 % агарозном геле. Валидация продуктов ПЦР осуществлялась методом секвенирования по Сэнгеру на приборе GenomeLab GeXP (Beckman Coulter, США) с использованием GenomeLab DTCS — Quick Start Kit (Beckman Coulter) согласно рекомендациям производителя. Очистка продуктов ПЦР из реакционной смеси проводилась с помощью набора GeneJET™ PCR Purification Kit (Thermo Scientific, США). После очистки концентрация ДНК измерялась на UV-Visible-спектрофотометре NanoDrop OneC.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В базах данных ICTV и GenBank удалось выявить шесть таксономических групп бактериофагов, использующих в качестве хозяев бактерии рода *Enterococcus*, преимущественно *Enterococcus faecalis*. Выделенные таксоны бактериофагов относятся без исключения к классу *Caudoviricetes*, то есть хвостатым бактериофагам. Представители родов *Saphexavirus*, *Efquatrovirus* и *Phifelvirus*, на настоящий момент не отнесенные к какому-либо семейству, обладают несократимым хвостом. Фаги родов *Kochikohdavirus* и *Schiekvirus* обладают сократимым хвостом и относятся к семейству *Herelleviridae*. Род *Copernicovirus* классифицируется в семействе *Rountreeviridae*. Всего в исследовании были рассмотрены шесть родов вирусов энтерококков: пять облигатно вирулентных и один род вирусов, способных интегрироваться в геном бактерии (*Phifelvirus*). На ген основного белка головки капсида, характерного для таксономической

Таблица 1. Праймеры, использованные в исследовании

Table 1. Primers used in the study

Таксономическая принадлежность/ Taxonomy	Последовательности праймеров, 5'-3'		Референсная последовательность, GenBank accession
	Прямой праймер/ Forward primer	Обратный праймер/ Reverse primer	
<i>Copernicivirus</i>	CCGTAGAACTACCCTCTTT	GACAGACCATATTTACCAAGG	NC_055866.1
<i>Efqatrovirus</i>	GCTAATGAAGCCGTGTTGGC	GCGAATGCATCAGGTTGTCC	MZ272341.1
<i>Kochikohdavirus</i>	GCACATGGACGTGTAGGTCA	AACCTGAACCTGCATCTGGG	MN854830.2
<i>Phifelvirus</i>	GATGCGCGGTGATCTTGAAC	TTCAGCTCTTGAACGCGCTA	GQ478085.1
<i>Saphexavirus</i>	AAGCCCGGTGCAGCTGGTATG	ACAGGCCTTCGTCAACTCCAT	MZ333457.1
<i>Schiekvirus</i>	ATCTGCTCCATCTGACGTGGC	GGTGACGAAGAGCTAAAGCG	MW004544.1

Таблица 2. Результаты детекции бактериофагов различных родов в коммерческих фаговых препаратах

Table 2. Detection of bacteriophages belonging to various genera in commercial phages

№	Название препарата	Наличие энтерококковых бактериофагов в составе	Род бактериофагов / Bacteriophage genera			
			<i>Copernicivirus</i>	<i>Efqatrovirus</i>	<i>Kochikohdavirus</i>	<i>Saphexavirus</i>
1	«Интести-бактериофаг» (Н41)	Да	+	+	+	+
2	«Пиобактериофаг» (Н45)	Да	+	+	+	+
3	«Интести-бактериофаг» (П78-1)	Да	-	+	-	+
4	«Бактериофаг стрептококковый» (П76)	Нет	-	+	+	+
5	«Бактериофаг стрептококковый» (П60)	Нет	-	+	+	+
6	«Интести-бактериофаг» (П78-2)	Да	-	+	-	+
7	«Секстафаг пиобактериофаг» (П70)	Да	-	+	-	+

группы вирусов, были подобраны праймеры для проведения ПЦР (табл. 1).

В результате проведенного ПЦР-анализа удалось получить положительные результаты со всеми семью образцами коктейлей при идентификации гена капсида вирусов рода *Saphexavirus* и *Efquatrovirus* (табл. 2). Также положительные результаты ПЦР были получены при идентификации гена основного белка капсида вирусов рода *Kochikohdavirus* в фаговых коктейлях под номерами 1, 2, 4 и 5, а также вирусов рода *Schiekvirus* в коктейле под номером 5. Кроме того, удалось обнаружить ДНК рода вирусов *Copernicivirus* семейства *Sarlesvirinae* в двух коктейлях 1 и 2. Умеренные бактериофаги рода *Phifelvirus* в коммерческих фаговых коктейлях обнаружить не удалось. Далее, после выполнения секвенирования ампликонов, удалось подтвердить, что фрагменты, получаемые в ходе ПЦР-амплификации, относятся к гену белка капсида, специфичного для идентифицируемого рода вирусов.

Разработанный набор праймеров, за исключением праймеров на ДНК представителей рода *Copernicivirus*, был использован для детекции ДНК бактериофагов в биологическом материале (табл. 3). В ходе экспериментов были выявлены вирулентные бактериофаги, относящиеся к четырем родам. Неспецифическая амплификация с человеческой и микробной ДНК не наблюдалась, что позволяет использовать праймеры для прямой ПЦР-детекции вирусов в биологическом материале.

ОБСУЖДЕНИЕ

В 2018 году метагеномное исследование фагового коктейля «Пиобактериофаг» производства НПО «Микроген» выявило только сифовирусы рода *Saphexavirus* [8]. Наши результаты позволяют говорить о гораздо более широком разнообразии входящих в его состав вирусов. Наблюдаемое несо-

ответствие выявляемого таксономического состава терапевтического коктейля, возможно, объясняется значительной переработкой его рецептуры [9]. Напротив, присутствие в обоих коктейлях «Бактериофаг стрептококковый» вирусов рода *Efquatrovirus*, *Kochikohdavirus*, *Saphexavirus* и *Schiekvirus* может отображать продолжительную историю развития рецептуры препарата. Известно, что данные бактериофаги размножаются исключительно на бактериях рода *Enterococcus*. В свою очередь, до 1984 года энтерококки классифицировались как стрептококки группы D [10].

В двух препаратах была обнаружена ДНК подовирусов *Copernicivirus*, относящихся к новому семейству *Rountreeviridae* [11]. Несмотря на довольно быстрое формирование устойчивости к этим вирусам, продемонстрированное экспериментально, бактериофаги этой группы являются облигатно вирулентными и описаны во множестве статей, посвященных новым терапевтическим бактериофагам [12].

В четырех коммерческих фаговых препаратах обнаружены вирусы рода *Schiekvirus*, и в одном коктейле — вирусы рода *Kochikohdavirus* (семейство *Herelleviridae*) [13]. Это семейство крупных вирусов, содержащих геномы от 120 до 170 тысяч пар нуклеотидов, имеющих морфологию, отдаленно напоминающую *Enterobacteria virus T4* [14]. Если проводить аналогию с другими вирусами этого семейства, а также крупными миовирусами энтеробактерий, геномы этих бактериофагов могут содержать детерминанты широкого спектра литической активности, а также гены, позволяющие выдерживать конкуренцию с другими фагами, в том числе интегрированными в геном бактериями, гены, отвечающие за синтез модифицированных нуклеотидов, делающих их невосприимчивыми к эндонуклеазам рестрикции, гены транспортных РНК. Кроме того, представители семейства не способны интегрироваться в геном бактерии. Все эти

Таблица 3. Результаты детекции бактериофагов в биологическом материале

Table 3. Detection of bacteriophages belonging to various genera in biological material

Биологический материал	Число положительных образцов (Доля положительных образцов)			
	<i>Saphexavirus</i>	<i>Efquatrovirus</i>	<i>Kochikohdavirus</i>	<i>Schiekvirus</i>
Фекалии человека (n = 46)	17 (37 %)	24 (52 %)	6 (13 %)	14 (30 %)

особенности делают их идеальными кандидатами на роль терапевтических фагов [15, 16].

Таким образом, применение системы родовой идентификации вирусов энтерококков показало высокое разнообразие входящих в состав коктейлей вирусов энтерококков, что, по-видимому, обеспечивает препаратам широкую литическую активность.

Ограничением предложенного метода является то, что с его помощью возможно оценить разнообразие только вирусов энтерококков с известными полногеномными последовательностями. В данный момент по всему миру ведутся активные исследования в области фаготерапии и выделяются новые вирусы энтерококков. Известное биологическое разнообразие вирусов других бактерий, например кишечной палочки (*Escherichia coli*), гораздо шире даже в классе *Caudoviricetes* [17]. В базе данных Генбанк имеются одиночные геномные последовательности вирусов энтерококков, не отнесенные ни к одному таксону. При увеличении количества загруженных геномов в базе данных, согласно имеющейся тенденции, Международный комитет по таксономии вирусов выделит новый таксон энтерококковых фагов на основе генетического сходства, и для его идентификации понадобится новый набор праймеров. Существуют еще «бесхвостые» вирусы, например *Tectiviridae*, которые так же, как и представители класса *Caudoviricetes*, используют в качестве генетического материала двухцепочечную молекулу ДНК. Такие вирусы обнаружены у бацилл, которые также относятся к порядку *Firmicutes*, как и энтерококки [18]. Также встречаются фаги с одноцепочечной молекулой ДНК и РНК-содержащие вирусы [19]. Вполне возможно, что со временем все эти группы вирусов будут найдены, охарактеризованы, и схема идентификации вирусов должна быть дополнена новыми праймерами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен набор праймеров для детекции и идентификации облигатно вирулентных энтерококковых фагов, относящихся к пяти родам, утвержденным ICTV. Схема детекции апробирована на коммерческих фаговых препаратах и образцах биологического материала и валидирована методом секвенирования по Сэнгеру. Таким образом, предлагаемая схема может быть применена при первичном скрининге образцов биологического материала для поиска новых видов бактериофагов, относящихся к пяти известным родам облигатно вирулентных вирусов энтеробактерий, а также при

производстве фаговых препаратов для контроля их идентичности и возможной кросс-контаминации.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors stated that there is no potential conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование проведено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2022-302 (20.04.2022). / The study was conducted with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Agreement No. 075-15-2022-302 (04/20/2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Fiore E, Van Tyne D, Gilmore MS. Pathogenicity of enterococci. *Microbiology spectrum*. 2019;7(4):10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018.
2. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):e00066-18. DOI: 10.1128/CMR.00066-18.
3. Pirnay JP, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, Corte-Real S, Debarbieux L, Dublanchet A, De Vos D, et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res*. 2015;32(7):2173–9. DOI: 10.1007/s11095-014-1617-7.
4. Sboner A, Mu XJ, Greenbaum D, Auerbach RK, Gerstein MB. The real cost of sequencing: higher than you think! *Genome Biol*. 2011;12(8):125. DOI: 10.1186/gb-2011-12-8-125.
5. Duda RL, Teschke CM. The amazing HK97 fold: versatile results of modest differences. *Curr Opin Virol*. 2019;36:9–16. DOI: 10.1016/j.coviro.2019.02.001.
6. Koonin EV, Dolja VV, Krupovic M, Varsani A, Wolf YI, Yutin N, Zerbini FM, Kuhn JH. Global organization and proposed megataxonomy of the virus world. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020;84(2):e00061-19. DOI: 10.1128/MMBR.00061-19.
7. Tkachev PV, Pchelin IM, Azarov DV, Gorshkov AN, Shamova OV, Dmitriev AV, Goncharov AE. Two novel lytic bacteriophages infecting *Enterococcus* spp. are promising candidates for targeted antibacterial therapy. *Viruses*. 2022;14(4):831. DOI: 10.3390/v14040831.
8. McCallin S, Sarker SA, Sultana S, Oechslein F, Brüssow H. Metagenome analysis of Russian and Georgian Pyophage cocktails and a placebo-controlled safety trial of single phage versus phage cocktail in healthy *Staphylococcus aureus* carriers. *Environ*

Microbiol. 2018;20(9):3278–3293. DOI: 10.1111/1462-2920.14310.

9. Алешкин А.В., Селькова Е.П., Ершова О.Н., Савин И.А., Шкода А.С., Бочкарева С.С., Митрохин С.Д., Киселева И.А., Орлова О.Е., Рубальский Е.О., Зулькарнеев Э.Р. Концепция персонализированной фаготерапии пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2018;3(2):66–74.

10. Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1984;34(1):31–4.

11. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses*. 2021;13(3):506. DOI: 10.3390/v13030506.

12. Duan Y, Llorente C, Lang S, Brandl K, Chu H, Jiang L, White RC, Clarke TH, Nguyen K, Torralba M, et al. Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease. *Nature*. 2019;575(7783):505–511. DOI: 10.1038/s41586-019-1742-x.

13. Barylski J, Kropinski AM, Alikhan NF, Adriaenssens EM, ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Herelleviridae. *J Gen Virol*. 2020;101(4):362–363. DOI: 10.1099/jgv.0.001392.

14. Khalifa L, Brosh Y, Gelman D, Copenhagen-Glazer S, Beyth S, Poradosu-Cohen R, Que YA, Beyth N, Hazan R. Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(8):2696–705. DOI: 10.1128/AEM.00096-15.

15. Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Rüger W. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(1):86–156. DOI: 10.1128/MMBR.67.1.86-156.2003.

16. Takeuchi I, Osada K, Azam AH, Asakawa H, Miyanaga K, Tanji Y. The presence of two receptor-binding proteins contributes to the wide host range of staphylococcal Twort-like phages. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(19):5763–74. DOI: 10.1128/AEM.01385-16.

17. Korf IHE, Meier-Kolthoff JP, Adriaenssens EM, Kropinski AM, Nimtz M, Rohde M, van Raaij MJ, Wittmann J. Still something to discover: novel insights into *Escherichia coli* phage diversity and taxonomy. *Viruses*. 2019;11(5):454. DOI: 10.3390/v11050454.

18. Sozhamannan S, McKinstry M, Lentz SM, Jalasvuori M, McAfee F, Smith A, Dabbs J, Ackermann HW, Bamford JK, Mateczun A, et al. Molecular characterization of a variant of *Bacillus anthracis*-specific phage AP50 with improved bacteriolytic activity. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(21):6792–6. DOI: 10.1128/AEM.01124-08.

19. Hyman P, Abedon ST. Smaller fleas: viruses of microorganisms. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:734023. DOI: 10.6064/2012/734023.

Информация об авторах:

Ткачев Павел Владимирович, младший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Кулешевич Евгения Владимировна, к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Гончаров Артемий Евгеньевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной геномики и протеомики микроорганизмов отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Author information:

Tkachev Pavel V., Postgraduate student of the Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine;

Kuleshevich Eugenia V., Ph.D., Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine; 1

Goncharov Artemiy E., Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genomics and Proteomics of Microorganisms, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616-056.52:616-08

АУТОПРОБИОТИЧЕСКИЕ ЭНТЕРОКОККИ КАК КОМПОНЕНТ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Алфёрова Л. С.^{1, 2}, Ермоленко Е. И.¹, Черникова А. Т.^{1, 2},
Новикова Н. С.¹, Анопова А. Д.², Васюкова Е. А.^{1, 2}, Цапиева А. Н.¹,
Демченко Е. А.^{1, 2}, Гладышев Н. С.¹, Гладышева Н. П.¹,
Симаненкова А. В.^{1, 2}, Попова П. В.², Дмитриев А. В.¹,
Каронова Т. Л.², Суворов А. Н.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Научно-образовательный центр
«Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» научного центра
мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский
исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Алфёрова Любовь Сергеевна,
НОЦ «Молекулярные основы
взаимодействия микроорганизмов
и человека» НЦМУ «Центр
персонализированной медицины» ФГБНУ
«ИЭМ»,
Академика Павлова ул., 12, Санкт-
Петербург, Россия, 197376.
E-mail: lu_bashka@mail.ru

Статья поступила в редакцию 10.11.2022
и принята к печати 04.12.2022.

РЕЗЮМЕ

Своевременная терапия нарушения толерантности к глюкозе (НТГ) и метаболически здорового ожирения необходима для предотвращения серьезных осложнений, связанных с нарушениями углеводного обмена (УО) и развитием сахарного диабета 2 типа (СД2).

Целью исследования являлась оценка эффективности аутопробиотиков при терапии метаболического синдрома (МС) в начальной стадии нарушения УО. Проведено исследование антропометрических показателей и параметров УО у 24 пациентов с ожирением без нарушений УО (группа К) и 31 пациента с НТГ. Больные с НТГ и ожирением рандомизированы на группы получавших: аутопробиотик двумя курсами, в течение 20 дней (АП+), и плацебо (П). Группы АП+ и П отличались от К большим количеством содержанием *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Eubacterium* sp., *Streptococcus* spp. и *Roreburia inulinivorans* по данным ПЦР-РВ. Масса тела (МТ), индекс массы тела

(ИМТ), концентрация гликированного гемоглобина (HbA1c) и глюкозы сыворотки крови коррелировали с указанными таксонами.

В группе АП+ в отличие от Р1 выявлено постепенное снижение МТ, ИМТ, уровня глюкозы и HbA1c, на фоне изменения состава микробиоты кишечника: уменьшение количества стрептококков, розебурий, эубактерий превотелл, руминококков и тенденции к снижению ацинетобактера.

Доказана эффективность использования аутопробиотических энтерококков при ожирении и НТГ. Несмотря на то что механизмы их действия остаются недостаточно изученными, их использование может рассматриваться как перспективный компонент комплексной профилактики и терапии МС, СД2 и ожирения.

Ключевые слова: микробиота, нарушение толерантности к глюкозе, ожирение, руминококки, эубактерии.

Для цитирования: Алферова Л.С., Ермоленко Е.И., Черникова А.Т., Новикова Н.С., Анопова А.Д., Васюкова Е.А., Цапиева А.Н., Демченко Е.А., Гладышев Н.С., Гладышева Н.П., Симаненкова А.В., Попова П.В., Дмитриев А.В., Каронова Т.Л., Суворов А.Н. Аутопробиотические энтерококки как компонент комплексной терапии метаболического синдрома. *Российский журнал персонализированной медицины*. 2022;2(6):98-114. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-98-114.

AUTOPROBIOTIC ENTEROCOCCI AS A COMPONENT OF METABOLIC SYNDROME COMPLEX THERAPY

Alferova L. S.^{1,2}, Ermolenko E. I.¹, Chernikova A. T.^{1,2}, Novikova N. S.¹, Anopova A. D.², Vasyukova E. A.^{1,2}, Tsapieva A. N.¹, Demchenko E. A.^{1,2}, Gladyshev N. S.¹, Gladysheva N. P.¹, Simanenkova A. V.^{1,2}, Popova P. V.², Dmitriev A. V.¹, Karonova T. L.², Suvorov A. N.¹

¹ Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

² Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Alferova Lyubov S.,
Institute of Experimental Medicine,
Academician Pavlov str., 12, Saint
Petersburg, Russia, 197376.
E-mail: lu_bashka@mail.ru

Received 10 November 2022; accepted
04 December 2022.

ABSTRACT

Timely therapy of impaired glucose tolerance (IGT) and metabolically healthy obesity is necessary to prevent serious complications associated with disorders of carbohydrate metabolism (CM) and the development of type 2 diabetes mellitus (DM2).

The aim of the study was to evaluate the effectiveness of autoprobiotics in the treatment of metabolic syndrome (MS) in the initial stage of CM disorders. A study of anthropometric indicators and parameters of CM was conducted in 24 obese patients without CM disorders (group K) and 31 patients with IGT. Patients with MS and obesity were randomized into groups receiving: an autoprobiotic in two courses, for 20 days (AP+), and a placebo (PI). The AP+ and PI groups differed from K by a large quantitative content: *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Eubacterium* sp., *Streptococcus* spp. and *Roseburia inulinivorans* according to PCR-RT. Body weight (BW), body mass index (BMI), concentration of glycated hemoglobin (HbA1c) and serum glucose correlated with these taxa.

In the AP+ group, in contrast to PI, a gradual decrease in BW, BMI, glucose and HbA1c was revealed, against the background of changes in the composition of the intestinal microbiota: a decrease in the number of streptococci, roseburia, eubacteria prevotella, ruminococci and a tendency to decrease acinetobacter.

The effectiveness of the use of autoprobiotic enterococci in obesity and IGT has been proven. Despite the fact that the mechanisms of their action remain insufficiently studied, their use can be considered as a promising component of the comprehensive prevention and therapy of MS, DM2 and obesity.

Key words: eubacteria, impaired glucose tolerance, microbiota, obesity, ruminococci.

For citation: Alferova LS, Ermolenko EI, Chernikova AT, Novikova NS, Anopova AD, Vasyukova EA, Tsapieva AN, Demchenko EA, Gladyshev NS, Gladysheva NP, Simanenkova AV, Popova PV, Dmitriev AV, Karonova TL, Suvorov AN. Autoprobiotic enterococci as a component of metabolic syndrome complex therapy. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):98-114. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-98-114.

Список сокращений: ИМТ — индекс массы тела, КОЕ — колониеобразующие единицы, МТ — масса тела, МС — метаболический синдром, НТГ — нарушение толерантности к глюкозе, ПФПП — персонифицированный функциональный пищевой продукт, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, СД2 — сахарный диабет 2 типа, УПБ — условно-патогенные бактерии, HbA1C — гликированный гемоглобин.

ВВЕДЕНИЕ

Метаболический синдром (МС) — это совокупность признаков, характеризующихся увеличени-

ем массы висцерального жира, снижением чувствительности периферических тканей к инсулину и гиперинсулинемией, которые вызывают развитие нарушений углеводного, липидного, пуринового обмена и артериальной гипертензии [1]. Метаболические нарушения, лежащие в основе МС, сопровождаются и во многом обусловлены нарушениями микробиоты желудочно-кишечного тракта [2–8]. Показано, что использование препаратов, направленных на коррекцию липидного и углеводного обменов, также приводит к деструктивным изменениям кишечного микробиома [9].

Микробный состав может оказывать влияние на проницаемость кишечника, его перистальтику и активность пищеварительных ферментов. До-

казано влияние микробиоты на углеводный, липидный обмен и энергетические процессы [10]. Основные изменения в микробиоте кишечника при МС, с одной стороны, заключаются в снижении популяций *Bacteroides* spp., *Ruminococcus* spp., *Parabacteroides distasonis*, *Faecalibacterium prausnitzii* и *Eubacterium rectale* [11–14], а с другой — в увеличении содержания условно-патогенных бактерий (УПБ): стафилококков, стрептококков и энтеробактерий, инициирующих так называемое малое воспаление [15].

Коррекция нарушений кишечного микробиоценоза, приводящая к восстановлению метаболического статуса организма при МС, может быть осуществлена при помощи пробиотических лактобацилл, бифидобактерий, аккермансий и энтерококков, которые способны улучшать целостность кишечника, восстанавливать состояние энтеральной среды и нарушения микробиоты, характерные для ожирения [16, 17], а также содействовать снижению веса [18]. Сравнительно хорошо изучены механизмы действия пробиотиков на углеводный обмен. Уже сейчас известно, что введение пробиотиков может улучшить прогноз сахарного диабета 2 типа (СД2) за счет модуляции кишечной микробиоты. Пробиотики уменьшают воспалительную реакцию и окислительный стресс, а также увеличивают экспрессию белков адгезии в эпителии кишечника, снижая его проницаемость. Также пробиотики могут стимулировать выработку инсулина и способствовать повышению чувствительности тканей к его действию [19], устранению окислительного повреждения тканей поджелудочной железы [20]. Несмотря на успехи пробиотической терапии при МС, в литературе имеются данные о недостаточной эффективности и побочных эффектах некоторых пробиотиков [21].

Аутопробиотики — полезные индигенные бактерии, которые выделены из организма и введены в него повторно в количествах, сопоставимых с дозами, рекомендованными для использования пробиотических средств [22, 23]. Аутопробиотики

в качестве персонифицированного функционального пищевого продукта (ПФПП) на основе облигатных представителей микробиоты хозяина (лактобацилл, энтерококков, бифидобактерий и др.) могут рассматриваться как альтернатива пробиотическим средствам. Наиболее хорошо изучены аутопробиотические энтерококки, эффективно используемые в РФ для коррекции дисбиоза, синдрома раздраженного кишечника, СД2 и других заболеваний инфекционной и неинфекционной природы [23, 24].

Целью настоящего исследования явилось изучение эффективности действия аутопробиотиков на кишечный микробиоценоз и клинико-лабораторные показатели при комплексной терапии МС, сопровождающегося нарушением углеводного обмена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика больных и дизайн исследования

Клинические и лабораторные исследования осуществлялись на базе ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. Полимеразная цепная реакция образцов фекалий в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и изготовление аутопробиотика, ПФПП, проводились отделом молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Клиническое исследование было одобрено на заседании локального этического комитета при ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. Все пациенты подписывали одобренную локальным этическим комитетом форму информированного согласия.

Всего было исследовано 55 добровольцев. Аутопробиотические энтерококки были выделены у 31 пациента (группы АП+ (n = 17) и РI (n = 14)). Также в исследовании приняли участие 24 добровольца с метаболически здоровым ожирением. Более подробно исследовательские группы описаны в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп

Группы	Ожирение	Нарушение углеводного обмена	Изменения липидного профиля	Получение аутопробиотика	Элемент комплексной терапии
АП+	+	+	+	+	Аутопробиотик
РI	+	+	+	+	Placebo
К	+	-	-	Не получали	Не проводилась

Указанные группы не различались по полу, возрасту, а также наличию или отсутствию гипертонии и ишемической болезни сердца в анамнезе. Преобладали пациенты среднего и пожилого возраста (45–65 лет).

Критерии включения в группу пациентов с МС (АП+, PI)

1. Возраст более 25 и менее 65 лет.
2. Наличие признаков абдоминального ожирения (ИМТ > 25 кг/м², ОТ ≥ 94 см у мужчин и ≥ 80 см у женщин).
3. Наличие гликемии натощак 6,1–6,9 ммоль/л, подтвержденной повторным измерением в другой день, и/или через 2 часа после нагрузки глюкозой 7,8–11,0 ммоль/л в ПГТТ с 75 г глюкозы и/или гликированного гемоглобина (HbA1c) 6,0–6,4 %.
4. Уровень триглицеридов крови $\geq 1,7$ ммоль/л; холестерина ЛПВП $< 1,0$ ммоль/л у мужчин и $< 1,3$ ммоль/л у женщин.
5. Артериальное давление $\geq 130/85$ мм рт. ст.
6. Наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии включения в группу контроля

1. Возраст более 25 и менее 65 лет.
2. Избыточная масса тела / Наличие признаков абдоминального ожирения (ИМТ > 25 кг/м², ОТ ≥ 94 см у мужчин и ≥ 80 см у женщин).
3. Нормальные результаты исследования глюкозы и HbA1c $< 6,0$ %, отрицательные результаты перорального глюкозотолерантного теста.
4. Нормальные результаты исследования липидного профиля.
5. Наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения для всех групп

1. Значительные сопутствующие заболевания, требующие постоянной или длительной терапии, эффект от которых может повлиять на результаты исследований.
2. Онкологические и миелопролиферативные заболевания не в стадии ремиссии.
3. Злоупотребление психоактивными веществами, алкоголем.
4. Беременность или планирование беременности, период грудного вскармливания.
5. Использование антибактериальных, противовирусных, противогрибковых и противопаразитарных препаратов.

Получение аутопробиотиков

У больных с МС для приготовления аутопробиотической закваски [25] были взяты пробы фека-

лий в соответствии с требованиями лаборатории. В течение трех дней перед сбором материала пациентам было необходимо прекратить применение слабительных препаратов, использование очистительных и слабительных клизм, прием пробиотических, антибактериальных и химиотерапевтических препаратов, БАД и молочнокислых продуктов, а также для лучшего результата исключить прием психоактивных веществ и алкоголя. Бактериологический посев образцов фекалий для получения отдельных колоний осуществлялся на селективную питательную среду для энтерококков. После отбора трех индивидуальных колоний получали чистые культуры *E. faecium*, из которых была выделена ДНК. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была осуществлена с целью определения вида микроорганизма и доказательства отсутствия генетических детерминант патогенности. Отобранные индивидуальные непатогенные штаммы *E. faecium* были использованы для приготовления ПФПП на основе соевого молока (SuproPlus 2640, концентрация 40 г/л; Monsanto company, Missouri, США). ПФПП содержал 5×10^8 колониеобразующих единиц (КОЕ) индигенных энтерококков в 1 мл и был рекомендован для приема в количестве 50 мл два раза в день в течение 20 дней, двумя курсами с перерывом в течение 8–9 недель.

Аутопробиотические штаммы энтерококков помещались в криогенный депозитарий, их использовали для повторного приготовления аутопробиотической закваски.

Дизайн исследования

Согласно протоколу, пациенты совершали 3 визита в исследовательский центр. На визите № 1 проводился сбор жалоб, анамнеза, антропометрическое исследование, оценивалось соответствие пациентов критериям включения и исключения. Также у участников исследования проводился стартовый сбор биоматериала — сыворотка крови для определения уровня гликированного гемоглобина и глюкозы крови натощак и образец фекалий для проведения ПЦР-РВ и изготовления аутопробиотического продукта.

Затем в течение 2 недель выполнялось изготовление ПФПП. После приготовления аутопробиотической закваски пациенты были разделены случайным образом на две группы: экспериментальную (АП+) и контрольную (PI), получавших аутопробиотик или плацебо в течение первого и второго курсов терапии соответственно. Продолжительность каждого курса терапии составила 20 дней, при этом пациентам не было известно, какой продукт они получают — плацебо или ПФПП.

На визите № 2, проходившем через 2 недели после окончания 1-го курса терапии ПФПП, пациенты посещали исследовательский центр с целью повторного измерения антропометрических показателей и сбора биоматериала для оценки лабораторных параметров и состава микробиоценоза кишечника.

Через 7 недель от 2-го визита участники исследования получали повторный курс терапии ПФПП (группа АП+) и плацебо (группа РI) в течение 20 дней.

Завершающий визит № 3 осуществлялся через 2 недели после окончания 2-го курса терапии ПФПП. На данном визите пациентам выполняли контрольный замер антропометрических показателей, лабораторных параметров и исследование микробиоты кишечника. Дополнительная характеристика дизайна исследования представлена в таблице 2.

Антропометрический анализ

Всем пациентам, вошедшим в исследование, проводилось измерение массы тела (МТ) и индекса массы тела (ИМТ). Для измерения массы тела использовали медицинские весы МАССА ВЭМ-150 («Масса-К», Россия). ИМТ рассчитывали согласно методике, разработанной Адольфом Кетле, которая представляет собой показатель отношения веса к росту и рассчитывается индивидуально по формуле: $\text{ИМТ (кг/м}^2\text{)} = \text{вес(кг)} / \text{рост(м)}^2$.

Оценка углеводного обмена

Биохимическое исследование образцов сыворотки крови было выполнено автоматическим ана-

лизатором Abbot ARCHITECT si 8200 (333 Fiske Street, Холлистон, Массачусетс, США). Уровень глюкозы и гликированного гемоглобина определяли натошак, используя нормативы, установленные в клинической лаборатории.

Исследование микробиома

Исследование микробиоты кишечника проводили при ПЦР-РВ. Выделение исследуемой ДНК из фекалий крыс проводилось согласно инструкции, используя набор Экспресс-ДНК-Био. Полученная ДНК использовалась для постановки ПЦР-РВ с использованием флуоресцентно-меченых зондов Taqman с помощью тест-системы «Колонофлор» (ООО «АльфаЛаб», Россия).

Статистический анализ данных

Нормальность распределения данных определялась с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. На этой основе использовались непараметрические критерии. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica-10 (StatSoft Inc., Талса, Оклахома, США). Наличие статистически значимых различий между группами определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни, скорректированного на множественные сравнения по методу Бенджамини–Хохберга. Для парных выборок также использовался t-критерий Уилкоксона. Поиск корреляций между исследуемыми параметрами осуществляли с помощью теста Спирмена с использованием программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, Талса, Оклахома, США). Различия при $p < 0,05$ считались достоверными.

Таблица 2. Дизайн исследования

Группы	Старт	+ 2 недели	20 дней	+ 2 недели	+ 7 недель	20 дней	+ 2 недели
Контроль- ные точки	V1			V2			V3
АП+	Антро- по-ме- трия	Получе- ние ПФПП	Прием ПФПП	Антропо- метрия		Прием ПФПП	Антропо- метрия
PI			Прием Placebo	Сбор биомате- риала*		Прием Placebo	Сбор биомате- риала*
K			-			-	

Примечания: Антропометрия включала в себя измерение массы тела, окружности талии, индекса массы тела Кетле. ПФПП — персонифицированный функциональный пищевой продукт. Сбор биоматериала: фекалии и сыворотка крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все группы пациентов прошли обследование по единому алгоритму, а анализ результатов проводился при сравнении групп АП+ и РІ с контрольной группой (ожирение без НТГ) и в динамике (до и после введения аутопробиотика или placebo после первого и второго курсов).

Антропометрические показатели

Вес и ИМТ во всех группах и на всех этапах исследования не отличались от группы К (рис. 1). Несмотря на то что нормализации антропометрических показателей не происходило, у исследуемых пациентов наблюдалось снижение веса и индекса массы тела уже после первого курса терапии ПФПП. Данный эффект подтвердился и в результате повторного курса терапии.

Параметры углеводного обмена

Во всех группах и на всех этапах исследования уровень глюкозы натощак и HbA1c были больше, чем в группе К с метаболически здоровым ожирением (рис. 2).

У пациентов с МС после приема аутопробиотика наблюдалось улучшение гликемического профиля, что выражалось в снижении уровней HbA1c и глюкозы натощак. Данные изменения наблюдались как после первого курса, так и после второго курса терапии ПФПП. В группе РІ, несмотря на использование диетотерапии, рекомендованной для всех пациентов, уровень HbA1c после первого курса даже увеличился, свидетельствуя о ее недостаточной эффективности. Динамики в показателях глюкозы крови натощак у пациентов, принимающих placebo, обнаружено не было.

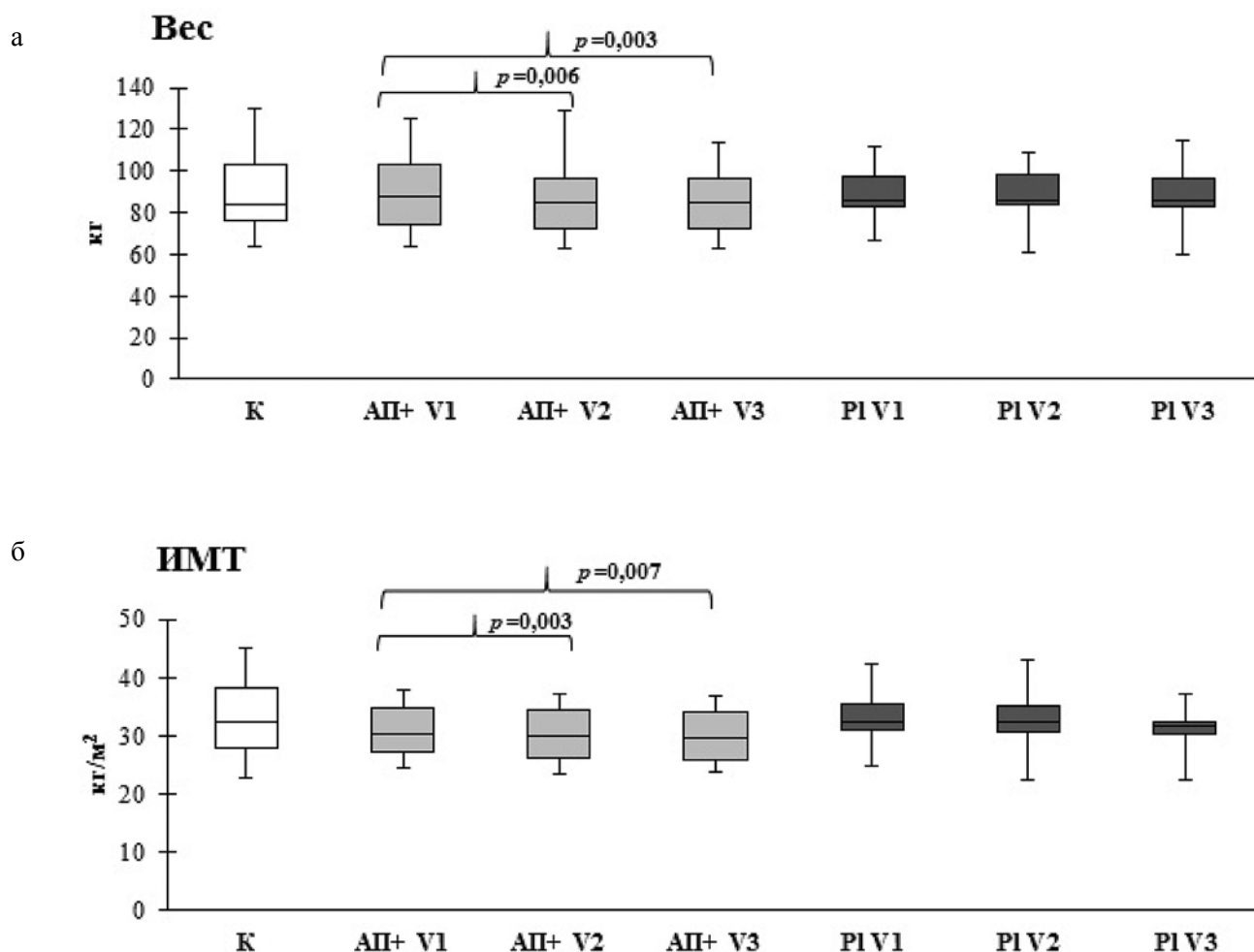


Рис. 1. Исследование антропометрических показателей (массы тела — а, индекса массы тела — б) у пациентов с МС до и после терапии аутопробиотиком. Результаты представлены в виде медианы (25 %; 75 %)

Особенности состава микробиоты кишечника

При оценке микробиоты все данные (рис. 3) были сопоставлены с диапазоном показателей по каждому из анализируемых таксонов, характерных для нормобиоза. Количественное содержание *Ruminococcus* spp., *Prevotella* spp., *Streptococcus* spp. и *Roseburia inulinivorans* у пациентов групп П1 и К не отличалось от нормальных значений. Обращало на себя внимание увеличение популяции *Acinetobacter* spp. у всех групп пациентов, что может быть рассмотрено в качестве причины развития малого воспаления, обусловленного грамотрицательными бактериями, содержащими в клеточной стенке липполисахарид (ЛПС). В группе АП+ было увеличено содержание стрептококков и розебурий, а количество

руминококков и превотелл соответствовало критериям нормобиоза.

Пациенты группы АП+ в начале исследования, до приема аутопробиотика (точка V1), отличались от пациентов с метаболически здоровым ожирением (группа К) большим содержанием *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus* spp., *Prevotella* spp., *Eubacterium rectale*, *Bacteroides* spp. и *Streptococcus* spp. (рис. 3).

Уменьшение популяции *Ruminococcus* spp. наблюдалось в виде тенденции после 1-го курса. После 2-го курса терапии содержание этих бактерий снижалось статистически достоверно, достигая уровня группы К (рис. 3а).

Представительство рода *Prevotella* у пациентов группы АП+ в точках V1 и V2 не имело различий и было выше, чем в группе К. После 2-го курса те-

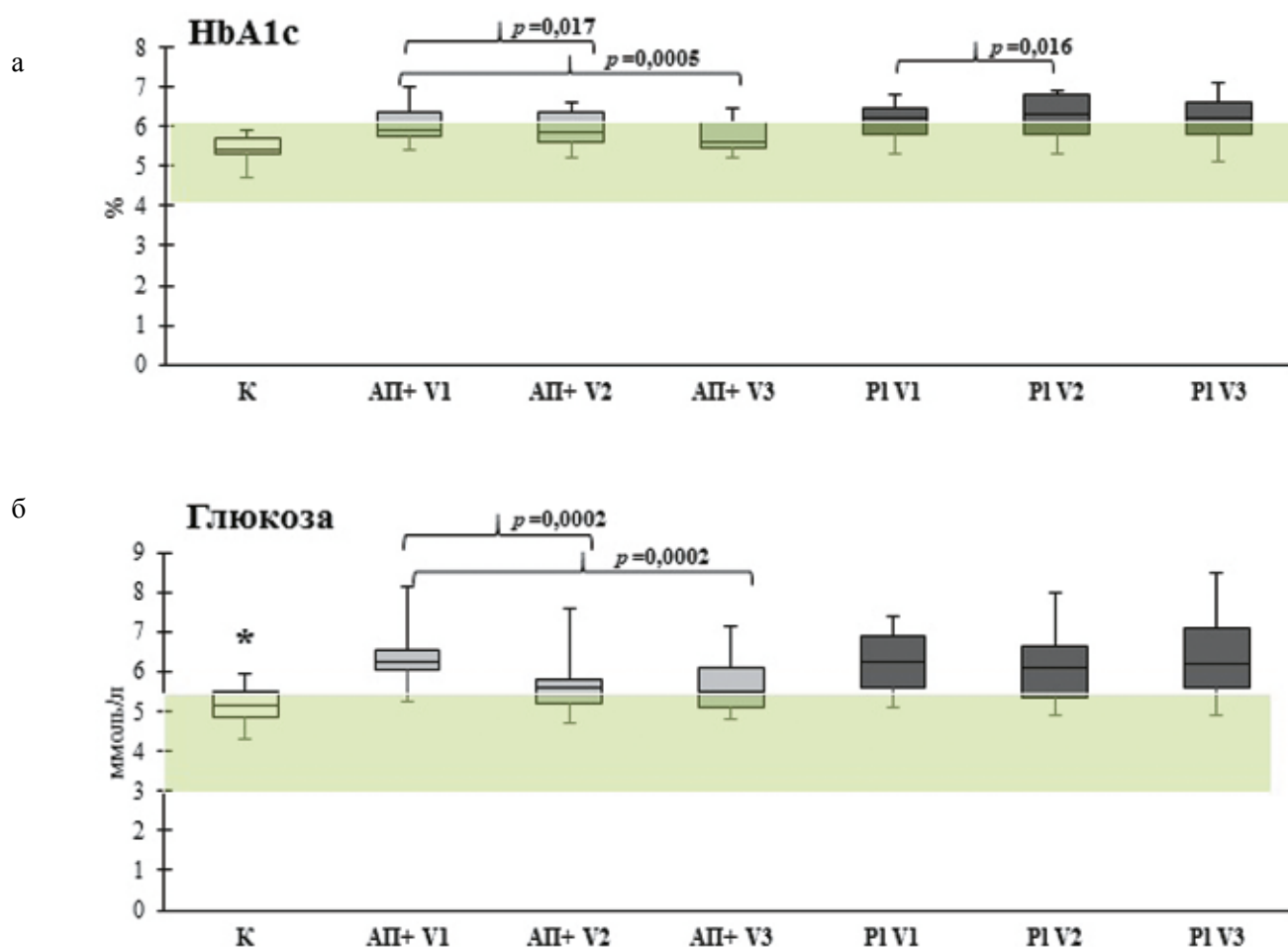
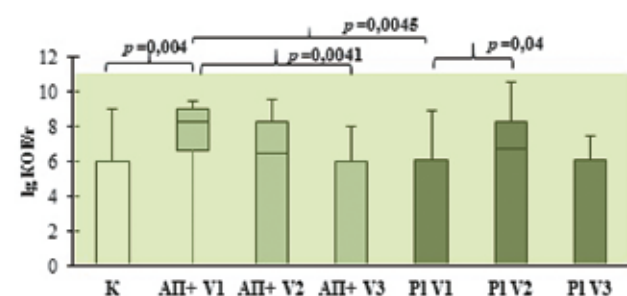
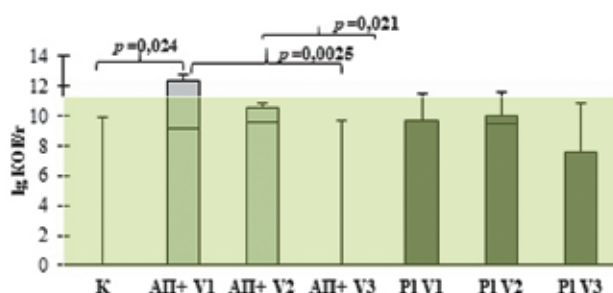


Рис. 2. Исследование параметров углеводного обмена (гликированного гемоглобина — а, глюкозы крови натощак — б) у пациентов с МС до и после терапии аутопробиотиком. Результаты представлены в виде медианы (25 %; 75 %)

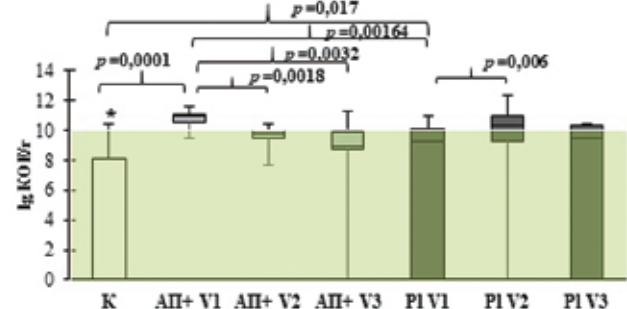
Примечание: * — отличается от всех групп, зеленым выделен диапазон нормальных значений.

Ruminococcus spp.

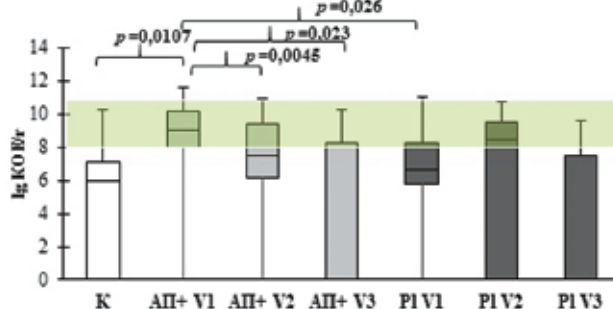
а

Prevotella spp.

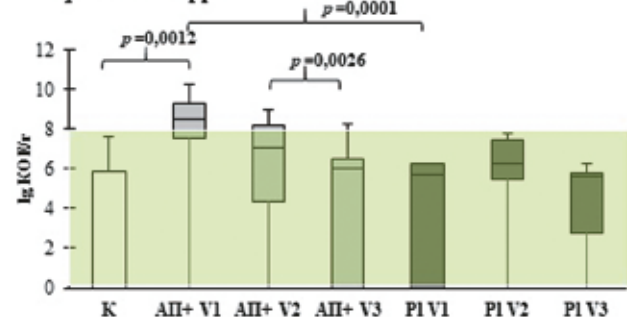
б

Roseburia inulinivorans

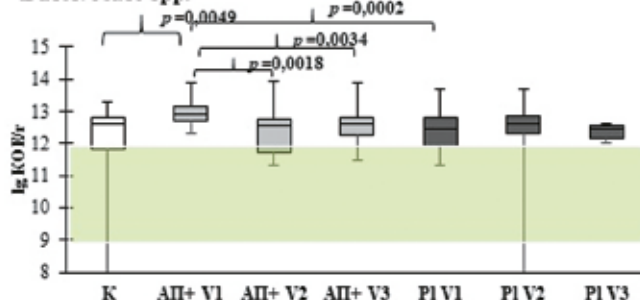
в

Eubacterium rectale

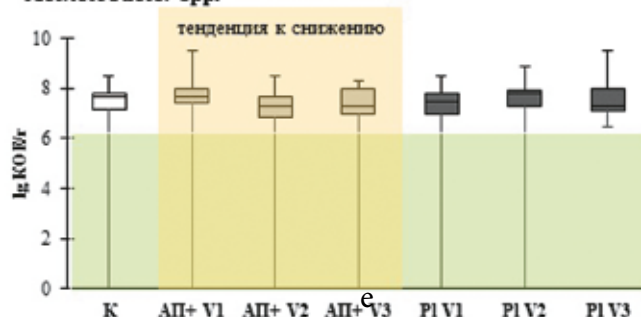
г

Streptococcus spp.

д

Bacteroides spp.

е

Acinetobacter spp.

ж

Рис. 3. Количественное содержание представителей кишечной микробиоты в образцах фекалий пациентов с МС при терапии аутопробиотиком: а — *Ruminococcus* spp., б — *Prevotella* spp., в — *Roseburia inulinivorans*, г — *Eubacterium rectale*, д — *Streptococcus* spp., е — *Bacteroides* spp., ж — *Acinetobacter* spp. Результаты представлены в виде медианы (25 %; 75 %)

Примечание: * — отличается от всех групп. Зеленым выделен диапазон значений, характерный для нормоценоза.

рации наблюдалось снижение численности прево-телл до уровня контроля (рис. 3б).

После 1-го и 2-го курсов терапии ПФПП наблюдалось постепенное уменьшение представительства бактерий *Roseburia inulinivorans* в группе АП+, однако количественное содержание розебурий на всем протяжении эксперимента отличалось от К (рис. 3в).

В группе АП+ в точках V2 и V3 наблюдалось постепенное снижение популяций *Eubacterium rectale* и *Bacteroides* spp. до значений, характерных для контрольной группы. Более выраженные изменения наблюдались после 2-го курса терапии (точка V3) (рис. 3г, 3е).

Количество *Streptococcus* spp. в точках V1 и V2 не отличалось друг от друга, однако после 2-го курса терапии ПФПП наблюдалось снижение представительства стрептококков до уровня К (рис. 3д).

Количественное содержание *Acinetobacter* spp. не изменялось и только в группе АП+ имело тенденцию к постепенному снижению (рис. 3ж).

Итоговые результаты исследования подробно представлены в таблице 3.

Корреляционный анализ

Корреляционный анализ проводился между антропометрическими показателями, параметрами углеводного обмена и количественным содержанием отдельных бактериальных таксонов до проведения терапии ПФПП.

Корреляционный анализ антропометрических показателей и компонентов микробиоценоза (рис. 4) позволил выявить отрицательную корреляционную связь между ИМТ и весом и *Ruminococcus* spp., *Prevotella* spp., *R. inulinivorans*, *E. rectale* и *Bacteroides* spp. В то же время количественное содержание этих же таксонов находилось в прямой связи с концентрациями HbA1c и глюкозы (рис. 5а, 5б). Исключение составляло наличие отрицательной корреляции между уровнем глюкозы и *A. muciniphila*.

ДИСКУССИЯ

В настоящей работе исследована эффективность аутопробиотических энтерококков при комплексной терапии МС с начальной стадией нарушений углеводного обмена и ожирением. Особенностью данного эксперимента был выбор в качестве контрольной группы пациентов с метаболически здоровым ожирением (группа К). У данной категории пациентов наблюдалось только увеличение антропометрических показателей и не выявлялись нарушения углеводного обмена, которые, очевидно, находятся в стадии компенсации.

Ранее было показано, что микробиота больных с доброкачественным ожирением, как правило, не существенно отличается от микробиоты здоровых людей [26, 27]. В данном исследовании выявленные отклонения от нормы проявляются только

Таблица 3. Обобщенные результаты исследования

Параметр	АП+ V1 – АП+ V2	АП+ V1 – АП+ V3	PI V1 – PI V2	PI V1 – PI V3
Вес	↓	↓	-	-
ИМТ	↓	↓	-	-
HbA1c	↓	↓	↑	-
Глюкоза	↓	↓	-	-
<i>Roseburia inulinivorans</i>	↓	↓	↑	-
<i>Ruminococcus</i> spp.	-	↓	↑	-
<i>Prevotella</i> spp.	-	↓	-	-
<i>Eubacterium rectale</i>	↓	↓	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	-	↓	-	-
<i>Bacteroides</i> spp.	↓	↓	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	- Тенденция ↓	- Тенденция ↓	-	-

увеличением содержания ацинетобактера и уменьшением популяции эубактерий.

Как и ожидалось, при исследовании кишечного микробиоценоза у пациентов с ожирением и нарушением углеводного обмена выявлено значительно большее количество бактерий, представительство которых отличается от нормобиоза. Так, в группах АП+ и РІ при сравнении с лабораторными показателями, характерными для здоровых людей, было обнаружено увеличение представительства таких родов бактерий, как *Bacteroides* и *Prevotella*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Acinetobacter* и *Ruminococcus*. Следует признать, что это противоречит (за исключением ацинетобактера) данным, полученным зарубежными авторами [11, 28]. Последние, сравнивая микробиоту людей с метаболически здоровым ожирением и МС, обнаружили снижение представительства бифидат-продуцирующих родов *Bacteroides* и *Prevotella*, *Roseburia*, *Ruminococcus* и *Faecalibacterium*. Подобные несоответствия с литературными данными часто встречаются при выявлении особенностей микробиоты кишечника при различных патологиях. Это может быть связано с гендерными, возрастными отличиями, наличием сопутствующих патологий, стадией заболевания и условиями жизни, а также с методами оценки состава кишечного микробиоценоза.

Выявленные особенности больных с МС в России могли быть связаны с характером ежедневного рациона, в котором, как правило, преобладают

продукты животного происхождения с малым количеством овощей, пищевых волокон и большим количеством легкоусвояемых углеводов [29].

В то же время, как и в нашем исследовании, так и другими авторами при МС выявлено увеличение условно-патогенных *Streptococcus* spp. и представителей фила *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*), потенциально инициирующих развитие так называемого малого воспаления [15].

В данном исследовании впервые на фоне использования двух курсов терапии аутопробиотическими энтерококками у больных с преддиабетом и ожирением в группе АП+ в отличие РІ удалось обнаружить динамическое снижение антропометрических параметров (МТ и ИМТ), а также HbA1c и глюкозы сыворотки крови.

По литературным данным, применение пробиотиков способно оказывать благоприятный эффект на углеводный обмен и способствовать снижению массы тела у животных с индуцированным СД2 [30, 31] и у больных с МС [32, 33]. Ранее мы использовали пробиотические энтерококки (*E. faecium* L3) и аутопробиотические энтерококки при терапии СД2 [34]. Однако в результате лечения было выявлено только исчезновение признаков диспепсии на фоне отсутствия существенных изменений в составе микробиоты кишечника. Отсутствие влияния на углеводный обмен и антропометрические параметры могло быть связано с тем, что терапия проводилась у больных с более грубыми наруше-

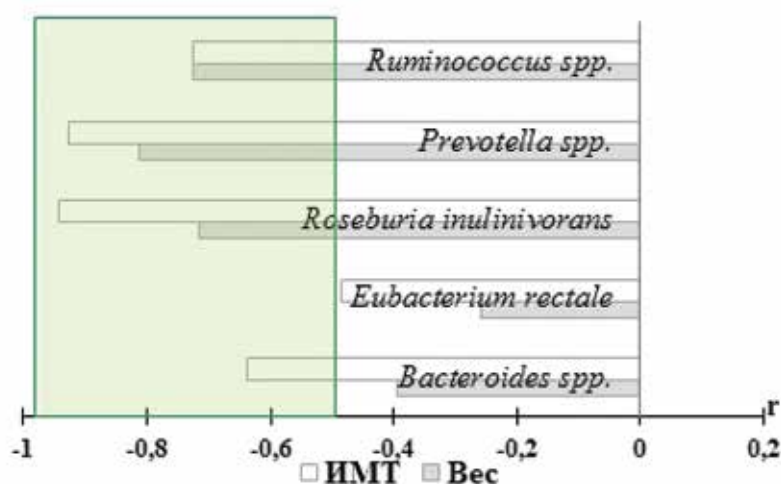


Рис. 4. Корреляционный анализ между антропометрическими показателями (индекс массы тела и вес) и бактериальными таксонами

Примечание: результаты исследования представлены с использованием $p < 0,05$. Поиск корреляций между исследуемыми параметрами проводился с помощью критерия Спирмена. Зеленым выделена область значений r , характерных для корреляционной связи средней (0,5–0,7), высокой (0,7–0,9) и очень высокой (0,9–1) силы.

ниями углеводного обмена и только одним и менее продолжительным курсом (14 дней).

В данном исследовании доказана важность длительного курса терапии и зависимость эффекта аутопробиотика от тяжести течения МС. Начало терапии на ранних стадиях нарушения углеводного обмена (преддиабет) также могло повлиять на ее более благоприятный эффект. Динамические однонаправленные изменения антропометрических показателей и параметров углеводного обмена доказывают целесообразность повторных курсов терапии даже в случае с использованием аутопробиотических штаммов, которые в большей степени адаптированы к существованию в организме и защищены избирательной иммунологической толерантностью к собственным представителям микробиоты [23, 24]. Аутопробиотические штам-

мы микроорганизмов, как известно, способны более длительно персистировать в организме хозяина [35]. Однако их повторное введение в концентрациях, характерных для пробиотических культур, оказывается более эффективным, чем персистирование этих полезных представителей микробиоты в естественных условиях, без дополнительных искусственных увеличений их популяций.

В данном исследовании введение аутопробиотиков привело к снижению условно-патогенных бактерий — стрептококков, и косвенно доказанному снижению ацинетобактерий, что является фактором, сокращающим вероятность возникновения воспалительных процессов. Это полностью совпадает с данными, полученными ранее при эффективном использовании различных пробиотиков при МС [32, 33].

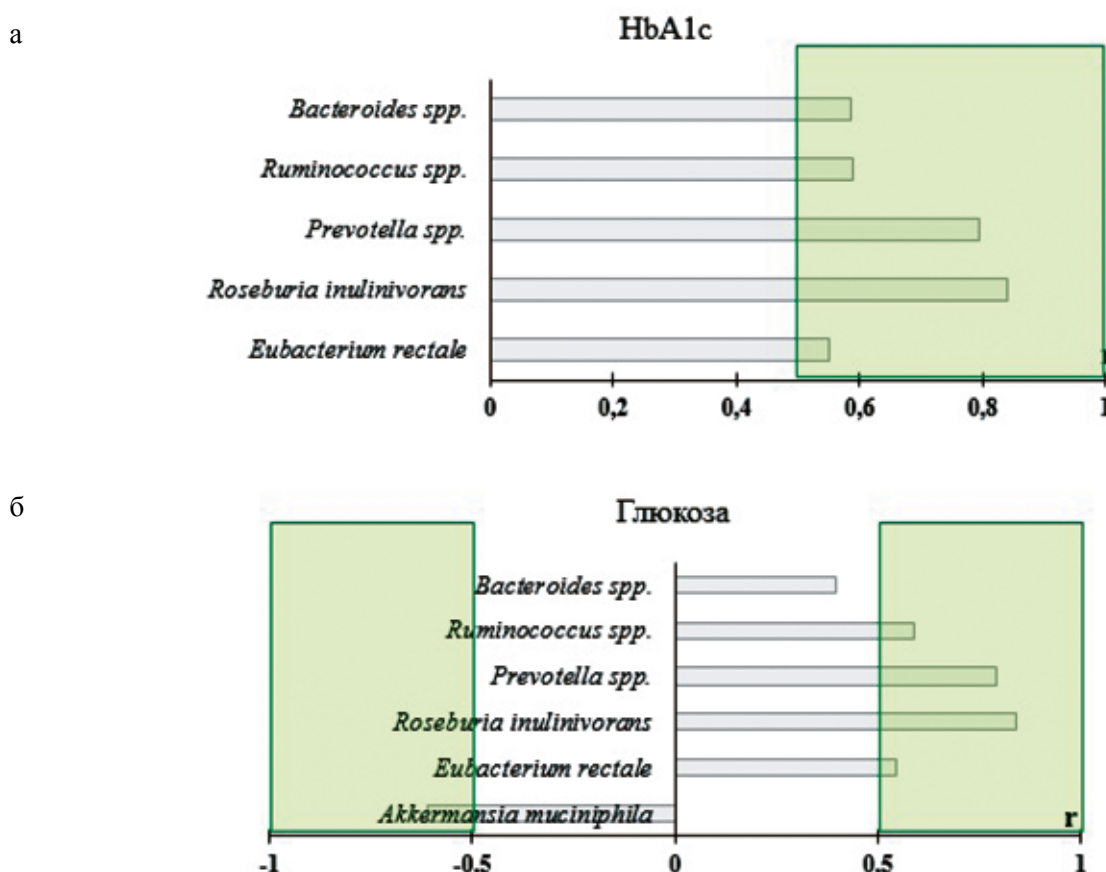


Рис. 5. Корреляционный анализ между показателями углеводного обмена (а — гликированный гемоглобин (HbA1c); б — глюкоза крови натощак) и бактериальными таксонами

Примечание: результаты исследования представлены с использованием $p < 0,05$. Поиск корреляций между исследуемыми параметрами проводился с помощью критерия Спирмена. Зеленым выделена область значений r , характерных для корреляционной связи средней (0,5–0,7), высокой (0,7–0,9) и очень высокой (0,9–1) силы.

Остальные изменения микробиоты достаточно трудно трактовать. Обращало на себя внимание, что большинство контролируемых изменений микробиоты находились в пределах установленной ранее нормы. Так, уменьшение количественного содержания розебурий, превотелл и руминококков можно рассматривать как динамические колебания нормальных показателей. Исключение составили только эубактерии, которых становилось меньше нормы, как и у больных со здоровым вариантом ожирения. Нельзя исключить, что именно эти изменения имели наиболее важное значение для позитивных сдвигов в клинико-лабораторных показателях. Данные, полученные при корреляционном анализе, отчасти объясняют целесообразность изменений в составе микробиоты и, возможно, отражают временные компенсаторные физиологические изменения в организме.

Выяснилось, что количественное содержание *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus* spp., *Prevotella* spp., *Roseburia inulinivorans*, увеличенное до терапии, на фоне использования аутопробиотика (группа АП+) динамически уменьшалось. Эти таксоны имели положительную корреляцию с ИМТ и МТ, а также с уровнем HbA1c. Установленные в данной работе закономерности подтверждают большинство корреляционных связей, выявленных на экспериментальной модели НТГ у крыс [36].

Перечисленные таксоны входят в состав различных функциональных групп/подгрупп фило-метаболического ядра микробиоты [17, 37], отличающихся по ключевым метаболическим путям, однако находящихся в постоянном сложном взаимодействии друг с другом, направленном на сохранение гомеостаза при наличии микрoэкологического равновесия.

Фокусируя внимание на выходящие за пределы нормальных значений изменения в содержании эубактерий, приведем литературные данные о влиянии этих бактерий на вес и углеводный обмен. *Eubacterium rectale* (фила *Bacilliota*, класс *Clostridia*, порядок *Eubacteriales*) — один из наиболее широко представленных в фекалиях человека вид грамположительных микроорганизмов, относящихся к группам по метаболическим особенностям: бутират-продуцирующих и утилизирующих желчные кислоты бактерий [17, 37]. *E. rectale* более распространены в группе пациентов с метаболически здоровым ожирением [38]. Это логически совпадает с отмеченным нами увеличением эубактерий у исследованных пациентов с МС и выявленной нами прямой корреляционной связью между количеством *E. rectale* и антропометрическими показателями. В то же время несколько неожиданным

было снижение популяции этих бактерий в группе К с ожирением без нарушений углеводного обмена. Это можно рассматривать как компенсаторный механизм, нормализующий потенциальные сдвиги в метаболизме глюкозы.

Ранее было отмечено, что метаболические особенности свойств *E. rectale* предполагают разнонаправленное влияние на углеводный обмен, и его чрезмерное количество в составе кишечного микробиоценоза может играть негативную роль. В нашем исследовании максимальное количество эубактерий было обнаружено до терапии в группах АП+ и Р1 на начальной стадии эксперимента и коррелировало с высоким уровнем глюкозы и HbA1c до введения аутопробиотика.

Ruminococcus spp. (фила *Bacilliota*, класс *Clostridia*, порядок *Eubacteriales*) близки таксономически к группе эубактерий, но по метаболическим особенностям их можно отнести к группе пропионат-продуцирующих бактерий [37], *R. gnavus* является воспроизводимым и основным независимым предиктором нескольких признаков МС. Предыдущие исследования показали, что эти бактерии могут переваривать кишечную слизь и стимулировать развитие воспалительных реакций. Данные свойства руминококков, вероятно, способствуют их ассоциации с болезнью Крона [39].

Объяснения корреляции между уменьшением содержания бактериоидов, превотелл и розебурий и выявленными позитивными изменениями клинико-лабораторных показателей сталкиваются с противоречивыми данными об их участии в обмене углеводов и липидов [17, 37, 40–43]. Изучение механизмов действия этих бактериальных таксонов является предметом дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, микробиота кишечника становится потенциальной мишенью для таргетной терапии МС. У больных с ожирением и предиабетом назначение аутопробиотика оказывает положительное влияние на основные проявления МС и может рассматриваться как средство профилактики более серьезных его осложнений, прежде всего связанных с СД2 и развитием сердечно-сосудистой патологии. Такой подход весьма благоприятен, поскольку он позволяет сократить затраты на лечение и значительно снизить риск причинения вреда пациенту по сравнению с более радикальными и инвазивными вмешательствами, используемыми в настоящее время для лечения ожирения и нарушений углеводного обмена.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors stated no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Работа выполнена при поддержке Минобр-науки России, соглашение №075-15-2022-302 (20.04.2022). / The work was carried out with the support of the Ministry of Education and Science of Russia, Agreement No. 075-15-2022-302 (04/20/2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Chazova IE, Mychka VB, Litvin AYU, et al. Diagnosis and treatment of metabolic syndrome. Russian recommendations (second revision). Cardiovascular therapy and prevention. 2009; 8(6):1–29. In Russian [Чазова И.Е., Мычка В.Б., Литвин А.Ю. и др. Диагностика и лечение метаболического синдрома. Российские рекомендации (второй пересмотр). Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009; 8(6):1–29.]
2. Volovnikova VA, Kotrova AD, Ivanova KA, et al. The role of gut microbiota in the development of obesity. *Juvenis scientia*. 2019;6:4–10. In Russian [Воловникова В.А., Котрова А.Д., Иванова К.А. и др. Роль кишечной микробиоты в развитии ожирения. *Juvenis scientia*. 2019;6:4–10.]
3. Dabke K, Hendrick G, Devkota S. The gut microbiome and metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2019;129(10): 4050–4057.
4. Bäckhed F, Manchester J, Semenkovich C, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104: 979–984.
5. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(43):16767–16772.
6. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*. 2012;61:364–371.
7. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010;328(5975):228–231.
8. Duncan SH, Lopley GE, Holtrop G, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity*. 2008;32(11):1720–1724.
9. Tuteja S, Ferguson JF. Gut microbiome and response to cardiovascular drugs. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*. 2019;12(9):421–429.
10. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010;299:G440–G448.
11. Haro C, Garcia-Carpintero S, Alcala-Diaz JF, et al. The gut microbial community in metabolic syndrome patients is modified by diet. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2016;27:27–31
12. Salyers AA, Vercellotti JR, West SE, et al. Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Applied and environmental microbiology*. 1977;33(2):319–322
13. Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC biology*. 2013;11(1):1–13.
14. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, et al. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(4):1073–1078.
15. Borschev Yul, Ermolenko EI. Metabolic syndrome and intestinal microecology. *Translational Medicine*. 2014;1:19–28. In Russian [Борщев Ю.Ю., Ермоленко Е.И. Метаболический синдром и микроэкология кишечника. Трансляционная медицина. 2014;1:19–28.]
16. Gareau MG, Sherman PM, Walker WA (2010) Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2010;7(9):503–514.
17. Gut microbiome, bacterial metabolism and metabolic disorders. In: *Metabolic syndrome*. 4th ed. Saint Petersburg: SPSPMU, 2020:67–104. In Russian [Микробиом кишечника, бактериальный метаболизм и метаболические расстройства. В кн.: Метаболический синдром. 1-е изд. СПб: СПбГПМУ, 2020:67–104.]
18. Lee HY, Park JH, Seok SH, et al. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show antiobesity effects in diet-induced obese mice. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular and cell biology of lipids*. 2006;1761(7):736–744.
19. Gomes AC, Bueno AA, de Souza RGM, et al. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutrition journal*. 2014;13(1):1–13.
20. Yadav H, Jain S, Sinha P. Effect of Dahi containing *Lactococcus lactis* on the progression of diabetes induced by a high-fructose diet in

rats. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2006;70(5):1255–8.

21. Anukam KC. Probiotic Toxicity, any evidence? Journal of Pharmacology and Toxicology. 2007;2(7):590–598.

22. Oleskin AV, Shenderov BA. Probiotics, prebiotics and metabiotics: problems and prospects. Physical and rehabilitation medicine, medical rehabilitation. 2020;2(3):233–243. In Russian [Олескин А.В., Шендеров Б.А. Пробиотики, пребиотики и метабиотики: проблемы и перспективы. Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2020;2(3):233–243.]

23. Suvorov A, Karaseva A, Kotyleva M, et al. Autoprobiotics as an Approach for Restoration of Personalised Microbiota. Frontiers in microbiology. 2018;12(9):1869.

24. Solovyova OI, Simanenkova VI, Suvorov AN, et al. The use of probiotics and autoprobiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. Experimental and clinical gastroenterology. 2017;7(143):115–120. In Russian [Соловьева О.И., Симаненков В.И., Суворов А.Н. и др. Использование пробиотиков и аутопробиотиков в лечении синдрома раздраженной толстой кишки. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2017;7(143):115–120.]

25. Suvorov AN, Simanenkova VI, Sundukova ZR, et al. Method for producing autoprobiotic of *Enterococcus faecium* being representative of indigenous host intestinal microflora. Patent on the application #2460778C1, 30.12.2010. In Russian [Суворов А.Н., Симаненков В.И., Сундукова З.Р., и др. Способ получения аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина. Патент по заявке No 2460778C1 от 30.12.2010 г.]

26. Kotrova AD, Shishkin AN, Voropaeva LS, et al. Gender assessment of the gut microbiome in obese patients. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2021;10:91–99. In Russian [Котрова А.Д., Шишкин А.Н., Воропаева Л.С. и др. Гендерная оценка микробиома кишечника у больных с ожирением. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021;10:91–99.]

27. Bakulina NV, Tikhonov SV, Ermolenko EI, et al. Intestinal microbiota, gastroenterological complaints and quality of life in overweight, obese and type 2 diabetes patients. Profilakticheskaya Meditsina. 2022;25(6):80–88. In Russian [Бакулина Н.В., Тихонов С.В., Ермоленко Е.И. и др. Кишечная микробиота, гастроэнтерологические жалобы и качество жизни у пациентов с избыточной массой тела, ожирением и сахарным диабетом 2-го типа. Профилактическая медицина. 2022;25(6):80–88.]

28. Santos-Marcos JA, Perez-Jimenez F, Camargo A. The role of diet and intestinal microbiota in the

development of metabolic syndrome. The Journal of nutritional biochemistry. 2019;70:1–27.

29. Egshatyan LV, Tkacheva ON, Kafarskaya LI, et al. The changes of gut microbiota associated with age and lifestyle. Obesity and metabolism. 2015;12(2):3–9. In Russian [Егшатын Л.В., Ткачева О.Н., Кафарская Л.И. и др. Изменения кишечной микрофлоры, ассоциированные с возрастом и образом жизни. Ожирение и метаболизм. 2015;12(2):3–9.]

30. Kvan OV, Konstantinova YuA, Alyokhina GP, et al. The effect of probiotic drugs on hematological blood parameters of laboratory animals. Bulletin of the Orenburg State University. 2017;6(206):76–79. In Russian [Кван О.В., Константинова Ю.А., Алехина Г.П. и др. Влияние пробиотических препаратов на гематологические показатели крови лабораторных животных. Вестник Оренбургского государственного университета. 2017;6(206):76–79.]

31. Li H, Liu F, Lu J, et al. Probiotic mixture of *Lactobacillus plantarum* strains improves lipid metabolism and gut microbiota structure in high fat diet-fed mice. Frontiers in microbiology. 2020;11:512.

32. Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH, et al. Gut microbiota and metabolic syndrome. World journal of gastroenterology: WJG. 2014;20(43):16079–16094.

33. Koutnikova H, Genser B, Monteiro-Sepulveda M, et al. Impact of bacterial probiotics on obesity, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease related variables: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. BMJ open. 2019;9(3):e017995.

34. Bakulina NV, Tikhonov SV, Ermolenko EI, et al. The use of *E. faecium* probiotic and autoprobiotic in patients with type 2 diabetes mellitus. HERALD of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov. 2022;14(1):77–88. In Russian [Бакулина Н.В., Тихонов С.В., Ермоленко Е.И. и др. Использование пробиотических и аутопробиотических *Enterococcus faecium* в лечении пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. 2022;14(1):77–88.]

35. Ermolenko EI, Svirido DA, Kotyleva MP, et al. Correction of rats intestinal dysbiosis using indigenous recombinant strains of enterococci and duration of their persistence in intestinal microbiocenosis. Experimental and clinical gastroenterology. 2016;12:65–69. In Russian [Ермоленко Е.И., Свиридо Д.А., Котылева М.П. и др. Коррекция дисбиоза кишечника крыс индигенными рекомбинантными штаммами энтерококков и длительность их персистенции в составе кишечного микробиоценоза. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2016;12:65–69.]

36. Ermolenko E, Simanenkova A, Voropaeva L, et al. Metformin influence on the intestinal microbiota and

organism of rats with metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(12):6837.

37. Sitkin SI, Tkachenko EI, Vakhitov TYa. The philometabolic core of the intestinal microbiota. *Almanac of Clinical Medicine*. 2015;40:12–34. In Russian [Ситкин С.И., Ткаченко Е.И., Вахитов Т.Я. Филометаболическое ядро микробиоты кишечника. *Альманах клинической медицины*. 2015;40:12–34.]

38. Olivares PDSG, Pacheco ABF, Aranha LN, et al. Gut microbiota of adults with different metabolic phenotypes. *Nutrition*. 2021;90:111293.

39. Grahnmemo L, Nethander M, Coward E, et al. Cross-sectional associations between the gut microbe *Ruminococcus gnavus* and features of the metabolic syndrome. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2022;10(7):481–483.

40. Wang SZ, Yu YJ, Adeli K. Role of gut microbiota in neuroendocrine regulation of carbohydrate and lipid metabolism via the microbiota-gut-brain-liver axis. *Microorganisms*. 2020;8(4):527.

41. Rios-Covian D, Salazar N, Gueimonde M, et al. Shaping the metabolism of intestinal *Bacteroides* population through diet to improve human health. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:376.

42. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet modulate the predisposition to obesity and metabolic syndrome. *Cell metabolism*. 2015;22(3):516–530.

43. Larsen N., Vogensen FK, Van Den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS one*. 2010;5(2):e9085.

Информация об авторах:

Алфёрова Любовь Сергеевна, младший научный сотрудник НИЛ персонифицированной микробной терапии отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»; младший научный сотрудник НИЛ реабилитации ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Ермоленко Елена Игоревна, д.м.н., заведующий НИЛ персонифицированной микробной терапии НИО микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Черникова Алена Тимуровна, к.м.н., научный сотрудник НИЛ персонифицированной микробной терапии отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ», младший научный со-

трудник НИЛ клинической эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Новикова Надежда Сергеевна, научный сотрудник НИЛ персонифицированной микробной терапии отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Анопова Анна Дмитриевна, младший научный сотрудник НИЛ метаболических заболеваний и микробиоты НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Васюкова Елена Андреевна, младший научный сотрудник НИЛ эндокринных заболеваний у беременных, Институт эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Цапиева Анна Николаевна, к.б.н., научный сотрудник НИЛ персонифицированной микробной терапии отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Демченко Елена Алексеевна, д.м.н., ведущий научный сотрудник НИЛ персонифицированной микробной терапии отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»; главный научный сотрудник НИЛ реабилитации ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гладышев Никита Сергеевич, научный сотрудник НИЛ персонифицированной микробной терапии отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Гладышева Надежда Павловна, научный сотрудник НИЛ персонифицированной микробной терапии отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Симаненкова Анна Владимировна, к.м.н., научный сотрудник НИЛ персонифицированной микробной терапии отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»; старший научный сотрудник лаборатории клинической эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Попова Полина Викторовна, к.м.н., заведующий НИЛ эндокринных заболеваний у беременных ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Дмитриев Александр Валентинович, д.б.н., профессор РАН, руководитель НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Каронова Татьяна Леонидовна, д.м.н., руководитель лаборатории клинической эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Суворов Александр Николаевич, д.м.н., член-корреспондент РАН, заведующий НИО микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ».

Author information:

Alferova Lyubov S., junior researcher of the scientific research laboratory of personalized microbial therapy of the department of microbial therapy of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM»; junior researcher of the scientific research laboratory of rehabilitation of Almazov National Medical Research Centre.

Ermolenko Elena I., MD, chief of the scientific research laboratory of personalized microbial therapy of the department of microbial therapy of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM».

Chernikova Alena T., PhD, junior researcher of the scientific research laboratory of personalized microbial therapy of the department of microbial therapy of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM»; junior researcher of the scientific research laboratory of clinical endocrinology of Almazov National Medical Research Centre.

Novikova Nadezhda S., researcher of the scientific research laboratory of personalized microbial therapy of the department of microbial therapy of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM».

Anopova Anna D., junior researcher of the scientific research laboratory of metabolic syndrome of Almazov National Medical Research Centre.

Vasyukova Elena. A., junior researcher of the scientific research laboratory of endocrine diseases in pregnant women of Almazov National Medical Research Centre.

Tsapieva Anna N., PhD, researcher of the scientific research laboratory of personalized microbial therapy

of the department of microbial therapy of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM».

Demchenko Elena. A., MD, leading researcher of the scientific research laboratory of personalized microbial therapy of the department of microbial therapy of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM»; chief researcher of the scientific research laboratory of rehabilitation of Almazov National Medical Research Centre.

Gladyshev Nikita S., researcher of the scientific research laboratory of personalized microbial therapy of the department of microbial therapy of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM».

Gladysheva Nadezhda P., researcher of the scientific research laboratory of personalized microbial therapy of the department of microbial therapy of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM».

Simanenkova Anna V., PhD, researcher of the scientific research laboratory of personalized microbial therapy of the department of microbial therapy of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM»; senior researcher of the scientific research laboratory of clinical endocrinology of Almazov National Medical Research Centre.

Popova Polina V., PhD, chief of the scientific research laboratory of endocrine diseases in pregnant women of Almazov National Medical Research Centre.

Dmitriev Alexander V., Dr.Sc., Professor of RAS, director of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM».

Karonova Tatyana L., MD, head of the scientific research laboratory of clinical endocrinology of Almazov National Medical Research Centre.

Suvorov Alexander N., MD, corresponding member of RAS, chief of the research department of microbial therapy of the Scientific and educational center "Molecular bases of interaction of microorganisms and human" of World-Class Research Centre for Personalized Medicine» of FSBSI «IEM».

