

ВОЙСК РХБ ЗАЩИТЫ

JOURNAL OF NBC PROTECTION CORPS

TEMA HOMEPA:

Научные проблемы соблюдения конвенций о запрещении химического и биологического оружия

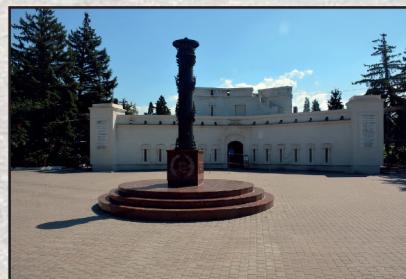
ISSUE SUBJECT:

Scientific Problems of Compliance with the Conventions on the Prohibition of Chemical and Biological Weapons



Наша замечательная Россия

Нулевая мировая. Малахов курган, 1854–1855 гг.



Война началась с локального военного конфликта с Турцией, объявившей войну Российской Империи 4 (16) октября 1853 г. Когда Турция стала терпеть поражение, Великобритания и Франция 15 (27) марта 1854 г. объявили войну России. С этого момента война приобрела глобальный характер. Боевые действия шли на Кавказе, в Дунайских княжествах, на Балтийском, Чёрном, Азовском, Белом и Баренцевом морях, а также в низовьях Амура и на Камчатке. Наибольшего напряжения они достигли в Крыму, поэтому в России война получила название «Крымской». В XX в., после двух мировых войн, ее стали называть «нулевой мировой войной». Боевые действия прекратились в конце 1855 г. с неопределенным результатом. Малахов курган пал 27 августа (8 сентября) 1855 г. Союзники смогли захватить только южную часть Севастополя. После захвата 16 (28) ноября 1855 г. нашими войсками турецкой крепости Карса в Закавказье, союзники пошли на переговоры о мире, так как движение русских войск от Карса в сторону Босфора грозило им стратегическим окружением. Заключенный в марте 1856 г. компромиссный Парижский трактат Россия разорвала после поражения в 1871 г. Франции в Франко-прусской войне (1870–1871). Британия в одиночку воевать с Россией не решилась.

Верхняя фотография. Памятник адмиралу В.А. Корнилову (1806–1854) на месте его смертельного ранения 5 октября 1854 г. на Малаховом кургане. Установлен 5 (17) октября 1895 г. Фотографии нижнего ряда. Слева – батарея № 17 лейтенанта С.С. Сенявина (1817–1866). В центре – Оборонительная башня Малахова кургана и установленный в 2009 г. «Вечный огонь». Построена в июне 1854 г. Нижний ярус до конца обороны служил убежищем для солдат. Справа – контрминный ход на Малаховом кургане. Русские продолбили около 7 тыс. м контрминных ходов. Из 94 подземных взрывов под позициями союзников, произведенных русскими, был только один неудавшийся.



ВЕСТНИК ВОЙСК РХБ ЗАЩИТЫ

Журнал издается
с 2017 года

Рецензируемый научно-практический журнал, специализирующийся на освещении химических и биологических угроз Российской Федерации, научных достижений по основным направлениям деятельности и задачам войск РХБ защиты ВС РФ, повышении профессионального уровня специалистов войск РХБ защиты ВС РФ, возрождении интереса к их истории и привлечении молодых ученых к работе в научно-исследовательских организациях войск РХБ защиты ВС РФ. «Вестник войск РХБ защиты» – единственный журнал в Российской Федерации, который рассматривает научные проблемы соблюдения конвенций о запрещении химического и биологического оружия, а также историю применения химического и биологического оружия в войнах и конфликтах.

ISSN 2587-5728

(Print)

ISSN 3034-2791

(Online)

Том 8, № 2

2024 г.

Учредитель и издатель

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского»
Министерства обороны Российской Федерации (27 НЦ МО РФ)

Выходит ежеквартально

Главный редактор

Петров Станислав Вениаминович.
Доктор технических наук. Главный научный сотрудник 27 НЦ МО РФ.
Москва, Россия

Заместители главного редактора

Супотницкий Михаил Васильевич
Кандидат биологических наук. Старший научный сотрудник. Главный специалист 27 НЦ МО РФ. Москва, Россия

Колесников Дмитрий Петрович
Кандидат технических наук, доцент. Старший научный сотрудник 27 НЦ МО РФ. Москва, Россия

Научный редактор

Лебединская Елена Владимировна
Кандидат биологических наук. Научный редактор отдела 27 НЦ МО РФ.
Москва, Россия

Редактор, дизайн, верстка

Шачнева Наталья Владимировна
Научный сотрудник отдела 27 НЦ МО РФ. Москва, Россия

К публикации принимаются статьи, подготовленные на русском и английском языках, в соответствии с правилами для авторов, размещенными на сайте журнала
<https://www.nbsprot.ru/jour/about/submissions#authorGuidelines>

Предпочтением в опубликовании пользуются работы по научным специальностям:

- 6.2.1. Вооружение и военная техника (технические науки).
- 6.2.10. Поражающее действие специальных видов оружия, средства и способы защиты (химические науки, технические науки, биологические науки).
- 6.3.3. Военная история (исторические науки).

Рецензируемый журнал открытого доступа, индексируется в российских и международных реферативных и индексных базах данных:

Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Российская государственная библиотека, DOAJ, ROAD, Академия Google (Google Scholar), Mendeley, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, Lens.org, Ulrichsweb, Unpaywall, OpenCitations, Wikidata и др.

Условия оферты для авторов приведены в п. 12 Правил для авторов (<https://www.nbsprot.ru/jour/about/submissions#authorGuidelines>).

Используется модель двойного слепого рецензирования. Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописей не взимается. Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International 4.0 (CC BY 4.0).

Журнал распространяется в органах законодательной и исполнительной власти Российской Федерации, в центральных органах военного управления, в научно-исследовательских организациях и образовательных учреждениях Министерства обороны Российской Федерации.

Позиция редакции может не совпадать с точкой зрения авторов.

Редакционная коллегия

Агеев Николай Валентинович
Доктор исторических наук, профессор. Преподаватель кафедры истории войн и военного искусства Военной академии Генерального штаба Вооруженных Сил Российской Федерации. Москва, Россия

Аминин Дмитрий Львович
Доктор биологических наук, член-кор. РАН. Начальник лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН. Владивосток, Россия

Бей Евгений Васильевич
Доктор исторических наук. Заместитель начальника отдела Научно-исследовательского института (войной истории) Военной академии Генерального штаба Вооруженных Сил Российской Федерации. Москва, Россия

Григорьев Андрей Михайлович
Доктор химических наук. Старший научный сотрудник отдела 27 НЦ МО РФ. Москва, Россия

Дармов Илья Владимирович
Доктор медицинских наук, профессор. Главный научный сотрудник научно-исследовательского управления филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ. Киров, Россия

Ефременко Елена Николаевна
Доктор биологических наук, профессор. Заведующая лабораторией кафедры химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Москва, Россия

Завьялова Наталья Васильевна
Доктор биологических наук, профессор. Главный научный сотрудник управления 27 НЦ МО РФ. Москва, Россия

Кондратьев Владимир Борисович
Доктор технических наук, профессор. Генеральный директор ГНИИ органической химии и технологии. Москва, Россия

Лакота Ян Янович
Доктор медицинских наук. Кандидат медицинских наук (онкология). Сотрудник Центра экспериментальной медицины Словацкой академии наук. Братислава, Словакия

Лещенко Андрей Анатольевич.
Доктор технических наук, профессор. Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ. Киров, Россия

Монаков Михаил Сергеевич

Доктор исторических наук. Старший научный сотрудник отдела Научно-исследовательского института (войной истории) Военной академии Генерального штаба Вооруженных Сил Российской Федерации. Москва, Россия

Нечипуренко Юрий Дмитриевич

Доктор физико-математических наук. Ведущий научный сотрудник лаборатории ДНК-белковых взаимодействий Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Москва, Россия

Родин Игорь Александрович

Доктор химических наук. Заместитель декана по научно-инновационной работе химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Москва, Россия

Рыбальченко Игорь Владимирович

Доктор химических наук, профессор. Ведущий научный сотрудник отдела 27 НЦ МО РФ. Москва, Россия

Холстов Виктор Иванович

Доктор химических наук, профессор. Руководитель Центра аналитических исследований Российской Федерации по конвенциям о запрещении химического и биологического оружия при Минпромторге России. Москва, Россия

Чугунов Евгений Анатольевич

Кандидат исторических наук. Доцент Военной академии РХБ защиты имени Маршала Советского Союза С.К. Тимошенко МО РФ. Кострома, Россия

Редакционный совет

Кириллов Игорь Анатольевич (председатель)

Кандидат военных наук. Начальник войск РХБ защиты ВС РФ. Москва, Россия

Ковтун Виктор Александрович (заместитель председателя)

Кандидат химических наук, доцент. Начальник 27 НЦ МО РФ. Москва, Россия

Иноземцев Валерий Александрович

Доктор военных наук. Начальник ФГБУ «33 ЦНИИ» МО РФ. Вольск, Россия

Туманов Александр Сергеевич

Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник. Начальник филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ. Киров, Россия

Шабельников Максим Петрович

Кандидат технических наук. Заместитель начальника 27 НЦ МО РФ по НИР. Москва, Россия

ВЕСТНИК ВОЙСК РХБ ЗАЩИТЫ

ТОМ 8, № 2 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Место журнала в рейтинге SCIENCE INDEX = 1378
Импакт-фактор журнала по Российскому индексу научного цитирования за 2022 г.:
- двухлетний = 1,085;
- двухлетний с учетом цитирования из всех источников = 1,234;
- пятилетний = 0,743;
- средний индекс Хирша авторов = 8,7;
- число просмотров статей за год = 3809.
По данным РИНЦа на июнь 2024 г. журнал цитировался 158 организациями и 96 научными журналами России

Все рукописи проверяются программой «Антиплагиат»

Тема номера: Научные проблемы соблюдения конвенций о запрещении химического и биологического оружия

Редакционная статья

- Военно-биологическая деятельность США и Украины
И.А. Кириллов 105

Химическая безопасность и защита от химического терроризма

- Идентификация продуктов деградации 2-хлоробензальмалондинитрила (CS) в объектах, доставленных из зоны проведения специальной военной операции
А.С. Ярлыченко, В.А. Игнатьев, М.А. Понсов, А.М. Григорьев 109

Биологическая безопасность и защита от биологических угроз

- Оспа Аляски на фоне новых ортопоксвирусных инфекций
М.В. Супотницкий 122
- Эпидемиология оспы лошадей. Новые аспекты
Л.Ф. Стовба, А.А. Петров, С.А. Мельников, О.В. Чухраля, Н.К. Черникова, С.В. Борисевич 135
- Ферменты в составе комбинированных антимикробных средств как улучшители их действия
Н.А. Степанов, А.Г. Асланлы, М.В. Домнин, Е.Н. Ефременко 146

Вооружения и средства войск РХБ защиты

- Современные аппаратные и программные решения для полногеномного секвенирования, перспективы их внедрения в практику войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации
А.А. Петров, А.В. Казанцев, Е.А. Ковальчук, М.Ю. Павлюков, А.В. Сапкулов, Д.А. Кутаев, С.В. Борисевич 164
- Оценка структуры свободного пространства в аэрозольном облаке
А.А. Брусенин, Д.Н. Буряк, В.Н. Пенязь, И.В. Артамонов 176

Исторический архив

- История открытия собственных плазмид у чумного микробы
И.В. Дармов, С.Н. Янов, И.В. Маракулин 185

Рецензия

- Яды, микробы, животные, адский огонь: История биологического и химического оружия Древнего мира
М.В. Супотницкий 199

Адрес редакции:

27 НЦ МО РФ, 111024, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19.
Тел.: 8 (495) 693-44-48, e-mail: 27nc_1@mil.ru.

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).
Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС 77-69472 от 25.04.2017 г.

Все права защищены. При перепечатке материалов и размещении их на интернет-ресурсах ссылка на журнал обязательна.

Подписано в печать: 27.06.2024 г. Дата выхода в свет 30.06.2024 г. Тираж 400 экз. Цена свободная.

Подписной индекс в каталоге «Пресса России» – 33015

Отпечатано в типографии:

ФГУП «ЦНИИХМ им. Д.И. Менделеева», 115487, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 16 А. Тел.: 8 (499) 661-80-46, e-mail: ntrved@cniihm.ru



JOURNAL OF NBC PROTECTION CORPS

[Vestnik voysk RChB zashchity]

ISSN 2587-5728

(Print)

ISSN 3034-2791

(Online)

Vol. 8 No 2

2024

Published since
2017

"Journal of NBC Protection Corps" is a peer-reviewed scientific and practical journal, publishing papers in the fields of chemical and biological threats to the Russian Federation. It covers scientific achievements in the main spheres and tasks of the NBC Protection Troops. The objective of the journal is to improve the professional level of specialists of the NBC Protection Troops, to revive the interest in their history and to attract young scientists to the work in scientific research organization of the NBC Protection Troops. "Journal of NBC Protection Corps" is the only journal in the Russian Federation that examines the scientific problems of compliance with the conventions on the prohibition of chemical and biological weapons, as well as the history of the use of chemical and biological weapons in wars and conflicts.

Founder and Publisher

Federal State Budgetary Establishment
"27 Scientific Centre Named After Academician N.D. Zelinsky" of the Ministry of Defence of the Russian Federation (27 SC MD RF).

Quarterly Edition

Editor-in-Chief

Stanislav Veniaminovich Petrov
Doctor of Technical Sciences. Leading Researcher of the 27 SC MD RF.
Moscow, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Mikhail Vasilievich Supotnitskiy
Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher. Chief Specialist of the 27 SC MD RF. Moscow, Russia

Dmitry Petrovich Kolesnikov
Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher of the 27 SC MD RF.
Moscow, Russia

Science Editor

Elena Vladimirovna Lebedinskaya
Candidate of Biological Sciences. Researcher at the Department of the 27 SC MD RF. Moscow, Russia

Editor, CRC preparation:

Natalya Vladimirovna Shachneva
Researcher at the Department of the 27 SC MD RF. Moscow, Russia

Articles in Russian and English are accepted for publication, prepared in accordance with the rules for authors posted on the journal's website
<https://www.nbsprot.ru/jour/about/submissions#authorGuidelines>

Papers in scientific specialties

- 6.2.1. Armament and military equipment (technical sciences).
- 6.2.10. The destructive effect of special types of weapons, means and methods of protection (chemical sciences, technical sciences, biological sciences).
- 6.3.3. Military history (historical sciences).

The peer-reviewed open access journal is indexed in the following databases:

Russian Science Citation Index (RSCI), Russian State Library, DOAJ, ROAD, Google Scholar (Google Scholar), Mendeley, Dimensions, Open Archives Initiative, ResearchBib, Lens.org, Ulrichsweb, Unpaywall, OpenCitations, Wikidata, etc.

The terms of the offer for authors are given in §12 of the Rules for Authors (<https://www.nbsprot.ru/jour/about/submissions#authorGuidelines>). A double-blind review model is used. There is no fee for publishing an article or reviewing a manuscript. The content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International license (CC BY 4.0).

The journal is distributed among the bodies of legislative and executive power of the Russian Federation, in the main military headquarters, scientific and research institutions and educational establishments of the Ministry of Defence of the Russian Federation, in engineering, experimental design offices and industrial and manufacturing structures, working in the sphere of NBC Defence.

The information and views set out in this publication are those of the author(s) and do not necessarily reflect the official opinion of the Editorial Board.

Editorial Board

Nikolay Valentinovich Ageyev
Doctor of Historical Sciences, Professor. Lecturer of the Subdepartment of History of Wars and Military Art of the Military Academy of the RF Armed Forces' General Staff. Moscow, Russia

Dmitry Lvovich Aminin
Doctor of Biological Sciences. Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences. Head of the Laboratory of Biotesting and the Mechanism of Action of Biologically Active Substances. Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences. Vladivostok, Russia

Yevgeny Vasilyevich Bey
Doctor of Historical Sciences, Deputy Head of the Department at the Military History Research Institute of the Military Academy of the RF Armed Forces' General Staff. Moscow, Russia

Andrej M. Grigoryev
Doctor of Chemical Sciences. Senior Researcher of the Department of the 27 SC MD RF. Moscow, Russia

Ilya Vladimirovich Darmov
Doctor of Medical Sciences. Professor. Chief Research Associate of the Research Department. Branch Office of the «48 Central Scientific Research Institute», MD RF. Kirov, Russia

Elena Nikolaevna Efremenko
Doctor of Biological Sciences, Professor. Head of the Laboratory, Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia

Natalia Vasilevna Zavalova
Doctor of Biological Sciences. Professor. Chief Researcher of the Department of the 27 SC MD RF. Moscow, Russia

Vladimir Borisovich Kondratiev
Doctor of Technical Sciences. Professor. General Director of the State Research Institute of Organic Chemistry and Technology. Moscow, Russia

Lakota Ján
MUDr., (MD), CSc. (PhD). Senior Lecturer, Fellow at the Center of experimental medicine SAS. Bratislava, Slovakia

Andrey Anatolyevich Leshchenko
Doctor of Technical Sciences, Professor. Leading Researcher of the Scientific and Research Department. Branch Office of the «48 Central Scientific Research Institute», MD RF. Kirov, Russia

Monakov Mikhail Sergeyevich

Doctor of Historical Sciences, Senior Researcher of the Department at the Military History Research Institute of the Military Academy of the RF Armed Forces' General Staff. Moscow, Russia

Yuri Dmitrievich Nechipurenko
Doctor of Physical and Mathematical Sciences. Chief Researcher, Laboratory of DNA-Protein Interactions, Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Igor Aleksandrovich Rodin
Doctor of Chemical Sciences. Deputy Dean of the Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia

Igor Vladimirovich Rybalchenko
Doctor of Chemical Sciences. Professor. Leading Researcher of the Department of the 27 SC MD RF. Moscow, Russia

Viktor Ivanovich Kholstov
Doctor of Chemical Sciences. Professor. Head of the Russian Center for Analytical Research on Conventions on the Prohibition of Chemical and Biological Weapons under the Ministry of Industry and Trade of Russia. Moscow, Russia

Yevgeniy Anatolyevich Chugunov

Candidate of Historical Sciences. Associate Professor. Marshal of the Soviet Union S.K. Tymoshenko Military Academy of NBC Protection, MD RF, Kostroma, Russia

Editorial Council

Igor Anatolyevich Kirillov (Chairman)
Candidate of Military Sciences. Head of the Radiation, Chemical and Biological Protection Troops of the Armed Forces of the Russian Federation. Moscow, Russia

Viktor Aleksandrovich Kovtun (Deputy chairman)
Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor. Head of the 27 SC MD RF. Moscow, Russia

Valery Aleksandrovich Inozemtsev
Doctor of Military Sciences. Head of the «33 Central Scientific Research Test Institute», MD RF. Volsk, Russia

Alexander Sergeevich Tumanov
Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher. Head of the Branch Office of the «48 Central Scientific Research Institute», MD RF. Kirov, Russia

Maxim Petrovich Shabelnikov
Candidate of Technical Sciences. Deputy Head of the 27 SC MD RF. Moscow, Russia

JOURNAL OF NBC PROTECTION CORPS

VOLUME 8, No 2
2024

CONTENTS

Place of the journal in the SCIENCE INDEX ranking = 1378
The impact factor of the journal according to the Russian Science Citation Index for 2022:
- two-year = 1.085;
- 2 years including citations from all sources = 1.234;
- five year old = 0.743;
- mean Hirsch index of the authors = 8.7;
- number of article views per year = 3809.
According to the Russian Science Citation Index, at June 2024, the journal was cited by 158 organizations and 96 scientific journals of Russia

All manuscripts are checked by the Anti-Plagiarism program

Theme of the Issue: Scientific Problems of Compliance with the Conventions on the Prohibition of Chemical and Biological Weapons

Editorial

- Military Biological Activities of the USA and Ukraine
I.A. Kirillov 105

Chemical Security and Protection Against Chemical Terrorism

- Identification of CS Degradation Products in Objects Delivered
from the Zone of a Special Military Operation
A.S. Iarlychenko, V.A. Ignatev, M.A. Ponsov, A.M. Grigoryev 109

Biological Security and Protection Against Biological Threats

- Alaskapox amid New Orthopox Viral Infections
M.V. Supotnitskiy 122
- Epidemiology of Horsepox. The New Aspects
L.F. Stovba, A.A. Petrov, S.A. Melnikov, O.V. Chukhralia, N.K. Chernikova, S.V. Borisevich 135
- Enzymes in the Content of Combined Antimicrobials as Improvers of Their Action
N.A. Stepanov, A.G. Aslanli, M.V. Domnin, E.N. Efremenko 146

Weapons and Means of NBC Protection Troop

- Modern Hardware and Software Solutions for Whole-Genome Sequencing, Prospects
of Their Implementation in the Practice of Nuclear, Chemical and Biological Protection Troops
of the Armed Forces of the Russian Federation
A.A. Petrov, A.V. Kazantsev, E.A. Kovalchuk, M.Yu. Pavlyukov, A.V. Sapkulov,
D.A. Kutaev, S.V. Borisevich 164
- Estimation of the Structure of Free Space in an Aerosol Cloud
A.A. Brusenin, D.N. Burjak, V.N. Penjaz', I.V. Artamonov 176

Historical Archive

- History of Plague Pathogen Plasmids Discovery
I.V. Darmov, S.N. Yanov, I.V. Marakulin 185

Review

- Greek Fire, Poison Arrows, and Scorpion Bombs Biological and Chemical Warfare
in the Ancient World
M.V. Supotnitskiy 199

Address of the Editorial Office:

Federal State Budgetary Establishment
«27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Entuziastov Passage, 19, Moscow, 111024, Russian Federation.
Tel.: 8 (495) 693-44-48, e-mail: 27nc_1@mil.ru.

Publication is registered by the Federal
Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications.
Certification of the Mass Media
ПИ № ФС 77-69472, April 25, 2017.

All rights reserved. Links to the journal are obligatory while citing.

Passed for printing: 27 June 2024.

Date of publication 30 June 2024.

Print run: 400 copies. Free price

Subscription codes Pressa Rossii catalogue: 33015

Published in: Federal State Unitary Establishment «TsNIKhM» named after D.I. Mendeleev, Nagatinskaya Str. 16A, Moscow 115487, Russian Federation
Tel.: 8 (499) 661-80-46, e-mail: ntrved@cnikhm.ru



Военно-биологическая деятельность США и Украины Military Biological Activities of the USA and Ukraine



Министерство обороны Российской Федерации продолжает анализ военно-биологической деятельности США, одним из направлений которой является глобальный контроль за биологической обстановкой и управление ею в своих интересах. Для достижения поставленной цели Соединенные Штаты формируют дополнительные административные и технические органы, а в американских документах стратегического планирования управление биологическими рисками определено как жизненно важный приоритет США (рисунок 1).

Полученные в ходе специальной военной операции документы показывают, что инициированная по указанию США реформа украинской системы здравоохранения, сдавшая условия для реализации военно-биологических программ, проводилась с многочисленными нарушениями законодательства и вопреки мнению профильных ведомств. Показательно, что реформирование здравоохранения на Украине проводились в период нахождения в должности профильного министра гражданки США Ульяны Супрун, а в состав комиссии по реорганизации входила

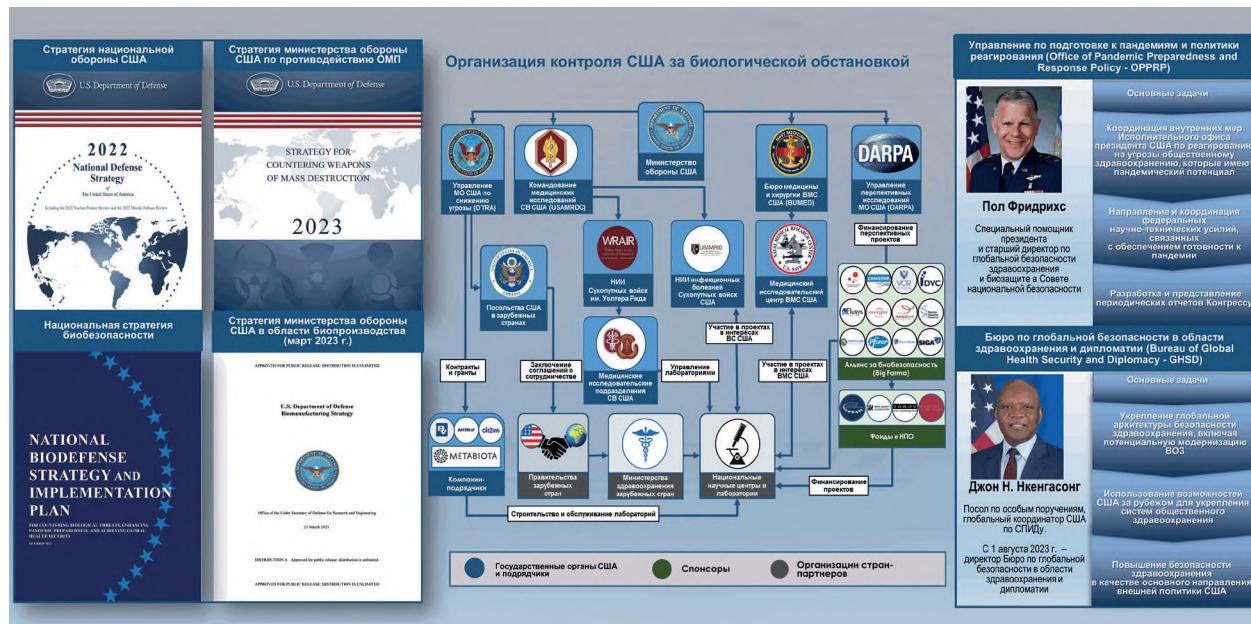


Рисунок 1 – Управление биологическими рисками в США (схема подготовлена УНВ РХБ защиты МО РФ)

Кириллов И.А.
Kirillov I.A.

Ирина Демчишина, которая неоднократно фигурировала в документах подрядных организаций Пентагона – «Блэк энд Вич» и «Метабиота».

В ходе проведения специальной военной операции были получены документы Главного следственного управления СБУ, подтверждающие заинтересованность киевского режима в продолжении работ с оружием массового поражения.

В октябре 2023 г. Национальная академия наук Украины в своем ответе на запрос СБУ о возможностях проведения подведомственными организациями исследований образцов химического, радиологического, биологического и ядерного оружия и следов их применения подтвердила проведение исследований двойного назначения в рамках подписанных в 2005 г. соглашения между министерством обороны США и министерством здравоохранения Украины о сотрудничестве по предотвращению распространения технологий, патогенов и сведений, которые могут быть использованы для разработки биологического оружия. В нем сообщается о возможностях лаборатории Одесского противочумного института и планах по ее модернизации до уровня BSL-3 на средства Пентагона. В лаборатории «...до настоящего момента осуществляется хранение коллекций таких особо опасных патогенов, как возбудители чумы и холеры...».

По имеющейся оперативной информации, продолжается ввоз на территорию Украины

для дальнейшей утилизации радиохимических веществ, которые превращают страну в свалку отработанного ядерного топлива и отходов опасных химических производств.

Необходимо озвучить имена некоторых других фигурантов незаконной деятельности с компонентами оружия массового поражения на украинской территории (рисунок 2).

В связи с тем, что России удалось остановить реализацию военно-биологических программ на освобожденных территориях Украины, Пентагон вынужден переносить незавершенные в рамках украинских проектов исследования в другие регионы. В настоящее время в зону повышенного интереса попала Африка, например, Демократическая Республика Конго, Сьерра-Леоне, Камерун, Уганда и ЮАР. Заказчиками со стороны американского правительства являются управление по снижению угрозы минобороны США (ДИТРА) и Госдепартамент. Для скрытия целей проводимых исследований Вашингтон задействует сторонних исполнителей. Это подрядные и посреднические организации, в том числе «Метабиота», «Квик-Сильвер», «Эко-Хелс-Альянс» (всего – более 20 компаний), а также предприятия так называемой «Биг-Фармы». Имеющиеся в распоряжении Минобороны России документы подтверждают, что военно-биологическое присутствие США на африканском континенте наращивается быстрыми темпами (рисунок 3).

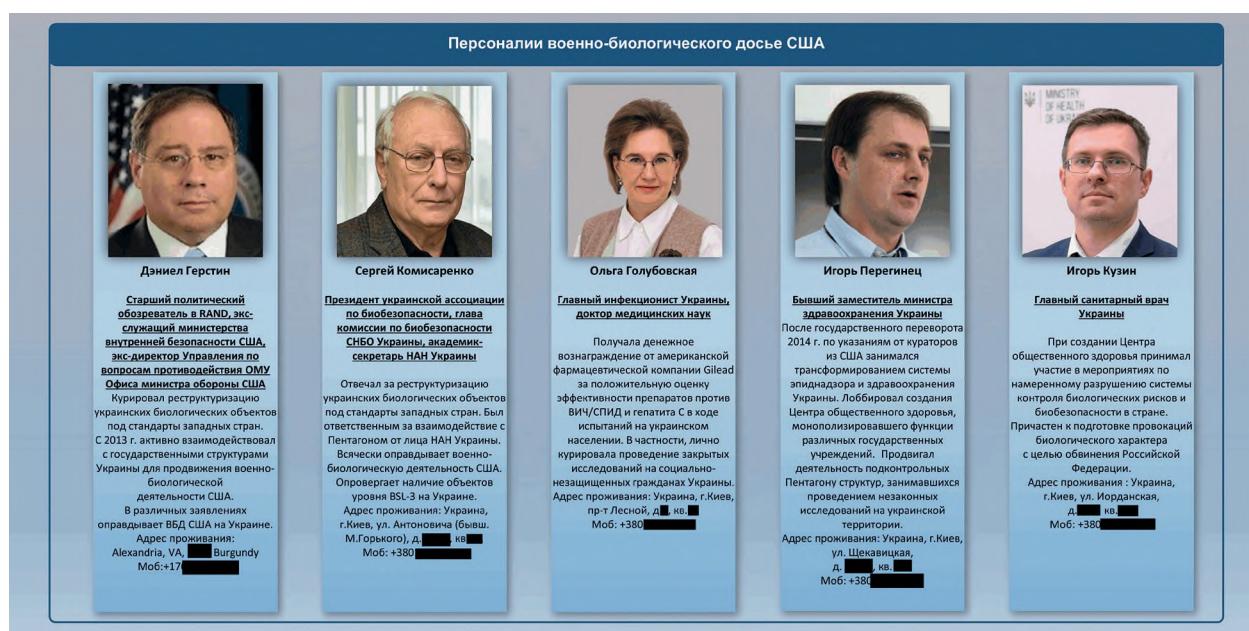


Рисунок 2 – Фигуранты незаконной деятельности с компонентами оружия массового поражения на украинской территории (схема подготовлена УНВ РХБ защиты МО РФ)

Военно-биологическая деятельность США и Украины Military Biological Activities of the USA and Ukraine

Проект по эпиднадзору за инфекционными заболеваниями (IDDS)

Участники военно-биологических проектов Минобороны США на территории африканского континента

Предложение «Метабиоты» по поиску подрядчиков, адресованное научно-исследовательскому институту инфекционных болезней сухопутных войск США

Деятельность подрядной организации Пентагона Quicksilver Group International в Африке

«На африканском континенте взрывной рост сети американских биолабораторий»

Встреча американских чиновников из минобороны, Госдепа и министерства здравоохранения с руководителями Африканского центра контроля заболеваний

Исследование хантавирусов с отбором проб от летучих мышей в Кении

Начало строительства биолаборатории в рамках Программы по совместному снижению угрозы при финансовой поддержке DTRA

**Рисунок 3 – Военно-биологическое присутствие США на африканском континенте
(схема подготовлена УНВ РХБ защиты МО РФ)**

В целом, как показывает практика, сотрудничество с США в военно-биологической сфере обрачивается утратой национального суверенитета в сфере биобезопасности и ухудшением ситуации с заболеваемостью. Примером являются такие инфекции, как желтая лихорадка, оспа обезьян и лихорадка долины Рифт, вспышка которой зафиксирована в Каире, где была размещена военно-биологическая лаборатория ВМС США.

Вместе с тем проведение исследований двойного назначения и пренебрежение нормами

биобезопасности привели к ухудшению эпидситуации и в самих США. В первую очередь речь идет о трансмиссивных болезнях – туляремии, сибирской язве, бешенстве. Несмотря на выявленные межвидовые переходы от животного к человеку, информация о них умалчивалась, а карантинные мероприятия в отношении выявленных очагов не проводились. О том, что Вашингтону есть, что скрывать, говорит блокирование США контрольного механизма в рамках Конвенции о запрещении биологического и токсинного оружия (рисунок 4).

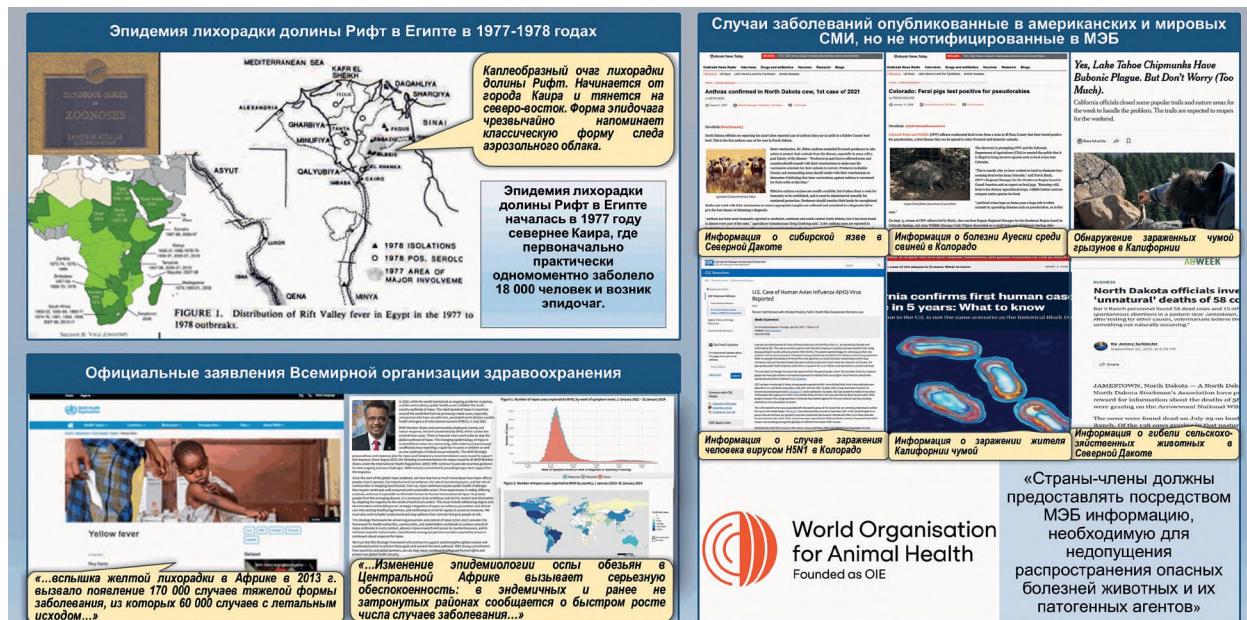


Рисунок 4 – Блокирование США контрольного механизма в рамках Конвенции о запрещении биологического и токсического оружия (схема подготовлена УНВ РХБ защиты МО РФ)

При этом американская некоммерческая организация «Рэнд», которая известна своими исследованиями по применению искусственного интеллекта для планирования крупномасштабных биологических атак, опубликовала в 2024 году отчет «Установление причастных к применению биологического оружия», который ставит под сомнение эффективность и авторитет Механизма Генсекретаря ООН по расследованию инцидентов, связанных с нарушением КБТО, в его нынешнем виде и описывает главенствующую

роль, которую могло бы занять минобороны США в расследовании подобных инцидентов.

Главенствующая роль США в деятельности Механизма Генерального секретаря позволит странам Запада назначать виновных по своему усмотрению, как это происходило в Организации по запрещению химического оружия.

Министерство обороны России продолжит работу в этом направлении и будет информировать о результатах широкую мировую общественность¹.

Начальник войск радиационной, химической и биологической защиты
Вооруженных Сил Российской Федерации,
генерал-лейтенант И.А. Кириллов

¹ См. брифинг начальника войск радиационной, химической и биологической защиты ВС РФ генерал-лейтенанта Игоря Кириллова по вопросам военно-биологической деятельности США и Украины от 25.06.2024 г. Россия. Официальные сайт и телеграм-канал Минобороны России. URL: https://function.mil.ru/news_page/country/12517930.html, https://t.me/mod_russia/40292.html



Идентификация продуктов деградации 2-хлоробензальмалонодинитрила (CS) в объектах, доставленных из зоны проведения специальной военной операции

А.С. Ярлыченко, В.А. Игнатьев, М.А. Понсов, А.М. Григорьев

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации,
111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19

e-mail: 27nc_1@mil.ru

Формирование аэрозоля 2-хлоробензальмалонодинитрила (CS) во время горения пиротехнической смеси в газовых гранатах сопровождается образованием многочисленных продуктов термолитической деградации. Многие из этих продуктов (включая и сам CS) являются весьма реакционноспособными веществами, вследствие чего состав аэрозоля значительно отличается от набора продуктов, которые можно обнаружить впоследствии в объектах окружающей среды.

Цель работы – обнаружение и идентификация производных CS в образцах грунта и в материале газовых гранат, доставленных из зоны проведения специальной военной операции, для оценки их относительного содержания и выбора перспективных маркеров факта применения CS.

Методы исследования. Обнаружение и структурную идентификацию продуктов деградации CS выполняли методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии низкого и высокого разрешения.

Результаты исследования. Обнаружены более 30 соединений, являющихся продуктами окисления, восстановления, термолитической деструкции и димеризации CS и его производных. Методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии, ранее не использовавшегося для подобных работ, предположительно идентифицировали пять соединений, сведения о которых в отношении газовых гранат отсутствуют в доступных нам источниках.

Вывод. В случае анализа объектов методом газовой хромато-масс-спектрометрии наиболее удобным маркером применения CS является 2-хлорбензилмалонилдинитрил, в то время как содержание самого CS может быть незначительным. Для варианта анализа методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии предпочтителен поиск продуктов циклизации CS хинолиновой природы (положительный режим ионизации), а для отрицательного режима – продуктов димеризации и восстановления CS.

Ключевые слова: CS; газовая хромато-масс-спектрометрия; деградация; жидкостная хромато-масс-спектрометрия; маркеры воздействия; специальная военная операция; термолиз; точные массы

Для цитирования: Ярлыченко А.С., Игнатьев В.А., Понсов М.А., Григорьев А.М. Идентификация продуктов деградации CS в объектах, доставленных из зоны проведения специальной военной операции. Вестник войск РХБ защиты. 2024;8(2):109–121. EDN:uivvwu.

<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-109-121>

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: А.М. Григорьев является членом редколлегии журнала (с 2024 г.). Это не повлияло на процесс рецензирования и окончательное решение.

Финансирование: федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации (27 НЦ МО РФ).

Поступила 13.06.2024 г. После доработки 23.06.2024 г. Принята к публикации 27.06.2024 г.

Ярлыченко А.С., Игнатьев В.А., Понсов М.А., Григорьев А.М.
Iarlychenko A.S., Ignatev V.A., Ponsov M.A., Grigoryev A.M.

Identification of CS Degradation Products in Objects Delivered from the Zone of a Special Military Operation

Aleksey S. Iarlychenko, Vladimir A. Ignatev, Michail A. Ponsov, Andrej M. Grigoryev✉

27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky
of the Ministry of Defence of the Russian Federation
Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation
✉ e-mail: 27nc@mil.ru

The formation of a CS aerosol during the combustion of a pyrotechnic mixture in gas grenades is accompanied by the formation of numerous thermolytic degradation products. Many of these products (including CS itself) are highly reactive substances, as a result of which the composition of the aerosol differs significantly from the set of products that can be subsequently detected in environmental objects.

The aim of the work is to detect and identify CS derivatives in soil samples and in the material of gas grenades delivered from the zone of a special military operation to assess their relative content and select promising markers of the fact of CS use.

Research methods. Detection and structural identification of CS degradation products were performed using gas and liquid chromatography-mass spectrometry (low- and high-resolution).

The results of the study. More than 30 compounds have been found that are products of oxidation, reduction, thermochemical degradation and dimerization of CS and its derivatives. The method of liquid chromatography-mass spectrometry, which was not previously used for such work, presumably identified five compounds, information about which in relation to gas grenades is not available in the sources available to us.

Conclusion. In the case of object analysis by gas chromatography-mass spectrometry, the most convenient marker of CS exposure is 2-chlorobenzylmalonyl nitrile, while the content of CS itself may be insignificant. For the variant of analysis by liquid chromatography-mass spectrometry, it is preferable to search for products of cyclization of CS of quinoline origin (positive ionization mode), and for the negative mode - products of dimerization and reduction of CS.

Keywords: CS, accurate masses; degradation, exposure markers, gas chromatography-mass spectrometry; liquid chromatography-mass spectrometry; special military operation; thermolysis

For citation: Iarlychenko A.S., Ignatev V.A., Ponsov M.A., Grigoryev A.M. Identification of CS Degradation Products in Objects Delivered from the Zone of a Special Military Operation. Journal of NBC Protection Corps. 2024;8(2):109–121. EDN:uiyvwu.

<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-109-121>

Financial disclosure: The authors have no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: Andrej M. Grigoryev is a member of the Editorial Board of the journal since 2024. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Funding: 27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of the Russian Federation (27 SC MD RF).

Received June 13, 2024. Revised June 23, 2024. Accepted June 27, 2024

В ходе проведения специальной военной операции зафиксировано более 400 случаев применения украинскими вооруженными формированиями токсичных химикатов против Вооруженных Сил Российской Федерации, что является прямым нарушением Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и

применения химического оружия и его уничтожении (КЗХО), ратифицированной Украиной 15 ноября 1998 г. Данные факты неоднократно приводились начальником войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации в ходе проводимых брифингов¹.

¹ <https://rutube.ru/video/520499cbb98ad773fa52ea71ba3bf9cf/?ysclid=lyeswqw9ji64213099> (дата обращения: 05.06.2024).

В качестве используемых украинской стороной токсичных химикатов нередко выступают и вещества раздражающего действия. Одно из таких веществ – CS (2-хлоробензальмалонодинитрил), *рисунок 1*, фактически применяемое как в полицейских, так и военных операциях. CS не входит в Списки Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожении (КЗХО), однако это вещество соответствует критериям, применяемым к агентам для борьбы с массовыми беспорядками и поэтому – по требованиям ОЗХО – не должно использоваться в военных целях² [1].

Симптомы поражения CS входят раздражение глаз и слизистых оболочек дыхательных путей, вызывающих неконтролируемое закрывание глаз, затруднение дыхания, кашель, жжение и головокружение³ [2]. Масса молекулы CS сравнительно невысока (около 188 Да), но температуры плавления и кипения значительны (93–95 и 310–315 °C соответственно), и поэтому он обычно применяется в виде аэрозоля, генерируемого посредством пиротехнических смесей. Возможный состав таких смесей включает сахар и хлорат калия⁴ [3]. Газовые гранаты, содержащие CS, выпускаются рядом производителей, и, в частности, Global Ordnance (США, Флорида)⁵.

Указанные физико-химические свойства CS, включая очевидную термическую стабильность и среднюю полярность (расчетная CLogP = 2,1) делают его удобным объектом для обнаружения методом газовой хроматографии (ГХ). Первая известная нам публикация, посвященная определению CS методом ГХ с электронно-захватным детектором сделана в 1971 г. сотрудниками Эджвудского арсенала, причем вместе с CS определяли возможные продукты его термолиза – 2-хлорбензальдегид (5) и 2-хлорбензилмалонодинитрил (15) [4]. Решение возможных количественных вопросов при определении CS методом ГХ, сопряженной с масс-спектрометром (ГХ-МС), в том числе с использованием адсорбционных трубок, рассмотрено в гораздо более поздних работах [5, 6].

Молекула CS содержит двойную связь и две нитрильные группы, что ограничивает ее химическую стабильность. Эта особенность становится особенно заметной при высоких температурах и в присутствии других реакционноспособных соединений, в том числе материала гранат и кислорода воздуха, а также возможных биогенных воздействий [7]. Как отмечено выше, химическая и термическая деградация CS может протекать как в окислительном, так и в восстановительном направлениях. Существует ряд работ, посвя-

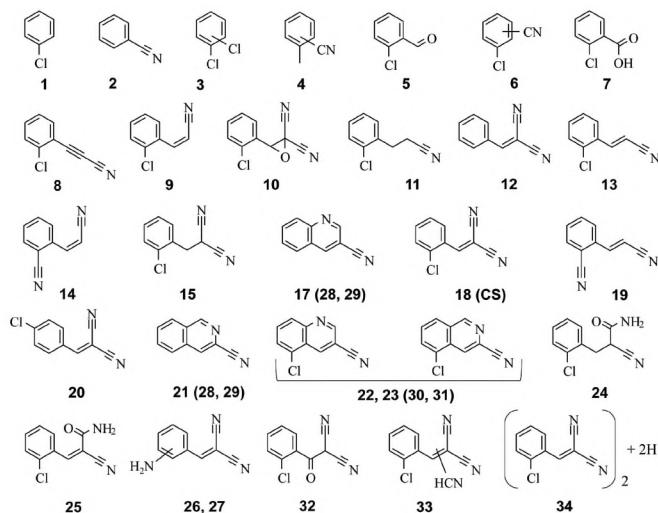


Рисунок 1 – Структурные формулы веществ, обнаруженных в данной работе. Пояснения в тексте

² Response to the Director-General's request to the Scientific Advisory Board to provide consideration on which riot control agents are subject to declaration under the Chemical Weapons Convention, OPCW Scientific Advisory Board, Twenty-Fifth Session, 27–31 March 2017, SAB-25/WP.1 of 27 March 2017. URL: https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/SAB/en/sab25wp01_e_.pdf (дата обращения: 05.06.2024).

³ Recommended Operating Procedures for Analysis in the Verification of Chemical Disarmament; The Ministry of Foreign Affairs of Finland, University of Helsinki: Helsinki, Finland, 2023.

⁴ Там же.

⁵ <https://www.global-ordnance.com> (дата обращения: 05.06.2024).

Ярлыченко А.С., Игнатьев В.А., Понсов М.А., Григорьев А.М.
Iarlychenko A.S., Ignatev V.A., Ponsov M.A., Grigoryev A.M.

щенных исследованию деградации CS при разных температурах и в возможном присутствии воздуха [8–10]. Методом ГХ-МС авторами этих работ было идентифицировано значительное число соединений – продуктов деградации CS. Следует отметить, что авторы указанных публикаций сосредоточились, в первую очередь, на продуктах, выделяемых гранатой в газовую фазу. Это совершенно необходимо для понимания происходящих процессов, а также для оценки возможного вреда, наносимого человеку, находящемуся в зоне действия аэрозоля. Однако такой подход мало полезен в случаях, когда необходимо установить факт применения CS в полевых условиях, учитывая значительное время, прошедшее после взрыва гранаты. Состав продуктов деградации CS, обнаруживаемых на объектах окружающей среды, может значительно отличаться от изначальной газовой (аэрозольной) смеси. Кроме того, нам не известны публикации, учитывающие возможность обнаружения продуктов деградации CS методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Цель работы – обнаружение и идентификация производных CS в образцах грунта и в материале газовых гранат, доставленных из зоны проведения специальной военной операции, для оценки их относительного содержания и выбора перспективных маркеров факта применения CS.

Для достижения данной цели применяли хромато-масс-спектрометрические методы. Учитывая известный недостаток метода ГХ-МС – ограниченность возможности элюирования тяжелых и термически нестабильных соединений – мы пользовались также методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС). Для повышения надежности идентификации в обоих методах применяли масс-спектрометры высокого разрешения (ВР).

Материалы и методы

Реактивы и материалы. Ацетонитрил (Scharlab, S.L., Испания), муравьиная кислота и формиат аммония (Sigma-Aldrich, Германия) были квалификации «для ВЭЖХ». Деионизированную воду (18,2 МОм) получали с помощью системы очистки Milli-Q Advantage A10 (Merck, Германия). Все другие реагенты и растворители (квалификация не ниже х.ч.) были приобретены в Химмед (Россия).

Объекты анализа и подготовка проб. Для проведения химического анализа из зоны проведения специальной военной операции были доставлены следующие объекты.

1. Три отработанные газовые гранаты, содержащие черный порошок. Первая и третья гранаты имели маркировку «ALSG 272. CS smoke grenade», вторая была не маркирована.

2. Двенадцать образцов грунта, отобранных вблизи места применения гранат.

Пробы готовили по одной схеме. Содержимое гранат (0,5 г) экстрагировали метиленхлоридом или ацетонитрилом (1 мл) при перемешивании на шейкере (500 об/мин, 10 мин). Полученные смеси центрифугировали (15000 об/мин, 5 мин). Надосадочную жидкость (для метиленхлорида) вводили в газовый хроматограф или (для ацетонитрила) разводили водой (1:1) и вводили в жидкостной хроматограф.

К образцам грунта (1 г) добавляли метиленхлорид (1 мл) и перемешивали на шейкере (500 об/мин, 10 мин). Полученные смеси центрифугировали (3000 об/мин, 10 мин), надосадочную жидкость упаривали в токе азота примерно до 100 мкл и вводили в газовый хроматограф.

Газовая хромато-масс-спектрометрия. Газовые масс-хроматограммы получали с помощью двух систем.

Первая состояла из газового хроматографа 8890, соединенного с моноквадрупольным масс-спектрометром 5977 (Agilent Technologies). Компоненты проб разделяли на колонке HP-1ms (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм, Agilent) согласно температурной программе: 40 °C (1 мин), 10°/мин (280 °C, 5 мин). Газоснайтер гелий (постоянная скорость потока, 1,44 мл/мин), объем вводимой пробы 1 мкл, режим ввода без деления потока. Температуры инжектора и интерфейса 270 и 290 °C соответственно. Масс-спектрометр работал в режиме электронной ионизации (ЭИ, 70 эВ) диапазон сканирования 39–600. Температуры ионного источника и масс-фильтра были 230 и 150 °C соответственно. Систему применяли для первичной идентификации и примерной оценки относительного содержания анализов согласно площадям пиков по выбранным ионам (метод внутренней нормировки).

Вторая включала газовый хроматограф Trace 1610, оснащенный колонкой TR-5ms (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) и соединенной с масс-спектрометром типа квадруполь-орбитальная ловушка Orbitrap Exploris GC 240 (Thermo Fisher Scientific, ФРГ). Температурная программа элюирования компонентов была той же, что и для первой системы. Газоснайтер гелий (постоянная скорость потока, 1 мл/мин), объем вводимой пробы 1 мкл, режим ввода с делением потока (1:10). Масс-спектры регистрировали в режиме ЭИ (70 эВ),

разрешение 60000, диапазон сканирования 50–600. Индексы удерживания измеряли относительно смеси *n*-алканов C10–C40. Систему применяли для подтверждения идентификации.

Жидкостная хромато-масс-спектрометрия. Применяемая система состояла из жидкостного хроматографа сверхвысокого давления Ultimate 3000, соединенного с трибридным масс-спектрометром высокого разрешения Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, США). Для разделения компонентов проб применяли колонку Acclaim RSLC 120 C18 (100 мм × 2,1 мм, 2,2 мкм, Thermo), терmostатированную при 40 °C. Компонентами подвижной фазы были фаза А (0,1 об. % муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил), подаваемые со скоростью потока 0,5 мл/мин согласно программе: 2 % фазы В (0–1 мин), 2–98 % В (1–8 мин), 98 % В (8–9 мин), 98–2 % В (9–9,1 мин), 2 % фазы В (9,1–11 мин). Для создания слабоосновного (рН ~ 7,5) элюента заменяли фазу А на раствор формиата аммония с добавками водного раствора аммиака.

Объем вводимой пробы 5 мкл.

Масс-спектрометр настраивали для работы в режиме электрораспылительной ионизации (ЭРИ) с ионным источником HESI-II при следующих условиях: вид газа для ионного источника и высокоэнергетичной диссоциации, активируемой соударением (HCD) – азот; вид газа для диссоциации, активируемой соударением в линейной ионной ловушке (CID) – гелий; поток дополнительного (Aux) и продувочного (Sweep) газа – 10 и 1 усл. ед. соответственно; давление в распылителе (Sheath) – 50 psi; температуры распыления и трубки переноса ионов – 350 и 325 °C соответственно; напряжение при распылении в положительном и отрицательном режимах – 3500 и 2500 В соответственно. Систему применяли для подтверждения идентификации и для поиска термически нестабильных компонентов.

Результаты и обсуждение

ГХ-МС. Первичным способом идентификации компонентов проб было автоматизированное сравнение их масс-спектров со спектрами, приведенными в библиотеке NIST2020. Всего обнаружили 25 соединений, структурные формулы которых приведены на рисунке 1. Идентификацию подтверждали при регистрации точных масс молекулярных ионов и наиболее интенсивных ионов масс-спектра. Примерное содержание компонентов относительно CS оценивали методом

внутренней нормировки площадей пиков ГХ-МС по выбранным ионам. При выборе ионов предпочтение отдавали молекулярным ионам, или – при их малой относительной интенсивности или при наличии матричных влияний – другим тяжелым интенсивным ионам масс-спектра. В таблице 1 приведены теоретические массы этих ионов, их состав и отклонение измеренных величин *m/z* от теоретических (массовый сдвиг). Результаты нормировок для содержащего трех гранат и восьми проб грунта приведены в таблице 2. В четырех оставшихся пробах грунта CS и компоненты, отнесенные к его применению, не нашли.

Следует учесть, что при горении пиротехнической смеси в гранате, возможная конверсия CS может определяться рядом термолитических процессов, и в том числе окислением, гидролизом, восстановлением и пиролитический деструкцией. Во влажном грунте молекула CS подвержена преимущественно гидролизу и окислению, причем эти процессы могут иметь биогенный характер. Учитывая возможные ложноположительные результаты идентификации, мы сосредоточились на производных хлорбензола и нитрильных производных, встречаемость которых в природе сравнительно малозначительна.

Набор соединений, обнаруженных в пробах, включает ряд изомеров. К ним можно отнести соединения 12, 14, 17, 19, 21 ($C_{10}H_6N_2$) и 16, 18, 20, 22, 23 ($C_{10}H_5ClN_2$). Однако даже значительное различие структур этих соединений сопровождается сходством масс-спектров, что приводит к затруднениям при идентификации в отсутствие образцов сравнения. Поэтому для отнесения наблюдавшихся компонентов были использованы данные работ [8, 9], индексы удерживания, приведенные в библиотеке NIST2020, и единственный образец сравнения (18, CS).

Наблюдаемое содержание легких летучих компонентов (1–4) очень мало. Исключение составляет только бензонитрил (2) в гранате № 2, площадь пика которого лишь в 4 раза меньше, чем CS (18). В этой же гранате отмечено наибольшее количество его хлорированного производного (6).

Согласно ряду работ [4, 7, 9, 10], 2-хлорбензальдегид (5) должен быть одним из основных компонентов окислительной деградации CS. Тем не менее, значительное содержание этого компонента отмечали только в гранатах, причем площадь его пика может превышать CS. Медианное значение относительной площади 2-хлорбензальдегида в пробах грунта

Ярлыченко А.С., Игнатьев В.А., Понсов М.А., Григорьев А.М.
Iarlychenko A.S., Ignatev V.A., Ponsov M.A., Grigoryev A.M.

**Таблица 1 – Характеристики соединений, обнаруженных методом ГХ-МС
в содержимом гранат и в грунте**

№	Соединение	Брутто-формула молекулы	Индекс	Ион для колич. оценки, m/z	Брутто-формула иона	Сдвиг, m/z
1	Хлорбензол	C ₆ H ₅ Cl	844	112,0074	[M] ⁺⁺	-0,26
2	Бензонитрил	C ₇ H ₅ N	984	103,0417	[M] ⁺⁺	0,50
3	Дихлорбензол	C ₆ H ₄ Cl ₂	1037	145,9685	[M] ⁺⁺	0,44
4	Метилбензонитрил	C ₈ H ₇ N	1070	117,0573	[M] ⁺⁺	0,36
5	2-Хлорбензальдегид	C ₇ H ₅ ClO	1123	138,9945	[M-H] ⁺⁺	1,67
6	Хлорбензонитрил	C ₇ H ₄ CIN	1172	137,0027	[M] ⁺⁺	0,72
7	2-Хлорбензойная кислота	C ₇ H ₅ ClO ₂	1360	155,9973	[M] ⁺⁺	0,46
8	3-(2-Хлорфенил)пропиненитрил	C ₉ H ₄ CIN	1364	161,0027	[M] ⁺⁺	0,52
9	2-Хлороциннамоилнитрил (Z-)	C ₉ H ₆ CIN	1382	163,0183	[M] ⁺⁺	0,55
10	2,2-Дициано-3-(2-хлорфенил)оксиран	C ₁₀ H ₅ CIN ₂ O	1388	141,0447	[M-CO-Cl] ⁺⁺	0,64
11	3-(2-Хлорфенил)пропанонитрил	C ₉ H ₈ CIN	1396	125,0153	[M-CH ₂ CN] ⁺⁺	-0,03
12	Бензилиденмалонилдинитрил	C ₁₀ H ₆ N ₂	1454	154,0526	[M] ⁺⁺	0,90
13	2-Хлороциннамоилнитрил (E-)	C ₉ H ₆ CIN	1467	163,0183	[M] ⁺⁺	0,17
14	2-Цианоциннамоилдинитрил (Z-)	C ₁₀ H ₆ N ₂	1476	154,0526	[M] ⁺⁺	-0,29
15	2-Хлорбензилмалонилдинитрил	C ₁₀ H ₇ CIN ₂	1504	125,0153	[M-CH(CN)CN] ⁺⁺	-0,09
16	CS изомер 1	C ₁₀ H ₅ CIN ₂	1505	188,0136	[M] ⁺⁺	0,66
17	3-Хинолин карбонитрил	C ₁₀ H ₆ N ₂	1519	154,0526	[M] ⁺⁺	0,01
18	CS (2-хлоробензальмалонодинитрил)	C ₁₀ H ₅ CIN ₂	1547	188,0136	[M] ⁺⁺	-0,49
19	2-Цианоциннамоилдинитрил (E-)	C ₁₀ H ₆ N ₂	1591	154,0526	[M] ⁺⁺	0,11
20	4-Хлоробензальмалонодинитрил	C ₁₀ H ₅ CIN ₂	1640	188,0136	[M] ⁺⁺	0,58
21	3-Изохинолин карбонитрил	C ₁₀ H ₆ N ₂	1641	154,0526	[M] ⁺⁺	-0,09
22	CS (циклизация 1)	C ₁₀ H ₅ CIN ₂	1659	188,0136	[M] ⁺⁺	0,10
23	CS (циклизация 2)	C ₁₀ H ₅ CIN ₂	1800	188,0136	[M] ⁺⁺	0,50
24	2-Хлорофенил-цианопропанамид	C ₁₀ H ₉ CIN ₂ O	1832	173,0709	[M-Cl] ⁺	-0,18
25	2-Хлорофенил-цианопропенамид	C ₁₀ H ₇ CIN ₂ O	1874	171,0553	[M-Cl] ⁺⁺	0,50

Примечание.

Таблица составлена авторами по собственным данным.

невелико (около 6 %), что может быть объяснено высокой химической активностью. Подтверждением этого предположения является 2-хлорбензойная кислота (7), присутствующая в грунтах и не найденная в гранатах.

Масс-спектр 3-(2-хлорфенил)пропиненитрила (8) отсутствует в библиотеке NIST2020, однако это вещество отмечено в работах [8, 9]. Идентификацию вещества 8 выполняли на основании полученного масс-спектра высокого разрешения и опубликованного времени удерживания. Масс-спектр приведен на рисунке 2.

Два 2-хлороциннамоилнитрила (цис- и транс-изомеры, 9 и 13 соответственно) являются продуктами формального восстановления CS и последующего элиминирования HCN. Их относительное содержание невелико

как в гранатах, так и в грунте (медиана менее 6 % от пика CS). Относительное медианное содержание продукта их дехлорирования (12, бензилиденмалонилдинитрил) почти в 6 раз ниже. Еще одно соединение, происхождение которого можно объяснить аналогичными процессами (элиминирование HCN и дигидрирование) – 3-(2-хлорфенил)пропанонитрил (11) было найдено почти во всех пробах при невысоком содержании; продукт дехлорирования этого вещества не обнаружили.

Присутствие в пробах заметного количества вещества 10, идентифицированного как эпоксидное производное CS (2,2-дициано-3-(2-хлорфенил)оксиран) выглядит необычно ввиду его очевидной реакционноспособности. Однако вещество 10 идентифицировано в ранних работах [8, 9] с использованием вещества сравнения, а его спектры

Таблица 2 – Доли площадей пиков соединений относительно CS

№	Соединение	Гранаты			Грунт							
		1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Хлорбензол	0,01	0,04	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	Бензонитрил	0,00	0,25	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	Дихлорбензол	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	Метилбензонитрил	0,00	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	2-Хлорбензальдегид	1,34	1,93	0,52	0,13	0,02	0,07	0,02	0,23	0,01	0,13	0,04
6	Хлорбензонитрил	0,07	0,14	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	2-Хлорбензойная кислота	0,00	0,00	0,00	0,15	0,04	0,15	0,02	0,48	0,01	0,62	0,13
8	3-(2-Хлорфенил)пропиненитрил	0,12	0,03	0,02	0,05	0,01	0,00	0,01	0,11	0,00	0,09	0,02
9	2-Хлороциннамоилнитрил (Z-)	0,05	0,04	0,02	0,08	0,03	0,00	0,02	0,22	0,01	0,23	0,05
10	2,2-Дициано-3-(2-хлорфенил)оксиран	0,02	0,16	0,00	0,00	0,07	0,00	0,19	0,00	0,24	0,00	0,16
11	3-(2-Хлорфенил)пропанонитрил	0,04	0,07	0,07	0,18	0,03	0,00	0,01	0,26	0,01	0,45	0,06
12	Бензилиденмалонилдинитрил	0,03	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,04	0,01
13	2-Хлороциннамоилнитрил (E-)	0,12	0,10	0,06	0,09	0,02	0,00	0,01	0,23	0,01	0,26	0,06
14	2-Цианоциннамоилдинитрил (Z-)	0,34	0,57	0,32	1,49	0,60	4,19	0,19	5,21	0,17	7,28	1,77
15	2-Хлорбензилмалонилдинитрил	0,00	0,00	0,03	4,18	1,61	10,2	0,53	19,0	0,61	26,1	5,63
16	CS изомер 1	0,05	0,04	0,02	0,10	0,03	0,26	0,01	0,26	0,01	0,60	0,08
17	3-Хинолин карбонитрил	0,25	0,29	0,08	0,20	0,07	0,56	0,03	1,66	0,04	1,47	0,32
18	CS (2-хлоробензальмалонодинитрил)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
19	2-Цианоциннамоилдинитрил (E-)	0,90	1,20	0,70	1,06	0,45	3,44	0,20	6,56	0,21	6,55	1,73
20	4-Хлоробензальмалонодинитрил	0,05	0,03	0,02	0,01	0,01	0,04	0,00	0,02	0,00	0,02	0,02
21	3-Изохинолин карбонитрил	0,16	0,22	0,09	0,45	0,13	0,74	0,00	2,27	0,05	1,60	0,48
22	CS (циклизация 1)	0,33	0,10	0,05	0,16	0,07	0,48	0,02	0,70	0,02	0,85	0,17
23	CS (циклизация 2)	0,21	0,03	0,02	0,10	0,06	0,37	0,02	0,54	0,02	0,62	0,12
24	2-Хлорофенил-цианопропанамид	0,00	0,00	0,01	0,98	0,81	5,00	0,23	9,00	0,29	10,9	2,71
25	2-Хлорофенил-цианопропенамид	0,05	0,01	0,07	0,00	0,00	0,00	0,01	0,14	0,01	0,09	0,03

Примечание.

Полужирным шрифтом выделены значения, превышающие CS.

Таблица составлена авторами по собственным данным.

приведены в ряде библиотек, включая NIST2020⁶, Wiley12⁷ и Designer Drug 2023⁸. Измерения точных масс ионов его масс-спектра подтвердили достоверность сделанной идентификации.

Происхождение двух 2-цианоциннамоилдинитрилов (цис- и транс-изомеры, 14 и 19 соответственно) можно объяснить на основании гомолитического элиминирования атома хлора в молекуле CS с последующей миграцией нитрильной группы на бензольное ядро через образование пятичленного цикла и элиминированием протона [8].

Относительные площади пиков этих соединений велики (в особенности, для транс-изомера, причем медианное значение сравнимо с площадью пика CS), но отсутствие хлора в молекулах делает их неудобными объектами для подтверждение применения CS.

2-Хлорбензилмалонилдинитрил (15) – вещество, наиболее заметное в пробах грунта и почти отсутствующее в материале гранат, рисунок 3. Этот факт можно объяснить, как (вероятно) большей химической стабильностью, так и большей летучестью вещества 15 по сравнению с CS. В большинстве проб

⁶ NIST/EPA/NIH 20 Mass Spectral Library. National Institute of Standards and Technology Mass Spectrometry Data Center. Gaithersburg, USA. <https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:start> (дата обращения: 05.06.2024).

⁷ <https://www.mswil.com/software/spectral-libraries-and-databases/wiley-spectral-libraries/wiley-12th-edition> (дата обращения: 05.06.2024).

⁸ <https://sciencesolutions.wiley.com/news-wiley-announces-release-of-mass-spectra-of-designer-drugs-to-accelerate-forensics-analysis-of-fentanyl-cannabinoids-and-more> (дата обращения: 05.06.2024).

Ярлыченко А.С., Игнатьев В.А., Понсов М.А., Григорьев А.М.
Iarlychenko A.S., Ignatev V.A., Ponsov M.A., Grigoryev A.M.

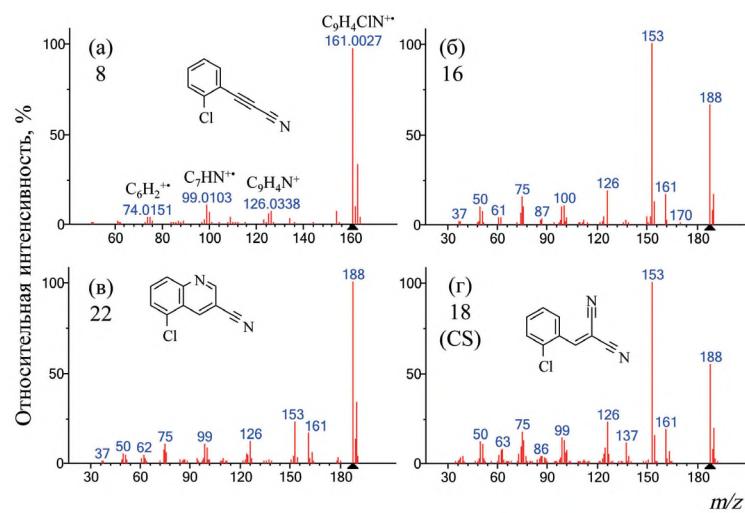


Рисунок 2 – Масс-спектры (ГХ-МС, ЭИ) вещества 8 с брутто-формулами ионов (а) и молекулярных изобаров CS (б, в). Масс-спектр CS (г) приведен для сравнения (рисунок подготовлен авторами по собственным данным)

грунта площадь пика 15 значительно превышает CS (в пробе грунта № 7 – более, чем в 26 раз). По совокупности важнейших признаков (стабильность, сходство структуры с CS при наличии атома хлора и значительная относительная площадь пика) 2-хлорбензилмалониддинитрил пригоден в качестве косвенного маркера применения CS.

Структуры двух сильно удерживающихся веществ – 17 и 21 (3-хинолинкарбонитрил и 3-изохинолинкарбонитрил соответственно) кардинально отличаются от других продуктов деградации CS вследствие бициклической природы. Их можно рассматривать как продукты циклизации CS и вещества 14 (Z-2-цианоциннамоиддинитрил). Оба вещества присутствуют почти во всех пробах, причем в пробах грунта № 5 и 7 их содержание превышает CS.

Четыре вещества (16, 20, 22 и 23) имеют масс-спектры, подобные CS (18) и, по-види-

мому, одинаковые брутто-формулы. Вещество 20 (4-хлоробензальмалонодинитрил), изомер CS по расположению атома хлора на кольце, идентифицировали по времени удерживания [8, 9], и его содержание в пробах невелико. Однако в этих работах ничего не сообщалось о сильно удерживающихся молекулярных изобарах CS (22 и 23). Их относительное содержание в материале гранат невелико, но становится заметным в пробах грунта (в грунте № 7 доля площади пика вещества 22 составляет более 0,8 от площади пика CS). Разумеется, надежная идентификация этих веществ была бы возможна только с применением стандартов. Тем не менее, можно отметить, что значительное удерживание веществ 22 и 23 свидетельствует о возможном наличии второго цикла в структурах, и это предположение подтверждается высокой относительной интенсивностью молекулярных ионов в их масс-спектрах, что

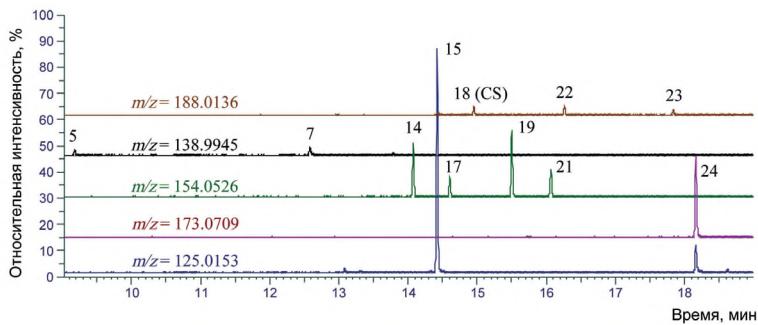


Рисунок 3 – ГХ-МСВР хроматограммы экстракта пробы грунта № 5 (толерантность m/z = 5 ppm). Приведены только соединения с относительной площадью пиков более 0,2 (рисунок подготовлен авторами по собственным данным)

**Идентификация продуктов деградации 2-хлоробензальмалонодинитрила (CS) в объектах...
Identification of CS Degradation Products in Objects Delivered from the Zone of a Special Military Operation**

характерно для прочных молекул, *рисунок 2*. Можно предположить, что вещества 22 и 23 являются хлорированными аналогами хинолинов 17 и 21 соответственно. Слабо удерживающееся вещество 16 имеет масс-спектр, полностью подобный CS, но предположения о его структуре сделать затруднительно: сходство масс-спектров должно свидетельствовать о сходстве структур, но возможные варианты (циклизация или увеличение расстояния между атомом хлора и боковой динитрильной цепью ведет к увеличению, а не к уменьшению удерживания.

Сильно удерживающиеся вещества 24 и 25 образованы частичным гидролизом одной из нитрильных групп веществ 15 и 18 (CS) соответственно. Масс-спектр вещества 24 отсутствует в библиотеке NIST2020, но имеется в Wiley12.

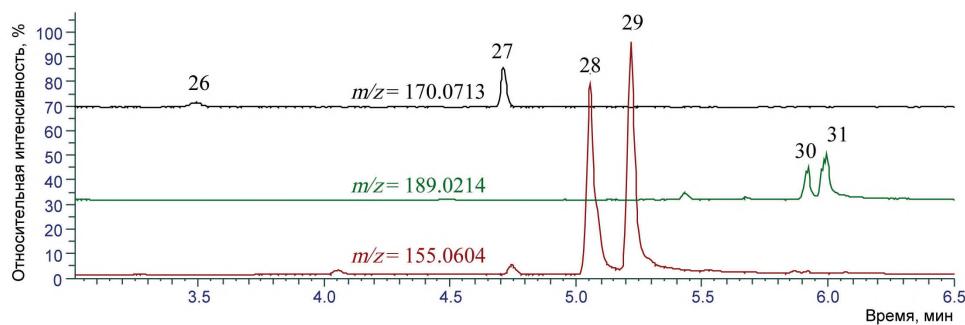
Обнаружение всех перечисленных веществ было подтверждено методами ГХ с электрон-захватным и термоионным детекторами при использовании индексов удерживания, измеренных с применением масс-спектрометров.

ЖХ-МС. CS не ионизируется в условиях ЭРИ и, следовательно, метод ЖХ-МС (ЭРИ) непригоден для его прямого обнаружения. Это же справедливо и для производных CS подобной структуры. Тем не менее, обнаружение ионизируемых маркеров применения CS при жидкостном скрининге, безусловно, необходимо для дальнейшего планирования процедуры анализа и – при необходимости – включения в нее газовой хроматографии с массовым или иным селективным детектированием. Можно отметить, что для установления маркерных веществ нет необходимости точного знания их структур, а достаточно уверенности в их происхождении от CS. Другими критериями выбора маркеров могут быть значительная интенсивность (пик, со-

ответствующий веществу должен присутствовать на хроматограммах общего ионного тока) и обоснованные предположения о его структуре.

Положительный режим. Два вещества с относительно малой площадью пиков (26 и 27) идентифицировали как аминобензольные производные CS при возможной замене атома хлора на аминогруппу, *рисунки 4, 5 и таблица 3*. Об этом свидетельствует легкое элиминирование амиака от протонированных молекул с образованием иона с *m/z* 153, а также последовательное элиминирование боковой цепи (ионы с *m/z* 143, 116 и 93). Дополнительным подтверждением наличия аминогрупп в структурах 26 и 27 было увеличение удерживания при замене кислой фазы А на слабощелочную вследствие диссоциации протонированной аминогруппы.

Фрагментация веществ 28 и 29 позволяет сделать предположение об их бициклической структуре с присоединенной нитрильной группой. Протонированные молекулы обоих веществ легко элиминируют HCN (ион с *m/z* 128); другие интенсивные ионы спектра образованы отщеплением соединений ацетиленовой природы (C_2H_2 , ион с *m/z* 129 и C_4H_2 , ион с *m/z* 105). Ионы с *m/z* 91 (катион тропилия, $C_7H_7^+$) и *m/z* 77 (катион фенила, $C_6H_5^+$) характерны для соединений, в структуре которых присутствует бензольный цикл. Наличие в масс-спектре ионов с атомом кислорода (например, *m/z* 146, 119 и 95) объясняется ион-молекулярными реакциями в ионных ловушках, в которых всегда присутствуют молекулы воды. Можно предположить, что вещества 28 и 29 имеют хинолиновую природу и аналогичны веществам 17 и 21, что объясняет их способность к ионизации при ЭРИ. Пики веществ 28 и 29 наиболее интенсивны по сравнению с другими возможными маркерами,



**Рисунок 4 – ЖХ-МСВР хроматограммы (положительная ЭРИ) экстракта содержимого гранаты № 1;
толерантность *m/z* = 5 ppm
(рисунок подготовлен авторами по собственным данным)**

Ярлыченко А.С., Игнатьев В.А., Понсов М.А., Григорьев А.М.
Iarlychenko A.S., Ignatev V.A., Ponsov M.A., Grigoryev A.M.

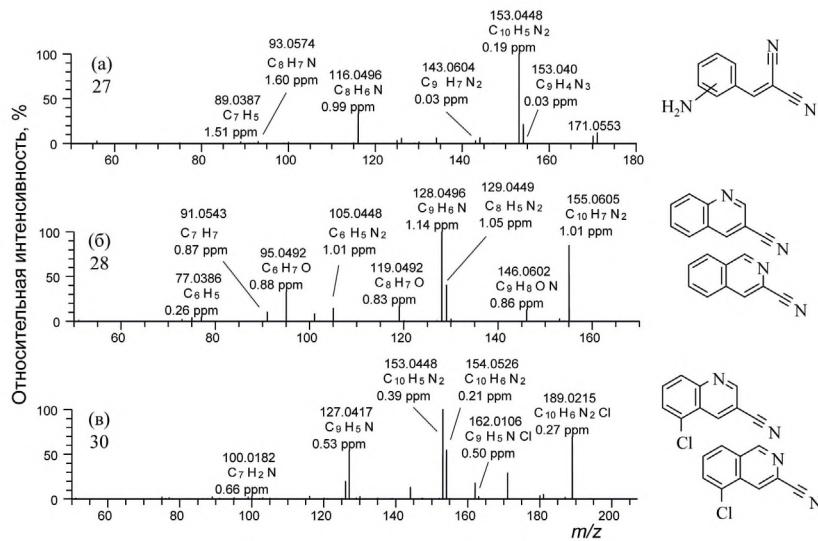


Рисунок 5 – Mass-спектры (ЖХ-МС, положительная ЭРИ) веществ 27, 28, 30 с брутто-формулами ионов и массовыми сдвигами. Энергия HCD 52,5 %
(рисунок подготовлен авторами по собственным данным)

но, к сожалению, в их молекулах отсутствует атом хлора.

Этого недостатка лишены вещества 30 и 31, брутто-формулы которых отличаются от 28 и 29 заменой атома водорода на хлор в фениленовом остатке. Их фрагментация сводится, в основном, к элиминированию атома хлора (образование катион-радикала $C_{10}H_6N_2^+$, m/z 154), молекул HCN и HCl (m/z 162 и 153 соответственно). Интенсивный пик иона с m/z 127 ($C_9H_5N^+$), образован совместным элиминированием HCN и атома хлора. Такой характер фрагментации, а также способность ионизироваться при ЭРИ позволяет предположить аналогию между веществами 30, 31 и наблюдаемыми при ГХ-МС веществами 22, 23.

Отрицательный режим. В кислой подвижной фазе вещество 32 ($C_{10}H_5ClN_2O$) элюируется широким пиком, но при переходе к слабоосновному элюенту его удерживание снижается, а пик становится узким. В масс-спектре вещества 32 присутствуют пики ионов, образованные последовательным элиминированием молекул HCl, CO и HCN (m/z 167, 139 и 112 соответственно). Вещество 32 предположительно идентифицировали как кетоновое производное CS (рисунок 1 и 6, 7), что подтверждается наличием двух интенсивных пиков ионов в спектре (C_3ON и C_3N_2 , m/z 66 и 64 соответственно), образованных распадом боковой цепи. В этом случае как хроматографическое поведение, так и ионизация объяснямы кетоэнольной

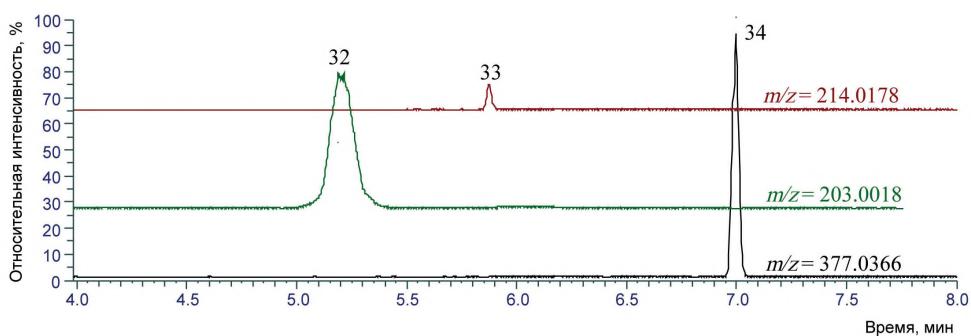
Таблица 3 – Характеристики соединений, обнаруженных методом ЖХ-МСВР в содержимом гранат

№	Соединение	Брутто-формула молекулы	Время удерж., мин	m/z	Сдвиг, m/z	Полярность
26	2-Аминобензалмалонодинитрил 1	$C_{10}H_8N_3$	3,41	170,0713	-0,36	(+)
27	2-Аминобензалмалонодинитрил 2	$C_{10}H_8N_3$	4,68	170,0713	0,27	(+)
28	CS (дехлорирование, циклизация 1)	$C_{10}H_6N_2$	5,06	155,0604	-0,56	(+)
29	CS (дехлорирование, циклизация 2)	$C_{10}H_6N_2$	5,22	155,0604	-1,06	(+)
30	CS (циклизация 1)	$C_{10}H_5ClN_2$	5,92	189,0214	-0,45	(+)
31	CS (циклизация 2)	$C_{10}H_5ClN_2$	5,99	189,0214	-0,21	(+)
32	CS (окисление)	$C_{10}H_5ClN_2O$	5,20	203,0018	-1,90	(-)
33	CS (+HCN)	$C_{11}H_6ClN_3$	5,87	214,0178	-0,15	(-)
34	CS (димеризация, +2H)	$C_{20}H_{12}Cl_2N_4$	7,00	377,0366	0,80	(-)

Примечание.

Таблица составлена авторами по собственным данным.

**Идентификация продуктов деградации 2-хлоробензальмалонодинитрила (CS) в объектах...
Identification of CS Degradation Products in Objects Delivered from the Zone of a Special Military Operation**



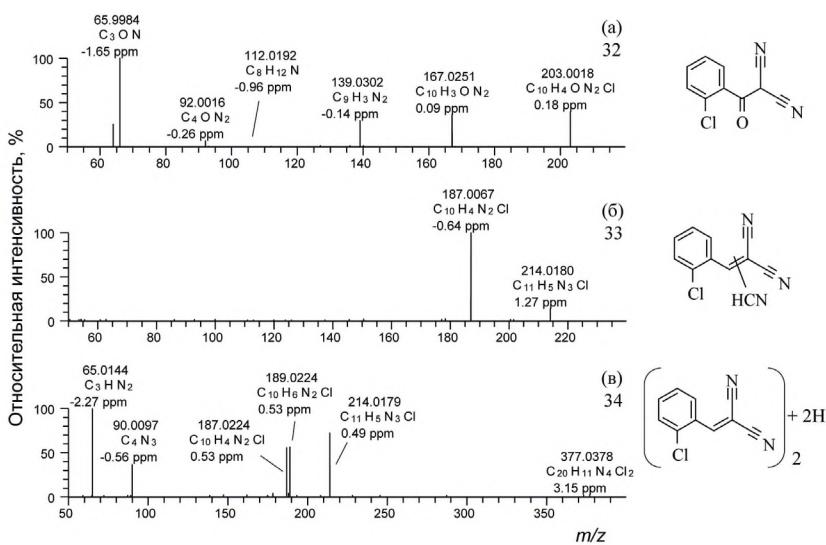
**Рисунок 6 – ЖХ-МСВР хроматограммы (отрицательная ЭРИ) экстракта содержимого гранаты № 1;
толерантность $m/z = 5$ ppm
(рисунок подготовлен авторами по собственным данным)**

таутомерией и наличием подвижного протона. Вещество 32 может быть использовано в качестве маркера применения CS, в основном, при хроматографировании слабоосновными подвижными фазами. Однако применение традиционных кислых фаз затрудняет обнаружение 32 при его малых концентрациях в пробах ввиду значительной ширины хроматографического пика.

Удерживание вещества 33 ($C_{11}H_6ClN_3$) так же заметно снижается в слабоосновном элюенте, а его спектр малохарактеристичен. Единственный интенсивный пик иона с m/z 187 соответствует элиминированию молекулы HCN, что затрудняет определение структуры. Площадь пика вещества 33 относительно мала, а его молекула высоко непредельна, в ней присутствует атом хлора и три остатка CN. Согласно брутто-формуле, вещество 33 является продуктом формаль-

ного присоединения HCN к молекуле CS. Совокупность этих наблюдений позволяет с высокой вероятностью предположить, что вещество 33 является производным CS.

Вещество 34 обладает наибольшим удерживанием в группе компонентов, ионизирующихся в отрицательном режиме, а его масса очень высока. Удерживание 34 не меняется при изменении pH подвижной фазы, что свидетельствует от отсутствии диссоциируемых функциональных групп. Брутто-формула вещества 34 ($C_{20}H_{12}Cl_2N_4$, масса около 378 Да) соответствует формальной димеризации CS с добавкой двух атомов водорода. Наиболее тяжелый ион в масс-спектре 34 ($C_{11}H_5ClN_3$, масса около 214 Да) предположительно имеет структуру, подобную 2-хлорбензилмалонилдинитрилу (15) с дополнительной нитрильной группой, а ионы с m/z 189 и 187 – самому 2-хлорбензилмалонилдини-



**Рисунок 7 – Масс-спектры (ЖХ-МС, отрицательная ЭРИ) веществ 32, 33, 34 с брутто-формулами ионов и массовыми сдвигами. Энергия HCD 35, 17,5 и 17,5 % для 32, 33 и 34 соответственно
(рисунок подготовлен авторами по собственным данным)**

Ярлыченко А.С., Игнатьев В.А., Понсов М.А., Григорьев А.М.
Iarlychenko A.S., Ignatev V.A., Ponsov M.A., Grigoryev A.M.

трилу и CS, соответственно. Наличие легких интенсивных ионов с m/z 90 и 65, соответствующих остаткам три- и дикарбонитрила соответственно, подтверждают сделанные предположения. Значительная интенсивность вещества 34, а также очевидная характеристичность позволяет использовать его в качестве маркера использования CS.

Заключение

Значительная реакционная способность CS приводит к образованию ряда продуктов конверсии, образованных преимущественно в ходе процессов термолиза и окисления. Следствием этих процессов является значительное снижение концентрации исходного соединения как в содержимом гранат, так и в объектах окружающей среды вблизи места их применения. В образцах грунта и в содержимом использованных газовых гранат, до-

ставленных из зоны проведения специальной военной операции, обнаружили 33 продукта конверсии или изомерии CS. Сведения об обнаружении восьми соединений из этого ряда в подобных объектах отсутствуют в доступных нам источниках. Было найдено, что при анализе объектов методом ГХ-МС (ЭИ) наиболее удобным маркером применения CS является 2-хлорбензилмалонилдинитрил, площадь пика которого может превышать CS более, чем в двадцать раз, в то время как обнаружение неизмененного CS затруднено из-за малого содержания. Для случая анализа проб методом ЖХ-МС (ЭРИ) предположительно идентифицировали девять маркеров применения CS, из которых наиболее удобными для положительного режима ионизации являются продукты циклизации CS хинолиновой природы, а для отрицательного режима – продукты димеризации и восстановления.

Список источников/References

1. Timperley CM, Forman JE, Åas P, Abdollahi M, Benachour D, Al-Amri AS, et al. Advice from the Scientific Advisory Board of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons on riot control agents in connection to the Chemical Weapons Convention. *RSC Adv.* 2018;8:41731–9.
<https://doi.org/10.1039/C8RA08273A>
2. Olajos EJ, Salm H. Riot control agents: Pharmacology, Toxicology, Biochemistry and Chemistry. *J Appl Toxicol.* 2001;21:355–91.
<https://doi.org/10.1002/jat.767>
3. Smith PA, Kluchinsky TA, Savage PB, Erickson RP, Lee AP, Williams K, et al. Traditional Sampling With Laboratory Analysis and Solid Phase Microextraction Sampling With Field Gas Chromatography/Mass Spectrometry by Military Industrial Hygienists. *AIHA J.* 2002;63(3):284–92.
<https://doi.org/10.1080/15428110208984715>
4. Sass S, Fisher TL, Jascot MJ, Herban J. Gas-Liquid Chromatography of Some Irritants at Various Concentrations. *Anal Chem.* 1971;43(3):462–4.
<https://doi.org/10.1021/ac60298a040>
5. Bettencourt da Silva RJN, Silveira DM, Camões MFGFC, Borges CMF, Salgueiro PAS. Validation, Uncertainty, and Quality Control of Qualitative Analysis of Tear Gas Weapons by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Lett.* 2014;47(2):250–67.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2013.832274>
6. Borusiewicz R. Chromatographic analysis of the traces of 2-chlorobenzylmalononitrile with passive adsorption from the headspace on Tenax TA and Carbotrap 300. *Forensic Sci Int.* 2019;303:109933.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.109933>
7. Gheorghe V, Gheorghe CG, Roxana DP, Mihai S, Calin C, Sarbu EE, et al. Synthesis, Purity Check, Hydrolysis and Removal of o-Chlorobenzylidene Malononitrile (CBM) by Biological Selective Media. *Toxics.* 2023;11(8):672.
<https://doi.org/10.3390/toxics11080672>
8. Kluchinsky TA (Jr), Savage PB, Sheely MV, Thomas RJ, Smith PA. Identification of CS-derived Compounds Formed during Heat-dispersion of CS Riot Control Agent. *J Micro Sep.* 2001;13(5):186–90.
<https://doi.org/10.1002/mcs.1040>
9. Kluchinsky TA (Jr), Sheely MV, Savage PB, Smith PA. Formation of 2-chlorobenzylidenemalononitrile (CS riot control agent) thermal degradation products at elevated temperatures. *J Chromatogr A.* 2002;952:205–13.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00096-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00096-1)
10. Hout JJ, Hook GL, LaPuma PT, White DW. Identification of Compounds Formed During Low Temperature Thermal Dispersion of Encapsulated o-Chlorobenzylidene Malononitrile (CS Riot Control Agent). *J Occup. Environ Hyg.* 2010;7(6):352–7.
<https://doi.org/10.1080/15459621003732721>

Идентификация продуктов деградации 2-хлоробензальмалонодинитрила (CS) в объектах...
Identification of CS Degradation Products in Objects Delivered from the Zone of a Special Military Operation

Вклад авторов / Authors Contribution

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.С. Ярлыченко – редактирование текста рукописи, работа с табличным материалом; В.А. Игнатьев – доработка текста, редактирование текста рукописи; М.А. Понсов – редактирование текста рукописи; А.М. Григорьев – формирование концепции статьи, написание текста рукописи / All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contribution were as follows: A.C. Iarlychenko – editing of the article, tabular work; V.A. Ignatev – revision of the text, editing of the article; M.A. Ponsov – editing of the article; A.M. Grigoryev – elaboration of the concept of the paper, writing of the article.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторах/ Authors

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации, 111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19.

Ярлыченко Алексей Сергеевич. Младший научный сотрудник.

Игнатьев Владимир Алексеевич. Старший научный сотрудник, канд. воен. наук, доцент.

Понсов Михаил Александрович. Старший научный сотрудник, канд. хим. наук, доцент.

Григорьев Андрей Михайлович. Старший научный сотрудник, д-р хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5971-5989>

Контактная информация для всех авторов: 27nc_1@mil.ru

Контактное лицо: Григорьев Андрей Михайлович; 27nc_1@mil.ru

27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation.

Aleksey S. Iarlychenko. Researcher.

Vladimir A. Ignatev. Senior Researcher. Dr Sci. (Mil.). Associate Professor.

Michail A. Ponsov. Senior Researcher. Dr Sci. (Chem.). Associate Professor.

Andrej M. Grigoryev. Senior Researcher. Dr Sci. (Chem).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5971-5989>

Contact information for all authors: 27nc_1@mil.ru

Contact person: Andrey M. Grigoryev; 27nc_1@mil.ru



Оспа Аляски на фоне новых ортопоксвирусных инфекций

М.В. Супотницкий[✉]

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации,
111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19
✉ e-mail: 27nc_1@mil.ru

Ранее неизвестный вирус из семейства ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*, OPXV) вызвал серию оспоподобных заболеваний среди жителей Аляски. Пациент с иммунодефицитом умер на фоне генерализованной инфекции, по клинике сходной с натуральной оспой. Вирус получил название – вирус оспы Аляски (*Alaskapox virus*, AKPV).

Цель исследования – обобщить имеющуюся информацию о природе и опасности для людей AKPV и его эпидемическом значении в контексте других активизировавшихся ортопоксвирусов.

Материалы и методы исследования. Использовались англоязычные источники, доступные через базы данных PubMed и Google Scholar. Анализ информации проводился от частного к общему. Рассматривались биологические и другие свойства AKPV в сопоставлении с аналогичными у известных OPXV.

Обсуждение. AKPV относится к OPXV Нового Света, но имеет тесные филогенетические связи с OPXV Старого света. Клиника болезни, вызванной AKPV и другими OPXV, имеет ряд общих симптомов, обобщенно называемых ортопоксвирусным синдромом. Он характеризуется начальным проромальным периодом в виде лихорадки, недомогания, головной болью, миалгией и, реже, тошнотой и рвотой. После инкубационного периода продолжительностью от 10 до 14 сут, в течение недель на фоне лимфоаденопатии происходит последовательное образование пятен, папул, везикул, пустул, язв, сухих корок и депигментированных рубцов. У иммунодефицитных больных OPXV могут вызывать смертельную инфекцию, напоминающую натуральную оспу. При обнаружении у пациента данного синдрома, необходимо предполагать OPXV-инфекцию и дальше вести пациента в соответствии с методическими рекомендациями МР 3.1.0291-22. Также существует риск использования любого обнаруженного OPXV в качестве источника генов для модификации в направлении «усиления функций» других патогенов или для имитации эпидемий и пандемий.

Заключение. Проникновение AKPV в популяции людей является частью процесса активизации природных очагов OPXV. Филогенетическое положение AKPV говорит о том, что он может иметь природные резервуары не только на Аляске, но и в зоне boreальных лесов России от Камчатки до Карелии. Искусственное глобальное распространение оспы обезьян малоконтагиозной клады WA, показывает, что технологии социальной инженерии в сочетании с глобальной пропагандой позволяют имитировать пандемии OPXV даже с помощью тех видов, которые считались неспособными к такому распространению.

Ключевые слова: Аляска; бореальная оспа; зооноз; вирус оспы Аляски; ортопоксвирус; полуостров Кенай; оспа обезьян; филогенетика; Фэрнбекс

Для цитирования: Супотницкий М.В. Оспа Аляски на фоне новых ортопоксвирусных инфекций. Вестник войск РХБ защиты. 2024;8(2):122–134. EDN:wjbzqr.

<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-122-134>

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: автор является заместителем главного редактора журнала (с 2017 г.). Это не повлияло на процесс рецензирования и окончательное решение.

Финансирование: федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации (27 НЦ МО РФ).

Поступила 13.06.2024 г. После доработки 23.06.2024 г. Принята к публикации 27.06.2024 г.

Alaskapox amid New Orthopox Viral Infections

Mikhail V. Supotnitskiy 

27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky
of the Ministry of Defence of the Russian Federation
Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation
 e-mail: 27nc_1@mil.ru

A previously unknown virus from the orthopoxvirus family (OPXV) caused a series of smallpox-like diseases among the inhabitants of Alaska. A patient with immunodeficiency died from a generalized infection similar to smallpox. The virus was named *Alaska smallpox virus* (AKPV).

The aim of the study was to summarize the available information on the nature and danger to humans of AKPV and its epidemic significance in the context of other activated orthopoxviruses.

Materials and methods. English-language sources available through the PubMed and Google Scholar databases were used. The information was analyzed from the specific to the general. The biological and other properties of AKPV were compared with those of known OPXV.

Discussion. AAKPV is related to New World OPXV, but is closely related to Old World OPXV. The clinical picture of the disease caused by AKPV and other OPXVs has a number of common symptoms, collectively called orthopoxvirus syndrome. It is characterized by an initial prodromal period in the form of fever, malaise, headache, myalgia and, less commonly, nausea and vomiting. After an incubation period of 10 to 14 days, macules, papules, vesicles, pustules, ulcers, dry crusts and depigmented scars develop over the course of weeks against the background of lymphadenopathy. In immunocompromised patients, OPXVs can cause a fatal infection resembling smallpox. If this syndrome is detected in a patient, OPXV infection should be assumed and the patient should be managed according to the guidelines of MP 3.1.0291-22. There is also a risk of using any detected OPXV as a source of genes for gain-of-function modification of other pathogens or for simulating.

Conclusion. The penetration of AKPV into human populations is part of the process of activation of natural foci of OPXV. The phylogenetic position of AKPV suggests that it may have natural reservoirs not only in Alaska, but also in the boreal forest zone of Russia from Kamchatka to Karelia. Artificial global spread of monkeypox of the low-infectivity WA clade shows that social engineering techniques combined with global propaganda can simulate OPXV pandemics even with species thought incapable of such spread.

Keywords: Alaska; Alaskapox virus; Borealpox virus; Orthopoxvirus; monkeypox; Fairbanks; zoonoses

For citation: Supotnitskiy M.V. Alaskapox amid New Orthopox Viral Infections. Journal of NBC Protection Corps. 2024;8(2):122-134. EDN:wjbzqr.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-122-134>

Financial disclosure: The author has no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: The author is deputy Editor-in-Chief of the journal (since 2017). This had no impact on the peer review process and the final decision.

Funding: 27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of the Russian Federation (27 SC MD RF).

Received June 13, 2024. Revised June 23, 2024. Accepted June 27, 2024

В 2015 г. у жительницы Аляски была выявлена болезнь, проявившаяся кожным поражением, похожими на осеннее, сопровождающаяся лимфаденопатией, лихорадкой, усталостью, артраптией и миалгией.

Выделенный из очага поражения вирус на основе секвенирования генома был отнесен к семейству *Poxviridae* – крупных вирусов с двухцепочечной ДНК, способных заражать широкий круг животных-хозяев, от насе-

Супотницкий М.В.
Supotnitskiy M.V.

комых до позвоночных, к роду ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*, OPXV), включающий вирус натуральной оспы (VARV), вирус вакцины (VACV)¹, вирус коровьей оспы (CPXV), оспы обезьян (MPXV) и ряд других, вызывающих инфекции у человека и животных, сопровождающиеся характерной сыпью. Новый вирус получил название – вирус оспы Аляски (*Alaskapox virus*, AKPV) [3], другое название – вирус бореальной (т.е. таежной) оспы (*Borealpox virus*, BPV) [4]. Позже были зарегистрированные еще пять самокупировавшихся случаев аналогичной болезни среди людей с подтверждением AKPV. Все они локализовались в одном географическом регионе – в лесистой местности в центре Аляски, вблизи города Фэрбанкс, в районе Фэрбенкс Норт-Стар². Однако седьмой случай привлек внимание эпидемиологов тем, что он стал первым, приведшим к длительной госпитализации и смерти пациента в январе 2024 г.; и в отличие от предыдущих, его обнаружили более чем на 500 км южнее от Фэрбенкса – на южном побережье Аляски, на полуострове Кенай³ [5, 6].

Цель исследования – обобщить имеющуюся информацию о природе и опасности для людей AKPV и его эпидемическом значении в контексте других активизировавшихся ортопоксвирусов.

Материалы и методы. Для исследования использовались англоязычные источники, доступные через базы данных PubMed и Google Scholar. Первичный поиск публикаций проводился с помощью логических операторов: Alaskapox Infection; Alaskapox; Alaskapox virus; Orthopoxvirus Alaska; Borealpox virus. Ручным поиском и исследованием библиографии найденных источников, отбирались источники, релевантные цели исследования. После удаления дубликатов и нерелевантных источников осталось 29 статей. Их анализ проводился от частного к общему, т.е. сопоставлением свойств AKPV с аналогичными свойствами других известных ортопоксвирусов.

Для достижения цели исследования решались следующие задачи:

- обобщалась информация по клинике болезни, вызванной AKPV;

- систематизировалась информация по строению генома и таксономии AKPV;

- анализировалась информация по активизировавшимся после ликвидации натуральной оспы другим ортопоксвирусам и по их использованию для имитации эпидемий.

Клиника болезни

Первые шесть случаев AKPV, зарегистрированные в Фэрбанксе, Аляска, привели инфекционистов к выводу, что оспа Аляски – это самокупирующееся заболевание, проявляющееся кожными поражениями, а также наличием общих симптомов, таких как лимфаденопатия, лихорадка, чувство усталости (астения), артрит, миалгия.

Поражения кожи AKPV морфологически похожи на поражения кожи при других ортопоксвирусных инфекциях (VARV, VACV, MPXV и др.). Возникают немногочисленные эритематозные пупковидные, везикулярные или пузырьковые высыпания с окружающей эритемой. Развитие поражений происходило в течение 3–6 нед. с образованием язв, корок; госпитализация никому из заболевших не потребовалась. Картина болезни седьмого случая (больной с лекарственной иммуносупрессией) отличалась от предыдущих более тяжелыми общими симптомами, большим сходством с натуральной оспой и необратимостью инфекционного процесса, приведшего пациента к смерти [3, 5].

Ниже приведены описания первого и седьмого случаев.

Первый пациент. 29 июля 2015 г., женщина средних лет, проживавшая с мужем и детьми в лесистой местности с низкой плотностью населения в пределах 50 миль от Фэрбенкса, обратилась в клинику неотложной помощи в Фэрбенксе с основной жалобой на подозрение на укус паука на правом плече. Она сообщила, что в течение 5 дней до обращения за помощью у нее наблюдались лихорадка, усталость, недомогание и болезненность лимфатических узлов. В ее истории болезни был отмечен только гипотиреоз. Она отрицала какие-либо недавние контакты с другими больными людьми, поездки за пределы штата или рецидивирующие кожные инфекции. Была ли проведена вакцинация против натуральной оспы, пациентка не помнила. Шрама от вакцинации у нее не было.

¹ Вирус осповакцины (вакцинии) – искусственно поддерживаемый вирус, источник современной вакцины против натуральной оспы. Происхождение не ясно. Исторически его и вирус коровьей оспой считали одним и тем же вирусом, пока не было выяснено, что серологически они различаются. Есть предположение, что вирус вакцинии был первоначально выделен от лошадей. Анализ ДНК из раннего (1902 г.) образца оспенной вакцины показал, что вирус осповакцины на 99,7 % похож на вирус оспы лошадей [1, 2].

² Fairbanks North Star Borough, Alaska. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Fairbanks_North_Star_Borough,_Alaska (дата обращения: 12.05.2024).

³ Kenai Peninsula. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Kenai_Peninsula (дата обращения: 12.05.2024).

Осмотр врача подтвердил наличие поверхностной язвы диаметром около 1 см и двух соседних пузырьков меньшего размера диаметром около 2 мм на задней верхней поверхности правого плеча пациента. Изъявление сопровождалось локальным уплотнением, повышением температуры и болезненностью, но не имело флюктуации или выделений. Одиночная линейная полоска эритемы распространялась вперед по правому плечу пациентки и назад к верхней части грудной клетки с правой стороны, не пересекая срединную линию. Ее врач пришел к выводу, что распространение эритемы соответствовало дерматому пятого шейного нервного корешка⁴, и вызвало опасения по поводу вирусной инфекции. Врач удалил везикулу, взял мазок и отправил образец мазка в вирусологическую лабораторию общественного здравоохранения штата Аляска для посева и диагностического тестирования [3].

Образец мазка был помещен в культуру клеточных линий MRC5, HEp-2 и RMK 3 августа, и к 10 августа цитопатические эффекты наблюдались во всех трех культурах. Результаты как прямого флуоресцентного теста на антитела к вирусу простого герпеса, так и теста полимеразной цепной реакции (ПЦР) на вирус ветряной оспы (проведенного в Департаменте общественного здравоохранения Калифорнии) были отрицательными.

17 августа изолят клеточной линии MRC5 был отправлен в Лабораторию общественного здравоохранения штата Аляска, где результаты ПЦР-тестов на ортопоксвирус, не специфичный для натуральной оспы, и специфичный для натуральной оспы, оказались отрицательными; однако общий ПЦР-тест на ортопоксвирус дал положительные результаты. 24 августа исходный образец мазка и 3 изолята клеточной культуры (по одному от каждой из 3 клеточных линий) были отправлены в лабораторию поксвирусов Центров по контролю и профилактике заболеваний, где ПЦР-анализ на ортопоксвирус показал положительные результаты на 27 образцах. Выделенный вирус получил обозначение – AK2015_poxvirus. Электронно-микроскопическое исследование клеток, инфицированных AK2015_poxvirus, проведенное с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, показало характерные для ортопоксвирусов морфологические характеристики [7] и наличие различных морфологических форм АКРВ (рисунок 1).

Образец сыворотки крови пациента также дал положительный результат на ранние антитела (IgM) к ортопоксвирусу. Для полного разрешения кожного поражения потребовалось около 6 месяцев. Никаких доказательств передачи вируса от основного пациента к людям, находившимся с

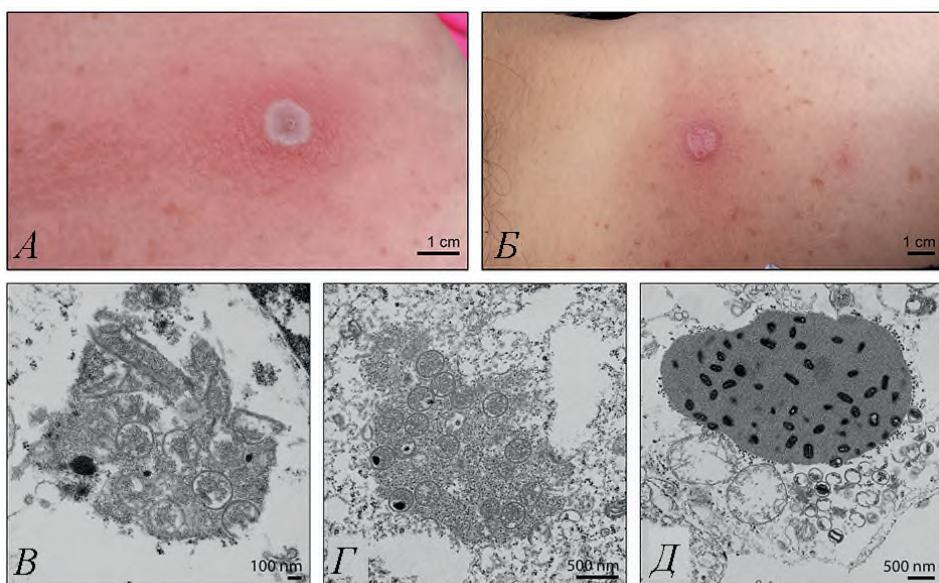


Рисунок 1 – Оспенные поражение кожи пациентки на 29 июля 2015 г. (А) и 20 августа 2015 г. (Б). В–Д – электронно-микроскопические изображения вируса, выделенного от пациентки, на разных стадиях сборки вириона: образования полумесяца (crescent formation), т.е. серповидных мембран (ранний этап формирования вириона), которые собираются в незрелые вирусные частицы (В), незрелые вирусные частицы на вирусных фабриках (Г) и тельца включения А-типа в зрелых вирусных частицах, окруженных рибосомами (Д) [3].

⁴ Дерматом – это участок кожи, из которого все сенсорные (чувствительные, афферентные) нервы направляются в один и тот же корешок спинномозгового нерва. Симптомы в конкретном дерматоме (например, боль или сыпь), могут указывать на патологию, затрагивающую соответствующий нервный корешок.

Супотницкий М.В.
Supotnitskiy M.V.

ним в контакте, не зарегистрировано. В окружающей среде, на фомитах⁵ и у отловленных возле дома животных обнаружить АКРВ не удалось. Анамнез пациента также не позволил выйти на источник инфекции [3].

Седьмой пациент. Пожилой мужчина с полуострова Кенай, в анамнезе – лекарственная иммуносупрессия, развившаяся в результате лечения онкологического заболевания. В сентябре 2023 г. он заметил болезненную красную припухлость в правой подмышке. В течение следующих шести недель несколько раз обращался к своему лечащему врачу и в местное отделение неотложной помощи, и ему «было прописано несколько схем лечения антибиотиками». Пункционная биопсия не выявила никаких признаков бактериальной инфекции или рака, но пациент почувствовал усиливающуюся боль в правом плече, переросшую в целлюлит, лишивший его способности двигать рукой. 17 ноября его поместили в местную больницу. Во время госпитализации он жаловался на «жгучую боль» в правом плече, и на его теле были обнаружены четыре небольших очага, похожих на оспенные. Рана, полученная при биопсии, не заживала и из нее выделялось обильное серозное вещество. Так как состояние пациента не улучшалось, его перевели в больницу в соседнем Анкоридже [6, 8].

Первоначальные лабораторные анализы предположили наличие коровьей оспы, но лаборатория Центров по контролю и профилактике заболеваний в конечном итоге выявила АКРВ. Пациенту назначили противоспанный иммуноглобулин и два противооспенных препарата: внутривенно тековиримат (TROXX)⁶ и бринцидофовир в таблетках. Сначала ему стало лучше, сыпь и бляшки на коже исчезли. Но позже у него обнаружились замедленное заживание ран, развилась кахексия, острые почечная и дыхательная недостаточность. Пациент умер 27 января 2024 г., т.е. болезнь длилась пять месяцев и имела необратимый характер [8].

Источник заражения седьмого пациента не был установлен. По его словам, он жил в изолированном лесном районе и кормил бездомную кошку, которая часто его царапала. Одна заметная царапина была рядом с его первоначальной сыпью и появилась менее чем за месяц до появления сыпи. У кошки был отрицательный результат на АКРВ, но официальные лица из органов здравоохранения штата заявили, что она могла иметь на своих когтях вирус «от недавнего убийства какого-то грызуна»⁷.

Краткое клиническое описание известных случаев оспы Аляски приведено в таблице 1.

Таблица 1 – Краткое клиническое описание известных случаев оспы Аляски [5]

Случай	Дата случая	Пол/ возраст	Географическое расположение	Кожное проявление болезни	Общие симптомы	Исход
1	Июль 2015 г.	Жен. / средний	Фэрбанкс	Одиночная язвенная бляшка размером 1 см на правом плече сзади с прилегающими везикулами размером 2×2 мм и окружающей эритемой, уплотнением и болезненностью при пальпации	Лихорадка, утомляемость, недомогание, лимфаденопатия, миалгия	Заживание через 6 мес.
2	Август, 2020 г.	Жен. / средний	Там же	Одиночная серая папула с пупковидным вдавлением и центральным струпом на левом плече с окружающей эритемой	Лихорадка, утомляемость, лимфаденопатия, боль в плече	Заживание через 6 нед.
3	Июль, 2021 г.	Жен. / ребенок	Там же	Единичная 1,2 см пупковидная пустулезная бляшка на медиальной стороне локтя слева с окружающей эритемой	Лихорадка, лимфаденопатия	Заживание через 3 нед.
4	Август, 2021 г.	Жен. / средний	Там же	Единичная оспенная пустулезная поражение на верхней внутренней стороне правого бедра с окружающей эритемой	Лимфаденопатия, артрит	Заживание через 3 нед.

⁵ Фомиты (англ. fomites) – любые предметы, контаминированные патогенными микроорганизмами или другими паразитами, при соприкосновении с которыми возникает риск заражения.

⁶ SIGA Receives Approval from the FDA for Intravenous (IV) Formulation of TPOXX® (tegovirimat). URL: <https://investor.siga.com/news-releases/news-release-details/siga-receives-approval-fda-intravenous-iv-formulation-troxxr> (дата обращения: 12.05.2024).

⁷ Jiménez J. Man Dies in First Known Fatal Case of Alaskapox. The New York Times. 2024. Feb. 13. URL: <https://www.nytimes.com/2024/02/13/health/alaskapox-virus-fatality.html> (дата обращения: 12.05.2024).

Продолжение таблицы 1

Случай	Дата случая	Пол/ возраст	Географическое расположение	Кожное проявление болезни	Общие симптомы	Исход
5–6	Подробности не сообщаются	Подробности не сообщаются	Там же	Подробности не сообщаются	Подробности не сообщаются	Подробности не сообщаются
7	Сентябрь, 2023 г.	Муж. / пожилой	Полуостров Кенай на южном побережье Аляски	Болезненная эритематозная папула на в подмышечной впадине с последующим увеличением до серой язвенной бляшки с серозным дренажем и прогрессирующей окружающей эритемой, уплотнением и сильной болью; четыре дополнительных небольших, похожих на оспенные поражения были отмечены на других участках тела	Усталость, обширный региональный миозит. Госпитализирован и получил внутривенно тековиримат, VIGIV, перорально бринцидофовир. Течение осложнилось задержкой заживления ран, кахексией, острой почечной недостаточностью и дыхательной недостаточностью	Смерть пациента в январе 2024 г.

Примечание.

VIGIV – внутривенный иммуноглобулин против вируса вакцины.

Все случаи заражения АКРВ были зарегистрированы в лесных районах в конце лета и в начале осени, т.е. в сезон максимальной численности грызунов. Ни в одном не сообщалось о поездках пациента за пределы штата, контактах с другими больными оспой Аляски или о связи с другими случаями. Утверждается, что АКРВ был выделен от рыжих полевок и землероек, и, вероятно, он широко распространен среди мелких млекопитающих Аляски. Домашние животные, такие как кошки, также участвуют в распространении вируса среди людей⁸ [9].

Филогенетическое положение АКРВ

Род OPXV содержит две отдельные клады вирусов, сходство геномных последовательностей которых коррелирует с их историческим географическим распространением в Старом или Новом Свете. OPXV Старого Света содержат семь признанных в настоящее время видов, включая VARV, VACV, MPXV, CPXV, вирус верблюжьей оспы (*Variola camelina*), вирус электромелии (ECTV) и вирус оспы гололапых песчанок (Taterapox), хотя разнообразие изолятов CPXV предполагает, что CPXV может включать несколько видов. В настоящее время известны три вида OPXV

Нового Света или Северной Америки: вирус оспы енотов (*Raccoonpox virus*, RCV), вирус оспы полевки (*Volepox virus*, VPXV) и вирус оспы скунса (*Skunkpox virus*, SKPV) [10].

Положение АКРВ внутри рода определяли с помощью анализа последовательности ДНК. Филогенетический вывод был основан на 9 генах, расположенных в центральной консервативной области генома АКРВ. Он показал, что изолят AK2015_poxvirus представляет собой отдельную генетическую линию ортопоксвируса. AK2015_poxvirus был сгруппирован в род *Orthopoxvirus* и выделен в отдельный вид как сестринская ветвь монофилетической клады⁹, содержащей все ортопоксвирусы Старого Света. На 6,1–7,3 % он отличается от различных видов ортопоксвирусов Старого Света и на 12,3–12,6 % – от изолятов внутри североамериканской клады. Генетические расстояния, оцененные между исследованными изолятами признанных видов ортопоксвирусов Старого Света, варьировались от 0,6 % (вирус оспы гололапых песчанок, вирус верблюжьей оспы) до 3,2 % (вирус электромелии и вирус натуральной оспы) [1] (рисунок 2).

Полный геном изолята АКРВ имел длину 210797 п.н. с инвертированными концевыми

⁸ В оригинале мне эту работу найти не удалось. Данные взяты из работы E.R. Parker [5].

⁹ Монофилетической называется группа, которая включает предка и всех его потомков. Монофилетическая группа это синоним термина «клада», потому что клада по определению монофилетична. Сестринская группа – группа, с которой изучаемый таксон формирует кладу (или монифилию). Полифилетическая группа не включает общего предка (Monophly. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Monophly>; дата обращения: 15.05.2024).

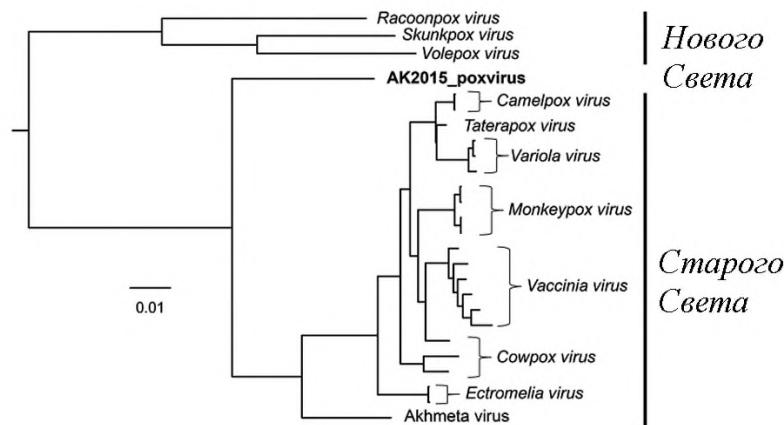


Рисунок 2 – Положение AK2015_poxvirus внутри рода Orthopoxvirus. Результаты байесовского филогенетического анализа, указывающие на положение AK2015_poxvirus в пределах рода Orthopoxvirus. Анализ был основан на 9 генах, расположенных в центральной консервативной области генома (гомологи штамма Копенгаген вируса осповакцины A7L, A10L, A24R, D1R, D5R, E6R, E9L, H4L и J6R)) [3]

повторами (ITR) размером 2,4 т.п.н. [10]. Он содержит гены диапазона хозяев и вирулентности, типичные для OPXV, но не имеет гомологов C4L (гипотетический белок)¹⁰ и B7R (белок, связывающий γ-интерферон), а ген гемагглютинина содержал уникальную вставку из 120 аминокислот. Семь предсказанных белков AKPV были наиболее похожи на белки поксвирусов Мурманска, не относящихся к OPXV, или NY_014. Геном AKPV не содержал нескольких генов OPXV, которые были идентифицированы как факторы хозяина или гены вирулентности в других OPXV. Геномный анализ выявил доказательства, свидетельствующие о рекомбинации с вирусом эктромелии в двух предполагаемых областях, которые содержат семь предсказанных кодирующих последовательностей, включая белок включения А-типа [3]. Нахodka более чем странная. Распространение и природный резервуар вируса эктромелии остаются неизвестными, но ранее предполагали, что он циркулирует только среди диких грызунов в Европе [11]. Будущие исследования, возможно, включающие еще не обнаруженные изоляты или новые виды поксвирусов, могут пролить свет на взаимосвязь между этими вирусами. Высокое сходство последовательностей в подозрительных рекомбинантных областях между AKPV и ECTV предполагает либо короткое время с момента

рекомбинации, либо очень низкую скорость эволюции для этой области генома [10].

Последний, седьмой пациент прибыл из другой части Аляски. Полученный от него вирус содержал последовательность генома, которая филогенетически отличалась от предыдущих изолятов из Фэрбенкса (эти данные пока не опубликованы). Представители здравоохранения связывают смерть этого пациента с ослабленным иммунитетом, а не с более вирулентным патогеном [6]. Данные по филогенетическому положению AKPV говорят, что видимо он сформировался еще до разделения Евразии и Североамериканского континента. Последнее обстоятельство говорит о возможном широком распространении природных очагов AKPV и возможности их существования на территориях boreальных лесов субарктических регионов России – от Камчатки и до Карелии¹¹.

Обсуждение

Тема новых и возвращения «старых» инфекционных болезней сама по себе не нова: XXI в. – COVID-19; в XX в. – геморрагические лихорадки, СПИД и СПИД-ассоциированные инфекции, сывороточные гепатиты, оспа обезьян, прионные болезни и др.; в XIX в. «новой» считалась холера; в XIV в. – чума. В настоящее время к источникам новых патогенов в человеческом обществе, как правило,

¹⁰ C4L hypothetical protein [Vaccinia virus]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3707639> (дата обращения: 11.04.2024).

¹¹ Располагаются примерно между 60° и 70° с.ш. на территориях, занятых boreальными лесами (тайга) – крупнейшим биомом на Земле.

относят зоонозные резервуары. Среди причин их проникновения к людям называют урбанизацию, вырубки лесов, нарушения экосистем, изменения климата, миграцию, перенаселение городов, туризм и мировую торговлю [12]. До пандемии COVID-19 такая угроза считалась локальной, контролируемой, не способной выйти за пределы отдельного региона. Пандемия COVID-19 поколебала эти представления, показав, что возможности природы по поддержанию патогенов с пандемическим потенциалом далеко не изучены¹².

Судя по увеличению количества публикаций, частота клинически проявляющейся OPXV-инфекции за последние 20 лет резко возросла. Помимо выше указанных причин [12], этот рост заболеваемости связан с увеличением количества людей, которые не были вакцинированы против натуральной оспы и поэтому не имеют специфического иммунитета против ортопоксвирусов [14, 15]. Другая причина – расширение иммунодефицитного «окна» для их проникновения в человеческое общество [24]. Возможна еще одна – происходит «разогрев» природных очагов OPXV. В реальности о таких очагах известно мало – разрозненные данные об инфицированных грызунах, либо о грызунах с антителами к OPXV. Вне поля зрения эпидемиологов находятся такие первичные резервуары, как почвенные и водные простейшие организмы (*Protozoa*) – эволюционные предшественники макрофагов позвоночных, в которых опасные патогены могут существовать неограниченно долго. В научном сообществе по OPXV существует только одна слепая уверенность – натуральную оспу человечество победило с помощью вакцинации, и она больше не вернется.

По данным, обобщенным в работе A.L. MacNeill [15], антитела против OPXV, выявляемые серологическими методами, существуют у одной трети исследуемых животных в отдельных регионах Южной Америки, Европы и Африки. Таким образом, риск проникновения различных OPXV в популяции людей существует постоянно.

В отсутствие глобального селективного давления на ортопокиры со стороны противооспенной вакцинации, наблюдается полиморфизация вирусов семейства, способных инфицировать человека [16]. Такой полиморфизацией подвержен вирус оспы коров.

В Бразилии уже циркулируют две генетически различные группы VACV. Возможно их больше. Этот вирус больше не обнаруживается у коров, его резервуаром являются дикие грызуны, источник их заражения неизвестен. Клиника болезни тяжелая даже у иммунокомпетентных людей. Инкубационный период заболевания VACV составляет примерно 3–5 сут. Люди, инфицированные VACV, испытывают лихорадку, головную боль и недомогание в течение 2–5 сут. Поражения сначала наблюдаются на кистях и руках. Первоначально они выглядят как папулы, которые развиваются в пустулы, затем примерно в течение 12 сут некротизируются и изъязвляются. Симптомы болезни обычно делятся 4 нед., сопровождаются лимфаденопатией. Вторичные бактериальные инфекции могут продлить течение болезни [17]. У иммунодефицитных пациентов болезнь приобретает генерализованный характер, выздоровление происходит только после компенсации основного заболевания [18].

Оспа буйволов (BPXV) – болезнь, поражающая домашних буйволов, крупный рогатый скот и людей. Возникает в виде спорадических и эпидемических вспышек в небольших деревнях и коммерческих фермах по всей Индии. Основной путь передачи BPXV – прямой контакт с инфицированными животными и продуктами животноводства. Возможна передача инфекции и от человека к животному. В период 1992–2009 гг., во время вспышек оспы среди буйволов в штате Махараштра, у ухаживающих за ними людей наблюдали несколько сот случаев инфекции у детей и взрослых. Клинические проявления болезни включали диссеминированные осенние поражения на лице, руках, ногах, во рту на фоне общих симптомов: лихорадка, недомогание и лимфаденопатия [19, 20].

Вирус Ахмета (*Akhmeta virus*) – выделен в 2013 г. в Грузии из поражений кожи двух грузинских дояров с симптомами лихорадки, струпами и отеком кожи рук, лимфаденопатией. Генетически он отличается от известных ортопоксвирусов, поэтому его выделили в отдельный вид. У коров, грызунов и землероек в этом районе были обнаружены положительные результаты на наличие антител против OPXV [21].

Верблюжья оспа (CMRV) – ортопоксвирусная инфекция, специфичная только для

¹² В этой связи показательно появление SARS-CoV-2 – вызвавшего пандемию COVID-19. На момент ее начала в 2019 г. были известны двадцать два патогенных для людей и животных вида, представителя семейства *Coronaviridae*, из них шесть обладали способностью вызывать инфекционный процесс в дыхательных путях человека. Два (SARS-CoV и MERS-CoV) обладали эпидемическим потенциалом, однако пандемии они не вызвали и постепенно исчезли из человеческих популяций [13].

Супотницкий М.В.
Supotnitskiy M.V.

верблюдов. Вызывается вирусом верблюжьей оспы. Он передается людям при прямом контакте с осенными поражениями на коже верблюдов или через фомиты. У людей, заразившихся верблюжьей оспой наблюдались лихорадка и оспоподобные поражения, локализованные на руках. Поражения начинались с приподнятых везикул, которые лопались в течение 7–10 сут, оставляя глубокие язвы, покрывающиеся коркой. Затем струпами, которые отслаивались и оставляли шрамы к третьей неделе болезни. Верблюжья оспа филогенетически тесно связана с вирусом натуральной оспы [22]. По мнению Л.Ф. Стуббы с соавт. [23] нельзя исключить, что мутация в небольшом фрагменте генома CMPV приведет к замене относительно безопасного для людей вируса на эпидемически опасный.

Обобщение симптомов поксвирусных болезней позволило J.H. Diaz [24] сформулировать определение *ортопоксвирусного синдрома*. Он характеризуется начальным прудромальным периодом в виде лихорадки, недомоганием, головной боли, миалгии и, реже, тошноты и рвоты. Прогрессирующая стадия болезни начинается после инкубационного периода продолжительностью от 10 до 14 сут с последовательным формированием на фоне лимфоаденопатии пятен, папул, везикул, пустул, язв, сухих корок и депигментированных рубцов – в течение недель или месяцев. Неврологические осложнения включают изменения психического статуса, энцефалит, поперечный миелит, нейрогенный мочевой пузырь¹³ и кишечник, а также орбитальную инфекцию с офтальмоплегией. Наиболее вероятно, что первыми таких пациентов будут выявлять врачи-дерматологи.

При наличии этого синдрома у пациента врачом должна быть заподозрена ортопоксвирусная инфекция, более точный диагноз можно поставить только после специального исследования. Далее врач должен действовать в соответствии с «Методическими рекомендациями МР 3.1.0291-22»¹⁴, т.е. пациент должен быть изолирован в боксированную палату инфекционного отделения, организован отбор проб клинического материала для проведения лабораторных исследований по уточнению этиологии болезни и немедленно информация о таком пациенте должна быть направлена в Роспотребнадзор.

Но это только часть проблемы, исходящей от «появляющихся» патогенов. Другую ее часть – имитационную, можно показать на примере недавно продемонстрировавшего пандемический потенциал, ортопоксвируса – вируса оспы обезьян (MPXV).

В 2022 г. за пределами эндемических территорий в Африке произошла крупная пандемия оспы обезьян. Ее необычность состояла в следующем:

- ее ждали, она была предсказана в марте 2021 г. на Мюнхенской конференции по безопасности¹⁵, и позже, в рамках учения The Nuclear Threat Initiative¹⁶;

- пандемия началась в «установленные сроки» в мае 2022 г. и была вызвана кладой MPXV, не имевшей шансов на самостоятельное распространение.

Если в предыдущие годы количество случаев оспы обезьян среди людей исчислялось десятками в эндемичных районах Африки, и единицами за ее пределами, то к 21 мая 2024 г. зафиксировано уже 91,3 тыс. заболевших, и в основном за пределами Африки, в регионах,

¹³ Нейрогенный мочевой пузырь или нейрогенная дисфункция мочевого пузыря – собирательное понятие, объединяющее большую группу нарушений резервуарной и эвакуаторной функций мочевого пузыря.

¹⁴ Методические рекомендации МР 3.1.0291-22. «Рекомендации по организации противоэпидемических мероприятий в медицинских организациях при выявлении больных оспой обезьян (лиц с подозрением на заболевание)» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 3 июня 2022 г.). URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/404724495/> (дата обращения: 04.05.2024).

¹⁵ Strengthening Global Systems to Prevent and Respond to High Consequence Biological Threats. Results from the 2021 Tabletop Exercise Conducted in Partnership with the Munich Security Conference. NTI:bio. 2021 November.

¹⁶ В ноябре 2021 г. The Nuclear Threat Initiative (Инициатива по ядерной угрозе) провела учение, к которому присоединились участники Мюнхенской конференции по безопасности. По сценарию произошла смертельная глобальная пандемия оспы обезьян в вымышленной стране Бриния. Эпидемия началась 15 мая 2022 г. (!). «Первоначальная вспышка была вызвана террористической атакой с использованием патогена, сконструированного в лаборатории с неадекватными мерами биобезопасности и слабым надзором». Вот только некоторые прогнозируемые цифры жертв: к 10 января 2023 г. вирус распространился в 83 странах. В мире зарегистрировано 70 млн случаев, и 1,3 млн человек умерли. Исследователи выяснили, что вирус был сконструирован так, чтобы быть устойчивым к вакцинам. К декабрю 2023 г. число случаев достигло 3,2 млрд, и 271 млн человек умерли (Docs From 2021 Int'l Security Exercise Showed Monkeypox Bio Attack on May 15, 2022. URL:https://translated.turropages.org/proxy_u/en-ru.ru.1c3242af-66716356-75fc7da3-74722d776562/https://www.westernjournal.com/docs-2021-intl-security-exercise-showed-monkeypox-bio-attack-may-15-2022/; дата обращения: 21.05.2024).

где ее никогда не было (в США – 32,8 тыс. заболевших)¹⁷.

Заразность инфекционных больного характеризуется величиной индекса репродукции возбудителя болезни (R_0)¹⁸. Для MPXV клады долины реки Конго (CB) она оценивается в диапазоне 0,6–1,0. Для MPXV клады Западной Африки (WA) предполагается, что R_0 значительно ниже, чем у клады CB. Верхний предел R_0 , равный 1,0, для клады CB указывает на то, что вирус способен распространяться в человеческой популяции локальными вспышками [25]. Но эпидемию вызвал MPXV клады WA [26]. Основную роль в распространения вируса сыграл легко организуемый социальный фактор – эпидемия началась в результате гомосексуальных контактов в ходе ежегодного гей-мероприятия на Pride Maspalomas¹⁹, проходившего на Канарских островах с 5 по 15 мая 2022 г., где присутствовало не менее 80 тыс. человек. Затем с этими же участниками последовали аналогичные мероприятия в Бельгии и Испании. Оспу обезьян инфекционисты сразу не распознали из-за нехарактерной локализации оспенных пустул²⁰. В целом ситуация с распространением оспы обезьян клады WA выглядела случайностью – прогноз и гей-мероприятие просто совпали.

На Мюнхенской конференции по безопасности прозвучал еще один прогноз – в январе 2023 г. распространение должен получить другой MPXV, устойчивый к защитному действию вакцин и с высокой летальностью среди заболевших²¹. В 2023 г. прогноз не сбылся. Но в начале июня 2024 г. стало

известно об еще одном «совпадении». Были раскрыты планы Национального института аллергии и инфекционных болезней США (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID) по созданию на основе MPXV клады WA, вируса, обладающего высокой вирулентностью и способного преодолевать постvakцинальный иммунитет²², т.е. MPXV с «усиленными функциями»²³. Такие работы несанкционированно велись в NIAID с 2015 г. под руководством его главы, Энтона Фаучи (англ. Anthony Stephen Fauci). Одновременно аналогичные эксперименты проводились с коронавирусами, выделенными от диких животных и не вызывающими болезни у людей. На их основе был получен не поддающийся контролю вакцинацией химерный коронавирус SHC014-MA15, способный к репликации в дыхательных путях человека и животных, имеющих рецептор ACE2 или его ортологи [27].

В октябре 2022 г. группа ученых из этого института планировала вставить гены из более опасного для людей MPXV CB в MPXV WA. Предполагалось, что летальность людей, зараженных «усиленным» MPXV WA, доходила бы до 15 %, а R_0 до 2,4²⁴. Следовательно, один человек, заболевший новой оспой обезьян, мог бы заразить более двух человек, т.е. у MPXV WA появился бы эпидемический потенциал. Разумеется, ученые NIAID заявили, что их эксперименты нацелены на разработку эффективных лекарственных средств и вакцин²⁵. В настоящее время расследованием этих экспериментов занимается Комитета по энергетике и торговле Палаты представа-

¹⁷ Our WorldIn Data. Mpoх. URL: <https://ourworldindata.org/mpox> (дата обращения: 21.05.2024).

¹⁸ Индекс репродукции вируса (basic reproduction number, R_0) – равен среднему количеству новых случаев болезни в неиммунной популяции, источником которых является один человек.

¹⁹ Гордость Маспаламаса – крупнейший туристический комплекс на Канарских островах.

²⁰ Расследование связи обезьяньей оспы с вечеринками на Канарских островах. URL: <https://www.theportugalnews.com/ru/ru-news/2022-05-23/monkeypox-investigation-into-link-to-parties-in-canary-islands/67306> (дата обращения: 24.05.2024).

Monkeypox likely spread by sex at two raves in Europe, expert says. The Associated Press. 2022. May 23. URL: <https://www.nbcnews.com/health/health-news/monkeypox-likely-spread-sex-two-raves-europe-expert-says-rcna30055> (дата обращения: 24.05.2024).

²¹ Там же.

²² Dr Anthony Fauci's department hid plans to create mutant monkeypox virus that 'could've started pandemic,' bombshell Congress report finds. Daily Mail. Online. 2024. 12 June. URL: <https://www.dailymail.co.uk/health/article-13519709/Dr-Anthony-Faucis-department-hid-plans-create-mutant-monkeypox-virus-couldve-started-pandemic-bombshell-Congress-report-finds.html> (дата обращения: 13.06.2024).

²³ Под «усищением функций» (англ. Gain-of-Function) понимается приданье возбудителю опасной инфекции нового свойства, делающего его более опасным для человека или животного [28].

²⁴ Я не исключаю, что речь шла не только о «пересадке» генов, но и об усилении их экспрессии, в частности тех, которые отвечают за репликацию MPXV WA и его противодействие иммунной системе человека.

²⁵ По сути, это такие же эксперименты, которые они декларировали на протяжении 20 лет работы с коронавирусами [27, 30]. Когда началась пандемия COVID-19, оказалось, что нет ни вакцин, ни эффективных схем лечения.

Супотницкий М.В.
Supotnitskiy M.V.

вителей Конгресса США. Такие же эксперименты можно провести и с АКРВ, и с любым другим патогеном.

Неудачный опыт пандемии COVID-19 показывает, что вспышки инфекционных болезней среди людей, вызванные редко встречающимися патогенами, но являющимися представителями каких-то больших зоонозных семейств, целесообразно воспринимать как сигналы об опасных процессах во вмещающих их экосистемах, способных вывести патоген с пандемическим потенциалом за их пределы. Появление случаев оспы Аляски – следствие таких процессов в семействе OPXV, сигнал о возможном появлении других ортопоксвирусов, передающихся от животных к человеку с последующим распространением среди населения. Филогенетическое положение АКРВ говорит о том, что он может иметь природные резервуары не только на Аляске, но и в зоне бореальных лесов России от Камчатки до Карелии. Поэтому вспышки кожных болезней в этих регионах, сопровождающихся поксвирусным синдромом, должны сопровождаться изоляцией заболевших и тщательным эпидемиологическим расследованием.

Анализ контекста пандемии оспы обезьян, начавшейся в 2022 г., показывает, что при современном развитии технологий обратной генетики и синтетической биологии

любой новый патоген из семейства OPXV, может рассматриваться как источник генов для модификации в направлении «усиления функций» других патогенов, или как объект таких экспериментов. Подобные эксперименты возможны в десятках государств как под государственным контролем, так и вне его, координироваться транснациональными структурами или отдельными исследовательскими группами. Глобальное распространение оспы обезьян клады WA показывает, что технологии социальной инженерии в сочетании с глобальной пропагандой позволяют организовывать пандемии с помощью патогенов, считавшихся неспособными к такому распространению. Психологически страх перед самим термином «оспа», основан на исторической памяти населения планеты, когда натуральная оспа постоянно присутствовала среди людей и «забирала» миллионы жизней ежегодно. Он открывает большие возможности манипуляциям этим страхом и неважно, будет это оспа Аляски, обезьян или другая. В разработке противоэпидемических мер и реагирования на эпидемии, вызванные OPXV, необходимо учитывать замечание бывшего советника французских президентов, Жака Аттали (фр. Jacques Attali), что «страх перед эпидемиями, может заложить основы реального мирового правительства гораздо быстрее, чем это было бы возможно только по экономическим причинам»²⁶.

²⁶ Цитируется по работе П. Шрайера [29].

Список источников/References

1. Schrick L, Tausch SH, Dabrowski PW, Damaso CR, Esparza J, Nitsche A. An Early American Smallpox Vaccine Based on Horsepox. *N Engl J Med.* 2017;377(15):1491–92.
<https://doi.org/10.1056/NEJMcl1707600>
2. Стобба ЛФ, Петров АА, Мельников СА, Чухраля ОВ, Черникова НК, Борисевич СВ. Эпидемиология оспы лошадей. Новые аспекты. *Вестник войск РХБ защиты.* 2024;8(2):135–45. EDN:uvyboa.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-135-145>
3. Stovba LF, Petrov AA, Melnikov SA, Chukhralya OV, Chernikova NK, Borisevich SV. Epidemiology of Horsepox. The New Aspects. *Journal of NBC Protection Corps.* 2024;8(2):135–45. EDN:uvyboa.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-135-145>
4. Springer YP, Hsu CH, Werle ZR, Olson LE, Cooper MP, Castrodale LJ, et al. Novel Orthopoxvirus Infection in an Alaska Resident. *Clin Infect Dis.* 2017;64(12):1737–41.
<https://doi.org/10.1093/cid/cix219>
5. Douglass N. Borealpox (Alaskapox) virus: will there be more emerging zoonotic orthopoxviruses? *Lancet Microbe.* 2024;S2666-5247(24)00106-X. Epub ahead of print.
[https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(24\)00106-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(24)00106-X)
6. Parker ER. Emergence of Alaskapox infection: what dermatologists need to know. *J Am Acad Dermatol.* 2024;S0190-9622.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2024.03.026>
7. Dyer O. Alaskapox: first human death from zoonotic virus is announced. *BMJ.* 2024;384:q415.
<https://doi.org/10.1136/bmj.q415>

7. Liu L, Cooper T, Howley PM, Hayball JD. From crescent to mature virion: vaccinia virus assembly and maturation. *Viruses*. 2014;6(10):3787–808.
<https://doi.org/10.3390/v6103787>
8. Branda F, Romano C, Ciccozzi M, Scarpa F. The emergence of Alaskapox: exploring an unprecedented viral threat and implications for public health. *Infect Dis*. 2024;56(6):496–8.
<https://doi.org/10.1080/23744235.2024.2332463>
9. Hutchinson D, Kunasekaran M. Emergence of novel orthopox virus in Alaska, USA. *Glob Biosecur*. 2022;4:10.
<https://doi.org/10.31646/gbio.143>
10. Gigante CM, Gao J, Tang S, McCollum AM, Wilkins K, Reynolds MG, et al. Genome of Alaskapox Virus. A Novel Orthopoxvirus Isolated from Alaska. *Viruses*. 2019;11(8):708.
<https://doi.org/10.3390/v11080708>
11. Fenner F. Mousepox (infectious ectromelia): past, present, and future. *Lab Anim Sci*. 1981;31:553–59.
12. Choi YK. Emerging and re-emerging fatal viral diseases. *Exp Mol Med*. 2021;53:711–12.
<https://doi.org/10.1038/s12276-021-00608-9>
13. Ghai RR, Carpenter A, Liew AY, Martin KB, Herring MK, Gerber SI, et al. Animal Reservoirs and Hosts for Emerging Alphacoronaviruses and Betacoronaviruses. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(4):1015–22.
<https://doi.org/10.3201/eid2704.203945>
14. Nalca A, Rimoin AW, Bavari S, Whitehouse C.A. Reemergence of monkeypox: prevalence, diagnostics, and countermeasures. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1765–71.
<https://doi.org/10.1086/498155>
15. MacNeill AL. Comparative Pathology of Zoonotic Orthopoxviruses. *Pathogens*. 2022;11(8):892.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11080892>
16. Babkin IV, Babkina IN, Tikunova NV. An Update of Orthopoxvirus Molecular Evolution. *Viruses*. 2022;14(2):388.
<https://doi.org/10.3390/v14020388>
17. de Souza Trindade G, Drumond BP, Guedes MI, Leite JA, Mota BE, Campos MA, et al. Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *J Clin Microbiol*. 2007;45(4):1370–2.
<https://doi.org/10.1128/jcm.00920-06>
18. Laiton-Donato K, Ávila-Robayo P, Páez-Martinez A, Benjumea-Nieto P, Usme-Ciro JA, Pinzón-Nariño N, et al. Progressive Vaccinia Acquired through Zoonotic Transmission in a Patient with HIV/AIDS, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(3):601–5.
<https://doi.org/10.3201/eid2603.191365>
19. Gurav YK, Raut CG, Yadav PD, Tandale BV, Sivaram A, Pore MD, et al. Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. *Prev Vet Med*. 2011;100(3–4):242–7.
<https://doi.org/10.1016/j.prevvetmed.2011.03.008>
20. Kolhapure RM, Deolankar RP, Tupe CD, Raut CG, Basu A, Dama BM, et al. Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra State during 1992–1996. *Indian J Med Res*. 1997;106:441–6. PMID: 9415737.
21. Vora NM, Li Y, Geleishvili M, Emerson GL, Khmaladze E, Maghlakelidze G, et al. Human infection with a zoonotic orthopoxvirus in the country of Georgia. *N Engl J Med*. 2015;372(13):1223–30.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1407647>
22. Bera BC, Shanmugasundaram K, Barua S, Venkatesan G, Virmani N, Riyesh T, et al. Zoonotic cases of camelpox infection in India. *Vet Microbiol*. 2011;152(1–2):29–38.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.010>
23. Стovба ЛФ, Лебедев ВН, Чухраля ОВ, Хмелев АЛ, Кузнецов СЛ, Борисевич С.В. Эпидемиология оспы верблюдов: новые аспекты. *Вестник войск РХБ защиты*. 2023;7(3):248–60. EDN: kuwcbv.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-7-3-248-260>
- Stovba LF, Lebedev VN, Chukhralia OV, Khmelyev AL, Kuznetsov SL, Borisevich SV. Epidemiology of Camelpox: New Aspects. *Journal of NBC Protection Corps*. 2023;7(3):248–60. EDN:kuwcbv (in Russian).
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-7-3-248-260>
24. Diaz JH. The Disease Ecology, Epidemiology, Clinical Manifestations, Management, Prevention, and Control of Increasing Human Infections with Animal Orthopoxviruses. *Wilderness Environ Med*. 2021;32(4):528–36.
<https://doi.org/10.1016/j.wem.2021.08.003>
25. Rimoin AW, Mulembakani PM, Johnston SC, et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(37):16262–7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107>

Супотницкий М.В.
Supotnitskiy M.V.

26. Alakunle E, Moens U, Nchinda G, Okeke MI. Monkeypox Virus in Nigeria: Infection Biology, Epidemiology, and Evolution. *Viruses*. 2020;12(11):1257. <https://doi.org/10.3390/v12111257>
27. Menachery VD, Yount BL Jr, Debbink K, Agnihothram S, Gralinski LE, Plante JA, et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat Med*. 2015;21(12):1508–13. <https://doi.org/10.1038/nm.3985>
28. Fleming RM. Is COVID-19 a bioweapon? *A scientific and forensic investigation*. New York: Skyhorse Publ; 2021.
29. Шрайер П. Хроника объявленного кризиса. Как вирус смог изменить мир. М.: «Канон-Плюс»; 2022. Schreyer P. Chronik einer angekündigten Krise. Wie ein Virus unsere Welt verändern konnte. Berlin: OVALMedia; 2020. ISBN 978-5-88373-729-8.
30. Супотницкий МВ. Современные подходы в области молекулярной генетики вирусов при изучении представителей семейства Coronaviridae. *Вестник войск РХБ защиты*. 2021;5(3):217–35. EDN:VWSIBB <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-1-3-217-235>
- Supotnitskiy MV. Modern Approaches to Molecular Genetics of Viruses in the Study of the Members of the Family Coronaviridae. *Journal of NBC Protection Corps*. 2021;5(3):217–35. EDN:VWSIBB (in Russian) <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-3-217-235>

Вклад автора / Author contribution

Разработка концепции статьи; сбор, анализ и систематизация научной литературы; написание статьи / Elaboration of the concept of the paper; collection, analysis, and systematization of scientific literature; writing and edition of paper.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторе/ Author

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации, 111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19.

Супотницкий Михаил Васильевич. Главный специалист, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3193-1032>

Контактная информация автора: 27nc_l@mil.ru

27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation.

Mikhail V. Supotnitskiy. Senior Researcher. Chief Specialist. Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3193-1032>

Contact information for author: Mikhail V. Supotnitskiy; 27nc_l@mil.ru



ОБЗОР | REVIEW

УДК 578.821.51:616.912-085.371

<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-8-2-135-145><https://elibrary.ru/uwyboa>

(cc) BY 4.0

Эпидемиология оспы лошадей. Новые аспекты

Л.Ф. Стовба, А.А. Петров, С.А. Мельников, О.В. Чухраля, Н.К. Черникова,
С.В. Борисевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«48 Центральный научно-исследовательский институт
Министерства обороны Российской Федерации,
141306, Российская Федерация, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11
✉ e-mail: 48cni@mail.ru

В последние 10 лет интерес ученых к возбудителю оспы лошадей резко возрос в связи с получением его химерной копии и дискуссией, был ли он использован при создании ранних оспенных вакцин и опасности технологий, позволяющих восстанавливать вымершие возбудители опасных инфекций.

Цель работы – обобщение материалов по современным исследованиям вируса оспы лошадей.

Источниковая база исследования – англоязычная научная литература, доступная через сеть Интернет.

Метод исследования – анализ научных источников по оспе лошадей от общего к частному. Рассматривали ареал распространения вируса, его эпидемиологическую опасность, филогенетическое родство, данные по секвенированию генома вируса оспы лошадей и вероятность использования его при создании первых противооспенных вакцин, а также получение его химерной копии, на основе которой создана новая противооспенная вакцина – TNX-801.

Результаты и обсуждение. Вирус оспы лошадей относится к семейству поксвирусов, роду ортопоксвирусов. Классическая оспа лошадей ранее зарегистрирована только в Европе (Франция), в Монголии и в Кении. Определена полная нуклеотидная последовательность генома вируса оспы лошадей штамма MNR-76, выделенного в Монголии. Помимо генов, характерных для всех ортопоксвирусов, он включает интактные гены, специфические только для этого вируса, гомологи которых фрагментированы в геноме других ортопоксвирусов. На основе консервативной центральной области генома и части более вариабельных терминальных областей выполнен филогенетический анализ ряда ортопоксвирусов и построено филогенетическое древо. Полученные данные свидетельствуют, что вирус оспы лошадей теснее всего связан со штаммами вируса вакцины и вируса оспы кроликов. Хотя оспа лошадей в настоящее время считается исчезнувшей, возможно, ее возбудитель сохраняется в неизвестных резервуарах. Данные по секвенированию генома вируса оспы лошадей, штамм MNR-76 дают основание предполагать, что вирус оспы лошадей мог служить основой первых противооспенных вакцин. Методом синтетической биологии получена химерная копия вируса оспы лошадей, на основе которой создана новая противооспенная вакцина – TNX-801. На ее основе сконструирована рекомбинантная вакцина против SARS-CoV-2. Восстановление «вымерших вирусов» методами синтетической биологии привело к интенсивным дебатам о пользе и риске подобных исследований.

Заключение. Нельзя исключать, что использование современных генно-инженерных технологий может привести не только к разработке эффективных вакцинных препаратов, но и к получению новых ортопоксвирусов, патогенных для человека и животных, или к реинтродукции натуральной оспы, что представляет особую опасность в условиях практического отсутствия противооспенного иммунитета у населения и международного контроля над экспериментами по синтетической биологии опасных патогенов.

Ключевые слова: вирус оспы лошадей; ортопоксвирусы; оспа лошадей; противооспенная вакцина; синтетическая биология; химерная копия

Для цитирования: Стовба Л.Ф., Петров А.А., Мельников С.А., Чухраля О.В., Черникова Н.К., Борисевич С.В. Эпидемиология оспы лошадей. Новые аспекты. Вестник войск РХБ защиты. 2024;8(2):135–145. EDN:uwyboa. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-135-145>

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Стовба Л.Ф., Петров А.А., Мельников С.А., Чухраля О.В., Черникова Н.К., Борисевич С.В.
Stovba L.F., Petrov A.A., Melnikov S.A., Chukhralya O.V., Chernikova N.K., Borisevich S.V.

Финансирование: Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Поступила 05.06.2024. После доработки 13.06.2024 г. Принята к публикации 27.06.2024.

Epidemiology of Horsepox. The New Aspects

**Lyudmila F. Stovba, Aleksandr A. Petrov, Sergey A. Melnikov, Oleg V. Chukhralia,
Natalya K. Chernikova, Sergey V. Borisevich✉**

*48 Central Scientific Research Institute
of the Ministry of Defence of the Russian Federation,
Oktyabrskaya Street, 11, Sergiev Posad 141306, Russian Federation
✉ e-mail: 48cnii_1@mil.ru*

In the last 10 years, scientists' interest in the horsepox pathogen has increased sharply due to the obtaining of its chimeric copy and the discussion of whether it was used to create early smallpox vaccines and the dangers of technologies that allow the restoration of extinct pathogens of dangerous infections.

The aim of the work is to summarize the materials on modern studies of the horsepox virus.

The source base of the study is English-language scientific literature available via the Internet.

The research method is an analysis of scientific sources on horsepox from the general to the specific. We considered the area of distribution of the virus, its epidemiological danger, phylogenetic relationship, data on the sequencing of the horsepox virus genome and the likelihood of its use in the creation of the first vaccines, as well as obtaining its chimeric copy, on the basis of which a new smallpox vaccine was created – TNX-801.

Results and discussion. The horsepox virus belongs to the poxvirus family, the orthopoxvirus genus. Classical horsepox has previously been reported only in Europe (France), Mongolia, and Kenya. The complete nucleotide sequence of the horsepox virus genome MNR-76 isolated in Mongolia has been determined. In addition to genes common to all orthopoxviruses, it includes intact genes specific only to this virus, the homologues of which are fragmented in the genome of other orthopoxviruses. Phylogenetic analysis of a number of orthopoxviruses was performed and a phylogenetic tree was constructed based on the conserved central region of the genome and some of the more variable terminal regions. The data obtained indicate that horsepox virus is most closely related to vaccinia virus and rabbitpox virus strains. Although horsepox is currently considered extinct, its pathogen may persist in unknown reservoirs. The data on the sequencing of the horsepox virus genome, strain MNR-76, suggest that horsepox virus could have served as the basis for the first smallpox vaccines. A chimeric copy of the horsepox virus was obtained using synthetic biology, which was used to create a new smallpox vaccine, TNX-801. On its basis, a recombinant vaccine against SARS-CoV-2 was constructed. The restoration of "extinct viruses" using synthetic biology methods has led to intense debates about the benefits and risks of such research.

Conclusion. It cannot be ruled out that the use of modern genetic engineering technologies may lead not only to the development of effective vaccines, but also to the production of new orthopoxviruses pathogenic for humans and animals, or to the reintroduction of smallpox, which is especially dangerous in the context of the virtual absence of smallpox immunity in the population and international control over experiments in the synthetic biology of dangerous pathogens.

Keywords: chimerical virus; horsepox virus; Orthopoxviruses; recombinant vaccine; reintroduction of smallpox; scHPXV; smallpox vaccines; strain MNR-76; synthetic biology

For citation: Stovba L.F., Petrov A.A., Melnikov S.A., Chukhralya O.V., Chernikova N.K., Borisevich S.V. Epidemiology of Horsepox. The New Aspects. Journal of NBC Protection Corps. 2024;8(2):135–145. EDN:uvyboa.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-135-145>

Financial disclosure: The authors have no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Funding: The study had no sponsorship.

Received June 05, 2024. Revised June 13, 2024. Accepted June 27, 2024

В последние 10 лет интерес ученых к возбудителю оспы лошадей резко возрос в связи с синтезом его химерной копии и дискуссией, был ли он использован при создании ранних осипенных вакцин и опасности технологий, позволяющих восстанавливать вымершие виды возбудителей опасных инфекций.

Цель работы – обобщение материалов по современным исследованиям вируса оспы лошадей.

Источниковая база исследования – англоязычная научная литература, доступная через сеть Интернет.

Метод исследования – анализ научных источников по оспе лошадей от общего к частному.

Рассматривали ареал распространения вируса, его свойства, эпидемиологическую опасность, филогенетическое родство, данные по секвенированию генома вируса оспы лошадей и вероятность использования его при создании первых вакцин, а также получение его химерной копии, на основе которой создана новая противоосипенная вакцина – TNX-801.

Распространение и свойства возбудителя оспы лошадей. Возбудителем оспы лошадей является вирус оспы лошадей, который относится к семейству поксвирусов (Poxviridae), роду ортопоксвирусов (Orthopoxviridae) [1]. Он образует осипины на хорион-аллантоисной оболочке (ХАО) развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ), хорошо репродуцируется во многих клеточных линиях, включая клетки млекопитающих. Классическая оспа лошадей ранее была зафиксирована только в Европе во Франции: в Реймсе близ Тулусы в 1860 г., в Мезон-Альфор, нынешнем пригороде Парижа, в 1863 г., в Тулусе в 1880 г., в Сен-Жанде-Недепартамента Верхняя Луара в 1887 г. [2]. Помимо Европы, к началу XX века вспышки этого заболевания фиксировались в Монголии (в провинции Хентил – в 1976 г., в провинциях Дорнговь, Дундговь и Кхентил – в 1980 г.) [3, 4] и в Кении – в 1934 г. [5].

Оспа лошадей протекает в двух клинических формах: щечная форма, характеризующаяся доброкачественными поражениями на морде и во рту, называемая пустулезным контагиозным стоматитом, и генерализованная – высоко контагиозная папулоузелковая форма, называемая вирусным папулезным дерматитом (*рисунок 1*) [6–8].



Рисунок 1 – Папулезная сыпь на коже лошади, инфицированной вирусом оспы лошадей [7]

Клинические симптомы, вызываемые вирусом оспы лошадей, схожи с таковыми, вызываемыми другими осипенными вирусами: лошадиным контагиозным моллюском и болезнью Уасингши [9].

Строение генома и филогенетический анализ вируса оспы лошадей. Определена полная нуклеотидная последовательность генома единственного штамма вируса оспы лошадей – MNR-76, выделенного в Монголии от лошади, больной пустулезным дерматитом [10]. Геном состоит из 212633 пар нуклеотидов, содержит 69 % (A+T) нуклеотидных пар и организационно подобен другим ортопоксвирусам. Он содержит центральную часть, которая определяет основные репродуктивные функции, такие как вирусную транскрипцию и модификацию, репликацию ДНК и сборку вирионов. По концам генома расположены инвертированные терминальные повторы, определяющие вирусную вирулентность, круг хозяев, модификацию хозяйского иммунного ответа. Однако помимо генов, характерных для всех ортопоксвирусов, в геноме вируса оспы лошадей имеются интактные гены, специфические только для этого возбудителя, гомологи которых фрагментированы в геномах других ортопоксвирусов. Параллельно с этим наблюдается уникальная фрагментация нескольких генов, которые интактны во всех или у большинства ортопоксвирусов. На основе высоко консервативной центральной области генома и части более вариабельных терминальных

Стовба Л.Ф., Петров А.А., Мельников С.А., Чухраля О.В., Черникова Н.К., Борисевич С.В.
Stovba L.F., Petrov A.A., Melnikov S.A., Chukhralia O.V., Chernikova N.K., Borisevich S.V.

областей был выполнен филогенетический анализ ряда ортопоксвирусов и построено филогенетическое древо, представленное на рисунке 2.

Полученные данные свидетельствовали, что вирус оспы лошадей теснее всего связан со штаммами вируса вакцины и вируса оспы кроликов, по сравнению с другими ортопоксвирусами. Эти выводы согласуются с ранее полученными результатами, что вирус оспы лошадей – это вакциноподобный вирус [11], а вирус вакцины и вирус оспы лошадей имеют общего предшественника [12]. Однако, несмотря на тесную взаимосвязь, филогенетически вирус оспы лошадей дистанцируется от штаммов вируса вакцины и не является их прямым предком. Следовательно, вирус оспы лошадей, штамм MNR-76, представляет собой новый, циркулирующий в природе возбудитель, а лошади являлись для него промежуточным хозяином.

О прямой передаче человеку оспы лошадей имеется сообщение в Великобритании. Кроме того, время от времени, начиная с работы Дженнера и Лоя, сообщалось о других случаях прямой передачи болезни человеку от лошади [13]. Однако диагностика возбудителя не проводилась ни в одном из случаев. Применение полимеразной цепной реакции с праймерами, рассчитанными на ген телец

включения А-типа, позволяет выявлять род возбудителя, поскольку эти тельца-включения имеют все ортопоксвирусы. И хотя при этом образуются амплификаты разного размера, рекомендуется дополнять эту реакцию другим методом, например, рестриктным анализом, результаты которого позволяют определять только вирус оспы лошадей, как в случае с вирусом оспы верблюдов [14, 15].

В целом, о свойствах вируса оспы лошадей известно немного, поскольку вызываемое им заболевание не было распространенным и не наносило большого вреда народному хозяйству. Нет также прямых доказательств передачи его человеку. Оспа лошадей начала исчезать в конце XIX века и сейчас считается исчезнувшей, хотя, возможно, возбудитель сохраняется в неизвестных резервуарах [4].

Вирус оспы лошадей как основа первых противооспенных вакцин. Однако в последнее время интерес ученых к вирусу оспы лошадей резко возрос. Это связано с дискуссией о том, на основе какого именно вируса были созданы первые противооспенные вакцины: на основе вируса оспы коров, вируса оспы лошадей или вируса вакцины. В 1798 г. был опубликован труд Дженнера «Inquiry» («Исследование»), в котором предполагалось, что противооспенная вакцина основана на вирусе оспы коров. Это мнение просущество-

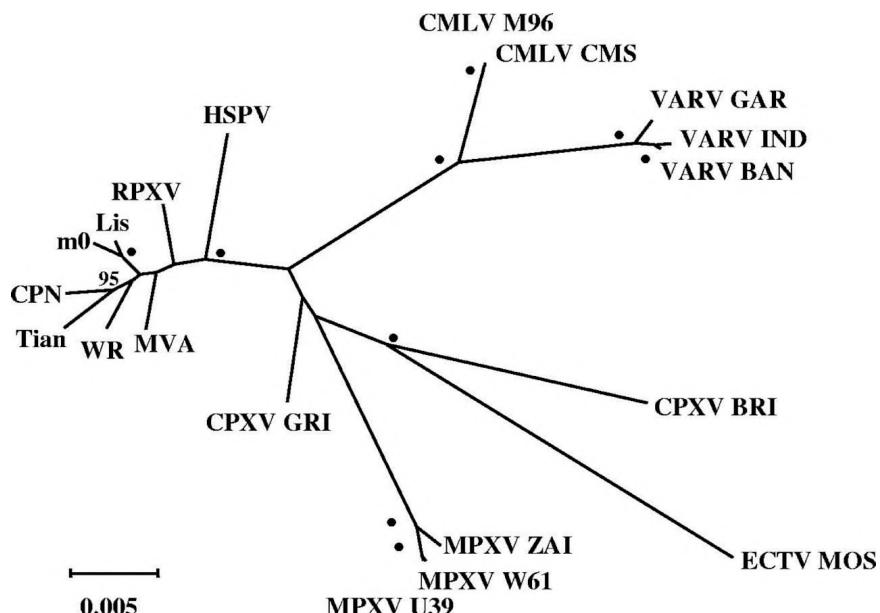


Рисунок 2 – Филогенетическое древо, построенное по результатам анализа центральных геномных последовательностей вируса оспы лошадей и ряда других ортопоксвирусов [10]. Штаммы вируса вакцины: Lis (Lister), m0 (LC16m8), CPN (Копенгаген), Tian (TianTan), WR, MVA; RPXV – вирус оспы кроликов (штамм Уtrecht); HSPV – вирус оспы лошадей (штамм MNR-76); CMLV – вирус оспы верблюдов (штаммы M96 and CMS); VARV – вирус натуральной оспы (штаммы GAR (Гарсия 1966), IND (Индия 1967), BAN (Бангладеш 1975)); CPXV – вирус оспы коров (штаммы BR Iu U39); ECTV – вирус эктромелии (штамм MOS (Москва)); MPXV – вирус оспы обезьянь (штаммы ZAI, W61, U39)

вало до 1939 г., пока не было показано, что данный патоген серологически, хоть и связан с вирусом оспы коров, но отличается от него [14–16].

На протяжении XIX в. иммунизация проводилась как лимфой больных коров (вакцинация), так и лимфой больных лошадей (эквинызация), то есть для противооспенной иммунизации использовались и вирус оспы коров, и вирус оспы лошадей [16–19]. Производственные вакцины на протяжении XIX в. могли содержать смеси этих двух вирусов, что приводило к различным генетическим модификациям, в результате которых образовались современные штаммы вируса вакцины [16].

Фактически вирус оспы коров никогда не был определен на молекулярном уровне ни в одной из противооспенных вакцин [20], в то время как вирус, связанный с вирусом оспы лошадей, применяемый в качестве основы противооспенной вакцины, использовался в лаборатории Mulford в США в 1902 г. [21, 22]. Центральная консервативная часть генома штамма Mulford 1902 на 99,7 % была подобна геному штамма MNR-76. Он отличался только по наличию делеций в 10,7 т.п.о. на левом конце генома и 5,5 т.п.о. на правом

конце генома, что также характерно для всех штаммов вируса вакцины [21, 23].

Недавно было сообщено о частичных последовательностях геномов вирусов, которые лежали в основе пяти американских противооспенных вакцин, применявшимися с середины до конца XIX в. [19, 23, 24]. Филогенетический анализ выявил, что эти штаммы кластеризуются с вирусом оспы лошадей и штаммом Mulford 1902 (рисунок 3). Также было показано, что противооспенные вакцины на основе вируса оспы лошадей применялись в США, по крайней мере, за 36 лет до штамма Mulford 1902. В XIX в. штаммы вирусов для противооспенных вакцин постоянно импортировались из Европы и вполне вероятно, что вакциновые вирусы оспы лошадей повторно интродуцировались в Европе, а подобные им вакцины производились и использовались в Европе в XIX в. [24–26].

Данные по секвенированию генома вируса оспы лошадей, штамм MNR-76, и многих штаммов вируса вакцины выявили их тесное подобие, что также дает основание предполагать, что вирус оспы лошадей и связанные с ним возбудители могли служить основой противооспенных вакцин, как и вирус вакцины. Для подтверждения этому предпо-

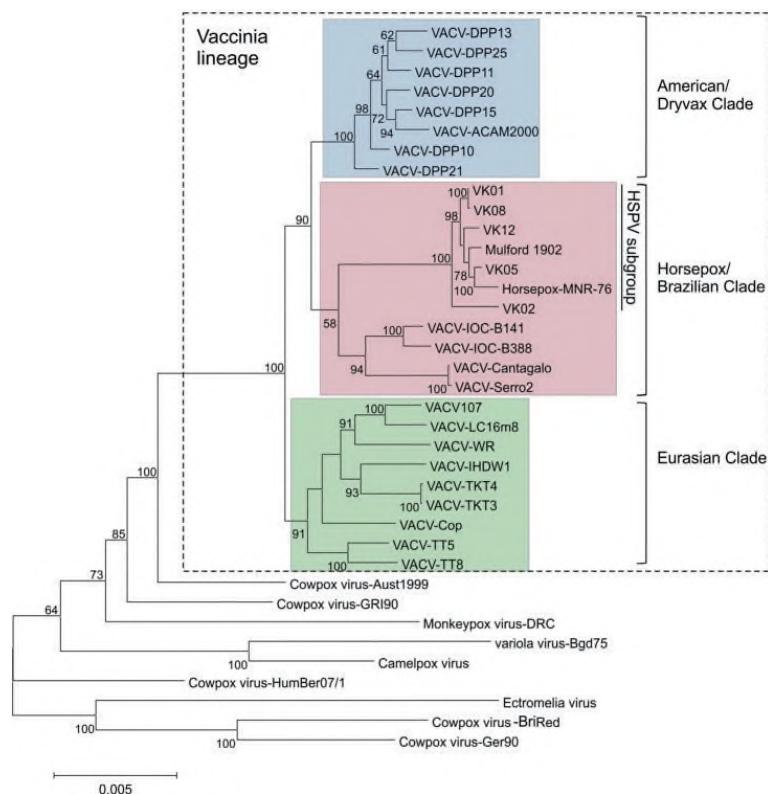


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево, определяющее положение противооспенных вакцин, применявшихся в XIX веке, относительно вируса оспы лошадей, современных штаммов вируса вакцины и ряда ортопоксвирусов [20]

ложению необходимо было получить вакцинный препарат на основе вируса оспы лошадей. Однако существовала одна проблема – вирус оспы лошадей не выявлялся в природе с 1980 г. [4].

Получение вируса scHPXV на основе химически синтезированной копии генома вируса оспы лошадей, штамм MNR-76. Рядом канадских авторов был получен геном вируса оспы лошадей на основе генома штамма MNR-76 из химически синтезированных фрагментов [27]. Авторы разделили геном величиной 212633 п.о. на 10 ДНК-фрагментов, в каждом из которых содержалось по 1000 п.о., перекрывающихся последовательностей с каждым соседним фрагментом.

Эта гомология способствовала рекомбинации между котрансфицируемыми фрагментами [28]. Размеры фрагментов и их положение в геноме вируса оспы лошадей представлены в таблице 1.

Каждый фрагмент был синтезирован и клонирован в плазмидном векторе. В третий фрагмент в тимидинкиназный (ТК) ген, который содержится в нем, была встроена генная кассета, кодирующая желтый флуоресцирующий белок, слитый с гуанин фосфорибозилтрансферазным белком (YFPgpt) под контролем поксвирусного ранне-позднего промотора, что позволяло определить новый патоген за счет флуоресцирующей метки.

Концевые 40-нуклеотидные фрагменты, содержащие одноцепочечные шпилечные структуры, не были синтезированы, а отрезаны от генома вируса вакцины, штамм WR, и спlicingированы с концевыми фрагментами химически синтезированного генома. Клонированные ДНК-фрагменты вырезались из плазмидного вектора, к концевым фрагментам пришивались фрагменты вируса вакцины, содержащие шпилечные одноцепочечные структуры, и этой эквимолярной смесью проводилась транфекция в клетках BGMK [28], инфицированных вирусом фибромы Шоупа как вирусом-помощником (рисунок 4).

Таблица 1 – Размер и расположение каждого синтетического ДНК-фрагмента в геноме вируса оспы лошадей [27]

Фрагмент	Размер (п.о.)	Расположение (DQ792504)
ЛИТП*	10,095	41-10,135
Фрагмент 1A	16,257	8,505-24,761
Фрагмент 1B	16,287	23,764-40,050
Фрагмент 2	31,946	38,705-70,650
Фрагмент 3	25,566	68,608-94,173
Фрагмент 4	28,662	92,587-121,248
Фрагмент 5	30,252	119,577-149,828
Фрагмент 6	30,000	147,651-177,650
Фрагмент 7	28,754	176,412-205,165
ПИТП**	8,484	204,110-212,593

Примечание.

*Левый инвертированный терминальный повтор.

**Правый инвертированный терминальный повтор.

Необходимость вируса-помощника продиктована тем, что для репликации геномной ДНК осипных вирусов требуется ДНК-зависимая ДНК-полимераза, специфическая только для вирусов этого семейства. Трансфицированные клетки переносились на монослои клеток BSC-40. При дальнейшем культивировании образовывались бляшки вируса-помощника и вируса-донора ДНК. Бляшки, образованные вирусом с химически синтезированным геномом, определялись по флуоресцирующей метке.

Далее маркерный ген с флуоресцирующей меткой был удален за счет гомологичной рекомбинации с синтезированным фрагментом, который встраивался в третий фрагмент, но без кассеты с маркерным геном. Отбирались бляшки, не флуоресцирующие под инвертированным микроскопом.

Всего было получено три бляшки, которые содержали химически синтезированный вирусный ген, идентичный геному вируса оспы лошадей, за исключением 40 нуклеотидов по концам генома. Стоимость данного эксперимента составила 100 тыс. долларов США.

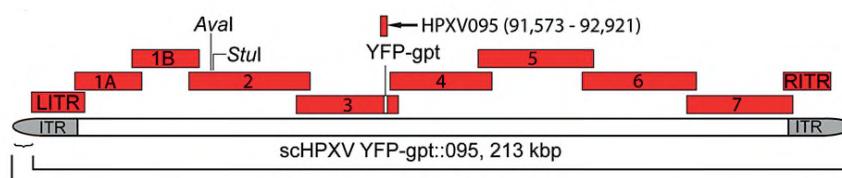


Рисунок 4 – Расположение клонированных синтетических фрагментов ДНК, без 40 концевых нуклеотидов, в геноме вируса оспы лошадей. В ТК ген (тимидинкиназный локус) 3-го фрагмента встраивался маркерный ген желтого флуоресцирующего белка, слитого с гуанинфосфорибозилтрансферазным белком (YFPgpt) [27]. ITR – инвертированный терминальный повтор

Секвенирование этих химерных геномов подтвердило их полное сходство с нуклеотидной последовательностью генома штамма MNR-76, за исключением 40 концевых нуклеотидов, которые были заменены на концевые последовательности вируса вакцины.

Изучение свойств одного из химерных вирусов, названного scHPVX (synthetic chimeric HPVX) проводилось в сравнении с вирусом вакцины, штаммами WR и DPP15. Химерный вирус образовывал бляшки меньшего размера в культурах клеток BSC-40, HeLa, HEL фибробластах, Vero и продуцировал меньше внеклеточного вируса, а также проявлял меньшую патогенность на мышах. При оценке его иммуногенных свойств было показано, что он защищает белых мышей от заражения летальной дозой вируса вакцины [27].

Создание вакцин на основе синтетического химерного вируса оспы лошадей (scHPVX). В марте 2017 г. компания Tonix Pharmaceuticals анонсировала создание новой противооспенной вакцины с коммерческим названием TNX-801. Эта вакцина была основана на указанном химерном вирусе оспы лошадей¹. Изучение ее свойств показало, что она индуцирует у обезьян *Cynomolgus macaques* гуморальный иммунный ответ, защитный уровень которого повышается при увеличении вводимой дозы [29]. Эффективность вакцины TNX-801 была оценена при заражении обезьян на 60 сутки после вакцинации летальной дозой (5,0 lg10 БОЕ) вируса оспы обезьян, штамм Заир. Все вакцинированные обезьяны выжили, либо не проявляя никаких симптомов заболевания, либо незначительно реагируя виремией, небольшой потерей веса или облысением. Следовательно, одноразовое введение вакцины TNX-801, способной к репликации в клетках млекопитающих, формирует иммунный ответ, достаточный для защиты иммунизированных животных от заражения летальной дозой вируса оспы обезьян (рисунок 5) [29].

Оценка вакцины TNX-801 в сравнении с существующими противооспенными вакцинами, изготовленными на основе вируса вакцины, показала, что она еще недостаточно исследована, коммерчески не выгодна, а потому имеет мало шансов на лицензирование [30, 31]. Но, тем не менее, создание вакцин на основе искусственно полученного вируса продолжалось [32, 33].

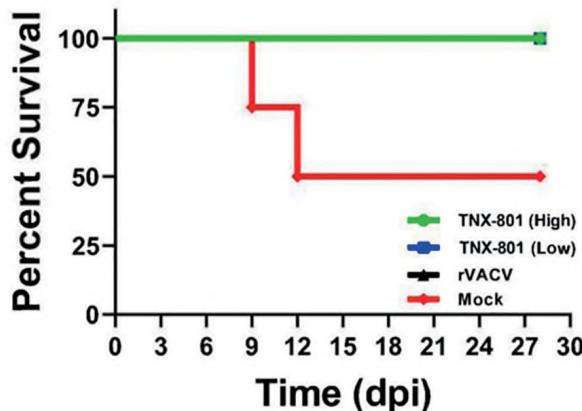


Рисунок 5 – Результаты оценки выживаемости обезьян *Cynomolgus macaques* (процент), после заражения их летальной дозой вируса оспы обезьян (линия зеленого цвета – вакцинированных рекомбинантной химерной вакциной TNX-801, красного – контрольных невакцинированных) [29]

Была получена рекомбинантная вакцина TNX-1800 на основе химерного вируса оспы лошадей, в геном которого встраивали ген спайкового белка вируса SARS-CoV-2. Она оценивалась на двух видах обезьян: африканских зеленых мартышках (African Green Monkeys) и макаках циномолгус (*Cynomolgus macaques*). Иммунизация этой вакциной не вызывала побочных реакций и изменений клинических параметров у обоих видов обезьян. Одноразовое введение вакцины индуцировало гуморальный иммунный ответ, о чем свидетельствовало наличие связывающих спайковых анти-SARS-CoV-2 IgG и нейтрализующих антител против штамма USA-WA1/2020 у обоих видов обезьян. У макак циномолгус индуцировался Т-клеточный иммунитет. При заражении вирусом SARS-CoV-2 обоих видов обезьян наблюдалось быстрое выведение вируса из верхних и нижних дыхательных путей.

Эта же вакцина оценивалась на сирийских хомячках и новозеландских белых кроликах [32, 33]. Животные были однократно вакцинированы тремя дозами вакцины внутрькожно. Вакцинация хорошо переносилась обоими видами животных, без побочных реакций. После вакцинации у всех животных выявлялись специфические антитела против спайкового S-белка вируса SARS-CoV-2. Следовательно, рекомбинантные живые вакцины на основе искусственно полученного

¹ Tonix Pharmaceuticals announces demonstrated vaccine activity in first-ever synthesized chimeric horsepox virus. Tonix Pharmaceuticals, New York, NY. 2017. URL: <https://www.tonixpharma.com/news-events/press-releases/detail/1052/tonix-pharmaceuticals-announces-demonstrated-vaccine> (дата обращения: 02.06.2024).

Стовба Л.Ф., Петров А.А., Мельников С.А., Чухраля О.В., Черникова Н.К., Борисевич С.В.
Stovba L.F., Petrov A.A., Melnikov S.A., Chukhralia O.V., Chernikova N.K., Borisevich S.V.

вируса оспы лошадей хорошо переносятся лабораторными животными и вызывают защитный иммунный ответ при однократной иммунизации.

Вместе с тем сами факты публикации методологии синтеза генома вируса оспы лошадей из химических фрагментов и создания на его основе нативного возбудителя показал, что синтетическая биология вступила в область больших вирусов [27].

Первый синтетический вирус, полиовирус, синтезированный Wimmer и коллегами, открыл новую эру обратной генетики, которая позволяет генерировать синтетический вирус без необходимости в нуклеиново-кислотной затравке [34]. Применение этой методологии дало возможность получить вирус гриппа, вызвавший эпидемию гриппа 1918–1919 гг., так называемую «Испанку», который сейчас не выделяется в природе [35]. Так же был получен SARS-подобный коронавирус, выделенный от летучих мышей, от которого происходит SARS-CoV-2 – коронавирус, вызвавший пандемию, начавшуюся в конце 2019 г. [36]. С помощью этой же методологии были получены инфекционные варианты трех изолятов вируса Эбола: Ebola Makona, Tumba, Ituri, которые обладали той же патогенностью для лабораторных мышей, как и природные изоляты [37].

Создание нативных вирусов методами синтетической биологии привело к интенсивным дебатам о пользе и риске подобных исследований. Создание вакциниального препарата открывает путь для получения новых противооспенных вакцин, не вызывающих побочных реакций и обладающих достаточной иммуногенностью при одноразовом введении. Однако эта же методология может привести к получению новых ортопоксвирусов, патогенных для человека и животных, или к реинтродукции натуральной оспы, что представляет особую опасность в условиях практического отсутствия противооспенного иммунитета.

Заключение

Таким образом, оспа лошадей – довольно редкое в прошлом заболевание, которое не наносило значительного ущерба народному хозяйству, сейчас не регистрируется, а его возбудитель не выявляется в природе. Од-

нако вирус оспы лошадей вызывает большой интерес, как основа репликационно-компетентных противооспенных вакцин, способных индуцировать иммунный ответ без побочных реакций при однократном введении. Данные по секвенированию генома вируса оспы лошадей, штамм MNR-76, и многих штаммов вируса вакцины выявили их тесное подобие, что дает основание предполагать, что вирус оспы лошадей мог ранее служить основой противооспенных вакцин, как и вирус вакцины.

Канадскими исследователями был получен геном вируса оспы лошадей на основе генома штамма MNR-76 из 10 химически синтезированных фрагментов по 10–30 т.п.о., за исключением 40 нуклеотидов, расположенных по концам генома (в месте образования одноцепочечных шпилечных структур). В результате была образована химерная копия вируса оспы лошадей, названная scHPXV. В марте 2017 г. компания Tonix Pharmaceuticals анонсировала создание на основе указанного химерного вируса оспы лошадей новой противооспенной вакцины под коммерческим названием TNX-801. Изучение ее свойств показало, что при однократном введении обезьянам *Cynomolgus macaques* она индуцирует гуморальный иммунный ответ и защищает от гибели 100 % животных при заражении летальной дозой (5,0 lg BOE) вируса оспы обезьян, штамм Заир. На основе этого же химерного вируса оспы лошадей была создана рекомбинантная вакцина против SARS-CoV-2 – TNX-1800, которая при однократном введении индуцировала гуморальный и клеточный иммунитет у обезьян, кроликов и сирийских хомячков и защищала их от заражения вирулентным коронавирусом.

В тоже время нельзя исключать и того, что использование современных генно-инженерных технологий может привести не только к разработке эффективных вакциниальных препаратов, но и к получению новых ортопоксвирусов, патогенных для человека и животных, или к реинтродукции натуральной оспы, что представляет особую опасность в условиях практического отсутствия противооспенного иммунитета у населения и международного контроля над экспериментами по синтетической биологии опасных патогенов.

Список источников/References

- Oliveira Silva NI, de Oliveira JS, Kroon EG, de Souza Trindade G, Drumond BP. Here, There, and Everywhere: The Wide Host Range and Geographic Distribution of Zoonotic Orthopoxviruses. *Viruses*. 2021;13:43. <https://doi.org/10.3390/v13010043>

2. Galtier V. *Horse-pox simulant la dourine; enzootie de variola équinedans la Haute-Loire; rapport adressé à M. le préfet de la Haute-Loire.* Lyon; 1887.
3. Delhon G, Afonso CL, Zsak L, Sandybaev NT. Genome of horsepox virus. *J Virol.* 2006;80:9244–58.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00945-06>
4. Esparza J. Has horsepox become extinct? *Vet Rec.* 2013;173:272–3.
<https://doi.org/10.1136/vr15587>
5. Kamingolo JS, Nyaga PN, Gicho JN. Isolation, Cultivation and Characterization of a Poxvirus from some Horses in Kenya. *Zbl Vet Med B.* 1974;21:592–601.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.tb00534.x>
6. McIntire RW. Virus popular Dermatitis of the horse. *Am J Vet Res.* 1949;10:229–32.
7. Munz E, Dumbell KH. Horsepox. In: *Infectious diseases of live stock-with special emphasis to Southern Africa.* Coetzer JAW, Thompson GR, Eds. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom; 1998. P. 631–2.
8. MacNeill AI. Comparative pathology of zoonotic orthopoxviruses. *Pathogens.* 2022;11(8):892.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11080892>
9. Thompson CH, Yager JA and Van Rensburg IB. Close relationship between equine and human molluscum contagiosum virus demonstrated by in situ hybridization. *Res Vet Sci.* 1998;64:157–61.
10. Tulman ER, Delhon G, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sandybaev NT, et al. Genome of Horsepox Virus. *J Virol.* 2006;80:9244–58.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00945-06>
11. Gubser C, Hue S, Kellam P, Smith GL. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol.* 2004;85:105–17.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.19565-0>
12. Esparza J, Damaso CR. Searching for the origin of the smallpox vaccine. Edward Jenner and his little-known horsepox hypothesis. *Vaccine.* 2022;3(40):3–4.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.11.007>
13. Cameron AF. Horse-pox directly transmitted to man. *British Med J.* 1908;1292–4.
<https://doi.org/10.1136/bmj.1.2474.1293>
14. Meyer H, Pfeffer M, Rziha H-J. Sequence alterations within and down stream of the A-type inclusion protein genes allow of Orthopoxvirus species by polymerase chain reaction. *J Gen Virol.* 1994;75:1975–81.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-8-1975>
15. Brum MCS, dos Anjos BL, Nogueira CEW, Weiblen R, Flores EF. An outbreak of orthopoxvirus-associated disease in horses in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:143–7.
<https://doi.org/10.1177/104063871002200132>
16. Esparza J, Schrick L, Damaso RD, Nitsche A. Equination (inoculation of horsepox): An early alternative to vaccination (inoculation of cowpox) and the potential role of horsepox virus in the origin of the smallpox vaccine. *Vaccine.* 2017;35:7222–30.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine1017.11.003>
17. Damaso CR. Revisiting Jenner's mysteries, the role of the Beaugency lymph in the evolutionary path of ancient smallpox vaccines. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:e55–63.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30445-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30445-0)
18. Esparza J, Nitsche A, Damaso CR. Beyond the myths: novel findings for old paradigms in the history of the smallpox vaccine. *PLoS Pathog.* 2018;14:e1007082.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007082>
19. Duggan AT, Klunk J, Porter AF, Dhody AN, Hicks R, Smith GL, et al. The origins and genomic diversity of American Civil War Era smallpox vaccine strains. *Genome Biol.* 2020;21(1):175.
<https://doi.org/10.1186/S13059-020-02079-z>
20. Brinkmann A, Souza ARV, Esparza J, Nitsche A, Damaso CR. Re-assembly of nineteenth-century smallpox vaccine genomes reveals the contemporaneous use of horsepox and horsepox-related viruses in the USA. *Genome Biology.* 2020;21:86.
<https://doi.org/10.1186/s13059-020-02202-0>
21. Schrick L, Tausch SH, Dabrowski PW, Damaso CR, Esparza J, Nitsche A. An early American smallpox vaccine based on horsepox. *N Engl J Med.* 2017;377:1491–2.
<https://doi.org/10.1056/NEJMMe170760>
22. Molteni C, Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Genetic ancestry and population structure of vaccinia virus. *NPJ Vaccines.* 2022;7(1):92.
<https://doi.org/10.1038/s41541-022-005199-4>
23. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic a flexible trimmer for illumine sequence data. *Informatics.* 2014;30:2114–20.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Стовба Л.Ф., Петров А.А., Мельников С.А., Чухраля О.В., Черникова Н.К., Борисевич С.В.
Stovba L.F., Petrov A.A., Melnikov S.A., Chukhralia O.V., Chernikova N.K., Borisevich S.V.

24. Souza ARV, Brinkmann A, Esparza J, Nitsche A, Damaso CR. Gene duplication, gene loss, and recombination events with variola virus shaped the complex evolutionary path of historical American horsepox-based smallpox vaccines. *mBio*. 2023;14(5):e0188723.
<https://doi.org/10.1128/mbio.01887-23>
25. Esparza J, Lederman S, Nitsche A, Damaso CR. Early smallpox vaccine manufacturing in the United States: introduction of the “animal vaccine” in 1870, establishment of “vaccine farms” and the beginnings of the vaccine industry. *Vaccine*. 2020;38(50):4773–9.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.05.037>
26. Duggan AT, Holmes EC, Poinar HN. Response to Brinkmann et al. “Re-assembly of nineteenth-century smallpox vaccine genomes reveals the contemporaneous use of horsepox and horsepox-related viruses in the United States”. *Genome Biology*. 2020;21:287.
<https://doi.org/10.1186/s13059-020-02203-z>
27. Noyce RS, Lederman S, Evans DH. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS ONE*. 2018;13(1):e0188453.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188453.t001>
28. Yao XD, Evans DH. High-frequency genetics recombination and reactivation of orthopoxviruses from DNA fragments transfected into leporipoxvirus-infected cells. *J Virol*. 2003;77(13):7281–90.
<https://doi.org/10.1128/JVI.77.133>
29. Noyce RS, Westfall LW, Fogarty S, Gilbert K, Mpanju O, Stillwell H et al. Single Dose of Recombinant Chimeric Horsepox Virus (TNX-801) Vaccination Protects Macaques from Lethal Monkeypox Challenge. *Viruses*. 2023;15(2):356.
<https://doi.org/10.3390/v15020356>
30. Koblenz GD. A Critical Analysis of the Scientific and Commercial Rationales for the De Novo Synthesis of Horsepox Virus. *mSphere*. 2018;3(2):e00040–18.
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00074-18>
31. DiEuliis D, Berger K, Gronvall G. Biosecurity Implication for the Synthesis of Horsepox, an Orthopoxvirus. *Health Security*. 2017;15(6):629–37.
<https://doi.org/10.1089/hs.20170081>
32. Awasthi M, Macaluso A, Myscofski D, Prigge J, Koide F, Noyce RS, et al. Immunogenicity and efficacy of TNX-1800, a live virus recombinant poxvirus candidate against SARS-CoV-2 Challenge in nonhuman primates. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(11):1682.
<https://doi.org/10.3390/vaccines11111682>
33. Awasthi M, Macaluso A, Goebel SJ, Luea E, Noyce RS, Nasar F, et al. Immunogenicity and tolerability of a SARS-CoV-2 TNX-1800, a live recombinant poxvirus candidate in Syrian hamsters and new Zeland white rabbits. *Viruses*. 2023;15(10):2131.
<https://doi.org/10.3390/v15102131>
34. Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*. 2002;297(5583):1016–8.
<https://doi.org/10.1126/science.1072266>
35. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solorzano A, Swayne DE, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*. 2005;310(5745):77–80.
<https://doi.org/10.1126/science.1119392>
36. Becker MM, Graham RL, Donaldson EF, Rockx B, Sims AC, Sheahan T, et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(50):19944–9.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808116105>
37. Beitzel BF, Radoshitzky SR, Di Paola N, Brannan JM, Kimmel D, Caviness K, et al. On-Demand Patient-Specific Phenotype-to-Genotype Ebola Virus Characterization. *Viruses*. 2021;13(10):2010.
<https://doi.org/10.3390/v13102010>

Вклад авторов / Authors contributions

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Вклад распределен следующим образом: **Л.Ф. Стоба** – формирование концепции статьи, написание текста рукописи; **А.А. Петров** – подбор и анализ данных научной литературы по проблематике ортопоксвирусов; **С.А. Мельников** – критическая переработка рукописи, редактирование текста; **О.В. Чухраля** – критический анализ статьи, оформление иллюстративных материалов; **Н.К. Черникова** – редактирование текста, оформление статьи в соответствии с требованиями журнала; **С.В. Борисевич** – сбор и анализ научной литературы, выбор темы статьи, окончательное утверждение рукописи для публикации. / All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). The significant contributions were as follows:

L.F. Stovba – conceptualized the study, drafted the manuscript; **A.A. Petrov** – selected and analysed scientific literature about orthopoxviruses; **S.A. Melnikov** – critical revised the manuscript, edited the text; **O.V. Chukhralya** – critical analysed of the manuscript, puted into shape the illustrations; **N.K. Chernikova** – corrected the text, edited the text with accordance of journal; **S.V. Borisevich** – selected and analysed scientific literature, choice of the manuscript subject.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторах / Authors

Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Российская Федерация, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11.

Стовба Людмила Федоровна. Старший научный сотрудник, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>

Петров Александр Анатольевич. Начальник управления, д-р мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9714-2085>

Мельников Сергей Алексеевич. Старший научный сотрудник, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3487-5829>

Чухраля Олег Васильевич. Заместитель начальника научно-исследовательского отдела.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2603-0860>

Черникова Наталья Константиновна. Старший научный сотрудник, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1491-6293>

Борисевич Сергей Владимирович. Начальник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, д-р биол. наук, профессор, академик РАН,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Контактная информация для всех авторов: 48cnii@mil.ru

Контактное лицо: Борисевич Сергей Владимирович; 48cnii@mil.ru

48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Octyabrskaya St., 11, Moscow region, SergievPosad-6 141306, Russian Federation.

Lyudmila F. Stovba. Senior Researcher of the Department. Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>

Aleksandr A. Petrov. Chief of the Directorate. Dr. Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9714-2085>

Sergey A. Melnikov. Senior Researcher of the Department. Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3487-5829>

Oleg V. Chukhralia. Chief of the Department.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2603-0860>

Natalya K. Chernikova. Senior Researcher of the Department. Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1491-6293>

Sergey V. Borisevich. Chief of the Institute. Dr. Sci. (Biol.), Professor, Academician of RAS.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Contact information for all authors: 48cnii@mil.ru

Contact person: Sergey V. Borisevich; 48cnii@mil.ru



Ферменты в составе комбинированных антимикробных средств как улучшители их действия

Н.А. Степанов, А.Г. Асланлы, М.В. Домнин, Е.Н. Ефременко

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

e-mail: eleno_efremenko@list.ru

Накапливающаяся информация о росте числа микроорганизмов, обладающих резистентностью по отношению к применяемым антимикробным препаратам, с одной стороны, и появление информации о наличии лабораторий, в которых ведутся закрытые работы с микробными патогенами, негативные свойства которых могут быть искусственно усилены, свидетельствуют о том, что необходима разработка новых эффективных антимикробных средств с максимально широким спектром действия.

Цель работы – провести анализ современных тенденций в развитии антимикробных препаратов, комбинирующих применение известных и широко используемых антибиотиков, а также веществ с антимикробными свойствами, включая металлические наночастицы, антимикробные пептиды, с различными ферментами, которые позволяют сохранить и усилить противомикробный эффект по отношению к клеткам различных микроорганизмов.

Источниковая база исследования – преимущественно англоязычная научная литература, доступная через глобальную сеть Интернет, а также собственные опубликованные экспериментальные исследования авторов.

Метод исследования – аналитический.

Результаты. В работе рассмотрены ферменты, которые, в отличие от классических антимикробных агентов, чаще вступающих в реакции ингибиции ключевых биохимических реакций, являются катализаторами процессов, направленных на окисление и гидролиз молекул, метаболически и структурно важных для микроорганизмов. Таким образом, ферменты многократно вступают в реакции, позволяющие существенно снизить концентрации веществ, важных для жизнедеятельности микробных клеток, что приводит к их ослаблению и более эффективному действию антимикробных агентов. Чаще всего при этом сами ферменты выступают в роли носителей для молекул с антимикробным действием, что позволяет избежать неспецифического их взаимодействия с другими, прежде всего, белками, выводящими, таким образом, часть, например, антибиотиков, из активного воздействия на клетки патогенов.

Выводы. Продемонстрировано, что ферментативное усиление бактерицидного действия антимикробных агентов может быть по отношению к разным клеткам, в том числе образуемым ими сложным по составу биосистемам (биопленкам), как в несколько раз, так и на несколько порядков. Такие комбинированные с ферментами антимикробные средства могут представлять интерес для проведения санитарных обработок разных поверхностей, емкостей, помещений, в том числе биолабораторий, для введения в состав защитных и перевязочных материалов.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; биопленки; гидролазы; деконтаминация; защитные материалы; оксидазы; патогены; раневые инфекции

Для цитирования: Степанов Н.А., Асланлы А.Г., Домнин М.В., Ефременко Е.Н., Ферменты как усилители действия антимикробных веществ. Вестник войск РХБ защиты. 2024;8(2):146–163. EDN:lkteat.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-146-163>

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: Е.Н. Ефременко является членом редколлегии журнала с 2019 г. Это не повлияло на процесс рецензирования и окончательное решение.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научным фондом (грант № 23-14-00092).

Поступила 05.06.2024. После доработки 20.06.2024 г. Принята к публикации 27.06.2024.

© Н.А. Степанов, А.Г. Асланлы, М.В. Домнин, Е.Н. Ефременко, 2024

Journal of NBC Protection Corps. 2024. V. 8. No 2

Enzymes in the Content of Combined Antimicrobials as Improvers of Their Action

Nikolay A. Stepanov, Aysel G. Aslanli, Maksim V. Dominin, Elena N. Efremenko✉

Moscow State University, Faculty of Chemistry
Lenin Hills 1-3, 119991 Moscow, Russian Federation
✉ e-mail: elena_efremenko@list.ru

Accumulating information about the growing number of microorganisms that are resistant to the antibiotics used, on the one hand, and the emergence of information about the presence of laboratories in which closed work is carried out with microbial pathogens, the negative properties of which can be artificially enhanced.

The aim of the work to analyze current trends in the development of antimicrobial drugs combining the use of well-known and widely used antibiotics, as well as substances with antimicrobial properties, including metal nanoparticles, antimicrobial peptides, with various enzymes that allow to preserve and enhance the antimicrobial effect against the cells of various microorganisms

The source base of the research is mainly English-language scientific literature available via the global Internet network, as well as the authors' own published experimental studies.

The research method is analytical.

Results. The work considers enzymes that, unlike classical antimicrobial agents, which more often enter into reactions inhibiting key biochemical reactions, are catalysts for processes aimed at oxidation and hydrolysis of molecules that are metabolically and structurally important for microorganisms.

Conclusion. The enzyme repeatedly enters into reactions that significantly reduce the concentrations of substances important for the vital activity of microbial cells, which leads to their weakening and more effective action of antimicrobial agents. Most often, in this case, the enzymes themselves act as carriers for molecules with antimicrobial action, which avoids their non-specific interaction with other, primarily proteins, thus removing some, for example, antibiotics, from the active effect on pathogen cells. It has been demonstrated that the enzymatic enhancement of the bactericidal action of antimicrobial agents can be in relation to different cells, including the complex biosystems (biofilms) formed by them, both by several times and by several orders of magnitude. Such antimicrobial agents combined with enzymes may be of interest for carrying out sanitary treatments of various surfaces, containers, premises, including biological laboratories, for the introduction of protective and dressing materials.

Keywords: antimicrobial peptides; bacterial and fungal pathogens; biofilms; decontamination; hydrolases; oxidases; protective materials; wound infections

For citation: Stepanov N.A., Aslanli, A.G., Dominin M.V., Efremenko E.N. Enzymes in the content of combined antimicrobials as improvers of their action. Journal of NBC Protection Corps. 2024;8(2):146–163. EDN:lkteat.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-146-163>

Financial disclosure: The authors have no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: E.N. Efremenko is a member of the Editorial Board of the journal (since 2019). This had no impact on the peer review process and the final decision.

Funding: This work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (Grant № 123-14-00092).

Received June 5, 2024. Revised June 20, 2024. Accepted June 27, 2024

Сегодня много внимания во всем мире уделяется микробной контаминации различных объектов, росту числа микроорганизмов, устойчивых к воздействию широко применяемых антибиотиков. Это касается не только бактериальных клеток, но и грибных клеток, резистентность которых к действию фунгицидов ранее почти не обсуждалась.

Согласно недавно опубликованному исследованию, за последнее десятилетие уровень ежегодной смертности от распространения грибковых инфекций вырос в среднем по 120 странам мира в 2 раза (до 3,8 млн в год) [1]. Фактически из 6,5 млн человек ежегодно страдающих грибковыми заболеваниями, 1,8 млн поражены аспергиллезом (*Aspergillus*

Степанов Н.А., Асланлы А.Г., Домнин М.В., Ефременко Е.Н.
Stepanov N.A., Aslanli, A.G., Domnin M.V., Efremenko E.N.

flavus и *Aspergillus fumigatus*), 1,5 млн страдают от кандидозов (*Candida albicans*) и 194000 – криптококковым менингитом (*Cryptococcus neoformans*). В 2022 г. все эти патогены были включены в «World Health Organization (WHO) fungal priority pathogens list», составленный из 19 групп грибковых патогенов, связанных с серьезным риском смертности или заболеваемости [2]. С этими же грибковыми поражениями связаны и заболевания животных, растений, развитие биокоррозионных процессов, порча пищевых продуктов, кормов для животноводства, биодеструкция строительных материалов [3–5]. Пандемия COVID-19 привела к ослаблению иммунной системы человека и усилила распространение грибковых заболеваний [6] при том, что основная масса применяемых средств лечения (антибиотиков) ориентирована на бактерии. Что касается проблемы резистентности бактерий ко многим «блокбастерным» антибиотикам, то она обсуждается давно, однако «свежую» струю в эти обсуждения привносит информация о выявлении в разных странах мира биолабораторий, занимающихся исследованиями бактериальных патогенов [7] с возможностью «синтетического усиления» производимых ими природных токсинов [8] под предлогом разработки новых средств борьбы с ними. Отсюда очевидной становится необходимость иметь средства купирования и надежной супрессии возможных вспышек заболеваний, провоцируемых такими бактериальными клетками, за счет максимально возможной деконтаминации мест их появления.

Особую опасность представляют полимикробные консорциумы, включающие разные виды мицелиальных грибов и бактерий, которые могут формировать устойчивые биопленки, повышая еще больше свою устойчивость к воздействию антимикробных агентов [9]. Биопленки являются постоянным источником внутрибольничных инфекций, возникающих вследствие колонизации медицинских изделий и поверхностей (катетеров, контактных линз, механических клапанов сердца, эндотрахеальных трубок, медицинского инвентаря и оборудования) [10]. Бактериальные инфекции в сочетании с грибковыми, особенно вызванными дрожжами рода *Candida* и мицелиальными грибами рода *Aspergillus*, приводят к высокой смертности [11]. Грибы рода *Aspergillus* вызывают кожные заболевания, провоцируют аллергические реакции и приводят к хроническому инфицированию дыхательных путей. Мицелий грибов в смешанных консорциумах явля-

ется матриксом для роста клеток бактерий. Внеклеточные гидролитические ферменты грибов способствуют деградации труднодоступных субстратов, обеспечивая питательными веществами всех участников консорциума. Помимо этого, особую опасность представляют микотоксины, секреируемые грибами [12]. Загрязнение продуктов питания и кормов микотоксинами представляет реальную опасность, поскольку микотоксины представляют собой природные яды, выступая в качестве ингибиторов для различных процессов, включая синтез белков.

Образование микробных биопленок начинается с адсорбции клеток на поверхности материалов с последующим прикреплением, ростом биомассы и секрецией внеклеточных полисахаридов с формированием матрикса биопленки [13].

Особую роль в проявлении резистентности микроорганизмов к антимикробным агентам и формировании биопленок играют кворумные молекулы, влияющие на экспрессию молчащих генов в популяциях с высокой концентрацией клеток, и, соответственно, синтез белков – факторов вирулентности [14]. Внутри биопленок происходит обмен генетического материала, приводящий к горизонтальному переносу генов между клетками, в том числе тех, которые передают устойчивость к лекарствам препаратам [15]. Именно поэтому применяемые в настоящее время антимикробные средства (антибиотики, фунгициды) в рекомендуемых дозах малоэффективны, а повышение их применяемой концентрации приводит к повышению токсичности сред.

Все указанные причины приводят к тому, что особое внимание в последнее время помимо поиска новых антибиотиков и фунгицидов сосредоточено на исследовании комбинированного применения различных противомикробных препаратов с ферментами [16], позволяющими катализически действовать на разные мишени в микробных клетках: клеточные стенки, мембранны, нуклеиновые кислоты, молекулы кворумного ответа клеток (Quorum Sensing, QS), пептиды и белки, участвующие в формировании биопленок на различных поверхностях (адгезины, гидрофобины) (рисунок 1).

Помимо природных форм ферментов, синтезируемых различными живыми объектами (растениями, микроорганизмами и животными), могут быть получены рекомбинантные молекулы этих биокатализаторов, производимые различными клетками-хозяевами, и при этом возможно направ-

Ферменты в составе комбинированных антимикробных средств как улучшители их действия Enzymes in the Content of Combined Antimicrobials as Improvers of Their Action

ленное улучшение их катализитических характеристик по отношению к определенным субстратам.

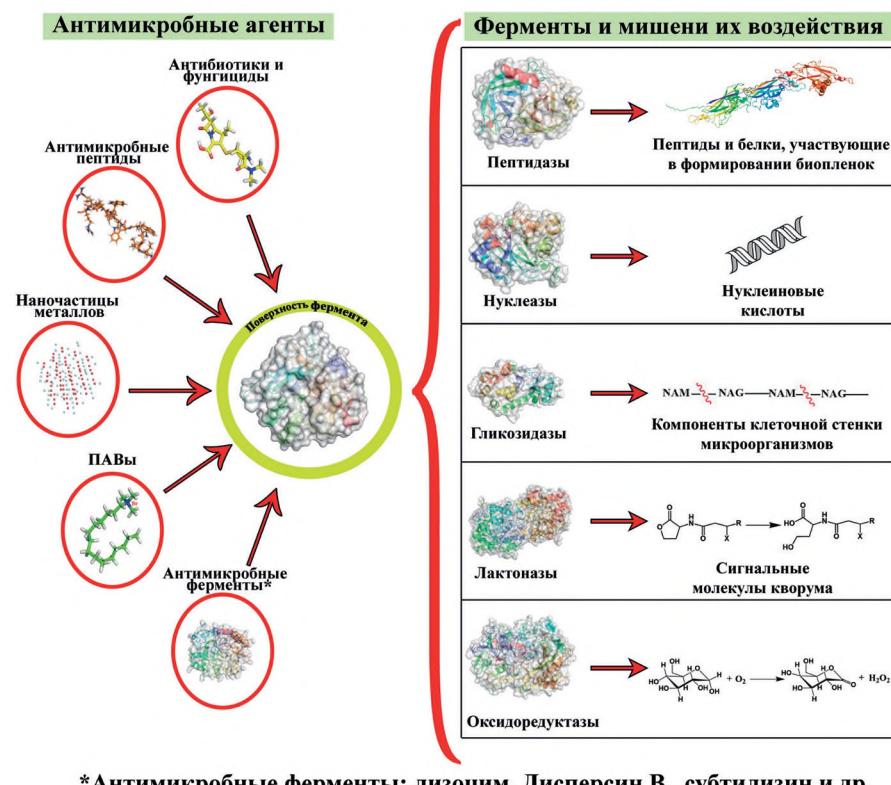
Цель работы – провести анализ современных тенденций в развитии антимикробных препаратов, комбинирующих применение известных и широко используемых антибиотиков, а также веществ с антимикробными свойствами, включая металлические наночастицы, антимикробные пептиды, с различными ферментами, которые позволяют сохранить и усилить противомикробный эффект по отношению к клеткам различных микроорганизмов (рисунок 1).

Вариации в составе фермент-содержащих комбинаций

Анализ ферментов, проявляющих разнообразную противомикробную активность, в сочетании с антибиотиками, свидетельствует о том, что большинство из них представляют собой гидролазы (таблица 1) [17–42], активно воздействующие на белковые и полисахаридные молекулы клеток. Некоторые из этих успешно применяемых гидролаз проявляют нуклеазную активность, причем в отношении разных молекул нуклеиновых кислот (как ДНК, так и РНК) [19, 21, 25, 26, 30].

Ферментативное разрушение экзополисахаридов (ЭПС) с применением разных карбогидраз, среди которых α -амилаза, трегалаза, целлюлаза, декстраназа, мутаназа и др. [18, 19, 35, 37–39], является одним из наиболее эффективных подходов к подавлению роста различных по составу биопленок и их уничтожению. Причина в том, что ЭПС играют важную роль не только в адгезии биопленок к различным поверхностям (техническим поверхностям, имплантам, тканям человека), но и в упрочнении самих матриксов биопленок с включенными в них клетками разных микроорганизмов. В этой связи, возможность катализитического разрушения ЭПС в мягких условиях, характерных для ферментативных реакций, делает клетки, в том числе в составе биопленок, более доступными для воздействия различных антимикробных агентов.

В ряде случаев эффективно одновременное внесение ферментов и антимикробных агентов в состав средств для обработки мест микробной контаминации. Однако возможно комбинированное, но не одновременное, а последовательное применение ферментов и антибиотиков для достижения максимального эффекта. Так для борьбы с полимикробными биопленками



*Антимикробные ферменты: лизоцим, Дисперсин В, субтилизин и др.

Рисунок 1 – Исследуемые варианты комбинирования антимикробных агентов с ферментами, катализирующими различные реакции с биомолекулами (рисунок подготовлен авторами для обзора)

Степанов Н.А., Асланлы А.Г., Домнин М.В., Ефременко Е.Н.
Stepanov N.A., Aslanli, A.G., Domnin M.V., Efremenko E.N.

Таблица 1 – Примеры комбинаций ферментов с антимикробными препаратами и эффекты от их применения

Объекты	Источник контаминации объекта	Примененные антимикробные комбинации с ферментами	Эффект	Источник литературы
Раны	Биопленка <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Трипсин (0,15 мг/мл), ДНКаза I (дезоксирибонуклеаза) (50 Ед/мл) с меропенемом или амикацином (125–500 мг/мл)	Уничтожение биопленки, снижение концентрации применяемых антибиотиков в 2,5 раза в сравнении с индивидуальными антибиотиками	[17]
Поверхности из полипропилена и нержавеющей стали	Биопленки <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> и <i>Bacillus cereus</i>	Протеаза и α-амилаза (180 Ед/г) с SanicipBioControl (дезинфектант – смесь поверхностно-активных веществ с высокой проникающей способностью (четвертичные аммонийные соединения пятого поколения) (30 мл/л) и надускусная кислота как окислитель (200 мг/л)	Снижение концентрации клеток в биопленках на 5–6 порядков на 1 см ²	[18]
Протезы	Биопленки <i>S. aureu</i> или <i>S. epidermidis</i> или <i>E. coli</i>	1,4-β-d-глюканаза, β-1,6-гексозаминидаза и РНК/ДНК эндонуклеазы с ципрофлоксацином, моксифлоксацином, колистином, доксициклином или линезолидом (0,25–30 мг/л)	Снижение концентрации клеток в биопленках (в большинстве вариантов на 80 %) по сравнению с обработкой только антибиотиками	[19]
Тканевые защитные материалы	<i>Bacillus subtilis</i> и <i>E. coli</i>	Полигистидиновая органоfosfатгидролаза (<i>His₆-OPH</i>) (0,3 г/л) и полимиксины (2 г/л)	Снижение концентрации клеток на поверхности защитного материала	[20]
Раны	Биопленки <i>S. aureus</i>	Наногеликарбопола (0,6 вес%), покрытые алкалазой (0,6 вес%) с ципрофлоксацином (0,32 мкг/мл)	Гибель клеток в биопленке	[21]
Раны	Биопленки <i>S. aureus</i>	Фицин, иммобилизованный на хитозане, в сочетании с бензалкониум хлоридом (75 мг/мл)	Снижению количества клеток на 3 порядка при лечении ран через 6 дней	[22]
Раны, медицинские технические средства, катетеры, протезы	Биопленки <i>Candida albicans</i>	ДНКаза (0,13 мг/мл) в сочетании с амфотерицином В (4 мг/л)	ДНКаза повышала эффективность действия амфотерицина В, что снижало на 2 порядка концентрацию клеток в биопленке	[23]
Катетеры, протезы, сердечные клапаны	Биопленки <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Субтилизин А (0,5 Ед/мл) в комбинации с моксифлоксацином (4 мг/л) и меропенемом (40 мг/л), каспофунгином (13,8 мг/л)	Снижение концентрации клеток на 40–90 % во всех биопленках	[24]
Легкие, катетеры, импланты, сердечные клапаны	Биопленка <i>Aspergillus fumigatus</i>	ДНКаза (128 мг/мл) самфотерицином В (0,125 мг/л) или каспофунгином (64 мг/л)	Эффективность амфотерицина В и каспофунгина улучшалась в присутствии фермента с 8-кратным снижением применяемых концентраций антибиотиков	[25]
Раны	Менингококовая инфекция, инфекции мочевыводящих путей, биопленки <i>Enterococcus faecalis</i> / <i>E. faecium</i>	Альгинатлиаза (15 Ед/мл) и ДНКаза (100 мг/л) с ванкомицином (16–64 мг/мл)	Ферменты повышали эффективность действия ванкомицина в отношении биопленок бактерий	[26]
Раны	Биопленки <i>S. aureus</i> / <i>P. aeruginosa</i>	Антисептик Пронтосан (10 % раствор) с протеазой (0,00083 Ед/мл) и ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) 10 мМ	Снижение концентрации клеток в биопленках <i>P. aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i> в 1300 и 30 раз соответственно	[27]

Продолжение таблицы 1

Объекты	Источник контаминации объекта	Примененные антимикробные комбинации с ферментами	Эффект	Источник литературы
Продукты питания	Биопленки <i>Salmonella</i> sp.	Бромид цетилtrimетиламмония (1 мг/мл) с целлюлазой R-10 (20 мг/мл)	Удаление зрелой биопленки и снижение клеток на 6 порядков	[28]
Импланты	Биопленка <i>S. aureus</i>	Дисперсин В, лизостафин, α -амилаза, эндопротеиназа, серрапептаза (1–64 мкг/мл) с ванкомицином и римфапицином (5 мг/мл)	Полное уничтожение или снижение клеток в биопленках на 1–6 порядков	[29]
Катетеры	Биопленка <i>C. albicans</i> и <i>S. epidermidis</i>	ДНКаза I или ДНКаза из бактерий <i>Vibrio alginolyticus</i> (5 мкг/мл) и биосурфактант <i>Bacillus subtilis</i> (300 мкг/мл)	Снижение концентрации клеток в биопленке на 79–85 %	[30]
Кожа, легких, катетеры	Биопленки <i>C. albicans</i> / <i>S. aureus</i> ; <i>C. albicans</i> / <i>E. coli</i> ; <i>C. albicans</i> / <i>P. aeruginosa</i> ; <i>C. albicans</i> / <i>K. pneumoniae</i>	Лонгидаза (3000 Ед/мл) (бовгигалуронидаза) с флуконазолом (256 мкг/мл)	Совместное применение фермента с противогрибковым препаратом увеличило эффективность действия флуконазола в 4 раза	[31]
Импланты	Биопленки <i>C. albicans</i> и <i>E. faecalis</i>	Глюкозооксидаза с наночастицами Fe_3O_4 (1,0 мг/мл)	Разрушение матрикса биопленки и гибель клеток за счет оксидативного стресса	[32]
Продукты питания	<i>Bacillus cereus</i> sensu lato, <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	ЭндолизинPlyG в комбинации с литическим бактериофагом (vB_BanS_Bcp1) и кодируемым им эндолизином PlyB (0,625 мг/кг)	Выживаемость зараженных сибирской язвой мышей составила 71 %	[33]
Раны	Биопленка <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Коммерческий препарат Flamin®®, в составе которого глюкозооксидаза, лактопероксидаза и гвяякола (1 мас. %)	Гибель клеток на 90 %	[34]
Подводные поверхности	Биопленки бактерий родов <i>Pseudoalteromonas</i> и <i>Rhodobacter</i>	α -химотрипсин (1500 Ед/мл), α -амилаза (83 Ед/мл), липаза (500 Ед/мл)	Снижение адгезии морских микроорганизмов к твердым поверхностям на 90 %	[35]
Стальные поверхности	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Трегалаза (30 мг/л) с сульфатом тетракисгидроксиметил-фосфония (50 мг/л)	Снижение концентрации адгезированных на стальной поверхности биокоррозионных клеток в 5,7 раза и уменьшение потери массы стали на 30 %	[36]
Продукты питания, промышленные системы хранения и трубопроводы	Биопленка <i>Bacillus cereus</i>	Протеаза (1 Ед/мл, pH 8,5, 60 °C) и HNO_3 (10 мл/л)	Полное удаление биопленки	[37]
Легкие, бронхи, технические поверхности	Биопленка разных штаммов клеток <i>P. aeruginosa</i>	Целлюлаза <i>Aspergillus niger</i> (10 Ед/мл) с цефтазидимом (16–256 мкг/мл)	Антибиотик в сочетании с целлюлазой снижает рост биопленки в 32–128 раз в зависимости от штамма бактерий	[38]
Импланты	Биопленки <i>S. mutans</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Streptococcus oralis</i>	Декстраназа (8,75 Ед/мл) и мутаназа (1,75 Ед/мл) в сочетании с Листерином (Johnson&Johnson)	Снижение концентрации клеток бактерий на 3 порядка	[39]
Бронхолегочная система	Биопленки <i>S. aureus</i>	Сухой порошок для ингаляционной терапии с серратиопептидазой (50 мкл/мл) и левофлоксацином (0,25 мг/мл)	Эрадикация биопленки на 85–90 %	[40]
Слизистые поверхности человека	<i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>S. mutans</i> и <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Гидрогель Pluronic® F-127 (20 мас%), содержащий лизоцим (2 мг/мл) и лактоферрин (1 мг/мл)	Ингибиование образования биопленок <i>S. sobrinus</i> и <i>S. mutans</i>	[41]

Продолжение таблицы 1

Объекты	Источник контаминации объекта	Примененные антимикробные комбинации с ферментами	Эффект	Источник литературы
Протезированные суставы	Биопленка <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Термочувствительный гидрогель Pluronic® F127 для лечения перипротезной инфекции суставов с серратиопептидазой (25 мг/мл), ванкомицином (4 мг/мл геля) и микросферами из поли(ε-капролактона) (200 мг/мл гидрогеля)	Ингибиование образования биопленки	[42]

(*S. aureus*, *S. epidermidis* и *E. coli*), формирующиеся в местах протезирования, успешно применялась комбинация ферментов эндо-1,4-β-d-глюканазы, β-1,6-гексозаминидазы и неспецифической РНК/ДНК эндонуклеазы в сочетании с антибиотиками разных классов. Зрелые биопленки обрабатывались ферментами в течение 0,5 ч, а затем инкубировались с антибиотиками, что в результате обеспечивало достижение синергического эффекта и значительного снижения общего остаточного количества жизнеспособных клеток по сравнению с биопленками, обработанными только антибиотиками [19].

Продолжая анализировать успешные варианты применения ферментов в сочетании с антибиотиками для подавления различных микробных инфекций, следует подчеркнуть эффективность применения именно нескольких ферментов, проявляющих разную субстратную специфичность действия в катализитических реакциях. Ферменты, разрушая полисахариды, белки, нукleinовые кислоты, используют, соответственно, разные мишени для воздействия на клетки. Так, например, была показана эффективность использования ряда гидролитических ферментов (α-амилазы, ДНКазы I, лизоцима, липазы, субтилизина A, дисперсина B, цеплюлазы) в комбинации с антимикробными препаратами (моксифлоксацином и меропенемом, амфотерицином B, ванкомицином, каспифунгином) против моно-, двух- и трехвидовых биопленок, формируемых бактериями (*S. aureus*, *E. coli*) и дрожжами (*C. albicans*). При этом надо отметить, что основным компонентом воздействия в исследованных комбинациях ферментов оказался субтилизин A. В его присутствии были отмечены наибольшие успехи в снижении биомассы всех протестированных биопленок (до 90 %) [24].

Надо отметить, что микробный состав биопленок во многом определяет не только тип применяемых антимикробных средств (антибактериальные препараты, фунгициды, их смесь), но и состав ферментов, вводимых в комбинации с ними. Так, для ингиби-

вания дрожжевых биопленок *C. albicans* эффективной оказалась дезоксирибонуклеаза I (ДНКаза I) в комбинации с различными противогрибковыми препаратами. Было показано, что амфотерицин B в сочетании с ДНКазой позволяет в 100 раз снизить концентрацию клеток в биопленке. С другой стороны, сочетание того же фермента с каспифунгином и флуконазолом оказалось неэффективным [23].

Было показано, что грибы *Aspergillus fumigatus* образуют биопленки, в структуре которых с помощью флуоресцентной микроскопии и количественного ПЦР-анализа было показано наличие внеклеточной (так называемой экологической) ДНК, аналогично тому, как она присутствует и в бактериальных биопленках. Эта информация была использована, и архитектурная целостность грибной биопленки была дестабилизирована обработкой ферментом ДНКазой. Комбинации этого фермента с амфотерицином B и каспифунгином значительно повышали эффективность противогрибковых препаратов, в результате чего удалось снизить концентрации применяемых фунгицидов в 8 раз, чтобы добиться аналогичных результатов в отсутствии фермента [25].

Известно, что *Enterococcus* могут быть причиной серьезных тканевых поражений, в их числе раневые инфекции, эндокардит, менингит, а также инфекции мочевыводящих путей. Для подавления этих бактерий известно применение ванкомицина, который мало эффективен, особенно в отношении биопленок, вследствие своей плохой биодоступности. Однако эффективность действия антибиотика может быть значительно повышенена при его использовании в комбинации с ферментами ДНКаза I и альгинатлиазой (подтверждено на клинических изолятах) [26].

Интересно отметить, анализируя известные результаты по применению ванкомицина, что его комбинирование с разными ферментами позволяет по-разному влиять на биопленки, различающиеся по своей стадии формирования. Так, на примере би-

пленки патогенных бактерий *S. aureus* было установлено, что использование ванкомицина, а также рифампицина в сочетании с дисперсином В (1 мкг/мл) значительно снижает жизнеспособность биопленок полисахаридного типа (флоккулярного типа) и в гораздо меньшей степени биопленок, содержащих уже белок-адгезин, то есть уже прикрепленных к поверхности. При этом обработка лизостафином в дозе 1 мкг/мл сама по себе приводила к снижению клеток в составе биопленок, а в сочетании с ванкомицином и рифампицином в дозе 5 мг/мл достигалась полная гибель всех бактерий в составе биопленок вне зависимости от их стадия развития [29]. α -Амилаза и серрапептаза в сочетании с ванкомицином или рифампицином обеспечивали только значительное снижение на 1–4 порядка численности бактерий в биопленках, но не полную гибель всех клеток. При этом серрапептаза в сочетании с обоими антибиотиками в лучшем варианте приводила к снижению количества клеток на 6 порядков [29].

Еще одним интересным решением задачи по усилению действия антимикробных веществ является привнесение в их комбинацию с ферментами дополнительного комплексообразующего агента, способного связывать ионы металлов, которые должны присутствовать в активных центрах важных клеточных ферментов. Так для элиминирования бактериальных биопленок, сформированных клетками *P. aeruginosa* и *S. aureus*, применялась их комбинированная обработка различными коммерчески доступными антисептиками, протеазами и этилендиаминетрауксусной кислотой (ЭДТА). В поиске возможных синергических эффектов ЭДТА (20 мМ) в сочетании с антисептиком наносили на биопленки, что приводило к их разрушению и гибели клеток на 99 %. В этой связи дополнительное введение ферmenta уже не улучшало эффективность такой обработки. Однако при снижении концентрации ЭДТА в 2 раза, добавление ферmenta приводило к полному уничтожению плотных биопленок как *P. aeruginosa*, так и *S. aureus*. Поскольку ЭДТА может осуществлять вывод металлов не только из активных центров ферментов бактерий, но и клеток обрабатываемых тканей человека, проявляя, таким образом, токсичный эффект, то использование ферментов фактически позволило снизить подобную токсичность, сохранив необходимый положительный антимикробный результат [27].

Эффективной против дрожжевой-бактериальной биопленки, содержащей *C. albicans*

и *S. epidermidis*, оказалась комбинация биосurfактанта (300 мкг/мл), представляющего собой липопептид, состоящий из пирроло[1,2-*a*]пиразин-1,4-диона, гексагидро-3-(фенилметил)-, метилового эфира октадекановой кислоты и метилового эфира гексадекановой кислоты, с ДНКазой I или ДНКазой из морских бактерий *Vibrio alginolyticus* (5 мкг/мл). Было установлено значительное ингибирование роста биопленки (на 79–85 %). Полученный эффект достигался за счет снижения поверхностного натяжения, что предотвращало прилипание микробных клеток к поверхности [30]. То есть применение поверхностно-активного вещества (ПАВ) (рисунок 1), обладающего антимикробными свойствами, в комбинации с ферментами оказалось весьма эффективным в своем воздействии на биопленки, содержащие про- и эукариотические клетки.

Еще одним примером использования комбинирования ферментов с веществами, проявляющими свойства, характерные для ПАВ, является применение смеси гидролитических ферментов (декстраназы и мутаназы) с клинически используемым противомикробным препаратом Листерином, содержащим различные эфирные масла. Декстраназа и мутаназа синергически разрушали матрицу биопленки, заметно усиливая действие Листерина (снижение концентрации клеток было в 1000 раз по сравнению с одним только противомикробным препаратом). Стоит отметить, что Листерин без ферментов воздействовал только на *S. mutans* и не действовал на *Actinomyces naeslundii* и *Streptococcus oralis* [39].

Для подавления еще более сложных по составу биопленок, в частности, дрожжей *C. albicans* с разными бактериями *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, возникающими при тяжелых инфекциях кожи, легких, а также при развитии катетер-ассоциированных инфекций, была исследована эффективность применения Лонгидазы® в комбинации с фунгицидом (флуконазолом). В результате было установлено, что обработка только одной Лонгидазой® (750 IU) снижала биомассу биопленок дрожжей с различными бактериями на 30–40 %, при этом эффективность воздействия ферmenta зависела от состава внеклеточного матрикса биопленок. Сам флуконазол в таком сочетании клеток был неожиданно малоэффективен по отношению к дрожжам *C. albicans*, в то же время совместное применение ферmenta с противогрибковым препаратом увеличило эффективность действия последнего в 4 раза [31].

Степанов Н.А., Асланлы А.Г., Домнин М.В., Ефременко Е.Н.
Stepanov N.A., Aslanli, A.G., Domnin M.V., Efremenko E.N.

Среди ферментов, относящихся к классу оксидоредуктаз, наиболее часто используемым является глюкозооксидаза, которая эффективно катализирует конверсию глюкозы в глюконовую кислоту и перекись водорода (H_2O_2), что приводит к окислительному стрессу клеток, и способствует повышению уязвимости клеток для антимикробных агентов. Например, были получены наночастицы Fe_3O_4 , модифицированные глюкозооксидазой с высокой эффективностью антибактериального действия в отношении смешанных биопленок *C. albicans* с *E. faecalis*. При контакте наночастиц с биопленкой наблюдалось ее разрушение за счет колебания наночастиц с ферментом, индуцированного магнитным полем, и образования активных форм кислорода, генерируемых ферментом и металлическими наночастицами (рисунок 1), которые в подобной системе выступали в качестве антимикробных агентов [32].

В другом исследовании с глюкозооксидазой было показано, что запатентованный препарат Flaminal®, в состав которого входят глюкозооксидаза, лактопероксидаза и гвяжакол (2-метоксиfenол), подавляет рост различных бактерий, в том числе в составе биопленок *S. aureus*, метициллин-резистентного штамма *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Для 90 % ингибирования сформировавшихся биопленок требовалась всего 1 мас% концентрация препарата. При этом стафилококки были более чувствительны, чем клетки *P. aeruginosa* [34].

Среди различных современных стратегий борьбы с бактериальными патогенами особое внимание уделяется бактериофагам. Бактериофаги, проявляя высокую специфичность воздействия к клеткам-мишеням, синтезируют эндотизины и другие ферменты, которые разрушают бактериальные клетки. Эта противомикробная активность делает их почти идеальными кандидатами в качестве средств биологического контроля присутствия определенных бактериальных патогенов. Например, был выделен фаг *Myoviridae* vB_BanS_Bcp1, антимикробная активность которого была исследована на различных штаммах *B. anthracis* (возбудителя сибирской язвы). При внутривенном введении комбинации фагового эндотизина PlyB в сочетании с другим эндотизином PlyG мышам, зараженным сибирской язвой, выживаемость мышей составила 71 % [33].

Особое место занимают исследования по комбинированному применению ферментов с антимикробными препаратами в решении задач подавления роста и развития биопленок в водных средах. Сюда относятся различные подводные поверхности, подвергающиеся

биокоррозии вследствие биообразаний, влекущих за собой значительные финансовые затраты из-за необходимости дорогостоящего обслуживания и проведения очистки. Для борьбы с биообразованиями применялись краски с биоцидными свойствами, на основе соединений меди. Однако из-за своей высокой и неспецифической токсичности для морских живых объектов они были запрещены. Причем в морских биообразованиях и формировании биопленок участвуют не только бактерии, но и микроводоросли, которые сами синтезируют токсины (микроцистины), которые не только ухудшают качество воды, но и вместе с испарениями попадают в воздух и становятся реspirаторно опасными [43].

Поскольку ЭПС и белки играют ключевую роль в адгезии бактерий к поверхностям, то было исследовано использование нескольких гидролитических ферментов (α-химотрипсин, α-амилаза, липаза), способных воздействовать на соответствующие биополимерные компоненты биопленок в качестве стратегии предотвращения морского биообразования и биокоррозии. Было показано, что по отдельности ни один из ферментов не ингибирировал образование биопленки при индивидуальном применении. Однако комбинация всех трех ферментов снижала образование биопленок почти на 90 % даже без добавления еще каких-либо биоцидов [36].

Реально биокоррозия стальных изделий представляет собой серьезную угрозу техническим средствам во нефтегазовой, водо- и интернет-снабжающей, военной областях. Биопленки сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio vulgaris* часто участвуют в процессах биокоррозии в микроаэрофильных и анаэробных (придонных) условиях. Применяемые биоциды характеризуются низкой эффективностью действия против анаэробных биопленок, однако, как показали исследования, на формирование анаэробной биопленки может влиять трегалоза – дисахарид, регулирующий число водородных связей, формирующихся в микроокружении поверхности бактериальных клеток. Учитывая это, фермент трегалаза был протестирован в качестве усилителя действия биоцида сульфата тетракис(гидроксиметил)fosфония, который используют для ингибирования роста биопленок *Desulfovibrio vulgaris* на углеродистой стали. Лабораторные исследования показали, что присутствие трегалазы приводило к 5,7-кратному снижению количества адгезированных к стали клеток, снижению потери веса металла за счет ингибирования биокоррозии на 30 % по сравнению с обработкой только одним биоцидом [36].

Бактериальные биопленки, образующиеся на поверхностях при производстве и хранении сырья и продуктов питания, приводят к их порче и потенциальному риску для человека, накапливая бактериальную биомассу, продукирующую токсины [8]. Из-за повышенной устойчивости биопленок к традиционным процессам дезинфекции требуются новые стратегии для предотвращения как их образования, так и их удаления. Эндоспорообразующие бактерии, в частности, *B. cereus*, являются известными патогенами, выявляемыми в продуктах питания. Причина в том, что часто биопленки развиваются в промышленных системах хранения и трубопроводах на пищевых предприятиях, в которых существует остаточная влажная среда после реализованного производственного цикла. Интересно, что очистка технологического оборудования с применением протеазы привела к полному удалению клеток биопленки, тогда как традиционная щелочная обработка не дала такого результата [37].

Была исследована *in vitro* эффективность действия антибиотика цефтазидима и целлюлазы, продуцируемой грибом *Aspergillus niger*, примененных по-отдельности и в комбинации против биопленок *P. aeruginosa*. Цефтазидим и целлюлаза, индивидуально примененные, снижали образование биопленок в водных средах, тем эффективнее, чем более высокая их концентрация использовалась. Комбинация фермента (10 Ед/мл) с антибиотиком (256 мкг/мл) приводила к значительному снижению биомассы биопленок, и концентрация антибиотика в такой комбинации, необходимая для ингибирования биопленок, была в 32 раза меньше, чем та, что давала тот же эффект без фермента [38].

Стабилизированные формы ферментов в составе комбинированных фермент-содержащих антимикробных препаратах

Одним из важных вопросов, связанных с применением любых катализаторов, включая ферменты, является стабильность проявляемых ими характеристик. Чтобы увеличить стабильность каталитических свойств ферментов при их хранении и использовании, применяют высушивание. Такая форма ферментов пригодна не только для хранения, но и даже для их применения. Так, например, в экспериментах *in vivo* комбинация левофлоксацина и серратиопептидазы использовалась при лечении инфекций, вызываемых *S. aureus*. Было установлено уничтожение биопленки на 90 % при ингаляционном лечении инфицированных крыс [40], при этом для ингаляций применялся сухой порошкообразный

комбинированный фермент-содержащий препарат. Нанесения сухих форм ферментов возможно и на раневые поверхности, где существует экссудат, создающий необходимые условия для гидролитического катализа. При этом сухая форма фермента может использоваться в составе перевязочных и влагосорбирующих материалов, использование которых далее будет обсуждаться отдельно.

Помимо высушивания ферменты могут быть стабилизированы в составе различных носителей и матриков. Интересными представляются решения, направленные на использование для этих целей разнообразных гелевых систем. Например, был получен наногель, функционализированный алкалазой в сочетании с антибиотиком ципрофлоксацином, который позволял полностью устранить биопленки *S. aureus* в течение 6 ч. Частицы наногеля, покрытые алкалазой, не проявляли токсичности, и поэтому продемонстрированный нанотехнологический подход потенциально может стать очень мощным средством лечения хронических раневых инфекций [21].

Фицин, иммобилизованный на хитозановом гелевом носителе, позволил сохранить ~90 % исходной активности фермента. Фицин разрушал биопленки стафилококков (*S. aureus*), повышая эффективность антибактериальных препаратов. В частности, площадь кожных ран у инфицированных крыс после обработки фицином с антибиотиком уменьшалась в 2 раза через 4 суток со снижением концентрации клеток бактерий в биопленках в 1000 раз [22].

Был исследован антибактериального эффект введения в гель полоксамера 407 с торговым названием Pluronic F-127, фермента лизоцима, а также белка лактоферрина против бактерий *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus acidophilus*. Данный гель проявлял противомикробную активность в отношении всех протестированных бактерий и эффективно ингибировал образование биопленок как *S. sobrinus*, так и *S. mutans* [41].

Был получен термочувствительный гель на основе плюроника, содержащий фермент серратиопептидазу и антибиотик ванкомицин. Была проведена оценка *in vitro* эффективности действия этой комбинации против перипротезной инфекций суставов. Анализ показал снижение количества бактериальных клеток. Фермент увеличивал антибиопленочную активность ванкомицина, однако увеличение концентрации фермента в применяемой комбинации в 2 раза без изменения концентрации антибиотика не приводило к увеличению оказываемого антимикроб-

ного эффекта. Очевидно, что соотношение антибиотик/фермент в применяемых комбинациях имеет решающее значение для получения максимально эффективных антимикробных препаратов [27]. Эти соотношения необходимо проверять экспериментально, но прогнозировать их можно на основе применения компьютерных методов молекулярного моделирования взаимодействий ферментов с различными эффекторами, которые широко применяются сегодня в энзимологии.

Фермент-содержащие антимикробные комбинации в составе тканевых материалов

Отдельный интерес по отношению к фермент-содержащим комбинациям с антимикробными агентами представляют различные носители, в том числе тканевые. Они, с одной стороны, повышают стабильность ферментов, а с другой стороны, фактически

локализуют и поддерживают присутствие обсуждаемых комбинаций в месте применения, а именно: перевязочные материалы – на раневых поверхностях, защитные костюмы – на теле человека, защитные материалы – в системах фильтрации и сорбции для защиты дыхательной системы, при изоляции продуктов питания, различных технических поверхностей и т.д. (таблица 2) [44–52]. При этом в качестве носителей могут использоваться натуральные, синтетические, смесевые и композитные материалы, поверхность которых может быть химически модифицирована, в том числе сшивирующими агентами, или вступать в нековалентные взаимодействия с ферментами, надежно удерживая их таким образом.

Хлопковый текстиль с антимикробными свойствами был разработан путем поверхностной модификации материала

Таблица 2 – Результаты исследования различных фермент-содержащих комбинаций с антимикробным действием, иммобилизованных на различных материалах

Объекты воздействия (микроорганизмы)	Фермент-содержащая антимикробная комбинация на носителе	Эффект	Источник литературы
Бактерии <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и дрожжи <i>C. albicans</i>	Хлопковый текстиль с иммобилизованными ферментами из препаратов Tertamyl 2X (α-амилаза) и Bioprep 3000L (щелочная пектиназа)	Повышение антимикробной активности по сравнению с Tertamyl 2X в отношении клеток <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> и <i>C. albicans</i> , а также частично в отношении <i>P. aeruginosa</i>	[44]
Бактерии <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Эвгенол-содержащие нанокапсулы человеческого сывороточного альбумина и шелкового фиброна со смесью хлопка/полиэтилентерефталата, функционализированных ферментами (целлюлазным комплексом и кутиназой)	Ингибирование роста <i>S. aureus</i> и <i>E. coli</i> на 81 и 33 % соответственно	[45]
Бактерии <i>S. aureus</i>	Рекомбинантный ферментный препарат AuresinePlus, содержащий автолизин LytM, был иммобилизован в многослойном нетканом материале, полученном на основе полиглактид-ко-гликолида с хитозаном	Уничтожение бактерий на 99,4 ± 0,6 %	[46]
Бактерии <i>E. coli</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Rhodococcus ruber</i> , <i>B. subtilis</i> и дрожжи <i>Candida</i> sp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Torulopsis</i> sp., <i>Trichosporon beigelii</i>	His ₆ -ОРН с бациллацином	Максимальное увеличение эффективности действия бациллацина в отношении клеток грамотрицательных бактерий и ряда штаммов дрожжей в 2,8 и 9,3 раз соответственно	[47]
Бактерии <i>P. aeruginosa</i> и <i>E. coli</i>	Послойное нанесение комбинации ферментов (ацилазы и α-амилазы) на силиконовые трубы катетеризованных животных	Полное уничтожение биопленок за 7 суток <i>in vivo</i>	[48]
Бактерии <i>Pseudomonas</i> sp., <i>B. subtilis</i>	Пенициллинацилаза и His ₆ -ОРН с полимиксином В и колистином иммобилизовались на различных тканевых носителях	Увеличение эффективности действия от 12,5 до 35 раз в сравнении с антибиотиками	[48]

Продолжение таблицы 2

Объекты воздействия (микроорганизмы)	Фермент-содержащая антимикробная комбинация на носителе	Эффект	Источник литературы
Бактерии <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>B. subtilis</i>	His ₆ -ОРН с β-лактамными антибиотиками (ампициллин, меропенем, имипенем, цефтриаксон) и АМП (индолицидин, темпорин А)	Увеличение эффективности антифунгального действия	[49–51]
Бактерии <i>E. coli</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Rhodococcus ruber</i> , <i>Bacillus subtilis</i> и дрожжи <i>Candida</i> sp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Torulopsis</i> sp., <i>Trichosporon beigelii</i>	His ₆ -ОРН с бациллазином	Максимальное увеличение эффективности действия бациллазина в отношении клеток грамотрицательных бактерий и ряда штаммов дрожжей в 2,8 и 9,3 раз соответственно	[52]

и иммобилизации ферментных коммерческих препаратов Termamyl 2X (α-амилаза) и Bioprep 3000L (щелочная пектиназа) [44]. Полученный материал был применен против клеток *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и *C. albicans*. Оказалось, что хлопок с Bioprep 3000L проявляет более высокую антимикробную активность по сравнению с Termamyl 2X в отношении протестированных клеток.

С целью производства «антимикробного текстиля» был изучен вариант объединения эвгенол-содержащих нанокапсул человеческого сывороточного альбумина в шелковом фиброне со смесью хлопка/полиэтилентерефталата (ПЭТ). Полученный материал был дополнительно функционализирован ферментами (целлюлазный комплекс и кутиназа) и ингибирал рост *S. aureus* и *E. coli* на 81 и 33 % соответственно [45].

Включение ферментов в перевязочные материалы и создание, так называемых, энзимиотиков (Enzybiotics – антимикробных препаратов на основе ферментов), для улучшения их антимикробных свойств на сегодняшний день представляет большой научно-практический интерес. В этой связи были разработаны антимикробные раневые повязки на основе нетканых материалов с ферментами (AuresinePlus). Такие повязки позволяют доставлять фермент непосредственно в инфицированную рану, улучшая их высвобождение из материала в активной каталитической форме. Были протестированы различные методы иммобилизации фермента, и было показано, что как физически адсорбированные, так и ковалентно связанные ферменты (с использованием N-гидроксисукциниимида/N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодииимида) проявляли высокую антибактериальную активность [46].

Особое внимание при разработке перевязочных материалов уделяется изучению теоретических и практических подходов к иммобилизации ферментов на различных производных наноцеллюлозы, которая, являясь природным материалом, характеризуется высокой биосовместимостью, химической стабильностью и хорошей гигроскопичностью. Для этих целей бактериальную целлюлозу (БЦ) использовали в качестве носителя для комбинаций антимикробных пептидов (АМП) с ферментами – пенициллинацилазой и гексагистидинсодержащей органофосфатидилазой (His₆-ОРН), гидролизующими бактериальные молекулы QS. В качестве АМП использовались полимиксин В и колистин. Анализ антибактериальной активности приготовленных образцов БЦ с указанными комбинациями *in vitro* подтвердил их эффективность против грамотрицательных *Pseudomonas* sp. и грамположительных *B. subtilis* [47]. Оказалось, что комбинации пенициллинацилаза/колистин и His₆-ОРН/колистин, обеспечивают 13-кратное (*B. subtilis*) и 35-кратное (*Pseudomonas* sp.) увеличение эффективности действия АМП.

Для борьбы с бактериальными биопленками на силиконовые катетеры методом послойного осаждения наносились ферменты ацилаза и α-амилаза [48]. Комбинирование обоих ферментов приводило не только к значительному снижению роста и формированию одновидовых (*P. aeruginosa*) и смешанных (*P. aeruginosa* и *E. coli*) биопленок, но и к их полной эрадикации за 7 суток при проведении исследований на животных *in vivo*.

Комбинирование ферментов с антимикробными агентами оказалось весьма перспективным для получения защитных материалов с выраженной химико-биологи-

ческой защитой [53, 54]. Фермент His₆-ОРН был успешно использован для таких целей, причем как в сочетании с наночастицами металлов [20, 53], так и в комбинации с АМП и антибиотиками [48–55]. Действие разработанных фермент-содержащих образцов защитных материалов оценивалось по отношению к различным бактериям (*B. subtilis* и *E. coli*), при этом контролировалась гидролитическая активность His₆-ОРН в составе тканевых материалов. Интерес в таком контроле состоял в том, что данный фермент способен катализировать не только гидролиз фосфорорганических соединений, но и молекул QS, причем как бактерий, так и грибов [56]. В результате численность бактериальных клеток на поверхности материала снижалась в разы. Кроме того, большая часть ферментной активности сохранялась в материалах в отношении пестицида параоксона [20].

Было установлено, что β-лактамные антибиотики (ампициллин, меропенем, имипенем, цефтриаксон) и различные АМП могут оказывать стабилизирующее воздействие на His₆-ОРН за счет образования нековалентных полиэлектролитных комплексов с молекулой фермента [55, 56]. Среди исследованных АМП наибольшую эффективность в отношении клеток грамотрицательных бактерий проявила комбинация индолицидина/His₆-ОРН, а в отношении клеток грамположительных бактерий – комбинация полимиксина В/His₆-ОРН (таблица 3).

Было выявлено заметное улучшение антибактериальной эффективности бациллазина в отношении *Pseudomonas* sp. при его сочетании с His₆-ОРН. Также показано, что комбинация His₆-ОРН/бациллазин против ряда штаммов дрожжей позволяет существенно снизить (в 9,3 раза) ингибирующую концентрацию самого АМП [52]. При этом исследования были проведены для всех указанных сочетаний фермента с АМП как в отсутствии носителя, в качестве которого была выбрана БЦ, так и в иммобилизованном виде. Следует отметить, что, БЦ, выбранная для нанесения тех или иных фермент-содержащих антимикробных комбинаций при использовании одного и того же фермента, неоднозначно влияла на получаемый результат (таблица 3). Этот факт свидетельствует о том, что не только взаимодействие фермента с носителем может определять эффективность получаемой комбинации, но и антимикробные агенты сами, вероятно, взаимодействуют с носителем, и это влияет на их свойства. Например, было установлено, что ферменты лактоназа AiiA и металло-β-лактамаза NDM-1 могут гидролизовать лактон-содержащие мо-

Таблица 3 – Увеличение эффективности действия различных АМП в комбинации с His₆-ОРН, применяемой в растворимой форме или нанесенной на бактериальную целлюлозу, против грамположительных и грамотрицательных бактериальных клеток [20, 48–51]

АМП	Бактерии	Увеличение эффективности, раз
Без бактериальной целлюлозы		
Бациллазин	<i>Pseudomonas</i> sp.	2,8
Индолицидин		156,7
Темпорин А		22,9
Бациллазин	<i>B. subtilis</i>	1,0
Индолицидин		1,8
Темпорин А		3,6
На бактериальной целлюлозе		
Колистин	<i>Pseudomonas</i> sp.	30,7
Полимиксин В		3,8
Индолицидин		2,7
Темпорин А		1,9
Колистин	<i>B. subtilis</i>	4,4
Полимиксин В		12,9
Индолицидин		5,4
Темпорин А		1,5

лекулы QS грибов и сами проявлять высокую антифунгальную активность в отношении клеток различных мицелиальных грибов [56]. Предположительно комбинирование данных ферментов, как между собой, так и с различными антимикробными агентами в составе противомикробных материалов также может позволить значительно улучшить действие последних в отношении широкого спектра микроорганизмов, однако это еще предстоит проверить.

Заключение

Анализируя представленный материал, отражающий современные тенденции использования разных ферментов в комбинации с разнообразными антимикробными агентами, можно сделать несколько основных выводов:

1. Разработка и применение подобных комбинаций позволяет существенно улучшить антимикробную эффективность действия применяемых противомикробных средств, при этом не только против бактериальных патогенов, относящимся к числу ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) и проявляющих высокую устойчивость к действию антибиотиков, но и улучшить

Ферменты в составе комбинированных антимикробных средств как улучшители их действия
Enzymes in the Content of Combined Antimicrobials as Improvers of Their Action

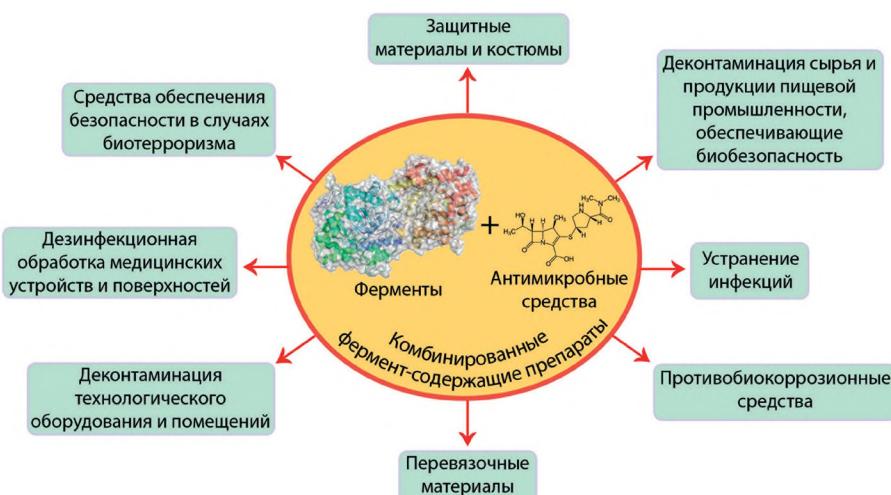


Рисунок 2 – Области потенциального применения комбинированных фермент-содержащих препаратов антимикробного действия (рисунок подготовлен авторами для обзора)

воздействие на клетки грибов, внесенных в международный лист опасных грибных патогенов;

2. Обсуждаемые фермент-содержащие комбинации с антимикробными агентами могут эффективно применяться не только против отдельных клеток микроорганизмов, но главное – против микробных биопленок, в составе которых клетки разных микроорганизмов пребывают в состоянии кворума и повышенной резистентности к противоми-

кробным воздействиям, при этом такие биопленки могут иметь высокую гетерогенность состава и включать разные про- и эукариотические клетки, в том числе различных патогенов;

3. Формы и области применения (рисунок 2) разрабатываемых фермент-содержащих комбинаций с антимикробным действием могут быть весьма разнообразными, а стабильность проявляемых ими свойств – высокой.

Список источников/References

- Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis.* 2024;24:E428–38.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8)
- Fisher MC, Denning DW. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21:211–2.
<https://doi.org/10.1038/s41579-023-00861-x>
- Rather MA, Gupta K, Bardhan P, Rather, Borah M, Sarkar, A. et al. Microbial biofilm: a matter of grave concern for human health and food industry. *J Basic Microbiol.* 2021;61(5):380–95.
<https://doi.org/10.1002/jobm.202000678>
- Kochina TA, Kondratenko YA, Shilova OA, Vlasov DY. Biocorrosion, biofouling, and advanced methods of controlling them. *Prot Met Phys Chem Surf.* 2022;58(1):129–50.
<https://doi.org/10.1134/S2070205122010129>
- Liu X, Koestler RJ, Warscheid T, Katayama Y, Gu JD. Microbial deterioration and sustainable conservation of stone monuments and buildings. *Nat Sustain.* 2020;3(12):991–1004.
<https://doi.org/10.1038/s41893-020-00602-5>
- Авдеева МГ, Зотов СВ, Кулбужева МИ, Мошкова ДЮ, Журавлева ЕВ. Грибковые осложнения при новой коронавирусной инфекции COVID-19. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2021;26(6):252–69.
<https://doi.org/10.17816/EID108872>
- Avdeeva MG, Zотов SV, Kulbuzheva MI, Moshkova DY, Zhuravleva EV. Fungal complications with the new coronavirus infection COVID-19. *Epidemiology and Infectious Diseases.* 2021;26(6):252–69.
<https://doi.org/10.17816/EID108872>
- Филонов ВВ, Щеренко ВВ, Попов ЮЕ, Терещатов ВЭ. Биологические лаборатории в Кавказском регионе как источники угроз национальной безопасности России. *Вестник войск РХБ защиты.* 2022;6(3):258–70.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-3-258-270>

Степанов Н.А., Асланлы А.Г., Домнин М.В., Ефременко Е.Н.
Stepanov N.A., Aslanli, A.G., Domnin M.V., Efremenko E.N.

- Filonov VV, Shcherenko VV, Popov YE, Tereshchatov VE. Biological laboratories in the caucasus region as sources of threats to Russia's national security. *Journal of NBC Protection Corps.* 2022;6(3):258–70.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-3-258-270>
8. Супотницкий МВ. Биологические свойства бактериальных токсинов. *Вестник войск РХБ защиты.* 2024;8(1):34–64. EDN:jtrfxo
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-1-34-64>
- Supotnitskiy MV. The Biological properties of bacterial toxins. *Journal of NBC Protection Corps.* 2024;8(1):34–64. EDN:jtrfxo
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-1-34-64>
9. Kulshrestha A, Gupta P. Combating polymicrobial biofilm: Recent approaches. *Folia Microbiol.* 2023;68(4):495–505.
<https://doi.org/10.1007/s12223-023-01070-y>
10. Sharma S, Mohler J, Mahajan SD, Schwartz SA, Bruggemann L, Aalinkeel R. Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment. *Microorganisms.* 2023;11(6):1614.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>
11. Tits J, Cammue BPA, Thevissen K. Combination therapy to treat fungal biofilm-based infections. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8873.
<https://doi.org/10.3390/ijms21228873>
12. Lyagin I, Efremenko E. Enzymes for detoxification of various mycotoxins: origins and mechanisms of catalytic action. *Molecules.* 2019;24(13):2362.
<https://doi.org/10.3390/molecules24132362>
13. Thallinger B, Prasetyo EN, Nyanhongo GS, Guebitz GM. Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol J.* 2013;8(1):97–109.
<https://doi.org/10.1002/biot.201200313>
14. Efremenko E, Senko O, Stepanov N, Aslanli A, Maslova O, Lyagin I. Quorum sensing as a trigger that improves characteristics of microbial biocatalysts. *Microorganisms.* 2023;11(6):1395.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11061395>
15. Gliźniewicz M, Miłek D, Olszewska P, Czajkowski A, Serwin N, Cecerska-Heryć E, et al. Advances in bacteriophage-mediated strategies for combating polymicrobial biofilms. *Front Microbiol.* 2024;14:1320345.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1320345>
16. Efremenko E, Stepanov N, Aslanli A, Lyagin I, Senko O, Maslova O. Combination of enzymes with materials to give them antimicrobial features: modern trends and perspectives. *J Funct Biomater.* 2023;14(2):64.
<https://doi.org/10.3390/jfb14020064>
17. Fanaei Pirlar R, Emaneini M, Beigverdi R, Banar M, B van Leeuwen W, Jabalameli F. Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the wound-like medium. *PLoS One.* 2020;15(6):e0235093.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235093>
18. Iñiguez-Moreno M, Gutiérrez-Lomelí M, Avila-Novoa MG. Removal of mixed-species biofilms developed on food contact surfaces with a mixture of enzymes and chemical agents. *Antibiotics.* 2021;10(8):931.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10080931>
19. Poilvache H, Ruiz-Sorribas A, Cornu O, Van Bambeke F. In vitro study of the synergistic effect of an enzyme cocktail and antibiotics against biofilms in a prosthetic joint infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(4):e01699-20.
<https://doi.org/10.1128/aac.01699-20>
20. Lyagin I, Stepanov N, Frolov G, Efremenko E. Combined modification of fiber materials by enzymes and metal nanoparticles for chemical and biological protection. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1359.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031359>
21. Weldrick PJ, Hardman MJ, Paunov VN. Enhanced clearing of wound-related pathogenic bacterial biofilms using protease-functionalized antibiotic nanocarriers. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(47):43902–19.
<https://doi.org/10.1021/acsami.9b16119>
22. Baidamshina DR, Koroleva VA, Trizna EY, Pankova SM, Agafonova MN, Chirkova MN, et al. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin. *Int J Biol Macromol.* 2020;164:4205–17.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.030>
23. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses.* 2012;55(1):80–5.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x>

24. Ruiz-Sorribas A, Poilvache H, Kamarudin NHN, Braem A, Van Bambeke F. Hydrolytic enzymes as potentiators of antimicrobials against an inter-kingdom biofilm model. *Microbiol Spectr*. 2022;10(1):e02589-21.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.02589-21>
25. Rajendran R, Williams C, Lappin DF, Millington O, Martins M. Extracellular DNA release acts as an antifungal resistance mechanism in mature *Aspergillus fumigatus* biofilms. *Eukaryot Cell*. 2013;12(3):420–9.
<https://doi.org/10.1128/ec.00287-12>
26. Torelli R, Cacaci M, Papi M, Sterbini FP, Martini C, Posteraro B, et al. Different effects of matrix degrading enzymes towards biofilms formed by *E. faecalis* and *E. faecium* clinical isolates. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;158:349–55.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.010>
27. Lefebvre E, Vighetto C, Di Martino P, Garde VL, Seyer D. Synergistic antibiofilm efficacy of various commercial antisepsics, enzymes and EDTA: a study of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(2):181–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.05.008>
28. Wang H, Wang H, Xing T, Wu N, Xu X, Zhou G. Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. *LWT-Food Sci Technol*. 2016;66:298–304.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.049>
29. Hogan S, Zapotoczna M, Stevens NT, Humphreys H, O'Gara JP, O'Neill E. Potential use of targeted enzymatic agents in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. *J Hosp Infect*. 2017;96(2):177–82.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.02.008>
30. Srikanth R, Banu SF, Sowndarya J, Parveen JHS, Rubini D, Wilson A, et al. Biosurfactant synergized with marine bacterial DNase disrupts polymicrobial biofilms. *Folia Microbiol*. 2021;66(5):831–42.
<https://doi.org/10.1007/s12223-021-00876-y>
31. Gatina A, Trizna E, Kolesnikova A, Baidamshina D, Gorshkova A, Drucker V, et al. The bovhyaluronidase azoximer (Longidaza®) disrupts *Candida albicans* and *Candida albicans*-bacterial mixed biofilms and increases the efficacy of antifungals. *Medicina*. 2022;58(12):1710.
<https://doi.org/10.3390/medicina58121710>
32. Ji Y, Han Z, Ding H, Xu X, Wang D, Zhu Y, et al. Enhanced eradication of bacterial/fungi biofilms by glucose oxidase-modified magnetic nanoparticles as a potential treatment for persistent endodontic infections. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(15):17289–99.
<https://doi.org/10.1021/acsami.1c01748>
33. Schuch R, Pelzek AJ, Nelson DC, Fischetti VA. The PlyB endolysin of bacteriophage vB_BanS_Bcp1 exhibits broad-spectrum bactericidal activity against *Bacillus cereus sensu lato* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2019;85(9):e00003-19.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00003-19>
34. Cooper RA. Inhibition of biofilms by glucose oxidase, lactoperoxidase and guaiacol: the active antibacterial component in an enzyme alginogel. *Internat Wound J*. 2013;10(6):630–7.
<https://doi.org/10.1111/iwj.12083>
35. Zanaroli G, Negroni A, Calisti C, Ruzzi M, Fava F. Selection of commercial hydrolytic enzymes with potential antifouling activity in marine environments. *Enzyme Microb Technol*. 2011;49(6-7):574–9.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.05.008>
36. Wang D, Ivanova SA, Hahn R, Gu T. Evaluation of trehalase as an enhancer for a green biocide in the mitigation of *Desulfovibrio vulgaris* biocorrosion of carbon steel. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2022;45(4):659–67.
<https://doi.org/10.1007/s00449-021-02684-7>
37. Kumari S, Sarkar PK. Optimisation of *Bacillus cereus* biofilm removal in the dairy industry using an in vitro model of cleaning-in-place incorporating serine protease. *Int J Dairy Technol*. 2018;71(2):512–8.
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12454>
38. Kamali E, Jamali A, Izanloo A, Ardebili A. In vitro activities of cellulase and ceftazidime, alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *BMC Microbiol*. 2021;21:1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02411-y>
39. Ren Z, Kim D, Paula AJ, Hwang G, Liu Y, Li J, et al. Dual-targeting approach degrades biofilm matrix and enhances bacterial killing. *J Dent Res*. 2019;98(3):322–30.
<https://doi.org/10.1177/002203451881848>
40. Gupta PV, Nirwane AM, Belubbi T, Nagarsenker MS. Pulmonary delivery of synergistic combination of fluoroquinolone antibiotic complemented with proteolytic enzyme: A novel antimicrobial and antibiofilm strategy. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2017;13(7):2371–84.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.011>

Степанов Н.А., Асланлы А.Г., Домнин М.В., Ефременко Е.Н.
Stepanov N.A., Aslanli, A.G., Domnin M.V., Efremenko E.N.

41. Tonguc-Altin K, Sandalli N, Duman G, Selvi-Kuvvetli S, Topcuoglu N, Kulekci G. Development of novel formulations containing lysozyme and lactoferrin and evaluation of antibacterial effects on mutans *Streptococci* and *Lactobacilli*. *Arch Oral Biol*. 2015;60(5):706–14.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.02.004>
42. Sarıgöl E, Ekizoğlu M, Pehlivan SB, Bodur E, Sağıroğlu M, Çalış S. A thermosensitive gel loaded with an enzyme and an antibiotic drug for the treatment of periprosthetic joint infection. *J Drug Deliv Technol*. 2018;43:423–29.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.11.004>
43. Wiśniewska K, Śliwińska-Wilczewska S, Savoie M, Lewandowska AU. Quantitative and qualitative variability of airborne cyanobacteria and microalgae and their toxins in the coastal zone of the Baltic Sea. *Sci Total Environ*. 2022;20(826):154152.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154152>
44. Coradi M, Zanetti M, Valério A, de Oliveira D, da Silva A, Ulson SMDAG, et al. Production of antimicrobial textiles by cotton fabric functionalization and pectinolytic enzyme immobilization. *Mater Chem Phys*. 2018;208:28–34.
<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.01.019>
45. Quartinello F, Tallian C, Auer J, Schön H, Vielnascher R, Weinberger S, et al. Smart textiles in wound care: functionalization of cotton/PET blends with antimicrobial nanocapsules. *J Mater Chem B*. 2019;7(42):6592–603.
<https://doi.org/10.1039/c9tb01474h>
46. Urbanek O, Wysocka A, Nakielski P, Pierini F, Jagielska E, Sabała I. *Staphylococcus aureus* specific electrospun wound dressings: influence of immobilization technique on antibacterial efficiency of novel enzybiotic. *Pharmaceutics*. 2021;13(5):711.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050711>
47. Aslanli A, Lyagin I, Stepanov N, Presnov D, Efremenko E. Bacterial cellulose containing combinations of antimicrobial peptides with various QQ enzymes as a prototype of an “enhanced antibacterial” dressing: *in silico* and *in vitro* data. *Pharmaceutics*. 2020;12(2):1155.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121155>
48. Ivanova K, Fernandes MM, Francesko A, Mendoza E, Guezquez J, Burnet M, et al. Quorum-Quenching and matrix-degrading enzymes in multilayer coatings synergistically prevent bacterial biofilm formation on urinary catheters. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(49):27066–77.
<https://doi.org/10.1021/acsami.5b09489>
49. Maslova O, Aslanli A, Stepanov N, Lyagin I, Efremenko E. Catalytic characteristics of new antibacterials based on hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase. *Catalysts*. 2017;7(9):271.
<https://doi.org/10.3390/catal7090271>
50. Aslanli A, Lyagin I, Efremenko E. Novel approach to Quorum Quenching: rational design of antibacterials in combination with hexahistidine-tagged organophosphorus hydrolase. *Biol Chem*. 2018;399(8):869–79.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0162>
51. Aslanli A, Lyagin I, Efremenko E. Charges' interaction in polyelectrolyte (nano)complexing of His₆-OPH with peptides: unpredictable results due to imperfect or useless concept? *Int J Biol Macromol*. 2019;140:368–76.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.137>
52. Aslanli A, Domnin M, Stepanov N, Efremenko E. “Universal” antimicrobial combination of bacitracin and His₆-OPH with lactonase activity, acting against various bacterial and yeast cells. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16):9400.
<https://doi.org/10.3390/ijms23169400>
53. Завьялов ВВ, Завьялова НВ, Холстов ВИ, Ковтун ВА, Гореленков ВК, Фролов ГА и др. Совместное действие металлических и ферментных наночастиц, используемых для функционализации защитных самоочищающихся материалов, нейтрализующих фосфорорганические соединения и обладающих бактерицидной активностью. *Вестник войск РХБ защиты*. 2023;7(2):107–26. EDN: jzeivh
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-7-2-107-126>
- Zavyalov VV, Zavyalova NV, Kholstov VI, Kovtun VA, Gorelenkov VK, Frolov GA, et al. The joint action of metal and enzymatic nanoparticles used for functionalization of protective self-cleaning materials neutralizing organophosphates and possessing bactericide activity. *Journal of NBC Protection Corps*. 2023;7(2):107–26. EDN: jzeivh
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-7-2-107-126>
54. Завьялов ВВ, Завьялова НВ, Холстов ВИ, Ковтун ВА, Гореленков ВК, Фролов ГА. и др. Бактерицидные свойства модульных защитных материалов. *Вестник войск РХБ защиты*. 2022;6(2):123–36. EDN: ombiwn.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-2-123-136>

Ферменты в составе комбинированных антимикробных средств как улучшители их действия
Enzymes in the Content of Combined Antimicrobials as Improvers of Their Action

Zavyalov VV, Zavyalova NV, Kholstov VI, Kovtun VA, Gorelenkov VK, Frolov GA, et al. Bactericidal Properties of Modular Protective Materials. *Journal of NBC Protection Corps.* 2022;6(2):123–36. EDN: ombiwn.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-2-123-136>

55. Efremenko E, Lyagin I, Aslanli A, Stepanov N, Maslova O, Senko O. Carrier variety used in immobilization of His₆-OPH extends its application areas. *Polymers.* 2023;15(3):591.
<https://doi.org/10.3390/polym15030591>

56. Efremenko E, Aslanli A, Domnin M, Stepanov N, Senko O. Enzymes with lactonase activity against fungal quorum molecules as effective antifungals. *Biomolecules.* 2024;14(3):383.
<https://doi.org/10.3390/biom14030383>

Вклад авторов / Authors contributions

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Концептуализация – Е.Н. Ефременко; анализ литературы – Н.А. Степанов, А.Г. Асланлы, М.В. Домнин, Е.Н. Ефременко; написание оригинального текста – Н.А. Степанов, А.Г. Асланлы, Е.Н. Ефременко; подготовка рисунков – Н.А. Степанов, М.В. Домнин; рецензирование и редактирование текста – Н.А. Степанов, Е.Н. Ефременко. Все авторы внесли существенный вклад в подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию рукописи / All authors confirm that their authorship meets the ICMJE criteria. The greatest contribution is distributed as follows: Conceptualization – E.N. Efremenko; literature analysis – N.A. Stepanov, A.G. Aslanly, M.V. Domnin, E.N. Efremenko; writing of the original text – N.A. Stepanov, A.G. Aslanly, E.N. Efremenko; preparation of drawings – N.A. Stepanov, M.V. Domnin; reviewing and editing of the text – N.A. Stepanov, E.N. Efremenko. All the authors made a significant contribution to the preparation of the article, read and approved the final version of the manuscript.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторах / Authors

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3.

Степанов Николай Алексеевич. Научный сотрудник, канд. техн. наук, член коллектива, выполняющего исследование.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0821-8226>

Асланлы Айсель Гюлхан гызы. Научный сотрудник, канд. хим. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1087-6690>

Домнин Максим Владимирович. Аспирант, член коллектива, выполняющего исследование.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9834-0606>

Ефременко Елена Николаевна. Зав. лабораторией, д-р биол. наук, профессор, руководитель коллектива, выполняющего исследование.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6992-854X>

Контактная информация для всех авторов: elena_efremenko@list.ru

Контактное лицо: Ефременко Елена Николаевна; elena_efremenko@list.ru

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Lenin Hills 1-3, Moscow 119991, Russian Federation.

Nikolay A. Stepanov. Cand. Sci. (Techn.). Grant team member.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0821-8226>

Aysel G. Aslanli. Scientific Researcher. Cand. Sci. (Chem.). Grant team member.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1087-6690>

Maksim V. Domnin. Post graduate student, Grant team member.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9834-0606>

Elena N. Efremenko. Laboratory Chief. Dr Sci. (Biol.). Professor. Grant supervisor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6992-854X>

Contact information for all authors: elena_efremenko@list.ru

Contact person: Elena Nikolaevna Efremenko; elena_efremenko@list.ru



Современные аппаратные и программные решения для полногеномного секвенирования, перспективы их внедрения в практику войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации

А.А. Петров, А.В. Казанцев, Е.А. Ковальчук, М.Ю. Павлюков, А.В. Сапкулов,
Д.А. Кутаев, С.В. Борисевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации
141306, Российская Федерация, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11
✉ e-mail: 48cnii@mail.ru

Одним из современных направлений совершенствования лабораторной диагностики инфекционных болезней является внедрение методов секвенирования геномов опасных патогенов. Среди них наибольшее распространение в настоящее время приобрел метод секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS).

Цель работы – определить перспективные направления и проблемы внедрения методов NGS в практику войск РХБ защиты Вооруженных Сил Российской Федерации (войск РХБ защиты ВС РФ).

Источниковая база исследования – данные, опубликованных в отечественных и англоязычных научных изданиях, доступных через сеть Интернет.

Метод исследования – аналитический.

Результаты. Представлены материалы, обобщающие данные о трех поколениях технологий секвенирования (по Сэнгеру, NGS, секвенирования на основе нанопор), рассмотрены их преимущества и недостатки применительно к использованию в практике войск РХБ защиты ВС РФ. Показано, что последние тенденции в инструментах биоинформатики для анализа геномных данных сосредоточены на машинном обучении, облачных приложениях, удобных интерфейсах и программном обеспечении с открытым исходным кодом. Использование параллельных вычислений и оптимизация биоинформационных алгоритмов позволяют повысить эффективность обработки данных NGS секвенирования при неизменности технических характеристик используемого оборудования. Но поскольку большинство биоинформационных программ имеют открытый код, их сертификация органами военного управления представляется маловероятной.

Вывод. Необходимым условием успешного внедрения NGS в практику подразделений войск РХБ защиты ВС РФ является решение двух основных проблем: 1) разработка отечественной аппаратной части (компьютеров достаточной мощности), сертифицированных для защиты информации в установленном порядке и при этом имеющих полный функционал; 2) разработка соответствующих биоинформационных инструментов и баз данных, сертифицированных для защиты информации в установленном порядке и функционирующих в автономном режиме без подключения к сети интернет.

Ключевые слова: биоинформационные инструменты, геном, ДНК, патоген, Сэнгер, секвенирование следующего поколения; секвенаторы

Для цитирования: Петров А.А., Казанцев А.В., Ковальчук Е.А., М.Ю. Павлюков, Сапкулов А.В., Кутаев Д.А., Борисевич С.В. Современные аппаратные и программные решения для полногеномного секвенирования, перспективы их внедрения в практику войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации. Вестник войск РХБ защиты. 2024;8(2):164–175. EDN:obanjc.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-164-175>

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: нет.

Финансирование: Государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

Поступила 08.07.2023 г. После доработки 05.06.2024 г. Принята к публикации 28.06.2024 г.

Modern Hardware and Software Solutions for Whole-Genome Sequencing, Prospects of Their Implementation in the Practice of Nuclear, Chemical and Biological Protection Troops of the Armed Forces of the Russian Federation

Aleksandr A. Petrov, Aleksey V. Kazantsev, Elena A. Kovalchuk, Mikhail Yu. Pavlyukov,
Aleksey V. Sapkulov, Dmitriy A. Kutaev, Sergey V. Borisevich✉

48 Central Scientific Research Institute
of the Ministry of Defense of the Russian Federation,
Oktiabrskaya St., 11, Sergiev Posad-6 141306, Russian Federation
✉ e-mail: 48cnii@mil.ru

One of the promising areas for improving laboratory diagnostics is the active introduction of next-generation sequencing (NGS), which retains the key advantages of molecular tests and allows the detection of a wide range of diverse microorganisms. Despite the significant advantages of NGS in the laboratory diagnosis of infectious diseases, there are also a number of objective obstacles to its widespread use.

The purpose of the work is to consider existing hardware and software solutions for whole-genome sequencing, as well as the prospects and problems of their implementation in the practice of the RCB protection troops of the Armed Forces of the Russian Federation for the identification of pathogens of various etiologies.

The source base of the research includes an analysis of data published in domestic and English-language scientific publications, as well as posted on the Internet.

The research method is analytical.

Results. Materials are presented that summarize data on three generations of sequencing technologies, their advantages and disadvantages. It is shown that with the development of NGS technologies, many technical problems arise that need to be deeply analyzed and solved. Despite its great potential, NGS has not yet been widely adopted in clinical microbiology laboratories, partly due to the lack of standardized workflows.

Conclusions. For the successful use of NGS by units of the RCB protection troops of the Armed Forces of the Russian Federation, it is necessary to solve the main problem, which is the development of domestic hardware, appropriate bioinformatics tools and databases certified in accordance with the established procedure for functioning offline without connecting to the Internet.

Keywords: bioinformatics tools, next-generation sequencing, sequencers

For citation: Petrov A.A., Kazantsev A.V., Kovalchuk E.A., Pavlyukov M.Yu., Sapkulov A.V., Kutaev D.A., Borisevich S.V. Modern Hardware and Software Solutions for Whole-Genome Sequencing, Prospects of Their Implementation in the Practice of Nuclear, Chemical and Biological Protection Troops of the Armed Forces of the Russian Federation. Journal of NBC Protection Corps. 2024;8(2):164–175. EDN:obanjc.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-164-175>

Financial disclosure: The authors have no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest.

Funding: 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation.

Received July 27, 2023. Revised June 10, 2024. Accepted June 27, 2024

Петров А.А., Казанцев А.В., Ковальчук Е.А., М.Ю. Павлюков, Сапкулов А.В., Кутаев Д.А., Борисевич С.В.
Petrov A.A., Kazantsev A.V., Kovalchuk E.A., Pavlyukov M.Yu., Sapkulov A.V., Kutaev D.A., Borisevich S.V.

Методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) благодаря высокой чувствительности, специфичности и воспроизведимости значительно расширили перечень выявляемых патогенов. Однако, ввиду того, что для выявления конкретного микроорганизма используются специфичные праймеры, комплементарные участкам генома микроорганизма, для идентификации требуется проведение одной полимеразной цепной реакции (ПЦР), соответственно. При скрининговых исследованиях и (или) определении неизвестного инфекционного агента требуется проведение значительного количества ПЦР-исследований. Использование комплементарных праймеров для ПЦР означает, что геном детектируемого объекта ранее был изучен. Кроме того, МАНК могут не выявлять новые варианты патогенов, возникшие в результате мутаций в геноме или приобретения новых генетических элементов в результате экспериментов по «усилению функций» [1]. Войска РХБ защиты Вооруженных Сил Российской Федерации (войска РХБ защиты ВС РФ) оснащены диагностическими наборами реагентов на основе МАНК для выявления и идентификации актуальных для ВС РФ патогенных биологических агентов (ПБА) в ходе проведения биологического контроля и специфической индикации, однако существует необходимость своевременного реагирования на вновь возникающие биологические угрозы, вызванные неизвестными ПБА.

Цель работы – определить перспективные направления и проблемы внедрения методов NGS в практику войск РХБ защиты ВС РФ.

Источниковая база исследования – данные, опубликованных в отечественных и англоязычных научных изданиях, доступные через сеть Интернет.

Метод исследования – аналитический.

Задачами данного исследования являлось:

- рассмотрение существующих аппаратных и программных решений для полногеномного секвенирования;
- оценка перспектив и проблем их внедрения в практику войск РХБ защиты ВС РФ для идентификации патогенов различной этиологии.

Секвенирование первого поколения

Секвенирование первого поколения – по Сэнгеру (Sanger sequencing), основано на

ферментативном синтезе комплементарной цепи ДНК по существующей одноцепочечной матрице и на происходящем в разных местах запрограммированном прерывании дальнейшего роста цепи за счет включения в состав растущей молекулы нуклеотида, дезоксирибоза лишен гидроксигруппы по 3'-атому фуранозного гетероцикла. Работающие по технологии Сэнгера капиллярные секвенаторы широко применяются для решения многих рутинных задач секвенирования, при этом секвенирование по Сэнгеру до сих пор считается «золотым стандартом». Ключевыми характеристиками данного поколения секвенирования являются высокая точность вместе с высокой себестоимостью и низкой производительностью исследования [3]. Группой специалистов компании «Синтол» (г. Москва) и Институтом аналитического приборостроения РАН (г. Санкт-Петербург) разработан прибор «Нанофор-05» и расходные материалы к нему, позволяющие осуществлять секвенирование с использованием отечественного оборудования [4]. Секвенирование по Сэнгеру успешно внедрено в практику на лабораторной базе ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России и активно используется для идентификации патогенов. Ограничениями данного метода применительно к сфере биологического контроля является необходимость установления видовой принадлежности ПБА и получения данных по предполагаемой последовательности еще до начала анализа. Ключевым преимуществом данной технологии являются наличие отечественной аппаратной базы, а также возможность проведения анализа без подключения к сети Интернет в отличие от современных биоинформационных инструментов, функционирующих в облачных сервисах.

Секвенирование второго поколения

Секвенирование второго поколения (second-generation sequencing, SGS)¹ – технологии, позволяющие провести исследование генетического материала произвольного объекта путем прочтения массы фрагментированных молекул ДНК с последующей реконструкцией структуры генома или анализом его отдельных локусов. При независимом секвенировании достаточно большого количества отдельных фрагментов ДНК, полученных из исходной нуклеотидной последовательности, найдется другая молекула, частично перекрывающаяся с предыдущей, что

¹ Другие названия данной технологии: массовое параллельное секвенирование (massive parallel sequencing, MPS) или секвенирование следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS). Коммерчески доступны с 2005 г.

позволит реконструировать более длинный участок генома из двух и более прочтений методом наложения с максимальным соотвествием. Данный подход в конечном итоге позволяет реконструировать геном (частично или полностью) *de novo* [2].

Анализ полученных таким образом данных позволяет выявить новые варианты патогенов, информация о геномах которых до момента проведения исследования отсутствует.

Компания Ion Torrent (США) продвигает на рынке одноименный полупроводниковый прибор, в основе которого по факту лежит высокочувствительный pH-метр, позволяющий осуществлять одновременное независимое измерение pH в большом количестве реакционных ячеек [5]. Прибор детектирует и документирует изменения pH, которые выделяются во время полимеризации ДНК, напрямую оцифровывая биологическую молекулу ДНК. К преимуществам таких секвенаторов следует отнести идеологически простые и предсказуемые реакционные взаимодействия (стандартные реагенты, высокие требования только к чистоте дезоксинуклеотидтрифосфатов). Основным недостатком является эффект недостоверного прочтения гомополимерных участков длиной более 3–4 одинаковых нуклеотидов, что ведет к появлению в ридах различных вариантов так называемых инделов (однонуклеотидных вставок и делеций).

Технологию флуоресцентного секвенирования с помощью мостиковой ПЦР (клональной амплификации) с формированием кластеров ДНК, или наношариков ДНК, наработанных посредством линейной репликации по типу катящегося кольца, развивает компания Illumina (США) и BGI Group (КНР) [6]. Данная технология основана на использовании так называемых обратимых терминаторов, по факту представляющих собой дезоксинуклеотидтрифосфаты, несущие различные флуорофоры ковалентно связанные с гетероциклами нуклеотидных оснований с помощью метилазидных linkerов. На каждом шаге синтеза цепи ДНК происходит встраивание комплементарного матрице дезоксинуклеотидтрифосфата, что приводит к остановке синтеза, поскольку 3'-конец растущей молекулы блокирован и недоступен для присоединения следующего основания. После регистрации флуоресценции в конце шага синтеза происходит специфическое удаление linker'a вместе с флуорофором и 3'-конец растущей молекулы снова готов к следующему шагу синтеза. Российским аналогом, эквивалентным по характеристикам

прибору MiSeq компании Illumina является секвенатор ДНК «Нанофор СПС», созданный коллективом авторов Института аналитического приборостроения РАН и компании «Синтол».

Ключевыми преимуществами таких технологий являются высокая точность и производительность, основными недостатками – высокая себестоимость, длительный рабочий цикл и сложная подготовка пробы к анализу.

Огромный массив данных, получаемый исследователем на выходе из полногеномного секвенатора, обуславливает потребность в соответствующих вычислительных мощностях. Общепринятым высокоэффективным подходом к решению данной задачи является аренда вычислительной мощности облачных серверов сети интернет. Очевидно, что данный подход недоступен для российской военной науки по ряду соображений, наиболее значимыми из которых являются режимные. Компромиссным решением может являться использование компьютеров достаточной мощности, позволяющих обрабатывать информацию без доступа к сети интернет и ее вычислительным ресурсам.

Секвенирование третьего поколения

Компания Oxford Nanopore Technologies (Великобритания) выпустила на рынок технологию секвенирования третьего поколения на основе так называемых нанопор [7]. Нанопора представляет собой отверстие нанометрового размера (ионный канал) сквозь который может одновременно проходить только одна молекула ДНК и только определенным образом. Приложении электрического поля ДНК стремится пройти сквозь нанопору, меняя ее ионную проводимость. Изменение ионной проводимости характерно и специфично для каждого из нуклеотидов и именно оно является пошагово регистрируемым прибором аналитическим эффектом. Нанопоровый секвенатор MinION представлен на рисунке 1.

Ключевые преимущества данной технологии: возможность сверхдлинных прочтений ДНК; высокая производительность; отсутствие сложных этапов подготовки проб; и относительно низкая себестоимость. Недостатки – низкая точность; высокие требования к качеству пробы, в частности, несмотря на заявления производителя, анализ проб объектов окружающей среды не представляется возможным по причине преимущественного занятия нанопор доминирующими в смеси ДНК, в то время как емкость чипа достаточно ограничена. Следовательно, в условиях ограничения количества пор и

Петров А.А., Казанцев А.В., Ковальчук Е.А., М.Ю. Павлюков, Сапкулов А.В., Кутаев Д.А., Борисевич С.В.
Petrov A.A., Kazantsev A.V., Kovalchuk E.A., Pavlyukov M.Yu., Sapkulov A.V., Kutaev D.A., Borisovich S.V.



Рисунок 1 – Нанопоровый секвенатор MinION.
Управление и получение данных осуществляется с помощью смартфона ([URL: https://www.skygen.com/katalog/oborudovanie/oxford_nanopore_technologies/nanoporovyj_sekvenator_minion/](https://www.skygen.com/katalog/oborudovanie/oxford_nanopore_technologies/nanoporovyj_sekvenator_minion/));
дата обращения: 07.07.2023)

отсутствия амплификации, вероятность выявить незначительные количества ДНК патогенов на фоне полного доминирования ДНК бактериальной микрофлоры крайне мала.

Таким образом, в настоящее время доступно несколько платформ секвенирования, каждая со своими уникальными функциями, которые предоставляют альтернативные варианты механизмов секвенирования, длины считывания, времени выполнения, простоты использования и масштабируемости (таблица 1) [8].

При имеющихся особенностях в технологических процессах предварительной подготовки образцов нуклеиновых кислот NGS-платформ, общим для них требованием остается создание набора (пула, библиотеки) фрагментов, которые будут в дальнейшем служить матрицей для синтеза комплементарной цепи ДНК, в процессе которого будет происходить детекция последовательно присоединяющихся нуклеотидов [9, 10]. Общая для всех процедура проведения NGS-секвенирования представлена на рисунке 2.

Основными этапами подготовки ДНК для NGS-секвенирования являются: 1) фрагментация целевых последовательностей до желаемой длины, 2) присоединение синтетических олигонуклеотидных адаптеров к концам фрагментов и 3) анализ библиотек для секвенирования.

Для фрагментации ДНК доступны три подхода: физический, ферментативный и химический. Фрагментация ДНК обычно выполняется физическими (обработка ультразвуком) или ферментативными методами (например, неспецифическая обработка специальным ферментом тагментазой) [11]. Сравнения результатов секвенирования библиотек, фрагментированных при помощи обработки ультразвуком по сравнению с

Таблица 1 – Сравнение различных NGS платформ [8]

Производитель / наименование оборудования	Общая продолжительность анализа, ч	Длина прочтения (рида), нуклеотидов	Технология секвенирования	Преимущества	Недостатки
Платформы секвенирования второго поколения					
Illumina (NovaSeq 6000) (США) Нанофор СПС (Россия)	44	500	Секвенирование путем синтеза	Высокая пропускная способность, более низкая стоимость исследования по сравнению с другими платформами	Короткая длина рида, сложная пробоподготовка, необходимость ПЦР-амплификации, длительное время работы
Thermo Fisher Scientific (Ion GeneStudio S5 Prime) (США)	12	600	Полупроводниковое секвенирование		
BGI/Complete Genomics (Китай)	40	200	Формированиеnanoшариков ДНК и секвенирование путем синтеза		
Платформы секвенирования третьего поколения					
PacBio (HiFi Reads) (США)	30	20 000	Одномолекулярное секвенирование	Отсутствие ПЦР-амплификации, требуется меньше исходного материала, низкий процент ошибок при подготовке библиотек	Высокая частота ошибок секвенирования, для обеспечения качества сверхдлинных ридов требуется ДНК высокого качества
Nanopore (PromethION) (Великобритания)	72	25 000	Нанопоровое секвенирование		

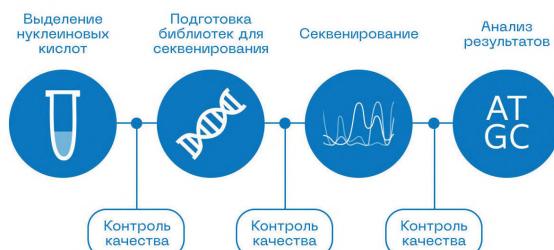


Рисунок 2 – Этапы проведения NGS-секвенирования
(URL: <https://www.skygen.com/podderzhka/obzory/3-etapa-kontrollya-kachestva-kotorye-dolzhen-znat-lyuboy-nsg-issledovately/>;
дата обращения: 24.01.2023)

приготовленных с помощью трансфаззы, показывают, что ультразвуковой метод является более надежным и воспроизводимым, однако требует соответствующего оборудования [12].

Для возможности одновременного анализа нескольких образцов ДНК используется подход мультиплексирования библиотек целью которого является присвоение каждой из библиотек специальных коротких нуклеотидных кодов (индексов). Для этого используются адаптеры с набором олигонуклеотидных последовательностей, введенных в их структуру (8–18 нуклеотидными индексами), позволяющими после этапа секвенирования дифференцировать массивы данных различных образцов. Индексы присутствуют непосредственно в структуре адаптеров или могут быть введены на этапе амплификации ПЦР с использованием различных индекс-содержащих праймеров для ПЦР для амплификации различных образцов в рамках процесса пробоподготовки [10].

Исследование геномов изолированных и культивированных патогенов является традиционным подходом, позволяющим осуществить обогащение пробы нуклеиновыми кислотами изучаемого микроорганизма. Применительно к бактериям обогащенная пробы в идеальном случае представляет собой колонию, снятую с плотной питательной среды. Препарат ДНК, полученный из подобной пробы содержит только бактериальную ДНК и пригоден для анализа любым из методов секвенирования.

Применительно к вирусам обогащенная пробы представляет собой препарат, содержащий нативные и дефектные вирионы, а также элементы среды накопления (культуры клеток, материал животных и т.д.). Препарат, полученный из подобной пробы, содержит нуклеиновые кислоты вируса на фоне колосального количества генетиче-

ского материала среды накопления и в исходном виде пригоден для анализа только после амплификации либо с использованием высокопроизводительных секвенаторов. Для решения данной проблемы применяют методы избирательного удаления нуклеиновых кислот среды накопления из пробы, например, обработка ДНКазой для удаления ДНК с последующим избирательным удалением рибосомальных РНК с использованием гибридизации на зондах.

В большинстве случаев этап культивирования требует дополнительного времени и специализированных условий, если вообще возможен (методы культивирования многих патогенов не разработаны), поэтому NGS с момента своего появления применяется для исследований смешанных образцов в рамках метагеномного подхода. Метагеномный подход на основе технологии NGS позволяет идентифицировать и проанализировать гены и геномы микроорганизмов, присутствующих в различных гетерогенных образцах окружающей среды или биологических материалах, без необходимости культивирования этих микроорганизмов [13–16]. При исследовании произвольного смешанного образца из него выделяется препарат тотальных ДНК/РНК который в дальнейшем используется для подготовки библиотеки, секвенируется и анализируется на предмет выявления в полученном массиве данных прочтений, соответствующих ранее исследованным аннотированным геномам [17–19] или, в случае ранее не исследованных, сборка и аннотация *de novo* [20, 21]. Результатом анализа смешанных образцов в большинстве случаев является отчет, содержащий данные об относительных долях нуклеиновых кислот микроорганизмов (рисунок 3).

Технология NGS имеет ряд ограничений, препятствующих ее широкому применению в диагностической практике. Наиболее очевидным ограничением технологии NGS является скорость проведения анализа, так как весь процесс является многоэтапным и занимает несколько дней, отсутствие стандартизованных рабочих процессов, проблемы, связанные с анализом сложных геномных данных, а также высокая стоимость используемых материалов. Кроме того, аналитические подходы к реконструкции и классификации геномов из смешанных образцов остаются ограниченными по своей производительности и удобству использования [22]. Необходимым условием получения хоть каких-либо практически применимых результатов является высокая квалификация персонала одновременно в нескольких научных

Петров А.А., Казанцев А.В., Ковальчук Е.А., М.Ю. Павлюков, Сапкулов А.В., Кутаев Д.А., Борисевич С.В.
Petrov A.A., Kazantsev A.V., Kovalchuk E.A., Pavlyukov M.Yu., Sapkulov A.V., Kutaev D.A., Borisevich S.V.

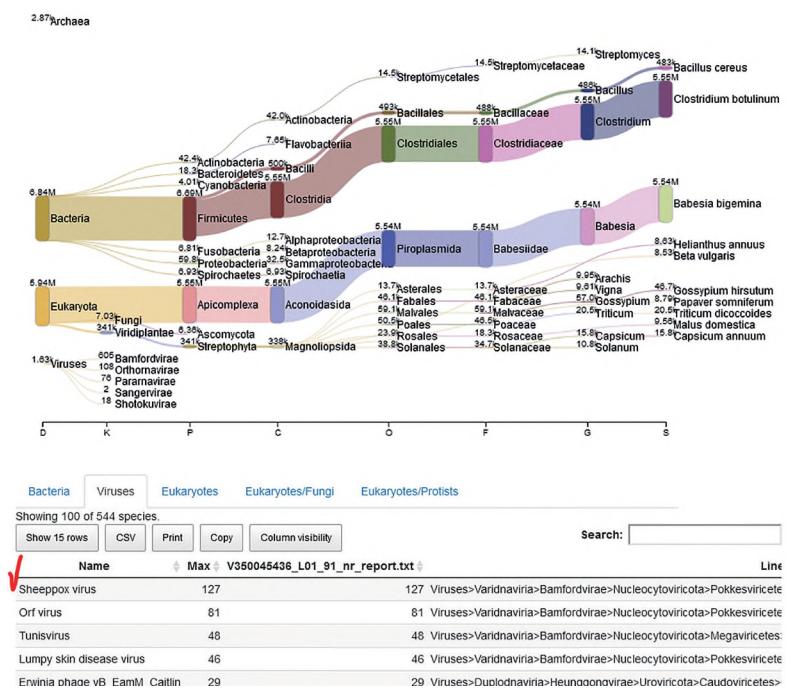


Рисунок 3 – Результаты NGS-секвенирования смешанного образца

(Представлены результаты практического исследования с использованием платформы DNBSEQ-G50, BGI, Китай). Данные авторов

областях – молекулярной биологии, биоинформатики, анализа данных. Наконец, для надежной отчетности необходимы сертифицированные в установленном порядке базы данных патогенов и биоинформационные инструменты анализа последовательностей, позволяющие минимизировать влияние человеческого фактора на результат анализа.

Для получения высококачественных результатов секвенирования оптимизация пробоподготовки имеет решающее значение и требует системной интеграции различных технологий и методов. Например, обнаружение патогенов с низким титром в клинически значимых образцах затруднено из-за абсолютного доминирования в образце генетического материала человека [17]. Образцы окружающей среды часто содержат разнообразные микробные популяции и компоненты, которые мешают обработке образцов и подготовке библиотеки для секвенирования.

Разработка универсального метода обнаружения патогенов от образца до получения результата требует выбора оптимального метода выделения бактерий и вирусов, очистки ДНК/РНК, уменьшение количества балластных нуклеиновых кислот (например, рибосомальной РНК прокариот и эукариот) и концентрирование патогенов с низкими концентрациями в среде культивирования.

В работе K. Parker с соавт. [23] представлено стандартизированное решение для обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний. Рабочий процесс PanGIA (Pan-Genomics for Infectious Agents) был оптимизирован для использования конечными пользователями при минимизации времени ручной обработки, чтобы обеспечить 24-часовой цикл от образца до ответа (рисунок 4). Стандартизованные операционные процедуры обнаружения патогенов включают в себя этапы выделения нуклеиновых кислот из исследуемых проб, удаления ДНК человека из клинических проб, подготовки библиотек и одновременного секвенирования РНК- и ДНК-мишней с использованием платформы секвенирования второго поколения компании Illumina (США) с последующим биоинформационным анализом полученных данных.

В настоящее время полногеномное секвенирование позволяет получать большие массивы данных, которые необходимы обрабатывать, поэтому одним из важных элементов внедрения метода NGS в практику лабораторной диагностики является проработка контроля качества исследования, в том числе на уровне биоинформационической обработки данных. Инструменты биоинформатики являются неотъемлемой частью секвенирования и анализа геномных данных.

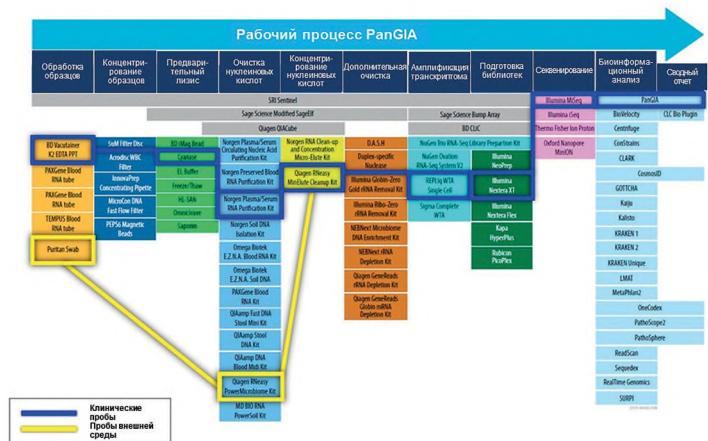


Рисунок 4 – Стандартизированное решение для обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний (рабочий процесс PanGIA) [23]

Для контроля качества и предварительной обработки первичных данных, полученных из секвенатора, фильтрации нецелевых последовательностей, сборки и контроля качества прочтений, а также таксономического профилирования последовательностей можно использовать широкий спектр аналитических инструментов. До сих пор не существует единого мнения, какой из подходов следует использовать для решения конкретных задач анализа данных.

Первым этапом анализа является контроль качества полученных из секвенатора данных, который осуществляется путем устранения технических ошибок. Основной целью данного этапа является предварительная обработка данных для удаления последовательностей адаптера, чрезмерно коротких и некачественных прочтений (ридов) или нуклеотидов, которые могут присутствовать в образце, с использованием определенных программ в зависимости от анализируемых данных. После выявления технических ошибок в первичных данных секвенирования, с помощью биоинформационных инструментов осуществляется их удаление, чтобы избежать получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Наиболее часто применяемые с этой целью биоинформационные инструменты приведены в таблице 2 [24].

Вторым этапом является фильтрация, т.е. удаление балластных последовательностей с использованием биоинформационических инструментов для картирования последовательностей и для дальнейшей сборки генома. После того, как геном собран, следует определить качество сборки. Инструменты для этой цели можно разделить на две основные категории: те, которые требуют эта-

лонных геномов (референсов) для контроля качества, и те, которые не нуждаются в них (таблица 2) [24].

Важным шагом для идентификации вирусов является выполнение таксономического профилирования (установление видов патогенов, последовательности геномов которых были получены в ходе секвенирования). Существует два основных метода решения этой задачи: первый заключается в классификации прочтений в соответствии с таксономиями, а второй – в установлении таксономических групп по набору перекрывающихся последовательностей фрагментов ДНК (так называемым контигам).

Для идентификации вирусных геномов программы анализа используют справочные базы данных на основе различных алгоритмов и программ (на основе k-меров, например, kraken2 [25], bracken [26], CLARK [27]; на основе генов-маркеров, например, MetaPhlAn4 [28], IGGsearch [29]; на архитектуре искусственных нейронных сетей, например, VirusTaxo [30], Metavir2 [31]), отличающихся по времени проведения анализа и объему вычислительных ресурсов. Существуют также биоинформационными инструменты для идентификации вирусных последовательностей без использования референсов (такие как VirSorter [32] и VirFinder [33]).

Ключевую роль при обработке данных высокопроизводительного секвенирования играют разработка и внедрение алгоритмов биоинформатики, выполняемых в определенной последовательности. Разработка биоинформационного алгоритма контроля качества образцов, включающего в себя инструменты, базирующиеся на различных подходах, позволит значительно

Таблица 2 – Программные решения, наиболее часто применяемые для обработки данных полногеномного секвенирования

Функция	Программа	Тип данных	Источник
Контроль качества первичных данных из секвенатора	FastQC	Короткие риды	https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
	MinionQC	Длинные риды	https://github.com/roblanf/minion_qc
Редактирование первичных данных из секвенатора, удаление технических ошибок и служебных последовательностей (адаптеров)	Trimmomatic	Короткие риды	http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic
	Fastp	Короткие риды	https://github.com/OpenGene/fastp
	NanoPack	Длинные риды	https://github.com/wdecoster/nanopack
	SequelTools	Длинные риды	https://github.com/ISUgenomics/SequelTools
Картрирование последовательностей	BWA	Короткие риды, длинные риды	https://bio-bwa.sourceforge.net
	Minimap2	Длинные риды	https://github.com/lh3/minimap2
Сборка генома	MEGAHIT	Короткие риды	https://github.com/voutcn/megahit
	metaSPADES	Короткие риды	https://github.com/ablab/spades
	NECAT	Длинные риды (Nanopore)	https://github.com/xiaochuanle/NECAT
Контроль качества сборки последовательностей	MetaQuast	На основе референса	http://bioinf.spbau.ru/metaquast
	DeepMAsED	Без референса	https://github.com/leylabmpi/DeepMAsED

упростить как оценку качества образцов, так и выявление нестандартных данных, требующих особого внимания на стадии интерпретации.

Последние тенденции в инструментах биоинформатики для анализа геномных данных сосредоточены на машинном обучении, облачных приложениях, удобных интерфейсах и программном обеспечении с открытым исходным кодом. Использование параллельных вычислений и оптимизация биоинформационных алгоритмов позволяют повысить эффективность обработки данных NGS секвенирования при неизменности технических характеристик используемого оборудования.

Современные программные решения для полногеномного секвенирования представляют несомненный интерес для подразделений войск РХБ защиты ВС РФ, выполняющих задачи по биологической защите войск и населения Российской Федерации от биологических угроз, в том числе и вызванных ранее неизвестными патогенами.

Общепринятым высокоеффективным подходом к использованию рассмотренных выше программных продуктов является их скачивание и постоянное обновление с помощью сети Интернет. Очевидно, что данный подход недоступен для военной науки в связи с невозможностью использования несертифицированного программного обеспечения и ряда других причин. Поскольку большин-

ство биоинформационных программ имеют открытый код, их сертификация органами военного управления представляется маловероятной.

Компромиссным решением может являться разработка отечественной промышленностью соответствующих биоинформационных инструментов, сертифицированных органами военного управления в установленном порядке и способных функционировать в автономном режиме без подключения к сети интернет. В противном случае внедрение современных методов генетического анализа в практику войск не представляется возможным.

Заключение

Основные направления внедрения NGS в практику подразделений войск РХБ защиты ВС РФ следующие: идентификация патогенных биологических агентов путем расшифровки их генома (генотипирование), обнаружение новых биологических угроз и осуществление молекулярного эпидемиологического надзора за вспышками опасных и особо опасных инфекционных заболеваний (геномный мониторинг) на территориях дислокации ВС РФ.

Принципиально необходимым условием успешного внедрения полногеномного секвенирования в практику подразделений войск РХБ защиты ВС РФ является решение двух основных проблем, имеющих общий источник:

- разработка отечественной аппаратной части (компьютеров достаточной мощности), сертифицированных для защиты информации в установленном порядке и при этом имеющих полный функционал;
- разработка соответствующих биоинформационных инструментов и баз данных, сертифицированных для защиты информации в установленном порядке и функционирующих в автономном режиме без подключения к сети Интернет.

Список источников/References

1. Sozhamannan S, Holland MY, Hall AT, Negrón DA, Ivancich M, Koehler JW, et al. Evaluation of Signature Erosion in Ebola Virus Due to Genomic Drift and Its Impact on the Performance of Diagnostic Assays. *Viruses*. 2015;7(6):3130–54.
<https://doi.org/10.3390/v7062763>
2. Sohn JI, Nam JW. The present and future of de novo whole-genome assembly. *Briefings in Bioinformatics*. 2018;19(1):23–40.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbw096>
3. Бородинов АГ, Манойлов ВВ, Заруцкий ИВ, Петров АИ, Курочкин ВЕ. Поколения методов секвенирования ДНК (обзор). *Научное приборостроение*. 2020;30(4):3–20.
Borodinov AG, Manoilov VV, Zarutsky IV, Petrov AI, Kurochkin VE. Generations of DNA sequencing methods (review). *Nauchnoe priborostroenie*. 2020;30(4):3–20 (in Russian).
4. Алексеев ЯИ, Белов ЮВ, Малюченко ОП, Монахова ЮА, Натыров АН, Орехов ВА и др. Генетический анализатор для фрагментного анализа ДНК. *Научное приборостроение*. 2012;22(4):86–92.
Alekseev YaI, Belov YuV, Malyuchenko OP, Monakhova YuA, Natyrov AN, Orekhov VA, et al. Genetic analyzer for DNA fragment analysis. *Nauchnoe priborostroenie*. 2012;22(4):86–92 (in Russian).
5. Зубов ВВ. Секвенирование по Ротбергу (потенциал полупроводникового секвенирования). *Биомика*. 2013;5(1–2):48–61.
Zubov VV. Rotberg sequencing (potential of semiconductor sequencing). *Biomica*. 2013;5(1–2):48–61 (in Russian).
6. Зубов ВВ, Чемерис ДА, Василов РГ, Курочкин ВЕ, Алексеев ЯИ. Краткая история методов высокопроизводительного секвенирования нуклеиновых кислот. *Биомика*. 2021;13(1):27–46.
<https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2021-4>
Zubov VV, Chemeris DA, Vasilev RG, Kurochkin VE, Alekseev YaI. Brief history of high-throughput nucleic acid sequencing methods. *Biomics*. 2021;13(1):27–46 (in Russian).
<https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2021-4>
7. MacKenzie M, Argyropoulos C. An introduction to nanopore sequencing: past, present, and future considerations. *Micromachines*. 2023;14(2):459.
<https://doi.org/10.3390/mi14020459>
8. Pervez M, Hasnain MJ, Abbas SH, Moustafa MF, Aslam N, Shah SSM. A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. *Biomed Res Int*. 2022; 2022:3457806.
<https://doi.org/10.1155/2022/3457806>
9. Head SR, Komori HK, LaMere SA, Whisenant T, Van Nieuwerburgh F, Salomon DR, Ordoukhian P. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques*. 2014;56(2):61–77.
<https://doi.org/10.2144/000114133>
10. Marine R, Polson SW, Ravel J, Hatfull G, Russell D, Sullivan M, et al. Evaluation of a transposase protocol for rapid generation of shotgun high-throughput sequencing libraries from nanogram quantities of DNA. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(22):8071–9.
<https://doi.org/10.1128/AEM.05610-11>
11. Knierim E, Lucke B, Schwarz JM. Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e28240.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028240>
12. Podnar J, Deiderick H, Huerta G, Hunnicke-Smith S. Next-Generation Sequencing RNA-Seq Library Construction. *Curr Protoc Mol Biol*. 2014;106(1):4.21.1–19.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0421s106>
13. Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palù G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *Int J Mol Sci*. 2011;12(11):7861–84.
<https://doi.org/10.3390/ijms12117861>
14. Wong K, Fong TT, Bibby K, Molina M. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ Int*. 2012;45:151–64.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.02.009>

Петров А.А., Казанцев А.В., Ковальчук Е.А., М.Ю. Павлюков, Сапкулов А.В., Кутаев Д.А., Борисевич С.В.
Petrov A.A., Kazantsev A.V., Kovalchuk E.A., Pavlyukov M.Yu., Sapkulov A.V., Kutaev D.A., Borisevich S.V.

15. Zhang L, Chen F, Zeng Z, Xu M, Sun F, Yang L, et al. Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. *Front Microbiol.* 2021;12:e766364.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364>
16. Sen P, Oresic M. Metabolic Modeling of Human Gut Microbiota on a Genome Scale: An Overview. *Metabolites.* 2019;9(2):22.
<https://doi.org/10.3390/metabo9020022>
17. Schlaberg R, Chiu CY, Miller S, Procop GW, Weinstock G. Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(6):776–86.
<https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0539-RA>
18. Seol D, Jhang SY, Kim H, Kim SY, Kwak HS, Kim SH, et al. Accurate and Strict Identification of Probiotic Species Based on Coverage of Whole-Metagenome Shotgun Sequencing Data. *Front Microbiol.* 2019;10:1683.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01683>
19. Afzaldi OK, Ali J, Chang JH. Next-Generation Sequencing Based Gut Resistome Profiling of Broiler Chickens Infected with Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Animals (Basel).* 2020;10(12):2350.
<https://doi.org/10.3390/ani10122350>
20. Del Chierico F, Ancora M, Marcacci M, Cammà C, Putignani L, Conti S. Choice of next-generation sequencing pipelines. *Methods Mol Biol.* 2015;1231:31–47.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1720-4_3
21. McCorrison J, Venepally P, Sing I, Fouts DE, Lasken RS, Methé BA. NeatFreq: reference-free data reduction and coverage normalization for De Novo sequence assembly. *BMC Bioinformatics.* 2014;15(1):357.
<https://doi.org/10.1186/s12859-014-0357-3>
22. Jia X, Hu L, Wu M, Ling Y, Wang W, Lu H, et al. A streamlined clinical metagenomic sequencing protocol for rapid pathogen identification. *Sci Rep.* 2021;11(1):4405.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83812-x>
23. Parker K, Wood H, Russell JA, Yarmosh D, Shteyman A, Bagnoli J, et al. Development and optimization of an unbiased, metagenomics-based pathogen detection workflow for infectious disease and biosurveillance applications. *Trop Med Infect Dis.* 2023;8(2):121.
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020121>
24. Ibañez-Lligoña M, Colomer-Castell S, González-Sánchez A, Gregori J, Campos C, García-Cehic D, et al. Bioinformatic tools for NGS-based metagenomics to improve the clinical diagnosis of emerging, re-emerging and new viruses. *Viruses.* 2023;15(2):587.
<https://doi.org/10.3390/v15020587>
25. Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 2019;20(1).
<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
26. Lu J, Breitwieser FP, Thielen P, Salzberg SL. Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Comput Sci.* 2017;3:e104.
<https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
27. Ounit R, Wanamaker S, Close TJ, Lonardi S. CLARK: fast and accurate classification of metagenomic and genomic sequences using discriminative k-mers. *BMC Genomics.* 2015;16: 236.
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-1419-2>
28. Blanco-Míguez A, Beghini F, Cumbo F, McIver LJ, Thompson KN, Zolfo M, et al. Extending and Improving Metagenomic Taxonomic Profiling with Uncharacterized Species with using MetaPhlAn 4. *Nat Biotechnol.* 2023;41(11):1633–4.
<https://doi.org/10.1038/s41587-023-01688-w>
29. Nayfach S, Shi ZJ, Seshadri R, Pollard KS, Kyrpides NC. New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome. *Nature.* 2019;568(7753):505–10.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1058-x>
30. Raju RS, Al Nahid A, Chondrow Dev P, Islam R. VirusTaxo: Taxonomic classification of viruses from the genome sequence using k-mer enrichment. *Genomics.* 2022;114:10414.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110414>
31. Roux S, Tournayre J, Mahul A, Debroas D, Enault F. Metavir 2: New tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis. *BMC Bioinformatics.* 2014;15:76.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-76>
32. Roux S, Enault F, Hurwitz BL, Sullivan MB. VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *PeerJ.* 2015;3:e985.
<https://doi.org/10.7717/peerj.985>
33. Ren J, Ahlgren NA, Lu YY, Fuhrman JA, Sun F. VirFinder: A novel k-mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data. *Microbiome.* 2017;5(1):69.
<https://doi.org/10.1186/s40168-017-0283-5>

**Современные аппаратные и программные решения для полногеномного секвенирования, перспективы...
Modern Hardware and Software Solutions for Whole-Genome Sequencing, Prospects of Their Implementation...**

Благодарности / Acknowledgements

Авторы выражают свою признательность Квону Дмитрию Аркадьевичу, кандидату биологических наук, за предоставленные обзорные материалы в области современных методов секвенирования / The authors express their gratitude to Dmitry Arkadyevich Kwon, Candidate of Biological Sciences, for providing review materials in the field of modern sequencing methods.

Вклад авторов / Authors' contributions

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Петров А.А.** – формирование концепции статьи, написание текста рукописи; **Казанцев А.В.** – критический пересмотр и коррекция текста рукописи; **Ковалчук Е.А.** – сбор и анализ данных научной литературы, переработка текста рукописи; **Павлюков М.Ю.** – подготовка материалов для статьи по методам секвенирования; **Сапкулов А.В.** – подготовка материалов для статьи по программному обеспечению; **Кутаев Д.А.** – редактирование текста рукописи; **Борисевич С.В.** – окончательное утверждение рукописи для публикации / All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **Petrov A.A.** conceptualised the study, drafted the manuscript. **Kazantsev A.V.** critically reviewed and corrected the manuscript. **Kovalchuk E.A.** collected and analysed scientific literature and revised the manuscript. **Pavlyukov M.Yu.** preparation of the article section on sequencing methods. **Sapkulov A.V.** preparation of the article section on software. **Kutaev D.A.** edited the manuscript. **Borisevich S.V.** approved the final version of the manuscript for publication.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторах/ Authors

Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Российская Федерация, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11.

Петров Александр Анатольевич. Начальник научно-исследовательского управления, д-р мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9714-2085>

Казанцев Алексей Васильевич. Старший научный сотрудник, канд. биол. наук.

Ковалчук Елена Анатольевна. Научный сотрудник, канд. мед. наук.

Павлюков Михаил Юрьевич. Научный сотрудник.

Сапкулов Алексей Владимирович. Помощник начальника ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

Кутаев Дмитрий Анатольевич. Заместитель начальника ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России по научной работе, канд. биол. наук.

Борисевич Сергей Владимирович. Начальник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, д-р биол. наук, профессор, академик РАН.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Контактная информация для всех авторов: 48cnii@mil.ru

Контактное лицо: Борисевич Сергей Владимирович; 48cnii@mil.ru

48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Oktyabrskaya St. 11, Sergiev Posad 141306, Russian Federation.

Aleksandr A. Petrov. Head of Research Department, Dr Sci. (Med.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9714-2085>

Aleksey V. Kazantsev. Leading researcher, Cand. Sci. (Biol.).

Elena A. Kovalchuk. Researcher, Cand. Sci. (Biol.).

Mikhail Yu. Pavlyukov. Researcher.

Aleksey V. Sapkulov. Assistant of Head of Federal State Budgetary Establishment “48 Central Scientific Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation.

Dmitriy A. Kutaev. Deputy of Head of Federal State Budgetary Establishment “48 Central Scientific Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation on scientific research, Cand. Sci. (Biol.).

Sergey V. Borisevich. Head of Federal State Budgetary Establishment “48 Central Scientific Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Academician of Russian Academy of Sciences, Dr Sci. (Biol.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Contact information for all authors: 48cnii@mil.ru

Contact person: Sergey V. Borisevich; 48cnii@mil.ru



Оценка структуры свободного пространства в аэрозольном облаке

А.А. Брусенин[✉], Д.Н. Буряк, В.Н. Пенязь, И.В. Артамонов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации,
111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19

[✉]e-mail: 27nc_1@mil.ru

Возрастание роли высокоточного оружия (ВТО) в системе вооружения зарубежных стран обозначает необходимость совершенствования средств и способов комплексной маскировки войск, составной частью которой является применения аэрозолей. Статья является продолжением исследований по оценке эффективности маскировки объектов аэрозолями на основе расчета доли пространства, скрываемого (экранируемого) частицами аэрозоля для свободного прохождения видимого света, несущего информацию об объекте и окружающем фоне. По мнению авторов, при распознании объекта сквозь подвижную структуру аэрозоля кроме доли свободного пространства влияние на маскировку оказывает и его структура, а именно размеры ячеек от минимума до максимума, которые суммарно это пространство и составляют.

Цель работы – оценка нового фактора маскировки, то есть характера распределения в аэрозольном облаке структуры свободного пространства в зависимости от плотности аэрозоля (интегральной концентрации, $\text{г}/\text{м}^2$) по линии визирования (наблюдения) и размера его частиц, мкм.

Метод исследования. Теоретическое моделирование прохождения света через облако аэрозоля с использованием ПЭВМ.

Обсуждение. Выполненные расчеты на ПЭВМ показывают существование вероятностного распределения ячеек свободного пространства по их величине (размеру и площади), которые и составляют суммарное значение свободного пространства, оцениваемого ранее нами в целом. Неравномерность размера ячеек обусловлена турбулентностью приземного слоя воздуха с распределенным в нем аэрозолем. Расчеты показали, что размер ячеек крайне мал: не более 100 мкм².

Заключение. Малый размер ячеек и их динамическое распределение в пространстве в ходе распространения облака аэрозоля может рассматриваться в математическом плане как дополнительное слагаемое вероятности маскировки, за счет невосприятия (неразличения) маскируемых объектов. Термин новый и, возможно, требует уточнения, как в теоретическом плане, так и в ходе экспериментов в аэрозольной камере. Но его смысл заключается в существовании минимального предельного телесного угла различия (восприятия) глазом человека пикселей видимой информации сквозь подвижную структуру аэрозольного облака на определенной дальности наблюдения.

Ключевые слова: вероятность маскировки; интегральная концентрация; искажение; маскировка аэрозолями; невосприятие объекта; плотность аэрозоля; скрытие; турбулентность

Для цитирования: Брусенин А.А., Буряк Д.Н., Пенязь В.Н., Артамонов И.В. Оценка структуры свободного пространства в аэрозольном облаке. Вестник войск РХБ защиты. 2024;8(2):176–184. EDN:jkidlh.
[https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-176-184*](https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-176-184)

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: нет.

Финансирование: федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации (27 НЦ МО РФ).

Поступила 08.04.2024 г. После доработки 01.06.2024 г. Принята к публикации 28.06.2024 г.

Estimation of the Structure of Free Space in an Aerosol Cloud

Albert A. Brusenin[✉], Dmitry N. Burjak, Vladimir N. Penjaz', Ilya V. Artamonov

27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky
of the Ministry of Defence of the Russian Federation
Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation
✉ e-mail: 27nc_1@mil.ru

The increasing role of high-precision weapons (HPW) in the weapons system of foreign countries means the need to improve the means and methods of complex camouflage of troops, an integral part of which is the use of aerosols. The article is a continuation of research on the assessment of the effectiveness of camouflage of objects with aerosols based on the calculation of the proportion of space hidden (screened) by aerosol particles for the free passage of visible light carrying information about the object and the surrounding background. According to the authors, when recognizing an object through a moving aerosol structure, in addition to the proportion of free space, its structure also influences camouflage, namely the size of the cells from minimum to maximum, which together make up this space.

The purpose of the work is to assess a new camouflage factor, that is, the nature of the distribution in an aerosol cloud of the structure of free space depending on the density of the aerosol (integral concentration, g/m²) along the line of sight (observation) and the size of its particles, μm.

Research method. Theoretical modeling of the passage of light through an aerosol cloud using a PC.

Discussion. The calculations performed on a PC show the existence of a probabilistic distribution of free space cells by their size (size and area), which make up the total value of free space, previously estimated by us as a whole. The unevenness of the cell size is due to turbulence of the surface air layer with aerosol distributed in it. The calculations showed that the cell size is extremely small: no more than 100 μm.

Conclusion. The small size of the cells and their dynamic distribution in space during the propagation of the aerosol cloud can be considered in mathematical terms as an additional term of the probability of camouflage, due to the non-perception (non-distinction) of the camouflaged objects. The term is new and, perhaps, requires clarification, both theoretically and during experiments in an aerosol chamber. But its meaning lies in the existence of a minimum limiting solid angle of difference (perception) by the human eye of pixels of visible information through the moving structure of an aerosol cloud at a certain observation range.

Keywords: aerosol camouflage; camouflage probability; concealment; distortion; integral concentration (aerosol density); object non-perception

For citation: Brusenin A.A., Burjak D.N., Penjaz' V.N., Artamonov I.V. Estimation of the Structure of Free Space in an Aerosol Cloud. Journal of NBC Protection Corps. 2024;8(2):176–184. EDN:jkidlh.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-176-184>

Financial disclosure: The authors have no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest.

Funding: 27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of the Russian Federation (27 SC MD RF).

Received April 8, 2024. Revised June 1, 2024. Accepted June 27, 2024

В последние годы особое внимание уделяется новым подходам к оценке эффективности маскировки войск. В предыдущих статьях в рамках данного вопроса было предложено за эффективность маскировки принимать два параметра:

долю закрытия пространства частицами аэрозоля для прохождения прямого света. Эта доля одинакова для прозрачного и не-

прозрачного аэрозоля при прочих равных условиях;

преломление света также участвует в маскировке объекта, при прохождении света через прозрачный аэрозоль происходит многократное отражение и преломление частицами лучей света, которые меняют свое первоначальное направление и, попадая в глаз наблюдателя (окуляр оптического прибора),

Брусенин А.А., Буряк Д.Н., Пенязь В.Н., Артамонов И.В.
 Brusenin A.A., Burjak D.N., Penjaz' V.N., Artamonov I.V.

вносят дополнительное искажение в отображаемую картину.

Но кроме этих факторов, по нашему мнению, имеет значение также не только величина доли открытого пространства, но и его свойства. А именно, количество ячеек свободного пространства и их размер.

Ранее нами была установлена зависимость влияния дисперсности аэрозоля на его маскирующую способность [1]. Обработка полученных при моделировании на ПЭВМ статистических результатов позволила получить аналитическую зависимость следующего вида значения вероятности скрытия или экранирования свободного пространства (P_c) для прохождения прямых лучей в зависимости от дисперсности аэrozоля и его интегральной концентрации по линии визирования, названной нами плотностью потока [2]:

$$P_c = 1 - e^{-a \times \Delta} \quad (1)$$

где: a – параметр закона (маскирующая способность), $\text{м}^2/\text{г}$, a имеет значения, зависящие от дисперсности аэrozоля (для диаметра частиц аэrozоля в 1 мкм a равно 1,6684; для 2 мкм – 0,8627, 5 мкм – 0,3267);

Δ – плотность потока аэrozоля по линии визирования (интегральная концентрация), $\text{г}/\text{м}^2$.

Полученная при моделировании на ПЭВМ зависимость подобна закону Ламберта–Бера [2]. Данный факт указывает на достаточную корректность выбранного авторами пути моделирования процесса маскировки на ПЭВМ. Очевидно, что математическая сумма доли скрытия пространства аэrozолем и свободной доли для прохождения света равны единице. Но при этом возникает вопрос: а какое значение свободного пространства позволяет наблюдателю распознать объект сквозь облако частиц аэrozоля? Или другими словами: какая плотность аэrozоля достаточнона, чтобы считать объект скрытым от наблюдения. Оценка размеров свободного пространства в аэrozольном облаке явля-

ется параметром, влияющим на возможность распознания объекта через помехи. Существующий экспериментальный метод оценки маскировки с использованием аэrozольной камеры заключается в измерении доли пропускаемого света. Эта суммарная доля может складываться из N-ячеек свободного пространства при прохождении света через аэrozоль. Каждая ячейка – своеобразный пиксель видимой информации, который при данных условиях может распознаваться зрением человека.

Вопрос распознания объекта при маскировке его аэrozолем имеет долгую историю и первоначально в отечественной науке преобладала точка зрения, что основным фактором при этом является соотношение яркостей объекта, фона и собственно самого аэrozоля [3–5]. Некорректность такого подхода относительно маскирующих способностей черного и белого дыма показана в заявке на изобретение [6]. В указанной заявке, которая подтверждена патентом, предложены два параметра маскировки: скрытия и искажения. Рассматриваемый в статье вопрос анализа свободного пространства в облаке маскирующего аэrozоля является расширением научного анализа маскировки как сложного явления, связанного не только с физикой процесса распространения аэrozоля в атмосфере, но и с некоторыми особенностями обработки зрительной информации человеческим мозгом.

Такая постановка вопроса никогда не возникла перед отечественными и зарубежными исследователями¹. В определенной степени это оправдано, поскольку разобраться с такими тонкостями можно только посредством использования ПЭВМ. Возникающий после этой фразы скепсис у определенной части читателей можно компенсировать аргументом: если расчеты на ПЭВМ [1, 2] привели нас к закону Ламберта–Бера в части оценки скрытия объекта аэrozолем, значит правомерно использование разработанного подхода и к оценке структуры свободного пространства в аэrozольном облаке.

¹ Аэrozольное противодействие средствам разведки и управления оружием противника: Энциклопедия, Министерство обороны Российской Федерации. URL: https://encyclopedia.mil.ru/encyclopedia/dictionary/details_rvsn.htm?id=12601@morfDictionary (дата обращения: 15.04.2024).

Буряк С.И. Комплексная защита войск от средств поражения, экономическая безопасность и безопасность в чрезвычайных ситуациях. ВА РВСН имени Петра Великого; 2004.

Как спрятать город? Аэrozольные войска. URL: <https://dzen.ru/a/YpvGktKD3ANa9QM> (дата обращения: 02.04.2024).

Латышев, Елизавета Комарова. Дымовая маскировка: в ЦНИИТОЧМАШ рассказали о новых боеприпасах постановки аэrozольной завесы – РТ на русском: 12 августа 2023 г. URL: <https://russian.rt.com/russia/article/1186814-cniitochmash-aerozol-boepripas?ysclid=lui57m2bw1428844450> (дата обращения: 02.04.2024).

Гражданская защита. Энциклопедия в 4 томах. Том 1(А–И), под общ. ред. С.К. Шойгу, МЧС России М.: Московская типография № 2; 2006.

Цель работы – оценка нового фактора маскировки, то есть характера распределения в аэрозольном облаке структуры свободного пространства в зависимости от плотности аэрозоля (интегральной концентрации, $\text{г}/\text{м}^2$) по линии визирования (наблюдения) и размера его частиц, мкм.

Метод исследования. Теоретическое моделирование прохождения света через облако аэрозоля с использованием ПЭВМ.

Таким образом, задачей исследования является моделирование случайного процесса распределения аэрозольных частиц в пространстве, и, соответственно, промежутков между ними для свободного прохождения света с применением ПЭВМ.

Прежде чем перейти к математическому анализу свободного пространства в аэрозольном облаке (АО), обратимся к детской игре составления картинок из пазлов. Как правило, к совокупности пазлов придается исходное изображение. Но даже если этого изображения нет, то составить картину соответствующую, например, формату А4 из 10 пазлов, возможно. При постепенном увеличении числа пазлов, допустим от 100 до 1000, данная задача значительно усложняется, тем более, если доля имеющихся пазлов равна, например, 50 % от необходимого их количества. А если представить, что эти мельчайшие пазлы постоянно перемещаются по плоскости, то задача объективного зрительного восприятия изображения может оказаться вовсе не решаемой.

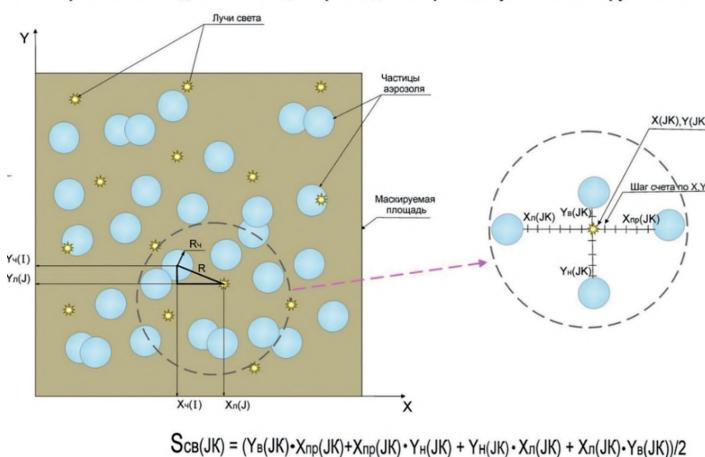
Выполним логический перенос этой задачи на маскировку фона и объекта аэрозольным облаком. Допустим, доля скрытия аэрозольного пространства составляет 50 % (наблюданная картина фона и объекта напо-

ловину скрыта от наблюдателя). Достаточно очевидно, что если открытое пространство в некотором телесном угле наблюдения имеет условно 10 окон видимости примерно равных по величине (постепенно смещающихся по ветру), то уловить в нем интересующий объект возможно. А если этих движущихся мелких окон видимости в пределах прежнего телесного угла наблюдения того же самого фона и объекта сотни тысяч и более, с соответствующим значительным уменьшением их линейного размера, то задача значительно усложняется. Из этих рассуждений делаем предварительный вывод, что распознание объекта на некотором фоне при применении маскирующих аэрозолей зависит не только от доли свободного пространства, через которую видимой частью спектра ЭМИ передается информация об объекте и фоне, но и от структуры «окон прямой видимости», а именно их численности на единицу маскируемой площади и их размера.

В этой связи нами была предпринята попытка решения данной задачи на ПЭВМ. Сущность моделирования, по смыслу получения интересующего нас результата, противоположна прежней задаче оценки доли скрытия пространства аэрозолем [1], но идентична по выбору исходных данных и логике расчетов, рисунок 1.

Исходными данными являются частицы аэрозоля заданного размера (мкм) и плотности потока ($\text{г}/\text{м}^2$), которые распределены случайным образом с координатами $X_{\text{ч}}(I)$ и $Y_{\text{ч}}(I)$ на маскируемой площади. Распределение этих частиц по глубине, а именно – по линии визирования вдоль оси Z (перпендикулярной плоскости рисунка или плоскости осей X и Y), перпендикулярной направлению

Схема расчета свободной ячейки для прохождения прямых лучей на маскируемой площа



**Рисунок 1 – Схема оценки размера ячейки свободного пространства
 (рисунок подготовлен авторами по собственным данным)**

Брусенин А.А., Буряк Д.Н., Пенязь В.Н., Артамонов И.В.
 Brusenin A.A., Burjak D.N., Penjaz' V.N., Artamonov I.V.

визирования – во внимание не принимается, поскольку важна только их проекция. На этой же плоскости случайным образом задаются координаты световых лучей $X_{\text{л}}(J)$ и $Y_{\text{л}}(J)$. Задача оценки скрытия сводилась к расчету доли световых лучей, попавших в аэрозольные частицы [1]. Попадание луча света на частицу происходит в случае, когда величина R (расстояние между лучом и центром соседней аэрозольной частицы) будет меньше радиуса частицы ($R_{\text{ч}}$). Продолжение данной задачи заключается в расчете свободного пространства ($S_{\text{cb}}(JK)$) в окрестности лучей, не попавших в аэрозольную частицу (где расстояние больше R).

Алгоритм расчета площади ячейки свободного пространства заключается в следующем (см. *рисунок 1*):

из лучей массива по переменной J , не попавших в частицы, формируется новый массив по переменной JK ;

из точки каждого данного луча с координатами $X(JK)$ и $Y(JK)$ делается шаг вправо по оси X , кратный, например, 0,1 диаметра частицы и осуществляется проверка попадания новой смещенной точки в любую соседнюю частицу. Если попадания не было (расстояние между лучом и центром частицы по-прежнему больше радиусы частицы), то шаги повторяются до попадания. После фиксирования факта попадания запоминается величина плеча свободного пространства (количество выполненных шагов, умноженных на величину шага за вычетом величины полшага), обозначенная, как $X_{\text{пр}}(JK)$;

аналогично формируются плечи свободного пространства влево, вверх и вниз, *рисунок 1*;

полученные величины являются катетами прямоугольников, поэтому оценка их площади, соответствующей ячейке свободного пространства, не представляет трудностей, что отражено в формуле на *рисунке 1*.

Правомерно замечание, что при данном алгоритме в промежутке между катетами могут оказаться частицы, которые будут пропущены и, следовательно, реальная величина свободного пространства будет меньше. Это верно, но мы пока проводим расчеты с четырьмя лучами, а не с восемью и более, поскольку машинное время на настоящее время для решения одной задачи занимает более двух суток. Возможности его сокращения нами продуманы: необходимо вокруг каждого не попавшего луча формировать массив соседних частиц, например, в пределах двадцати-тридцати диаметров частиц. И при проверке свободного пространства работать не со всеми частицами на маскируемой пло-

щади, а только с ними. Это условие сократит расчетное время в десятки раз.

Полученные же результаты по оценке свободного пространства с использованием только четырех направлений «математического зондирования» аэрозольного облака (АО) можно трактовать следующим образом: использование восьми и большего количества лучей могут уменьшить размеры ячеек, и, соответственно, наши расчеты по четырем направлениям по предложенному алгоритму при оценке свободного пространства будут несколько завышены относительно объективного результата.

Полученные первые результаты оценки свободного пространства в аэрозольном облаке, по представленному выше алгоритму, представлены на *рисунках 2–4*.

Конечно, пока они недостаточны для полной статистической картины, но необходимы для понимания особенности маскировки. Следует обратить внимание, что количество ячеек свободного пространства и количество частиц аэрозоля сопоставимы. Главный вопрос: для чего все эти длительные расчеты на предельных возможностях обычных ПЭВМ? Дело в том, что наши глаза имеют особенность: мы воспринимаем условный пиксель информации о фоне и объекте при некотором угловом разрешении. При этом имеют значение и другие факторы: освещенность и разница в яркости объекта и фона, но угловое разрешение доминирующее. Накопив необходимую статистику по оценке структуры величины свободного пространства в зависимости от дисперсности и плотности аэрозоля, можно найти критические их значения, которые превращают облако аэрозоля, а именно некоторую его часть, в непросматриваемую сплошную зону. Этую долю формально просматриваемой маскируемой площади, но не воспринимаемой нашим зрением, мы предлагаем назвать вероятностью невосприятия.

Данный эффект нераспознания объектов мы можем наблюдать на многих фотоснимках аэрозольных образований сверху от шашек и дымовых машин в виде практически сплошной непросматриваемой области. Дело в том, что распространение облака аэрозоля (дыма) подчиняется нормальному закону. Расчеты показывают, что концентрации примеси на директрисе облака аэрозоля (по оси) превышают концентрации на периферии (на удалении трех вероятных отклонений – сигм) более 15 раз. Казалось бы, что, исходя из этого плотность аэрозоля, визуально наблюдаемая глазами сверху, должна лучше просматриваться на периферии и хуже по

Оценка структуры свободного пространства в аэрозольном облаке Estimation of the Structure of Free Space in an Aerosol Cloud



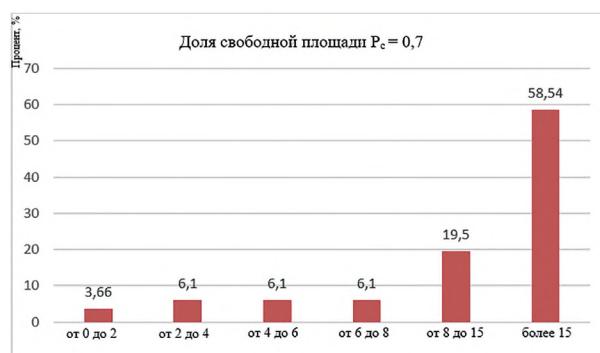
Площадь ячейки свободного пространства в единицах площади одной частицы, ед.
Количество частиц – $2,6 \times 10^{10}$, 1/м²
Количество ячеек свободного пространства – 4×10^{10} , 1/м²
Средняя площадь ячейки свободного пространства – 12,2 мкм²

Рисунок 2 – Распределение ячеек свободного пространства, кратных площади одной аэрозольной частицы ($D_4 = 2$ мкм) (рисунок подготовлен авторами по собственным данным)



Площадь ячейки свободного пространства в единицах площади одной частицы, ед.
Количество частиц – $2,05 \times 10^{10}$, 1/м²
Количество ячеек свободного пространства – $2,6 \times 10^{10}$, 1/м²
Средняя площадь ячейки свободного пространства – 22,4 мкм²

Рисунок 3 – Распределение ячеек свободного пространства, кратных площади одной аэрозольной частицы ($D_4 = 2$ мкм) (рисунок подготовлен авторами по собственным данным)



Площадь ячейки свободного пространства в единицах площади одной частицы, ед.
Количество частиц – $1,5 \times 10^{10}$, 1/м²
Количество ячеек свободного пространства – 9×10^{10} , 1/м²
Средняя площадь ячейки свободного пространства – 80,7 мкм²

Рисунок 4 – Распределение ячеек свободного пространства, кратных площади одной аэрозольной частицы ($D_4 = 2$ мкм) (рисунок подготовлен авторами по собственным данным)

центру. Но в реальности непротивляемые границы облака аэрозоля обозначены, как правило, достаточно четко, постепенного размытия – нет.

Формирование сплошного белого пятна при применении прозрачного аэрозоля объясняется следующим. Моделируются отдельные лучи (кванты света), а реальные микропиксели пучков света от фона, объекта, неба с облаками и солнцем разной цветности (зеленого, коричневого, голубого и т.д.), попадая на частицы прозрачного аэрозоля, буквально рассыпаются на кванты: отражаясь и преломляясь под разными углами в зависимости от угла падения к нормали частицы. Эти кванты разной цветности смешиваются в пространстве и расходятся во все стороны в результате множественности процессов отражения и преломления. Часть из них, попадая в глаз наблюдателя, и создают зрительное восприятие сплошного молочного пятна примерно одинаковой тональности с достаточно четко выраженным внешними границами. Объяснение этого эффекта вытекает из выполненных расчетов. Да, плотности аэрозоля в центре и на периферии АО значительно различаются, но величина ячеек свободного пространства и на периферии не позволяет визуально воспринимать информацию об объекте и фоне.

Кроме этого, следует обратить внимание на психологические особенности восприятия человеком подвижной картинки. В кино используется 24 статичных кадра в секунду. При этом движение объекта мы воспринимаем как непрерывное. А в случае с аэрозолем, мы имеем дело с микроизображениями неполной картинки, да еще сменяющейся почти непрерывно из-за хаотичного движения аэрозоля.

Еще один пример: демонстрация ночного движения автомобилей на трассе с повышенной частотой кадров. Воспринимаемый нами свет автомобильных фар сливается в сплошную полосу, хотя разрывы между автомобилями в 40–50 м имеются. Если учесть, что средний линейный размер свободной ячейки на представленных рисунках 2–4, при варьировании доли свободного пространства в АО от 50 до 70 %, находится в пределах от 4 до 9 мкм, то «смена картинки» в ячейке происходит за время не более 3×10^{-6} с при скорости перемещения АО 3 м/с! Данная величина получена следующим образом.

Линейный размер ячейки примерно равен корню квадратному от ее площади, из рисунка 4 корень квадратный из 81 мкм² равен 9 мкм. Время экспозиции свободной

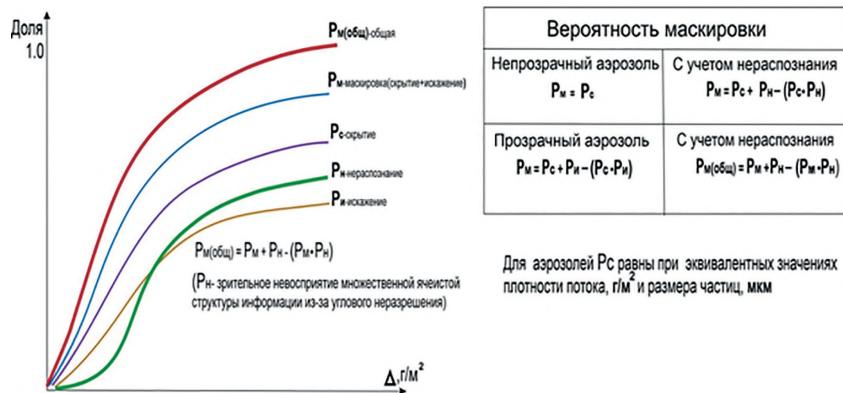


Рисунок 5 – Изменение вероятностей скрытия и искасжения фона и, соответствующей им суммарной вероятности маскировки при применении прозрачных аэрозолей, а также вероятностей маскировки с учетом дополнительного фактора – вероятности невосприятия информации (рисунок подготовлен авторами по собственным данным)

ячейки ($T_{\text{экс}}$) равно отношению ее линейного размера к скорости перемещения облака или:

$$T_{\text{экс}} = 9 \text{ мкм} / (3 \text{ м/с}) = 9 \text{ мкм} / (3 \times 10^6 \text{ мкм/с}) = 3 \times 10^{-6} \text{ с} \quad (2)$$

Проверить эффект нераспознания объектов сквозь малые окна видимости необходимо на опытах с аэрозольной камерой визуальным наблюдением и фотографированием любой картинки на проекторе (подвижной и статичной) сквозь аэрозоль с изображением фона и объекта на условной дальности 1–2 км. Полученные результаты могут привести нас к необходимости новой формулировки эффективности маскировки, а именно: обеспечения заданной сплошной площади маскировки с требуемой вероятностью, например, не ниже 0,99 с учетом нового параметра – невосприятия объекта. А также к возможному снижению расхода аэрозолеобразующего состава (АОС) с учетом доказанного эффекта невосприятия для противодействия средствам разведки в видимом диапазоне. Таким образом, будущие расчеты вероятности маскировки прозрачным и непрозрачным аэрозолем необходимо будет дополнить учетом вероятности нераспознания, что повышает снижение заметности объекта в целом, соответствующие зависимости показаны в таблице рисунка 5.

В настоящее время при оценке маскировки площади мы «делим» данную площадь на сотни мелких площадок и в каждой из них определяем вероятность маскировки (в пределах от 0 до 0,99) с использованием зависимости (1). Итоговая вероятность маскировки оценивается как средняя величина. При получении практического результата на аэрозольной камере невосприятия объекта при

скрытии его, например, при величине более 0,3, необходимо будет всем этим площадкам присваивать вероятность маскировки равную 1. Следовательно, учет фактора невосприятия повысит итоговое значение маскировки площади по отношению к используемому в настоящее время подходу.

Можно отметить, что идея применения ячеистых структур для маскировки реализована в виде инженерных средств маскировки общего назначения (ИСМОН), или на разговорном уровне – маскировочных сетей, которые достаточно эффективно скрывают ВВСТ на расстояниях нескольких сотен метров, рисунок 6.

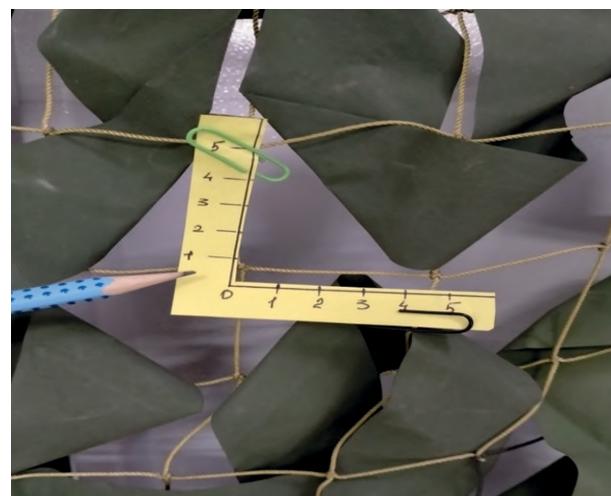


Рисунок 6 – Фрагмент современного инженерного средства маскировки общего назначения. Серо-сиреневый цвет – свободное пространство фона (стена помещения) (рисунок подготовлен авторами по собственным данным)

Можно обратить внимание, что размер свободных ячеек в этих средствах достигает 5 см, а в АО, по нашим расчетам, не более 100 мкм. Возможно замечание, что некоторыми исследователями в целях сокращения расходов аэрозолеобразующего состава предлагалось создание на маскируемых площадях не сплошной маскировки, а распятненной, что аналогично рассматриваемому в статье вопросу. Это не совсем так, если сравнивать данные эффекты по масштабу явления. Выполненные нами расчеты дают оценку *микрораспятнению* внутри АО, а применение множества источников аэрозоля соответствуют *макрораспятнению* маскируемой площади.

Выводы

1. При оценке эффективности маскировки объектов аэрозолями необходимо учитывать структуру и размер ячеек свободного пространства в аэрозольном облаке в зависимости от дисперсности частиц и их плот-

ности (интегральной концентрации, г/м²) по линии визирования с применением ПЭВМ, что обуславливает повышение расчетной величины вероятности маскировки только по скрытию объекта и его искажению.

2. На распознание (восприятие) информации влияет не только общая доля свободного пространства для прохождения прямых лучей с информацией об объекте и фоне, но и характер размера свободных ячеек в аэрозольном облаке относительно разрешающей способности человеческого зрения.

3. Количество свободных ячеек сопоставимо с количеством частиц аэрозоля на единицу маскируемой площади, то есть составляет миллиарды на 1 м² при чрезвычайно их малом размере (не более ста микрон по протяженности).

4. Необходима экспериментальная проверка наличия фактора невосприятия (нераспознания) объекта на аэрозольной камере с учетом всех факторов маскировки: скрытия, искажения и нераспознания.

Список источников/References

1. Колесников ДП, Пенязь ВН, Голышев МА, Буряк ДН, Артамонов ИВ. Влияние дисперсности аэрозоля на его маскирующую способность. *Вестник войск РХБ защиты*. 2021;5(3):260–8.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-3-260-268>
2. Kolesnikov DP, Penyaz VN, Golyshev MA, Buryak DN, Artamonov IV. Effect of Aerosol Dispersion on Its Masking Ability. *Journal of NBC Protection Corps*. 2021;5(3):260–8.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-3-260-268>
3. Брусенин АА, Красильников СА, Пенязь ВН, Буряк ДН, Артамонов ИВ, Бурков ВД. Аналитическая зависимость вероятности маскировки объектов от плотности и дисперсности аэрозоля. *Вестник войск РХБ защиты*. 2023;7(1):53–61.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-7-1-53-61>
4. Brusenin AA, Krasilnikov SA, Penyaz VN, Buryak DN, Artamonov IV, Burkov VD. Analytical Dependence of the Probability of Masking Objects on the Density and Dispersion of the Aerosol. *Journal of NBC Protection Corps*. 2023;7(1):53–61.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-7-1-53-61>
5. Вейцер ЮИ, Лучинский ГП. Химия и физика маскирующих дымов. М.: Государственное издательство оборонной промышленности; 1938. С. 208.
6. Weitzer YI, Luchinsky GP. *Chemistry and physics of masking smokes*. Moscow: State production of the defense industry; 1938. P. 208 (in Russian).
7. Вейцер ЮИ, Лучинский ГП. Маскирующие дымы. М.-Л.: Государственное научно-техническое издательство химической литературы; 1947. С. 203.
8. Weitzer YI, Luchinsky GP. *Masking smokes*. Moscow-Leningrad: State scientific and technical publishing house of chemical literature; 1947. P. 203 (in Russian).
9. Ванин ФИ. Боевые дымы. Пособие для осоавиахимовского актива. М.: Главная редакция химической литературы; 1935. С. 120.
10. Vanin FI. *Combat smoke. Benefit for osoaviakhim assets*. Moscow: Main editorial office of chemical literature; 1935. P. 120 (in Russian).
11. Брусенин АА, Голышев МА, Пенязь ВН, Буряк ДН, Артамонов ИВ, Полякова ГЮ. Способ количественной оценки маскирующей способности аэрозоля и установка для его осуществления. Патент Российской Федерации № 2814453; 2024.
12. Brusenin AA, Golyshev MA, Penyaz VN, Buryak DN, Artamonov IV, Polyakova GYu. Possibility of quantitative assessment of the masking ability of an aerosol and installation for its implementation. Patent RU 2814453; 2024 (in Russian).

Брусенин А.А., Буряк Д.Н., Пенязь В.Н., Артамонов И.В.
Brusenin A.A., Burjak D.N., Penjaz' V.N., Artamonov I.V.

7. Судаков КМ, Вагонов СН, Поляков ЕП. Состояние и перспективы аэрозольных средств защиты объектов ВВСТ. *Известия ТулГУ. Технические науки*. 2014;12(2):204–8. EDN:tltxod.
 Sudakov KM, Vagonov SN, Polyakov EP. State and prospects of aerosol means of protection of military and military equipment facilities. *News of Tula State University. Technical science*. 2014;12(2):204–8 (in Russian). EDN:tltxod.
8. Гребенникова ИВ. *Методы математической обработки экспериментальных данных*. Учебно-методическое пособие. Екатеринбург; 2015. С. 124.
 Grebennikova IV. *Methods of mathematical processing of experimental data. Educational and methodological manual*. Ekaterinburg; 2015. P. 124.
9. Кальной АИ, Тарасов СВ, Катунин ФА, Стрельников СИ. Анализ использования маскирующих занавес (дымовых завес) в военных действиях. *Наука и военная безопасность*. 2017;4(11):13–20. EDN:zxkrmh.
 Kralnay AI, Tarasov SV, Katunin FA, Strelnikov SI. Analysis of camouflage screen (smoke screen) employment in military operations. *Science and military security*. 2017;4(11):13–20 (in Russian). EDN:zxkrmh.
10. Королёв АЮ, Королёва АА, Яковлев АД. *Маскировка вооружения, техники и объектов*. Учебное пособие. Санкт-Петербург: Университет ИТМО; 2015. С. 136.
 Korolev AY, Koroleva AA, Yakovlev AD. *Camouflage of weapons, equipment and objects. Tutorial*. Saint Petersburg: Saint Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics; 2015. P. 136 (in Russian).

Вклад авторов / Authors' contributions

Брусенин А.А. – редактирование статьи; **Буряк Д.Н.** – поиск научной литературы, разработка алгоритма расчетов по оценке параметров свободного пространства в аэрозольном облаке, иллюстративный материал; **Пенязь В.Н.** – постановка задачи, написание начального варианта статьи; **Артамонов И.В.** – разработка программы для ПЭВМ (на языке Python) по математическому моделированию поставленной задачи, выполнение расчетов / **Brusenin A.A.** – editing the article; **Burjak D.N.** – search for scientific literature, development of a calculation algorithm for assessing the parameters of free space in an aerosol cloud, illustrative material; **Penjaz V.N.** – statement of the problem, writing the initial version of the article; **Artamonov I.V.** – development of a PC program (in Python) for mathematical modeling of the problem, performing calculations

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторах/ Authors

Брусенин Альберт Александрович. Начальник научно-исследовательского отдела, кандидат технических наук.

Буряк Дмитрий Николаевич. Научный сотрудник отдела.

Пенязь Владимир Николаевич. Старший научный сотрудник, канд. техн. наук, почетный работник науки и техники РФ.

Артамонов Илья Валерьевич. Научный сотрудник отдела.

Контактная информация для всех авторов: 27nc_l@mil.ru

Контактное лицо: Брусенин Альберт Александрович; 27nc_l@mil.ru

27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation.

Albert A. Brusenin. Head of the Research Department, Cand. Sci. (Techn).

Dmitry N. Burjak. Researcher of the Department.

Vladimir N. Penjaz'. Senior Researcher, Cand. Sci. (Techn), Honored Worker of Science and Technology of the Russian Federation.

Ilya V. Artamonov. Researcher of the Department.

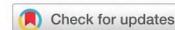
Contact information for all authors: 27nc_l@mil.ru

Contact person: Albert Aleksandrovich Brusenin; 27nc_l@mil.ru



ОБЗОР | REVIEW

УДК 579.252.5

<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-185-198><https://elibrary.ru/vylugc>

История открытия собственных плазмид у чумного микробы

И.В. Дармов[✉], С.Н. Янов, И.В. Маракулин

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны
Российской Федерации (г. Киров)
610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119
✉ e-mail: 23527@mil.ru

Представленная в открытых источниках информация о роли отечественных специалистов в открытии внекромосомных факторов наследственности (плазмид) у чумного микрона (*Yersinia pestis*) скудна и разрознена, а ведущий вклад отечественных военных ученых в решение этой задачи остается в тени.

Цель работы – обобщение имеющихся фактов и материалов об истории открытия внекромосомных факторов наследственности (плазмид) у чумного микрона.

Источниковая база и методы исследования. Анализировались открытые зарубежные и отечественные источники по рассматриваемой проблеме, в том числе архивные документы филиала 48 ЦНИИ МО РФ (г. Киров), ранее недоступные.

Результаты и обсуждение. В 1972 г. ученые США на основании экспериментальных данных сделали вывод об отсутствии у чумного микрона (*Yersinia pestis*) внекромосомной ДНК. В 1975–1977 гг. военные ученые НИИ микробиологии МО СССР (НИИМ, ныне – филиал 48 ЦНИИ МО РФ, г. Киров) с использованием равновесного ультрацентрифугирования, электронной микроскопии и электрофореза в агарозном геле обнаружили у возбудителя чумы три собственные плазмиды с молекулярными массами 6,4; 47 и 67 мегадальтон (МД) и показали, что первая из них кодирует синтез пестицина I, фибринолизина и плазмокоагулазы; вторая определяет признак кальцийзависимости и синтез антигенов V и W; третья детерминирует синтез антигена FI и мышного токсина. В 1978 г. была подана заявка на научное открытие, авторами являлись Т.Г. Абдуллин, Е.В. Смирнов и И.В. Дармов (от НИИМ), а также академик И.В. Домарадский – руководитель лаборатории ВНИИсинтезбелок (г. Москва). Официальный диплом СССР на научное открытие за № 001 под шифром «Плазма» был выдан в 1983 г., приоритет открытия – 27 декабря 1977 г. Первые публикации в отечественной и зарубежной литературе, подтверждающие истинность открытия, появились лишь в 1980–1981 гг. На основе открытия были созданы новые вакциновые штаммы и штаммы-суперпродуценты протективных антигенов.

Заключение. На основании анализа данных литературы и архивных материалов показана ведущая роль отечественных военных ученых в открытии собственных плазмид у чумного микрона.

Ключевые слова: вакциновые штаммы; внекромосомная ДНК; научное открытие; плазмиды; чумной микроб; *Yersinia pestis*

Для цитирования: Дармов И.В., Янов С.Н., Маракулин И.В. История открытия собственных плазмид у чумного микрона. Вестник войск РХБ защиты. 2024;8(2):185–198. EDN:vylugc.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-195-198>

Прозрачность финансовой деятельности: авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: И.В. Дармов является членом редколлегии журнала (с 2017 г.). Это не повлияло на процесс рецензирования и окончательное решение.

Финансирование: Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров).

Поступила 01.06.2024 г. После доработки 23.06.2024 г. Принята к публикации 27.06.2024 г.

History of Plague Pathogen Plasmids Discovery

Ilya V. Darmov[✉], Sergey N. Yanov, Igor V. Marakulin

Branch Office of 48 Central Scientific Research Institute
of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov),
Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation
[✉]e-mail: 23527@mil.ru

To date, there is practically no available information about the leading role of Soviet military scientists in the discovery of extra-chromosomal heredity factors (plasmids) of *Yersinia pestis* - the causative agent of the plague.

The purpose of this work is to summarize all of the available materials about the plague pathogen plasmids discovery. **The source base, method** is the analysis of foreign and domestic unclassified materials on topic under consideration, including archival documents.

Results and discussion. In 1972, US scientists, based on their experimental data, concluded that the plague pathogen (*Yersinia pestis*) had no extra-chromosomal DNA. Later, in 1975-1977, military scientists of the Research Institute of Microbiology of the Ministry of Defense of the USSR (RIM, now it is called Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment "48 Central Scientific Research Institute" of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov)) have proven the existence of *Yersinia pestis* plasmids using sedimentation equilibrium ultracentrifugation, electron microscopy and agarose gel electrophoresis. It was established that the microbe has three own plasmids with molecular weights of 6.4, 47 and 67 megadalton (MDa). Soviet military microbiologists have revealed that the first plasmid encodes the synthesis of pectincine I, fibrinolysin and plasmocoagulase; the second one determines the calcium dependence and the synthesis of antigens V and W; and the third one determines the synthesis of antigen FI and mouse toxin. In 1978, T.G. Abdullin, E.V. Smirnov, I.V. Darmov (from RIM), as well as Academician I.V. Domaradsky (VNIIIsintezbelok laboratory, Moscow) applied for a patent for the scientific discovery. The official USSR diploma for scientific discovery No. 001 under the code "Plasma" was issued in 1983, with the priority date of December 27th, 1977. The first unclassified publications confirming this discovery appeared only a few years later, in 1980-1981. Based on this discovery, new vaccine strains and protective antigens producer strains were designed, which made it possible to develop effective means of specific plague prevention.

Conclusion. Available data and archival materials confirm the priority of Soviet military scientists in the plague pathogen plasmids discovery.

Keywords: plague pathogen; *Yersinia pestis*; plasmids; vaccine strains

For citation: Darmov I.V., Yanov S.N., Marakulin I.V. History of Plague Pathogen Plasmids Discovery. *Journal of NBC Protection Corps.* 2024;8(2):185-198. EDN:vylugc.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-2-185-198>

Financial disclosure: The authors have no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: I.V. Darmov is a member of the Editorial Board of the journal (since 2017). This had no impact on the peer review process and the final decision.

Funding: Branch Office of 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov).

Received June 1, 2024. Revised June 23, 2024. Accepted June 27, 2024

Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (48 ЦНИИ МО РФ), в частности, его филиал, расположенный в г. Кирове (далее – филиал 48 ЦНИИ МО РФ, г. Киров) известен своим вкладом в разработку и создание средств и способов

профилактики, лечения и диагностики особо опасных инфекций бактериальной природы [1, 2]. Гораздо менее известны работы его сотрудников, направленные на изучение фундаментальных основ микробиологии, генетики и иммунохимии патогенных бактерий, в том числе возбудителя чумы, определившие перспективы последующих прикладных

исследований и разработок новых защитных препаратов.

Цель работы – обобщение имеющихся фактов и материалов об истории открытия внекромосомных факторов наследственности (плазмид) у чумного микрода, включая ранее недоступные.

Для ее достижения анализировались открытые зарубежные и отечественные источники по рассматриваемой проблеме, в том числе ранее недоступные архивные документы филиала 48 ЦНИИ МО РФ (г. Киров).

Плазмиды бактерий и методы их изучения

Подавляющее большинство структурно-функциональных элементов клетки детерминируются хромосомными генами. Однако у ряда организмов, помимо хромосом(ы), в клетке имеются внекромосомные (экстрахромосомные) факторы наследственности, которые детерминируют отдельные свойства клеток. Чаще всего они встречаются у бактерий, и в этом случае их называют *плазмидами*, поскольку они находятся непосредственно в цитоплазме клетки [3]. Термин плазмиды предложил в 1952 г. выдающийся французский генетик Андре Львов (Andre Lwoff, 1902–1994) [4].

Бактериальные плазмиды представляют собой генетические элементы, которые в бактериальной клетке физически обособлены от хромосомы и способны к автономной репликации. По функциональной активности в клетке плазмиды делятся на несколько групп: F-плазмиды, или секс-факторы; R-плазмиды, или плазмиды лекарственной устойчивости; плазмиды бактериоциногенности; плазмиды патогенности (токсигенности) бактерий; плазмиды метаболизма и утилизации различных соединений и другие [3–5].

По способности передаваться из клетки в клетку плазмиды подразделяют на конъюгативные (способные к переносу) и неконъюгативные [3–5].

По химической природе бактериальные плазмиды в большинстве случаев представляют собой кольцевые двухцепочечные (двойниковые) ковалентно замкнутые молекулы ДНК. Такая природа определяет методы их выделения и изучения [3–5].

Для выделения плазмидной ДНК из общего пула ДНК клетки используют равновесное ультрацентрифугирование ДНК в градиенте плотности хлористого цезия. Этот же метод позволяет судить об относительном количестве копий плазмидной ДНК на одну бактериальную клетку.

Равновесное ультрацентрифугирование ДНК реализуется в двух вариантах: прерывистом и аналитическом. В первом случае используется прерывистая ультрацентрифуга и обычные центрифужные пробирки, во втором случае – аналитическая ультрацентрифуга и специальные ячейки со стенками из сапфирового стекла. Для окраски ДНК в растворах хлористого цезия применяют интеркалирующий флуоресцентный краситель этидиум бромид.

Молекулы плазмидной ДНК могут быть представлены в клетке в различных конформациях, каждая из которых характеризуется соответствующим коэффициентом седиментации в градиенте раствора хлористого цезия. Существует линейная двухцепочечная форма и кольцевые двухцепочечные формы. Последние включают ковалентно замкнутую по обеим нитям кольцевую форму (суперскрученную) и открытые кольцевые формы (релаксированные), которые образуются в результате размыкания одной из двух нитей ДНК.

Особый интерес для решения практических задач представляет то, что в щелочных растворах нити ковалентно замкнутых кольцевых молекул ДНК не разъединяются, а открытые кольцевые и линейные формы ДНК, в том числе фрагменты хромосомной ДНК, разъединяются (денатурируют), что определяет их различия по плотности и позволяет осуществлять очистку ковалентно замкнутых молекул плазмидной ДНК от хромосомной ДНК [5].

Для определения контурной длины и конформации молекул плазмидной ДНК применяют электронную микроскопию.

Необходимо отметить, что методы равновесного аналитического ультрацентрифугирования и электронной микроскопии ДНК весьма трудоемки и в настоящее время в повседневной практике плазмидного анализа не используются. Однако на заре исследований бактериальных плазмид, в 60–70-е гг. XX в., данные методы считались «золотым стандартом» и без их использования невозможно было доказать наличие у того или иного вида бактерий факторов внекромосомной наследственности.

В настоящее время наиболее распространенным, доступным и удобным методом изучения плазмидной ДНК, безусловно, является электрофорез в агарозном геле. Полученные после разделения молекул ДНК гели окрашивают этидиумом бромидом, подсвечивают ультрафиолетовым светом и фотографируют флуоресцирующие оранжевым цветом по-

лоски ДНК. Метод позволяет рассчитывать молекулярную массу плазмид с использованием стандартов молекулярной массы, выявлять молекулы ДНК в различных конформациях (ковалентно замкнутые кольцевые, открытые кольцевые, линейные формы, димеры, тримеры и др.).

Для генетического картирования плазмид используют метод рестрикционного анализа, когда ДНК обрабатывается различными рестриктазами, подвергается электрофорезу в агарозном геле, после чего составляется карта плазмиды с нанесенными на нее сайтами узнавания рестриктазами и позициями генов (по результатам клонирования рестриктов).

В XXI в. для изучения плазмид все более широко используют метод секвенирования, который позволяет определять первичную структуру ДНК с точностью до нуклеотида. К настоящему времени составлены полногеномные карты плазмид большинства практических или клинически значимых бактерий, которые доступны специалистам в генетических базах данных (EMBL, GenBank и др.).

Чума. Возбудитель чумы

Чума – зоонозное природно-очаговое бактериальное инфекционное заболевание, характеризующееся интоксикацией, лихорадкой, поражением лимфатической системы, сепсисом и высокой летальностью. Относится к карантинным инфекциям [6].

Основную роль в сохранении инфекции в природе играют грызуны и зайцеобразные и их эктопаразиты (блохи). Природные очаги занимают 6–7 % территории суши Земли. В южных и юго-восточных регионах бывшего Советского Союза обнаружены 43 природных очага чумы [7].

Заражение человека происходит при укусе блохой (трансмиссивный путь передачи); при непосредственном соприкосновении с больными людьми, при снятии шкурок с больных грызунов и зайцев или разделке туш инфицированных верблюдов и сайгаков, при контакте с их трупами и выделениями (черезслизистые оболочки, микротравмы кожных покровов – контактный путь передачи); через желудочно-кишечный тракт (редко). Наиболее опасной в эпидемиологическом отношении и исключительно тяжелой клинической формой болезни является первичная легочная чума (воздушно-капельный путь пе-

редачи). До начала эры антибиотиков летальность при этой форме достигала 80–100 %, но и сейчас она требует к себе пристального внимания медиков [6]. Восприимчивость людей к чуме очень высока.

Возбудитель чумы – грамотрицательная полиморфная неподвижная бактерия *Yersinia pestis* из семейства *Enterobacteriaceae* рода *Yersinia*. По морфологии *Y. pestis* – мелкая, прямая, с закругленными концами палочка длиной 1–3 мкм и шириной 0,3–0,7 мкм. Образует капсулу. Факультативный анаэроб. Размножается на простых питательных средах. Оптимум роста – 26–28 °С, оптимум pH 7,0–7,2 [6]. Отнесен к I группе патогенности¹.

Возбудитель чумы рассматривается отечественными и зарубежными специалистами как потенциальный агент биологического оружия наивысшей степени значимости, способный к эпидемическому распространению [8]. Это определяет важность проведения исследований по изучению генетики, иммунохимии, вирулентности возбудителя чумы, и, в том числе, его плазмид как научной основы для разработки эффективных средств защиты войск и населения Российской Федерации.

История открытия плазмид у чумного микроба

Научное открытие плазмид у чумного микроба в 1976–1977 гг. – один из наиболее значимых на тот период результатов работы военных ученых НИИ микробиологии МО СССР (НИИМ; сегодня – филиал 48 ЦНИИ МО РФ, г. Киров). Начало 70-х гг. ХХ в. – время, когда в нашей стране была осознана необходимость возрождения генетики и развития молекулярной биологии после 30 лет вынужденного отставания и застоя вследствие царствования в советской биологической науке «народного академика» Трофима Денисовича Лысенко (1898–1976). 21 мая 1974 г. в газете «Правда» было опубликовано постановление ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О мерах по ускорению развития молекулярной биологии и молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве»². Начали строиться институты и создаваться академгородки генетического и молекулярно-биологического профиля, открываться новые специальности

¹ Приложение 1. ПБА по группам патогенности. В: СанПиН 3.3686-21. Санитарные правила и нормы «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

² Постановление ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О мерах по ускорению развития молекулярной биологии и молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве». Правда № 141 от 21.05.1974 г.

в ВУЗах для подготовки соответствующих кадров. Организация в НИИМ отдела генетики бактерий, первого отдела подобной направленности в системе научно-исследовательских институтов 15 Управления МО СССР, являлась логическим продолжением указанного процесса возрождения генетики в нашей стране и распространения его на область военной медицины и микробиологии.

Решение о создании отдела генетики бактерий было принято начальником 15 Управления МО СССР академиком АМН СССР генерал-полковником медицинской службы Ефимом Ивановичем Смирновым (1904–1989), который был основателем системы биологической защиты в нашей стране и неустанно заботился о процветании этой системы и ее развитии на основе передовых направлений науки и методов исследований (рисунок 1).

Идеологом и вдохновителем создания первого генетического отдела был заместитель начальника 15 Управления МО СССР академик АМН СССР генерал-майор медицинской службы Игорь Петрович Ашмарин (1925–2007), который уже в то время был признанным в нашей стране специалистом в области молекулярной биологии, автором первой отечественной монографии по этой дисциплине [9]. Будучи заместителем и консультантом Е.И. Смирнова по ряду направлений биологической науки, он успешно сочетал службу в центральном аппарате Ми-

нистерства обороны СССР с научной и преподавательской деятельностью сначала в Ленинградском государственном университете, а затем – в Московском (рисунок 2). О жизни и деятельности И.П. Ашмарина – выдающегося ученого, педагога и организатора науки написана и издана прекрасная книга [10].

Немало сделали для становления отдела член-корреспондент АМН СССР доктор медицинских наук, профессор генерал-майор медицинской службы Виктор Николаевич Паутов (1926–2020), бывший в то время начальником НИИМ (рисунок 3), и его заместитель по научной работе, в то время полковник медицинской службы Николай Николаевич Ураков (1929–2017), доктор медицинских наук, профессор (рисунок 4).

Первым начальником отдела и его основателем был полковник медицинской службы Тимерьян Габдрахманович Абдуллин (1926–2022), впоследствии – начальник НИИМ, генерал-майор медицинской службы доктор медицинских наук, профессор (рисунок 5). Основателем отдела генетики бактерий был также заместитель начальника отдела кандидат биологических наук подполковник Евгений Викторович Смирнов (1934–2009) (рисунок 6).

Следует отметить, что отдел создавался не на пустом месте, он вобрал в себя часть кадров других подразделений и научных школ. Ярким представителем одного из важных направлений был полковник медицинской службы доктор медицинских наук, профессор



Рисунок 1 – Е.И. Смирнов
(фотография филиала ФГБУ
«48 ЦНИИ» Минобороны России,
г. Киров)



Рисунок 2 – И.П. Ашмарин
(фотография филиала ФГБУ
«48 ЦНИИ» Минобороны России,
г. Киров)



Рисунок 3 – В.Н. Паутов
(фотография филиала ФГБУ
«48 ЦНИИ» Минобороны России,
г. Киров)



Рисунок 4 – Н.Н. Ураков
(фотография филиала ФГБУ
«48 ЦНИИ» Минобороны России,
г. Киров)



Рисунок 5 – Т.Г. Абдуллин
(фотография филиала ФГБУ
«48 ЦНИИ» Минобороны России,
г. Киров)



Рисунок 6 – Е.В. Смирнов
(фотография филиала ФГБУ
«48 ЦНИИ» Минобороны России,
г. Киров)

Константин Иванович Волковой (1929–2003) (рисунок 7).

В процессе своей многолетней работы в институте К.И. Волковой детальнейшим образом изучил антигенную структуру чумного микробы, создал панель специфических сывороток, с помощью которых можно было идентифицировать до 30 антигенов у чумного микробы и других иерсиний. Под руководством К.И. Волкового были селекционированы штаммы *Y. pestis*, дефектные по синтезу ряда факторов патогенности, что сыграло впоследствии важную роль при обнаружении у чумного микробы плазмид и установлении их связи с факторами патогенности. О выдающейся трудоспособности и научной добросовестности К.И. Волкового свидетельствует тот факт, что в течение 15 лет после его убытия из Кирова сотрудники отдела пользовались наработанными им запасами диагностических сывороток и антигенных препаратов. К сожалению, К.И. Волковой не принимал непосредственного участия в организации отдела, так как в 1973 г. убыл на другое место работы.

Наиболее многочисленную прослойку (около 15 человек) в только что организованном отделе составляли молодые научные сотрудники – недавние выпускники военных и гражданских ВУЗов, в том числе Горьковского и Саратовского университетов, 2-го Московского медицинского института, Горьковского, Куйбышевского и Саратовского военно-медицинских факультетов,

ряда кировских ВУЗов. Среди специалистов преобладали медики и биологи, в том числе микробиологи, биофизики, биохимики, количество «чистых» химиков и инженеров было невелико.

Очень скоро в отделе было сформировано несколько функциональных групп; одна из них именовалась группой «химиков» (рисунок 8), ею руководил Е.В. Смирнов.

Руководством института и отдела были созданы все условия для плодотворных исследований, а затем был задан такой высокий темп работ, что успехи не заставили себя долго ждать.

В 1975 г. перед группой «химиков» по-военному четко была поставлена задача: с помощью физико-химических методов осуществить поиск в клетках возбудителя чумы внекромосомных факторов наследственности и установить их функции. Непосредственным исполнителем данной работы был назначен младший научный сотрудник лейтенант медицинской службы И.В. Дармов (рисунок 9).

Необходимо отметить, что к началу 70-х гг. ХХ в. отечественными учеными были получены косвенные данные, указывающие на наличие у возбудителя чумы по крайней мере одного внекромосомного фактора наследственности, а именно, – фактора пестицидогенности (*Pst*). Так, Г.Ю. Пак в 1969 г. продемонстрировал элиминацию *Pst*-признака у чумного микробы под действием УФ-излучения, что указывало на высокую вероятность



Рисунок 7 – К.И. Волковой (фотография филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, г. Киров)

его кодирования внекромосомным фактором наследственности [11]. В 1971 г. Е.Г. Кольцова с соавторами показали возможность мобилизации фактора пестициногенности на перенос в бесплазмидные штаммы *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli* с помощью конъюгативной R-плазмиды. Интересно, что одновременно с признаком пестициногенности в клетки иерсиний передавались также фибринолитическая (Fb) и плазмокоагулазная (C) активности, при этом в клетках *E. coli* экспрессировался только фактор пестициногенности [12]. По мнению автора, такой характер передачи изученных свойств при скрещивании позволял предположить плазмидную локализацию детерминант Pst, Fb и C, а высокая частота совместной передачи могла указывать на близкое расположение их на плазмиде.

В то же время, в ряде отечественных публикаций, а также в известной статье американских ученых R.V. Little и R.R. Brubaker, опубликованной в 1972 г., утверждалось, что у чумного микробы нет внекромосомной ДНК [13].

Под руководством Т.Г. Абдуллина и Е.В. Смирнова поставленная задача была решена в кратчайшие сроки: уже в 1976 г. И.В. Дармов доложил на научной конференции войсковой части 23527 первые экспериментальные данные о наличии у чумного микробы внекромосомной ДНК (рисунок 10).

Вот так И.В. Дармов вспоминает одно из счастливейших событий своей жизни: «Осень 1976 г., лаборатория в 21 корпусе, я



Рисунок 8 – Группа «химиков» (рис. О.Н. Непогодиной)

открываю ротор препартивной ультрацентрифуги «Beckman», достаю пробирку с ДНК чумного микробы в градиенте раствора хлористого цезия с флуоресцентным красителем, освещая ее УФ-светом и вижу две полоски: верхняя – это хромосомная ДНК чумного микробы, а нижняя – долгожданная внекромосомная. Взволнованный, я разыскиваю Е.В. Смирнова, и вместе с ним мы долго стоим в синеватом полумраке лаборатории и зачарованно смотрим на эти светящиеся оранжевым цветом полоски, две фракции, в которых сосредоточилась вся наследственная информация возбудителя чумы. Сейчас геном возбудителя чумы, как и геномы других возбудителей особо опасных инфекций детально изучен и полностью секвенирован, а в то время все это было покрыто мраком неизвестности и вызывало огромный интерес».

Эти данные были подтверждены с помощью аналитической ультрацентрифуги «Spinco», модель E (США). Это крайне сложная, капризная и дорогостоящая машина; очень трудно было запустить и поддерживать ее в работоспособном состоянии. Тем не менее, это было сделано своими силами, под руководством Е.В. Смирнова, руками молодых инженеров С.Н. Янова и Н.А. Черкасова. Груда металла ожила и позволила получить важный результат.

Затем с помощью гель-электрофореза и электронной микроскопии было установлено, что пул внекромосомной ДНК возбудителя чумы состоит из трех плазмид, различающихся по молекулярной массе. Плазмиды



Рисунок 9 – И.В. Дармов
(фотография филиала ФГБУ
«48 ЦНИИ» Минобороны России,
г. Киров)

были обозначены рKM1, рKM2 и рKM3 (в порядке возрастания молекулярных масс); их молекулярные массы составляли 6,4 мегадальтон (МД); 47 МД и 67 МД соответственно (для штамма EV). Аналогичные плазмида, обнаруженные в других штаммах чумного микробы, могли несколько отличаться по молекулярной массе от плазмид штамма EV.

Ведущий научный сотрудник центра доктор биологических наук, профессор Сергей Николаевич Янов (рисунок 11) начинал свою трудовую деятельность как инженер-конструктор в конструкторском бюро завода имени XX партсъезда (г. Киров), где его отыскал Е.В. Смирнов. Первая задача, которую перед ним поставили в отделе генетики бактерий, наряду с запуском аналитической центрифуги, была весьма сложная: необходимо было научиться с высокой точностью определять размеры (контурную длину) молекул плазмидных ДНК с помощью электронной микроскопии. Эта задача была успешно решена в 1977 г.: были получены качественные микрофотографии плазмидных ДНК (пример на рисунке 12) и определена контурная длина открытых кольцевых форм ДНК в сравнении со стандартом (плазмидой ColE1). Использовали ацетатную методику, контрастирование ДНК уранилацетатом и напыление платиной.

Но самое трудное заключалось все же в том, чтобы установить, какие именно при-



Рисунок 10 – Результаты экспериментов по
обнаружению внекромосомной ДНК у чумного микробы
(1976 г.) (фотография филиала ФГБУ «48 ЦНИИ»
Минобороны России, г. Киров)

знаки детерминирует каждая из плазмид. В результате изучения плазмидного состава представительного набора изогенных производных вирулентных и авирулентных штаммов чумного микробы, полученных ранее К.И. Волковым и А.Г. Обросовой, было установлено, что три собственные плазмида чумного микробы кодируют синтез большинства известных к тому времени факторов его вирулентности, а именно: рKM1 – кодирует синтез пестицина I, фибринолизина и плазмоагулазы; рKM2 – определяет признак кальцийзависимости и синтез антигенов V и W; рKM3 – детерминирует синтез антигена FI и мышного токсина.

В 1978 г. руководством было принято решение оформить полученные результаты в виде заявки на научное открытие. В число авторского коллектива были включены Т.Г. Абдуллин, Е.В. Смирнов и И.В. Дармов (от НИИМ МО СССР), а также академик И.В. Домарадский (1925–2009) – руководитель лаборатории ВНИИсинтезбелок (г. Москва). В данной лаборатории примерно в это же время проводились работы по исследованию внекромосомной ДНК чумного микробы.

Вот как описывает И.В. Домарадский в своей монографии³ вклад двух авторских коллективов в проведенные исследования: «Поиски собственных плазмид у чумного микробы были заторможены утверждением R. Little и R. Brubaker (1972), что чумной

³ Домарадский ИВ. Чума. М.: Медицина; 1998.



Рисунок 11 – С.Н. Янов (фотография филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, г. Киров)

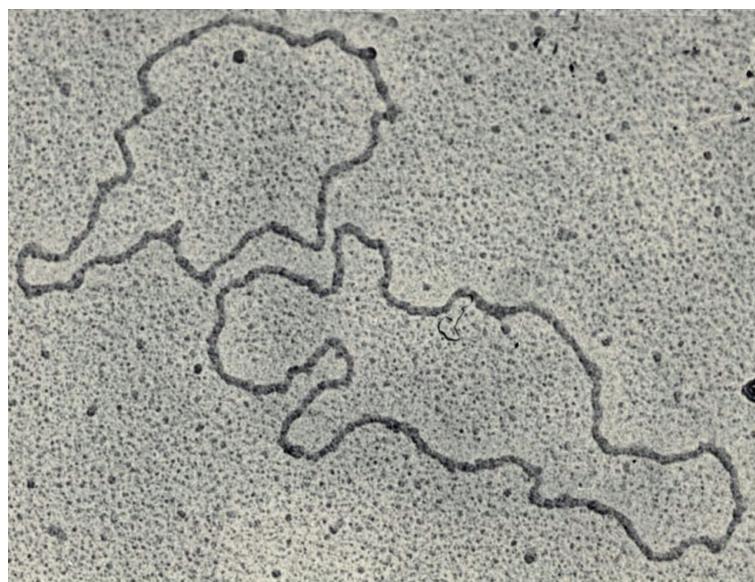


Рисунок 12 – Электронная микрофотография ДНК плазмид pPst (слева) и ColE1 (справа). ×10000 (фотография филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, г. Киров, 1977 г.)

микроб плазмид не имеет. Тем не менее, совместно с сотрудниками Кировского НИИМ все же продолжались соответствующие исследования. В нашей лаборатории (рук. И.В. Домарадский) работали с вакцичными штаммами EV, 1 и 17, применяя для анализа ДНК электронную микроскопию, а в НИИМ использовали также вирулентные штаммы, а ДНК подвергали электрофорезу в агарозном геле. В результате совместных усилий плазмиды были обнаружены [6].

Справедливости ради надо отметить, что исследования не были совместными, оба коллектива работали независимо друг от друга. При этом сотрудники НИИМ успешно использовали не один только гель-электрофорез, как отмечает И.В. Домарадский, но и равновесное ультрацентрифугирование, и электронную микроскопию, и работали со множеством штаммов, что, в совокупности, и привело к успеху.

Интересно отметить, что при оформлении заявки соавторы присвоили найденным плазмидам возбудителя чумы наименование «рКМ» (плазмиды Киров–Москва), чтобы подчеркнуть вклад в работу сотрудников обеих лабораторий. Однако это наименование не прижилось в силу закрытого характера первых публикаций и заявки на открытие. В настоящее время для обозначения плазмид чумного микробы чаще всего используются следующие наименования: рPst (плазмида пестицидогенности), рCad (плазмида кальций-зависимости) и рFra/Tox (плазмида синтеза антигена фракции I и мышного токсина).

Официальный диплом на научное открытие за № 001 под шифром «Плазма» [14] был выдан авторскому коллективу в 1983 г. (рисунок 13), но приоритет открытия датируется 27 декабря 1977 г., когда основные экспериментальные данные были уже получены, доложены на научной конференции и опубликованы в закрытом издании.

По вполне понятным причинам результаты исследований и материалы открытия не были опубликованы в открытых источниках, поэтому сведения о приоритете авторов открытия не стали достоянием широкой научной общественности. Это, однако, никак не снижает научной и практической ценности открытия, которое послужило основой для многих исследований и разработок в филиале 48 ЦНИИ МО РФ.

Необходимо также отметить, что первые публикации в отечественной и зарубежной литературе, подтверждающие истинность открытия, появились лишь в 1980–1981 гг., т.е. примерно через 3 года после составления заявки; при этом ни одна из опубликованных работ не носила комплексный характер, в каждой из них речь шла лишь о какой-то одной из трех плазмид [15–18]. За минувшие 40 с лишним лет ни одно из положений открытия не было подвергнуто ревизии. Все они были подтверждены результатами отечественных и зарубежных исследователей в статьях, диссертациях и монографиях [см. обзоры 19, 20].

В связи с изложенным возникает вопрос, каковы причины успеха предпринятых исследований плазмид чумного микробы, какие

Дармов И.В., Янов С.Н., Маракулин И.В.
Darmov I.V., Yanov S.N., Marakulin I.V.



Рисунок 13 – Диплом на открытие (фотография филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, г. Киров)

решения руководства по организации этих исследований оказались наиболее эффективными?

Можно выделить следующие причины.

1. Отличное материально-техническое обеспечение. С первых дней работы сотрудники были обеспечены всем необходимым оборудованием и реактивами. В отделе сложилась практика осознанного, научно обоснованного обновления лабораторно-методической базы с учетом последних достижений биологической науки и приборостроения. Важно, что работа по обновлению базы никогда не прекращалась. Немаловажно и то, что все сотрудники были обеспечены жильем, получали хорошую зарплату или денежное довольствие, дети обеспечивались местами в яслях и садиках; все это позволяло полностью сосредоточиться на работе.

2. Оптимальный кадровый состав. При организации отдела было очень верно найдено соотношение кадров и по специализации, и по возрасту. Подавляющее большинство составляли близкие по возрасту и по духу молодые выпускники гражданских и военных учебных заведений, среди которых естественным образом возникла здоровая конкуренция. Каждый стремился в чем-то

превзойти товарища, сказать свое слово в науке. Научные руководители не досаждали молодым специалистам мелочной опекой (как порой бывает в стареющих коллективах), они скорее выполняли функции научных консультантов, вовремя останавливая тех, кто слишком торопился в ущерб качеству, направляя усилия в единое русло. Самостоятельность была почти полная; много было ошибок на первых порах, зато созревание специалистов шло очень быстро.

3. Глубоко продуманная, мудрая постановка задач как всему коллективу в целом, так и отдельно взятым специалистам. Перед каждым ученым, инженером, лаборантом была поставлена задача конкретная, очень нужная и важная для обороноспособности или для исследовательских целей. Приветствовалась разумная инициатива. Взвешенность подхода заключалась в том, что задачи ставились, с одной стороны, трудные, на первый взгляд, неразрешимые, а с другой стороны, они все же были, в принципе, решаемые, хотя и на пределе возможностей каждого специалиста. Этот подход определил крайне высокий темп исследовательских работ в отделе, когда за один рабочий день в одной лаборатории использовали тысячи

чашек с питательной средой, тысячи пробирок, их вечно не хватало.

4. Наличие обратной связи между исполнителями и руководством всех уровней. Руководство отдела, руководство института и Управления постоянно интересовались ходом исследований, рассматривали протоколы опытов, корректировали направления работ. Незабываемы многочасовые совещания, которые проводил начальник 15 Управления МО СССР генерал-полковник медицинской службы Ефим Иванович Смирнов в конференц-зале. Он собирал всех научных сотрудников отдела, включая младших, задавал трудные вопросы, внимательно выслушивал каждого и давал конкретные указания по дальнейшей работе. Такое внимание со стороны командования поднимало дух, заставляло с высокой ответственностью подходить к делу, позволяло оперативно решать как научные, так и организационно-технические вопросы.

5. С первых дней основания руководителями отдела была сформирована атмосфера научного поиска, товарищества, взаимопомощи, понимания научной истины как абсолютной ценности. Проводились многочисленные научные конференции, дискуссии и т.д.

Проведенный анализ может быть полезен при создании новых научных коллективов и функциональных групп, предназначенных для решения конкретных научных задач.

Теоретическое значение открытия плазмид у чумного микробы

За годы, прошедшие с момента открытия плазмид у чумного микробы, выяснилось, что у ряда других патогенных бактерий – возбудителей опасных и особо опасных инфекций, в частности, сибирской язвы, псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза, дифтерии, токсигенных штаммов кишечной палочки и др. – детерминанты вирулентности и токсигенности тоже локализованы на внехромосомных элементах (плазмidaх, умеренных бактериофагах). На этом основании было сформулировано положение о том, что многие высокопатогенные бактерии произошли от непатогенных или слабо патогенных бактерий в результате приобретения ими готовых блоков наследственной информации (плазмид, фагов, мобильных генетических элементов) в результате горизонтального переноса от других организмов [21]. Подобные эволюционные преобразования происходят в мире микробов достаточно часто и имеют высокую скорость, в отличие от обычного пути

эволюции – медленного и постепенного накопления точковых мутаций.

С учетом изложенного была предложена, в частности, гипотеза о происхождении чумного и псевдотуберкулезного микробы от общего предка – бактерии, клетки которой содержали лишь одну плазмиду кальций-зависимости (pCad), а далее от этого предка возник чумной микроб в результате приобретения от кишечных бактерий еще двух плазмид, обеспечивших защиту от фагоцитоза (pFra/Tox) и способность микробов вызывать блок преджелудка у блох (pPst), а также возбудители псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, эволюция которых пошла по пути модификации ряда хромосомных генов предкового вида, связанных с инвазивностью и адгезией [22, 23].

Детали эволюции возбудителей чумы, псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза еще предстоит выяснить, но не вызывает сомнения, что плазмидная природа основных факторов патогенности иерсиний будет играть в этом исследовании значительную роль.

Практические аспекты открытия плазмид у чумного микробы

На основе открытия в 1976–1977 гг. плазмид у чумного микробы и установления их связи с его факторами патогенности в последующие годы в НИИМ были получены новые данные по генетике вирулентности и иммуногенности чумного микробы, частично опубликованные в открытых источниках в 80–90-е гг. XX в., созданы новые вакциные штаммы и штаммы-суперпродуценты протективных антигенов, получены авторские свидетельства на изобретения и патенты [1, 24, 25]. Ключевым моментом в этих исследованиях было то, что ряд важнейших генов возбудителя чумы, как было установлено, локализован на плазмidaх, что значительно облегчало манипуляции с ними по сравнению с генами хромосомной локализации. В указанный период времени это было важно и обеспечивало быстрое достижение практических результатов.

Так, в НИИМ проводилась работа по созданию полидетерминантной живой вакцины, защищающей одновременно от всех патогенных иерсиний: возбудителей чумы, псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Для достижения поставленной цели была сконструирована рекомбинантная плазмida, способная встраиваться в хромосому бактерий и «выключать» гены, связанные с патогенностью реципиента [24]. С использова-

нием данной плазиды был получен мутант штамма дикого типа возбудителя псевдотуберкулеза, ауксотрофный по ароматическим аминокислотам и полностью авирулентный [24]. Данный аттенуированный штамм был использован в качестве реципиента, в его клетки была передана рекомбинантная плазиды с клонированным геном протективного антигена чумного микробы Fra. Полученный прототипный вакциинный штамм в экспериментах на животных обладал протективными свойствами как в отношении возбудителя чумы, так и в отношении возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза.

Еще одним важным для практики направлением было конструирование рекомбинантных штаммов-продуцентов протективных и видоспецифических антигенов чумного микробы. На первом этапе исследований были клонированы гены антигена Fra, мышного токсина, антигенов V и W, пестицина I, фибринолизина/плазмокоагулазы. Далее на основе стабильных векторов были сконструированы гибридные плазиды с клонированными генами чумного микробы.

Полученные гибридные плазиды передавали в клетки бесплазидных авирулентных штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов, а также в клетки кишечной палочки. В результате были получены авирулентные штаммы-продуценты, синтезирующие FI-антигена в 8 раз больше, мышного токсина – в 30 раз больше, по сравнению с обычными штаммами чумного микробы [25]. Продуценты отличаются простотой культивирования, так как они имеют сниженные питательные потребности, конечный продукт получается более чистым, поскольку продуценты лишены многих контаминации антигенов. Полученные штаммы-продуценты использовались при разработке химической чумной вакцины и ряда диагностических препаратов.

Заключение

На основании анализа данных литературы и архивных материалов показана ведущая роль отечественных военных ученых в открытии собственных плазид чумного микробы.

Список источников/References

- Медведев НП, Погорельский ИП, Кибиров АВ, Черкасов НА, Золотарев АГ, Шабалин БА и др. *История и современность. 1928–2008. Федеральное государственное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны России*. Киров: ОАО «Кировская областная типография»; 2008. 648 с.
- Medvedev NP, Pogorelskiy IP, Kibirev AV, Cherkasov NA, Solotarev AG, Shabalin BA, et al. *History and modernity. 1928–2008. Federal State Institution “48 Central Research Institute” of the Ministry of Defence of Russia*. Kirov: OAO Kirov Regional Printing House; 2008. 648 p. (in Russian).
- Онищенко ГГ, Дармов ИВ, Васильев НТ, Кириллов ИА, Кикоть СГ, Борисевич СВ и др. *Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты*. Онищенко ГГ, Дармов ИВ, Борисевич СВ, ред. 2-е изд. Сергиев Посад; 2018. 592 с.
- Onishchenko GG, Darmov IV, Vasilyev NT, Kirillov IA, Kikot SG, Borisevich SV, et al. *Anthrax: actual problems of elaboration and introduction in practice of medical defense means*. Onishchenko GG, Darmov IV, Borisevich SV, Eds. 2nd ed. Sergiev Posad; 2018. 592 p. (in Russian).
- Пехов АП. *Генетика бактерий*. М.: Медицина; 1977. 408 с.
- Pekhov AP. *Genetics of bacteria*. Moscow: Medicine; 1977. 408 p. (in Russian).
- Кудлай ДГ. *Внекромосомные факторы наследственности бактерий и их значение в инфекционной патологии*. М.: Медицина; 1977. 224 с.
- Kudlay DG. *Extrachromosomal factors of inheritance of bacteria and their significance in the infectious pathology*. Moscow: Medicine; 1977. 224 p. (in Russian).
- Мейнелл Г. *Бактериальные плазиды* [пер. с англ.]. М.: Мир; 1976. 237 с.
- Meynell GG. *Bacterial plasmids [transl. from English]*. Moscow: Mir; 1976. 237 p. (in Russian).
- Домарадский ИВ. *Чума*. М.: Медицина; 1998. 176 с.
- Domaradskiy IV. *The plague*. Moscow: Medicine; 1998. 176 p. (in Russian).
- Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17(2):434–64.
<https://doi.org/10.1128/cmr.17.2.434-464.2004>
- Супотницкий МВ. *Биологическая война. Введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений: монография*. М.: «Кафедра», «Русская панорама»; 2013. 1136 с.
- Supotnitskiy MV. *Biological war. Introduction in epidemiology of artificial epidemic processes and biological damages: monography*. Moscow: “Kafedra”, “Russian Panorama”; 2013. 1136 p. (in Russian).

9. Ашмарин ИП. Молекулярная биология: Избранные разделы. Л.: Медицина, Ленинградское отделение; 1974. 360 с.
Ashmarin IP. Molecular biology: Selected divisions. Leningrad: Medicine, Leningrad's div.; 1974. 360 p. (in Russian).
10. И.П. Ашмарин: жизнь в науке и наука в его жизни. Ашмарина-Кукушкина ОИ, Ашмарина ЛИ, ред. М.: Изд-во МГУ; 2010. 328 с.
I.P. Ashmarin: the life in science and science in his life. Ashmarina-Kukushkina OI, Ashmarina LI, Eds. Moscow: MGU Public House; 2010. 328 p. (in Russian).
11. Пак ГЮ. Некоторые свойства индуцированных непестицидогенных мутантов чумного микробы. Проблемы особо опасных инфекций. 1969;(1):75–9.
Pak GYu. Some characteristic of induced apesticinogenic mutants of the plague microbe. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 1969;(1):75–9 (in Russian).
12. Кольцова ЕГ, Сучков ЮГ, Лебедева СА. Передача фактора бактериоцидогенности у чумного микробы. Генетика. 1971;7(4):118–22.
Koltsova EG, Suchkov YuG, Lebedeva SA. Transfer of the bacteriocinogenic factor of the plague microbe. *Genetics.* 1971;7(4):118–22 (in Russian).
13. Little RV, Brubaker RR. Characterization of deoxyribonucleic acids from *Yersinia pestis* by ethidium bromide cesium chloride density gradient centrifugation. *Infect Immun.* 1972;5(4):630–31.
14. Авторское свидетельство 001 СССР. «Плазма». Дармов ИВ: № 01/01A; заявл. 27.06.1978; опубл. 27.06.1983. Приоритет открытия 27.12.1977.
Author's certificate 001 SU. «Plasma». Darmov IV.: № 01/01A; declar. 27.06.1978; publ. 27.06.1983. Priority of discovery 27.12.1977. (in Russian).
15. Попов ЮА, Проценко ОА, Анисимов ПИ, Кокушкин АМ, Можаров ОТ. Обнаружение плазмид пестицидогенности чумного микробы методом электрофореза в агарозном геле. В кн.: *Профилактика особо опасных инфекций.* Саратов; 1980. С. 20–5.
Popov YuA, Prozenko OA, Anisimov PI, Kokushkin AM, Mozharov OT. Identification of the pesticinogenic plasmids of the plague microbe by use electrophoresis method in agarose gels. In: *Profilaktika osobo opasnykh infektsii [Prophylaxis of particularly dangerous infections].* Saratov; 1980. P. 20–5 (in Russian).
16. Проценко ОА, Анисимов ПИ, Можаров ОТ, Попов ЮА, Кокушкин АМ, Кононов НП. Внекромосомная наследственность чумного микробы. В кн.: *Эпидемиология и профилактика природноочаговых инфекций.* Саратов; 1981. С. 131–40.
Prozenko OA, Anisimov PI, Mozharov OT, Popov YuA, Kokushkin AM, Kononov NP. Extrachromosomal inheritance of the plague microbe. In: *Epidemiologia i profilaktika prirodnoochagovikh infektsii [Epidemiology and prophylaxis of feral herd infections].* Saratov; 1981. P. 131–40 (in Russian).
17. Ferber DM, Brubaker RR. Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 1981;31(2):839–41.
18. Ben-Gurion R, Shafferman A. Essential Virulence Determinants of Different *Yersinia* Species are Carried on a Common Plasmid. *Plasmid.* 1981;5(2):183–87.
19. Yang R, Anisimov A, Eds. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* V. 918. *Yersinia pestis:* Retrospective and Perspective. Dordrecht: Springer Science, Business Media Dordrecht; 2016. 391 p.
<https://doi.org/10.1007/978-94-024-0890-4>
20. Demeure Ch, Dussurget O, Fiol GM, Le Guern A-S, Savin C, Pizarro-Cerda J. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination and diagnostics. *Microbes Infection.* 2019;21(5–6):202–12.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.06.007>
21. Шестаков СВ. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий. Экол генетика. 2007;5(2):12–24.
<https://doi.org/10.17816/ecogen52>
- Shestakov SV. How does the horizontal gene transfer in bacteria occur and then is it tied up. *Ecol Genetics.* 2007;5(2):12–24 (in Russian).
<https://doi.org/10.17816/ecogen52>
22. Achtman M, Zurth K, Moirelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(24):14043–8.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14043>
23. Сунцов ВВ. Геномогенез микробы чумы *Yersinia pestis* как процесс мозаичной эволюции. Генетика. 2021;57(2):140–54.
<https://doi.org/10.31857/S0016675821020119>
- Sunzov VV. Genomogenesis of the plague microbe *Yersinia pestis* as mosaic evolution process. *Genetics.* 2021;57(2):140–54 (in Russian).
<https://doi.org/10.31857/S0016675821020119>

24. Янов СН, Дармов ИВ, Маракулин ИВ. Способ введения чужеродных генов в геномы грамотрицательных микроорганизмов, плазмидный вектор рKC47м для введения чужеродных генов в геномы грамотрицательных микроорганизмов, способ конструирования плазмидного вектора рKC47м. Патент РФ. 2092556. Опубл.10.10.1997. Бюл. № 28.

Yanov SN, Darmov IV, Marakulin IV. Method for introducing of foreign genes in genomes gram-negative microbes, plasmid vector pKC47m for introducing of foreign genes in genomes gram-negative microbes, method for constructing of plasmid vector pKC47m. Patent RU 2092556. Publ. 10/10/1997. Bull. № 28 (in Russian).

25. Дармов ИВ, Маракулин ИВ, Янов СН, Бывалов АА, Абдуллин ТГ, Смирнов ЕВ. Конструирование штаммов-продуцентов антигенов FI и T чумного микробы. *Биотехнология*. 1992;(6):59–62.

Darmov IV, Marakulin IV, Yanov SN, Bivalov AA, Abdullin TG, Smirnov EV. Construction of strains producers of antigens FI and T of plague microbe. *Biotechnology*. 1992;(6):59–62 (in Russian).

Вклад авторов / Authors' contributions

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.В. Дармов** – формирование концепции статьи, написание текста рукописи, окончательное утверждение рукописи для публикации; **С.Н. Янов** – критический пересмотр и коррекция текста рукописи / All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contribution were as follows: **I.V. Darmov** – formation of the concept of the article, drafting the manuscript, final approval of the manuscript for publication; **S.N. Yanov** – critical revision and correction of the text of the manuscript; **I.V. Marakulin** – collection and analysis of scientific literature data, revision the manuscript.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been double-blind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторах / Authors

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119.

Дармов Илья Владимирович. Главный научный сотрудник научно-исследовательского управления, д-р мед. наук, профессор.

Янов Сергей Николаевич. Старший научный сотрудник, д-р биол. наук, профессор.

Маракулин Игорь Вадимович. Ведущий научный сотрудник, д-р мед. наук, ст. науч. сотр.

Контактная информация для всех авторов: 23527@mil.ru

Контактное лицо: Дармов Илья Владимирович; 23527@mil.ru

Branch Office of 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation.

Ilya V. Darmov. Leading Researcher. Dr. Sci. (Med.), Professor.

Sergey N. Yanov. Senior Researcher. Dr. Sci. (Biol.), Professor.

Igor V. Marakulin. Leading Researcher. Dr. Sci. (Med.).

Contact information for all authors: 23527@mil.ru

Contact person: Ilya V. Darmov; 23527@mil.ru



Яды, микробы, животные, адский огонь: История биологического и химического оружия Древнего мира

Мэйор А.

Яды, микробы, животные, адский огонь:
История биологического и химического оружия Древнего мира / Адриенна Мэйор; [пер. с англ. А.Г. Коробейникова]. М.: Ко-Либри, Азбука-Аттикус; 2023. 432 с.; ил.

Adrienne Mayor

Greek fire, poison arrows, and scorpion bombs Biological and Chemical Warfare in the Ancient World.

Впервые опубликовано в 2003 г. издательством Overlook Press. Права на перевод предоставлены Sandra Dijkstra Literary Agency.

ISBN 978-5-389-21666-2

В прошлом году на книжном рынке России появилась уникальная книга известного американского историка, сотрудника Стэнфордского университета, Адриенны Мэйор (Adrienne Mayor) «Яды, микробы, животные, адский огонь: История биологического и химического оружия Древнего мира». Книга посвящена истории применения химического, зажигательного и биологического оружия в Античный период истории человечества. Собирая много лет подобную информацию, я был поражен обилием использованных автором источников. Труды только античных авторов насчитывают 65 наименований. Современных источников не менее 220, плюс археологические находки, детально описанные автором, и иллюстративные материалы. Временной охват книги составляет почти 3000 лет начиная с ближневосточных записей 1500 г. до н.э. и архаических греческих мифов, впервые собранных Гомером примерно в 750–650 гг. до н.э., есть свидетельства и латинских авторов – от основания Рима и до поздней Римской империи VI в. н.э.

Однако книга очень современна. Она показывает глубокую подоплеку, своего рода ментальный фундамент, на котором сегодня стоят апологеты новых поколений оружия массового поражения и уничтожения людей, и их надежды на убийства без разрушения материальных ценностей, накопленных этими людьми. Идеи создания такого оружия появились в глубокой древности и находили свое развитие на протяжении всей человеческой истории, вопреки тому, что к ним



ЯДЫ, МИКРОБЫ, ЖИВОТНЫЕ,
АДСКИЙ ОГОНЬ

ИСТОРИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ХИМИЧЕСКОГО ОРУЖИЯ
ДРЕВНЕГО МИРА

Адриенна Мэйор

историк, специалист по науке, мифологии и фольклору Античности

Супотницкий М.В.
Supotnitskiy M.V.

Например, первым упоминаются шумерские клинописные таблички от 1700 г. до н.э., свидетельствующие о понимании процесса заражения во время эпидемий; раздела «Карты», очерчивающих географию рассматриваемых событий; «Введения», рассеивающего наши иллюзии, взятые из школьных учебников, что когда-то в античности войны велись храбрецами, побеждающими на поле боя умением пользоваться копьями и мечами. Поэтому у него второе название – «Война без правил». Далее идут семь насыщенных фактами глав, в которых последовательно, начиная с Геракла, излагается история применения, отравленного оружия (морозник, яд гидры, яды змей, трупные яды, аконит, белладонна и др.) и массовые отравления населения осаждаемых городов через воду рек и колодцев, зараженных «дурными травами».

Мы узнаем, что некоторые ядовитые растения получали свое наименование по типу оружия, которым применялся их яд. Например, само название «аконит» восходит своим названием к греческому слову «акон», обозначающему дротик или копье. Давленным аконитом, добавленным в колодцы, уничтожались целые армии.

В 256 г. н.э. войско Сасанидов намеренно изготовило и пустило в ход ядовитый газ – диоксид серы для отравления римлян, укрывшихся в туннеле. Скелеты 20 жертв и остаточное содержание кристаллов серы, а также следы сожженной в жаровне смолы подтверждают эту гипотезу. В 1855 г. британцы, пришедшие в отчаяние упорным сопротивлением защитников Севастополя, готовились к такой же атаке, но в большем масштабе.

Древние не знали таких понятий, как бактерии, вирусы или малярийные плазмодии, но они пользовались эмпирическим термином «миазмы», оставленным Гиппократом. Он означает нечто материальное, враждебное природе людей. Их источником считались болотистая местность, реки и озера в низинах, влажные прибрежные местности, территории прошлых сражений, заваленные трупами. Туда старались оттеснить войска противника, заставить его пить зараженную опасным патогенами и ядами воду, подвергаться атакам малярийных комаров.

В крепости во время осады и в корабли во время морских сражений забрасывались суды с ядовитыми насекомыми и змеями. Отступая, оставляли противнику отравленные продукты, вино, воду. Такая тактика ведения

войны используется и сегодня. Например, в 2014 г. сообщалось, что исламская экстремистская группировка ИГИЛ¹ терроризировала иракские деревни, забрасывая туда канистры с живыми скорпионами. В зоне СВО неоднократно фиксировались случаи отравления продуктов и спиртных напитков токсическими соединениями, используемыми для ведения химической (ЕА-3167 – аналог боевого отравляющего вещества «Бизет») или биологической войны (ботулинический токсин).

Отдельная глава «Адский огонь», посвящена зажигательному оружию. Разнообразие таких средств было огромным. Это и зажигательные стрелы; огненные снаряды и горящие копья, метаемые катапультами; брандера с котлами с кипящей серой и смолой; специальные боеприпасы, разбрасывающие на защитников крепостей раскаленный песок и металлические опилки – аналоги термитных и магниевых бомб Второй мировой войны. И наконец – «греческий огонь» – абсолютное оружие византийцев и арабов поздней античности. Его состав горел в воде, сбить его было не возможно. Среди ингредиентов горючей жидкости – дистиллированная нефть и загустители (смола, воск, сера, селитра). Точные составы неизвестны. Но еще большее значение в то время имела система ее подачи и поджога, которая позволяла выстреливать греческим огнем с небольших судов без современных клапанов и сосудов высокого давления и других технических новшеств XX в., используемых в современных огнеметах.

Автор в заключении приводит слова римского историка «Митридатовых войн» Аппиана Александрийского²: «Они попробовали все, что только могли придумать люди».

Данная книга доказывает, что биологическое, химическое и зажигательное оружие применялось всегда. Подобные методы ведения войны прослеживаются с самого начала человеческой культуры, как и связанные с ними практические проблемы и этические вопросы. Русское издание книги автор дополнила новыми материалами об оружии массового поражения прошлого и о современном оружии, ставшим его эволюционным развитием.

Главный специалист 27 НЦ МО РФ,
канд. биол. наук, ст. науч. сотр.
М.В. Супотницкий
ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3193-1032>

¹ Признана террористической организацией, ее деятельность запрещена на территории Российской Федерации (Прим. ред.).

² Аппиан Александрийский (греч. Αππιανός) – римский историк (ок. 95–165 г. н.э.).

Наша замечательная Россия

Нулевая мировая. Штурм Петропавловска-Камчатского, 1854 г.



Военный губернатор Камчатки и командир Петропавловского военного порта генерал-майор В.С. Завойко (1812–1898) располагал сведениями о возможном нападении летом 1854 г. на Петропавловск англичан и французов. Он успел подготовиться к обороне. Защитников города было 930 человек при 68 орудиях, 39 – на 7 батареях, 27 – на кораблях. Англо-французская эскадра состояла из 6 кораблей (фрегаты «Форт», «Президент», «Пайк», корвет «Эвридида», бриг и пароходофрегат), 2500 моряков вместе морпехами при 204 орудиях. Первый штурм состоялся 20 августа, второй – 24 августа. Оба оказались разгромными для противника.

Верхняя фотография. Историческая часть Петропавловска с Сигнальной сопки. В центре Никольская сопка, где происходили основные бои в 1854 г. Фотографии нижнего ряда. Слева – макет третьей («Смертельной») батареи лейтенанта князя А.П. Максутова (1830–1854), пять 24-фт. пушек. Батарея вела дуэль с фрегатом «Форт» с расстояния 800 м. Залп каждого борта – 30 пушек. Батарея нанесла серьезные повреждения фрегату и потопила катер с десантом (до 50 морпехов). Большая часть ее артиллеристов погибла, Максутов умер от ран 10 сентября. В центре – знамя Королевского гибралтарского полка морской пехоты. Захвачено во время второго штурма города, когда десант из 800 человек во главе с капитаном Паркером попал под картечные выстрелы шестой батареи поручика К.Я. Гезехуса (1817–1881), четыре 18-фт. и шесть 6-фт. пушек. Паркер был убит. Британские морпехи бросились бежать на Никольскую сопку. Оттуда их сбросили штыками наши солдаты и ополченцы. Справа – братская могила защитников Петропавловска. Погибли не менее 350 британцев и французов. Около 150 раненых и 5 пленных. Наших во время первого штурма погибли 6 человек и 13 были ранены, во время второго – 38 человек и 139 были ранены. Крест справа – захоронение русских. Крест слева – захоронение британцев и французов. Выше – часовня (1885 г.).

Фотографии М.В. Супотницкого



Сайт журнала



РИНЦ

