

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, А.А. Назаренко

Редакционный совет

В.Г. Дебабов (Москва), В.Т. Иванов (Москва), М.П. Кирпичников (Москва),
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва),
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),
К.Г. Скрябин (Москва), Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru, vorobyev095@yandex.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 4

Оригинальные статьи

Зоопланктон рек в районе строящейся Балтийской АЭС.

Д.В. Кулаков 5

Панкреатический гидролиз липидов хвойных пород для трансформации в жидкое биотопливо.
Кинетика процесса.

В.С. Болдырев, А.Н. Иванкин, А.Н. Зарубина, А.Н. Зенкин, Я.Д. Сеина 14

Математическое моделирование работы ферментного биотопливного элемента в спинномозговой жидкости.

М.В. Вишневецкая, П.М. Готовцев, Ю.М. Парунова, Д.А. Газизова, Р.Г. Василев 19

Влияние гидрохимических показателей воды рек Дон и Темерник на обнаружение холерных вибрионов.

Д.А. Левченко, Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова, С.В. Титова,

В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, М.В. Ренгач 25

Определение индекса десорбции холерных вибрионов различных серогрупп и токсигенности в биопленке на хитиновом панцире речного рака.

Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова, С.О. Водопьянов, С.В. Титова, А.В. Миронова 32

Влияние пробиотиков «Зоонорм» и «Ветом 4» на морфофункциональные и биохимические показатели крови цыплят-бройлеров.

С.В. Сидоренко, Г.Ф. Рыжкова 35

Обзоры

Современные представления о микробном разнообразии кожи.

А.Ю. Шаталова, Е.С. Булыгина, Т.Н. Гаева, Н.В. Слободова, С.М. Расторгуев,

С.В. Цыганкова, Ф.С. Шарко, Р.Г. Василев 39

Геномные технологии как предмет правового регулирования в публичных отраслях права: коллизии, проблемы и пути их решения за рубежом.

Ю.А. Петушкова, П.А. Каменский 52

Токсокароз. Особенности диагностики и профилактики.

О.Б. Жданова, С.В. Аббасова, Л.А. Написанова, Е.С. Ключкина, И.И. Окулова, О.В. Часовских,

С.П. Ашихмин, А.Г. Мешандин, В.С. Болдырев, Я.Д. Сеина 60

История и перспективы использования холерных бактериофагов в терапии и профилактике холеры.

А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Кочеткова 66

Страницы истории

К 150-летию со дня рождения биохимика Фебуса Левина — ученика И.П. Павлова и А.П. Бородина.

В.С. Воробьев 72

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 4

Original articles

Zooplankton of rivers in the area of the Baltic NPP under construction.
D.V. Kulakov 5

Pancreatic hydrolysis of coniferous lipids for transformation into liquid biofuel. Kinetics.
V.S. Boldyrev, A.N. Ivankin, A.N. Zarubina, A.N. Zenkin, Ya.D. Seina 14

Mathematical modeling of the work of an enzyme biofuel element in cerebrospinal fluid.
M.V. Vishnevskaya, P.M. Gotovtsev, Yu.M. Parunova, D.A. Gazizova, R.G. Vasilov 19

The influence of hydrochemical indicators of the Don and Temernik rivers water for the detection of cholera vibrios.
D.A. Levchenko, E.A. Men'shikova, E.M. Kurbatova, S.V. Titova, V.D. Kruglikov, I.V. Arkhangelskaya, M.V. Rengach 25

Determination of the desorption index of cholera vibrios of various serogroups and toxigenicity in biofilm on chitinous carapace of crayfish.l,
E.A. Men'shikova, E.M. Kurbatova, S.O. Vodopyanov, S.V. Titova, A.V. Mironova 32

Influence of «Zoonorm» and «Vetom 4» probiotics on morphofunctional and biochemical indicators of blood of chicken-broilers.
S.V. Sidorenko, G.F. Ryzhkova 35

Reviews

Modern views on the microbial diversity of the skin.
A.Yu. Shatalova, E.S. Bulygina, T.N. Gaeva, N.V. Slobodova, C.M. Rastorguev, S.V. Tsygankova, F.S. Sharko, R.G. Vasilov 39

Genetic technologies as a subject of legal regulation in the public branches of law: legal collision, challenges and solutions in foreign countries.
Yu.A. Petushkova, P.A. Kamenskiy 52

Toxocarosis. Features of diagnostics and preventive maintenance.
O.B. Zhdanova, S.V. Abbasova, L.A. Napisanova, E.S. Kliukina, I.I. Okulova, O.V. Chasovskih, S.P. Ashihmin, A.G. Meshandin, V.S. Boldyrev, Ya.D. Seina 60

The history and prospects of using cholera bacteriophages in the treatment and prevention of cholera.
A.V. Tyurina, N.E. Gaevskaya, M.P. Pogozhova, A.O. Kochetkova 66

Pages of history

On the 150th anniversary of the birth of the biochemist Febus Levin, the student of I.P. Pavlov and A.P. Borodin.
V.S. Vorobyev 72

Rules for authors 78

К читателям

Третий номер журнала за 2019 год открывается обстоятельной статьей Кулакова Д.В. «Зоопланктон рек в районе строящейся Балтийской АЭС» (Институт геоэкологии им. Е.М. Сергеева РАН, Санкт-Петербургский государственный университет). На протяжении 6 лет был осуществлен комплексный мониторинг с целью всесторонней биоиндикации фонового уровня видового разнообразия зоопланктона.

В работе Болдырева В.С. с коллегами из Московского государственного технического университета им. Н.Э. Баумана был изучен панкреатический гидролиз липидов хвойных пород для трансформации в жидкое топливо с акцентом на выяснение кинетики процесса.

Вишневская М.В. и др. (НИЦ «Курчатовский институт», Московский физико-технический институт) показали возможность математического моделирования работы ферментного биотопливного элемента в спинномозговой жидкости.

Левченко Д.А. с рядом сотрудников Ростовского-на-Дону противочумного института изложили результаты мониторинговых исследований рек Дон и Темерник с целью выделения нетоксигенных штаммов холерных эмбрионов неO1/неO139 серогрупп, которые могут служить этиологическим фактором возникновения гастроэнтеритов у людей.

Меньшикова Е.А. и др. (Ростовский-на-Дону противочумный институт) разработали метод десорбции холерных вибрионов различных серогрупп и токсигенности в биопленке на хитиновом панцире речного рака.

Сотрудники Курской государственной сельскохозяйственной академии Сидоренко С.В., Рыжкова Г.Ф. изучили влияние пробиотиков «Зоонорм» и «Ветом 4» на морфофункциональные и биохимические показатели крови цыплят-бройлеров.

Шаталова А.Ю. вместе с группой исследователей НИЦ «Курчатовский институт» представили подробный обзор о микробном разнообразии кожи, имея в виду региональную специфику микробиоты, ее функциональную значимость и роль в патологии.

Среди других обзорных статей выделяется статья Петушковой Ю.А., Каменского П.А. (Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова), являющаяся экспертно-аналитическим исследованием геномных технологий как предмета правового регулирования в публичных отраслях права.

Жданова О.Б. и др. в составе большого коллектива из разных учреждений Москвы и Кирова подготовили высокопрофессиональный обзор токсокароза — актуального гельминтоза, имеющего социальное значение в связи с многочисленными контактами с домашними и дикими животными и экологическими загрязнениями.

Ростовские эпидемиологи (Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Кочеткова А.О.) собрали в своей обзорной статье уникальные данные об истории и перспективах использования холерных бактериофагов в терапии и профилактике холеры.

Наконец, в исторической рубрике помещен материал, посвященный 150-летию со дня рождения биохимика Фебуса Левина — ученика И.П. Павлова и А.П. Бородина.

Главный редактор,
президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ

ЗООПЛАНКТОН РЕК В РАЙОНЕ СТРОЯЩЕЙСЯ БАЛТИЙСКОЙ АЭС

Д.В. КУЛАКОВ*

ФГБУН Институт геоэкологии им. Е.М. Сергеева Российской академии наук,
Санкт-Петербургское отделение, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет

В 2012–2018 гг. в связи со строительством Балтийской АЭС (БтАЭС), в рамках комплексного мониторинга исследовался зоопланктон и была выполнена оценка качества вод рек Неман, Шешупе, Юра, Тыльжа и Инстроч, относящихся к водосборному бассейну Балтийского моря. На р. Неман станции отбора проб размещались в верхнем, среднем и нижнем течении, на остальных водотоках отбор проб осуществлялся в 30 км зоне БтАЭС. В зоопланктоне рек было зарегистрировано 96 таксонов видового и подвигового рангов (в р. Неман — 83, в р. Шешупе — 57, в р. Юра — 42, в р. Тыльжа — 49, в р. Инстроч — 47 видов и подвигов). Основу зоопланктоценоза составляли космополитные и широко распространенные в Голарктике виды. Во всех реках максимальное таксономическое богатство зоопланктона регистрировалось в 2016 году, наибольшим количеством видов были представлены *Rotifera*. В сезонной динамике таксономической структуры сообщества от весеннего периода к осеннему в реках Неман, Шешупе и Юра наблюдалось сокращение доли *Rotifera* и увеличение доли *Cladocera*. В реках Тыльжа и Инстроч в летний период сокращалась доля *Rotifera* за счет увеличения доли *Cladocera*. Во всех исследованных реках в многолетнем ряду наблюдений прослеживались тенденция ухудшения качества вод и повышение их трофического статуса. Происходило увеличение численности и биомассы зоопланктона на фоне снижения значений индекса видового разнообразия, массово развивались коловратки, сокращалась доля численности и биомассы ракообразных.

Ключевые слова: Балтийская АЭС, зоопланктон, биоиндикация, река, оценка качества вод.

Введение

В районе размещения строительной площадки Балтийской атомной электростанции (БтАЭС), расположенной в Калининградской области, наиболее значимой является р. Неман с притоками Шешупе, Юра и Тыльжа, а также р. Инстроч, принадлежащая к бассейну р. Преголя. Водотоки относятся к типу равнинных рек со смешанным водным питанием [2, 4]. По солевому составу воды рек гидрокарбонатно-кальциевые, со средней минерализацией 0,4–0,5 г/дм³, значения рН близки к 8,2. Концентрация соединений фосфора и азота подвержена значительным сезонным колебаниям [4]. Водный режим рек характеризуется весенним половодьем, относительно низкой летней и зимней меженью и осенними паводками [3, 10]. В настоящее время в водотоках наблюдаются процессы эвтрофирования в

связи с повышенным поступлением биогенных веществ [5, 6], источником которых, вероятно, служит сток атмосферных осадков с водосборов, а также стоки бытовой и промышленной канализации городов, расположенных на реках [12, 13]. В будущем также планируется использование р. Неман в качестве приемника сбросных вод с градирен БтАЭС, что может привести к изменению условий существования гидробионтов. В связи с этим в настоящее время актуально изучение состояния речных экосистем, в частности, изучение зоопланктона — одного из важнейших компонентов водной биоты, что позволит использовать в последующем характеристики гидробиоценоза для оценки возможных изменений в водотоках и разработать мероприятия по снижению и компенсации ущерба водным биоресурсам при эксплуатации атомной электростанции.

Цель работы — изучение зоопланктона и оценка качества воды рек, расположенных в районе строящейся БтАЭС.

Материалы и методы

Исследования зоопланктона выполнялись в период с 2012 по 2018 гг. в рамках комплексного экологического мониторинга [5, 6, 7]. Пробы отбирались в мае, июне и

© 2019 г. Кулаков Д.В.

* Автор для переписки:

Кулаков Дмитрий Владимирович

канд. биол. наук, научный сотрудник Санкт-Петербургского отделения Института геоэкологии им. Е.М. Сергеева Российской академии наук (СПбО ИГЭ РАН), главный специалист Санкт-Петербургского государственного университета (СПбГУ)

E-mail: dvkulakov@mail.ru

сентябре, за исключением 2012 г., когда отбор проб был осуществлен только на территории Калининградской области в мае и сентябре. Станции (ст.) отбора проб располагались в прибрежной части реки Неман (ст. 1–13), Шешупе (ст. 14, 15), Юра (ст. 16), Тыльжа (ст. 17) и Инструч (ст. 18) (рис. 1).

На р. Неман станции размещались в верхнем (ст. 1, 2), среднем (ст. 3, 4) и нижнем течении реки (ст. 5–13). Станция 8 соответствовала расположению проектируемого выпуска сбросных вод БтАЭС. Гидрологические характеристики исследованных рек представлены в таблице 1 [3, 4].



Рис. 1. Расположения станций отбора проб на территории трех государств (А) и в районе 30 км зоны БтАЭС

Таблица 1
Гидрологические характеристики исследованных рек [3, 4]

Река	Длина, км	Площадь водосбора, км ²	Среднегодовой расход воды, м ³ /с
Неман	937	98200	678
Шешупе	298	6104,8	33,2
Юра	177	3990	20,1
Тыльжа	44	207	Нет данных
Инструч	101	1250	8,8

Отбор, обработка и анализ проб осуществлялись по общепринятым методикам [8] с использованием соответствующих определителей [2, 11]. Пробы брались путем фильтрования 50–100 л воды через планктонную сеть Джели с размером ячеек 64 мкм, фиксировались этиловым спиртом крепостью 70°. Всего было собрано, обработано и проанализировано 327 проб. Зоопланктон оценивался по видовому составу, численности, биомассе, доле таксономических групп от общей численности и биомассы сообщества. Для оценки качества воды применялся фаунистический коэффициент трофности [9] и индекс сапробности Пантле и Букка в модификации Сладечека [15]. Видовое разнообразие сообществ определялось по информационному индексу Шеннона – Уивера [14]. Для

количества видов, численности и биомассы зоопланктона рассчитывали среднее арифметическое и ошибку среднего за каждый год исследований. Доминирующие виды выделялись по относительной численности и биомассе, принимая за нижнюю границу доминирования обилие $\geq 10\%$ от суммарного количества.

Результаты и обсуждение

В зоопланктоне исследованных рек было зарегистрировано 96 таксонов видового и подвидового рангов (табл. 2), среди которых колероваток (*Rotifera*) – 43, веслоногих ракообразных (*Copepoda*) – 15, ветвистоусых ракообразных (*Cladocera*) – 37 видов и подвидов. Из них в р. Неман встречалось 83, в р. Шешупе – 57, в р. Юра – 42, в р. Тыльжа – 49, в р. Инструч – 47 видов и подвидов. Всесветное распространение имели 59,1% видов, к числу широко распространенных в Голарктике принадлежало 22,6% видов, доля палеарктических видов составляла 11,8%, европейских – 6,5%. Во всех исследованных водотоках наибольшего таксономического богатства зоопланктон достигал в 2016 году (табл. 4).

В р. Неман количество видов зоопланктона в среднем на одну пробу составляло от 7 до 13, численность достигала максимума в 2016–2018 гг., наибольшие зна-

чения биомассы обнаруживались в 2017 и 2018 гг. (см. табл. 4). В весенние и летние периоды регистрировалось наибольшее таксономическое богатство зоопланктона (табл. 3). Численность и биомасса достигали максималь-

ных значений в весенний период в нижнем течении реки, летом и осенью — в среднем течении. Минимальные количественные показатели зоопланктона были характерны для верхнего течения.

Таблица 2

Таксономический состав зоопланктона рек в районе БтАЭС

Таксон	1	2	3	4	5
Коловратки (<i>Rotifera</i>)					
<i>Asplanchna priodonta</i> Gosse	+	+	+	+	+
<i>Brachionus angularis</i> Gosse	+	+	+	+	+
<i>B. budapestinensis</i> Daday	+	—	—	—	—
<i>B. calyciflorus</i> Pallas	+	+	+	—	+
<i>B. c. amphiceros</i> Ehrenberg	+	—	+	—	—
<i>B. c. spinosus</i> Wierzejski	+	—	+	—	+
<i>B. diversicornis</i> (Daday)	+	—	—	—	—
<i>B. leydigii rotundus</i> Rousselet	+	+	+	—	—
<i>B. l. tridentatus</i> Zernov	+	—	—	—	—
<i>B. quadridentatus</i> Hermann	+	+	—	—	—
<i>B. qu. ancylognathus</i> Schmarda	+	+	—	—	—
<i>B. qu. cluniorbicularis</i> Skorikov	+	+	+	+	+
<i>B. urceus</i> (Linnaeus)	+	+	—	+	+
<i>Eosphora ehrenbergi</i> Weber	+	—	—	—	—
<i>Eothinia elongata</i> (Ehrenberg)	+	+	+	+	+
<i>Euchlanis dilatata</i> Ehrenberg	+	+	+	+	+
<i>Eu. triquetra</i> Ehrenberg	—	—	+	—	—
<i>Filinia longiseta</i> (Ehrenberg)	+	+	+	+	+
<i>F. maior</i> Colditz	+	+	—	—	—
<i>Kellicottia longispina</i> Kellicott	+	+	+	+	+
<i>Keratella cochlearis</i> Carlin	+	+	+	+	+
<i>K. c. tecta</i> (Gosse)	+	+	—	+	+
<i>K. quadrata</i> O.F. Müller	+	+	+	+	+
<i>K. ticinensis</i> (Callerio)	—	—	—	—	+
<i>Lecane bulla</i> (Gosse)	+	+	+	—	+
<i>L. luna</i> (O.F. Müller)	+	+	+	+	—
<i>L. lunaris</i> (Ehrenberg)	+	+	+	+	—
<i>Monommata grandis</i> Tessin	—	—	—	+	—
<i>Mytilina ventralis</i> (Ehrenberg)	+	+	—	—	+
<i>Notholca acuminata</i> (Ehrenberg)	+	+	+	+	+
<i>N. squamula</i> (O.F. Müller)	+	+	—	—	—
<i>Platygaster patulus</i> (O.F. Müller)	+	—	—	—	—
<i>P. quadricornis</i> Ehrenberg	+	+	+	+	+
<i>Polyarthra dolichoptera</i> Jdelson	+	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i> Carlin	+	—	—	—	+
<i>Rotaria rotatoria</i> Pallas	+	—	—	—	—
<i>Synchaeta pectinata</i> (Ehrenberg)	+	+	+	+	—
<i>S. stylata</i> Wierzejski	—	—	—	+	+
<i>Testudinella patina</i> (Hermann)	+	+	—	+	+
<i>Trichocerca capucina</i> (Wierzejski & Zacharias)	+	—	—	—	—
<i>T. cylindrica</i> (Imhof)	—	—	—	+	—
<i>T. pusilla</i> (Lauterborn)	—	+	—	—	+
<i>Trichotria pocillum</i> (O.F. Müller)	+	+	+	+	+
Веслоногие ракообразные (<i>Copepoda</i>)					
<i>Acanthocyclops viridis</i> (Jurine)	—	—	—	+	+
<i>Cyclops scutifer</i> G.O. Sars	+	—	—	—	+
<i>C. strenuus</i> Fischer	+	—	+	+	—
<i>C. vicinus</i> Ulyanin	+	+	+	+	+
<i>Eucyclops macrurus</i> (G.O. Sars)	+	+	—	+	+
<i>Eu. serrulatus</i> Fischer	+	+	+	+	+
<i>Eudiaptomus gracilis</i> G.O. Sars	+	+	—	—	—
<i>Eu. graciloides</i> Lilljeborg	+	+	—	—	—
<i>Eurytemora lacustris</i> (Poppe)	+	—	—	+	—
<i>Macrocyclus albidus</i> Jurine	+	+	+	+	+
<i>Mesocyclus leuckarti</i> Claus	+	—	—	+	—

Таксон	1	2	3	4	5
<i>Paracyclops affinis</i> G.O. Sars	+	–	+	+	–
<i>P. fimbriatus</i> Fischer	+	+	–	+	+
<i>Thermocyclops crassus</i> Fischer	–	–	+	–	–
<i>T. oithonoides</i> G.O. Sars	+	+	+	+	+
Ветвистоусые ракообразные (Cladocera)					
<i>Acroperus harpae</i> (Baird)	+	+	+	+	+
<i>Alona quadrangularis</i> (O.F. Müller)	+	+	–	–	–
<i>Al. rectangula</i> (G.O. Sars)	+	+	+	+	+
<i>Alonella exigua</i> (Lilljeborg)	+	–	+	–	–
<i>Al. nana</i> (Baird)	+	+	+	+	–
<i>Biapertura affinis</i> (Leydig)	+	–	–	–	–
<i>Bosmina coregoni</i> (Baird)	+	–	–	–	–
<i>B. crassicornis</i> (Lilljeborg)	+	–	–	–	–
<i>B. longirostris</i> (O.F. Müller)	+	+	+	+	+
<i>B. longispina</i> (Leydig)	+	–	–	–	–
<i>Ceriodaphnia affinis</i> Lilljeborg	–	+	–	+	–
<i>C. pulchella</i> G.O. Sars	+	+	+	+	+
<i>C. reticulata</i> Jurine	–	–	–	+	+
<i>Chydorus ovalis</i> Kurz	–	–	–	+	–
<i>Ch. sphaericus</i> (O.F. Müller)	+	+	+	+	+
<i>Daphnia cristata</i> G.O. Sars	+	–	–	–	–
<i>D. cucullata</i> G.O. Sars	+	+	–	–	–
<i>D. galeata</i> G.O. Sars	+	+	–	–	–
<i>D. longispina</i> (O.F. Müller)	+	+	–	+	–
<i>Diaphanosoma brachyurum</i> (Lievin)	+	+	–	–	+
<i>Eurycercus lamellatus</i> (O. F. Müller)	+	–	+	+	+
<i>Graptoleberis testudinaria</i> Fischer	+	+	+	–	+
<i>Ilyocryptus agilis</i> Kurz	+	–	–	–	–
<i>Il. sordidus</i> Lievin	+	–	–	–	–
<i>Lathonura rectirostris</i> (O.F. Müller)	+	–	–	+	+
<i>Leptodora kindtii</i> (Focke)	+	–	–	–	–
<i>Leydigia leydigi</i> Schoedler	+	–	–	–	–
<i>Macrothrix rosea</i> (Jurine)	+	+	–	+	–
<i>Moina macrocopa</i> (Straus)	+	–	–	–	–
<i>M. rectirostris</i> (Leydig)	–	–	–	+	–
<i>Pleuroxus aduncus</i> Jurine	+	+	+	+	+
<i>P. striatus</i> Schoedler	+	+	–	–	+
<i>P. truncatus</i> (O.F. Müller)	+	+	–	–	+
<i>Polyphemus pediculus</i> (Linnaeus)	+	+	+	–	–
<i>Scapholeberis mucronata</i> O.F. Müller	+	+	+	–	+
<i>Sida crystallina</i> (O.F. Müller)	+	+	–	–	–
<i>Simocephalus vetulus</i> (O.F. Müller)	+	+	+	+	+
Всего Rotifera	37	28	22	22	24
Всего Copepoda	13	8	7	11	8
Всего Cladocera	33	21	13	16	15
Сумма	83	57	42	49	47

Примечание: 1 – р. Неман, 2 – р. Шешупе, 3 – р. Юра, 4 – р. Тыльжа, 5 – р. Инструч.

Таблица 3

Сезонная динамика показателей зоопланктона р. Неман

Участок реки	Количество видов в пробе			Численность (тыс. экз./м ³)			Биомасса (г/м ³)		
	V	VI	IX	V	VI	IX	V	VI	IX
Нижнее течение	14	11	6	49,7±10,9	11,0±2,8	0,8±0,1	0,227±0,043	0,165±0,047	0,009±0,001
Среднее течение	12	12	6	13,0±6,1	24,3±10,7	6,0±4,6	0,031±0,009	0,499±0,396	0,036±0,020
Верхнее течение	–	8	5	–	2,6±0,8	0,9±0,5	–	0,012±0,003	0,017±0,012

Примечание: прочерк – исследования не проводились, V – май, VI – июнь, IX – сентябрь

По численности и биомассе ежегодно доминировали коловратки *Euchlanis dilatata* и копеподиты циклопов, в комплекс доминирующих по численности видов также входили коловратки *Keratella cochlearis*, *K. quadrata*. Кроме того, в разные периоды исследований в комплекс доминирующих по численности видов входили *Polyarthra dolichoptera*, *Brachionus quadridentatus*, *Daphnia cristata*, *D. cucullata*, *Bosmina longirostris*, *Chydorus sphaericus*, *Asplanchna priodonta*, *Synchaeta pectinata*, *Brachionus angularis*, *B. leydigii rotundus* и *Rotaria rotatoria*.

По биомассе в разные годы исследований доминировали *Daphnia cucullata*, *Bosmina longirostris*, *Chydorus sphaericus*, *Asplanchna priodonta*, *Eudiaptomus graciloides*, *Diaphanosoma brachyurum*, *Alona rectangula*, *Daphnia cristata*, *Cyclops vicinus*, *Macrocyclus albidus*, *Brachionus quadridentatus*, *Synchaeta pectinata*, *Thermocyclops oithonoides* и *Brachionus leydigii rotundus*.

В р. Шешупе в среднем в одной пробе обнаруживалось от 5 до 13 видов зоопланктона. Численность и биомасса планктонных беспозвоночных достигали максимальных значений в 2016 г. (см. табл. 4), когда по сравнению с предыдущими периодами исследований численность возростала в 34 раза. Это происходило за счет массового развития мелких коловраток *Keratella cochlearis*, не вносящих ощутимого вклада в общую биомассу; поэтому биомасса зоопланктона увеличивалась в среднем только в 4 раза.

Наибольшее количество видов зоопланктона обнаруживалось в весенние периоды — в среднем до 11 видов в пробе, летом количество видов снижалось до 8, а осенью — до 7. Численность и биомасса планктонных беспозвоночных также достигали максимальных значений весной (соответственно $106,4 \pm 51,9$ тыс. экз./м³ и $0,177 \pm 0,071$ г/м³).

Таблица 4

Межгодовая динамика показателей зоопланктона рек в районе БтАЭС

Объект	Год исследований	Количество видов в пробе	Численность (тыс. экз./м ³)	Биомасса (г/м ³)	Индекс Шеннона – Уивера		Коэффициент трофности	Индекс сапробности
					бит/экз.	бит/г		
р. Неман	2012	8	6,2±2,5	0,022±0,012	1,9±0,2	2,0±0,2	6,8±1,8	1,6±0,0
	2013	8	2,2±0,6	0,025±0,006	2,5±0,1	2,0±0,1	6,2±1,1	1,6±0,0
	2014	7	10,6±3,3	0,128±0,040	2,3±0,1	1,9±0,1	10,4±2,1	1,6±0,0
	2015	8	10,7±2,7	0,081±0,022	2,5±0,1	1,9±0,1	8,2±1,3	1,6±0,0
	2016	13	30,4±10,3	0,088±0,022	2,5±0,1	2,5±0,1	19,0±3,5	1,6±0,0
	2017	11	20,9±5,6	0,344±0,136	2,5±0,1	1,9±0,1	7,7±1,4	1,6±0,0
р. Шешупе	2012	5	1,4±0,4	0,004±0,002	1,9±0,6	1,6±0,5	7,1±3,3	1,5±0,0
	2013	7	1,1±0,4	0,022±0,018	2,3±0,3	1,8±0,2	3,0±1,1	1,6±0,1
	2014	8	3,1±1,0	0,076±0,064	2,2±0,3	2,2±0,2	4,3±2,4	1,7±0,1
	2015	8	6,6±2,4	0,106±0,061	2,0±0,2	1,9±0,2	4,7±2,3	1,5±0,0
	2016	13	103,9±66,0	0,203±0,093	2,3±0,2	1,9±0,1	10,8±2,4	1,7±0,1
	2017	9	15,8±9,2	0,087±0,031	2,1±0,2	1,8±0,2	6,4±3,0	1,5±0,0
	2018	7	2,6±0,9	0,080±0,037	2,1±0,2	1,5±0,1	3,8±0,9	1,5±0,0
р. Юра	2013	7	1,1±0,7	0,008±0,002	2,6±0,2	1,5±0,4	6,1±4,5	1,5±0,1
	2014	8	3,2±1,4	0,110±0,077	2,9±0,1	2,2±0,2	3,1±2,4	1,6±0,1
	2015	7	2,8±1,8	0,160±0,152	1,9±0,7	1,8±0,4	4,8±3,6	1,5±0,0
	2016	11	7,5±3,6	0,035±0,018	2,1±0,2	2,1±0,2	5,7±2,0	1,5±0,0
	2017	11	4,7±3,8	0,071±0,058	2,8±0,4	2,2±0,1	7,9±6,6	1,6±0,1
	2018	7	37,5±35,0	0,136±0,130	1,1±0,4	1,0±0,4	7,3±5,3	1,5±0,1
р. Тьльжа	2012	12	2,9±0,1	0,067±0,026	2,8±0,1	2,0±0,2	3,3±0,3	1,5±0,1
	2013	5	0,2±0,0	0,002±0,001	2,0±0,6	1,9±0,5	0,3±0,2	1,8±0,2
	2014	9	26,9±19,2	0,572±0,311	1,9±0,3	1,8±0,5	2,4±1,2	1,8±0,1
	2015	8	11,7±2,1	0,237±0,222	1,3±0,2	1,5±0,7	4,8±3,2	1,6±0,1
	2016	9	77,8±57,6	1,246±1,153	1,6±0,4	1,8±0,4	2,9±0,3	1,5±0,1
	2017	5	1,9±1,6	0,007±0,005	1,8±0,3	1,5±0,6	6,2±4,9	1,6±0,1
	2018	7	12,7±6,5	0,118±0,099	1,3±1,2	1,3±1,2	9,8±0,0	1,5±0,1

р. Инструч	2012	6	0,8±0,6	0,015±0,012	2,1±0,3	1,7±0,3	1,3±0,1	1,6±0,0
	2013	7	2,4±1,1	0,044±0,022	2,5±0,2	2,1±0,2	1,3±0,4	1,6±0,0
	2014	11	6,0±1,3	0,129±0,060	2,7±0,3	2,8±0,3	3,8±3,4	1,6±0,0
	2015	9	6,1±1,0	0,149±0,069	2,4±0,2	1,9±0,4	4,3±3,9	1,6±0,1
	2016	12	7,8±3,3	0,209±0,114	2,4±0,3	2,0±0,3	5,8±3,2	1,5±0,0
	2017	6	4,4±1,8	0,049±0,014	2,2±0,3	1,4±0,2	6,0±4,0	1,6±0,0
	2018	9	3,2±0,9	0,074±0,026	2,7±0,1	2,3±0,3	3,6±1,9	1,6±0,0

По численности ежегодно доминировали коловратки *Euchlanis dilatata*. Кроме того, в разные годы наблюдений массового развития достигали *Keratella cochlearis*, *Brachionus quadridentatus*, *B. angularis*, *Acroperus harpae*, *Polyarthra dolichoptera*, *Bosmina longirostris*, *Chydorus sphaericus* и науплиусы веслоногих ракообразных. Среди доминирующих по биомассе видов во все годы наблюдений встречался рачок *Chydorus sphaericus*. В разные годы исследований по биомассе доминировали *Asplanchna priodonta*, *Euchlanis dilatata*, *Scapholeberis mucronata*, *Bosmina longirostris*, *Alona rectangula* и копепоидиты циклопов.

В р. Юра количество видов зоопланктона в среднем на одну пробу составляло от 7 до 11 (см. табл. 4). Наибольшие значения численности наблюдались в 2018 г., когда по сравнению с предыдущими годами исследований численность в среднем увеличивалась в 10 раз. Наибольшее количество видов зоопланктона было зарегистрировано весной — в среднем 11 видов в пробе, летом количество видов снижалось до 7, осенью увеличивалось до 8. Численность планктонных беспозвоночных достигала наибольших значений в весенний период — 21,4±17,3 тыс. экз./м³, биомасса была максимальна осенью — 0,120±0,067 г/м³.

Преобладающими по численности ежегодно были коловратки *Euchlanis dilatata*, науплиусы и копепоидиты циклопов. Кроме того, в разные годы исследований массового развития достигали *Keratella cochlearis*, *Alona rectangula*, *Bosmina longirostris* и *Polyarthra dolichoptera*. Основу биомассы зоопланктона в разные периоды наблюдений составляли *Alona rectangula*, *Bosmina longirostris*, *Simocephalus vetulus*, *Chydorus sphaericus*, а также копепоидиты веслоногих ракообразных.

В р. Тыльжа количество видов зоопланктона в среднем на одну пробу варьировало от 5 до 12 и имело тенденцию к снижению (см. табл. 4). Наименьшие значения численности и биомассы регистрировались в 2013 г., наибольшие — в 2016 г.

Наибольшее видовое богатство обнаруживалось в весенние периоды — 9 видов в пробе, летом наблюдалось снижение количества видов до 6, осенью — увеличение до 8. Численность и биомасса планктонных беспозво-

ночных достигали максимальных значений летом, составляя соответственно 49,346±36,988 тыс. экз./м³ и 0,954±0,712 г/м³.

Основу численности зоопланктона ежегодно составляли науплиусы веслоногих ракообразных. В разные периоды исследований массового развития достигали копепоидиты циклопов, *Chydorus sphaericus*, *Euchlanis dilatata*, *Ceriodaphnia pulchella*, *Polyarthra dolichoptera*, *Keratella cochlearis* и *K. quadrata*. Состав доминирующих по биомассе видов в многолетнем ряду наблюдений был непостоянен и разнообразен. В комплекс доминирующих по биомассе видов входили *Cyclops vicinus*, *Eucyclops macrurus*, *Eu. serrulatus*, *Daphnia longispina*, *Cyclops strenuus*, *Chydorus sphaericus*, *Ceriodaphnia pulchella*, *Daphnia longispina*, *Simocephalus vetulus*, *Euchlanis dilatata* и копепоидиты циклопов.

В р. Инструч среднее количество видов зоопланктона в пробе варьировало от 6 до 12. Наименьшие значения численности и биомассы регистрировались в 2012 году, в другие периоды наблюдений межгодовые различия в количественных показателях зоопланктона были незначительны (см. табл. 4). Среднее количество видов в пробе варьировало от 8 до 9. Численность и биомасса планктонных беспозвоночных достигали максимальных значений летом, составляя соответственно 6,8±1,9 тыс. экз./м³ и 0,151±0,065 г/м³.

Основной вклад в численность и биомассу сообщества вносили науплиусы и копепоидиты веслоногих ракообразных. В разные годы наблюдений по численности доминировали *Euchlanis dilatata*, *Macrocyclus albidus* и *Alona rectangula*. Ежегодно среди доминирующих по биомассе видов обнаруживался *Chydorus sphaericus*, не ежегодно по биомассе доминировали *Eucyclops macrurus*, *Cyclops vicinus*, *Macrocyclus albidus*, *Simocephalus vetulus* и *Graptoleberis testudinaria*.

В сезонной динамике таксономической структуры зоопланктона рек Неман, Шешупе и Юра наблюдалось сокращение доли численности и биомассы коловраток за счет увеличения доли ветвистоусых ракообразных (рис. 2).

В межгодовом ряду наблюдений в этих реках преобладающей по численности группой организмов были коловратки (в р. Неман — до 73,5±3,5%, в р. Шешупе

— до $69,3 \pm 10,0\%$, в р. Юра — до $79,1 \pm 4,7\%$), при этом их доля численности имела тенденцию к увеличению. Основной вклад в биомассу зоопланктона вносили ветви-

стоусые ракообразные (в р. Неман — до $57,9 \pm 4,4\%$, в р. Шешупе — до $72,6 \pm 7,6\%$, в р. Юра — до $82,2 \pm 6,1\%$) (рис. 3).

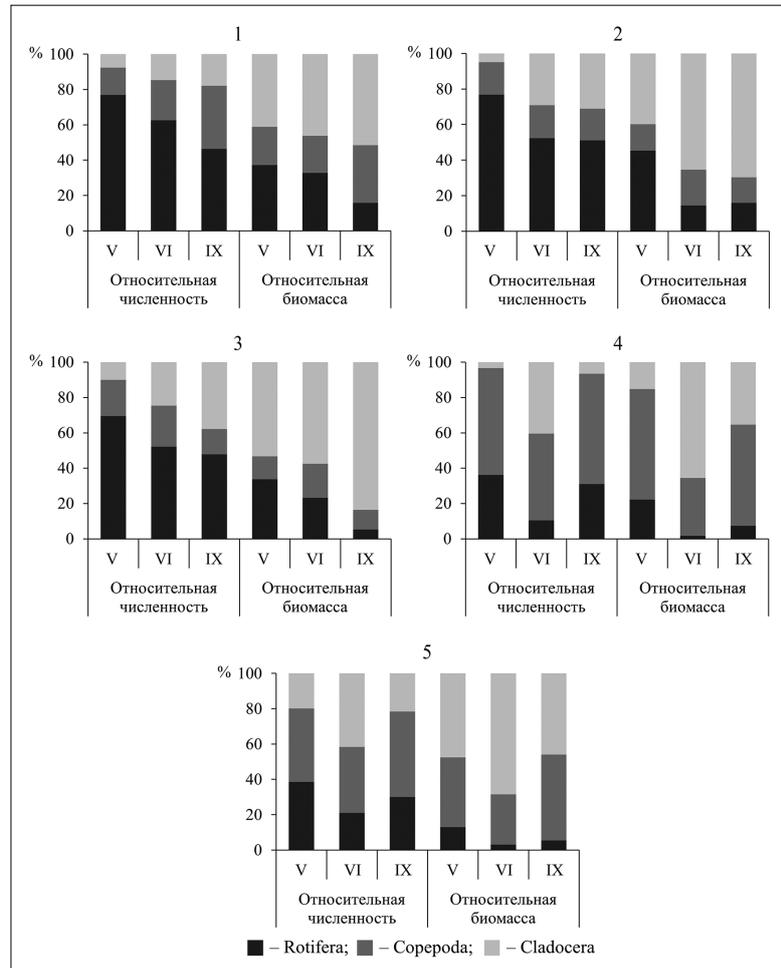


Рис. 2. Сезонная динамика таксономического состава зоопланктона р. Неман (1), р. Шешупе (2), р. Юра (3), р. Тьльжа (4), р. Инструч (5), V — май, VI — июнь, IX — сентябрь

В реках Тьльжа и Инструч сокращение доли численности и биомассы коловраток происходило в летний период, при этом доля ветвистоусых ракообразных в сообществе увеличивалась (см. рис. 2). В многолетнем ряду наблюдений в р. Тьльжа основу зоопланктона составляли веслоногие ракообразные ($53,5 \pm 17,3\%$ от общей численности и $48,0 \pm 22,5\%$ от общей биомассы), тем не менее прослеживалась тенденция увеличения доли численности и биомассы ветвистоусых ракообразных и коловраток.

В р. Инструч в течение семи лет исследований преобладающей по численности группой организмов также были веслоногие ракообразные ($41,2 \pm 11,0\%$). По биомассе эти организмы доминировали с 2012 по 2014 гг. ($53,6 \pm 14,3\%$), в последующие годы основной вклад в биомассу сообщества вносили ветвистоусые ракообразные ($61,0 \pm 11,2\%$). Доля численности и биомассы коловраток имела тенденцию к увеличению (см. рис. 3).

Средние значения индекса Шеннона — Уивера, рассчитанного по численности и биомассе зоопланктона, свидетельствовали о наибольшей выравненности сообщества в реках Неман и Инструч (2,4 бит/экз. и 2,1 бит/экз.), минимальные величины данного индекса зарегистрированы в р. Тьльжа (1,8 бит/экз. и 1,7 бит/экз.) (см. табл. 4). Трофический тип исследованных рек изменялся от эвтрофного до гиперэвтрофного, наибольшие значения коэффициента трофности регистрировались в р. Неман (9,4). В реках Неман и Шешупе значения коэффициента трофности достигали максимума в 2016 году, в остальных исследованных реках наблюдалась тенденция повышения трофического статуса вод в межгодовом ряду наблюдений. По показателям индекса сапробности водотоки относились к мезосапробной зоне — умеренно загрязненная вода (в среднем 1,6 баллов) (см. табл. 4).

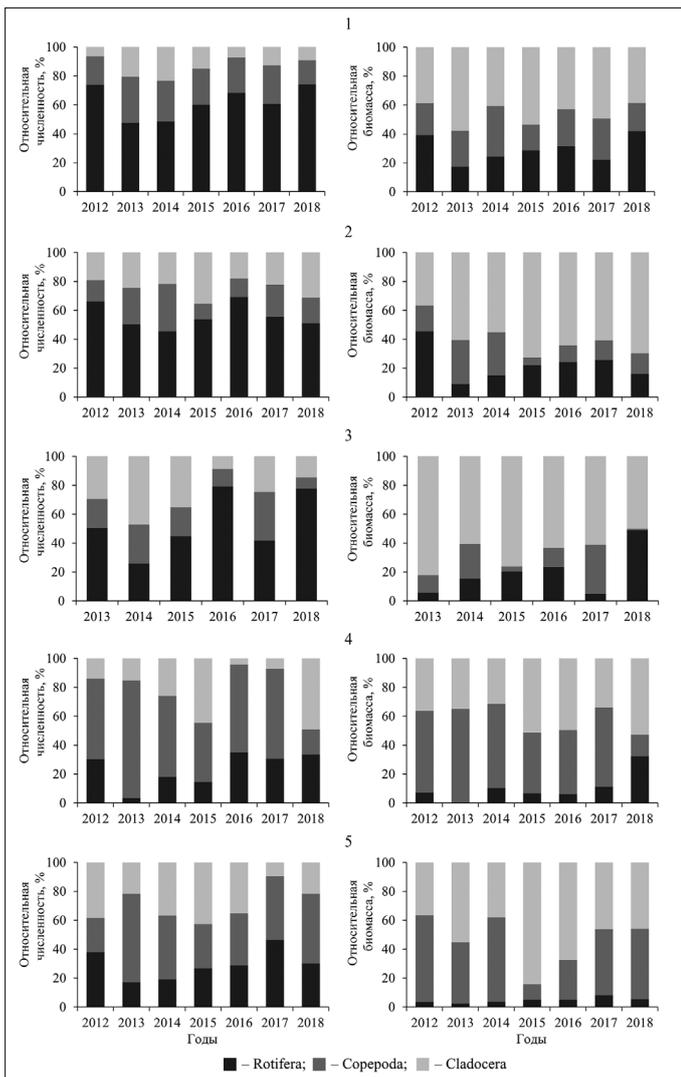


Рис. 3. Межгодовая динамика таксономического состава зоопланктона р. Неман (1), р. Шешупе (2), р. Юра (3), р. Тьльжа (4), р. Инструч (5)

Заключение

Зоопланктон исследованных водотоков был типичен для водоемов Северо-Запада России, представлен эврибионтными видами с высокой экологической пластичностью, имел бедный таксономический состав, а уровень количественного развития изменялся в зависимости от времени года.

В реках Неман и Шешупе максимальные значения численности и биомассы планктонных беспозвоночных были характерны для весенних периодов, что может быть связано с разливом рек во время паводка и образованием благоприятных условий для формирования временных сообществ зоопланктона в водах затопленной поймы. Преобладание организмов-индикаторов эвтрофных условий свидетельствовало

о повышенном уровне трофности этих водотоков. В летние и осенние периоды в водотоках наблюдалось значительное сокращение количественных показателей зоопланктона. Кроме того, в течение вегетационного периода в реках Неман, Юра и Шешупе происходило сокращение доли численности и биомассы коловраток за счет увеличения доли ветвистоусых ракообразных. Развитие этих беспозвоночных в р. Юра способствовало увеличению численности и биомассы зоопланктона в осенние периоды.

Зоопланктон рек Инструч и Тьльжа достигал максимального количественного развития летом, когда уровень воды снижался, а течение замедлялось, что способствовало формированию условий для развития крупных ракообразных, вносящих основной вклад в численность и биомассу зоопланктона.

Значения коэффициента трофности в весенние периоды характеризовали воды рек Неман, Юра и Шешупе как гиперэвтрофные, в летние и осенние периоды наблюдалось снижение трофического статуса вод. В реках Инструч и Тьльжа наименьшие значения коэффициента трофности регистрировались летом, в осенние периоды наблюдалось увеличение трофического статуса вод. Средние значения индекса сапробности в водотоках соответствовали β -мезосапробной зоне (умеренное загрязнение).

Работа поддержана проектом СПбГУ Pure ID 35626971.

Литература

1. Белов Н.С., Зотов С.И. Оценка гидроэкологического состояния речных систем Калининградской области // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки. — 2008. — № 1. — С. 6–16.
2. Боруцкий Е.В., Степанова Л.А., Кос М.С. Определитель *Calanoida* пресных вод СССР. — СПб: Наука, 1991. — 503 с.
3. Государственный Водный Кадастр. Многолетние данные о режиме и ресурсах поверхностных вод суши. Т. 8. Литовская ССР и Калининградская область РСФСР. — Л., Гидрометеиздат, 1987. — 88 с.
4. Государственный Водный Кадастр. Основные гидрологические характеристики. Т. 4. Прибалтийский район, Литовская ССР и Калининградская область РСФСР. — Л.: Гидрометеиздат, 1988. — 256 с.
5. Кулаков Д.В., Верещагина Е.А., Макушенко М.Е., Лунева Е.В. Зоопланктон и гидрохимические условия трансграничной реки Неман в период строительства Бал-

- тийской АЭС // Вода: химия и экология. — 2016. — № 6. — С. 46–55.
6. Кулаков Д.В., Макушенко М.Е., Верещагина Е.А., Лунева Е.В. Зоопланктон и зообентос р. Неман в районе строящейся Балтийской АЭС // Вода: химия и экология. — 2014. — № 11. — С. 70–76.
7. Кулаков Д.В. Сезонные и межгодовые изменения зоопланктона реки Неман // Принципы экологии. — 2018. — № 2. — С. 87–102.
8. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. — М.: Наука, 1975. — 240 с.
9. Мясметс А.Х. Изменения зоопланктона // Антропогенное воздействие на малые озера. — Л.: Наука, 1980. — С. 54–64.
10. Назорнова Н.Н., Берникова Т.А., Цупикова Н.А. Гидрогеохимическая характеристика малых рек Калининградской области // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки. — 2011. — № 7. — С. 160–166.
11. Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России. Т. 1. Зоопланктон. — М.: Тов-во научн. изд. КМК, 2010. — 495 с.
12. Ресурсы поверхностных вод СССР. Прибалтийский район, Литовская ССР и Калининградская область. — Л.: Гидрометеиздат, 1967. — Т. 4. — Вып. 3. — 507 с.
13. Рыбохозяйственный кадастр трансграничных водоемов России (Калининградская область) и Литвы. — Калининград: Изд-во «ИП Мишуткина», 2008. — 200 с.
14. Shannon C.E., Weaver W. The mathematical theory of communication. — Urbana, 1963. — 117 p.
15. Sladec̆ec V. System of water quality from the biological point of view // Arch. Hydrobiol. — 1973. — Vol. 7. — P. 1–218.

ZOOPLANKTON OF RIVERS IN THE AREA OF THE BALTIC NPP UNDER CONSTRUCTION

D.V. KULAKOV

*Sergeev Institute of Environmental Geoscience of RAS, St. Petersburg Division; St. Petersburg State University,
St. Petersburg*

In 2012–2018 in connection with the construction of the Baltic NPP zooplankton was studied as part of comprehensive monitoring, and the water quality assessment of the Neman, Sheshupe, Jura, Tylzha and Instruch rivers belonging to the Baltic Sea catchment area was assessed. On the river Neman sampling stations were located in the upper, middle and lower reaches; on the remaining watercourses, sampling was carried out in the 30 km zone of Baltic NPP. In the zooplankton of the rivers, 96 taxons of the species and subspecies ranks were registered (83 in the Neman River, 57 in the Sheshupe River, 42 in the Jura River, 49 in the Tylzha River, 47 in the Instruch River). The basis of zooplanktocenosis was cosmopolitan and widespread species in the Holarctic. In all the rivers the greatest taxonomic wealth of zooplankton was recorded in 2016, the largest number of species were represented by *Rotifera*. In the seasonal dynamics of the taxonomic structure of the community from spring to autumn in the Neman, Sheshupe and Jura rivers was observed a decrease in the share of *Rotifera* and an increase in the share of *Cladocera*. In the Tylzha and Instruch rivers, in the summer period, the *Rotifera* share was reduced due to an increase in the share of *Cladocera*. In all the studied rivers, a tendency of deterioration of water quality and an increase in their trophic status was observed in a long-term series of observations. An increase in the abundance and biomass of zooplankton took place against the background of a decrease in the values of the species diversity index, rotifers developed massively, and the proportion of crustacean abundance and biomass decreased.

Keywords: Baltic NPP, zooplankton, bioindication, river, water quality assessment.

ПАНКРЕАТИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ ЛИПИДОВ ХВОЙНЫХ ПОРОД ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ В ЖИДКОЕ БИОТОПЛИВО. КИНЕТИКА ПРОЦЕССА

В.С. БОЛДЫРЕВ*, А.Н. ИВАНКИН, А.Н. ЗАРУБИНА, А.Н. ЗЕНКИН, Я.Д. СЕИНА

ФГБОУ ВО «Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана
(Национальный исследовательский университет)», Москва

Изучен процесс гидролиза липидов таллового масла в присутствии панкреатической липазы. Показано, что эффективное высвобождение максимального количества свободных жирных кислот из липидной фракции таллового масла протекает при 45 °С в течение первых трех часов с дальнейшим преобладанием процесса переэтерификации. Определены основные кинетические параметры процесса: максимальное значение скорости гидролиза $V=1,1\pm 0,1$ мг жира/мл·мин; константа Михаэлиса $K_M^H=120\pm 18$ мг жира/мл; константа субстратного ингибирования $K_S=10,0\pm 0,6$ мг масла/мл, а также константа равновесия $K_P=310\pm 190$ мг масла/мл. Значение энергии активации гидролиза таллового масла панкреатической липазой составило $E_a=20,3\pm 1,8$ кДж/моль. Использованный кинетический подход может служить основой для дальнейшей химической трансформации природных жирных кислот в метиловые эфиры и их использования в качестве моторного биотоплива.

Ключевые слова: талловое масло, панкреатическая липаза, кинетика гидролиза.

Введение

Необходимость создания технологий получения альтернативных видов моторных топлив для технических устройств из возобновляемого сырья представляет сегодня известную проблему [4, 10]. Возможным источником получения таких продуктов могут выступать природные жирные кислоты, в частности, получаемые из таллового масла — малоиспользуемого продукта целлюлозно-бумажной промышленности [1, 13]. Данный вид сырья содержит связанные жирные кислоты, которые могут найти применение после получения в свободном виде в процессе образования алкиловых эфиров с целью их использования в виде жидкого биодизеля [5, 14]. Процесс трансформации масла в свободные жирные кислоты можно осуществлять ферментативным путем, однако кинетика данного процесса в литературе не описана.

Цель работы — исследование кинетики гидролиза природных липидов таллового масла панкреатической липазой.

Материалы и методы

В работе использовали соли, кислоты, гидроксиды, спирты, углеводороды отечественного производства квалификации ч.д.а. и х.ч.

В качестве объектов исследования использовали жирные кислоты (ЖК) таллового масла по ГОСТ 14845-79 с кислотным числом (КЧ) 10 мг КОН/г. Содержание ЖК в сырье по данным газохроматографического анализа (%): лауриновая C12:0 — 0,33; миристиновая C14:0 — 0,17; пальмитиновая C16:0 — 1,79; пальмитолеиновая C16:1 — 0,2; маргариновая C17:0 — 0,3; гептадеценовая C17:1 — 1,27; стеариновая C18:0 — 5,57; олеиновая C18:1n9c — 20,3; элаидиновая C18:1n9t — 2,6; линолевая C18:2n6 — 47,4; γ -линоленовая C18:3n6 — 8; α -линоленовая C18:3n3 — 3; нондекановая C19:0 — 0,05; гадолеиновая C20:1n9 — 0,5; арахидиновая C20:0 — 3,04; *цис*-8,11,14-эйкозатриеновая C20:3n6 — 0,23; *цис*-11,14,17-эйкозатриеновая C20:3n3 — 0,1; арахидиновая C20:4n6 — 0,2; эйкозапентаеновая C20:5n3 — 0,06; генэйкозановая C21:0 — 0,35; бегеновая C22:0 — 0,26; эруковая C22:1n9 — 0,14; *цис*-13,16,17-докозадиеновая C22:2 — 0,06; лигноцериновая C24:0 — 0,43.

В качестве ферментного препарата применяли панкреатическую липазу фирмы «Serva» (Германия) с молекулярной массой 50 кДа и удельной активностью 15 ед./мг [12].

© 2019 г. Болдырев В.С., Иванкин А.Н., Зарубина А.Н., Зенкин А.Н., Сеина Я.Д.

* Автор для переписки:

Болдырев Вениамин Станиславович

к.т.н., доцент кафедры химии МГТУ им. Н.Э. Баумана, ведущий инженер инженерингового центра «Автоматика и робототехника» МГТУ им. Н.Э. Баумана.

E-mail: boldyrev.v.s@bmstu.ru

Гидролиз проводили в термостатируемом реакторе с магнитной мешалкой при скорости перемешивания 150 об/мин, в объеме реакционной смеси 15 мл. Субстрат для гидролиза готовили диспергированием смеси ЖК таллового масла и гексана в соотношении 1:1, после чего в эмульсию добавляли дистиллированную воду. Концентрацию масла в смеси варьировали от 1,5 до 10%. Температуру гидролиза изменяли от 40 до 65 °С. Процесс контролировали по изменению кислотного числа, для чего в течение 1 ч реакции через каждые 15 мин и далее через каждые 30 мин из реакционной массы отбирали пробы, в которых определяли КЧ стандартным методом [7]. Расчет КЧ проводили по формуле: $KЧ = 5,611 \cdot V \cdot K / g$, где 5,611 — титр 0,1 М раствора КОН, V — количество раствора КОН, мл, пошедшее на титрование, K — поправка к титру, g — навеска таллового масла, г. Из полученных значений КЧ вычитали фоновые значения КЧ исходного жира. Статистическую обработку результатов проводили линейным методом наименьших квадратов.

При расчете параметров кинетического процесса основывались на значениях начальной скорости реакции, которую определяли по изменению величины КЧ в единицу времени, используя формулу Михаэлиса — Ментен [6]. Максимальное значение кислотного числа для ЖК таллового масла $KЧ_{\text{макс}}$ составляло 200 мг КОН/г.

Результаты и обсуждение

Процесс гидролитического распада липидного сырья зависит от условий ведения процесса. Из данных рисунка 1 видно, что оптимальное соотношение концентрации фермента к ЖК субстрата составляет 0,1:1.

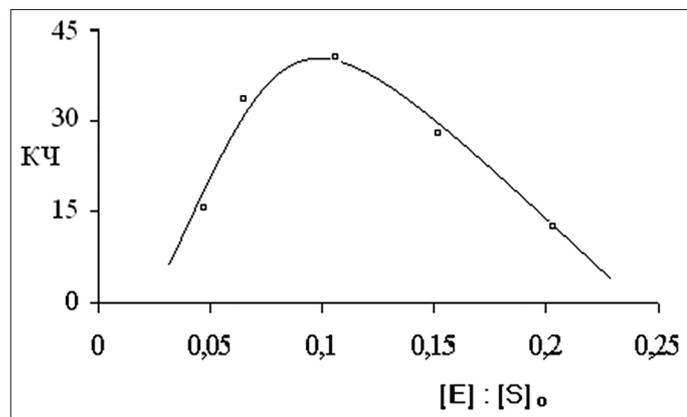


Рис. 1. Зависимость начальной скорости гидролиза ЖК таллового масла с концентрацией 1,5% в водно-гексановой 1:1 смеси, при 45 °С от соотношения количества фермента — панкреатической липазы (E) и субстрата (S, масло)

На рисунке 2 показано, что при увеличении концентрации масла в реакционной смеси наблюдается снижение скорости гидролиза, причем это проявлялось наиболее заметно после 4 ч гидролиза и при концентрациях субстрата более 7%; по-видимому, это связано с развитием процесса переэтерификации [2, 11].

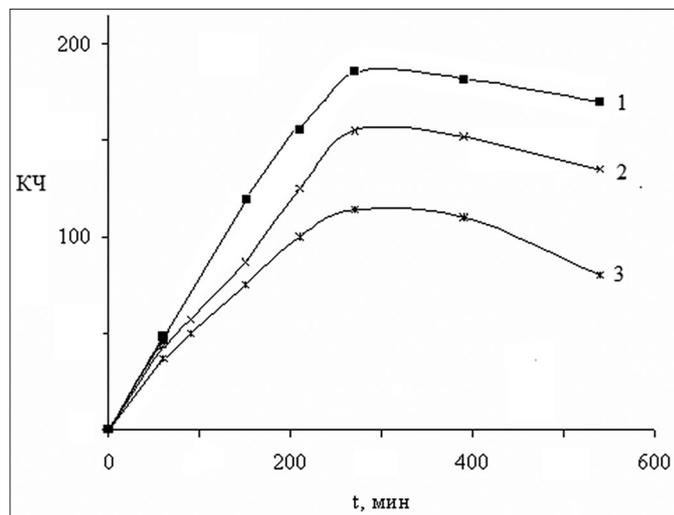
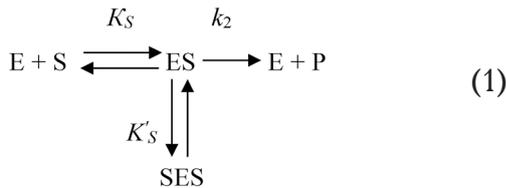


Рис. 2. Зависимость величины КЧ, мг КОН/г масла, от времени гидролиза при соотношении $[E]:[S]_0 = 1:20$ и значениях $[S]_0$: 1 — 15, 2 — 50, 3 — 100 мг масла/мл

Определение характера зависимостей начальных скоростей процесса гидролиза от концентрации продемонстрировало, что в интервале концентраций таллового масла от 10 до 30 мг/мл значения начальных скоростей были достаточно близкими. Это позволяет использовать уравнение Михаэлиса — Ментен для определения кинетических констант [3].

Линеаризация уравнения Михаэлиса — Ментен в координатах Лайнуивера — Берка позволила определить максимальную скорость процесса $V = 1,1 \pm 0,1$ мг масла/мл·мин и константу Михаэлиса $K_M^H = 120 \pm 18$ мг масла/мин при низких значениях концентраций. При высоких концентрациях субстрата определить кинетические константы классическими методами не удавалось, что связано с ингибированием ферментативной реакции большими концентрациями субстрата и обратимостью реакции гидролиза.

Для определения константы субстратного торможения (K'_S) была использована зависимость $(1/v)$ от $[S]_0$, которую количественно можно описать, исходя из предположения об образовании тройного комплекса $[SES]$ в следующей схеме, считая $K_M^H \approx K'_S$:



На основе анализа кинетической схемы (1) при установившемся равновесии можно написать уравнение для начальной скорости ферментативной реакции:

$$v = \frac{V \cdot [S]_0}{K^H + [S]_0 + [S]_0^2 / K'_S} \quad (2)$$

Линеаризовав зависимость (2), можно найти значение $K'_S = 10,0 \pm 0,6$ мг масла/мл.

Кривая зависимости скорости гидролиза от начальной концентрации субстрата $[S]_0$ приведена на рисунке 3 и описывается уравнением (3), которое получено делением числителя и знаменателя (2) на $[S]_0$:

$$v = V \frac{1}{1 + ([S]_0 \beta_1)^{-1} + [S]_0 \beta_2} \quad (3)$$

где V – скорость (v) при субстратном насыщении $\beta_1 = 1/K^H$, (мг масла /мл) $^{-1}$, $\beta_2 = 1/K'_S$ (мг масла/мл) $^{-1}$, а $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата (мг масла/мл).

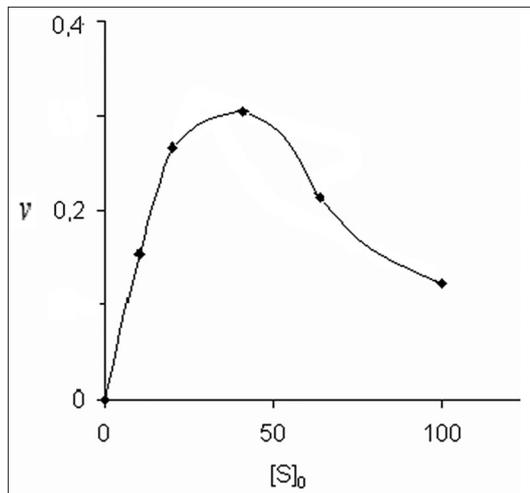


Рис. 3. Зависимость скорости гидролиза таллового масла (v , мг масла/мл·мин) от начальной концентрации субстрата $[S]_0$, С

Вид полученной кривой (см. рис. 3) с характерным экстремумом, соответствующим концентрации субстрата $[S]_{0\text{ макс}} = 35$ мг масла /мл, когда фермент проявляет свою максимальную активность и скорость гидролиза максимальна, подтверждает в определенной степени наличие

ингибирования исследуемой реакции высокими концентрациями субстрата.

Таким образом, получается, что в уравнении (3) для $[S]_0 < [S]_{0\text{ макс}}$ на восходящей ветви основную роль играет член $([S]_0 \beta_1)^{-1}$, а для $[S]_0 > [S]_{0\text{ макс}}$ на нисходящей ветви – член $[S]_0 \beta_2$, что свидетельствует об определенной возможности применения кинетической схемы (1) при низких значениях концентраций субстрата до 5%.

Для выяснения ферментативной активности тройного комплекса $[SES]$ экспериментальные данные были представлены в координатах (v , $\lg[S]_0$) (рис. 4).

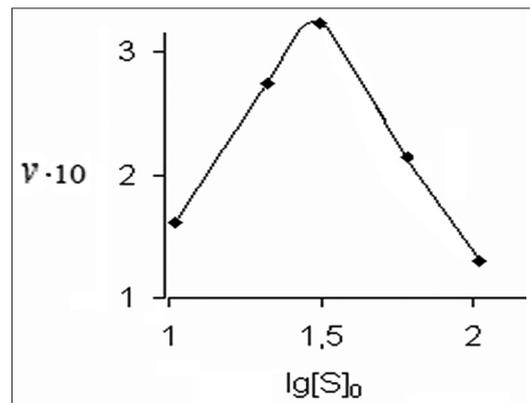


Рис. 4. Ферментативная активность комплекса $[SES]$ в координатах: v , мг масла/мл·мин – $\lg[S]_0$

Симметричный вид полученной колоколообразной кривой может свидетельствовать об отсутствии ферментативной активности у комплекса $[SES]$ [3].

Как известно, важным условием проведения любой каталитической реакции является достижение максимальной конверсии субстрата (X). По экспериментальным кривым, изображенным на рисунке 2, возможно провести расчет зависимости X от $[S]_0$ (рис. 5).

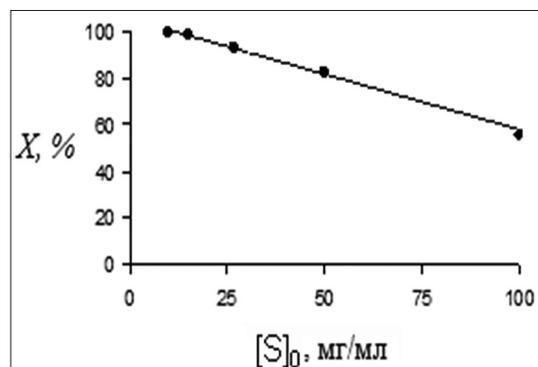


Рис. 5. Зависимости конверсии субстрата X от его начальной концентрации $[S]_0$

Процесс гидролитического расщепления таллового масла является обратимым. По закону действующих масс

была определена константа равновесия ферментативной реакции, условно считая, что при гидролизе таллового масла образуется $[S]_0 X$ ЖК и $[S]_0 X$ глицерина:

$$[S]_0(1-X) = [S]_0 X + [S]_0 X \quad (4)$$

талловое жирная глицерин
масло кислота

$$K_p = \frac{[S]_0 X^2}{1-X} \quad (5)$$

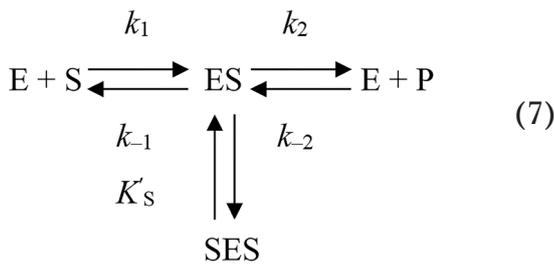
В этом случае константу равновесия данной реакции K_p можно представить в виде уравнения (5), на основании решения которого была определена константа равновесия данной реакции $K_p = 310 \pm 190$ мг масла/мл. Высокий доверительный интервал у K_p , составляющий более 50%, связан с наблюдавшимся фактом значительного уменьшения значений константы равновесия при увеличении концентрации масла в реакционной среде, более 5%.

Анализ значений основных кинетических констант исследуемого процесса: $V = 1,1 \pm 0,1$ мг масла /мл·мин; $K_M^H = 120 \pm 18$ мг масла /мл; $K'_S = 10,0 \pm 0,6$ мг масла /мл, $K_p = 310 \pm 190$ мг масла /мл, показывает, что наиболее существенный вклад в падение конверсии субстрата (X) в зависимости от его начальной концентрации $[S]_0$ вносит константа равновесия (K_p), которая более чем в 30 раз превышает K'_S и более чем 3 раза K_M^H .

Известно, что при динамическом равновесии общая скорость реакции равна нулю, то есть выражение для K_p в этом случае можно записать [9]:

$$K_p = k_1 k_2 / k_{-1} k_{-2}, \quad (6)$$

что соответствует кинетической схеме:



Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что основную роль в снижении величины X по мере увеличения $[S]_0$ играет k_{-2} . В определенной степени имеет место не только ингибирование реакции высокими концентрациями субстрата, но и реакция переэтерификации.

Определение скорости реакции гидролиза таллового масла панкреатической липазой установило, что она существенно зависит от температуры и для получения однозначных результатов необходим строгий контроль температуры реакции. В связи с этим была исследована

зависимость величины скорости гидролиза от температуры реакционной среды, что отображено на рисунке 6.

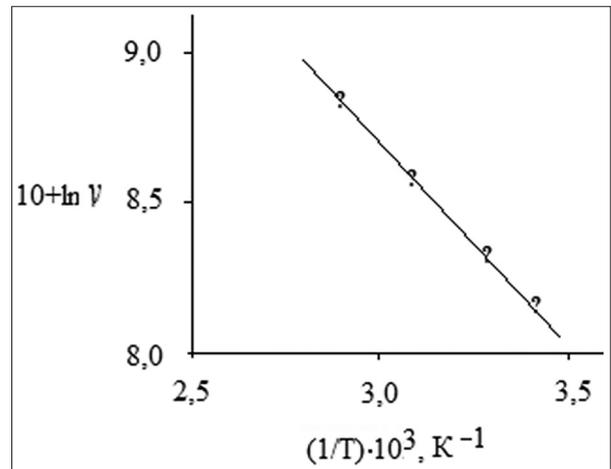


Рис. 6. Зависимости скорости гидролиза (v) от температуры

Как видно из рисунка 6, в исследуемом температурном интервале зависимость скорости реакции от температуры подчиняется уравнению Аррениуса:

$$v(T) = \tilde{v} V(T), \quad (8)$$

$$V(T) = \exp \left[-\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{\tilde{T}} \right) \right] \quad (9)$$

где: $\tilde{v} = V(\tilde{T})$ — значение скорости гидролиза при некоторой «стандартной» температуре \tilde{T} , E_a — энергия активации каталитической реакции, значение которой оказалось равным $E_a = 20,3 \pm 1,8$ кДж/моль.

Подстановка значения E_a в формулу (9) при стандартной температуре 313 К дает:

$$V(T) = \exp(7,5 - 2200/T) \quad (10)$$

Уравнение (10) справедливо для прямолинейного участка, то есть для $T \leq 333$ К.

В результате анализа вышеизложенных данных можно прийти к заключению, что при низких концентрациях субстрата, менее 30 мг/мл, в условиях стационарного состояния, когда $k_2 \gg k_{-2}$, процесс протекает в данных условиях с получением продуктов гидролиза и описывается классическим уравнением Михаэлиса — Ментен. При высоких концентрациях субстрата $[S]_0 > 30$ мг жира/мл, когда $k_{-2} \gg k_2$, возможен процесс ингибирования с параллельным протеканием переэтерификации. Гидролиз масла проводился в нейтральной среде при pH 6,0 без буферной системы, поэтому высокие концентрации субстрата скорее способствуют реакции переэтерификации,

чем ингибированию, учитывая высокую гидрофобность образующихся в процессе реакции свободных жирных кислот, имеющих существенно большее сродство к гексану и другим органическим средам, чем к воде.

Заключение

Проведенные исследования кинетики ферментативного расщепления таллового масла показывают, что имеется возможность биотехнического получения смеси природных жирных кислот из практически мало используемых отходов растительного происхождения [8, 9].

Выявленные кинетические закономерности протекающей реакции гидролиза таллового масла панкреатической липазой могут быть использованы для дальнейшего создания технологии химической трансформации полученных свободных жирных кислот растительного происхождения в алкиловые эфиры для их применения в качестве экологичного биотоплива технических устройств.

Литература

1. Владимирова Т.М., Третьяков С.И., Жабин В.И., Коптелов А.Е. Получение и переработка талловых продуктов. — Архангельск: Изд-во Арханг. гос. техн. ун-та, 2008. — 155 с.
2. Герман А.Б., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. Кинетика гидролиза животного жира панкреатической липазой // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38. — № 6. — С. 604–608.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М.: Мир, 1982. — Т. 1. — С. 82–290.
4. Иванкин А.Н., Болдырев В.С., Жилин Ю.Н., Олиференко Г.Л., Бабурина М.И., Куликовский А.В. Макрокинетическая трансформация природных липидов для получения моторного топлива // Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана. Серия Естественные науки. 2017. — № 5. — С. 95–108.
5. Иванкин А.Н., Куликовский А.В., Вострикова Н.Л., Чернуха И.М. Цис-, транс-конформационные изменения бактериальных жирных кислот в сравнении с аналогами животного и растительного происхождения // Прикладная биохимия и микробиология. — 2014. — Т. 50. — № 6. — С. 604–611.
6. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1990. — С. 112–129.
7. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. Анализ компонентов и микропримесей. — М.: ВНИИМП, 2001. — 402 с.
8. Рошковски А. Жидкие растительные топлива и окружающая среда // Коммунальное обозрение. — 1999. — № 6. — С. 97–102.
9. Ban T., Kawaizumi F., Nii S., Takahashi K. Effects of surface activities of extractants on drop coalescence and breakage in a mixer-settler // Ind. Eng. Chem. Res. — 2002. — Vol. 41. — P. 29–38.
10. Chou C.C., Tzeng P.S., Wang G.J., Su Y.H., Chiang C.J., Ku Y.Y. Numerical study of a turbo-charged common-rail diesel engine fueled with various biodiesel blends // Energy Procedia. — 2014. — Vol. 61. — P. 1146–1149.
11. Darnoko D., Cheruan M. Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor // J. Amer. Oil. Chem. Soc. — 2000. — Vol. 77(12). — P. 1263–1267.
12. Enzymes and related biochemicals. — Freehold: Worthington Biochem. Div., 1990. — 212 p.
13. Meher L.C., Sagar D.V., Naik S.N. Technical aspect of biodiesel production by transesterification. A review // Renewal and Sustainable Energy Reviews. — 2006. — Vol. 10(3). — P. 29–35.
14. Vedernikov D.N., Roshchin V.I. Extractive compounds of betulaceae family birch buds (*Betula pendula* Roth.). Composition of triterpene seco-acids // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. — 2012. — Vol. 38(7). — P. 762–768.

PANCREATIC HYDROLYSIS OF CONIFEROUS LIPIDS FOR TRANSFORMATION INTO LIQUID BIOFUEL. KINETICS

V.S. BOLDYREV, A.N. IVANKIN, A.N. ZARUBINA, A.N. ZENKIN, Ya.D. SEINA

Bauman Moscow State Technical University, Moscow

The process of hydrolysis of lipid tall oil (liquid rosin, tallol) in the presence of pancreatic lipase was studied. It was shown that the effective release of the maximum amount of free fatty acids from the lipid fraction of melt oil occurs at 45 °C for the first 3 hours with a further predominance of the transesterification process. The main kinetic parameters of the process were determined: the maximum value of the hydrolysis rate $V=1.1\pm 0.1$ mg of fat/ml·min; Michaelis constant $K_M^H=120\pm 18$ mg fat/ml; substrate inhibition constant $K'_S=10.0\pm 0.6$ mg oil/ml, as well as the equilibrium constant $K_p=310\pm 190$ mg oil/ml. The activation energy of tall oil hydrolysis by pancreatic lipase was $E_a=20.3\pm 1.8$ kJ/mol. The kinetic approach used can serve as the basis for the further chemical transformation of natural fatty acids into methyl esters and their use as motor biofuels.

Keywords: tall oil, pancreatic lipase, kinetics of hydrolysis.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РАБОТЫ ФЕРМЕНТНОГО БИОТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

М.В. ВИШНЕВСКАЯ^{1*}, П.М. ГОТОВЦЕВ¹, Ю.М. ПАРУНОВА¹,
Д.А. ГАЗИЗОВА^{1,2}, Р.Г. ВАСИЛОВ¹

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,*

² *Московский физико-технический институт (Государственный университет), Москва*

В настоящей работе показана возможность математического моделирования биотопливных элементов с электродами из гидрогелей и сделан расчет ожидаемой электрической мощности таких устройств в случае их работы в спинномозговой жидкости. Валидация математической модели проводилась по литературным данным и была достигнута высокая корреляция выше 0,86 между экспериментальными данными и результатами моделирования. Также выявлено, что уже существующие биотопливные элементы при работе в спинномозговой жидкости могут генерировать электрическую мощность, достаточную для работы некоторых обсуждаемых в научной литературе нейроимплантов. Следует отметить, что в данной работе анализировались только биотопливные элементы, изготовленные из биосовместимых материалов.

Ключевые слова: биотопливные элементы, имплантируемые источники тока, математическое моделирование, биосенсоры, нейроимпланты.

Введение

В настоящее время растет число публикаций, посвященных исследованиям и разработкам, направленным на создание имплантируемых источников электрического тока [16, 24]. Данный интерес обусловлен бурным развитием различных бионических устройств, как имплантируемых [18, 19, 25], так и неимплантируемых [7, 20]. Обычно выделяется несколько потенциальных типов имплантируемых электрогенераторов [10]:

1. Устройства, преобразующие механическую энергию тканей, органов или жидкостей.
2. Различные термоэлектрические преобразователи.
3. Устройства, основанные на преобразовании химической энергии некоторых соединений в биологических жидкостях в электрическую, — биотопливные элементы.

Все указанные типы электрогенераторов сегодня разрабатываются в большом количестве научных групп по всему миру [10]. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки и, вероятнее всего, все они могут найти то

или иное применение в зависимости от решаемых на практике задач. В частности, биотопливные элементы (БТЭ) пока что рассматриваются как устройства, отличающиеся большей удельной мощностью, по сравнению с остальными типами генераторов [10, 13]. Однако работа этих устройств в определенной степени вмешивается в естественный метаболизм организма, что требует детального анализа возможных последствий их применения.

Как указывалось выше, работа БТЭ заключается в преобразовании химической энергии в электричество, так же, как и в традиционных топливных элементах. В качестве катализатора в БТЭ используются микроорганизмы, а в случае имплантируемых устройств — ферменты. В зависимости от выбора субстрата подбирается фермент, сегодня чаще всего речь идет о глюкозных топливных элементах (ГТЭ), способных получать электрическую энергию за счет разрушения глюкозы [16].

В качестве источника глюкозы для ГТЭ рассматриваются различные физиологические среды. В первую очередь, исследователи ориентировались на кровотоки, в котором присутствуют миллимолярные концентрации данного субстрата [5]. Кроме того, физиологические жидкости в полостях живота [9], секретируемые жидкости, такие как пот [23] и слезы [28], а также спинномозговая жидкость [27]. Из всего перечисленного ликвор представляет определенный интерес как носитель субстрата для энергопитания нейроимплантов [30]. Вопрос энергоснабжения нейроимплантов является крайне

© 2019 г. Вишневская М.В., Готовцев П.М., Парунова Ю.М., Газизова Д.А., Василев Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Вишневская Мария Владиславовна

аспирант НИЦ «Курчатовский институт»

E-mail: Vishnevskaya_MV@nrcki.ru

актуальным в силу особенностей нейрохирургических вмешательств, при которых идеальным решением для установки нейроимпланта была бы пожизненная имплантация [21, 34], что требует создания пожизненного энергоисточника. В этом случае ликвор с его постоянно поддерживаемой концентрацией глюкозы на уровне 2,8–3,9 ммоль/л [8, 32] является перспективным субстратом для ГТЭ, питающих нейроимпланты.

На сегодняшний день нет данных о возможном влиянии локальных падений концентрации глюкозы в физиологических жидкостях, связанных с работой ГТЭ, на близлежащие ткани и органы [10]. Результаты экспериментов на животных показывают возможность длительной, более ста дней, эксплуатации имплантированного ГТЭ без существенных последствий для организма [33]. Однако к настоящему времени эти наиболее успешные результаты по длительной имплантации ГТЭ получены на таких небольших животных, как лабораторная крыса. Следовательно, несмотря на большие заделы в создании имплантируемых ГТЭ на сегодня перехода к созданию устройств с их использованием для клинических исследований не произошло. Изучение работы ГТЭ и того, как их работа может повлиять на организм в целом, пока что продолжается. Важным элементом таких исследований является математическое моделирование, которое позволяет приближенно оценить какие-либо параметры работы устройства при различных внешних факторах. Сейчас значительное внимание уделяется математическому моделированию микробных БТЭ, так как их область применения не связана с медициной и многие разработки уже практически применяются; примером таких моделей являются работы [22, 26, 29]. В то же время похожие подходы к моделированию применяются и в случае ферментных биотопливных элементов. Например, в работах [12, 11] авторы использовали подход, базирующийся на тех же принципах, что и для микробных БТЭ, исключая из рассмотрения процессы, связанные с микроорганизмами в целом. При этом авторы обращают внимание на достаточно простой пористый электрод, концентрируясь на изучении его работы с медиатором и без. Задачи сделать потенциально имплантируемый электрод авторы перед собой не ставили, концентрируясь непосредственно на изучении динамики самого процесса переноса заряда. Таким образом, на сегодня сложилась задача моделирования работы глюкозного БТЭ с учетом использования потенциально имплантируемых материалов.

В настоящей работе представлены первые результаты математического моделирования электрода,

выполненного из биосовместимого электропроводящего гидрогеля. Валидация модели была проведена с использованием результатов лабораторных экспериментов, опубликованных ранее [2, 4]. Выбор этих исследований обусловлен тем, что в них предложены электроды на основе электропроводящих гидрогелей, которые выполнены из биосовместимых материалов. Также с помощью предложенной математической модели проведен анализ возможной генерации электричества в случае использования в качестве субстрата ликвора.

Материалы и методы

Математическая модель

В основе математической модели заложены соотношения, описанные в работах [3, 6, 12, 29]. Кинетика процесса рассматривалась как классическая кинетика по Михаэлису – Ментен, без учета промежуточных стадий реакций и сопутствующих процессов. Взаимодействие фермента с субстратом описывается как:



где: E_{ox} , E_{red} – окисленный и восстановленный фермент; S – субстрат; P – продукт.

Скорость данной реакции записывается как:

$$r_1 = k_1 [E][S] x_{E_{ox}}, \quad (2)$$

где: r_1 – скорость реакции (1); k_1 – константа скорости реакции (1); $[E]$ и $[S]$ – концентрации фермента и субстрата соответственно; $x_{E_{ox}}$ – мольная доля фермента, находящегося в окисленном состоянии.

Взаимодействие фермента с материалом электрода описывается с помощью соотношения Батлера – Фолмера:

$$r_2 = k_2 [E] (x_{E_{red}} \exp(\alpha F(E - E_0)/RT) - x_{E_{ox}} \exp(-(1-\alpha)F(E - E_0)/RT)), \quad (3)$$

где: r_2 – скорость передачи электронов с фермента на электрод; k_2 – константа скорости процесса взаимодействия фермента с электродом; $x_{E_{red}}$ – мольная доля фермента в восстановленной форме; α – коэффициент передачи заряда; E – электрический потенциал в системе; E_0 – равновесный потенциал пары; F и R – константы Фарадея и универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура.

Электрический потенциал всей системы составит:

$$E = E_{eq} - IR_{ohm}, \quad (4)$$

где: E_{eq} – равновесный потенциал системы; I – сила тока в ячейке; R_{ohm} – сопротивление ячейки БТЭ.

Сила тока в ячейке связана с плотностью тока j через площадь поверхности электрода A следующим образом:

$$I = jA \quad (5)$$

Используемые данные

В качестве данных для валидации математической модели использовались результаты исследований, представленные в работах [2, 4]. В этих работах использовались электроды из проводящих гидрогелей и глюкозооксидазы. Гидрогель в обоих случаях имел одинаковый состав из коррагенана, поливинилового спирта и ПЭДОТ ПСС, однако метод иммобилизации фермента глюкозооксидазы различался. В работе [2] он вносился в виде суспензии на уже полученный гель, а в [4] — в процессе синтеза, перед стадиями замораживания/оттаивания. Основные входные параметры для математической модели представлены в таблице 1.

Таблица 1

Входные параметры для математической модели

Источник данных	[2]	[4]
Тип ГТЭ	безмембранный	безмембранный
Материал анода	Гидрогель ПВС + йота каррагинан + ПЭДОТ ПСС на подложке из Ni	Гидрогель ПВС + йота каррагинан + ПЭДОТ ПСС на подложке из Ni
Материал катода	Ni	Ni
Концентрация наносимого фермента	6 мкг по сухому весу на электрод	20 мкг по сухому весу на электрод
Размеры анода	Площадь 8 см ² , толщина 0,3 см	Площадь 2 см ² , толщина 0,3 см
Размеры катода	Площадь 4 см ² , толщина 0,2 см	Площадь 4 см ² , толщина 0,2 см
Состав рабочей среды	Физиологические растворы (0,9% NaCl) с различным содержанием глюкозы — 0,05; 0,5 и 5%	Физиологический раствор (0,9% NaCl) с различным содержанием глюкозы — 5%

Состав ликвора был взят по данным из работ [8, 32]. Концентрация глюкозы изменялась в диапазоне от 2,8–3,9 ммоль/л.

Предварительная обработка табличных данных, полученных с потенциостатов в работах [2, 4], проводилась в Microsoft Excel. Математическая модель была реализована в GNU Octave 5.1.0.

Результаты и обсуждение

В первом эксперименте исследовалась возможность воспроизвести вольт-амперные характеристики ГТЭ с использованием математических моделей при тех же начальных условиях, что и в случае экспериментов. Результативность работы математической модели оценивалась через стандартные статистические показатели [14, 15, 17]: R^2 — квадрат коэффициента множественной детерминации и r^2 — квадрат корреляции. В таблице 2 представлены результаты проверки математической модели в рамках первого эксперимента.

Таблица 2

Результаты валидации математической модели

Эксперимент	R^2	r^2
Работа [2] при концентрации глюкозы 0,05%	0,8846	0,8761
Работа [2] при концентрации глюкозы 0,5%	0,8853	0,8807
Работа [2] при концентрации глюкозы 5%	0,8799	0,8683
Работа [2]	0,9017	0,8962

Как видно из представленных в таблице 2 данных, результаты расчета с помощью математической модели отличаются высокой корреляцией с экспериментальными данными. Следует отметить, что используемые в работах [2, 4] ячейки для исследования ГТЭ не создавали каких-либо затруднений в диффузии глюкозы к электродам. В ряде работ [11, 12, 29] было установлено, что учет этого фактора оказывает существенное влияние на точность математических моделей.

В ходе второго эксперимента с помощью математической модели была симулирована работа ГТЭ на потребителя и рассчитана электрическая мощность. Описанный в работе [2] ГТЭ отличался недостаточной концентрацией фермента на аноде для тех значительных концентрациях глюкозы, которые использовались в экспериментах. То есть, в данном случае концентрация субстрата была существенно больше, чем константа Михаэлиса—Ментен, а оценка концентрации продуктов реакции описывалась по соотношению [1, 2]:

$$[P] = Lk[E]/k_m, \quad (6)$$

где: $[P]$ — концентрация продукта, L — толщина диффузного слоя у поверхности анода, k — константа скорости реакции, $[E]$ — концентрация иммобилизо-

ванного фермента на поверхности, k_m — коэффициент массопереноса продукта.

С учетом соотношения (5) можно отметить, что в данном случае мощность ГТЭ и концентрация продуктов реакции зависят только от концентрации фермента и не зависят от концентрации субстрата [2]. Необходимо отметить, что речь идет о концентрации активного, вступающего в биохимические реакции фермента. Так, в работе [2] для всех трех экспериментов была достигнута мощность элемента порядка 9 мкВт. При расчете с помощью математической модели были получены различные значения мощности, которые составили 8,6, 9 и 9,1 мкВт для концентраций глюкозы 0,05, 0,5 и 5% соответственно. В целом можно отметить, что полученные значения близки к экспериментальным. Однако в связи с наблюдаемым ростом мощности ГТЭ с увеличением концентрации глюкозы потребуются дальнейшие исследования,

направленные на изучение эффективности математической модели для случаев, аналогичных описанному в работе [2].

В исследовании [4] показана работа ГТЭ в приближенных к физиологическим концентрациях глюкозы, при этом генерируемая электрическая мощность составила 15 мкВт. Расчет с помощью математической модели дал значение мощности, равное 14,3 мкВт. В целом надо отметить, что математическая модель позволяет дать достаточно адекватную оценку мощности ГТЭ, в связи с чем далее был проведен анализ потенциальной мощности ГТЭ, аналогичного по конструкции представленному в работе [4] при эксплуатации в ликворе. При этом рассматривался вариант с тем же количеством фермента, что и в работе [4] (см. табл. 1), а также с вдвое меньшим и вдвое большим количеством (10 и 40 мкг соответственно). На рисунке 1 представлены результаты математического моделирования.

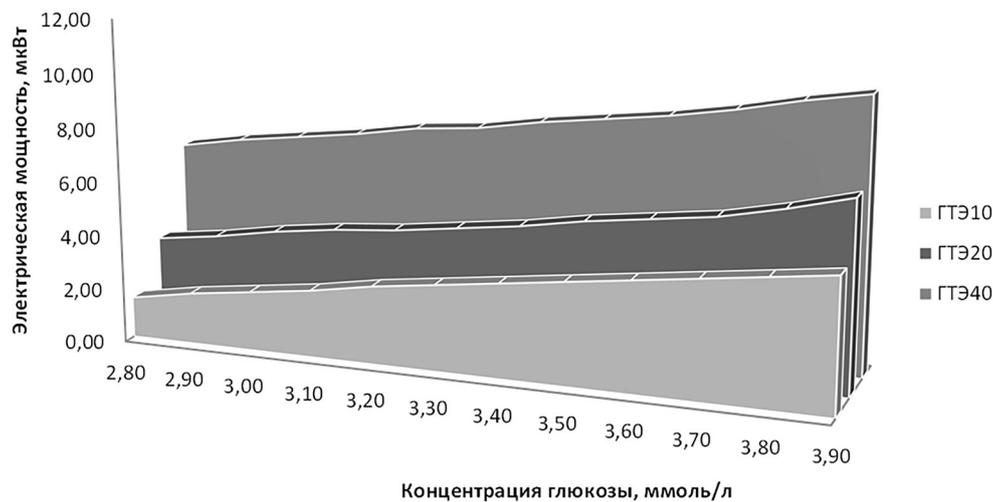


Рис. 1. Результаты математического моделирования работы ГТЭ в спинномозговой жидкости. ГТЭ10 — элемент с количеством фермента, равным 10 мкг; ГТЭ20 — элемент с количеством фермента, равным 20 мкг, и ГТЭ40 — элемент с количеством фермента, равным 40 мкг

Из рисунка 1 видно, что уже существующий подход к созданию электродов из электропроводящих гидрогелей может обеспечить электрическую мощность до 6 мкВт. Дальнейшее увеличение количества фермента на электроде может привести к росту мощности до 12 мкВт, что вполне соответствует энергопотреблению некоторых перспективных нейроимплантов [30, 31, 34].

Заключение

В данной работе показана возможность математического моделирования биотопливных элементов с электродами из гидрогелей и сделан расчет ожидаемой

электрической мощности таких устройств в случае их работы в спинномозговой жидкости. При этом были выбраны биотопливные элементы, электроды которых созданы из биосовместимых материалов. Таким образом, уже сегодня можно сделать вывод о теоретической возможности создания ГТЭ для энергоснабжения нейроимплантов. Полученные в результате математического моделирования значения электрической мощности уже находятся на границе необходимого минимума тех устройств, которые в настоящее время обсуждаются в научной литературе. Также следует отметить, что используемая математическая модель демонстрирует высокую корреляцию с экспериментальными данными.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект №18-29-23024.мк и тематического плана НИЦ «Курчатовский институт».

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Баника Ф.-Г. Химические и биологические сенсоры: основы и применения. — М.: Техносфера, 2014. — 879 с. — С. 109–110.
2. Вишневецкая М.В., Газизова Д.А., Бадранова Г.У., Готовцев П.М., Василев Р.Г. Применение гелевых электродов для изучения биотопливных элементов на основе фермента глюкозооксидазы // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2018. — Т. 14. — № 3. — С. 45–49.
3. Anicet N., Bourdillon C., Demaille C., Moiroux J., and Savéant J.-M. Catalysis of the electrochemical oxidation of glucose by glucose oxidase and a single electron cosubstrate: kinetics in viscous solutions // J. Electroanal. Chem. — 1996. — Vol. 410(2). — P. 199–202.
4. Antipova S., Parunova Y., Vishnevskaya M., Grigor'ev T., Lukanina K., Krashenninikov S., Gazizova D., Gotovtsev P. Flexible electroconductive hydrogel for biosensors and biofuel cells application / IEEE Developments in eSystems Engineering 2019. Kazan 7th–10th October 2019 (в печати).
5. Ben Amar A., Kouki A.B., and Cao H. Power approaches for implantable medical devices // Sensors (Basel). — 2015. — Vol. 15(11). — P. 28889–28914.
6. Cass A.E.G. et al. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose // Anal. Chem. — 1984. — Vol. 56(4). — P. 667–671.
7. Clement R.G.E., Bugler K.E., and Oliver C.W. Bionic prosthetic hands: A review of present technology and future aspirations // Surg. — 2011. — Vol. 9(6). — P. 336–340.
8. Clifford Schold S., Wasserstrom W.R., Fleisher M., Schwartz M.K., and Posner J.B. Cerebrospinal fluid biochemical markers of central nervous system metastases // Ann. Neurol. — 1980. — Vol. 8(6). — P. 597–604.
9. Cosnier S., Le Goff A., and Holzinger M. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs. Review // Electrochem. commun. — 2014. — Vol. 38. — P. 19–23.
10. Dagdeviren C., Li Z., and Wang Z.L. Energy harvesting from the animal/human body for self-powered electronics // Annu. Rev. Biomed. Eng. — 2017. — Vol. 19. — P. 85–108.
11. Do T.Q.N., Varničić M., Flassig R.J., Vidaković-Koch T., and Sundmacher K. Dynamic and steady state 1-D model of mediated electron transfer in a porous enzymatic electrode. // Bioelectrochemistry. — 2015. — Vol. 106. — Pt A. — P. 3–13.
12. Do T.Q.N., Varničić M., Hanke-Rauschenbach R., Vidaković-Koch T., and Sundmacher K. Mathematical modeling of a porous enzymatic electrode with direct electron transfer mechanism // Electrochim. Acta. — 2014. — Vol. 137. — P. 616–626.
13. Fan F.-R., Tian Z.-Q., and Lin Wang Z. Flexible triboelectric generator. — Nano Energy. — 2012. — Vol. 1(2). — P. 328–334.
14. Fukuda T., Shibata T. Theory and applications of neural networks for industrial control systems // IEEE Trans. Ind. Electron. — 1992. — Vol. 39(6). — P. 472–489.
15. Gotovtsev P.M., Voronov V.N., Smetanin D.S. Analysis of the coolant condition with the help of artificial neural networks // Therm. Eng. SP MAIK Nauka/Interperiodica. — 2008. — Vol. 55(7). — P. 552–557.
16. Halámková L., Halánek J., Bocharova V., Szczupak A., Alfonta L., and Katz E. Implanted biofuel cell operating in a living snail // J. Am. Chem. Soc. — 2012. — Vol. 134(11). — P. 5040–5043.
17. Jain A.K., Duin P.W., Jianchang Mao J. Statistical pattern recognition: a review // IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. IEEE. — 2000. — Vol. 22(1). — P. 4–37.
18. Jandial R. and Hoshide R. Bionic-brain: Controlling a prosthetic hand // World Neurosurg. — 2017. — Vol. 105. — P. 980–982.
19. Karagkiozaki V. et al. Bioelectronics meets nanomedicine for cardiovascular implants: PEDOT-based nanocoatings for tissue regeneration // Biochim. Biophys. Acta. — 2013. — Vol. 1830(9). — P. 4294–4304.
20. Kay S. and Wilks D. Bionic hand transplantation: linking the cortex to the hand // Lancet. — 2015. — Vol. 385(9983). — P. 2130–2132.
21. Koch J., Schuettler M., Pasluosta C., and Stieglitz T. Electrical connectors for neural implants: design, state of the art and future challenges of an underestimated component. — J. Neural Eng. — 2019. — Vol. 16(6). — 061002. doi: 10.1088/1741-2552/ab36df.
22. Korth B., Rosa L.F.M., Harnisch F., and Picioreanu C. A framework for modeling electroactive microbial biofilms performing direct electron transfer. // Bioelectrochemistry. — 2015. — Vol. 106. — P. 194–206.
23. Lv J. et al. Sweat-based wearable energy harvesting-storage hybrid textile devices // Energy Environ. Sci. — 2018. — Vol. 11(12). — P. 3431–3442.
24. Mano N. and De Poulpiquet A. O₂ reduction in enzymatic biofuel cells // Chem. Rev. — 2018. — Vol. 118(5). — P. 2392–2468.
25. Musk E., Neuralink. An integrated brain-machine interface platform with thousands of channels // J. Med. Internet Res. — 2019. — Vol. 21(10). — e16194. doi: 10.2196/16194.

26. Pankratova G. and Gorton L. Electrochemical communication between living cells and conductive surfaces // *Current Opinion in Electrochemistry*. – 2017. – Vol. 5(1). – P. 193–202.
27. Rapoport B.I., Kedzierski J.T., and Sarpeshkar R. A glucose fuel cell for implantable brain-machine interfaces // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(6). – e38436. doi: 10.1371/journal.pone.0038436.
28. Rasmussen M., Abdellaoui S., and Minter S.D. Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – Vol. 76. – P. 91–102.
29. Reshetilov A.N. et al. Effect of some carbon nanomaterials on ethanol oxidation by *Gluconobacter oxydans* bacterial cells // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2017. – Vol. 53(1). – P. 123–129.
30. Rizea R.E., Gheorghita K.L., David G., and Ciurea A.V. Neuromodulation devices nowadays // *Rom. Neurosurg.* 2019. – Vol. 33(1). – P. 31–33.
31. Sarpeshkar R. *Ultra Low Power Bioelectronics*. – New-York: Cambridge University Press, 2010. – 890 p.
32. Whitehead W.E. Cerebrospinal Fluid Shunting / In *Cerebrospinal Fluid Disorders*. – Cham: Springer International Publishing, 2019. – P. 281–295.
33. Zebda A. et al. Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices // *Sci. Rep.* – 2013. – Vol. 3(1). – 1516. doi:10.1038/srep01516.
34. Zhao Z., Li X., He F., Wei X., Lin S., and Xie C. Parallel, minimally-invasive implantation of ultra-flexible neural electrode arrays // *J. Neural Eng.* – 2019. – Vol. 16(3). – 035001. doi: 10.1088/1741-2552/ab05b6.

MATHEMATICAL MODELING OF THE WORK OF AN ENZYME BIOFUEL ELEMENT IN CEREBROSPINAL FLUID

M.V. VISHNEVSKAYA¹, P.M. GOTOVTSEV¹, Yu.M. PARUNOVA¹,
D.A. GAZIZOVA^{1,2}, R.G. VASILOV¹

¹ *National Research Centre «Kurchatov Institute»*,

² *Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow*

In the present work, the possibility of mathematical modeling of biofuel elements with electrodes made of hydrogels is shown and the expected electric power of such devices is calculated in case of their operation in the cerebrospinal fluid. The validation of the mathematical model was carried out according to literature data and a high correlation was achieved above 0.86 between the experimental data and the simulation results. It was also revealed that existing biofuel elements when working in cerebrospinal fluid can generate electric power sufficient for the operation of some neuroimplants discussed in the scientific literature. It should be noted that in this work we analyzed only biofuel elements made of biocompatible materials.

Keywords: biofuel elements, implantable current sources, mathematical modeling, biosensors, neuroimplants.

ВЛИЯНИЕ ГИДРОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВОДЫ РЕК ДОН И ТЕМЕРНИК НА ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Д.А. ЛЕВЧЕНКО*, Е.А. МЕНЬШИКОВА, Е.М. КУРБАТОВА, С.В. ТИТОВА,
В.Д. КРУГЛИКОВ, И.В. АРХАНГЕЛЬСКАЯ, М.В. РЕНГАЧ

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

Результаты мониторинговых исследований рек Дон и Темерник показали выделение большого количества нетоксигенных штаммов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, которые могут служить этиологическим фактором возникновения гастроэнтеритов у людей. В настоящее время в связи с ростом объема сбрасываемых сточных вод актуальна проблема загрязнения воды поверхностных водоемов, используемых для питьевых, хозяйственно-бытовых и рекреационных целей. Установлен комплекс показателей (медь, железо, нефтепродукты, БПК₅), оказывающий влияние на высеваемость штаммов *V. cholerae* nonО1/nonО139. Полученные результаты подтверждают необходимость проведения дальнейших мониторинговых исследований для оценки качества воды рек Дон и Темерник, с целью обоснования связи с обнаружением штаммов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, являющихся индикатором наличия экологических условий для жизнедеятельности холерного вибриона.

Ключевые слова: холерный вибрион неО1/неО139, водоемы, мониторинг, гидрохимические показатели.

Введение

Результаты мониторинговых исследований объектов окружающей среды (ООС) в пределах г. Ростова-на-Дону свидетельствуют о постоянном выделении из поверхностных водоемов нетоксигенных штаммов холерных вибрионов. Известно, что *V. cholerae* nonО1/nonО139 служат индикатором наличия оптимальных для жизнедеятельности холерного вибриона условий в экологической нише и могут быть этиологическим фактором sporadических заболеваний или вспышек острых кишечных инфекций у людей [4, 13, 14]. Город Ростов-на-Дону — крупный административный и промышленный центр Юга России на берегу реки Дон. Река Дон служит источником питьевого, хозяйственно-бытового и рекреационного водопользования. Главные источники загрязнения реки Дон — сточные воды, в том числе предприятий машиностроения, пищевой, легкой, химической промышленности, жилищно-коммунального хозяйства, а также факторы, связанные с судоходством. Кроме того, крупной водной артерией также на территории города является река Темерник —

приток реки Дон [16]. При проведении ретроспективного анализа литературных данных исследователями отмечено обширное загрязнение окружающей среды различными продуктами, связанными с деятельностью человека [20, 26]. Кроме того, ранее было установлено наличие связи степени загрязнения водоемов органическими веществами с увеличением интенсивности и длительности выделения холерных вибрионов. Рассмотрены также различные экологические условия в водоеме, способствующие сохранению и размножению холерных вибрионов, и найдено, что размножение холерных вибрионов и сохранение ими типичных биологических свойств зависят от характера экосистемы и изменений, которые претерпевают штаммы под действием различных экологических факторов [18, 23, 25]. Качественный состав воды в объектах зависит от климатических, гидрологических, физико-химических и других показателей и изменяется при нарушении экологического равновесия [11]. К климатическим факторам, характеризующим водные экосистемы, относятся следующие показатели: температура воды, рН, биохимическое потребление кислорода за 5 суток (БПК₅), содержание растворенного кислорода, общего азота и фосфора [17]. По данным разных авторов, из воды объектов окружающей среды вибрионы начинают выделять при температуре воды от +17,5 до 19,5 °С, а основное количество — при +22–25 °С [12, 25]. Согласно мнению К. Miyaki et al. (1967), холерные вибрионы размножаются в пределах рН 6,0–8,0 [27]. В.Н. Савельева с соавт. (1984) наблюдали хороший рост холерных вибрионов при рН 10,0. На осно-

© 2019 г. Левченко Д.А., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Титова С.В., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ренгач М.В.

* **Автор для переписки:**

Левченко Дарья Александровна

канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: levchenko_da@antiplague.ru

вании экспериментальных исследований А.Ф. Пинигиным и др. (1986) [18] сделано заключение, что размножение холерных вибрионов в водной среде возможно при температуре 18–20 °С, минимальном содержании органических веществ (БПК₅ от 2,6–3,9 мг/л), в диапазоне рН 6–11. С помощью БПК₅ речной воды оценивают содержание биохимически окисляемых органических веществ, а также эффективность работы очистных сооружений [22]. Л.М. Смоликовой с соавт. (1985) [24] продемонстрировано, что уменьшение концентрации кислорода до определенного предела ведет наряду с другими факторами к уменьшению численности холерных вибрионов. Содержание растворенного кислорода существенно для аэробной микрофлоры и служит индикатором биологической активности (фотосинтеза) в водоеме [9]. В работе В.И. Погорелова с соавт. (1998) [19] установлено наличие достоверной корреляционной связи между показателями азотосодержащих веществ и выделением холерных вибрионов в водоемах, что было подтверждено экспериментально. Источником биогенных элементов (общего азота и фосфора) в стоках являются отходы производственного и коммерческого использования, которые сбрасываются в городскую канализационную сеть города, что приводит к цветению водоемов, что, в свою очередь, вызывает гибель рыб [1–3, 5].

Вместе с тем на сегодняшний день не определен комплекс гидрохимических показателей, включающий в себя ионы тяжелых металлов [10, 15, 16], оказывающий влияние на высеваемость штаммов холерных вибрионов. В этой связи целью настоящего исследования явился анализ влияния гидрохимических показателей воды рек Дон и Темерник в пределах г. Ростов-на-Дону на обнаружение холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп с 2017-го по 2018-й годы.

Материалы и методы

Исследования проб воды на наличие холерных вибрионов осуществляли по двум стационарным точкам (с.т.) отбора проб воды на вибриофлору в лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в соответствии с СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации» и МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». Процент высеваемости штаммов *V. cholerae* nonО1/nonО139 рассчитывали по соотношению положительных результатов на наличие холерных вибрионов к общему количеству исследованных проб. Определение гидрохи-

мических показателей проводили в ФГБНУ «ВНИРО» («АзНИИРХ»). Отбор проб воды осуществлялся в летне-осенний период в 2017 г. и 2018 г., ежемесячно. Полученные результаты сравнивали с регламентированными данными (ПДК — предельно допустимая концентрация) [7, 21] (табл. 1).

Таблица 1

ПДК в водоемах по гидрохимическим показателям

№ п/п	Показатели	ПДК, мг/л
1	Общий азот	0,3–10,0
2	Общий фосфор	0,3–10,0
3	Растворенный кислород	до 14
4	БПК ₅	0,5–4,0
5	Железо	до 0,1
6	Медь	0,001
7	Цинк	0,01–0,05
8	Нефтепродукты	0,05
9	рН	6,5–8,5

Результаты и обсуждение

В ходе проведения мониторинга за наличием холерных вибрионов в поверхностных водоемах г. Ростова-на-Дону в период с 2017 г. по 2018 г. было исследовано 88 проб воды (с.т.: р. Дон, правый берег, Державинский спуск; с.т. — р. Темерник, Ботанический сад). В результате было изолировано 54 штамма *V. cholerae* nonО1/nonО139 (31 — из р. Дон и 23 — из р. Темерник). Все выделенные штаммы обладали типичными для рода *Vibrio* и вида *V. cholerae* морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

Среди изученных культур обнаружено 12 (22,2%) штаммов атипичных по признаку агглютинабельности, как и в предыдущие годы (2010–2011 гг.) [8]. В результате исследования положительную реакцию слайд-агглютинации с О1 холерной сывороткой (производства ФКУЗ «Российский научно-исследовательский институт «Микроб») давали 12 штаммов, а в некоторых случаях (семь штаммов) с типоспецифическими сыворотками (Огава или Инаба), однако при последующих пассажах указанные штаммы утрачивали это свойство (табл. 2). Все культуры давали свечение на два креста при обработке иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими холерными, что является неспецифическим. Атипичность холерных вибрионов по признаку агглютинабельности была отмечена В.И. Погореловым (1997) [20] в процессе адаптации их к воздействию факторов окружающей среды. Для исключения диагностических ошибок при лабораторной диагностике холеры по определению серогрупповой принадлежности про-

ведена своевременная дифференциация данных водных штаммов холерных вибрионов от *V. cholerae* O1 и O139 по отрицательным результатам в ПЦР с праймерами,

специфичными к генам, кодирующим синтез O1 — антигена *wbe (rfbO1)*, а также по определению принадлежности к определенным серогруппам атипичных штаммов.

Таблица 2

Агглютинабельность штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 диагностической O1 холерной сывороткой, выделенных в 2017–2018 гг.

№ п/п	№ пробы	Серогруппа	Название водоема и точки отбора проб воды	O1	Инаба	Огава
2017 г.						
1	30	O76	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	+	-
2	50	н/т*	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	-	+
3	64	O20	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	+	-
4	71	н/т	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	-	-
5	92	н/т	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	-	-
2018 г.						
6	12	н/т	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	+	-
7	20	н/т	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	-	+
8	54	н/т	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	-	+
9	88	O8	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	-	-
10	108	н/т	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	-	-
11	213	O2	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	+	-
12	239	н/т	Р. Дон. Правый берег у Державинского спуска	+	-	-

Примечание: * — не типифицируется

В ходе проведения анализа гидрохимических показателей установлено, что в 2018 г. относительно показателей, полученных за 2017 году, в воде р. Дон среднегодовая концентрация общего азота ($1,4 \pm 1,7$ мг/л) уменьшилась в 1,1 раза; при этом максимальные значения отмечались в ноябре 2017 г. ($1,92 \pm 1,7$ мг/л). В воде р. Темерник констатируется увеличение среднегодовой концентрации общего азота ($6,9 \pm 1,4$ мг/л) в 1,3 в 2018 г. в сравнении с 2017 годом. Так, максимальная концентрация была зарегистрирована в марте 2018 года ($8,89 \pm 1,4$ мг/л). Среднегодовое содержание общего азота и фосфора в обоих водоемах было в пределах ПДК. Среднегодовая концентрация растворенного кислорода в воде рек Дон и Темерник находилась в пределах регламентированных значений (р. Дон, 2017 г. — $8,23 \pm 0,4$ мг/л, 2018 г. — $8,69 \pm 0,3$ мг/л; р. Темерник, 2017 г. — $8,25 \pm 0,4$ мг/л; 2018 г. — $8,77 \pm 0,04$ мг/л), то есть дефицита кислорода не выявлено. В соответствии с полученными данными, по значениям рН воду исследуемых рек можно отнести к слабощелочной (рН 7,5–8,5). Только в ноябре 2017 г. рН речной воды

была нейтральной (рН $6,5 \pm 0,1$ — р. Дон; $6,7 \pm 0,1$ — р. Темерник). Что касается данного показателя, то его значение в исследуемых водоемах не превышало нормы — рН 6,5–8,5. Комплекс вышеуказанных контрольных гидрохимических показателей не превышал ПДК и не оказывал вредного воздействия на обитателей водоема. При определении среднегодовых концентраций БПК₅ в исследуемых водоемах найдено превышение ПДК в р. Темерник в 2017 г. — в 1,3 раза ($5,27 \pm 0,6$ мг/л) и в 2018 г. — в 2 раза ($8,0 \pm 3,1$ мг/л); в то же время установлено, что в сентябре (2017 г.) отмечалось превышение ПДК данного показателя в 1,7 раз ($6,98 \pm 0,72$ мг/л) и в мае (2018 г.) — в 3,1 раза ($12,40 \pm 1,34$ мг/л). Что касается р. Дон, то вышеуказанный показатель в эти сроки оказался в пределах ПДК.

Проведен анализ высеваемости *V. cholerae* nonO1/nonO139 из проб воды р. Дон и р. Темерник в пределах г. Ростова-на-Дону, содержания тяжелых металлов и нефтепродуктов по среднегодовым показателям в этих водоемах, результаты которого представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Результаты бактериологического и гидрохимического исследования воды рек Дон и Темерник
по среднегодовым показателям**

№ п/п	Место отбора воды	Год	рН	Т _{воды} (°С)	Высеваемость <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139, в %	БПК ₃	Железо	Медь	Цинк	Нефте-продукты
							мг/л			
1	с.т. № 1 р. Дон, правый берег, Державинский спуск	2017	7,5	20,4	68,2	3,2	0,07	0,001	0,01	0,15
		2018	7,7	19,8	65,5	2,4	0,2	0,001	0,01	0,18
2	с.т. № 6 р. Темерник, Ботанический сад	2017	7,4	20,7	73,5	5,27	0,2	0,0026	0,008	5,24
		2018	7,7	19,3	72,7	8,0	1,6	0,0026	0,01	1,8

При анализе среднегодовых показателей было выявлено, что наибольший процент высеваемости *V. cholerae* nonO1/nonO139 (73,5%) зарегистрирован в р. Темерник при максимальной среднегодовой температуре 20,7 °С. Установлено, что среднегодовое содержание железа в реках Дон и Темерник превышало гигиенические нормативы, а именно: в р. Дон (2018 г.) — в 2 раза (0,2±0,1 мг/л) и в р. Темерник (2017 г.) — в 2 раза (0,2±0,04 мг/л), а в 2018 г. — в 16 раз (1,6±1,0 мг/л). При определении среднегодового содержания меди в водоемах обнаружено превышение ПДК в р. Темерник в 2017 г. и 2018 г. — в 2,6 раза (0,0026±0,01 мг/л). При анализе среднегодового содержания нефтепродуктов в р. Дон и Темерник установлено максимальное превышение ПДК в р. Темерник в 2017 г. в 104,8 раз (5,24±0,03 мг/л), что, по нашему мнению, связано со сбросом в водоемы сточных вод с загрязнениями техногенного и антропогенного характера. Анализ всех проб на среднегодовое содержание цинка показал, что концентрация данного металла находилась в пределах нормативных значений ПДК. Помимо проведенного изучения влияния среднегодовых гидрохимических показателей на высеваемость *V. cholerae* nonO1/nonO139 (в %), был проведен анализ среднемесячных значений вышеуказанных показателей по изучаемым рекам.

Ежегодный мониторинг предоставил доказательства того, что наибольший процент высеваемости холерных вибрионов (100,0%) был зарегистрирован в августе и сентябре, а наименьшее количество в мае — 20,0%. Так, было зафиксировано, что в р. Дон в сентябре 2017 г. зарегистрирована наибольшая концентрация меди, равная 0,115±0,1 мг/л, что в 1,2 раза превышало ПДК. Также отмечено превышение ПДК по содержанию нефтепродуктов в р. Дон в августе 2017 г. — в 4,2 раза (0,21±0,08 мг/л) (рис. 1).

При анализе ежемесячных заборов воды из р. Темерник установлено, что концентрация меди держалась на одном уровне и составляла от 0,0023±0,0002 мг/л до 0,0042±0,003 мг/л, что превышало ПДК. Кроме того, определено, что в р. Темерник наибольшее содержание ионов железа найдено в мае (2,99±0,299 мг/л), августе (0,314±0,03 мг/л) и сентябре (0,192±0,01 мг/л) 2017 г. Отмечено превышение ПДК нефтепродуктов в р. Темерник в августе 2017 г. — в 220 раз (11±0,55 мг/л) (рис. 2).

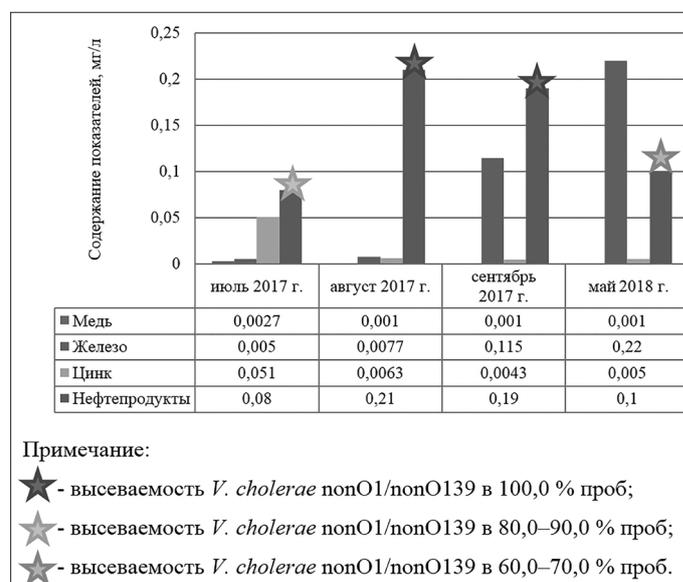


Рис. 1. Среднемесячные концентрации комплекса гидрохимических показателей в с.т. № 1 р. Дон, правый берег, Державинский спуск

Проведенный анализ загрязнений тяжелыми металлами и нефтепродуктами рек Дон и Темерник показал техногенный и антропогенный характер загрязнения, возможным источником которых был сброс неочищенных стоков. При проведении статистического (корреляционного) анализа полученных результатов установлено, что температура воды, рН и содержание нефтепродуктов

в водоемах г. Ростова-на-Дону имеют прямую взаимосвязь ($r=+0,6$; $r=+0,3$; $r=+0,7$, соответственно) с высеваемостью штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и могут оказывать влияние на выделение культур холерных вибрионов неO1/неO139.

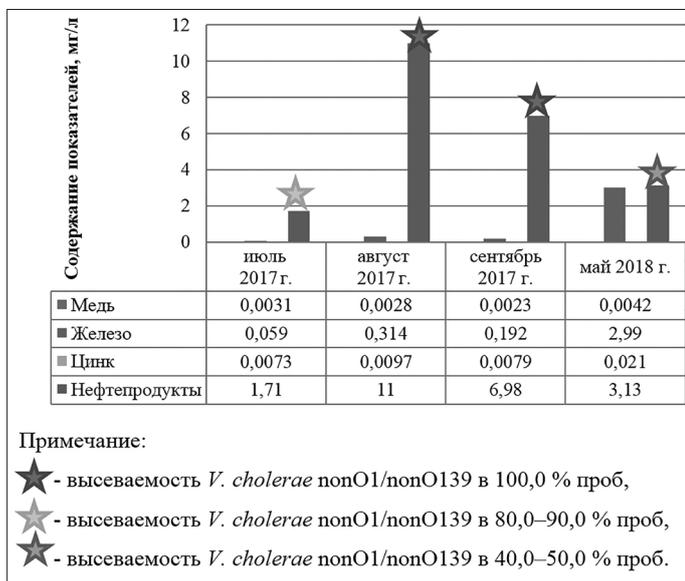


Рис. 2. Среднемесячные концентрации комплекса гидрохимических показателей в с.т. № 6 р. Темерник, Ботанический сад

Обратная корреляционная взаимосвязь обнаружена с БПК₅ ($r=-0,1$), растворенным кислородом ($r=-0,5$), общим азотом ($r=-0,3$) и фосфором ($r=-0,3$), железом ($r=-0,3$), медью ($r=-0,7$) и цинком ($r=-0,1$). Выявлена множественная корреляционная зависимость частоты выделения штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 с температурой воды, рН и содержанием нефтепродуктов в водоемах. Анализ данных о влиянии температуры воды, рН и содержания нефтепродуктов на высеваемость штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 с использованием статистического анализа позволил констатировать, что в течение изучаемого периода с изменением указанных показателей в реках Дон и Темерник создаются определенные условия, оказывающие отрицательное воздействие на частоту обнаружения холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп.

Заключение

В результате оценки данных по содержанию общего азота, фосфора, растворенного кислорода, нефтепродуктов и тяжелых металлов, а также по показателям БПК₅, рН, полученных в ходе мониторинговых исследований воды рек Дон и Темерник, выявлены изменения в сто-

рону повышения концентраций некоторых показателей, особенно тяжелых металлов, в течение исследуемого периода. Оценка полученных данных продемонстрировала высокий уровень загрязненности речной воды в районе г. Ростов-на-Дону. Установлен комплекс показателей (температура воды, рН, нефтепродукты), оказывающий влияние на высеваемость штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп. Надо отметить, что наибольший процент высеваемости (100,0%) штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 был зарегистрирован в водоемах, где обнаружено значительное превышение ПДК по содержанию нефтепродуктов (в 220 раз), что подтверждается экспериментальными данными, полученными ранее И.Я. Черепahiной с соавт. (1984) [26]. Выживание холерных вибрионов в водоемах обеспечивается их высокими адаптационными возможностями по отношению к действию гидрохимических факторов водной среды, в результате чего возникают атипичные свойства (агломинабельность). Судя по повторяемости случаев превышения ПДК в течение года, загрязнение имело устойчивый характер. По нашему мнению, основной причиной загрязнения рек соединениями меди, железа, нефтепродуктов является сброс их со сточными водами. Что касается показателей общего азота, фосфора и рН, то их значения не превышали ПДК. Полученные результаты подтверждают необходимость проведения дальнейших мониторинговых исследований для оценки качества воды рек Дон и Темерник с целью обоснования их влияния на обнаружение штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, которые служат индикатором наличия экологических условий для жизнедеятельности холерного вибриона.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам ФГБНУ «ВНИРО» («АзНИИРХ»), предоставивших данные по характеристике гидрохимических и гидробиологических показателей рек Дон и Темерник.

Литература

1. Алекин О.А., Семенов А.Д., Скопинцев Б.А. Руководство по химическому анализу вод суши. — Л.: Гидрометеоиздат, 1973. — 270 с.
2. Андроникова И.Н. Структурно-функциональная организация зоопланктона озерных экосистем разных трофических типов: автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Л., 1989. — 46 с.
3. Арапова А.В. Биологическое удаление азота и фосфора из городских сточных вод: дис. ... канд. тех. наук. — М., 2004. — 154 с.

4. *Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Демидова Г.В.* Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп как возбудители кишечных инфекций в Ростовской области и Республике Калмыкия / Актуальные вопросы инф. патологии: Материалы междунар. форума специалистов с заседанием профильной комиссии по специальности «Инфекционные болезни» МЗ РФ. — Краснодар, 2016. — С. 25–27.
5. *Батян А.Н., Фруммин Г.Т., Базылев В.Н.* Основы общей и экологической токсикологии. Учебное пособие. — СПб.: Спец. Лит, 2009. — 352 с.
6. *Гавриловский Д.В., Гапонов В.А., Кузнецов Д.М., Юдина М.С.* Влияние денивеляции на качество воды реки Дон // Инженерный вестник Дона. — 2017. — № 1(44). — С. 82..
7. ГН 2.1.5.1315-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования».
8. *Григоренко Л.В., Кругликов В.Д., Мазрухо А.Б., Архангельская И.В., Зубкова Д.А., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С.* Холерные вибрионы неО1/неО139, выделенные в ходе мониторинга водоемов и стоков Ростова-на-Дону с 2009 по 2011 год // Проблемы особо опас. инф. — 2013. — № 4. — С. 48–50.
9. *Дробашева Т.И., Кленкин А.А., Пелипенко Л.В., Редрикова О.Д., Каструбина Г.И.* Мониторинг загрязнений рек Темерник и Дон в пределах г. Ростова-на-Дону // Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. — 2003. — № 1. — С. 85–87.
10. *Дробашева Т.И., Расторопов С.Б.* Токсичные загрязнения природных вод тяжелыми металлами // Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. — 2005. — № 8. — С. 53–60.
11. *Жань-Жань Х.* Геоэкологическая оценка трофического статуса пресноводных озер Китая: дис. ... канд. геогр. наук — СПб., 2013. — 149 с.
12. *Левченко Д.А., Ежова М.И., Ренгач М.В., Меньшикова Е.А., Архангельская И.В., Курбатова Е.М., Кругликов В.Д.* Роль температуры в выделении штаммов *Vibrio cholerae* различной эпидзначимости в реках Дон и Темерник / Материалы XV Всерос. научно-практ. конф. МУиСР «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены». — М., 2018. — С. 54–57.
13. *Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д., Авдеева Е.П., Ежова М.И., Шестиалтынова И.С., Шалу О.А., Непомнящая Н.Б., Архангельская И.В.* Мониторинг вибриофлоры водных объектов окружающей среды в системе эпиднадзора за холерой // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2010. — № 5. — С. 24–28.
14. *Монахова Е.В., Архангельская И.В.* Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире // Проблемы особо опас. инф. — 2016. — № 2. — С.14–23.
15. *Неверова-Дзионак Е.В., Цветкова Л.И., Макарова С.В., Киселев А.В.* Об экологической безопасности водных объектов // Современные проблемы науки и образования. — 2012. — № 3. — С. 136–136.
16. *Никаноров А.М., Хоружая Т.А., Минаева Л.И., Миранова Т.В.* Влияние мегаполиса на качество воды большой реки (на примере г. Ростов-на-Дону) // Вестник Южного научного центра РАН. — 2009. — Т. 5. — № 4. — С. 62–70.
17. *Одум Ю.* Основы экологии. Пер. с англ. — М.: Мир, 1975. — 740 с.
18. *Пинигин А.Ф., Марамович А.С., Ганин В.С.* Влияние некоторых экологических факторов на размножение холерных вибрионов биовара Эльтор в водной среде (экспериментальные данные) / Вопр. сан. охраны территории и проф. природно-очаг. инф. — Хабаровск, 1986. — С. 85–87.
19. *Погорелов В.И., Марамович А.С., Ганин В.С., Погорелова И.Г.* Влияние нитратов и нитритов на сохранение вибрионов эльтор в водной среде // Журн. инф. патологии. — 1998. — Т. 5. — № 4. — С. 48–52.
20. *Погорелов В.И.* Оценка экологических факторов, влияющих на циркуляцию вибрионов эльтор в поверхностных водоемах Сибири и Дальнего Востока: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Саратов, 1997. — 18 с.
21. РД 52.24.671-05 «Методы выделения и определения ионов тяжелых металлов во взвешенных веществах поверхностных вод суши в условиях опасных уровней загрязнения».
22. СанПиН 2.1.5.980-00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод».
23. *Сергиев В.П., Марчук Л.М., Круглая М.Н.* Особенности седьмой пандемии холеры // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 1981. — № 3. — С. 3–8.
24. *Смоликова Л.М., Сомова А.Г., Мединский Г.М., Пашенцева Н.Ф.* Зависимость численности вибрионов и аэромонад от степени биологического загрязнения водоемов / Всесоюз. микробиол. об-во, Съезд, 7-й: Тез. Т. 6. — Алма-Аты, 1985. — С. 172.
25. *Титова С.В.* Взаимоотношения холерных вибрионов с представителями планктона водоемов средних широт в условиях эксперимента: дис. ... канд. мед. наук. — Ростов-на-Дону, 2000. — 165 с.
26. *Черепихина И.Я., Ураева В.С., Кутырев И.В.* Влияние нефти и продуктов ее переработки на холерные вибрионы в эксперименте / Актуал. вопр. диагн. и биохимии возб. чумы и холеры. — Саратов : ин-т «Микроб», 1984. — С. 56–60.
27. *Miyaki K., Iwachara S., Sato K.* Основные исследования жизнеспособности вибрионов Эль-Тор // Бюл. ВОЗ. — 1967. — Т. 37. — № 5. — С. 777–782.

THE INFLUENCE OF HYDROCHEMICAL INDICATORS OF THE DON AND TEMERNIK RIVERS WATER FOR THE DETECTION OF CHOLERA VIBRIOS

D.A. LEVCHENKO, E.A. MEN'SHIKOVA, E.M. KURBATOVA, S.V. TITOVA, V.D. KRUGLIKOV,
I.V. ARKHANGELSKAYA, M.V. RENGACH

Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor

The results of monitoring studies of the Don and Temernik rivers showed the release of a large number of non-toxigenic strains of cholera vibrios of nonO1/nonO139 serogroups, which can serve as the etiological factor for the onset of gastroenteritis in humans. Currently, the problem of water pollution of surface water bodies used for drinking, household and recreational purposes, in connection with the growth of discharged wastewater, is relevant. A set of indicators has been established (copper, iron, petroleum products, BOD₅), which influences the seeding rate of *V. cholerae* nonO1/nonO139 strains. The obtained results confirm the need for further monitoring studies to assess the water quality of the Don and Temernik rivers in order to substantiate the connection with the identification of serogroup cholera vibrio strains that are an indicator of the presence of environmental conditions for the cholera vibrio.

Keywords: cholera vibrio nonO1/nonO139, reservoirs, monitoring, hydrochemical indicators.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДЕКСА ДЕСОРБЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОГРУПП И ТОКСИГЕННОСТИ В БИОПЛЕНКЕ НА ХИТИНОВОМ ПАНЦИРЕ РЕЧНОГО РАКА

Е.А. МЕНЬШИКОВА*, Е.М. КУРБАТОВА, С.О. ВОДОПЬЯНОВ,
С.В. ТИТОВА, А.В. МИРОНОВА

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт

В настоящее время известно, что более 99% бактерий существуют в природных экосистемах не в виде свободно плавающих клеток, а в виде прикрепленных к субстрату биопленок (Biofilms). Формирование биопленок — это многоступенчатый процесс, последняя стадия которого — десорбция, во время которой бактерии активно покидают биопленку, переходя в планктонную форму. Этот процесс приводит к диссеминации возбудителя и контаминации объектов окружающей среды. Для определения индекса десорбции холерных вибрионов в биопленке был разработан простой и удобный метод с использованием хитина широкопалого речного рака *Astacus astacus* в качестве биотического субстрата. Метод может быть полезен для прогнозирования эпидемиологической ситуации, так как способность холерных вибрионов колонизировать объекты окружающей среды и переходить из биопленки в планктон может привести к распространению возбудителя за пределы эндемичных очагов и накоплению холерных вибрионов в случае заноса на территориях, где он раньше не выявлялся.

Ключевые слова: холерный вибрион, планктон, биопленка, диссеминация возбудителя, индекс десорбции.

Введение

В настоящее время известно, что более 99% бактерий существуют в природных экосистемах не в виде свободно плавающих клеток, а в виде прикрепленных к субстрату биопленок (Biofilms). Некоторые исследователи считают, что планктонную форму можно рассматривать лишь как способ перемещения микробной клетки от одной поверхности к другой, то есть как кратковременное состояние в жизни бактерий. Более того, ни для одного вида бактерий не описано существование только в планктонном состоянии при всех возможных условиях роста [4]. Достижения в области молекулярных технологий продемонстрировали, что холерные вибрионы можно обнаружить в тех областях, где ранее они не были выделены, что свидетельствует о значительно более широком, глобальном распространении *Vibrio cholerae* за пределами эндемичных регионов. Способность выживать в различных экологических нишах в основном объясняется

развитием ряда приспособительных реакций, которые позволяют холерным вибрионам переживать стрессовые факторы, такие как недостаток питательных веществ, колебания солености воды и температуры, защита от хищных гетеротрофных протистов и бактериофагов. Возбудитель холеры способен прикрепляться к абиотическим и биотическим поверхностям (хитину, а также зоо- и фитопланктону) и образовывать биопленку [5, 9, 10]. Формирование биопленки ассоциируется с повышенной стрессоустойчивостью, расширением доступа к питательным веществам и использованием ее в качестве средства для распространения, когда бактерия прикрепляется к различным представителям водной биоты [6, 7, 11]. Формирование биопленок представляет собой многоступенчатый процесс, последняя стадия которого — дисперсия, во время которой бактерии активно покидают биопленку, переходя в планктонную форму. Этот процесс приводит к диссеминации возбудителя и контаминации объектов окружающей среды [1]. Согласно данным Окулича В.К. с соавт. (2012), возбудитель холеры, диспергируемый из биопленки в окружающую среду, изменяет свои свойства, в том числе повышает свою инфекционность на 1–2 порядка [2].

Целью работы явилось определение индекса десорбции холерных вибрионов различных серогрупп и токсигенности в биопленке на хитиновом панцире речного рака методом ПЦР.

© 2019 г. Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О., Титова С.В., Миронова А.В.

* Автор для переписки:

Меньшикова Екатерина Александровна
канд. биол. наук, руководитель группы экологии холерных вибрионов, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт
Роспотребнадзора

E-mail: super.monica2007@yandex.ru

Для определения индекса десорбции (ИД) холерных вибрионов в биопленке был разработан простой и удобный метод с использованием хитина широкопалого речного рака *Astacus astacus* в качестве биотического субстрата. Фрагменты хитинового панциря речного рака без предварительной обработки размером 0,5×0,5 см и массой 100 мг помещали во флаконы (100 мл) с 30 мл речной воды и автоклавируют при 132 °С 30 минут. Штаммы *V. cholerae* El Tor *ctxA*⁺ *tcpA*⁺ № Р-19613, 5879, 18332, 301; *ctxA*⁻ *tcpA*⁻ №№ 19754, 20000, 17817; *V. cholerae* Classical № 434 и *V. cholerae* nonO1/nonO139 № 30, выделенные в разные годы от людей и из воды поверхностных водоемов, добавляли в среду культивирования до конечной концентрации 10⁴ мк/мл. Работу проводили в соответствии с требованиями биологической безопасности [3]. Для удобства подсчета количества копий ДНК в ПЦР исследуемые пробы культивировали при 15 °С. Для постановки ПЦР фрагменты хитина извлекали стерильным пинцетом, трижды промывали в стерильном физиологическом растворе, несвязавшиеся клетки удаляли на стерильной фильтровальной бумаге и вносили в стандартные пробирки Эппендорфа емкостью 1,5 мл с 1,0 мл физраствора. Лизис клеток биопленки проводили путем прогревания в течение 30 минут при 99 °С. Полученные препараты использовали для постановки ПЦР в формате реального времени. Использовали систему праймер-зонд для выявления видоспецифичного для холерных вибрионов гена *hlyA* [8]. Наличие/отсутствие роста исследуемых штаммов параллельно подтверждали бактериологическим методом.

Для оценки способности холерных вибрионов десорбироваться из биопленки на хитиновом панцире речного рака в окружающую среду нами был введен показатель индекс десорбции, который рассчитывали как отношение количества копий ДНК в планктоне над хитиновыми пластинами к количеству копий ДНК в биопленке на фрагменте хитина. В ходе исследования установили, что к 17-м суткам культивирования у нетоксигенного штамма *V. cholerae* El Tor № 19754, выделенного из воды, показатель ИД уменьшился до 0,96 от первоначальных значений, у классического варианта холерных вибрионов № 434 — до 20,6 (количество копий ДНК/мл.). Снижение ИД, возможно, объясняется переходом холерных вибрионов из планктона в биопленку. К 35-м суткам инкубации (период наблюдения) у двух штаммов *V. cholerae* El Tor *ctxA*⁺ № 301 (вода), 5879 (человек) и *V. cholerae* nonO1/nonO139 № 30 *ctx*⁻ (вода) ИД увеличился от 2,3 до 3,7, от 1,9 до 3,3 и от 0,3 до 3,8 (количество копий ДНК/мл.) соответственно; еще у двух токсигенных штаммов холерных вибрионов Эль Тор 19613 (вода) и 18332 (человек) ИД уменьшился в три и два раза соответственно от первоначальных значений. Следует отметить, что способность *V. cholerae* Classical к переходу из состояния биопленки в планктон очень низкая. Индекс десорбции классического вибриона к концу периода наблюдения уменьшился от 6,2 до 0,1 (количество копий ДНК/мл.). У нетоксигенных штаммов холерных вибрионов El Tor к концу периода наблюдения ИД снизился в 3,6–5,7 раз. В этот же период ИД *V. cholerae* nonO1/nonO139 № 30 увеличился с 0,3 до 3,8 (количество копий ДНК/мл.) (табл. 1).

Таблица 1

Индекс десорбции зрелой биопленки *V. cholerae* на хитиновом панцире речного рака

№ штамма и наличие <i>ctx</i> -гена	Объект выделения	Сроки инкубации (сутки)								
		1	2	5	6	7	17	20	25	35
		ИД	ИД	ИД	ИД	ИД	ИД	ИД	ИД	ИД
O1 El Tor 5879 <i>ctx</i> ⁺	человек	1,9	0,91	1,12	1,0	2,7	1,2	2,8	1,2	3,3
O1 El Tor 18332 <i>ctx</i> ⁺	человек	4,1	0,6	0,8	1,7	2,8	1,3	1,5	2,1	2,1
O1 El Tor 19613 <i>ctx</i> ⁺	вода	3,0	1,2	2,8	1,9	0,3	0,7	0,9	0,4	1,0
O1 El Tor 19754 <i>ctx</i> ⁻	вода	5,5	2,7	2,5	0,9	2,9	5,7	2,3	3,6	5,0
O1 El Tor 301 <i>ctx</i> ⁺	вода	2,3	2,1	0,72	0,62	0,2	0,3	0,4	1,6	3,7
O1 El Tor 17817 <i>ctx</i> ⁻	вода	29,0	7,4	7,1	4,0	10,0	3,9	5,4	6,0	8,0
O1 El Tor 20000 <i>ctx</i> ⁻	вода	8,0	0,9	0,8	0,9	0,6	1,0	1,0	1,4	1,4
O1 Classical 434 <i>ctx</i> ⁺	человек	6,2	0,7	1,1	0,4	0,9	0,3	0,4	0,5	0,1
nonO1/nonO139 30 <i>ctx</i> ⁻	вода	0,3	0,8	2,6	1,9	2,0	1,6	4,0	3,0	3,8

Заключение

Таким образом, разработан доступный метод определения индекса десорбции зрелой биопленки холерных вибрионов различных серогрупп и токсигенности. Проведя сравнительный анализ показателя ИД, установили, что у токсигенных штаммов холерных вибрионов Эль Тор, независимо от объекта выделения, интенсивность биопленкообразования выше, чем у классического варианта возбудителя, нетоксигенных штаммов холерных вибрионов и *V. cholerae* по O1/O139. Разница в показателях ИД токсигенных штаммов *V. cholerae* El Tor, возможно, объясняется штаммовыми отличиями возбудителя. Разработанный нами метод может быть полезен для прогнозирования эпидемиологической ситуации, так как способность холерных вибрионов колонизировать объекты окружающей среды и переходить из биопленки в планктон может привести к распространению возбудителя за пределы эндемичных очагов и накоплению холерных вибрионов в случае заноса на территории, где он раньше не выявлялся.

Литература

1. Глушанова Н.А., Блинов А.И., Алексеева Н.Б. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека // Медицина в Кузбассе. — 2015. — № 2. — С. 30–35.
2. Окулич В.К., Плотников Ф.В., Кабанова А.А. Роль микробных биопленок в патогенезе инфекционных процессов на современном этапе // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2012. — № 4. — С. 70–82.
3. СП 1.3.3118-13. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). — М., 2014. — 197 с.
4. Чернявский В.И. Бактериальные биопленки и инфекции (лекция) // Annals of Mechnikov Institute. — 2013. — № 1. — Р. 86–90.
5. Akselman R., Jurquiza V., Costagliola M.C., Fraga S.G., Pichel M., Hozbor C. *Vibrio cholerae* O1 found attached to the dinoflagellate *Noctiluca scintillans* in Argentine shelf waters // J. Marine Bio-Innovation. — 2010. doi: 10.1017/S1755267210001077.
6. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases // Nat. Rev. Microbiol. — 2004. — Vol. 2(2). — Р. 95–108.
7. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun Sh., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio* // Front. Microbiol. — 2013. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00375.
8. Lyon W.J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — Vol. 67(10). — Р. 4685–4693.
9. Nahar S., Sultana M., Naser M.N., Nair G.B., Watanabe H., Ohnishi M., Yamamoto S., Endtz H., Cravioto A., Sack R.B., Hasan N.A., Sadique A., Huq A., Colwell R.R., Alam M. Role of shrimp chitin in the ecology of oxigenic and cholera transmission // Front Microbiol. — 2012. — Vol. 2. — Р. 260. doi:10.3389/fmicb.2011.00260.
10. Shikuma N.J. and Hadfield M.G. Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* // Biofouling. — 2010. — Vol. 26(1). — Р. 39–46. doi: 10.1080/08927010903282814.
11. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis // PLoS Neglected Tropical Diseases. — 2016. — Vol. 10(2). — e0004330. doi: 10.1371/journal.pntd.0004330.

DETERMINATION OF THE DESORPTION INDEX OF CHOLERA VIBRIOS OF VARIOUS SEROGROUPS AND TOXIGENICITY IN BIOFILM ON CHITINOUS CARAPACE OF CRAYFISH

E.A. MEN'SHIKOVA, E.M. KURBATOVA, S.O. VODOPYANOV, S.V. TITOVA, A.V. MIRONOVA

Rostov-on-Don Antiplague Institute

It is now known that more than 99% of bacteria exist in natural ecosystems not in the form of free-floating cells, but in the form of biofilms attached to a substrate (Biofilms). The formation of biofilms is a multi-stage process, the last stage of which is desorption, during which bacteria actively leave the biofilm, turning into a planktonic form. This process leads to dissemination of the pathogen and contamination of environmental objects. To determine the desorption index of cholera vibrios in a biofilm, a simple and convenient method was developed using chitin of broad-toed crayfish *Astacus astacus* as a biotic substrate. The method can be useful for predicting the epidemiological situation, since the ability of cholera vibrios to colonize environmental objects and transfer from biofilm to plankton can lead to the spread of the pathogen beyond the endemic foci and the accumulation of cholera vibrios in case of drift in territories where it was not previously detected.

Keywords: cholera vibrio, plankton, biofilm, pathogen dissemination, desorption index.

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ «ЗООНОРМ» И «ВЕТОМ 4» НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

С.В. СИДОРЕНКО*, Г.Ф. РЫЖКОВА

ФГБОУ ВО «Курская государственная сельскохозяйственная академия имени И.И. Иванова»

Рассмотрена возможность включения в рацион цыплят-бройлеров пробиотиков «Зоонорм» и «Ветом 4» в качестве разумной альтернативы современным кормовым антибиотикам. Изучено влияние пробиотиков на содержание общего белка и белковых фракций в сыворотке крови цыплят-бройлеров. Рассмотрено изменение ряда иммунологических показателей крови цыплят-бройлеров при включении в рацион пробиотиков.

Ключевые слова: пробиотики, иммуноглобулины, фагоцитарная активность, бактерицидная активность, лизоцимная активность, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, цыплята-бройлеры.

Введение

Содержание многотысячного поголовья современных кроссов сельскохозяйственной птицы на ограниченном пространстве неизбежно вызывает ряд проблем, приводящих к угнетению иммунной системы организма птицы, что нередко служит причиной всплеска заболеваемости. Зачастую эти проблемы связаны с нарушением нормального состава микробиоценоза кишечника, которое происходит под влиянием патогенной и условно-патогенной микрофлоры [1, 7].

На протяжении долгого времени средством контроля кишечной микрофлоры служили антибиотики. Однако в научной литературе появились данные, свидетельствующие о сохранении антибиотиков в органах и тканях птицы уже после убоя. Кроме того, в процессе длительного использования антибиотиков у некоторых микроорганизмов сформировалась устойчивость к их применению [4].

В связи с этим особенно острой стала необходимость поиска новых альтернативных препаратов, обеспечивающих наиболее полную реализацию генетического потенциала сельскохозяйственной птицы и в то же время обладающих доступностью и экологичностью. В качестве таких препаратов наиболее перспективными являются пробиотики, которые представляют собой существующие

или специально выведенные живые культуры микроорганизмов, предназначенные возместить недостаток собственной микрофлоры [3].

Поэтому целью настоящей работы явилось определение влияния пробиотических добавок «Зоонорм» и «Ветом 4» на иммунный статус цыплят-бройлеров.

Материалы и методы

Для реализации поставленной цели был проведен опыт в условиях вивария ОБУ «Курская областная ветеринарная лаборатория» на цыплятах-бройлерах кросса «Ross-308», которые выращивались 42 дня при клеточном содержании. Было сформировано 3 группы, в которые отбирали по 50 цыплят суточного возраста.

Кормление птиц всех групп осуществляли одинаковыми кормосмесями, соответствующими рекомендованным нормам кормления [8]. Контрольная группа получала только основной рацион. В рацион первой опытной группы дополнительно вводился пробиотик «Зоонорм» с титром 1×10^7 КОЕ *Bifidobacterium bifidum*, который добавлялся в воду. В рацион второй опытной группы добавлялся пробиотик «Ветом 4», в одном г которого содержится 1×10^6 КОЕ живых микробных клеток генетически модифицированного штамма бактерий *Vacillus subtilis* ВКПМ В-10641.

Забор крови осуществляли на 14-, 28- и 42-е сутки. Измерения общего белка и альбуминов проводили в течение часа на автоматическом биохимическом анализаторе «ВІОСНЕМ»; содержание Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов по реакции розеткообразования по И.Ю. Ездоковой, О.М. Чуйко, Е.О. Чадиной; фагоцитарную активность лейкоцитов — по методу В.М. Бермана и Е.М.

© 2019 г. Сидоренко С.В., Рыжкова Г.Ф.

* **Автор для переписки:**

Сидоренко С.В.

аспирант, ФГБОУ ВО «Курская государственная сельскохозяйственная академия имени И.И. Иванова»

E-mail: semen.sidorenko.92@mail.ru

Славской; иммуноглобулинов, α -, β -, γ -глобулинов — нефелометрическим методом; бактерицидную активность сыворотки крови — по методу Мишеля Теффера в модификации О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой; лизоцимную активность — фотоэлектроколлометрическим методом по А.Г. Дорофейчуку с изменением температурного режима реакции сыворотки крови кур с культурой *M. lisdecticus*.

Результаты и обсуждение

Иммуноглобулины представляют собой протеины, осуществляющие гуморальную защиту организма. Кроме того, их количество является показателем естественно приобретенного пассивного иммунитета [2]. В результате эксперимента были определены некоторые тенденции и закономерности в изменении количества иммуноглобулинов, а также их динамика, связанная с возрастом цыплят-бройлеров. Определяемые показатели представлены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови цыплят-бройлеров, г/л

Показатели	Контроль	«Ветом 4»	«Зоонорм»
14-е сутки			
Иммуноглобулин IgG	3,25±0,08	3,53±0,11	3,51±0,12
Иммуноглобулин IgA	2,08±0,07	2,21±0,08	2,19±0,06
Иммуноглобулин IgM	2,81±0,09	3,19±0,09	3,11±0,08
28-е сутки			
Иммуноглобулин IgG	3,12±0,08	3,17±0,08	3,51±0,04
Иммуноглобулин IgA	1,94±0,04	2,07±0,09	2,04±0,06
Иммуноглобулин IgM	2,69±0,06	2,94±0,07	2,79±0,03
42-е сутки			
Иммуноглобулин IgG	3,23±0,06	3,53±0,09	3,51±0,08
Иммуноглобулин IgA	2,09±0,07	2,31±0,08	2,24±0,07
Иммуноглобулин IgM	2,79±0,06	2,96±0,11	2,85±0,07

Примечание: $p < 0,05$

На 14-е сутки наблюдается превышение иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM в опытных группах относительно контрольной: IgG — на 8,62%, IgA — на 6,25%, IgM — на 13,52% в группе «Ветом 4»; IgG — на 8,00%, IgA — на 5,29%, IgM — на 10,68% в группе «Зоонорм». Однако на 28-е сутки наблюдалось понижение всех иммуноглобулинов во всех группах, но в опытных группах под влиянием пробиотических препаратов содержание иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM все же было выше. Из данных литературы известно, что этот период соответствует развитию второго возрастного иммунного де-

фицита цыплят-бройлеров, характеризующегося резким снижением иммуноглобулинов в сыворотке крови [5]. Наибольший упадок испытывает IgM, в меньшей степени снижаются IgG, IgM. На 42-е сутки тенденция более высокого содержания иммуноглобулинов в опытных группах также сохранялась. По-видимому, это подтверждает, что органы иммунной защиты у цыплят-бройлеров опытных групп начинают функционировать раньше.

На протяжении всего опыта, вместе с ростом и развитием цыплят наблюдалось достоверное повышение уровня белка в сыворотке крови с 14-х суток по 42-е во всех группах (табл. 2). Однако в опытных группах увеличение общего белка происходило более интенсивно. Так, в группе «Ветом 4» на 42-е сутки общего белка было на 34,58% больше, чем в контроле, а в группе «Зоонорм» — выше на 27,79%.

Таблица 2

Концентрация общего белка и его фракций в сыворотке крови цыплят-бройлеров

Возраст, сут.	Общий белок, г/л	Альбумины, г/л	Глобулины, г/л		
			α	β	γ
Контроль					
14	27,64±0,25	18,17±0,19	7,5±0,10	4,5±0,17	4,3±0,14
28	28,87±0,31	19,21±0,28	8,2±0,13	4,6±0,11	4,5±0,12
42	29,15±0,49	19,21±0,32	8,1±0,21	4,6±0,08	4,8±0,25
«Ветом 4»					
14	31,23±0,72	24,26±0,29	7,8±0,19	4,6±0,26	4,7±0,19
28	35,15±0,64	26,21±0,41	9,3±0,36	6,2±0,18	5,2±0,14
42	39,23±0,89	26,12±0,54	10,2±0,11	7,5±0,42	7,1±0,21
«Зоонорм»					
14	32,17±0,63	20,15±0,17	7,7±0,11	4,7±0,16	4,5±0,19
28	34,11±0,69	21,34±0,26	9,4±0,20	6,4±0,31	5,1±0,15
42	37,25±0,71	22,15±0,18	9,4±0,17	7,2±0,18	7,1±0,22

Примечание: $p < 0,05$

При анализе содержания белковых фракций было установлено, что содержание альбуминов в группе «Ветом 4» на 42-е сутки составило 26,12±0,24 г/л, а в группе «Зоонорм» — 22,15±0,18 г/л. Эти значения выше показателей контрольной группы соответственно на 35,97 и 15,30%. Количество альбумина является ключевым показателем, позволяющим оценить запасы белка в организме.

Итоги эксперимента отражают позитивное влияние внесения пробиотических добавок в рацион цыплят-бройлеров, так как альбумины являются резервом аминокислот для синтеза белка в организме. Кроме того, белки данной фракции, образуя отрицательно заряженные мицеллы с большой поверхностью, способны адсорбировать и транс-

портировать ряд веществ, таких как гормоны, токсины, билирубин, соли желчных кислот. То есть, наши данные согласуются с литературными сведениями [6].

В результате анализа глобулинов установлено, что значения концентрации глобулинов всех групп повышаются с ростом цыплят-бройлеров. Концентрация α -глобулинов на конец опыта в сыворотке крови составила: в группе «Ветом 4» — $10,2 \pm 0,11$ г/л, в группе «Зоонорм» — $9,4 \pm 0,17$ г/л, в контрольной группе — $8,1 \pm 0,21$ г/л. Полученные данные говорят о том, что уровень α -глобулинов в опытных группах достоверно выше относительно контрольной группы на 25,93 и 16,05% соответственно.

Уровень β -глобулинов в конце опыта составил: в группе «Ветом 4» — $7,5 \pm 0,42$ г/л, в группе «Зоонорм» — $7,2 \pm 0,18$ г/л и в контрольной группе — $4,6 \pm 0,08$ г/л. Следовательно, уровень β -глобулинов в сыворотке крови цыплят-бройлеров оказался выше в опытных группах относительно контрольной на 63,04 и 56,52% соответственно в группах «Ветом 4» и «Зоонорм».

Известно, что γ -глобулины принимают активное участие в специфических реакциях, связанных с защитой организма от инфекции и других негативных воздействий. На конец опыта значения γ -глобулинов в сыворотке крови цыплят-бройлеров составляли: в группе «Ветом» — $7,1 \pm 0,21$ г/л, в группе «Зоонорм» — $7,1 \pm 0,22$ г/л, в контрольной группе — $4,8 \pm 0,25$ г/л. Значения этого показателя в группах «Ветом 4» и «Зоонорм» выше контроля на 47,92%.

Таким образом, увеличение белков глобулиновой фракции в сыворотке крови цыплят-бройлеров опытных групп свидетельствует об усилении защитных функций организма птицы и подтверждает иммуностимулирующее действие пробиотических добавок.

Для определения состояния неспецифической резистентности были проведены исследования фагоцитарной, лизоцимной и бактерицидной активностей, а также было определено содержание Т- и В-лимфоцитов в крови. Результаты неспецифической резистентности у цыплят-бройлеров при добавлении им в рацион пробиотиков «Зоонорм» и «Ветом 4» приведены в таблице 3.

Таблица 3

Иммунологические показатели крови цыплят-бройлеров

Контрольная			«Ветом 4»			«Зоонорм»		
14	28	42	14	28	42	14	28	42
Фагоцитарная активность, %								
35,21±1,15	36,17±1,21	37,84±1,42	36,14±1,62	43,12±1,45	51,28±1,87	36,47±1,16	39,74±1,69	48,96±1,84
Бактерицидная активность, %								
47,15±1,75	50,14±1,84	53,21±1,69	48,21±1,96	53,19±1,67	59,12±1,78	48,56±1,85	52,11±1,87	54,13±1,96
Лизоцимная активность, %								
15,32±1,13	17,11±1,23	20,34±1,19	15,36±1,34	21,29±1,54	29,34±1,31	16,88±1,39	18,36±1,69	22,14±1,31
Т-лимфоциты, %								
12,36±1,08	12,89±1,36	13,11±1,12	12,91±1,42	15,39±1,31	18,57±1,41	13,26±1,15	14,58±1,45	15,63±1,19
В-лимфоциты, %								
15,26±1,20	16,11±1,22	16,98±1,37	15,49±1,31	17,36±1,19	19,68±1,32	15,28±1,28	18,36±1,34	18,54±1,27

Примечание: $p < 0,05$

В результате анализа таблицы 3 видно, что на 14-е сутки все определяемые показатели находились приблизительно на одном уровне, однако в пределах физиологической нормы.

Фагоцитарная активность характеризует способность фагоцитов захватывать и переваривать попавшую в организм патогенную микрофлору. На 42-е сутки значения фагоцитарной активности составили $51,28 \pm 1,08\%$ и $48,96 \pm 1,08\%$ в группах «Ветом 4» и «Зоонорм» соответственно, в контрольной группе это значение было ниже — $37,84 \pm 1,08\%$. Таким образом, на всем протяжении роста и развития цыплят значения фагоцитарной активности возрастали, однако в опытных группах эти значения были намного выше: на 35,52 и 29,39% в группах «Ветом 4» и «Зоонорм» соответственно.

Лизоцим — термостабильный белок, фермент, который влияет преимущественно на грамположительные бактерии: разрывает β -гликозидные связи аминсахаров в пептидогликане, что приводит к лизису пептидогликана и разрушению клеточной стенки бактерий. Значение лизоцимной активности на 42-е сутки у цыплят группы «Ветом 4» составило $29,34 \pm 1,08\%$, у цыплят группы «Зоонорм» — $22,14 \pm 1,08\%$, у цыплят контрольной группы — $20,34 \pm 1,08\%$. Следовательно, в конце опыта лизоцимная активность у цыплят бройлеров опытных групп была выше относительно контрольных показателей на 44,25 и 8,85% соответственно в группах «Ветом 4» и «Зоонорм».

При определении бактерицидной активности установлена аналогичная закономерность ее увеличения у цыплят-бройлеров опытных групп: в группе «Ветом

4» эта величина превысила значение контрольных показателей на 11,11, а в группе «Зоонорм» — на 1,73%.

В опытных группах цыплят-бройлеров наблюдалась тенденция к увеличению содержания Т-лимфоцитов. Так, на конец опыта значение этого показателя превысило контрольные значения на 41,65% в группе «Ветом 4» и на 19,22% в группе «Зоонорм». Содержание В-лимфоцитов в опытных группах на конец опыта также было выше относительно контрольных показателей на 15,90% в группе «Ветом 4» и на 9,19% в группе «Зоонорм».

Заключение

Анализ всех вышеприведенных данных позволяет сделать следующие выводы:

1. Под влиянием изучаемых пробиотиков происходит увеличение иммуноглобулинов, что свидетельствует об усилении защитных свойств организма.

2. Внесение в рацион цыплят-бройлеров пробиотиков «Ветом 4» и «Зоонорм» оказывает позитивное влияние на белковый спектр крови, способствуя увеличению альбуминов и α -, β - и γ -глобулинов и интенсификации белкового обмена. Кроме того, более высокое содержание глобулинов способствует усилению иммунной защиты, что подтверждает иммуностимулирующее действие пробиотиков «Зоонорм» и «Ветом 4».

3. Внесение пробиотиков «Зоонорм» и «Ветом 4» в рацион цыплят-бройлеров положительно влияет на лимфоцитопоез, на клеточный и гуморальный иммунитет, что подтверждает увеличение в крови цыплят опытных групп содержания Т- и В-лимфоцитов, а также увеличение относительно контрольных значений таких показателей, как фагоцитарная, бактерицидная, лизоцимная активности.

Таким образом, внесение пробиотиков «Зоонорм» и «Ветом 4» оказывает положительное влияние на механизмы неспецифической резистентности, способствует регенерации тканей, стимулирует иммуногенез, вследствие чего повышается устойчивость организма цыплят-бройлеров к негативным воздействиям, инфекциям и стрессам.

Литература

1. *Бабина М.П.* Иммунология цыплят-бройлеров в онтогенезе и профилактика иммунной недостаточности, желудочно-кишечных болезней бактериальными препаратами. — Витебск, 2001. — 114 с.
2. *Болотников И.А., Конопатов Ю.В.* Физиолого-биохимические основы иммунитета сельскохозяйственных птиц: учебное пособие. — Л.: Наука, 1987. — 164 с.
3. *Васильев А., Лысенко С.* Влияние пробиотиков на продуктивность цыплят-бройлеров и формирование кишечного микробиоценоза // Птицеводческое хозяйство. Птицефабрика, 2011. — № 7. — С. 21–25.
4. *Карпуть И.М., Бабина М.П.* Профилактика иммунных дефицитов и желудочно-кишечных болезней у цыплят-бройлеров // Ветеринария. — 2000. — № 1. — С. 41–44.
5. *Карпуть И.М., Бабина М.П.* Формирование иммунного статуса цыплят-бройлеров // Ветеринария. — 1996. — № 6. — С. 28–30.
6. *Клетикова Л.В., Бессарабов Б.Ф.* Особенности обмена белка, глюкозы и триглицеридов при введении в рацион цыплят пробиотических препаратов // Научный поиск. — 2012. — № 1. — С. 60–64.
7. *Тимошко М.А.* Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных. — Кишинев: Штиинца, 1990. — С. 6–26, 42–74, 106–122, 124–150.
8. *Фисинин В.И., Егоров И.А., Околелова Т.М., Имангулов Ш.А.* Кормление сельскохозяйственной птицы. — Сергиев Посад, 2004. — 375 с.

INFLUENCE OF «ZOONORM» AND «VETOM 4» PROBIOTICS ON MORPHOFUNCTIONAL AND BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD OF CHICKEN-BROILERS

S.V. SIDORENKO, G.F. RYZHKOVA

I.I. Ivanov Kursk State Agricultural Academy

The possibility of including probiotic Zoonorm and Vetom 4 in the ration of broiler chickens as a reasonable alternative to modern feed antibiotics is considered. The effect of probiotics on the content of total protein and protein fractions in the blood serum of broiler chickens was studied. The change in a number of immunological parameters of blood of broiler chickens with the inclusion of probiotics in the diet is considered.

Keywords: probiotics, immunoglobulins, phagocytic activity, bactericidal activity, lysozyme activity, T-lymphocytes, B-lymphocytes, broiler chickens.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МИКРОБНОМ РАЗНООБРАЗИИ КОЖИ

А.Ю. ШАТАЛОВА*, Е.С. БУЛЫГИНА, Т.Н. ГАЕВА, Н.В. СЛОБодОВА,
С.М. РАСТОРГУЕВ, С.В. ЦЫГАНКОВА, Ф.С. ШАРКО, Р.Г. ВАСИЛОВ

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

В обзоре представлены данные о микробном разнообразии кожи. Одним из важных факторов функционального состояния организма человека выступает его микробиота: относительная стабильность микробного пейзажа для каждой области тела. Поэтому актуальным направлением исследований на сегодняшний день продолжает оставаться изучение характеристики микробных сообществ как отдельных эпителиев (желудочно-кишечного и мочеполового тракта, кожи, дыхательных путей и т.д.), так и организма в целом. В свете исследований микробиоты кожи много работ посвящено этиопатологической роли микроорганизмов в развитии тех или иных кожных патологий, а также характеристике микробиоты кожи при кожных заболеваниях. Благодаря стремительному развитию методов метагеномного и метаболомного анализа расширилось представление не только о микробном разнообразии кожи и его динамике изменчивости под действием различных факторов внешней и внутренней среды, но также о сложных связях внутри микробного сообщества и механизмах взаимодействия микроорганизмов с кожей человека. Направленное воздействие на конкретное звено микробиоты кожи может представлять собой абсолютно новый подход как в поддержании здорового физиологического состояния, так и в терапии и профилактике многих заболеваний кожи. Таким образом, исследование микробиоты кожи и функциональной значимости ее представителей до сих пор остается одним из актуальнейших вопросов фармацевтической и медицинской науки в целом.

Ключевые слова: микробиота, микробиом, микроорганизмы, комменсалы, микробное разнообразие, метагеномное секвенирование, кожный барьер.

Введение

Кожа представляет собой сложный многофункциональный орган с наибольшей поверхностью, который является внешним покровом всего организма и служит барьером, отделяющим и сохраняющим целостность и внутренний гомеостаз от внешней среды. Кожа человека колонизирована множеством различных групп микроорганизмов (МкО), совокупность которых называется микробиотой. Микробиота кожного покрова представляет собой динамическую взаиморегулируемую эволюционно сложившуюся систему, обеспечивающую оптимальное микробное состояние организма [3]. Большая часть МкО состоит в симбиотических отношениях с эпидермальными клетками. Такое взаимодействие обусловлено сложными сигнальными механизмами, реализуемыми за счет врож-

денного и приобретенного иммунитета. Микробиота кожи также напрямую связана с эпидермальным барьером, который обеспечивает коже основную функцию защиты. Таким образом, любой дисбаланс (качественный, количественный, нарушение метаболизма) в комменсальной (то есть симбиотической) экосистеме кожи может привести к нарушению функционирования разных иммунных путей, что, в свою очередь, может способствовать развитию патологических состояний кожи и, наоборот, любая эпидермальная дисфункция и иммунная дисрегуляция могут привести к нарушению микробного равновесия в пользу роста патогенного звена. Поэтому для поддержания здорового функционирования кожи необходим баланс между ее барьерной и иммунной системами и покровной микробиотой [3, 20]. Микробный баланс кожи поддерживается слегка кислым рН, низким содержанием влаги, высоким содержанием липидов, а также присутствием антимикробных пептидов (АМП) [56]. Всех обитателей микробного сообщества, колонизирующих кожу, можно разделить на две группы: резидентные (постоянные) и транзиторные (временные). Резидентная микрофлора представлена, в основном, *Corynebacterium*, *Cutibacterium* (ранее *Propionibacterium*), *Staphylococcus*, *Diphtheroides*,

© 2019 г. Шаталова А.Ю., Булыгина Е.С., Гаева Т.Н., Слободова Н.В., Расторгуев С.М., Цыганкова С.В., Шарко Ф.С., Василов Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Шаталова Анна Юрьевна
НИЦ «Курчатовский институт»
E-mail: Doc.shatalova@mail.ru

Micrococcus, дрожжеподобными грибами рода *Malassezia*. Представители резидентной флоры в своем большинстве относятся к комменсалам и являются непатогенными или условно-патогенными микроорганизмами (УПМ). К транзитной части микробиоты относятся временно присутствующие на коже МкО, которые попадают на нее в результате контакта с окружающей средой и могут находиться на ней до нескольких дней. Как правило, обе группы МкО не обнаруживают патогенных свойств, однако в неблагоприятных условиях комменсальные УПМ могут проявлять себя как патогены. Например, *S. aureus* может быть как резидентным МкО, так и важным патогеном при пиодермиях или атопическом дерматите (АтД) [20, 23]. В свете функционального предназначения микробиоты кожи стоит отметить ее участие в поддержании pH, в становлении и стимуляции иммунной и барьерной функций кожи, предотвращении абсорбции токсических веществ, в обеспечении колонизационной резистентности путем конкуренции за питательные субстраты, тем самым затрудняя заселение и развитие других условно-патогенных и патогенных МкО. Кроме того, микробиота кожи участвует в регуляции запаха тела, что определяет индивидуальную особенность каждого человека [1, 58].

Целью настоящего обзора является представить существующие на сегодняшний день сведения о состоянии микробиоты кожи и динамике ее изменчивости в зависимости от влияния факторов внешней и внутренней среды, о взаимодействии микробиоты с кожей, а также о современных методах исследования и способах, воздействующих на ее модуляцию.

Современные методы исследования микробиоты кожной экосистемы

В течение последних нескольких лет наблюдается всплеск исследований в области кожной микробиоты. До недавнего времени единственным подходом к исследованиям в этом направлении был бактериологический метод. Однако данный метод представляет собой достаточно сложный, трудоемкий процесс, требующий длительного времени выполнения. Помимо этого, существенным недостатком указанного метода является трудность культивирования большинства представителей микробного сообщества. Так, анаэробные МкО зачастую крайне медленно растут на стандартных культуральных средах и требуют создания особых условий для своего роста, транспортировки и обработки образцов, а культивирование вирусов возможно только в организме восприимчивых животных, в клетках куриных эмбрионов и клеточных культурах тканей [23]. Поэтому появление молекулярно-биологических методов исследования,

основанных на прямой детекции генома МкО и не зависящих от необходимости их культивирования, не только облегчило и ускорило процесс самого исследования и получения готовых результатов, но и значительно расширило представление об истинном многообразии микробного пейзажа, о сложном взаимодействии внутри микробиоты и ее связи с физиологией кожи, а также о роли МкО в патогенезе некоторых дерматозов [31, 73]. Методы молекулярно-биологической идентификации МкО постоянно совершенствуются, а метагеномика представляет собой наиболее быстро развивающееся направление исследований [61]. На данных метагеномного секвенирования основаны результаты большинства современных работ по исследованию микробиома человека. Для идентификации бактерий используется ген 16S рибосомальной РНК (16S рРНК), тогда как грибы и другие микроэукариоты идентифицируются с использованием либо гена 18S рРНК, либо области внутреннего транскрибированного спейсера (ITS). Стоит отметить, что все молекулярно-биологические методы, применяемые для расшифровки таксономического и функционального разнообразия МкО, ни в коем случае не заменяют, а только дополняют традиционные методы, основанные на бактериологическом подходе [15, 22, 23, 31]. Только в отличие от последнего позволяют идентифицировать более широкий спектр микробов (бактерии, вирусы, грибы, археи, простейшие) и изучать их разнообразные генотипы. Кроме того, преимуществом молекулярно-биологических методов последнего поколения служит возможность одномоментной, параллельной и точной детекции большого количества нуклеотидных последовательностей, что также увеличивает их производительность [61].

С целью изучения микробиома человека начали формироваться научные консорциумы. На сегодняшний день одной из ведущих организаций по изучению кожного микробиома человека с помощью новых высокопроизводительных технологий является американский консорциум НМР (проект «Микробиом человека»), основанный в 2007 году при поддержке общего фонда Национального института здоровья США [10, 48]. Одно из крупнейших исследований НМР-проекта по анализу кожного микробиома завершилось в 2012 году, в рамках которого была изучена поверхность 18 участков кожи более чем у 240 здоровых людей. В результате этого впервые была показана сложная природа микробных сообществ кожи и проанализировано их разнообразие на топографически отличных участках тела [35]. В 2014 г. были успешно созданы библиотеки метагеномных профилей МкО по отдельным топографическим участкам, которые исполь-

зовались для выявления генетических признаков видов, в том числе не имеющих эталонных геномов [51]. Методы молекулярного секвенирования на основе микробиомных данных позволили вести разработку точных молекулярных сигнатур для диагностики заболеваний кожи, в частности псориаза [63]. Также с помощью геномных и метагеномных исследований появилась возможность изучать полную последовательность генома особо значимых МкО. В результате этого стало очевидным, что некоторые комменсальные МкО состоят из филогенетически различных кластерных групп с отличающимися патогенными свойствами и только часть из них участвует в патогенезе кожных заболеваний. Таким образом, данные методы позволили осуществлять мониторинг генетической вариабельности МкО, их патогенности и распространенности [21].

Методы протеомного и метаболомного анализа в дополнение к метагеномным исследованиям позволили расширить представления о сложном взаимодействии эпителиальных тканей человека с заселяющей их микробиотой, а также в ряде случаев объяснить возникающую патогенность и вирулентность комменсальных МкО. На основании созданных трехмерных топографических карт, показывающих распределение на коже метаболитов, пептидов и бактерий, сформированных на базе данных UPLC-QTOF, MALDI-TOF и данных последовательностей ампликонов 16S рРНК, стало возможным сделать вывод о том, что человеческая кожа состоит не только из молекул, полученных из человеческих или бактериальных клеток, а содержит химические вещества — следы взаимодействия кожи с окружающей средой [10]. В 2019 г. был разработан алгоритм, который позволяет идентифицировать целую группу низкомолекулярных химических соединений, закодированных в микробиоме человека [65]. Таким образом, дальнейшие исследования в данном направлении смогут помочь лучше понять разнообразие химического состава поверхности кожи и его корреляцию с локализацией МкО на коже, а также то, как химический состав кожи меняется со временем при переменных условиях окружающей среды, в том числе при кожных заболеваниях, или то, как изменения химического состава могут повлиять на динамику микробного равновесия. Также подобные исследования представляются перспективными в решении вопроса о регулировании сложного взаимодействия МкО с патологически измененной и здоровой кожей.

Особенности кожной микробиоты при воздействии факторов внешней и внутренней среды

Каждый человек обладает индивидуальной структурой микробиоты кожи с заметными таксономическими

отличиями между разными частями тела и эволюцией во времени в зависимости от сочетанного действия следующих внешних и внутренних условий:

- различный уровень таких показателей кожи, как рН, влажность, плотность залегания сальных и потовых желез, количество выделяемого ими секрета, температура;
- физиологические особенности человека: возраст, пол, способ рождения, состояние эпидермального барьера, иммунной и эндокринной систем, способ питания;
- специфические факторы окружающей среды: место проживания, образ жизни, род деятельности, использование антибактериальных препаратов (АБП), косметики, моющих средств, влияние ультрафиолетового излучения (УФИ) [31, 60].

Микробная колонизация кожи человека начинается в процессе и сразу после его рождения, когда новорожденный впервые подвергается воздействию широкого спектра МкО из различных источников, включая материнские бактерии. При этом, проходя через родовые пути, кожа ребенка заселяется МкО, идентичными влагалищному эпителию с преобладанием *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium*, *Sneathia*. Доминирующими же видами МкО на коже младенцев, родившихся путем кесарева сечения, являются в основном *Staphylococcus*, что, по мнению ряда авторов, объясняет более высокую восприимчивость кожи этих детей к определенным патогенным МкО [18]. Кроме того, было установлено, что уже в младенческом возрасте микробиота кожи подвергается своему критическому созреванию. К тому же в течение первых трех месяцев отмечается ее топографическая дифференцировка. В зависимости от того, какими МкО будет заселена кожа в этот возрастной период, так и будет проходить процесс формирования иммунной и барьерной функций кожи; поэтому важно, чтобы преобладала колонизация комменсалами [12]. Значительные изменения в качественном составе микробиоты происходят в период полового созревания и ассоциируются с присутствием *Bacteroidetes*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium* в большой, а также уменьшенной численности *Firmicutes*, включая виды *Staphylococcus*, *Streptococcus*. Далее постепенно микробиота кожи подростка начинает походить на микробиоту взрослого человека [52]. Основываясь на секвенировании генов 16SpРНК, было выявлено, что большинство МкО здоровой кожи взрослого человека является представителями типов: *Actinobacteria* (доминирующие рода *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*) — 36,6%, *Firmicutes* (доминирующие рода *Staphylococcus*,

Streptococcus и *Lactobacillus*) — 34,3%, *Proteobacteria* (превалируют *Paracoccus*, *Hematobacter*) — 11,9% и *Bacteroidetes* (превалируют *Prevotella*, *Porphyromonas*) — 9,5%. Эти же типы МкО также преобладают у здорового человека в микробиоте желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), однако отличаются по своему соотношению [15, 31, 35, 64]. Между тем некоторые участки кожи демон-

стрируют большее микробное разнообразие, нежели чем в кишечнике или ротовой полости [15]. Также, в отличие от ЖКТ, кожа имеет более высокую грибковую и вирусную обсемененность [25, 51].

Вариабельность состава микробных сообществ определяется местом топографического расположения на коже (табл. 1) [15, 24, 31, 73].

Таблица 1

Преобладающие комменсальные МкО на различных участках кожи

Категория отличающихся по физиологии участков кожи	Топография участков кожного покрова	Преобладающие МкО на данных участках	Источник
Себорейные участки	Лоб, нос, переносица, подбородок, ретроаурикулярная складка, волосистая часть головы, верхняя часть спины, грудь	<i>Cutibacterium</i> (60–80%)	[15, 24, 73]
Влажные участки	Область пупка, подмышечные впадины, паховые складки, подошвы стоп, антекубитальные и подколенные ямки	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> . В меньшей степени <i>Cutibacterium</i> (20–40%)	[31, 15]
Сухие участки	Кожа верхних и нижних конечностей (кисти, предплечья, плечи, ягодицы, бедра, голени, тыл стоп)	<i>Staphylococcus</i> , <i>Cutibacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enhydrobacter</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Proteobacteria</i>	[73]

Таким образом, видно, что наибольшим микробным разнообразием обладают сухие участки кожи. Особое внимание отводится микробиоте подмышечных впадин, где на фоне большого числа бактерий доминируют *Corynebacterium*, *Staphylococcus* и *Betaproteobacteria*. Было установлено, что за сильный запах в области подмышек отвечают именно коринебактерии [74]. Особенности обладают те участки кожи, которые находятся на границе со слизистыми эпитопами и определяются МкО, преобладающими в этих экологических нишах. Так, например, в области наружного отверстия ноздрей идентифицируются комменсальные бактерии, *Branhamella spp.*, обычно заселяющие верхние дыхательные пути, а на коже промежности — *Lactobacillus spp.*, доминирующие во влажном эпитопе [15]. При этом установлено, что изменения рН кожи коррелируют с изменениями относительного содержания *Corynebacterium*, тогда как уровень себума (секрета сальных желез) и влажности на коже — с распространенностью *Cutibacterium* [73]. Было доказано, что бактериальные и грибковые сообщества себорейных участков кожи наиболее стабильны на протяжении длительного времени по сравнению, например, с сухими участками, где отмечается высокая приживаемость МкО из других эпитопов и участков кожи [15, 51].

При анализе микробиома кожи с одного и того же участка, например, кистей рук, было продемонстрировано, что при относительно индивидуальном разнообразии исследуемого локуса в среднем только в 17% случаев отмечалось сходство микробного состава между двумя руками [22] и только 10–13% видов идентифицированных МкО были общими среди всех испытуемых [22, 29]. Большая часть такого разнообразия между людьми, по мнению ряда авторов, обусловлена гендерными и физиологическими особенностями кожи, а также предшествующими гигиеническими мероприятиями [22, 31]. Недавние исследования демонстрируют, что социальное, семейное и профессиональное взаимодействие также влияет на формирование микробной идентичности кожи человека. Так, члены семьи, проживающие в одном и том же доме, имеют гораздо большее сходство среди комменсальных МкО, чем незнакомцы. Состав же микробиоты кожи владельцев домашних животных схож с бактериальными сообществами, присутствующими на коже проживающих с ними питомцев [62]. Похожие результаты были получены при изучении микробиоты после тактильного взаимодействия по средствам контактных видов спорта (дерби). В результате этого было выявлено, что микробные сообщества у членов обеих команд после окончания поединка стали более похожими друг на друга;

при этом прослеживалось и то, что внутри каждой команды сохранился свой постоянный микробный отпечаток [43]. Однако результаты этих исследований не указывают на то, как долго сохраняются подобные изменения кожного микробиома после тактильного контакта. Американским обществом микробиологии в 2019 году были опубликованы данные о том, что после 10-минутного плавания в океане микробиота кожи у всех участников эксперимента претерпела значительные модификации, сохраняющиеся более 24 часов. Обращало на себя внимание, что преобладающими МкО, присутствующими на коже после купания, были представители рода *Vibrio*, в том числе и его патогенные виды [6].

Анализ динамики состава микробного сообщества кожи в зависимости от места проживания людей (город, село), возраста и пола показал, что у взрослых людей 25–35 лет микробиота кожи наиболее разнообразна по сравнению с пожилыми людьми и подростками. Самое низкое разнообразие микробов на коже выявлено у мужчин пожилого возраста, проживающих в сельской местности. Однако у пожилых людей наблюдаются наибольшие внутригрупповые вариации, по сравнению с другими возрастными группами, с преобладанием у первых МкО типа *Proteobacteria*. Относительная численность некоторых представителей семейства *Enterobacteriaceae* значительно выше у городских жителей по сравнению с сельчанами. Среди взрослого населения города доля *Cutibacterium* на сухих участках была значительно выше, чем у сельских жителей, у которых чаще данный тип МкО идентифицировался на себорейных областях кожи. В отношении *Corynebacterium* наблюдалась противоположная картина. У подростков же на сухих участках кожи преобладали *Sphingomonas* и *Streptococcus* [73]. От 12 до 20% варибельности состава кожного микробиома объясняется действием совокупности демографических и национальных факторов. Так, у китайцев, по мере приближения к старости постепенно снижается численность *Firmicutes*, в частности *St. aureus*, в отличие, например, от японцев старше 60 лет, у которых уменьшается численность *Cutibacterium* [16]. Интересные результаты были получены в 2019 г., показывающие, что в возрасте 40–49 лет на коже человека присутствуют два взаимоисключающих вида коринебактерий: *C. kroppenstedtii* и *C. amycolatum*. При этом первый из них чаще доминирует и способен подавлять коринебактерии, продуцирующие АМП, что может способствовать большей восприимчивости кожи к патогенным МкО в период старения. Сам по себе *C. kroppenstedtii* не является патогеном, однако наличие в нем гена нейраминидазы делает его таковым [16]. Данное

исследование может способствовать освоению нового направления anti-age подхода в коррекции возрастных изменений путем воздействия на конкретные МкО, появление которых с возрастом нежелательно. Анализ гендерных особенностей микробиоты показал, что относительная численность бактериальной части микробиоты значительно различается у мужчин и женщин [74].

Стоит отметить, что подавляющее большинство исследований, направленных на изучение микробиома кожи, в основном сосредоточено на характеристике бактериального сегмента и только немногие охватывают анализ таких представителей микрофлоры, как вирусы, грибы, паразиты и археи [15, 60]. По данным Probst A. J. et al. (2013), археи составляют до 4,2% прокариотического микробиома кожи [57]. Структура архейного сообщества в основном представлена следующими типами: *Thaumarchaeota* (88%) и *Euryarchaeota* (22%). Археи более распространены у людей в возрасте до 12 и старше 60 лет по сравнению с людьми среднего возраста [44], что открывает новые возможности в области создания эффективных косметических anti-age средств (направленных против старения), способных избирательно действовать на коррекцию архейного звена микробиома на возрастной коже [57]. Однако перед этим еще предстоит выяснить метаболическую активность архей, их взаимодействие с эпидермисом кожи, влияние на здоровье и патологию кожи, изменчивость при патологических состояниях организма, потому что в настоящее время данные вопросы остаются неизученными.

Среди всех присутствующих грибов, колонизирующих здоровую кожу человека, наиболее часто (до 80%) встречаются различные виды *Malassezia*, распространение которых зависит от уровня липидов себума. Таким образом, *Malassezia* преобладает в основном на себорейных участках кожи [27, 28], однако может находиться и на участках с низким количеством сальных желез, например, в области антекубитальных ямок, предплечий, ладоней, подошв и пальцев ног. При этом данные участки демонстрируют меньшее фенотипическое разнообразие, но большую стабильность с течением времени, из них только кожа подошв отличается максимальным микробным разнообразием, где, помимо *Malassezia*, встречаются такие грибы, как *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* и *Epicoccum* [24]. Наиболее часто идентифицируемыми видами среди *Malassezia* являются *M. sympodialis*, *M. globosa* и *M. restita*, присутствие которых не зависит от страны проживания человека. Колонизация же остальными видами *Malassezia*, как правило, варьирует в зависимости от места и качества проживания [28]. Грибы *Malassezia* играют

важную роль в патогенезе таких кожных заболеваний, как отрубевидный лишай, себорейный дерматит, а также псориаз и фолликулит. Обладая высокой иммуногенной активностью, данный МкО способен инициировать IgE-опосредованный ответ, тем самым участвуя в инициации, обострении и прогрессировании аллергодерматозов, в том числе АгД и экземы [27].

С развитием молекулярно-биологических методов исследования особое внимание стало отводиться детальному изучению генетического разнообразия и эпидемиологии вирусов, заселяющих кожу. Результаты многочисленных исследований последних лет подтверждают существование довольно-таки многообразного и сложного кожного виroma, с преобладанием папилломавирусов (ВПЧ) [25]. Контаминация кожи ВПЧ может происходить достаточно рано у младенцев и детей младшего возраста [7]. Общая распространенность ВПЧ в популяции взрослых людей, согласно исследованию [25], составила 68,9% и была самой высокой на коже (61,3%) по сравнению с другими эпитопами. Также отмечается высокий уровень распространенности ВПЧ среди людей разных рас вне зависимости от места проживания. Высокая степень видового разнообразия ВПЧ наблюдается у жителей Скандинавии. Обращает внимание то, что некоторые генотипы ВПЧ, например, 5-й, могут быть распространены повсеместно и встречаются на коже людей, проживающих на разных континентах [7]. Согласно последним данным, виром здоровой кожи человека, помимо ВПЧ, также представлен семействами полиомавирусов и цирковирусов. При этом отмечено, что уровень генетического разнообразия среди видов полиомавируса на коже не является высоким [26]. На сегодняшний день уже доказана роль ВПЧ в пролиферативных нарушениях кожи и онкопатологии. Существует достаточно данных *in vitro* и *in vivo*, все больше свидетельствующих о том, что некоторые комменсальные ВПЧ играют ключевую роль в патогенезе плоскоклеточного рака кожи (ПКРК) [13], а также могут служить кофактором в развитии меланомы и модуляции ее более агрессивного фенотипа [19]. В последнее время обсуждается роль полиомавирусов в онкогенезе по причине их способности кодировать онкопротеины LT-ag и ST-ag. Однако участие большинства полиомавирусов в онкогенезе остается спорным вопросом. Единственным генотипом полиомавируса, роль которого в развитии редкой, но крайне агрессивной опухоли кожи (клеточной карциномы Меркеля) доказана, является МСРyV [30]. Все это способствует продолжению более подробного изучения виroma кожи и его потенциальной роли.

Клещи вида *Demodex* относятся к типу членистоногих, постоянно обитающих в пилосебационных

комплексах. Предполагается, что эфир холестерина может быть подходящей средой для роста и пролиферации *Demodex*, что может определять его расположение на коже. Однако роль данного вида клещей в качестве комменсалов кожи на сегодняшний день изучена недостаточно, но недавние исследования морфологии клеща *Demodex* выявили его непосредственное участие в патогенезе такого дерматоза, как розовые угри (розацеа) [38].

Влияние микробиоты кишечника на кожу

На основании многих исследований становится очевидным тот факт, что микробиота человека функционирует как единая взаимосвязанная система, поэтому микробиом кишечника оказывает значительное влияние на состояние микробиома кожи, однако механизмы такого взаимодействия изучены еще недостаточно. Короткоцепочечные жирные кислоты (Short-chain fatty acids, SCFAs) являются важными метаболитами кишечной микробиоты, которые образуются в результате ферментации пищи, богатой клетчаткой или неусваиваемыми углеводами. Они обладают иммуномодулирующим и противовоспалительным действием. Известно, что SCFAs поддерживают здоровую среду в кишечнике, а многие заболевания, развивающиеся при старении организма, связаны с уменьшением количества именно SCFAs. Считается, что SCFAs играют одну из ключевых ролей в формировании кожной микробиоты. Таким образом, можно предположить, что употребление продуктов, богатых клетчаткой, будет способствовать формированию здоровой микробиоты кожи [54, 69]. Также установлена корреляционная связь между некоторыми кожными заболеваниями, например, такими, как АгД и другие аллергодерматозы, псориаз, розацеа, акне, с нарушением работы ЖКТ, в том числе дисбактериозом кишечной биоты. Известно, что дисбактериоз кишечника приводит к образованию хронического системного воспаления, к снижению SCFAs и накоплению токсичных метаболитов, в том числе и в коже, что вызывает нарушение дифференцировки эпидермиса и процесса кератинизации. Клинически такая кожа может выглядеть сухой, бледной, обезвоженной, с признаками гиперкератоза, раздражения и воспаления [69]. Ряд доклинических и клинических исследований показывает благотворное воздействие кишечных лактобактерий на внешний вид кожи при пероральном введении, которое проявляется в улучшении ее барьерных свойств путем снижения трансэпидермальной потери воды (ТЭПВ) [34, 50, 54]. К настоящему моменту накоплены данные о том, что пероральный прием пробиотических бактерий кишечного происхождения сокращает время заживления кожи после длительного воздействия УФИ, например, при применении *Lactobacillus johnsonii* [33],

Bifidobacterium breve [59], а также очищенной липотейховой кислоты, полученной из *Lactobacillus rhamnosus* [72]. Учитывая способность непатогенной кишечной микрофлоры и их метаболитов или структурных компонентов клеток восстанавливать кожный барьер, оказывать увлажняющий эффект и повышать репаративный потенциал кожи, актуальным остается вопрос изучения терапевтического потенциала про- и постбиотических препаратов системного и наружного применения или их сочетанного воздействия не только в дерматологии, но и в косметологии [54, 69].

Связь кожной микрофлоры с иммунной функцией кожи

Известно, что комменсальная микрофлора кожи модулирует и поддерживает врожденный и приобретенный иммунный ответ, способствуя выработке в клетках кожи интерлейкинов, системы комплемента и антимикробных пептидов [14, 71]. При этом комменсальные и патогенные МКО активируют разные сигнальные пути. Комменсалы, например, индуцируют экспрессию АМП в кератиноцитах через Toll-подобные рецепторы 2, эпидермальный фактор роста и стимуляцию экспрессии в них нуклеарного фактора каппа-би (NF-κB), патогены же стимулируют выработку митоген-активируемой протеинкиназы, сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназа/киназа АКТ и путем подавления активации NF-κB. Кроме того, комменсальные бактерии способны блокировать подавление NF-κB, что также усиливает иммунный ответ кератиноцитов против патогенных МКО [71]. Большинство комменсалов кожной микрофлоры способно самостоятельно производить различные АМП, тем самым напрямую ограничивая рост близкородственных видов бактерий, не вредя при этом себе [42, 47, 67]. У *S. acnes* обнаружена способность подавлять рост золотистого стафилококка, устойчивого к метилциллину, путем сбраживания глицерина и снижения рН внутри патогена. Данное исследование может открыть новые направления в изучении биологической функции микрофлоры кожи, а концепция ферментации может быть основой принципиально нового терапевтического подхода в лечении инфекций, ассоциированных с *S. aureus*, резистентного к АБП [5].

Связь микрофлоры кожи с ее барьерной функцией

Эпидермальный барьер, представленный корнеоцитами и липидной субстанцией эпидермиса (ЛСЭ), обеспечивает не только защиту от действия внешних факторов, но и от потери собственных полезных веществ, в том числе воды, создавая оптимальный уровень гидратации в коже. Хорошее состояние эпидермального барьера обеспечивает здоровый внешний вид и нормальное функ-

ционирование кожи, в том числе хорошую репаративную способность [8]. Была доказана роль отдельных МКО в процессе репарации поверхностных ран. При этом было установлено, что *Cutibacterium* представляет доминирующий род в первые дни после повреждения кожи у женщин, у мужчин же превалирует *Corinebacterium*. Следует отметить, что восстановление изначального баланса кожной микрофлоры происходит к 14-му дню после повреждения [74]. При многих заболеваниях кожи структура и, следовательно, физиология эпидермального барьера также нарушены. Поэтому такие заболевания, как АТД, псориаз, экзема, акне и т.д., имеют свои характерные особенности микрофлоры, а изучению этого вопроса посвящено сегодня достаточно статей. Дополнительно эпидермальный барьер нарушается вследствие длительного наружного использования лекарственных средств, включая антибактериальные и кортикостероидные препараты [23]. В свое время исследователи предположили, что восстановление кожного барьера может привести к изменению также и микробного соотношения в сторону здорового. Эта гипотеза была подтверждена в исследовании [36], когда на фоне терапии, направленной на восстановление кожного барьера при АТД, численность *S. aureus* и *S. epidermidis* значительно снизилась, по сравнению с доминированием численности этих МКО на исходном этапе до начала лечения. Также наблюдался рост *Streptococcus*, *Cutibacterium* и *Corynebacterium*. Сегодня большинство обращений к косметологу связано с жалобами на сухость, повышенную чувствительность и реактивность кожи, что может свидетельствовать о нарушенном эпидермальном барьере, к тому же многие процедуры в эстетической медицине являются агрессивными для кожи и направлены на нарушение целостности ее покрова. Поэтому данную концепцию модуляции микробиомы кожи путем восстановления эпидермального барьера справедливо применять и в косметологии.

Уровень гидратации рогового слоя эпидермиса, обеспечиваемый состоянием эпидермального барьера, также влияет на состав МКО, колонизирующих ее поверхность. На хорошо гидратированной коже микрофлора является более однообразной, чем на сухой. Было установлено, что при увеличении степени гидратации кожи путем нанесения базовой косметики уменьшается общее разнообразие микрофлоры за счет *Cutibacterium*, *Staphylococcus* и *Corynebacterium*, тогда как количество *Ralstonia* увеличивается. Микроорганизм *Ralstonia* не относится к доминирующим видам, но имеет способность метаболизировать компоненты косметики. Также было обнаружено, что использование косметики не вызывает изменения равно-

весия в бактериальных сообществах в группе с изначально низким уровнем гидратации кожи [39].

Взаимосвязь микробиоты с кожей всегда двусторонняя. С одной стороны, физиологическое и физико-химическое состояние кожи влияет на покровное биоразнообразие посредством иммунной ответной реакции, десквамации эпидермиса, уровня рН, гидратации, антимикробного эффекта некоторых жирных кислот себума, АМП кератиноцитов и т.д. С другой стороны, микробиота кожи оказывает воздействие на физиологическое состояние кожи и ее барьер путем выработки ферментов, например, протеаз, которые влияют на процесс десквамации, или липаз, выделяемых *Cutibacterium spp.* и способных расщеплять триглицериды себума до свободных жирных кислот. Жирные кислоты, в свою очередь, вносят вклад в поддержание рН кожи, но могут оказывать также и негативное воздействие, особенно при переизбытке [1, 39]. Негативный эффект свободных жирных кислот заключается в реализации провоспалительного и комедоногенного эффекта, а также в повышении адгезии между *Cutibacterium acnes* и клетками волосяного фолликула, что приводит к формированию биопленки. В связи с этим *Cutibacterium* являются одним из основных факторов в патогенезе акне [1]. *S. acnes* также вырабатывает фермент гиалуронан-лиазу, расщепляющий компоненты внеклеточного матрикса кожи, определяя тем самым один из механизмов своей патогенности [49]. Золотистый стафилококк вырабатывает фермент церамидазу, который разрушает церамиды, преобладающие в составе ЛСЭ и являющиеся основными влагоудерживающими молекулами [53]. В свою очередь, дефицит церамидов способствует нарушению кожного барьера. Однако обращает на себя внимание тот факт, что продукт микробного расщепления церамидов, сфингозин, обладает противомикробными свойствами, в том числе, и в отношении *S. aureus* [9]. *Malassezia furfur* производит азелаиновую кислоту, которая ценится в косметологии и дерматологии благодаря своим способностям не только ингибировать рост *S. acnes* и *S. epidermidis*, но и снижать образование комедонов, уменьшать чрезмерное ороговение, поглощать свободные радикалы, снижать уровень пигментации, ингибировать 5α -редуктазу и уменьшать воспаление [1].

Влияние косметики на микробное разнообразие кожи

Сегодня уже нельзя представить человека, который бы не пользовался продуктами косметической промышленности, включающими в себя достаточно разнообразные средства по уходу за кожей, волосами, ногтями. Доказано, что любой химический компонент, в особенности синте-

тической природы, в составе косметического средства способен оказывать влияние на микробиоту прямым путем, непосредственно стимулируя или угнетая выработку тех или иных МкО и образование в них определенных метаболитов, или оказывая опосредованное влияние через изменение физико-химического состояния кожи [2, 11, 17, 64, 70]. Однако всеобъемлюще учесть все сложные взаимодействия внутри микробиоты и ее связь с кожей в настоящее время практически не представляется возможным, а большинство исследований, направленных на изучение влияния тех или иных ингредиентов косметики на микробное разнообразие, охватывает либо динамику одного-двух МкО, либо вообще проводится на изолированных культурах. Поэтому эффект при использовании косметических средств непосредственно на коже может сильно отличаться от результатов, полученных в лабораторных условиях [17]. Метагеномные исследования микробиоты кожи и анализ ее метаболома показали, что все косметические продукты влияют не только на изменение микробного биоразнообразия, но и на структуру самих бактерий. Так, было найдено, что изменения микробиома начинаются с первой недели регулярного использования косметики, а молекулярная и бактериальная изменчивость во времени зависят от природы косметического продукта и особенностей кожи на месте нанесения косметического средства. Также было установлено, что химические вещества, ингредиенты косметических средств, могут длительно сохраняться на коже, несмотря на ежедневный прием душа, при этом продолжая оказывать влияние на МкО. Это исследование может послужить будущим заделом для пополнения косметической индустрии препаратами, способными формировать молекулярный и микробный состав кожи [11].

Дезодоранты были первыми косметическими средствами, разработанными для воздействия на микробиоту кожи, в частности на *Corynebacterium*. Так, было показано, что действие антиперспирантов и дезодорантов существенно изменяет баланс среди популяций *Corynebacterium* (14 и 29% соответственно) и *Staphylococcaceae* (60 и 61% соответственно) в сторону их уменьшения, причем антиперспиранты показали большую силу воздействия [66]. Доказана антимикробная роль многих биологически активных веществ из класса витаминов, пигментов, жирных кислот, полимеров и т.д., которые широко и активно добавляются в разные косметические средства в качестве антиоксидантов, фотопротекторов и т.д. [37]. Использование моющих средств, мыл может также стать причиной повреждения кожного барьера, а впоследствии и микробиома [47, 70]. Распространенными ингредиентами в них являются поверхностно-активные вещества (ПАВ), из которых са-

мыми агрессивными для ЛСЭ являются анионные ПАВ [2]. Увлажняющие средства также были вовлечены в изменение микробиома кожи [11]. Ежедневное использование make-up (пудра, тональный крем) способствовало заметному увеличению бактериального разнообразия на сальных участках лица. Кроме того, такие МкО, как *Selenomonas*, *Aggregatibacter* и *Aquicella*, были найдены исключительно у женщин, использующих ежедневный макияж [64]. На баланс кожной микробиоты однозначное влияние оказывает микробиологическая чистота самого косметического средства, наносимого на кожу.

Одной из многих стратегий в обеспечении контроля за бактериальной обсемененностью косметического продукта, помимо применения противомикробных агентов (парабенов, изотиазолинона, органических кислот, формальдегидов, триклозана, хлоргексидина), использования спиртовых основ, добавления консервантов и т.д., является коррекция активности воды (*aw*). Активность воды — это количество воды, доступной для метаболических реакций в клетке. Надо отметить, что бактерии нуждаются в более высокой активности воды, чем грибы, а грамотрицательные бактерии нуждаются в более высокой активности воды, чем грамположительные бактерии. Продукты со значением *aw* менее 0,92 являются малодоступными для грамотрицательных бактерий, а продукты со значением *aw* менее 0,70 практически не подвержены заражению МкО [2].

Достаточно быстро развивающейся областью в косметической промышленности являются производство и маркетинг косметических продуктов на основе пре-, про- и постбиотиков. В обзоре [41] представлен перечень потенциальных бактерий с пробиотическими свойствами, благоприятное воздействие которых доказано также в отношении кожи. Однако включение живых микроорганизмов (пробиотиков) в косметику сегодня весьма затруднительно. С одной стороны, правила безопасности на стадии технологического процесса требуют для косметического средства прохождения ряда процедур и/или добавления ингредиентов, губительных для широкого спектра МкО. Также встает вопрос о сохранности полезных жизнеспособных бактерий при длительном хранении продукта на стадии испытаний срока годности и условий хранения. С другой стороны, возникают сложности с определением безопасной, но при этом эффективной нормы живых МкО в косметике. Согласно техническому регламенту таможенного союза 009/2011 «О безопасности парфюмерно-косметической продукции», общее количество МкО в косметическом продукте не должно превышать 10^3 КОЕ/мл [4]. Также к настоящему времени проведено недостаточно крупномасштабных исследований

по безопасности использования живых МкО в косметических целях. Поэтому все чаще в косметике используются лизаты пробиотических МкО. Лизаты содержат клеточные стенки, бактериальные метаболиты и мертвые бактерии. К постбиотикам относятся метаболиты и/или компоненты клеточной стенки из культур пробиотиков, которые избирательно влияют на микробиоту. Поэтому многие из лизатов и экстрактов микробных ферментов в пробиотической косметике можно рассматривать как постбиотики. Полезные ингредиенты в пробиотических бактериальных лизатах включают в себя гиалуроновую кислоту, сфингомиелиназу, пептидогликан, липотейховую, молочную и уксусную кислоты и др. Пребиотики также могут быть легко включены в средства по уходу за кожей и являются хорошей альтернативой живым бактериям, которые направлены на коррекцию микробиоты путем избирательного стимулирования роста одной или некоторого числа бактерий [41].

Новые подходы, направленные на модуляцию микробиоты кожи

Еще одним принципиально новым подходом к управляемому изменению в микробиоте кожи является трансплантация образца от здорового донора. В настоящее время доказана эффективность подобного терапевтического подхода в лечении хронических часто рецидивирующих заболеваний, устойчивых к традиционной антибактериальной терапии (АБТ). Так, в 2013 году были получены успешные результаты в терапии подобным способом рецидивирующей кишечной инфекции, ассоциированной с *Clostridium difficile*, устойчивой к АБТ [68]. На основании удачного предшествующего опыта в 2018 г. проведена трансплантация лиофилизата *Roseomonas mucosa* больным с АтД [45]. В 2019 году было продемонстрировано, что состав микробиоты кожи человека можно модулировать с помощью пробиотических растворов донорской здоровой микробиоты. Так, при нанесении такого раствора реципиентная микробиота постепенно становилась более похожей на донорскую, при этом уровень ее приживления зависел от состава микробиоты как реципиента, так и донора, а также от уровня общей бактериальной нагрузки. Наибольшая приживляемость, согласно исследованию [55], наблюдалась при использовании донорского раствора, богатого *Cutibacterium acnes*: подтипом Н1 и *Leifsonia*. Лечение грамотрицательными бактериями, полученными со здоровой кожи, значительно улучшило состояние АтД на мышинной модели болезни [46]. Подобные результаты получены при применении средств на основе непатогенной грамотрицательной бактерии *Vitreoscilla liformis* [32] и коагулазонегативного *Staphylococcus spp.* [47]. В 2019 году

израильские медики впервые провели успешную пересадку вагинальной биоты реципиенту с хроническим течением бактериального вагиноза, устойчивого к АБТ, в результате чего им удалось добиться стойкой ремиссии [40]. Таким образом, методы модуляции микробиома кожи могут стать основой для новой терапевтической стратегии в лечении заболеваний кожи с нарушенным кожным барьером, а также для создания продуктов нового поколения, которые могут быть использованы в качестве ухода за кожей на фоне хронических дерматозов в период ремиссии [32].

Заключение

Микробиота кожи человека достаточно разнообразна и имеет высокий уровень отличий между людьми. И хотя прослеживается преобладание определенных представителей микробиоты на коже всех людей, соотношение их может значительно варьировать, что диктует необходимость развития персонализированного подхода в дальнейшей работе с микробиотой с учетом межличностных различий и действия на нее разнообразных факторов. На формирование и поддержание микробных профилей кожи человека влияет целый ряд факторов: наследственные (пол, возраст); топографическое расположение микроорганизмов на поверхности кожи; физиологические особенности кожи в разных зонах; факторы окружающей среды (воздействие ультрафиолетовых лучей, характер питания, использование антибактериальных препаратов системного и местного назначения, место проживания, климат, образ жизни, профессия, занятия спортом, качество используемой одежды, чрезмерное и/или ненадлежащее использование моющих и косметических средств, долгое пребывание в водной среде); патологические состояния кожи и разнообразные системные заболевания. Поэтому продолжает быть актуальным вопрос адаптивного потенциала микробиоты кожи при действии совокупности факторов внешней и внутренней среды. Понимание сложной взаимосвязи между физиологией кожи с микробиотой, ее динамических изменений и возрастных особенностей имеет решающее значение для рациональной разработки новых лекарственных и косметических продуктов по уходу за кожей. Подобные продукты должны быть направлены, в первую очередь, на эффективное восстановление и поддержание барьерной функции кожи, с одновременным предотвращением дисбактериоза кожи, повышением активности и роста полезной микробиоты. В этих целях сейчас активно исследуется влияние пре-, про- и постбиотиков. Также в рамках возможной модуляции микробиоты кожи изучается стратегия лечения хронических заболеваний, ассоциированных с микроорганизмами, устойчи-

выми к широкому спектру антимикробных препаратов, путем трансплантации микробиома или его части от здорового донора. Таким образом, целенаправленные манипуляции с микробиотой кожи человека могут стать потенциально новой терапевтической стратегией для лечения и изучения заболеваний кожи, а также для поддержания ее здорового функционирования. Методы протеомного, метаболомного и метагеномного анализа могут способствовать развитию новых подходов к диагностике патологий кожи по состоянию ее микробиома.

Работа выполнена в рамках тематического плана НИЦ «Курчатовский институт».

Литература

1. Барретт-Хилл Ф. Advanced skin analysis. Диагностика в практике косметолога и дерматолога. — М.: Косметика и медицина, 2018. — С. 130–149.
2. Беликов О.Е., Пучкова Т.В. Консерванты в косметике и средствах гигиены. — М.: «Кафедра», 2003. — 250 с.
3. Нелюбова О.И., Тальникова Е.Е., Моррисон А.В. Микробиом кожи и его роль в норме и патологии // Российский журнал кожных и венерических болезней. — 2016. — Vol. 19(2). — С. 97.
4. Технический регламент таможенного союза 009/2011 «О безопасности парфюмерно-косметической продукции». Приложение 7, стр. 248.
5. Alhede M., Er Ö., Eickhardt S., Kragh K., Alhede M., Christensen L.D., Poulsen S.S., Givskov M., Christensen L.H., Haiby N., Tvede M., Bjarnsholt T. Bacterial biofilm formation and treatment in soft tissue fillers // Pathogens and Disease. — 2014. — Vol. 70(3). — P. 339–346.
6. American Society for Microbiology: website. Ocean swimming alters skin microbiome, increasing vulnerability to infection. URL: <https://www.asm.org/Press-Releases/2019/June/Ocean-Swimming-Alters-Skin-Microbiome,-Increasing>.
7. Antonsson A., Karanfilovska S., Lindqvist P.G., Hansson B.G. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41. — P. 2509–2514.
8. Baldwin H.E., Bhatia N.D., Friedman A., Eng R.M., Seite S. The role of cutaneous microbiota harmony in maintaining a functional skin barrier // JDD. — 2017. — Vol. 16(1). — P. 12–18.
9. Bibel D.J., Aly R., Shah S., Shinefield H.R. Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin // Acta Derm. Venereol. — 1993. — Vol. 73(6). — P. 407–411.
10. Bouslimani A., Porto C., Rath C.M., Wang M., Guo Y., Gonzalez A., Berg-Lyon D., Ackermann G., Moeller Christensen G.J., Nakatsuji T., Zhang L., Borkowski A.W., Meehan M.J., Dorrestein K., Gallo R.L., Bandeira N., Knight R., Alexandrov T., Dorrestein P.C. Molecular

- cartography of the human skin surface in 3D // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2015. — Vol. 112. — E2120–E2129.
11. Bouslimani A., Silva R., Kosciolk T., Janssen S., Callewaert C., Amir A., Dorrestein K., Melnik A.V., Zaramela L.S., Kim J.N., Humphrey G., Schwartz T., Sanders K., Brennan C., Luzzatto-Knaan T., Ackermann G., McDonald D., Zengler K., Knight R., Dorrestein P.C. The impact of skin care products on skin chemistry and microbiome dynamics // BMC Biology. — 2019. — Vol. 17. — P. 47. doi: 10.1186/s12915-019-0660-6.
 12. Capone K.A., Dowd S.E., Stamatas G.N., Nikolovski J. Diversity of the human skin microbiome early in life // J. Invest. Dermatol. — 2011. — Vol. 131. — P. 2026–2032.
 13. Chahoud J., Semaan A., Chen Y., Cao M., Rieber A.G., Rady P., et al. Association between beta-genus human papillomavirus and cutaneous squamous cell carcinoma in immunocompetent individuals — A meta-analysis // JAMA Dermatol. — 2016. — Vol. 152. — P. 1354–1364.
 14. Chehoud C., Rafail S., Tyldsley A.S., Seykora J.T., Lambris J.D., Grice E.A. Complement modulates the cutaneous microbiome and inflammatory milieu // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2013. — Vol. 110(37). — P. 15061–15066.
 15. Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time // Science. — 2009. — Vol. 326(5960). — P. 1694–1697.
 16. Dimitriu P.A., Iker B., Malik K., Leung H., Mohn W.W., Hillebrand G.G. New insights into the intrinsic and extrinsic factors that shape the human skin microbiome // mBio. — 2019. — Vol. 10(4). — e00839-19. doi: 10.1128/mBio.00839-19.
 17. Dobler D., Schmidts T., Wildenhain S., Seewald I., Merzhäuser M., Runkel F. Impact of selected cosmetic ingredients on common microorganisms of healthy human skin // Cosmetics. — 2019. — Vol. 6(3). — P. 45. doi: 10.3390/cosmetics6030045.
 18. Dominguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010. — Vol. 107. — P. 11971–11975.
 19. Dreau D., Culbertson C., Wyatt S., Holder W.D. Human papilloma virus in melanoma biopsy specimens and its relation to melanoma progression // Ann. Surg. — 2000. — Vol. 231(5). — P. 664–671.
 20. Dreno B., Araviiskaia E., Berardesca E., Gontijo G., Sanchez V.M., Xiang L.F., Martin R., Bieber T. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. — 2016. — Vol. 30(12). — P. 2038–2047.
 21. Dreno B., Pecastaings S., Corvec S., Veraldi S., Khammari A., Roques C. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. — 2018. — Vol. 32(Suppl. 2). — P. 5–14.
 22. Fierer N., Hamady M., Lauber C.L., Knight R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105(46). — P. 17994–17999.
 23. Findley K., Grice E.A. The skin microbiome: a focus on pathogens and their association with skin disease // PLoS Pathogens. — 2014. — Vol. 10(11). — e1004436. doi: 10.1371/journal.ppat.1004436.
 24. Findley K., Oh J., Yang J., Conlan S., Deming C., Meyer J.A. et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin // Nature. — 2013. — Vol. 498. — P. 367–370.
 25. Forslund O. Genetic diversity of cutaneous human papillomaviruses // J. Gen. Virol. — 2007. — Vol. 88(Pt 10). — P. 2662–2669.
 26. Foulongne V., Sauvage V., Hebert C., Dereure O., Cheval J., Ar Gouilh M., Pariente K., Segondy M., Burguière A., Manuguerra J., Caro V., Eloit M. Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7(6). — e38499. doi: 10.1371/journal.pone.0038499.
 27. Gaitanis G., Magiatis P., Hantschke M., Bassukas I.D., Velegraki A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases // Clin. Microbiol. Rev. — 2012. — Vol. 25(1). — P. 106–141.
 28. Gao Z., Perez-Perez G.I., Chen Y., Blaser M.J. Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations // J. Clin. Microbiol. — 2010. — Vol. 48. — P. 3575–3581.
 29. Gao Z., Tseng C., Pei Z., Blaser M.J. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota // PNAS. — 2007. — Vol. 104(8). — P. 2927–2932.
 30. Gossai A., Waterboer T., Hoen A.G., Farzan S.F., Nelson H.H., Michel A., Willhauck-Fleckenstein M., Christensen B.C., Perry A.E., Pawlita M., Karagas M.R. Human polyomaviruses and incidence of cutaneous squamous cell carcinoma in the New Hampshire skin cancer study // Cancer Med. — 2016. — Vol. 5(6). — P. 1239–1250.
 31. Grice E.A., Kong H.H., Conlan S., Deming C.B., Davis J., Young A.C., Bouffard G.G., Blakesley R.W., Murray P.R., Green E.D., Turner M.L., Segre J.A. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome // Science. — 2009. — Vol. 324(5931). — P. 1190–1192.
 32. Guéniche A., Knaudt B., Schuck E. et al. Effects of non-pathogenic gram-negative bacterium *Vitreoscilla lififormis* lysate on atopic dermatitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study // Br. J. Dermatol. — 2008. — Vol. 159(6). — P. 1357–1363.
 33. Guéniche A.G., Benyacoub J., Buettler T.M., Smola H., Blum S. Supplementation with oral probiotic bacteria maintains cutaneous immune homeostasis after UV exposure // Eur. J. Dermatol. — 2006. — Vol. 16. — P. 511–517.
 34. Horii Y., Kaneda H., Fujisaki Y., Fuyuki R., Nakakita Y., Shigyo T., et al. Effect of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 on cutaneous arterial sympathetic nerve activity,

- cutaneous blood flow and transepidermal water loss in rats // J. Appl. Microbiol. — 2014. — Vol. 116. — P. 1274–1281.
35. Huttenhower C., Gevers D., Knight R. et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome // Nature. — 2012. — Vol. 486. — P. 207–214.
 36. Kong H.H., Oh J., Deming C., Conlan S., Grice E.A., Beatson M.A., Nomicos E., Polley E.C., Komarow H.D., Murray P.R., Turner M.L., Segre J.A. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis // Genome Res. — 2012. — Vol. 22(5). — P. 850–859.
 37. Kyme P., Thoennissen N.H., Tseng C.W., et al. C/EBP ϵ mediates nicotinamide-enhanced clearance of *S. aureus* in mice // J. Clin. Invest. — 2012. — Vol. 122(9). — P. 3316–3329.
 38. Lacey N., Raghallaigh N.S., Powell F.C. Demodex mites — commensals, parasites or mutualistic organisms? // Dermatology. — 2011. — Vol. 222. — P. 128–130.
 39. Lee H.J., Jeong S.E., Lee S., Kim S., Han H., Jeon C.O. Effects of cosmetics on the skin microbiome of facial cheeks with different hydration levels // Microbiologyopen. — 2018. — Vol. 7(2). — e00557. doi: 10.1002/mbo3.557.
 40. Lev-Sagie A., Goldman-Wohl D., Cohen Y., Dori-Bachash M., Leshem A., Mor U., Strahilevitz J., Moses A.E., Shapiro H., Yagel S., Elinav E. Vaginal microbiome transplantation in women with intractable bacterial vaginosis // Nature Medicine. — 2019. — Vol. 25. — P. 1500–1504.
 41. Lew L.C., Liong M.T. Bioactives from probiotics for dermal health: functions and benefits // J. Appl. Microbiol. — 2013. — Vol. 114(5). — P. 1241–1253.
 42. Li H., Goh B.N., Teh W.K., Jiang Z., Goh J.P.Z., Goh A., Wu G., Hoon S.S., Raida M., Camattari A., Yang L., O'Donoghue A.J., Dawson T.L. Jr. Skin commensal *Malassezia globosa* secreted protease attenuates *Staphylococcus aureus* biofilm formation // JID. — 2018. — Vol. 138(5). — P. 1137–1145.
 43. Meadow J.F., Bateman A.C., Herkert K.M., O'Connor T.K., Green J.L. Significant changes in the skin microbiome mediated by the sport of roller derby // PeerJ. — 2013. — Vol. 1. — e53. doi: 10.7717/peerj.53.
 44. Moissl-Eichinger C. et al. Human age and skin physiology shape diversity and abundance of *Archaea* on skin // Scientific Reports. — 2017. — Vol. 7(1). — P. 4039. doi: 10.1038/s41598-017-04197-4.
 45. Myles I.A., Earland N.J., Anderson E.D., Moore I.N., Kieh M.D., Williams K.W., Saleem A., Fontecilla N.M., Welch P.A., Darnell D.A., Barnhart L.A., Sun A.A., Uzel G., Datta S.K. First-in-human topical microbiome transplantation with *Roseomonas mucosa* for atopic dermatitis // JCI Insight. — 2018. — Vol. 3(9). — pii: 120608. doi: 10.1172/jci.insight.120608.
 46. Myles I.A., Williams K.W., Reckhow J.D., Jammeh M.L., Pincus N.B., Sastalla I., Saleem D., Stone K.D., Datta S.K. Transplantation of human skin microbiota in models of atopic dermatitis // JCI Insight. — 2016. — Vol. 1(10). — pii: 86955. doi: 10.1172/jci.insight.86955.
 47. Nakatsuji T., Chen T.H., Narala S., Chun K.A., Two A.M., Yun T., Shafiq F., Kotol P.F., Bouslimani A., Melnik A.V., Latif H., Kim J.N., Lockhart A., Artis K., David G., Taylor P., Streib J., Dorrestein P.C., Grier A., Gill S.R., Zengler K., Hata T.R., Leung D.Y., Gallo R.L. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis // Sci. Transl. Med. — 2017. — Vol. 9(378). — pii: eaah4680. doi: 10.1126/scitranslmed.aah4680.
 48. National Institutes of Health: website. URL: <https://commonfund.nih.gov/hmp>.
 49. Nazipi S., Stodkilde K., Scavenius C., Bruggemann H. The skin bacterium *Propionibacterium acnes* employs two variants of hyaluronate lyase with distinct properties // Microorganisms. — 2017. — Vol. 5(3). — pii: E57. doi: 10.3390/microorganisms5030057.
 50. Ogawa M., Saiki A., Matsui Y., Tsuchimoto N., Nakakita Y., Takata Y. et al. Effects of oral intake of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 (SBL88TM) on dry skin conditions: a randomized, double-blind, placebocontrolled study // Exp. Ther. Med. — 2016. — Vol. 12. — P. 3863–3872.
 51. Oh J., Byrd A.L., Deming C., Conlan S., Kong H.H., Segre J.A. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome // Nature. — 2014. — Vol. 514(7520). — P. 59–64.
 52. Oh J., Conlan S., Polley E.C., Segre J.A., Kong H.H. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults // Genome Med. — 2012. — Vol. 4(10). — P. 77. doi: 10.1186/gm378.
 53. Ohnishi Y., Okino N., Ito M., Imayama S. Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 1999. — Vol. 6(1). — P. 101–104.
 54. O'Neill C.A., Monteleone G., McLaughlin J.T., Paus R. The gut-skin axis in health and disease: A paradigm with therapeutic implications // Bioessays. — 2016. — Vol. 38(11). — P. 1167–1176.
 55. Paetzold B., Willis J.R., Lima J.P., Knödseder N., Brüggemann H., Quist S.R., Gabaldón T., Güell M. Skin microbiome modulation induced by probiotic solutions // Microbiome. — 2019. — Vol. 7. — P. 95. doi: 10.1186/s40168-019-0709-3.
 56. Percival S.L., Emanuel C., Cutting K.F., Williams D.W. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection // International Wound Journal. — 2012. — Vol. 9(1). — P. 14–32.
 57. Probst A.J., Auerbach A.K., Moissl-Eichinger C. *Archaea* on human skin // PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8(6). — e65388. doi: 10.1371/journal.pone.0065388.
 58. Sanford J.A., Gallo R.L. Functions of the skin microbiota in health and disease // Semin. Immunol. — 2013. — Vol. 25(5). — P. 370–377.
 59. Satoh T., Murata M., Iwabuchi N., Odamaki T., Wakabayashi H., Yamauchi K., Abe F., Xiao J.Z. Effect of *Bifidobacterium breve* B-3 on skin photoaging induced by chronic UV irradiation in mice // Benef. Microbes. — 2015. — Vol. 6(4). — P. 497–504.

60. Schommer N.N., Gallo R.L. Structure and function of the human skin microbiome // *Trends Microbiol.* – 2013. – Vol. 21(12). – P. 660–668.
61. Simon C., Daniel R. Metagenomic analyses: past and future trends // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 77. – No. 4. – P. 1153–1161.
62. Song S.J., Lauber C.L., Costello E.K., Lozupone C.A., Humphrey G., Berg-Lyons D. et al. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs // *Elife.* – 2013. – Vol. 2. – e00458. doi: 10.7554/eLife.00458.
63. Statnikov A., Alekseyenko A.V., Li Z., Henaff M., Perez-Perez G.I., Blaser M.J., Aliferis C.F. Microbiomic signatures of psoriasis: feasibility and methodology comparison // *Sci. Rep.* – 2013. – Vol. 3. – P. 2620. doi: 10.1038/srep02620.
64. Staudinger T., Pipal A., Redl B. Molecular analysis of the prevalent microbiota of human male and female forehead skin compared to forearm skin and the influence of make-up // *J. Appl. Microbiol.* – 2011. – Vol. 110(6). – P. 1381–1389.
65. Sugimoto Y., Camacho F.R., Wang S., Chankhamjon P., Odabas A., Biswas A. A metagenomic strategy for harnessing the chemical repertoire of the human microbiome // *Science.* – 2019. – Vol. 366(6471). – pii: eaax9176. doi: 10.1126/science.aax9176.
66. Urban J., Fergus D.J., Savage A.M., Ehlers M., Menninger H.L., Dunn R.R., Horvath J.E. The effect of habitual and experimental antiperspirant and deodorant product use on the armpit microbiome // *PeerJ.* – 2016. – Vol. 4. – e1605. doi: 10.7717/peerj.1605.
67. Vandecandelaere I., Depuydt P., Nelis H.J., Coenye T. Protease production by *Staphylococcus epidermidis* and its effect on *Staphylococcus aureus* biofilms // *Pathogens and Disease.* – 2014. – Vol. 70(3). – P. 321–331.
68. van Nood E., Vriese A., Nieuwdorp M., Fuentes S., Zoetendal E.G., de Vos W.M., Visser C.E., Kuijper E.J., Barteldsman J.F., Tijssen J.G., Speelman P., Dijkgraaf M.G., Keller J.J. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile* // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 368. – P. 407–415.
69. Vaughn A.R., Notay M., Clark A.K., Sivamani R.K. Skin-gut axis: The relationship between intestinal bacteria and skin health // *World J. Dermatol.* – 2017. – Vol. 6(4). – P. 52–58.
70. Wallen-Russell C. The role of every-day cosmetics in altering the skin microbiome: a study using biodiversity // *Cosmetics.* – 2019. – Vol. 6(1). – P. 2. doi: 10.3390/cosmetics6010002.
71. Wanke I. et al. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways // *J. of Invest. Dermatol.* – 2011. – Vol. 131(2). – P. 382–390.
72. Weill F.S., Cela E.M., Paz M.L., Ferrari A., Leoni J., González Maglio D.H. Lipoteichoic acid from *Lactobacillus rhamnosus* GG as an oral photoprotective agent against UV-induced carcinogenesis // *Br. J. Nutr.* – 2013. – Vol. 109(3). – P. 457–466.
73. Ying S., Zeng D., Chi L., Tan Y., Galzote C., Cardona C., Lax S., Gilbert J., Quan Z. The influence of age and gender on skin-associated microbial communities in urban and rural human populations // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10(10). – e0141842. doi: 10.1371/journal.pone.0141842.
74. Zeeuwen P.L.J.M., Boekhorst J., Bogaard E.H., Koning H.D., Kerkhof P.M.C., Saulnier D.M., Swam I.I., Hijum S.A.F.T., Kleerebezem M., Schalkwijk J., Timmerman H.M. Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption // *Genome Biol.* – 2012. – Vol. 13(11). – R101. doi: 10.1186/gb-2012-13-11-r101.

MODERN VIEWS ON THE MICROBIAL DIVERSITY OF THE SKIN

A.Yu. SHATALOVA, E.S. BULYGINA, T.N. GAEVA, N.V. SLOBODOVA,
C.M. RASTORGUEV, S.V. TSYGANKOVA, F.S. SHARKO, R.G. VASILOV

Kurchatov Institute National Research Centre, Moscow

The review presents data on the microbial diversity of the skin. One of the important factors in the functional state of the human body is its microbiota: the relative stability of the microbial landscape for each area of the body. Therefore, the study of the characteristics of microbial communities of both individual epitopes (the gastrointestinal and genitourinary tract, skin, respiratory tract, etc.) and the body as a whole continues to be a relevant area of research today. In light of studies of skin microbiota, many works are devoted to the etiopathological role of microorganisms in the development of various skin pathologies, as well as to the characterization of skin microbiota in skin diseases. Thanks to the rapid development of metagenomic and metabolic analysis methods, the concept of not only the microbial diversity of the skin and its dynamics of variability under the influence of various factors of the external and internal environment, but also the complex relationships within the microbial community and the mechanisms of interaction of microorganisms with human skin has expanded. A targeted effect on a specific link of skin microbiota can represent an entirely new approach both in maintaining a healthy physiological state, and in the treatment and prevention of many skin diseases. Thus, the study of the microbiota of the skin and the functional significance of its representatives is still one of the most pressing issues of pharmaceutical and medical science in general.

Keywords: microbiota, microbiome, microorganisms, commensals, microbial diversity, metagenomic sequencing, skin barrier.

ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ КАК ПРЕДМЕТ ПРАВОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ В ПУБЛИЧНЫХ ОТРАСЛЯХ ПРАВА: КОЛЛИЗИИ, ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ ЗА РУБЕЖОМ

Ю.А. ПЕТУШКОВА*, П.А. КАМЕНСКИЙ

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Статья представляет собой экспертно-аналитическое исследование и посвящена выявлению пробелов и коллизий в правовом регулировании геномных технологий. Приведены примеры опыта зарубежных стран по устранению выявленных проблем межотраслевого характера правоотношений в сфере биотехнологий в целом и геномных технологий, в частности. Представлена концепция совершенствования законодательства в рассматриваемой сфере.

Ключевые слова: геномные технологии, геномная инженерия, ГМО, трансгены, правовое регулирование, геномное редактирование, правовые коллизии.

Введение

С бурным развитием геномных исследований в самых различных областях, в особенности, медицине, сельском хозяйстве, охране окружающей среды, энергетике стали широко применяться современные геномные технологии. Наиболее существенный вклад геномных технологий в экономику уже только за счет агросектора наблюдается в США, Китае, Аргентине, Бразилии, Индии, Канаде и других странах, избравших биоэкономический путь развития. Примеры европейских стран-членов ЕС, США и стран БРИКС могут являться ориентиром для России в развитии биофармацевтики, биомедицины и биоэнергетики.

Однако в России геномные исследования остаются малопривлекательными для инвестиционных проектов. Основные причины этого носят правовой характер. Правовое регулирование практически не затрагивает сферу непосредственного проведения научных исследований и разработок, что, на первый взгляд, не препятствует их развитию, однако и не предусматривает прямые меры государственной поддержки в области геномных технологий. Наряду с этим в России появляется все больше законодательных ограничений на внедрение результатов таких исследований в практику, большинство из которых

не имеет достаточных оснований как в научном плане, так и с точки зрения развития экономики государства.

Вместе с тем публичное право призвано обеспечить снижение рисков неблагоприятных последствий использования продуктов современных геномных технологий, установив надлежащую систему контроля над их применением. Другим немаловажным аспектом является защита получаемой в результате геномных исследований информации. Сфера геномных исследований затрагивает практически все отрасли публичного права, в связи с чем эффективное правовое регулирование может быть установлено только путем принятия единой концепции развития и совершенствования законодательства. В юридической науке сфера геномных исследований и их практическое использование до настоящего времени не рассматриваются и, следовательно, не исследуются как отдельный самостоятельный вид общественных отношений, а изучаются только в отдельных аспектах и только в рамках самостоятельных отраслей, чаще всего экологического или международного права.

В результате предмет правового регулирования сферы геномных технологий не определен и в различных публичных отраслях права рассматривается по-разному в зависимости от предусмотренных и установленных в отраслевых законах терминов и понятий, имеющих прямое или косвенное отношение к генетическим исследованиям и технологиям. Такое несогласованное регулирование, выражающееся в различных подходах и принципах в зависимости от отрасли права фактически к одному и тому же предмету, а также заложенная возможность множественного толкования понятий в сфере геномных

© 2019 г. Петушкова Ю.А., Каменский П.А.

* Автор для переписки:

Петушкова Юлия Алексеевна,

к.б.н., с.н.с. каф. биоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: jupponline@gmail.com

технологий препятствуют развитию геномных технологий в России.

Наряду с межотраслевым характером правового регулирования геномных исследований, другими важными проблемами являются существенное отставание действующих правовых норм от развития современных биотехнологий, а также внутренняя несогласованность в сферах развития фундаментальной биологической науки и геномных технологий, с одной стороны, и в сферах развития основных отраслей публичного права — с другой. Это проявляется, начиная с основных понятий и терминов, которые представляются ключевыми в вопросах определения предмета правового регулирования, и заканчивая различием в подходах к видению рисков возможных неблагоприятных последствий использования геномных технологий и механизмов их уменьшения.

Целью настоящего экспертно-аналитического исследования было раскрыть содержание правового регулирования геномных технологий с обоснованием возможности и целесообразности выделения сферы биотехнологии в отдельную отрасль права. В связи с этим поставлены следующие задачи:

- выявить противоречия подходов, методов и принципов правового регулирования геномных технологий в различных отраслях права;

- уточнить понятие «геномных технологий» как правового феномена;
- провести анализ содержания правоотношений в сфере геномных технологий;
- привести примеры зарубежной практики правового регулирования биотехнологии в целом и геномных технологий, в частности, как концептуальные пути решения устранения коллизий в праве и отставания от развития фундаментальной и прикладной науки.

Пробелы и коллизии в правовом регулировании геномных технологий по отраслям права

Причины появления коллизий в правовом регулировании биотехнологии кроются, в первую очередь, в трактовке сущности предмета правового регулирования, а также в целях правового регулирования геномных технологий в каждой отрасли права.

В настоящее время сфера геномных технологий рассматривается в рамках нескольких отраслей права самостоятельно и независимо. Ключевые особенности российской системы правового регулирования сведены в таблицу 1, в которой также приведены основные положительные примеры устранения выявленных пробелов и коллизий, принятых в различных зарубежных странах.

Таблица 1

Особенности правового регулирования геномных технологий в публичных отраслях права

Отрасль публичного права	Особенности правового регулирования геномных технологий		
	Пробелы и место геномных технологий в отрасли в российском законодательстве	Цели и принципы правового регулирования (применимые к сфере геномных технологий) в России	Пример зарубежных стран, устанавливающих правовое регулирование геномных технологий в публичных отраслях права, устраняющий возможные коллизии
Конституционное право	Отсутствуют нормы, регулирующие геномные технологии	Уважение прав и свобод человека, безопасность для окружающей среды, повышение качества жизни населения (с целью использования достижений геномных технологий)	В Швейцарии регулирование сферы геномной инженерии установлено на конституционном уровне [8], что обуславливает развитие данного направления как самостоятельной отрасли и гарантирует минимизацию коллизий в других отраслях права, в том числе путем привлечения конституционного судопроизводства
Административное право	Отсутствует специализированный орган исполнительной власти, как и координационный центр на уровне Правительства (комитет, комиссия), что влечет за собой пересечение полномочий в сфере государственного управления геномными технологиями и не создает предпосылок для выработки единой государственной системы контроля/надзора в сфере геномных исследований	Принцип распределения полномочий органов исполнительной власти в сфере геномных технологий по целям их использования приводит к пересечению функций управления и контроля и противоречиям правового регулирования в отношении одной и той же технологии и одной и той же продукции	1. Создание специализированного органа государственного управления (пример: в Индии — Национальный комитет по развитию биотехнологии). В том числе за счет эффективного правового регулирования биотехнологий к 2025 году ожидается рост биоэкономики более чем на 100 млрд. долларов с ежегодным приростом на 20% [13]. 2. В странах-лидерах в агробиотехнологии — в Китае и Аргентине — контроль возложен на министерства сельского хозяйства с наделением не только полномочиями, но и ответственности, включая риски в отношении здоровья человека и окружающей среды

Экологическое право	Геномные технологии рассматриваются исключительно как потенциальный источник опасности в отношении окружающей среды, преобладают запретные нормы. Отсутствуют понятия, определяющие предмет правового регулирования геномных технологий в сфере исследований	Цель — защита окружающей среды и минимизация рисков негативного воздействия на природные экосистемы	1. В законодательстве Евросоюза максимально проработаны риски при выпуске ГМО в окружающую среду. 2. В законодательстве о переработке отходов предлагаются методы биотехнологии (стимулирующая функция). 3. Правовой статус всех классов живых организмов и их категоризация в целях определения объектов правового регулирования предусмотрены в экологических кодексах Франции
Международное право	Россия как сторона Конвенции «О биоразнообразии» приняла понятие биотехнологии, однако не ратифицировала ни одного протокола к данной конвенции, включая Картахенский протокол «О биобезопасности»	Принцип ответственности страны-экспортера ГМО при трансграничном перемещении, принцип предоставления информации о продукции, содержащей ГМО	В большей степени принято и инициировано Европой с целью унификации правил и подходов при обороте ГМО, в то время как Китай пропагандирует политику национального развития биотехнологии с послаблением требований по регистрации национальной продукции агробиотехнологии с искусственными барьерами для импорта [7]
Налоговое право	В России не предусмотрены никакие из возможных методов налогового стимулирования в отношении биотехнологий	Стимулирование полезных технологий, механизм реальной государственной поддержки приоритета развития биотехнологии	Активно вводятся в Аргентине в виде налоговых льгот при использовании полезных биотехнологий [12]
Уголовное право	В России не предусмотрены составы преступлений в сфере геномных технологий	Принцип общественной опасности, принцип презумпции невиновности и, как следствие, необходимость доказывания вины лежит на государстве	В Швейцарии предусмотрены составы преступлений в связи с нарушением законодательства о выпуске ГМО в окружающую среду, в сфере злоупотреблений генной инженерией, в сфере репродуктивной медицины [1]
Информационное право	Отсутствуют правовые нормы, устанавливающие правоотношения в сфере геномной информации и ее использования	Распространение на геномную информацию тех же принципов, что и на общую информацию о персональных данных	Защита геномной информации как информации особого статуса в США
Энергетическое право	Отсутствуют стимулирующие нормы по использованию биотоплива	Отсутствие политического курса на получение энергии из альтернативных источников	В Европейском Союзе развитие биоэнергетики связано с целями энергетической независимости, которые не ставятся в России

Как видно из таблицы 1, коллизии в праве кроются внутри административной и экологической отраслей, а в других публичных отраслях правоотношения в сфере геномных исследований вовсе не рассматриваются и возникают пробелы в правовом регулировании.

В результате появления взаимоисключающих целей и принципов возникает множество коллизий, препятствующих развитию геномных технологий и их эффективного государственного администрирования. Примером может служить цель ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности», предусматривающая такие основные цели генно-инженерной деятельности, как повышение эффективности сельского хозяйства, улучшение условий жизни человека и охрана его здоровья, повышение эффективности перерабатывающей промышленности и иные экономически и экологически обоснованные цели [6], в то время как экологическая отрасль права вводит запрет на разведение/выращивание генно-инженерно-модифицированных животных/растений,

установленная в ФЗ «Об охране окружающей среды» [4]. Таким образом, базовый закон в сфере геномных технологий предусматривает создание условий для развития приоритетных направлений в области генно-инженерной деятельности, устанавливает предпосылки развития государственной системы контроля и надзора в данной сфере, а базовый экологический закон закрывает возможность их появления. Административное право призвано устанавливать систему государственного управления, в то время как в России с 1996 г. единственный нормативный правовой акт, предусматривающий такую систему, вступил в силу по прошествии 20 лет и касается только выпуска ГМО в окружающую среду, причем после введения запрета на территорию России производства ГМ-растений и ГМ-животных [2]. Полномочия органы исполнительной власти получили, а возможность регистрации ГМО для выпуска в окружающую среду остается закрытой до принятия уточняющих нормативных правовых документов, регламентирующих такую возможность.

ФЗ «Об охране окружающей среды» вводит в статью 50, п. 1 следующую норму: «Запрещаются выращивание и разведение растений и животных, генетическая программа которых изменена с использованием методов геномной инженерии и которые содержат генно-инженерный материал, внесение которого не может являться результатом природных (естественных) процессов, за исключением выращивания и разведения таких растений и животных при проведении экспертиз и научно-исследовательских работ». Такая формулировка вводит исключение: а) выпуск ГМО в научно-исследовательских целях, оставляя введение процедуры и порядка регистрации такой деятельности профильным министерствам; б) при наличии доказательств, что внесение генетического материала также может явиться результатом естественных (природных) процессов. Представить такое доказательство при отсутствии установленной процедуры с четкими требованиями и критериями практически невозможно, поэтому без принятия соответствующего подзаконного акта воспользоваться таким исключением не представляется возможным.

Противоречия в подходах и принципах правового регулирования геномных технологий

В административном праве полномочия управления сферой геномных исследований были распределены различным министерствам и ведомствам, где основная роль отводится Минсельхозу России, Минздраву России, Роспотребнадзору, Россельхознадзору, Росздравнадзору. Каждое ведомство вправе издавать свои правила регулирования в сфере геномных технологий, которые, учитывая их положение на одном уровне иерархии правовых актов, вступают между собой в противоречие при отсутствии соответствующих норм в постановлениях Правительства РФ и законодательства России. В связи с этим выработка единого подхода к оценке безопасности продуктов геномной инженерии не представляется возможной, а регистрация одного и того же продукта происходит в различных ведомствах и имеет свои критерии оценки и требования к заявителю в зависимости от целей использования, устанавливаясь каждым ведомством произвольно.

За рубежом приняты два варианта моделей административного управления: путем создания комитета на уровне правительства (как в Евросоюзе) и путем выделения профильного ответственного министерства, уполномоченного правительством, как в Аргентине и Китае, развивающих агробιοтехнологии. Любые из данных вариантов позволили избежать пересечения полномочий органов исполнительной власти.

Политический курс стран также по-разному ориентирован в распространении геномных технологий. По степени либерализации экономики и применения геномных технологий, выраженной жесткостью государственного контроля и установленной правом системы требований и ограничений, мировые биотехнологические державы существенно отличаются и представляют примеры диаметрально противоположных подходов. Это касается широкого спектра подходов, начиная с канадской системы правового регулирования, не предусматривающей правовых ограничений и специальных требований в отношении геномных технологий как самостоятельного вида правоотношений, вплоть до выработки исчерпывающих требований к геномным технологиям на примере Евросоюза и наиболее выраженных подходов к геномным технологиям как технологиям особого статуса в Швейцарии с развитым конституционным и уголовным законодательством в рассматриваемой сфере. При этом все эти страны объединяет последовательный подход в регулировании геномных исследований и четкое следование выработанным принципам во всех отраслях публичного права.

Принцип регулирования оборота ГМ-продукции в Канаде основан на оценке конечных свойств продукции, но не технологии ее получения, установлен для всех направлений и целей использования (Канада). Принцип существенной эквивалентности установлен для оценки безопасности продукции геномных технологий и основывается на ее сравнении с традиционным аналогом (Евросоюз). В России происходит смешение данных принципов, при котором оценке подлежат технологии производства, но при этом на рынок допускается импортная продукция геномной инженерии, которая оценивается по свойствам конечного продукта, что блокирует национальное производство в рассматриваемой сфере. Принцип существенной эквивалентности также не является основополагающим, так как уполномоченные ведомства вправе разрабатывать свои требования по оценке безопасности, не основываясь на научных критериях.

Экономические последствия правовых пробелов и коллизий для России

Традиционно принято рассматривать экономические риски от негативного влияния технологий геномной инженерии, однако в условиях современной конкуренции за агробιοтехнологические рынки и необходимости обеспечения технологической независимости отдельной группой рисков можно рассматривать риски вследствие отказа от использования полезных технологий. В частности, это касается развития сельского хозяйства в

условиях ограниченного импорта. В настоящее время законодательно действует ограничение на импорт семян и племенного материала [3, 5], однако это автоматически не приводит к развитию национального сельского хозяйства. Более того, в случае снятия ограничений в Россию начнут поступать качественные современные сорта растений/породы животных по доступным ценам в ущерб национальным производителям. Причина этого кроется в низком стимулировании развития национального сектора сельского хозяйства, причем вследствие как финансово-экономической, так и законодательной политики.

Задачи для обеспечения конкурентоспособности — получение и внедрение новых сортов/пород со следующими условиями:

- короткие сроки от разработки до выведения и регистрации с дальнейшим выпуском. Для этого сроки проверки и регистрации должны определяться исключительно технологическими причинами, а не административными;
- соответствие качеству (по пищевым ценностям) и природным условиям, характерным для предполагаемой зоны выведения. Для этого современная селекция предполагает использование новых методов агrobiотехнологии, что широко используется у всех наших западных конкурентов. Законодательно они и в России разрешены к применению, но их внедрению необходимо помочь, развивая правовое регулирование на подзаконном уровне;
- снижение стоимости конечной продукции. Для этого необходимо применять к выведенным с использованием современных методов биотехнологии сортам/породам все действующие льготы и субсидии, применяемые к продукции, полученной методами традиционной селекции. Следует отметить, что современное законодательство не только этому не препятствует, но и предусматривает возможность стимулирования современных методов генно-инженерной деятельности, если речь не идет о трансгенах (ГМО).

С учетом предложенных способов решения проблем развитие сельского хозяйства может стимулировать разработка Постановления Правительства Российской Федерации, которое детализирует нормы, установленные в федеральном законодательстве о генно-инженерной деятельности, о семеноводстве и об охране окружающей среды, обеспечивая внедрение в сельское хозяйство безопасных сортов/пород с полезными свойствами, производимыми с учетом новейших научных достижений, если речь не идет о трансгенах (ГМО). Для этого

в отношении сортов/пород, полученных современными методами, которые также могут быть получены естественным (природным) путем, предусмотреть, что к этой категории относятся:

- а) все организмы, не являющиеся трансгенами;
- б) трансгены (ГМО), которые могут быть получены природным путем (для этой группы выработать методики исследования и критерии оценки).

Если новый сорт/порода удовлетворяет условиям, предусмотренным в Постановлении, применять к ним те нормы, которые действуют в отношении сортов/пород, полученных методами традиционной селекции. Тогда все новые нетрансгенные сорта, независимо от метода их получения, будут проходить проверку и регистрацию в соответствии с действующим законодательством.

При таком подходе сорта с полезными свойствами очевидно получают преимущество, причем уже на рыночных условиях свободной конкуренции.

Сфера биотехнологии, геномных технологий как предмет правоотношений в российском законодательстве

Все выявленные пробелы и противоречия могли бы быть минимизированы при выработке общего взгляда на определение предмета правоотношений в сфере биотехнологии, а вслед за этим геномных исследований и технологий. При выделении самостоятельного предмета и метода правоотношений появится предпосылка выделения новой отрасли права — биотехнологического права. Такой подход практически реализован в Швейцарии, где биотехнология регулируется на конституционном уровне. В настоящее время в России понятие биотехнологии применимо только в наднациональном законодательстве в конвенции «О биоразнообразии», где под биотехнологией понимается любой вид технологии, связанный с использованием биологических систем, живых организмов или их производных для изготовления или изменения продуктов или процессов с целью их конкретного использования [9]. В российском праве предложено понятие генно-инженерной деятельности, которое предопределило принцип регулирования и оценки технологий, а не полученной продукции и ее новых свойств. В результате в российском праве не доработана система требований к импорту ГМО, в то время как производство практически стало под запретом.

В установленном законом определении генно-инженерной деятельности заложена внутренняя неоднозначность: «генная инженерия — совокупность методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых

кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы». Формально юридическим методом толкования можно трактовать такое определение либо как совокупность трех составляющих одновременно, выделению, манипуляций с генами и введению их в другой организм, либо деятельность по одной из трех перечисленных составляющих. Во втором случае под генно-инженерную деятельность подпадают любые операции с нуклеиновыми кислотами. А в случае трактовки нормы с требованием одновременно трех условий на первый план выходит требование о введении генов в другие организмы. То есть, такой подход частично оставляет за рамками правового регулирования геномное редактирование. Если же трактовать понятие расширительно, то если организм содержит генно-инженерный материал (в том числе РНК) и получен методом генной инженерии, то есть в результате произошло введение в него генно-инженерного материала из другого организма, то такой организм будет считаться ГМО, а геномное редактирование можно, строго говоря, отнести к ГМО в том случае, если хотя бы на каком-либо этапе было внесение материала из другого организма. В случае, если все работы проводились без привнесения генно-инженерного материала из других организмов, такие методы не относятся к методам генной инженерии, даже если было проведено вмешательство в геном.

В различных законодательствах понятие ГМО трактуют по-разному. В основном, в зарубежных законодательствах правовое регулирование ГМО касалось трансгенов. Теперь же с появлением технологий геномного редактирования Европа и другие страны стали рассматривать вопрос о целесообразности правового регулирования геномного редактирования. В фокусе рассмотрения три модели: отказ от специального регулирования и отнесения их к продукции, получаемой методами традиционной селекции (в настоящее время в Китае), распространение на такую продукцию законодательства о ГМО (Европа) и разработка специального законодательства по регулированию технологий геномного редактирования (страны Латинской Америки).

Содержание правоотношений в сфере генетических технологий и их постепенная трансформация в связи с развитием науки

В связи с бурным развитием биотехнологии право не всегда успевает за появлением новых общественных отношений и появлением новых продуктов, которые влекут за собой легальное разделение понятий ГМО и геномного редактирования. В тех государствах, в которых приняты специализированные органы управления в сфере биотех-

нологий, в настоящее время ведутся дебаты. В Аргентине, например, геномное редактирование определяют как новые методы селекции. Система правового регулирования в Аргентине признана ФАО одной из сильнейших в мире, при этом она официально вынесла технологии геномного редактирования за рамки регулирования технологий генетической инженерии. Сейчас в Аргентине решено не останавливаться на введении закрытых перечней технологий, включая CRISPR-Cas9, ни как для технологий, предлагающих новые комбинации генетического материала, попадающие под регулирование ГМО, ни как технологии, идентичные традиционной селекции, а предполагается рассматривать каждый случай отдельно, устанавливая гибкую систему оценки. Теперь Аргентина представила 6 примеров таких исключений, принятых, чтобы не относить полученные технологии к ГМО [14].

В литературе понятие «генетическая инженерия» стало рассматриваться как использование трансгенных технологий (ГМО). Для технологий геномного редактирования используются два термина: «новые технологии селекции» и «инновационные биотехнологии» [11].

В 2018 году Европейский Суд принял решение отнести организмы, полученные прямым мутагенезом, к ГМО, в первую очередь, по формальным критериям, связанным с отсутствием гарантии безопасности, а, во-вторых, воздействием на ДНК и получением направленных изменений в геноме [10].

Устаревший понятийный аппарат в российском законодательстве не дает возможность развития правового регулирования продуктов современных геномных технологий.

Определение предмета и метода правового регулирования геномных технологий в связи с реализацией функций государственного управления в данной сфере

В общем виде предмет правового регулирования можно определить как общественные отношения в области геномных исследований, геномных технологий, результатов и конечных продуктов их применения. Термины и понятия определяются, как сказано выше, в законодательстве, однако требуют актуализации и уточнения.

Во всех отраслях права необходимы единые принципы государственного регулирования в рассматриваемой сфере, а также единый орган государственного управления. В настоящее время при отсутствии единства системы управления речи о выделении биотехнологии в самостоятельную отрасль быть не может, однако теоретические предпосылки наличия зарубежного опыта и реализации совершенствования российского законодательства сви-

детельствуют о теоретической возможности выделения отрасли биотехнологического права по аналогии с энергетическим и информационным правом.

Метод правового регулирования может быть императивно-диспозитивным и обеспечивать реализацию следующих функций:

- стимулирования полезных геномных технологий от исследования до внедрения продуктов;
- государственная система регистрации, контроля и надзора продуктов геномных технологий;
- государственная защита граждан в сфере применения геномных технологий, в том числе защита геномной информации.

Заключение

Представленный анализ концептуального подхода к правовому регулированию геномных исследований и геномных технологий выявил множество противоречий в определении понятий, относящихся к предмету правового регулирования, а также в принципах и подходах, представляемых в различных публичных отраслях права. Основные коллизии связаны с взаимоисключающими принципами экологического права и развитием биотехнологий, самостоятельное место которым не было определено в российском праве. Отсутствие четкой системы административно-правового регулирования в сфере геномных технологий приводит не только к технологическому отставанию государства и отказу от внедрения полезных результатов геномных исследований, но и к отсутствию гарантий безопасности использования их продуктов.

Зарубежные страны решили проблемы межотраслевых противоречий в сфере правового регулирования геномных исследований в большей степени по географическому признаку следующим образом:

1. Швейцария установила правовое регулирование на конституционном уровне, предусмотрев принципы в основном законе и заложив необходимость регулирования всех направлений генетических технологий на законодательном уровне, снижая риск возникновения противоречий в иных публичных отраслях права, подчиняющихся конституционному. Опыт Швейцарии является уникальным и закладывает предпосылки выделения биотехнологического права в юридической науке в отдельную отрасль. Вмешательство государства в развитие технологий максимальное, при этом на территории страны действует множество ограничений.

2. Группа стран поставила экономические факторы во главу приоритетов, что привело к развитию множества стимулирующих геномные технологии норм с развитием налогового стимулирования и снижения административных барьеров. При этом Китай и Индия отдали приоритет национальным разработкам, а Аргентина и Бразилия — геномным технологиям как таковым вне зависимости от их происхождения и государства-правообладателя. Данные страны объединяет активная политическая поддержка развития биотехнологий.
3. США, Австралия и Канада ввели политику минимальных административных барьеров при отсутствии прямых норм стимулирования, то есть не придали геномным технологиям особого юридического статуса ни в целях приоритетного стимулирования, ни в целях повышенного внимания в отношении безопасности их использования. Такая политика минимального вмешательства государства оставила возможность развития рынков биотехнологий в условиях свободной конкуренции.
4. Страны Евросоюза придерживаются принципа четкого административного регулирования всех современных биотехнологий. Основная цель — обеспечение безопасности использования новых технологий.
5. Россия находится на обособленной позиции в реализации политики правового регулирования геномных технологий. На первый взгляд, вмешательство государства значительное. С одной стороны, действует максимальное количество запретов по сравнению с другими рассмотренными странами, с другой стороны, действующая система контроля не позволяет выявить правонарушения в сфере применения геномных технологий в полной мере. При выявлении таких правонарушений отсутствует уголовная ответственность, как в Швейцарии, размер санкций при выявлении административных правонарушений не столь высок, как в Европе, судебная система не развита так, как в Америке, а национальные разработки не поддерживаются так, как в Китае и Индии. Таким образом, роль и позиция государства в сфере геномных технологий до конца не определены, что является основной причиной рассмотренных коллизий в праве.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-29-14024).

Литература

1. Петушкова Ю.А. Политические предпосылки формирования нормативной правовой базы в сфере генной инженерии в России и за рубежом // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2016. – Т. 12. – № 4. – С. 66–74.
2. Постановление Правительства РФ от 23.09.2013 № 839 (ред. от 01.10.2018) О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы, включая указанную продукцию, ввозимую на территорию Российской Федерации» // Собрание законодательства РФ, 30.09.2013, N 39, ст. 4991.
3. Федеральный закон от 07.08.1995 N 32-ФЗ (ред. от 02.08.2019) «О племенном животноводстве» // СЗ РФ, 07.08.1995, № 31, ст. 3199.
4. Федеральный закон от 10.01.2002 N 7-ФЗ (ред. от 29.07.2017) «Об охране окружающей среды» // СЗ РФ, 14.01.2002, № 2, ст. 133.
5. Федеральный закон от 22.12.1997 N 51-ФЗ (ред. от 03.07.2016) «О семеноводстве» // СЗ РФ, 22.12.1997, № 51, ст. 5715.
6. Федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (ред. от 03.07.2016) // СЗ РФ, 08.07.1996, № 28, ст. 3348.
7. China – Peoples Republic of Agricultural Biotechnology Annual. 2019. USDA Foreign Agriculture Service Global Agricultural Information Network (GAIN), 2/22/2019, Rep. num. CH 18085.
8. Constitution fédérale de la Confédération suisse du 18 avril 1999 // Recueil officielle du droit fédéral. – 1999. – P. 2556–2611.
9. Convention on Biological Diversity No. 30619. Concluded at Rio de Janeiro on 5 June 1992 / In Treaty Series 1772: Treaties and International Agreements Registered or Filed and Recorded with the Secretariat of the United Nations United Nations. – UN, New York, 1993. – P. 143–382.
10. Gelinsky E., Hilbeck A. European Court of Justice ruling regarding new genetic engineering methods scientifically justified: a commentary on the biased reporting about the recent ruling // Environmental Sciences Europe. – 2018. – Vol. 30. – P. 52.
11. Guerrero M. Spain – Agricultural Biotechnology Annual. 2018. // USDA Foreign Agriculture Service Global Agricultural Information Network (GAIN), 12/10/2018, Rep. num. SP 1830.
12. Ley de Promoción del Desarrollo y Producción de la Biotecnología Moderna Ley 20270, B.O., July 25, 2007.
13. S V.M., P C., Dahiya S., A N.K. Waste derived bioeconomy in India: A perspective // New Biotechnology. – 2018. – Vol. 40. – P. 60–69. doi: 10.1016/j.nbt.2017.06.006.
14. Yankelevich A. Agricultural Biotechnology Annual. Argentina // USDA Foreign Agriculture Service Global Agricultural Information Network (GAIN), 2/15/2019.

GENETIC TECHNOLOGIES AS A SUBJECT OF LEGAL REGULATION IN THE PUBLIC BRANCHES OF LAW: LEGAL COLLISION, CHALLENGES AND SOLUTIONS IN FOREIGN COUNTRIES

Yu.A. PETUSHKOVA, P.A. KAMENSKIY

Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The article is devoted to gaps and legal collisions in the genetic technologies regulation. The practices of the foreign countries in the law relation inter-branch issues in the field of biotechnology in general and genetic technologies in particular were examined. The legal concept of the legislation development was presented.

Keywords: genomic technologies, genetic engineering, GMO, transgenes, legal regulation, genetic editing, legal collisions.

ТОКСОКАРОЗ. ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ

О.Б. ЖДАНОВА^{1,2}, С.В. АББАСОВА², Л.А. НАПИСАНОВА¹, Е.С. КЛЮКИНА³,
И.И. ОКУЛОВА², О.В. ЧАСОВСКИХ², С.П. АШИХМИН³, А.Г. МЕШАНДИН⁴,
В.С. БОЛДЫРЕВ^{4*}, Я.Д. СЕИНА⁴

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт паразитологии
им. К.И. Скрябина», Москва;

²ФБГОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет», Киров;

³ФБГОУ ВО «1-й Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»,

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана
(Национальный исследовательский университет)», Москва

В обзоре даны общие и частные сведения о такой специфической и актуальной патологии, как токсокароз. Токсокароз — инфекция, вызванная инвазированием личинками круглых гельминтов собак *Toxocara canis* или кошек *Toxocara cati*. Токсокароз относится к одному из самых опасных зоонозов плотоядных животных, так как инвазия вызывает у человека заболевание, которое может сопровождаться поражением печени, сердца, легких, мышц, глаз и головного мозга. Домашние животные могут играть роль в поддержании распространения паразита, а урбанизация диких животных способствует экологическому загрязнению почв. Изучали заражение пушных зверей и домашних животных *T. canis* в некоторых областях России и Италии». И хотя животные как источник инфекции имеют ведущее значение в человеческой инфекции, но инвазия их токсокарой обычно бессимптомна. Именно поэтому в обзоре особый акцент сделан на иммунологической, гематологической и копрологической диагностике, которая необходима как для человека, так и для плотоядных животных. Кроме того, для предупреждения заболеваемости токсокарозом необходимо проводить дезинфекцию почв.

Ключевые слова: токсокароз, почвы, заражение, дезинфекция, профилактика.

Введение

Токсокароз, несмотря на пристальное внимание паразитологов, до сих пор является нерешенной проблемой как крупных мегаполисов, так и населенных пунктов, расположенных в сельской местности. Также и систематика токсокар остается предметом дискуссий. В настоящее время принята следующая классификация: тип — круглые черви, класс *Nematoda*, отряд *Spirurida*, семейство *Anisakidae* (*Toxocaridae*), род *Toxocara*; основные виды *Toxocara canis*, *Toxocara mystax*. *Toxocara canis* — это нематода средней величины, самцы длиной 5—10 см, самки 10—18 см. На головном конце имеется три губы и кутикулярные крылья. Между пищеводом и кишечником имеется так называемый желудочек, являющийся характерным признаком представителей семейства *Anisakidae*.

Яйца средней величины (0,068—0,085 x 0,064—0,072 мм), слегка овальной формы, желтоватого цвета, незрелые; наружная оболочка яиц ячеистая [1—3, 6, 7].

Клинические признаки токсокароза человека

Z.S. Pawlowski предложил выделять следующие клинические формы токсокароза: системные (классический 1, неполный VLM); локализованные (глазной, невралгический); скрытый токсокароз; асимптомный токсокароз. Эта классификация, однако, не учитывает кожные и астматические формы заболевания. Среди клинических симптомов у пациентов с серологически подтвержденным токсокарозом отмечают боль в животе (41%), головная боль (12%), эозинофилия (9,2%), лимфаденопатия (7,0%), неврологические симптомы (5,1%), сыпь (4,6%), пневмония (4,6%), аллергия (4,6%), глазные симптомы (3,2%), мышечные боли (2,8%), гепатомегалия (2,85%), лихорадка (2,3%) [3, 4, 6, 7].

Висцеральная форма. Выделяют висцеральную и глазную формы токсокароза. Висцеральная форма токсокароза имеет разнообразные клинические проявления, они, как правило, малоспецифичны, определяются интенсивностью инвазии, особенностями распределения личинок в органах и тканях, частотой реинвазии и особен-

© 2019 г. Жданова О.Б., Аббасова С.В., Написанова Л.А., Ключкина Е.С., Окулова И.И., Часовских О.В., Ашихмин С.П., Мешандин А.Г., Болдырев В.С., Сеина Я.Д.

* Автор для переписки:

Болдырев Вениамин Станиславович,

к.т.н., доцент кафедры химии МГТУ им. Н.Э. Баумана

E-mail: boldyrev.v.s@bmstu.ru

ностями иммунного ответа организма человека. Мигрируя по организму, личинки могут оставаться в таких жизненно важных органах, как: печень, сердце, легкие, головной мозг, глаза, и т. д. Находясь в организме человека, паразиты могут годами сохранять свою жизнеспособность, но при этом никак себя не проявлять. Активация токсокар обычно наступает тогда, когда у человека резко снижается иммунитет. При благоприятном течении заболевания паразиты инкапсулируются и погибают. У детей они обычно проявляются ярче, инвазия протекает тяжелее, чем у взрослых. Это объясняется, по-видимому, анатомо-физиологическими особенностями организма ребенка, в том числе формированием иммунного ответа на инвазию. Клиническая симптоматика висцерального токсокароза малоспецифична и имеет сходство с таковой при острой стадии других гельминтозов. В острой стадии у больных наблюдается лихорадка, для детей характерны выраженная лимфаденопатия, кожный синдром в виде различных высыпаний, крапивницы, отеков Квинке, Wells-синдрома и др. Кожный синдром может сохраняться длительное время, являясь иногда основным клиническим проявлением болезни. У детей характерно увеличение печени, часто и селезенки, выраженный различной степени легочный синдром, гиперэозинофильный лейкоцитоз. Различают острое, подострое и латентное течение. Острый токсокароз начинается внезапно со следующих проявлений: общее недомогание; повышение температуры тела (может варьировать от 37 до 37,9 °С); снижение аппетита и массы тела, изменение состава крови (эозинофилия, лейкоцитоз, ускоренная СОЭ); боли в мышцах; аллергические проявления (например, крапивница, отек Квинке, кашель); увеличение лимфатических узлов. Однако главные клинические проявления варьируют в зависимости от степени поражения внутренних органов [2–4, 6, 7].

Хронический токсокароз характеризуется сменой двух периодов, обострением и ремиссией. В период обострения у больного наблюдаются идентичные симптомы, как и в острый период заболевания. Период ремиссии может протекать и бессимптомно, и с сохранением таких проявлений, как повышенная температура тела, пониженный аппетит, увеличенные лимфатические узлы и печень. Также при данной стадии заболевания могут наблюдаться кожно-аллергические проявления.

Латентный токсокароз характеризуется отсутствием клинических признаков заболевания. Выявить наличие токсокароза в данном случае возможно лишь при проведении лабораторных исследований (изменение состава крови). Симптомы токсокароза зависят от следующих факторов:

1. Миграция личинок по внутренним органам и тканям.
2. Количество личинок в организме.
3. Иммунный статус (постоянное присутствие токсокар в организме снижает иммунитет). Заболевание может протекать в легкой, средней или тяжелой форме, что зависит как от количества личинок, проникших в организм, так и от состояния нейро-иммуноэндокринной системы хозяина.

Поражение легких — одно из наиболее ярких проявлений токсокароза, особенно у детей. На фоне лихорадки (от субфебрильной до гектической), иногда с ознобами, возникает боль в горле, кашель. В дальнейшем могут присоединиться симптомы острого бронхита, нередко обструктивного характера, развиваться пневмония, тяжелые приступы удушья. Для токсокароза у детей характерным является упорный лающий кашель, особенно по ночам, часто заканчивающийся рвотой. Аускультативно определяются рассеянные сухие и разнокалиберные влажные хрипы. Рентгенологически выявляются усиление легочного рисунка, картина пневмонии, часто определяются облаковидные «летучие» инфильтраты, что в сочетании с другими клиническими симптомами (лихорадка, лимфаденопатия, гепатоспленомегалия, кожно-аллергический синдром, гиперэозинофильный лейкоцитоз) служит основанием для диагноза. Симптомы поражения легких, особенно у детей, в виде часто рецидивирующих бронхитов, приступов удушья остаются длительно даже после стихания клинических проявлений инвазии. При сероэпидемиологических исследованиях установлено, что у больных бронхиальной астмой часто обнаруживаются антитела к антигенам *T. canis*. Показано, что у 20% больных неинфекционно-аллергической формой бронхиальной астмы, протекающей с гиперэозинофилией, выявляются антитела к токсокарозовому антигену (иммуноглобулины классов G и/или E) [2–4, 6, 7, 9, 11].

Полагают, что больные токсокарозом с наследственной предрасположенностью к атопии, относятся к группе риска формирования бронхиальной астмы. Легочный синдром у больных токсокарозом часто сочетается с абдоминальным, который проявляется болями в животе, расстройством стула, тошнотой, рвотой. Возможно развитие миокардита, панкреатита, поражение щитовидной железы, мышц и других органов. При миграции личинок токсокар в головной мозг развиваются симптомы поражения ЦНС: упорные головные боли, эпилептиформные приступы, парезы, параличи.

При токсокарозе наиболее характерными признаками являются повышенное содержание лейкоцитов, эозинофилов, увеличение СОЭ. Относительная эозинофилия периферической крови может колебаться в пределах от 6 до 80%,

а лейкоцитоз достигать $20-50 \times 10^9 / \text{л}$. Для токсокароза характерна прямая корреляция между тяжестью клинических проявлений и уровнем эозинофилии. Наблюдается также умеренная анемия, гиперпротеинемия, гипергаммаглобулинемия, высокий уровень IgE. При поражении печени отмечаются нарушения ее функции. При УЗИ диагностируются гипоехогенные очаги в печени, иногда мелкие кальцинаты, изменения паренхимы поджелудочной железы, увеличение лимфоузлов в воротах печени и парааортальных, увеличение селезенки.

Хроническая стадия токсокароза протекает с выраженными в различной степени обострениями и ремиссиями. После острого периода инвазия длительно может протекать практически бессимптомно или субклинически. Обычно в хронической стадии даже в период ремиссии у детей сохраняется субфебрилитет, слабость, снижение аппетита, иногда потеря массы тела или замедленная ее прибавка, полилимфаденопатия, увеличение печени, иногда — кожно-аллергический синдром. Дети часто болеют острыми респираторными заболеваниями, наблюдаются повторные бронхиты, сохраняется гиперэозинофилия крови с колебаниями от 5—6 до 30—40% [6, 7, 9].

Инвазия может протекать остро, сопровождаясь яркой клинической симптоматикой, субклинически и бессимптомно, проявляясь лишь повышенным содержанием эозинофилов. Тяжелое течение токсокароза с диссеминацией возбудителя наблюдается при очень массивной инвазии, а также при нарушениях иммунной системы.

Глазная форма токсокароза. Больные с поражением глаз длительно наблюдаются с диагнозами хориоретинита неясной этиологии, может развиваться катаракта, симптомы опухолевого процесса и др. Описаны случаи энуклеации глаза по поводу предполагавшейся опухоли, а при гистологическом исследовании тканей удаленного глаза выявлялись личинки токсокар. Наблюдаются также поражения параорбитальной клетчатки личинками токсокар. Клинически эти поражения могут протекать в виде периодически появляющихся или усиливающихся параорбитальных отеков. Из-за выраженного отека может развиваться резкий экзофтальм [2—5, 6, 7, 10].

Поражение глаз при токсокарозе обычно одностороннее. Больные жалуются на снижение зрения, в тяжелых случаях вплоть до полной слепоты. В процесс могут вовлекаться сетчатка, хрусталик, стекловидное тело и другие отделы глаза. Выявляются кровоизлияния в сетчатку, иридоциклит, папиллит, кератит. Паразитарные гранулемы, формирующиеся в тканях глаза, нередко принимают за ретинобластомы. Истинный диагноз устанавливается при гистологическом исследовании удаленного глаза. Глазная инвазия личинками токсокар происходит

на первых стадиях заражения в той же степени, что и при повторном заражении. Вероятность попадания личинок в камеру глаза напрямую зависит от количества попавшего в организм инвазионного материала. Получены достоверные данные, подтверждающие факт участия мигрирующих личинок токсокар в необъяснимых хронических случаях зуда и крапивницы неясной этиологии. Различия в клинических симптомах, констатируемых при токсокарозе, и их недостаточная специфичность не могут стать основой для установления диагноза этого заболевания, тогда как наличие хотя бы нескольких симптомов может быть существенным подспорьем для клинициста.

Диагностика

Прижизненный паразитологический диагноз токсокароза у человека, животных — неспецифических хозяев, а нередко и у псовых, не всегда возможен, так как обнаружить мигрирующие личинки трудно, а идентифицировать их по томограмме и гистологическим срезам не всегда удается. Тем не менее окончательный диагноз токсокароза основан на обнаружении личинок в биоптатах тканей. Наиболее часто личинки, окруженные эозинофильной гранулемой, выявляют в биоптатах печени. Хорошие результаты дает лапароскопия, позволяющая выявить признаки поражения печени мигрирующими личинками. На поверхности печени обнаруживают возвышающиеся желтовато-белые образования длиной 2—5 мм, извитые или в форме круга, выявляют абсцессы до нескольких миллиметров в диаметре. При прицельной биопсии в биоптате можно обнаружить личинки гельминтов в гранулеме.

Ограниченные возможности паразитологического диагноза делают иммунологические тесты ведущими в диагностике токсокароза. Из иммунологических тестов в разных странах используют реакцию связывания комплемента, реакцию непрямой гемагглютинации, иммуноферментный анализ (ИФА) и др. Эти тесты имеют различную чувствительность и специфичность. Для их постановки используют антигены, приготовленные из возбудителей на разных стадиях развития (личинки или взрослые паразиты), применяют различные источники антигена (соматические или секреторные). Выявлена положительная корреляция между клинической картиной токсокароза, уровнем эозинофилии и содержанием специфических антител. На этом основании по результатам ИФА можно судить о тяжести патологического процесса при токсокарозе. Так, титры 1:800 и выше свидетельствуют о заболевании человека, а титры 1:200 — 1:400 — о незначительном патологическом процессе, соответствующем токсокароносительству; у самок псовых часто данный титр свидетельствует о наличии «спящих» токсокар, которые в дальнейшем могут активизироваться

и передаваться их потомству. Лиц с низкими титрами специфических антител целесообразно взять на диспансерное наблюдение. В случае появления клинических симптомов и (или) увеличения числа антитоксокарных антител необходимо назначить специфическую терапию [6, 7, 9–11].

Дифференциальный диагноз при токсокарозе следует проводить, прежде всего, с ранней стадией гельминтозов, свойственных человеку (аскаридоз, стронгилоидоз, некатороз, описторхоз, фасциолез, шистосомозы и др.), а также с заболеваниями, сопровождающимися выраженной эозинофилией, например, с синдромом Леффлера.

Иммунологическая диагностика достаточно эффективна и в медицинской и ветеринарной практике. Так, например, при проведении серомониторинга Бекиш Л.Я. (2008) указал на то, что серопозитивные результаты получены в 33,9% образцов исследуемых сывороток. У 28,5% сероположительных пациентов наблюдались аллергические поражения кожи, у 71,1% — легочная симптоматика. В 85,7% случаев у больных висцеральным токсокарозом не отмечали гепатомегалии, но уровень эозинофилии был выше, чем у серонегативных. Токсокароз диагностируется на основе определения специфических антител, которые встречаются в плазме зараженных пациентов. Эти антитела действуют, в первую очередь, против экскреторно-секреторных антигенов личинок. Уровень антител, однако, не отражает активную фазу инвазии, потому что он может быть результатом множественной инвазии или реинвазии. Наблюдения за большими группами пациентов показывают, что интерпретация уровней антител при токсокарозе — исключительно сложная диагностическая проблема. Сероположительные случаи выявляются у 23,5% детей до 14 лет и у 19,4% взрослых, а среди позитивных к токсокарозу преобладают мужчины (23,9% против 18,8% женщин). При определении циркулирующих паразитарных антигенов и IgG антител по тесту ELISA установлено, что чувствительность реакций возрастает со снижением молекулярной массы секреторно-экскреторных и соматических антигенов личинок токсокар до 30 кДа. Перспективным методом может быть кристаллография, которая позволяет оценить как динамику патологического процесса, так и эффективность лечения [10, 13, 14].

Особенности лечения токсокароза

Для лечения токсокароза рекомендуются диэтилкарбамазин, альбендазол, мебендазол, фенбендазол, упакованный в липосомы, ивермектин. Чаще используется альбендазол, хотя другие бензимидазольные производные имеют сходную эффективность. Обычная дозировка альбендазола составляет около 15 мг/кг массы тела ежедневно в течение 5 дней. В некоторых случаях синдром мигрирующих личинок требует повторных курсов лечения.

Оценка эффективности лечения базируется на учете клинических симптомов, эозинофилии и серологических тестов на протяжении длительного времени (по крайней мере, больше месяца). Необходимо проводить специфическое превентивное лечение, имея в виду повышение риска локализации личинок в мозгу. Для того чтобы уменьшить число мигрирующих личинок токсокар, допускается (если эозинофилия и серологический анализ умеренно позитивны) однократный курс лечения альбендазолом. В результате терапии уровень специфических антител снижается, но процесс снижения идет медленно и наблюдается не у всех пациентов, лечившихся от токсокароза. Сходные эффекты наблюдались у больных, лечившихся тиабендазолом. Четырехлетнее исследование J. Irgoyen et al., охватившее пациентов, лечившихся тиабендазолом и диэтилкарбамазином, показало улучшение состояния дыхательного тракта, несмотря на сохраняющийся высокий уровень антител. D. Strchler et al. (2003) описали большую группу (34 чел.) с серологически диагностированным симптоматическим токсокарозом: 15 пациентов лечили тиабендазолом, 19 — альбендазолом. Время наблюдения — 18 месяцев. Однако даже через 6–8 мес после завершения терапии снижения уровня антител не отмечено. M. Marczynska наблюдала 74 ребенка от 1,8 до 15 лет, больных токсокарозом. После их лечения диэтилкарбамазином уровень антител снижался в течение 6 мес в 23% случаев, в 16% сначала увеличивался, затем падал, а у остальных больных уровень не зависел от лечения [6].

Вышеупомянутые исследования показывают, что клинически положительные эффекты лечения токсокароза не всегда сопровождаются снижением уровня специфических антител. Снижение может идти медленными темпами и занимать очень много времени. Это происходит из-за продолжительного раздражения иммунной системы хозяина антигенами мертвых паразитов и ее реактивности.

Использование кортикостероидов при лечении токсокароза может быть полезным для больных с дыхательной и сердечной недостаточностью, а также с активно воспаленными глазами. Учитывая негативные последствия применения кортикостероидов, при лечении тканевых гельминтозов рекомендуется назначать неспецифические противовоспалительные препараты — индометацин, бруфен, вольтарен и др. В 2000 году была предложена комбинированная терапия висцерального токсокароза мебендазолом с антиоксидантным комплексом, содержащим витамины С, Е, бета-каротин и селен, который назначали за два дня до начала и в течение лечения мебендазолом. Этот метод оказался более эффективным по сравнению с применением

только одного антигельминтика. Наблюдения позволяют сделать два вывода: во-первых, определение уровней антител, как предлагалось до сих пор, не обеспечивает удовлетворительного критерия эффективности лечения токсокароза; во-вторых, следует развивать систему дополнительных лабораторных анализов, которые обеспечат более быструю оценку эффективности лечения заболевания.

Заключение

Таким образом, проблема висцерального токсокароза человека для нашей страны весьма актуальна. Необходимо исследовать собак на пораженность токсокарами; изучать обсемененность почвы яйцами паразитов; обследовать лиц, работающих в непосредственном контакте с собаками; целенаправленно обследовать лиц с подозрением на *larva migrans visceralis*, особенно детей с высокой эозинофилией, с аллергическими заболеваниями неясного генеза и лиц с ослабленным зрением; совершенствовать способы диагностики и лечения заболевания.

Профилактика токсокароза складывается из своевременной диагностики, в этой связи огромное значение имеет диагностика носительства у беременных сук, которые и становятся источником инвазии. С этой целью необходимо обследовать их в иммунологических реакциях и при необходимости дегельминтизировать и вакцинировать [10, 12, 15, 16].

Однако не менее важными представляются вопросы уничтожения возбудителя в окружающей среде и, прежде всего, в почвах. Оптимальными для развития яиц являются глинистые, влагоемкие почвы, температура 24–30 °С, относительная влажность воздуха 85%, почвы — выше 20%. При этих условиях личинка в яйце развивается за 5–8 суток. Длительность развития личинки до инвазионной стадии определяется главным образом температурой почвы (обычно имеется в виду температура на глубине 5–10 см, где концентрируется основная масса яиц). Нижний температурный порог развития яиц токсокар +(10–13) °С, при температуре +37 °С яйца погибают через 5 суток, а при +55 °С — в течение 7 мин. Для развития яиц до инвазионной стадии требуется 160–183 градусо-суток. При среднесуточной температуре, например, +13–18 °С на это потребуется около 36 суток, а при температуре +2 °С — около 15 суток. Отмирание яиц начинается при температуре ниже -15 °С. Минимальная относительная влажность почвы для развития яиц токсокар составляет 5–8%, развитие яиц токсокар является фотозависимым процессом, яйца токсокар не могут развиваться успешно в темноте, однако прямые солнечные лучи оказывают на них губительное действие.

В средней полосе РФ яйца могут сохраняться жизнеспособными в почве в течение всего года, хорошо перезимовывая под снегом. При температуре ниже -15 °С яйца не развиваются и находятся в состоянии анабиоза. Период развития яиц длится около 5 месяцев (с мая по сентябрь), когда температура и влажность почвы благоприятны. Яйца токсокар сохраняются в почве жизнеспособными в течение нескольких лет. В 3%-ном растворе формалина яйца сохраняются живыми до 11 лет. Учитывая высокую устойчивость яиц в растворах дезинфектантов, мы предприняли попытку дезинвазии азидом натрия. Для этого в 0,1–0,5%-ных растворах азид натрия вносили яйца токсокар и наблюдали за их развитием. Была отмечена гибель 30% яиц в первые сутки и 63% во вторые сутки инкубирования в 0,3% растворе азид натрия, в 0,1% растворе яйца оставались без изменений в течение недели. Таким образом, теоретически азид натрия можно рекомендовать для дегельминтизации почвы в местах скопления фекалий собак и кошек [1, 10, 17, 18]. Однако возникает необходимость проверки безопасности препарата для газонных растений и полезной почвенной микрофлоры.

Литература

1. Ашихмин С.П., Мартусевич А.К., Жданова О.Б. Азид натрия: некоторые физико-химические свойства и потенциальное место в дезинфектологии // Здоровье населения и среда обитания. — 2012. — № 4. — С. 43–45.
2. Гораши В.Г., Алексеева М.И. Результаты трехлетней работы по изучению обсемененности почвы яйцами токсокар в г. Кишиневе // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 1985. — № 1. — С. 77–80.
3. Горохов В.В., Успенский А.В., Малышева Н.С., Самофалова Н.А., Малышева Е.В., Власов Е.А., Гладких К.А. Паразитарные зоонозы: состояние проблемы // Ученые записки. Электронный научный журнал Курского государственного университета. — 2012. — № 1. — С. 56–61.
4. Давидяц В.А. Исследование объектов внешней среды на наличие яиц токсокар // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 1982. — № 3. — С. 67–70.
5. Довгалёв А.С., Щучинова Л.Д., Успенский А.В., Паутова Е.А., Астанина С.Ю. Эпизоотолого-эпидемиологическое и экологическое районирование — элемент системы обеспечения благополучия территории по токсокарозу (на примере республики Алтай) // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 2016. — № 3. — С. 48–52.
6. Жданова О.Б., Ашихмин С.П., Написанова Л.А., Аббасова С.В., Ястреб В.Б. Токсокароз человека и животных. Современный подход к обеспечению биобезопасности почв. (Монография). — Киров, 2018. — 89 с.

7. Жданова О.Б., Ашихмин С.П., Написанова Л.А., Ключкина Е.С., Мешандин А.Г., Болдырев В.С., Богословский С.Ю. Биобезопасность урбаноземов. Перспективы совершенствования диагностики и профилактики токсокароза // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 1. — С. 25–29.
8. Жданова О.Б., Назарова С.Г. Зараженность токсокарами собак и клеточных песцов разных возрастных групп / Материалы докладов к Первой международной научной конференции «Современные вопросы ветеринарной медицины и биологии». — Уфа, 2000. — С. 226–227.
9. Жданова О.Б. Изучение иммунитета при гельминтозах / Материалы докладов на 2-м Российском Конгрессе по патофизиологии. — М., 2000. — С. 348.
10. Жданова О.Б. Паразитозы плотоядных (патогенез, иммуноромфология и диагностика): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Всероссийский НИИ гельминтологии им. К.И. Скрябина. — М., 2007. — 43 с.
11. Жданова О.Б. Проблемы прижизненной диагностики трихинеллеза и токсокароза плотоядных // Материалы докладов к Международной научной конференции, посвященной 70-летию КГАВМ. — Казань, 2000. — Т. 2. — С. 105–106.
12. Мартусевич А.К., Жданова О.Б., Написанова Л.А. Биокристалломик в паразитологии: современное состояние, возможности и перспективы // Российский паразитологический журнал. — 2012. — № 4. — С. 77–88.
13. Мартусевич А.К., Жданова О.Б. Особенности свободного кристаллогенеза мочи здоровых и зараженных гельминтами грызунов / Труды Всероссийского НИИ гельминтологии им. К.И. Скрябина. — 2007. — Т. 45. — С. 153.
14. Мартусевич А.К., Жданова О.Б. Тезиокристаллоскопия в идентификации качества лекарственного препарата // Фармация. — 2006. — № 6. — С. 15–17.
15. Руднева О.В., Написанова Л.А., Бережко В.К., Жданова О.Б., Ключкина Е.С. Изменения в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником, у белых мышей при воздействии иммуномодулятора (азоксимера бромид) и антигенов токсокар / В сб.: Материалы межрегиональной заочной научно-практической Интернет-конференции, посвященной 90-летию со дня рождения первого заведующего кафедрой анатомии с курсом оперативной хирургии и топографической анатомии доктора мед. наук, профессора Александра Васильевича Краева. Сборник научных статей. — Киров, 2018. — С. 281–285.
16. Руднева О.В., Написанова Л.А., Бережко В.К., Жданова О.Б. Состояние лимфоидной ткани кишечника белых мышей при экспериментальном токсокарозе после применения комплексного иммунопрепарата // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. — 2018. — № 19. — С. 420–422.
17. Ястреб В.Б., Белоусов М.Н. Ветеринарно-санитарные проблемы содержания собак и кошек в г. Москве // Тезисы докладов научно-практического совещания «Паразитарное загрязнение мегаполиса Москвы». — М., 1994. — С. 53–54.
18. Taylor M.A., Coop R.L. Veterinary parasitology (2nd ed.). — Blackville Publishing, USA, 2014. — 209 p.

TOXOCAROSIS. FEATURES OF DIAGNOSTICS AND PREVENTIVE MAINTENANCE

O.B. ZHDANOVA^{1,2}, S.V. ABBASOVA², L.A. NAPISANOVA¹, E.S. KLIUKINA³, I.I. OKULOVA²,
O.V. CHASOVSKIY², S.P. ASHIHMIN¹, A.G. MESHANDIN⁴, V.S. BOLDYREV^{4*}, Ya.D. SEINA⁴

¹All-Russian Scientific Research Institute of Helminthology, named after Skriabin K.I., Moscow; ²Kirov State Medical University, Kirov; ³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, ⁴Bauman Moscow State Technical University, Moscow

Toxocariasis is an infection caused by the ingestion of larvae of the dog roundworm *Toxocara canis* or the cat roundworm *Toxocara cati*. Toxocariasis is the most dangerous zoonosis of carnivores because infection may cause human disease that involves the liver, heart, lung, muscle, eye and brain. Though human toxocariasis is mainly attributed to *Toxocara canis* and *T. cati*, the major roundworm species found in dogs and cats, and also numbers of wild canids and felids may also be infected with *T. canis* or *T. cati* in some areas. These populations might play a role in parasite maintenance, and urbanized wild animals could contribute to environmental contamination of soil. Contamination of fur-bearing animals and domestic dogs by *T. canis* in some region of Russia and Italy is investigated. The soil of parks and playgrounds is a common area contaminated with the eggs of *T. canis*. Animals as a source of infection play the leading role in human infection, but the infection of *T. canis* is usually asymptomatic. That is why immunological, hematological and coprological diagnostics are necessary for the carnivores. Also disinfections of soil is necessary in the preventions of disease.

Keywords: toxocariasis, soil, disinfection, prophylaxis.

ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ В ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ ХОЛЕРЫ

А.В. ТЮРИНА*, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, М.П. ПОГОЖОВА, А.О. КОЧЕТКОВА

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

В обзоре обоснованы актуальность и научно-практическая востребованность фаготерапии холеры. Рассмотрены исторические аспекты данной проблемы. Акцент сделан на особое, специфическое место фаготерапии в профилактике и лечении холеры. Проведена оценка потенциала отечественных исследователей применительно к решению указанных задач.

Ключевые слова: холерные бактериофаги, фаготерапия.

Введение.

Общая оценка перспективности фаготерапии

Угроза возникновения масштабных эпидемий и вспышек холеры на различных континентах мира определяет необходимость постоянного мониторинга с целью предотвращения ее распространения, оптимизации современной терапии и профилактики этого заболевания [25].

Несмотря на то, что химиопрофилактика может существенно облегчать течение холеры [44], побочные реакции на антибактериальные препараты хорошо известны — это случаи анафилаксии, нефро-, кардио-, гепато- и нейротоксичности, а также возникновение ряда желудочно-кишечных и гематологических осложнений [36]. Типичные ошибки при проведении антибактериальной терапии заключаются в неправильном выборе препарата и дозы, неадекватном пути введения, преждевременном прекращении или нарушении схемы приема антибиотиков [30], что приводит к растущей антибиотикоустойчивости бактерий [4]. Динамика антибиотикорезистентности холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации в 2012–2016 гг., показывает увеличение процента и расширение спектра антибиотикоустойчивости по сравнению с прошлыми годами [27].

Всемирная организация здравоохранения рекомендует профилактические меры, включающие в себя массовые вакцинации против холеры по эпидпоказаниям [43].

Но, к сожалению, для применения вакцин есть противопоказания (аллергия, возраст до двух лет, беременность и грудное вскармливание) [48]. Беременные женщины были исключены из числа вакцинированных против холеры из-за недостаточных данных о безопасности для них вакцин Dukoral® (Швеция) и Shanchol (Индия) [49].

Учитывая вышеизложенное, в настоящее время актуальной проблемой является поиск новых средств для профилактики и этиотропной терапии холеры [44]. В сложившейся ситуации альтернативу классическим антибактериальным средствам и вакцинам могут составить природные биологические агенты — бактериофаги, характеризующиеся специфической способностью к избирательному инфицированию бактериальных клеток и обладающие выраженными бактерицидными свойствами [4, 47].

Бактериофаги специфически связаны с определенным бактериальным штаммом и проявляют сильную бактерицидную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Некоторые фаги специфичны к отдельным типам бактерий, тогда как другие обладают широким спектром активности. Бактериофаги представляют собой уникальные микроорганизмы, на основе которых создана особая по своим свойствам и характеристикам группа лечебно-профилактических препаратов [34].

В организме человека фаги проявляют короткие периоды полураспада (15–30 мин), так как они эффективно устраняются иммунной системой пациента, и особенно ретикуло-эндотелиальной системой, но одновременно они могут размножаться экспоненциально в присутствии бактерий-хозяев [33].

Препараты на основе бактериофагов могут стать более эффективными, чем вакцины и антибактериальные

© 2019 г. Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Кочеткова А.О.

* Автор для переписки:

Тюрина Анна Владимировна
младший научный сотрудник ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора
E-mail: turina_av@antiplague.ru

препараты. Белки, являющиеся «действующим веществом вируса», по сути, служат прообразами возможных лекарств нового поколения, к которым бактерии не смогут выработать устойчивость [5]. Совместное же использование фагов и антибактериальных препаратов может помочь избежать проблем, связанных с появлением антибиотикоустойчивых и фагоустойчивых бактериальных мутантов [4].

В результате многолетних исследований установлено, что фаги абсолютно безопасны и нетоксичны для человека. Они не имеют противопоказаний к применению, могут быть использованы в сочетании с любыми другими лекарственными препаратами. Их можно назначать беременным, кормящим матерям и детям любого возраста, включая недоношенных [14, 26, 45].

В нескольких институтах Восточной Европы, самыми известными из которых являются Институт бактериофага, микробиологии и вирусологии им. Г. Элиавы в Тбилиси и Институт иммунологии и экспериментальной терапии во Вроцлаве, исследуется возможность использования фагов для терапии и профилактики различных заболеваний человека [38]. В России, Грузии и Польше проводятся фаготерапия и фагопрофилактика таких инфекционных болезней, как сальмонеллез, дизентерия, брюшной тиф, паратифоидная лихорадка, пиогенные инфекции и инфекции мочевых путей [23, 32].

Относительно новым направлением использования бактериофагов является их применение в качестве пищевых добавок, применение которых одобрено Управлением по контролю над продуктами и препаратами и другими регулирующими органами по всему миру [3, 11, 42].

Из современных клинических исследований российских ученых, посвященных профилактике и лечению острых кишечных инфекций, стоит отметить крупномасштабные регистрационные испытания фагового коктейля против *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, проведенные ведущим специалистом ФГУП НПО «Микроген» Н.Н. Ворошиловой [8]. Новый бактериофаговый препарат Энтеробактер по уровню своей эффективности был выше, чем про- и эубиотики на 28%, и соответствовал эффективности антибиотиков приблизительно на 90%.

Несмотря на то, что фаготерапия и фагопрофилактика удачно используются для борьбы с многими кишечными инфекциями [1], в отношении холерных бактериофагов сведений мало. В арсенале коммерческих лечебно-профилактических препаратов холерные фаги отсутствуют [9], хотя у холерных вибрионов, устойчивых к самым активным антибиотикам, отмечается сохранение чувствительности к бактериофагам.

Исторические сведения о фаготерапии холеры

История холерного бактериофага начинается в 1896 году, когда английский бактериолог Э.Х. Хэнкин заметил в пробе воды из реки Ганг значительное уменьшение числа бактерий *Vibrio cholerae*. Это странное явление в то время не нашло своего объяснения и получило название «феномен Хэнкина». Затем, в 1917 г. грузинский ученый Г.Г. Элиава наблюдал таинственное исчезновение клеток *V. cholerae* в воде из реки Мтквари [2].

Честь открытия холерного фага принадлежит основоположнику учения о фагах д'Эреллю, который в 1921 году из испражнений реконвалесцента впервые выделил специфический фаг. В 1922 г. Jötten выделил холерный фаг из культуры холерных вибрионов. В 1931 г. Ф. д'Эрелль и Г.Г. Элиава впервые предприняли совместные попытки применения бактериофагов для профилактики и лечения холеры [15].

Среди образцов холерных фагов различного происхождения, выделенных из испражнений больных холерой, из лизогенных штаммов холерных вибрионов и водоисточников наблюдалось значительное разнообразие. Холерные фаги отличались между собой по морфологии негативных колоний, типам чувствительности к ним различных штаммов холерных вибрионов и другим свойствам. Потребовались систематика и классификация холерных фагов [22].

Первую классификацию холерных фагов создали I. Asheshov, S. Khan, M. Lahiri в 1933 г. [24], в которой учитывались серологические свойства, морфология негативных колоний и тип чувствительности к бактериофагам различных штаммов холерных вибрионов. По серологическим свойствам выделенные в очагах холеры в Индии холерные фаги были подразделены на 14 типов.

Значительный вклад в изучение холерных фагов сделан работами d'Herelle, Asheshov, Nicolle, Morison, Mukerjee, З.В. Ермольевой, Е.И. Коробковой, А.Г. Никонова, А.Г. Сомовой, Н.М. Остроумовой, М.С. Дрожевкиной, Ю.И. Арутюнова, Н.Ф. Быстрого, Т.А. Кудряковой, Ю.М. Ломова и других выдающихся ученых [24].

Большой опыт использования фага для борьбы с холерой говорит о том, что фаг может быть успешно использован как профилактическое средство [12, 15, 21].

Одним из самых масштабных примеров применения холерных фагов является использование комплексного препарата бактериофагов в Сталинграде во время Великой Отечественной войны [21]. Производство холерного фага было налажено в самом Сталинграде, для терапии и профилактики холеры препарат ежедневно принимали около 50 тысяч человек. В Ташкентском Институте вакцин и

сывороток Э.В. Ермольева разработала препарат, содержащий 19 видов бактериофагов, в том числе холерный, брюшнотифозный и дифтерийный. После войны приготовление лечебно-профилактического препарата холерного фага осуществлялось в противочумных институтах [12].

Новый этап интенсивных исследований по фаготерапии и фагодиагностике холеры начался в Ростовском противочумном институте в 1950-х годах [22].

Никонов А.Г. с соавторами разработали препарат холерных бактериофагов, литическая активность которого повысилась благодаря пассажирам холерных вибрионов и холерных бактериофагов в организме животных. Возможность апробации этого препарата была предоставлена в 1958 году в Восточном Пакистане, результаты фаготерапии были оценены положительно. Затем препарат использовали для фагопрофилактики населения кишлаков в Афганистане, что привело к полной ликвидации вспышки холеры [22].

В 1964 г. О.М. Петрунина, Н.В. Полякова, Н.М. Остроумова и Л.В. Макаридзе установили, что пассажирами бактериофага на холерных вибрионах в среде крови человека удается получить бактериофаг, обладающий более выраженной активностью, чем препарат, приготовленный по методу А.Г. Никонова [22].

В 1969 году клинические испытания двух препаратов фагов провела группа русских ученых Марчук Л.М., Никифоров В.Н., Щербак Ю.Ф., Левитов Т.А., Котлярова Р.И., Наумшина М.С., Давыдов С.У. в Бангладеш. Препараты поливалентных холерных бактериофагов были приготовлены в Институте «Микроб» Министерства здравоохранения СССР с учетом двух биоваров возбудителя холеры. Фаготерапию проводили на фоне регидратационной терапии. В результате данного опыта установлено отсутствие клинического эффекта на течение холеры у больных, получавших бактериофаг [22].

Монсур К.А. и Марчук Л.М. в 1974 г. также высказали сомнение в целесообразности дальнейших попыток использования бактериофага для лечения больных с тяжелой формой холеры, воздержавшись от окончательных выводов об эффективности фаготерапии [40]. Из-за противоречивых результатов большинство исследований в этой области прекратилось.

Современный этап в фаготерапии холеры

Только в 2000-х годах в Ростовском-на-Дону противочумном институте изучение этого вопроса возобновилось благодаря Кудряковой Т.А. Был разработан препарат холерного поливалентного бактериофага [16–18, 20], активного в отношении холерных классических вибрионов и состоящего из четырех фагов трех серотипов (III, IV, VI). В связи со сменой биовара возбудителя во время

VII пандемии пришлось изменить типовой состав лечебно-профилактического препарата. Препарат состоял из фагов 5 серотипов (III, V, VI, VII, IX). При этом количественный компонент эльторовских фагов был незначительный.

В 2004 г. исследования по подбору и применению *in vitro* и *in vivo* бивалентной смеси холерных фагов продолжила Гаевская Н.Е. с соавторами. Полученные результаты показали перспективность дальнейших исследований по поиску фагов, наиболее эффективных для лечения и профилактики экспериментальной холеры [10].

Кроме этого, Т.А. Кудряковой с соавторами (2003) проводилось изучение антибактериальной активности мутационных рас холерных бактериофагов и ее изменений при пассажах *in vivo*. В результате многократных пассажей трех холерных фагов в организме белых мышей, инфицированных внутрибрюшинно холерными вибрионами вирулентного штамма Эль Тор Р-5879, были получены новые бактериофаги 455ж, К1 Вир, 3900ж. Экспериментальные расы холерных фагов К1 Вир и 3900ж обладали большим, чем исходные фаги, диапазоном действия и были отобраны как наиболее перспективные для конструирования бивалентного препарата фага [19].

В настоящее время в Ростовском-на-Дону противочумном институте продолжают исследования этого вопроса под руководством Гаевской Н.Е. Результаты работ *in vitro* и *in vivo* показывают перспективность изучения и использования разработанных фаговых композиций в отношении холерных вибрионов [29].

За границей в последние годы также возобновились исследования по изучению целесообразности и эффективности фаготерапии и фагопрофилактики холеры на моделях экспериментальных животных с использованием коктейлей, содержащих холерные фаги [7]. В исследованиях на модели RITARD [31, 35] показано, что пероральное введение фагового коктейля (1×10^8 БОЕ/мл) как перед, так и после заражения *V. cholerae* O1 значительно уменьшало выделение бактерий ($p < 0,01$) и тяжесть диареи, снижало уровень воспалительных цитокинов (IL-6 и TNF-альфа). Эффективность профилактики холеры фаговым коктейлем показана и на модели взрослых мышей [37].

В 2017 году американские исследователи использовали коктейль из трех вирулентных фагов для профилактики холеры [50], эксперимент был проведен на двух моделях животных (мышей-сосунков и кроликов). Показано, что пероральное введение фагов за сутки до заражения животных снижало колонизацию тонкой кишки возбудителем холеры и препятствовало развитию заболевания.

Активно изучается вопрос действия бактериофагов на биопленки холерных вибрионов [7, 28]. Показано, что фаги

могут эффективно инфицировать и лизировать клетки, присутствующие в био пленках одноклеточных и полимикробных видов [39]. Коктейль, состоящий из трех разных фагов, выделенных из поверхностных вод в Бангладеш, существенно влиял на распределение и уменьшал концентрацию как активной планктонной формы, так и связанных с био пленкой токсигенных вибрионов O1 и O139 серогруппы [41]. Полученные данные расширяют спектр применения бактериофагов для профилактики и терапии холеры.

Несмотря на положительные результаты использования фагов для лечения и профилактики холеры [31, 35, 37, 50], необходимо учитывать и отрицательные эффекты их применения.

Это — возможная передача резистентных генов между бактериальными клетками, что превращает бактерии в вирулентные штаммы [4]. Следует помнить, что умеренные бактериофаги играют существенную роль в эволюции бактерий, способствуя приобретению возбудителями дополнительных факторов вирулентности. В связи с этим фаги, применяемые для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, должны быть исключительно вирулентными [13]. Вот почему нужна проверка бактериофагов на наличие таких факторов перед использованием их в качестве профилактического средства.

Еще одна проблема — это потенциальный иммунный ответ против фага, который может развиться у человека после терапии [45]. Показано, что специфические антитела иммунной системы ликвидируют фаги, поэтому следует отбирать бактериофаги, которые являются менее иммуногенными. Кроме этого, при проведении фаготерапии необходимо определение соответствующих антител для корректировки штаммового состава препаратов [6].

В настоящее время благодаря появлению аналитических инструментов, способных исследовать бактериофаги, таких как секвенирование и электронная микроскопия, удается нивелировать вышеперечисленные недостатки применения фагов для профилактики и лечения различных заболеваний [46]. При условии рационального применения этих препаратов использование фагов имеет значительные перспективы дальнейшего развития.

Заключение

Для применения бактериофагов с профилактической целью при холере необходимо совершенствование технологического процесса получения холерных фаголизатов с высоким титром вирусных частиц и введение этапов специфической очистки от холерного токсина. С помощью молекулярно-генетических методов требуется подтвержде-

ние вирулентной природы используемых бактериофагов, отсутствия генов патогенности в фаговых геномах, что позволит обеспечить высокий уровень безопасности и эффективности противо холерных фаговых препаратов.

Использование фагов для терапии и профилактики холеры как в качестве альтернативы, так и в дополнение к антибиотикотерапии, вакцинопрофилактике этого заболевания, дает возможность, на наш взгляд, снизить риск развития спорадических случаев и вспышек этой инфекции.

Литература

1. Алешкин А.В., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Галимзянов Х.М., Рубальский О.В., Теплый Д.Л., Ахминеева А.Х., Киселева И.А., Бочкарева С.С., Рубальская Е.Е., Рубальский Е.О., Смирнова К.Н., Зулькарнеев Э.Р., Теплый А.Д., Вихрова А.С. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть II: современная история исследований фагопрофилактики и фаготерапии кишечных инфекций // Астраханский медицинский журнал. — 2016. — Т. 11. — № 3. — С. 8–17.
2. Алешкин А.В., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Галимзянов Х.М., Рубальский О.В., Теплый Д.Л., Ахминеева А.Х., Киселева И.А., Бочкарева С.С., Рубальская Е.Е., Рубальский Е.О., Смирнова К.Н., Зулькарнеев Э.Р., Теплый А.Д. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть I: История исследований до широкого применения антибиотиков // Астраханский медицинский журнал. — 2016. — Т. 11. — № 2. — С. 8–16.
3. Алешкин А.В., Зейгарник М.В. Возможности применения бактериофагов в качестве пробиотических средств деконтаминации в области питания // Вопросы диетологии. — 2012. — № 4. — С. 24–34.
4. Асланов Б.И. Бактериофаги — эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам // Медицинский совет. — 2015. — № 13. — С. 106–109.
5. Бактериофаги: биология и практическое применение / Под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. Пер. с англ.: коллектив переводчиков; науч. ред. А.В. Летаров. — М.: Научный мир, 2012. — 640 с.
6. Бочкарева С.С., Алешкин А.В., Еришова О.Н., Новикова Л.И., Афанасьев С.О., Киселева И.А., Зулькарнеев Э.Р., Рубальский Е.О., Борисова О.Ю., Караулов А.В. Иммунологические аспекты фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделении нейрореанимации // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 2017. — № 4. — С. 42–48.
7. Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Лысова Л.К. Анализ внутривидовой

- конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках // Естественные науки. — 2016. — № 1. — С. 49–53.
8. Ворошилова Н.Н., Алферова Э.В., Дарбеева О.С., Майская Л.М., Перепанова Т.С., Лазарева Е.Б., Яцик Г.В., Самсыгина Г.А., Анкирская А.С. Изучение клинической эффективности препарата бактериофага Энтеробактер поливалентного очищенного // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. — 2010. — № 2(38). — С. 31–33.
 9. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Качкина Г.В., Алиева А.А., Саямов С.Р. Отбор бактериофагов для лечения экспериментальной холеры, вызванной классическими холерными вибрионами // Современные наукоемкие технологии. — 2004. — № 3. — С. 11–15.
 10. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Алиева А.А., Саямов С.Р. Применение бивалентной смеси холерных фагов при экспериментальной холере, вызванной *V. cholerae* / Сб. матер. проблем. комис. Научн. совета по сан.-эпид. охр. террит. РФ «Холера и патогенные для человека вибрионы». — Ростов-на-Дону. — 2004. — Вып. 17. — С. 112–114.
 11. Галимзянов Х.М., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Голикова Т.О., Зязин С.Н., Мамонтова Н.С. Перспективы использования бактериофагов в качестве биологически активных добавок к пище // Астраханский медицинский журнал. — 2008. — Т. 3. — № 1. — С. 80–85.
 12. Доскин В.А., Власова И.В. Необыкновенные факты из биографии Э.В. Ермольевой // Науч.-практич. журн. «Врач». — 2012. — № 6. — С. 86–87.
 13. Зуева Л.П., Асланов Б.И., Акимкин В.Г. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 2014. — № 3. — С. 100–107.
 14. Зуева Л.П., Асланов Б.И., Акимкин В.Г. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике ИСМП // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2014. — №1 (74). — С. 43–49.
 15. Кажал Н., Ифтимович Р. Из истории борьбы против микробов и вирусов. — Бухарест: Научное издательство, 1968. — 404 с.
 16. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В. Лизогенные системы и свойства умеренных холерных фагов // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. — 2001. — Вып. 3. — С. 165–167.
 17. Кудрякова Т.А., Авроров В.П., Кругликов В.Д., Качкина Г.В., Шершенко Т.Е., Македонова Л.Д., Переседова Е.С., Мазрухо Б.Л., Пасюкова Н.И. Использование бактериофага в сочетании с глюкозоламом и молочнокислой культурой штамма лактобацилл при лечении экспериментальной холеры / Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. — Ростов н/Д, 2002. — Вып. 15. — С. 111–113.
 18. Кудрякова Т.А., Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Н., Дудина Н.А., Алиева А.А., Рыжко И.В., Качкина Г.В., Македонова Л.Д., Гаевская Н.Е. Применение бактериофага при лечении экспериментальной холеры / Матер. VII Росс. науч.-практ. конф. по пробл. «Холера». — Ростов-на-Дону, 2003. — С. 216–219.
 19. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Гаевская Н.Е., Саямов С.Р. Испытание антибактериальной активности музейных рас холерных бактериофагов и ее изменение при пассажах in vivo / Сб. матер. проблем. комис. Научн. совета по сан.-эпид. охр. террит. РФ «Холера и патогенные для человека вибрионы». — Ростов-на-Дону. — 2003. — Вып. 18. — С. 147–150.
 20. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Саямов С.Р. Поиск вирулентных фагов для лечения экспериментальной холеры / Проблемы биол. и экологич. безопасности: матер. междунаро. науч. конф. — Оболенск, 2000. — С. 57–58.
 21. Ломов Ю.М., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Переседова Е.С. Лечение экспериментальной холеры специфическими фагами // В Материалах VI Российско-Итальянской научной конференции «Инфекционные болезни: диагностика, лечение, профилактика», 14–16 дек. 2000 г. — СПб.: Воен.-мед. акад., 2000. — 315 с. — С. 147.
 22. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. Холерные фаги. — Ростовский государственный научно-исследовательский противочумный институт МЗ СССР, Ростов-на-Дону, 1990. — 159 с.
 23. Лыско К.А., Отрашевская Е.В., Игнатьев Г.М. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов: краткий обзор производства и применения // Биопрепараты. — 2013. — № 4. — С. 4–9.
 24. Микробиология и лабораторная диагностика холеры. Краткое руководство. — Ростов н/Д: Кн. изд-во, 1975. — 136 с.
 25. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Куриленко М.Л., Пакскина Н.Д., Иванова С.М., Анисимова Г.Б., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. Прогноз на 2018 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2018. — № 1. — С. 36–43.
 26. Падруль М.М., Захарова Ю.А., Николаева А.М. и др. Микробиологическая диагностика инфекций мочевых путей у женщин при беременности и использование препаратов бактериофагов при данной патологии: методические рекомендации. — Пермь: 2007. — 29 с.
 27. Селянская Н.А., Егизарян Л.А., Веркина Л.М. Динамика антибиотикорезистентности холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории РФ в 2012–2016 гг. / Акт. вопр. эпидемиол. микроб. и диагност. инф. и паразитар. забол. в Рост. обл.: Матер. регион. научн.-практ. конф. — Ростов-на-Дону, 2017. — С. 151–154.
 28. Титова С.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И. и др. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V. cholerae* O1El-Tor, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области в 2003–2014 гг. // Здоровье населения и среда обитания. — 2015. — № 2. — С. 39–41.

29. Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Селянская Н.А., Егиазарян Л.А., Погожова М.П., Головин С.Н., Пасюкова Н.И. Активность препарата бактериофагов в отношении антибиотикорезистентных штаммов холерных вибрионов *E1Tor* // Антибиотики и химиотерапия. — 2018. — Т. 63. — Вып. 7–8. — С. 28–31.
30. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система) / Под ред. А.Г. Чучалина, Ю.Б. Белоусова, В.В. Яснецова. — М.: Эхо, 2006. — Вып. VII. — С. 659–667.
31. Bhowmick T.S., Koley H., Das M., Saha D.R., Sarkar B.L. Pathogenic potential of *Vibrio* phages against an experimental infection with *Vibrio cholerae* O1 in the RITARD model // Int. J. Antimicrob. Agents. — 2009. — Vol. 33(6). — P. 569–573.
32. Chanishvili N. Phage therapy — history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches // Adv. Virus. Res. — 2012. — Vol. 83. — P. 3–40.
33. Cooper C.J., Khan Mirzaei M., Nilsson A.S. Adapting drug approval pathways for bacteriophage-based therapeutics // Front. Microbiol. — 2016. — Vol. 7. — P. 1209.
34. Domingo-Calap P., Georgel P., Bahram S. Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools // HLA. — 2016. — Vol. 87. — P. 133–140.
35. Dutta N.K., Panse M.V. An experimental study on the usefulness of bacteriophage in the prophylaxis and treatment of cholera // Bull. World Health Organ. — 1963. — Vol. 28. — P. 357–360.
36. Granowitz E.V., Brown R.B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions // Crit. Care Clin. — 2008. — Vol. 24. — P. 421–422.
37. Jaiswal A., Koley H., Mitra S., Saha D.R., Sarkar B. Comparative analysis of different oral approaches to treat *Vibrio cholerae* infection in adult mice // Int. J. Med. Microbiol. — 2014. — Vol. 304(3–4). — P. 422–430.
38. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi A.K., Wertheim H.F., Sumpradit N., Vlieghe E., Hara G.L., Gould I.M., Goossens H. et al. Antibiotic resistance — the need for global solutions // Lancet Infect. Dis. — 2013. — Vol. 13(12). — P. 1057–1098.
39. Lehman S.M., Donlan R.M. Bacteriophage-mediated control of a two-species biofilm formed by microorganisms causing catheter-associated urinary tract infections in an in vitro urinary catheter model // Antimicrob. Agents Chemother. — 2015. — Vol. 59. — P. 1127–1137.
40. Monsur K.A., Marchuk L.M. Therapeutic and prophylactic value of cholera phage / In: Cholera (eds. Barua D. & Burrows W.). — W.B. Saunders, Philadelphia, 1974. — P. 273–280.
41. Naser I.B., Hogue M.M., Abdullah A., Bari S.M.N., Ghosh A.N., Farugue S.M. Environmental bacteriophages active on biofilms and planktonic forms of toxigenic *Vibrio cholerae*: Potential relevance in cholera epidemiology // PLoS One. — 2017. — Vol. 12(7). — e0180838.
42. Pirnay J.P., Blasdel B.G. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products // Pharm. Res. — 2015. — Vol. 32(7). — P. 2173–2179.
43. Qadri F. Efficacy of a single-dose inactivated oral cholera vaccine in Bangladesh // N. Engl. J. Med. — 2016. — Vol. 374. — P. 1723–1732.
44. Reveiz L. et al. Chemoprophylaxis in contacts of patients with cholera: systematic review and meta-analysis // PLoS One. — 2011. — Vol. 6. — e27060.
45. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G. Bacteriophage therapy // Antimicrob. Agents Chemother. — 2001. — Vol. 45(3). — P. 649–659.
46. Wahida A., Ritter K., Horz H.P. The Janus-face of bacteriophages across human body habitats // PLoS Pathog. — 2016. — Vol. 12(6). — e1005634.
47. Weinbauer M.G. Ecology of prokaryotic viruses // FEMS Microbiol. Rev. — 2004. — Vol. 28. — P. 127–181.
48. Wong K.K., Burdette E., Mahon B.E., Mintz E.D., Ryan E.T., Reingold A.L. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices for Use of Cholera Vaccine // MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. — 2017. — Vol. 66(18). — P. 482–485.
49. World Health Organization. Cholera vaccines: WHO position paper // Wkly Epidemiol. Rec. — 2010. — Vol. 85. — P. 117–128.
50. Yen M., Cairns L.S., Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models // Nat. Commun. — 2017. — Vol. 8. — Art. 14187.

THE HISTORY AND PROSPECTS OF USING CHOLERA BACTERIOPHAGES IN THE TREATMENT AND PREVENTION OF CHOLERA

A.V. TYURINA, N.E. GAEVSKAYA, M.P. POGOZHOVA, A.O. KOCHETKOVA

Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don

The review substantiates the relevance and scientific and practical relevance of phage therapy for cholera. The historical aspects of this problem are considered. The emphasis is on the special, specific place of phagotherapy in the prevention and treatment of cholera. The assessment of the potential of domestic researchers in relation to solving these problems is given.

Keywords: cholera bacteriophages, phage therapy.

К 150-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ БИОХИМИКА ФЕБУСА ЛЕВИНА — УЧЕНИКА И.П. ПАВЛОВА И А.П. БОРОДИНА

В.С. ВОРОБЬЕВ*

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва

В связи со 150-летием со дня рождения американского биохимика российского происхождения Фебуса Левина приведены биографические материалы и осуществлен анализ его творчества с акцентом на преемственный вклад в изучение нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: история науки, биохимия, нуклеиновые кислоты, биографии, Фебус Левин.



В 2019 году исполнилось 150 лет со дня рождения Фебуса Левина — известного американского биохимика российского происхождения, внесшего определенный вклад в расшифровку строения ДНК. Это имя знакомо сравнительно узким специалистам, и юбилейная дата открывает возможность для ознакомления с его творчеством более широкого круга молекулярных биологов и вообще специалистов, имеющих вкус к истории.

Curriculum vitae. Левин родился 25 февраля 1869 года в Ковенской губернии Российской империи (ныне — территория Литовской республики) в семье евреев-литваков (это — территориально-лингвистическая подгруппа ашкеназийских евреев). При рождении он был наречен

Фашелем, а по отцу — Аронович. При поступлении на учебу имя было заменено на «Федор». Позднее в эмиграции он вместо официального «Фашель Аронович Левин» стал именоваться «Phoebus Aaron Theodore Levene», а исторически за ним сохранилось укороченное сочетание «Phoebus Levene» (в русском эквиваленте — Фебус Левин, иногда «Фибус»). Наиболее частое цитирование в статьях — Levene P.A.

Левин вырос в многодетной семье: он был вторым ребенком среди восьмерых. В возрасте 2 лет семья переехала в Санкт-Петербург. Очевидно, достаток (отец владел тремя магазинами) и положение позволили ему получить хорошее образование. В столице он учился в 6- и 10-й гимназиях, был отличником. В совершенстве овладел греческим и латинским языками. В числе квоты (процентная норма для поступления в учебные заведения) ему открылась возможность получить приравняемое к университетскому образование. В 1886 году он поступил в Военно-медицинскую академию в Санкт-Петербурге, где ему было оказано внимание выдающимися профессорами. Среди его наставников был знаменитый композитор А.П. Бородин, занимавший тогда пост начальника кафедры химии (в здании Естественно-исторического института ВМедА на Пироговской набережной Невы, в котором она располагалась, до сих пор учат химии будущих военных медиков), который опекал талантливого юношу и приставил нему своего зятя профессора А.П. Дианина — последний дал слушателю академии полную свободу в овладении химией и ее методами, предложив тему в пределах своих научных интересов. Молодой талант оправдал надежды своих покровителей, выполнив работу по органической химии — изучение конденсации фенолов с альдегидами и кетонами. По-видимому, под руководством И.П. Павлова (бывшего в то время при-

© 2019 г. Воробьев В.С.

* Автор для переписки:

Воробьев Вадим Сергеевич

к.м.н., член Центрального Правления Общества биотехнологов

России им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru

ват-доцентом на кафедре физиологии) им была выполнена научная работа на стыке физиологии и биохимии о роли блуждающего нерва в регуляции уровня сахара в крови (статья по этой теме была напечатана позже на немецком языке). Этот период до 23 лет, когда фактически закладываются основы творческой личности, мало комментируется в существующих биографиях ученого. А ведь общение с А.П. Бородиным и И.П. Павловым (в будущем Иван Петрович посещал своего ученика во время визита в США) было не просто контактом с интеллигентными людьми в военных мундирах, а взаимодействие с первоклассными гениями русской нации. Здесь он приобщился к нелегкому ремеслу химика, отсюда из России он вынес привычку денно и нощно трудиться в лаборатории и уже в Америке, где он делал так до конца своих дней, любил, когда сослуживцы его уважительно-ласково называли «Федей».

Интересен такой факт из продолжения «русской истории» Левина. Во время поездки И.П. Павлова с сыном Владимиром в США в 1923 году его ограбили (украли бумажник), при этом были утрачены деньги и документы. Он был очень расстроен и собирался поскорее покинуть негостеприимную страну. Выйти из этого положения помог своему учителю Левин, давший денег и поспособствовавший в получении новой визы. Вообще дом и лаборатория Левина были всегда открыты для соотечественников. Этот факт описали большой почитатель Павлова американец Уолтер Кеннон [6] и ученик Павлова Э.А. Асратян [1].

В июне 1891 года Левин, не закончив обучение в академии, с семьей эмигрировал в США. Однако вернулся ненадолго в Россию и осенью того же года сдал экзамены, получив степень магистра и диплом лекаря с отличием в Императорской Военно-медицинской академии. Историки и биографы называют причину отъезда возросший уровень антисемитизма в России, а также более широкие возможности для применения собственной инициативы в Новом Свете.

Поселившись в Нью-Йорке, с 1892 по 1905 гг. он занимался практической медициной и параллельно проводил научные исследования в Америке и Европе. Он продолжил занятия физиологической химией в лаборатории профессора Дж. Куртиса на кафедре физиологии Колледжа по подготовке врачей и хирургов при Колумбийском университете. Он трудился так несколько лет, а на лето пересекал океан, чтобы поработать в лаборатории Э. Дрекслера в Берне. В 1896 году он получил должность сотрудника по физиологической химии в лаборатории Института патологии государственных больниц Нью-

Йорка. Уже тогда он проявлял интерес к нуклеинам и нуклеиновым кислотам.

В ноябре 1896 года у него открылся туберкулез. На два года он выключился из работы для лечения. Сначала это был год в США, в Саранак-Лейке, а затем поездка за границу в Давос (Швейцария). Однако везде он не прекращал занятия наукой. Особо надо отметить работу приглашенным сотрудником в Марбурге в лаборатории Альбрехта Косселя, знаменитого биохимика, создателя одной из первых теорий строения белков, исследователя нуклеинов и нуклеиновых кислот, который выделил и описал 5 азотистых оснований, присутствующих в нуклеиновых кислотах: аденин, цитозин, гуанин, тимин и урацил, лауреата Нобелевской премии 1910 года.

В 1900—1902 гг. Левин получил приглашение занять должность химика в лаборатории по изучению туберкулеза в Саранак-Лейке, откуда он на лето выезжал в лабораторию Эмиля Фишера в Берлинском университете, также лауреата Нобелевской премии (1902), осуществившего синтез пуриновых производных: аденина, гуанина, кофеина и др., автора и других выдающихся достижений в химии. Так что Левин неслучайно попал на магистральную дорогу, ведущую к познанию наследственных молекул, и сделал ряд существенных вкладов в предысторию открытия ДНК. И не его вина, что им была сформулирована неверная тетрауклеотидная гипотеза, но зато им получены преемственные достоверные факты, приблизившие сообщество ученых к прогрессу в раскрытии главной тайны самовоспроизведения биологических молекул. Дело в том, что большинство биохимиков XX века не связывало наследственные свойства с нуклеиновыми кислотами, а отдавало предпочтение белкам, и это сохранялось до начала 1950-х годов. Левин не был исключением.

В 1905 году он был принят на должность лабораторного ассистента к д-ру Симону Флекснеру в Рокфеллеровский институт медицинских исследований (позднее — Рокфеллеровский университет). Его авторитет в физиологической химии был вскоре замечен, и в 1907 году он стал членом института, возглавив отдел химии и в этой должности оставался до самой смерти в 1940 году. В 1906 году отдел получил прекрасное новое помещение для работы с необходимым оборудованием — два этажа в отдельном здании, что в значительной мере способствовало проведению полноценных научных исследований не только коллективу Левина, но и разворачиванию биохимического направления в США. Здесь состоялся расцвет его деятельности (рис. 1).

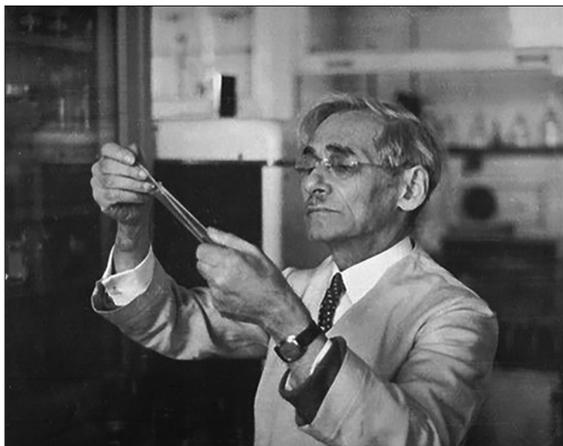


Рис. 1. Левин за работой в лаборатории

Научный вклад. Научная продуктивность Левина очень высока — более 700 работ, большая часть которых носила экспериментальный характер. Его научные интересы лежали в области исследования биологических молекул — нуклеиновых кислот, белков, аминокислот, липидов, углеводов, гликопротеинов, ферментов, аминокислот (в том числе гексозаминов), витаминов. Разнообразна была и методология — физическая химия, стереохимия, кристаллохимия и др. Применялись разные подходы: мягкий гидролиз, оптическое обращение и т.д. В целом, его вклад в создание биохимии в США огромен (это можно особенно проследить по серии его публикаций в *Journal of Biological Chemistry* (1905–1940), а также особенно по числу подготовленных специалистов на базе Рокфеллеровского института. Надо отметить, что Левин в течение первых 15 лет существования указанного журнала входил в его редакционный совет.

Исторически так случилось, что больше всего его имя упоминается в связи с тетра-нуклеотидной гипотезой, заслоняя остальной блок работ, порой очень значимых для других отраслей (например, изучение сахаров и другие темы). В общих энциклопедических сводках, включая Интернет, он представляется как автор тетра-нуклеотидной гипотезы с преподнесением авторского вклада в фактическую базу, подготовленную в процессе ее формирования [3, 7, 8, 10, 18, 21]. Упоминается его имя в руководствах и учебных пособиях [4, 5], в научно-популярной литературе [9]. Имеются и квалифицированные научно-исторические исследования [2, 11, 19].

После нескольких лет стажировки в ведущих мировых центрах по изучению нуклеиновых кислот и работы в превосходно оборудованной лаборатории Рокфеллеровского института Левин сумел найти собственную нишу для проявления творческой инициативы. Результат не замедлил сказаться и уже в 1909 году появилась осно-

вополагающая публикация 40-летнего автора [15]. В ней были изложены результаты биохимического изучения нуклеиновой кислоты дрожжей и высказаны теоретические положения, названные тетра-нуклеотидной гипотезой. Позднее она была подкреплена, по его мнению, другими работами и в обобщенном виде представлялась так.

Согласно нее, утверждалось, что в клетках живых организмов нуклеиновые кислоты содержат равные молярные концентрации всех четырех нуклеотидов. На основании этого им была выдвинута гипотеза о том, что эта четырехкомпонентная структура, тетрамер (тетрануклеотид) многократно повторяется, образуя полимер. Такая организация служила доказательством непричастности нуклеиновых кислот к передаче наследственных свойств, а предпочтение отдавалось, согласно общепринятому тогда консенсусу, белковому компоненту хромосом, вообще белкам, особенно ферментам, и вирусам. Вдобавок к краткой текстовой информации нередко приводилась структурная формула с циклическим строением тетра-нуклеотида (рис. 2).

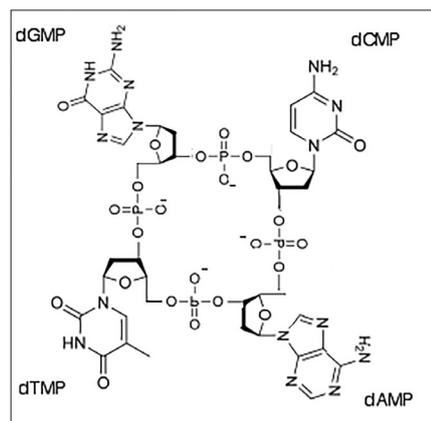


Рис.2. Схема, иллюстрирующая тетра-нуклеотидную гипотезу

В мемориальном юбилейном материале целесообразно все же дать более пространную картину с деталями, выстроенными в процессе развития. Важные последовательные исследования по раскрытию структуры нуклеиновых кислот и ключевые результаты получены опытным биохимиком с помощью безукоризненных химических методов. Но практические достижения Левина зачастую меркли в связи с противоречиями, неоднозначным восприятием и отсутствием критики его тетра-нуклеотидной гипотезы при жизни ученого в связи с его большим авторитетом; как это часто бывает, после его смерти она быстро выпала из поля зрения.

Рассмотрим динамику событий. В статье 1909 года [17] он поставил вопрос о соотношениях между нукле-

иновыми кислотами дрожжей и других организмов. Его ответ был ошибочным. Он не доказал, что содержание нуклеиновых кислот организмоспецифично, и не знал, что в большинстве организмов 4 нуклеотида не присутствуют в равных количествах. Можно полагать, что он пришел к неверному заключению, скорее всего, из-за несовершенства аналитических методов того времени. Ведь только после работ Чаргаффа 1949–1951 гг. стало ясно о строгих количественных соотношениях между различными типами азотистых оснований нуклеотидов в любом организме.

Тетрануклеотидная гипотеза последовательно утверждалась в течение двух десятилетий после ее концептуальной формулировки в статье 1909 года. При изучении нуклеиновой кислоты дрожжей он установил эмпирическую формулу соединения — $C_{38}H_{50}O_{29}N_{15}P_4$ и нашел в нем 4 азотистых основания (нуклеозида): аденин, гуанин, цитозин, урацил; то есть, это была РНК. Причем, основное содержание было в эквимольных соотношениях. Сахар был представлен пентозой. Констатировано наличие фосфорной кислоты, так что нуклеотид представлялся как комплекс фосфат — сахар — основание. Автор представлял себе нуклеиновую структуру как ряд тетрануклеотидов, связанных через фосфатные группы, — это изображено им на структурной формуле (рис. 3).

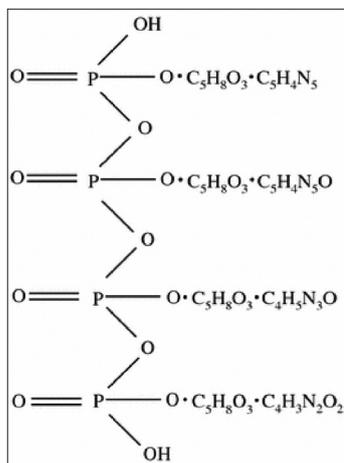


Рис. 3. Предполагаемая структурная формула нуклеиновой кислоты дрожжей (по Левину, 1909) [17]

В 1912 году была опубликована статья Ф. Левина в соавторстве с В. Джекобсом об исследовании нуклеиновой кислоты тимуса (тимонуклеиновой кислоты) [13]. Речь шла о ДНК, в которой тимин находился вместо урацила. Однако способ связи между нуклеотидами в рамках его гипотезы не был выяснен. В последующем

вышло несколько статей в развитие тетрануклеотидной идеи. Проблема связи между нуклеотидами по-прежнему оставалась. В публикации 1919 года [16], подготовленной на материале дрожжей, он считал, что имеется фосфо-моноэфирная связь, но, как оказалось, это было неправильно (здесь фосфодиэфирная связь). В общем, росло число публикаций по тетрануклеотидной теме [12, 14, 15], но приближения к истине не было. Резюмируя эпопею с тетрануклеотидной гипотезой, следует отметить, что ее «пробуксовка» однако не мешала наряду с этим получать отдельно взятые позитивные доказательные факты. Тем более нельзя с высоты XXI века судить о нерешенных вопросах прошлого: никто тогда не представлял размеры ДНК. Даже Левин говорил о 10 тетрамерах в структуре предполагаемого полимера нуклеиновой кислоты.

Интересны нумерологические параллели в жизни и творчестве Левина: он родился в год открытия Фридрихом Мишером нуклеина в ядре клеток в 1869 году, в 1909 году им была изучена структура нуклеотидов и сформулирована в общих чертах тетрануклеотидная гипотеза [17], в 1919 году была опубликована его значимая, обобщающая и часто цитируемая статья о структуре нуклеиновых кислот [16], в 1929 году он раскрыл химическую формулу дезоксирибозы [14].

Нужно подчеркнуть, что полная оценка научного вклада Левина более возможна при общей ретроспективной реконструкции. В этом случае многие разрозненные факты классифицируются и интегрируются в последовательную цепь, логически подводящую к будущему развитию молекулярной биологии с ее базисной доктриной нуклеиновых кислот.

Несомненной заслугой Левина является то, что он, исходя из представлений лабораторий А. Косселя и Э. Фишера, продвинул далее разработку проблемы нуклеиновых кислот. В частности, он полнее исследовал то, что нуклеиновые кислоты являются полимерами, состоящими из мономеров — нуклеотидов (термин «нуклеотид» предложен им), специфика которых определяется пуриновыми (аденин, гуанин) и пиримидиновыми (тимин, цитозин, урацил) основаниями.

Левин методом мягкого гидролиза нуклеиновых кислот выделил нуклеотиды и посредством метилирования изучил их структуру. Существенно также то, что им были определены химические различия между РНК и ДНК (бывшей тимонуклеиновой кислотой). Ему принадлежит приоритет в определении этих различий в зависимости от характера содержания в них сахара: в РНК — d-рибоза, моносахарид из группы пентоз, идентифицирован в 1905 году (ее он выделил и

идентифицировал в 1909 г.), а в ДНК — дезоксирибоза (для определения ее химической формулы Левину понадобились 20 лет).

Главное в деятельности Левина — это существенный вклад в распознавание строения крупной наследственной молекулы (нуклеиновой кислоты, но не белка, как ожидалось многими) не методом одновременной полной расшифровки, а способом последовательного приближения, постепенного прояснения отдельных множественных деталей, причем без подразумевания их истинного общего функционального предназначения. Его открытия вместе с данными Чаргаффа, кристаллографов, пророческих идей Кольцова и фактов других предшественников легли в основу реальной стереомодели Уотсона — Крика, которая сразу поставила точку в определении единого структурного и функционального принципа репликации, причем природа предусмотрела здесь и механизм позитивного копирования — самоудвоения за счет антипараллельности — двунаправленности спиральной организации в третичной структуре.

На временном отдалении хорошо представляются и другие достижения Левина. Так, он придерживался линейной пептидной теории строения белков Фишера. Большая заслуга принадлежит ему в применении методов физической химии к биохимии. Конечно, важен и весь его цикл исследований по сахарам.

Общественная активность и признание. Было бы странным и незаслуженным отсутствие признаков общественного признания у такой личности и столь неутомимого подвижника науки. Они налицо, так как он был членом многих научных обществ: Американское химическое общество, Американское общество биохимиков, Американское физиологическое общество, Американское общество естествоиспытателей, Американское философское общество, Общество Гарвея, Немецкое химическое общество, Французское химическое общество и др. Чикагское отделение Американского химического общества наградило его в 1931 году медалью Уилларда Гиббса, а в 1938 году Нью-Йоркское отделение того же общества — медалью Уильямса Николса.

Особенности личности. Это был человек высокой культуры, широко образованный, знаток искусств, собиратель и коллекционер, с обширной личной библиотекой, с огромной мотивацией к научному поиску, внимательный наставник, открытый к любому благому делу. Что уж говорить о его филологических способностях: владение в совершенстве базовыми европейскими языками с дополнительным умением изъясняться на испанском и итальянском — это было прямым следствием

его выдающейся, разносторонне одаренной личности. Стиль его работы был сугубо индивидуализирован, он не любил больших коллективов. Ему были чужды излишняя публичность и бюрократия. Женился в 51 год на норвежке Анне Эрикссон, брак был бездетным.

Публикации. Уже говорилось о его сотнях опубликованных работ. Новые поколения ученых должны быть благодарны Академии наук США за подборку полной библиографии его трудов, которая приведена в ее *Biographical memoirs*, Vol. 23, 1943 [20].

Вместо заключения. В 1931 году при получении награды (медаль Уилларда Гиббса Американского химического общества) Левин в своей речи «Восстание биохимика» сказал: «Таким образом, шаг за шагом одна тайна жизни за другой будет раскрываться. Достигнет ли человеческий разум полного и абсолютного знания и полной разгадки жизни — это не существенно. Однако вполне определено, что восстание биохимика против идеи ограниченности человеческой любознательности будет продолжаться. Биохимия будет продолжать функционировать, если все знание, даже таковое о жизни, будет доступно человеческому пониманию. Прошлое учит, что решение некоторой проблемы всегда ставит новую. Новые открытия в физике, математике, теоретической химии снабжают биохимию новыми инструментами, новыми инструментами для решения проблем и создания новых. Жизнь продолжается, человеческий разум сталкивается с новыми тайнами, и биохимия будет играть роль в их решении» [20, р. 86].

Литература

1. Асратян Э.А. Иван Петрович Павлов. — М.: «Наука», 1974. — 456 с.
2. Ванюшин Б.Ф. История биологии с начала XX века до наших дней. — М.: Наука, 1975. — С. 454.
3. Взлеты и просчеты Фебуса Левина. Интернет: www.lev-verkhovsky.ru/взлеты-и-просчеты-фебуса-левина.
4. Глушен С.В. История биологии: пособие. — Минск: БГУ, 2010. — 91 с.
5. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. — М.: Мир, 1976. — 415 с.
6. И.П. Павлов в воспоминаниях современников. — Наука: Ленинградское отделение, 1967. — 384 с. — С. 283.
7. Левин Фашель Аронович (Левен Фозбус Арон Теодор). Интернет: www.ihst.ru/projects/emigrants/Levin.htm.
8. Сойфер В. Великий Николай Константинович Кольцов // Троицкий вариант. — 2018. — № 2. — С. 6–7. Интернет: https://elementy.ru/nauchno-popularnaya_bib

- lioteka/433971/Velikiy—Nikolay—Konstantinovich—Koltsov.
9. Федор Левин и нуклеотиды / В кн.: Люди мира. Русское научное зарубежье. Ред. Д. Баяк. — М.: Альпина нон-фикшн, 2018. — 516 с.
 10. Biography 15: Phoebus Aaron Theodor Levene (1869–1940) — DNA Learning Center. Интернет: <https://www.dnasc.org/view/16357—Biography-15—Phoebus—Aaron—Theodor—Levene—1869—1940—html>.
 11. Hargittai I. The tetranucleotide hypothesis: a centennial // Structural Chemistry. — 2009. — Vol. 20. — No. 5. — P. 752–758.
 12. Levene P.A., Bass L.W. Nucleic acids. American chemical society monograph series. Vol. 56. — The Chemical Catalog Co, New York, 1931.
 13. Levene P.A., Jacobs W.A. On the structure of thymus nucleic acid // J. Biol. Chem. — 1912. — Vol. 12. — P. 411–420.
 14. Levene P.A., London E.S. The structure of thymonucleic acid // J. Biol. Chem. — 1929. — Vol. 83. — P. 793–802.
 15. Levene P.A. Preparation and analysis of animal nucleic acid // J. Biol. Chem. — 1921. — Vol. 48. — P. 177.
 16. Levene P.A. The structure of yeast nucleic acid. IV. Ammonia hydrolysis // J. Biol. Chem. — 1919. — Vol. 40. — P. 415–424.
 17. Levene P.A. Über die Hefennucleinsäure // Biochem. Zeitschrift. — 1909. — Bd. 17. — S. 120–131.
 18. Phoebus Levene. — Wikipedia. Интернет: https://wikipedia.org/wiki/Phoebus_Levene.
 19. Tipson R.S. Phoebus Aaron Theodor Levene, 1869–1940 // Adv. Carbohydr. Chem. — 1957. — Vol. 12. — P. 1–12.
 20. Van Slyke D.D., Jacobs W.A. Biographical memoirs. — Vol. 23. — National Academy of Sciences of the USA. Washington, DC, 1943. — P. 73–126.
 21. <https://www.chemistryworld.com/news/the-dna-story/3003946.article>.

ON THE 150TH ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF THE BIOCHEMIST FEBUS LEVIN, THE STUDENT OF I.P. PAVLOV AND A.P. BORODIN

V.S. VOROBYEV

Yu.A. Ovchinnikov Society of Biotechnologists of Russia, Moscow

In connection with the 150th anniversary of the birth of an American biochemist of Russian origin, Febus Levin, biographical materials are presented and his work is analyzed with an emphasis on the successive contribution to the study of nucleic acids.

Keywords: history of science, biochemistry, nucleic acids, biographies, Febus Levin.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 28.09.19
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru