

ГЕГЕНАВА АННА ВЯЧЕСЛАВОВНА

**МИКРОБИОТА КОЖНЫХ ПОКРОВОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ
ГЕРМЕТИЧНЫХ ПОМЕЩЕНИЙ И ДЛИТЕЛЬНЫХ КОСМИЧЕСКИХ
ПОЛЕТОВ ПРИ ДЕТЕКТИРОВАНИИ МЕТОДОМ ХРОМАТОМАСС-
СПЕКТРОМЕТРИИ МИКРОБНЫХ МАРКЕРОВ**

14.03.08 – авиационная, космическая и морская медицина

03.02.03 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва, 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук

Научные руководители:

Доктор медицинских наук

Мухамедиева Лана Низамовна

Доктор биологических наук,

профессор

Осипов Георгий Андреевич

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедры микробиологии,
вирусологии, иммунологии Московского
государственного медико - стоматологи-
ческого университета

Царев Виктор Николаевич

Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией « Клиника
здорового человека» ГНЦ РФ – ИМБП РАН

Воронков Юрий Иванович

Ведущая организация: Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский испытательный Центр подготовки космонавтов имени Ю.А.Гагарина»

Защита состоится «_____» _____2012 при ГНЦ РФ - ИМБП РАН по адресу: 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д.76а

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГНЦ РФ - ИМБП РАН (123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д.76а)

Автореферат разослан «_____» _____2012

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Левинских М. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность работы.

Одной из основных проблем медико-биологического обеспечения длительных пилотируемых космических полетов является предотвращение возможности развития инфекционных заболеваний у членов экипажей (Лебединский А.В. с соавт., 1964; Левашов В.В., Финогенов А.М., 1967; Нефедов Ю.Г. с соавт., 1979; Ташпулатов Р.Ю. с соавт. 1979; Залогуюев С.Н. с соавт., 1986; Поликарпов Н.А., 1991; Пирсон Д.Л., 1994; Горшков В.П., 1995; Лизько Н.Н., 1996; Викторов А.Н. с соавт., 1998; Новикова Н.Д., 2003; Ильин В.К., 2004, 2008; Lechtman M.D. et al., 1967; Berry Ch.A. 1970; Ferguson J.K. et al., 1973; Rodgers E., 1986; Taylor G.R., 1997; Costello E.K. et al., 2009). Известно, что кожные покровы являются мощным источником загрязнения воздушной среды герметичных помещений ограниченного объема. Количество микроорганизмов, поступающих с покровных тканей человека в окружающую среду герметично замкнутого помещения, увеличивается практически в три раза (Берлин А.А., 1990). При этом эпидемиологическое значение имеют условно-патогенные представители аутомикрофлоры кожных покровов человека, проявление патогенных свойств которых в герметично замкнутом помещении существенно возрастает (Нефедов Ю.Г., 1979; Викторов А.Н. с соавт. 1986, 1998; Залогуюев С.Н. с соавт., 1986; Новикова Н.Д., 2003).

Изменения функционального состояния кожи у космонавтов развиваются в результате нарушения колонизационной резистентности организма, как результат воздействия неблагоприятных условий среды обитания: ограниченного объема помещения, перекрестной аутоинфекции, многокомпонентного загрязнения воздуха химическими веществами, астении, стрессовых ситуаций, которые в сочетании со снижением иммунологической реактивности организма и нарушением барьерной функции эпителия, способствуют активизации потенциально патогенной микрофлоры у космонавтов (Залогуюев С.Н. с соав. 1980; Поликарпов Н.А., 1991; Ильин В.К. с соавт. 2004).

Следует отметить, что в условиях эксплуатации Международной космической станции при частой сменяемости членов экипажей из различных географических регионов возрастает опасность развития оппортунистических инфекций у человека, обусловленных активацией условно-патогенной микрофлоры (Дроздова В.П. с соавт., 1970; Прохоров В.Я., 1971; Старцева Н.Д., 1976; Борисова О.К., 1976; Залогуюев С.Н. с соавт., 1986; Новикова Н.Д., 2001; Mishra S.K., Pierson D.L., 1992; Taylor G.R., 1993; Пирсон Д.Л. с соавт., 1997).

Однако проблемой остается невозможность оценки роли некоторых групп микроорганизмов, труднокультивируемых с помощью классического бактериологического метода, прежде всего анаэробов. Используемые в последнее десятилетие молекулярно-биологические методы видоспецифичны, но могут дать ложноположительные результаты и значительно варьируют, затрудняя оценку общей численности популяции, (Нобл У.К., 1986; Осипов Г.А. и др. 1996, 2003; Noble W.C., 1993; Dekio I. et. al., 2005).

Перспективным является метод газовой хроматографии – масс спектрометрии (ГХ-МС) (дайте ссылку, если не поздно на Осипов Г.А. и др. 1996), основанный на идентификации и количественном определении специфических маркерных молекул,

входящих в состав клеточных липидов микроорганизмов в биопробе (Васюренко З.П., 1992; Goodfellow M., Minnikin D.E., 1985; Grice E.A. et al., 2009).

Хемодифференциация микроорганизмов методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии по видоспецифичным, генетически детерминированным высшим жирным кислотам, альдегидам и стеринам (стеринам) клеточной стенки позволяет детектировать микроорганизмы на уровне семейства, рода и вида с количественной оценкой ауто- и инородной микробиоты человека (Албертс Б., 1994; Турова Е.С., 1996; Осипов Г.А., 2005, 2007).

Высококчувствительный, селективный метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии с установлением микробных маркеров, применительно к специфичным условиям обитания человека в герметичных помещениях и длительных космических полетах, позволит оперативно проводить мониторинг микробиологического статуса человека (длительность ГХ-МС анализа составляет 3 часа) и разработать адекватные методы профилактики для снижения риска возникновения инфекционных заболеваний.

В связи с этим научный и практический интерес представляют исследования, позволяющие расширить спектр родового и видового составов микробных сообществ, формируемых на кожных покровах человека при длительной изоляции в герметичных помещениях и космических полетах, с внедрением оперативного метода контроля и диагностики микробиоценоза кожи человека в реальном времени по молекулярным маркерам.

Цель работы. Исследование микробиоты кожных покровов человека при длительной изоляции в герметичных помещениях и в космических полетах методом масс-спектрометрии микробных маркеров и установление возможности применения метода ГХ-МС для оперативной диагностики анаэробной и условно патогенной микрофлоры человека в длительных космических полетах.

Задачи исследования:

1. Разработать технологию отбора, хранения и тестирования кожных проб для проведения хромато-масс детектирования.
2. Экспериментально сравнить родо/видовой составы микробиоты кожных покровов здорового человека при длительности изоляции от 105 и до 390 суток в герметичном помещении и в условиях космическом полета (до 180 суток).
3. Провести сравнительный анализ микробного статуса кожных покровов человека культуральным методом и методом ГХ-МС детектирования.
4. Установить реперные точки для анализа микробной обсемененности кожных покровов человека, достаточных для объективной и оперативной оценки микробного статуса.
5. Методом кластерного анализа установить маркеры - диагностически значимые микроорганизмы собственной и инородной микробиоты, определяющие микробиологический статус человека при изоляции в герметичном объекте и в космическом полете.

Научная новизна работы.

Впервые детектированием методом ГХ-МС при длительной изоляции в гермообъеме и космическом полете расширен видовой/родовой диапазон комменсальной и условно-патогенной аутомикрофлоры кожных покровов человека, трудно культивируемой классическим бактериологическим методом, включая анаэробную

микрофлору глубоких слоев кожи и: *Eubacterium lentum*, *Bacillus cereus*, *Nocardia sp.*, *Pseudonocardia*, *Actinomycetes*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Prevotella*, *Propionibacterium sp.*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium sp.*, *Fusobacterium*, *Malassesia*, *Peptostreptococcus anaerobius*.

Микробиота кожных покровов человека делится на две группы- микроорганизмы, которые претерпели количественные изменения в результате условий изоляции в гермообъеме (*Actinomycetes*, *Rhodococcus*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus sp.*, *Candida*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacillus cereus*), среди которых преобладали представители условно-патогенной аутомикрофлоры, включая потенциальных возбудителей оппортунистических инфекций, и - микроорганизмы, количественно не отреагировавшие на экстремальные условия длительной изоляции в гермообъекте (*Staphylococcus sp.*, *Enterococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium sp.*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus sp.*, *Alcaligenes*, *Prevotella*, *Malassezia*, *Eubacterium lentum* , *Clostridium sp.*)

Показано, что дисбиотические изменения кожных покровов человека при длительной (390 суток) изоляции в герметичных помещениях характеризуются определенной закономерностью и имеют волнообразный характер с периодами активации условно-патогенной аутомикрофлоры в первый месяц адаптации человека к условиям изоляции и периодом относительной стабилизации видового и количественного состава микробиоты. Второй период активации условно-патогенной микрофлоры наблюдается с 270 суток изоляции и достигает максимальных значений по мере увеличения длительности изоляции человека до года. Из числа микроорганизмов, количественно прореагировавших на условия длительной изоляции, группу риска составили: *Streptococcus sp.*, - потенциальные возбудители стрептодермий, в частности импетиго и рожистого воспаления кожи, *P. acnes* – являющиеся главным звеном в патогенезе угревой болезни, и *Actinomycetes* - потенциальные возбудители актиномикоза.

Практическая значимость работы.

Внедрение метода оперативного контроля по молекулярным маркерам методом ГХ-МС детектирования позволит проводить мониторинг условно-патогенной и анаэробной микробиоты кожных покровов и снизить риск возникновения инфекционных заболеваний при длительной изоляции человека в герметичном помещении и в условиях космического полета.

Установление микробных маркеров микробиологического статуса человека создает основу для оперативного контроля и разработки бортовой аналитической аппаратуры в реальных условиях полета.

Разработана и апробирована технология отбора и подготовки кожных проб для анализа методом ГХ-МС в течение длительного космического полета и применительно к условиям герметичных помещений.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Метод ГХ-МС, являясь высокочувствительным, некультуральным методом детектирования микробиоты кожных покровов человека по видоспецифичным высшим жирным кислотам клеточной стенки микроорганизмов, позволяет расширить видовой/родовой диапазон идентификации комменсальной и условно-патогенной аутомикрофлоры, включая микроорганизмы, трудно культивируемые классическими бактериологическими методами: *Pseudonocardia*, *Actinomycetes sp.*, *Rhodococcus*,

Nocardia sp., *Pseudonocardia*, *Propionibacterium sp.*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Fusobacterium*, *Alcaligenas*, *Prevotella*, *Malassezia*, *Bacillus cereus*, *Eubacterium lentum*, *Clostridium sp.* и др.

2. Хемодифференциацией микроорганизмов методом ГХ-МС детектирования с установлением молекулярных маркеров показано, что в при длительной изоляции в гермобъеме и в космическом полете микробиота кожи человека характеризуется количественными и видовыми изменениями, с увеличением доли условно-патогенных микроорганизмов (включая анаэробные), что является одним из факторов микробиологического риска и определяет необходимость осуществления оперативного мониторинга состояния микрофлоры кожных покровов по микробным маркерам.

Апробация работы.

Основные результаты и положения диссертации докладывались и обсуждались: на Международном конгрессе «Человек и космос» (Москва, Россия, май 2009); на VIII «Конференции молодых ученых, специалистов и студентов», посвященной дню космонавтики (Москва, апрель 2009); на Всероссийской конференции «Экотоксикология- 2009. Современные биоаналитические системы, методы и технологии (Пушино - Тула, Россия, октябрь 2009); на IX «Конференции молодых ученых, специалистов и студентов», посвященной дню космонавтики (Москва, апрель 2010); на «XXXVIII Международных общественно- научных чтениях, посвященных памяти Ю. А. Гагарина» (Гагарин, Россия, март 2011); на конференции «Актуальные проблемы космической биологии и медицины» (Москва, Россия, октябрь 2011).

Диссертация прошла апробацию на заседании секции Учёного Совета ГНЦ РФ- ИМБП РАН “Космическая медицина” (протокол №1 от 12 января 2012 г.).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура работы.

Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов и практических рекомендаций. Библиографический указатель включает 230 наименований, из них 118 российских и 112 иностранных. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 34 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования.

При выполнении работы проведены исследования с участием человека при длительности изоляции от 105 до 390 суток в герметичных обитаемых помещениях и космонавтов в длительных космических полетах. Группу контроля составили добровольцы в обычных условиях жизнедеятельности.

Основные направления экспериментальных исследований и их объем представлены в табл.1.

Отбор проб.

Отбор проб микрофлоры **покровных испытателей** ? проводился по общепринятой в микробиологической практике методике – методом кожных смывов (Залогуев С.Н., Тейлор Г.Р., 1974). В условиях космического полета для взятия кожных проб использовали стандартные укладки со стерильным ватным тампоном, помещенным в

пробирку с капилляром и консервантом, обеспечивающим сохранение исходного состава микрофлоры на срок до 5 суток. Отбор аутомикрофлоры у космонавтов - членов экипажей МКС проводился со следующих биотопов: лба, щек, шеи, груди, подмышечных впадин, паховой области, ладоней рук. В наземных экспериментах забор кожных проб производился с участков подмышечных впадин и паховой области. Отбор микрофлоры осуществлялся в одно и то же время: натошак, до принятия душа не ранее 2 часов перед шлюзованием. Площадь исследуемой поверхности кожи - 4X5 см. После этого ½ тампона, отделенного пинцетом, использовалась при ГХ-МС анализе, а другая ½ - при бактериологическом исследовании.

Таблица 1. Структура и объем проведенных исследований.

Изучение динамики микробной обсемененности кожи человека	Периодичность исследования	Длительность экспериментов	Количество человек	Количество проанализированных проб		Биотопы
				ГХ-МС методом	Бактериологическим методом	
А. Исследования здоровых людей в обычных условиях обитания	однократные	----	34	34	34	Подмышечная впадина
				34	34	Паховая область
Наземные испытания гермобъеме в а) длительность 105 суток	перед экспериментом; на 35, 70, 90, 105 сутки эксперимента; на 7 и 14 сутки после эксперимента	105 суток	6	42	42	Подмышечная впадина
				42	42	Паховая область
б) длительность 390 суток	перед экспериментом и каждые 30 суток эксперимента	390 суток	6	78	78	Подмышечная впадина
				78	78	Паховая область
Б. Пилотируемые полеты	перед полетом; на 7 сутки полета; на 0 и 7 суток после приземления.	6 месяцев	7	28	28	Лоб
				28	28	Щека
				28	28	Шея
				28	28	Грудь
				28	28	Подмышечная впадина
				28	28	Паховая область
28	28	Ладонь				
Общее количество проанализированных проб методом ГХ-МС					466	

Анализ микрофлоры кожи бактериологическим методом исследования.

Микробиологические исследования у здоровых лиц производились в лаборатории микрoэкологии человека Отдела санитарно - гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания ГНЦ РФ - ИМБП РАН.

Исследование мазков: посев, микроскопию, оценку количественным методом, оценку результатов и идентификацию выделенных культур (с использованием соответствующих сред и методов) проводили в соответствии с методикой, описанной в приказе МЗ №535 от 22.04.1985г. Биохимическая идентификация проводилась с использованием коммерческих тест систем LACHEMA в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ микрофлоры кожи методом хроматомасс-спектрометрического детектирования.

ГХ-МС анализ отобранных проб проводился в лаборатории санитарно-химической безопасности и токсикологии ГНЦ РФ- ИМБП РАН.

Анализ и обоснование принадлежности маркеров конкретным микроорганизмам осуществляли по методике «Оценка микрoэкологического статуса человека методом хроматомасс-спектрометрии», утвержденной Росздравнадзором № 2010/038 от 24.02.2010 г. с внесенными изменениями для кожных проб.

Анализ проводился непосредственно после отбора проб или пробы замораживали и хранили при - 5/ -18°C, если немедленный анализ был невозможен. Пробоподготовка предусматривала проведение кислого метанолиза: в виал с пробой приливали 400 мкл 1N соляной кислоты в метаноле, завинчивали плотно крышкой и термостатировали при 80°C в течение 1 часа. К охлажденной реакционной среде добавляли 400 мкл гексана. Смесь встряхивали на вибраторе и отстаивали до разделения фаз в течение 5 мин при комнатной температуре. Верхнюю, гексановую фракцию отбирали порциями по 80 мкл в чистый виал и высушивали 5-7 мин при 80°C. Сухой остаток обрабатывали 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида в течение 15 мин при 80°C и закрытой крышке. К реакционной смеси добавляли микропипеткой 80 мкл гексана и переносили смесь в коническую вставку, которую помещали в тот же виал, и завинчивали его плотно крышкой. Смесь эфиров в количестве 1 мкл вводили в инжектор ГХ-МС системы AT-5973 Agilent Technologies (США). Для управления и обработки данных использовали штатные программы прибора. Хроматографическое разделение пробы осуществляли на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой HP-5ms Хьюлетт-Паккард. Масс-спектрометр - квадрупольный, с ионизацией электронами (70эВ) работал в режиме селективных ионов (SIM) при периодическом детектировании до 30 ионов в пяти интервалах времени.

Площади пиков маркеров на масс-фрагментограммах интегрировали автоматически по заданной программе с использованием внутреннего стандарта – тридеканового эфира тридекановой кислоты. Верификация данных масс-фрагментограмм состояла в измерении площадей пиков ионов определенной массы на селективной хроматограмме специфических веществ - маркеров микроорганизмов, учитывая время хроматографического удерживания. Данные автоматической обработки требовали частичной, ручной проверки измерения. Затем эти данные вводили в программу расчета, подготовленную в электронных таблицах EXCEL.

Статистическая обработка результатов.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием кластерного анализа (Егоров А.Д с соавт., 2009; Трифонова О.П. с соавт., 2010). Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Статистическую обработку данных, полученных при фоновых исследованиях, выполняли с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0» для Microsoft Windows.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Топическая характеристика микробной обсемененности кожных покровов и выбор реперных точек для мониторинга микробиоты кожи в условиях космического полета.

В соответствии с задачами исследование микрофлоры кожных покровов обследованных проводилась классическим бактериологическим методом и методом хроматомасс-спектрометрического детектирования (ГХ-МС). На коже обследованных методом ГХ-МС идентифицированы микроорганизмы, принадлежащие к 22 родам/видам. Количественно определены следующие виды микроорганизмов: *Pseudonocardia*, *Actinomyces sp.*, *Rhodococcus*, *Nocardia sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Propionibacterium acnes*, *Corinebacterium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium*, *Alcaligenas*, *Prevotella*, *Candida*, *Malassezia*, *Bacillus cereus*, *Eubacterium lentum* (группа А), *Clostridium sp.*

В результате исследований установлено, что анализ кожных проб при длительной изоляции человека в гермообъеме и в космическом полете методом ГХ-МС детектирования позволил расширить родовой/видовой диапазон комменсальной и условно-патогенной аутомикрофлоры, труднокультивируемой классическим бактериологическим методом, включая анаэробную микрофлору глубоких слоев кожи, *Eubacterium lentum*, *Bacillus cereus*, *Nocardia sp.*, *Actinomycetes*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Prevotella*, *Propionibacterium sp.*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium sp.*, *Fusobacterium*, *Malassesia*, *Peptostreptococcus anaerobius* (рис. 1, 3).

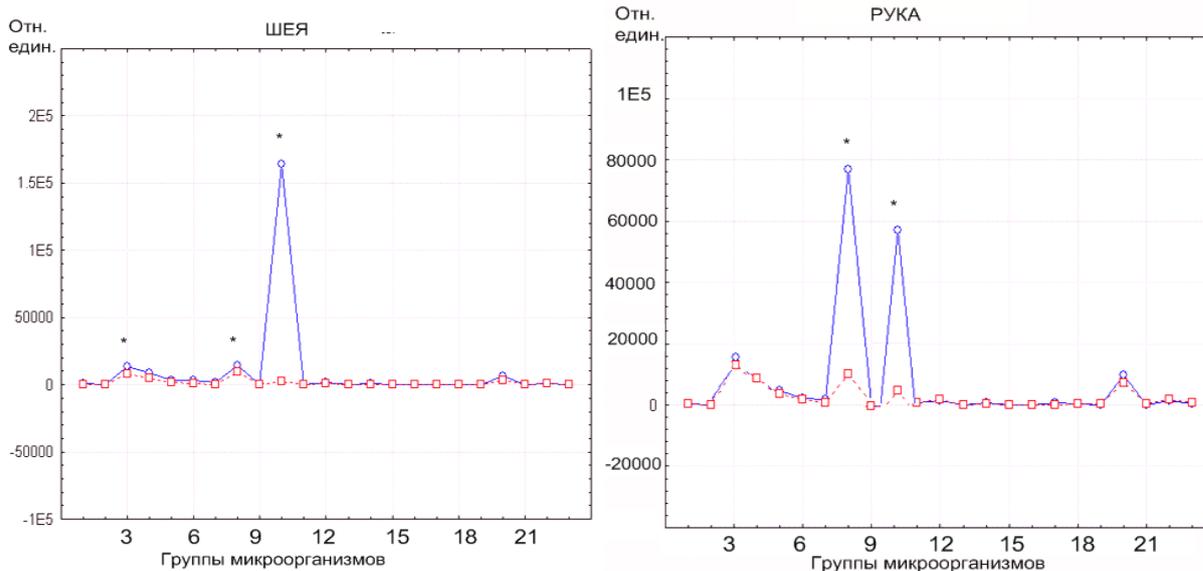


Рис. 1. Распределение микроорганизмов кожных покровов лба, шеи, щеки, руки, груди по отношению к реакции на воздействие комплекса факторов космического полета ($p < 0,05$).

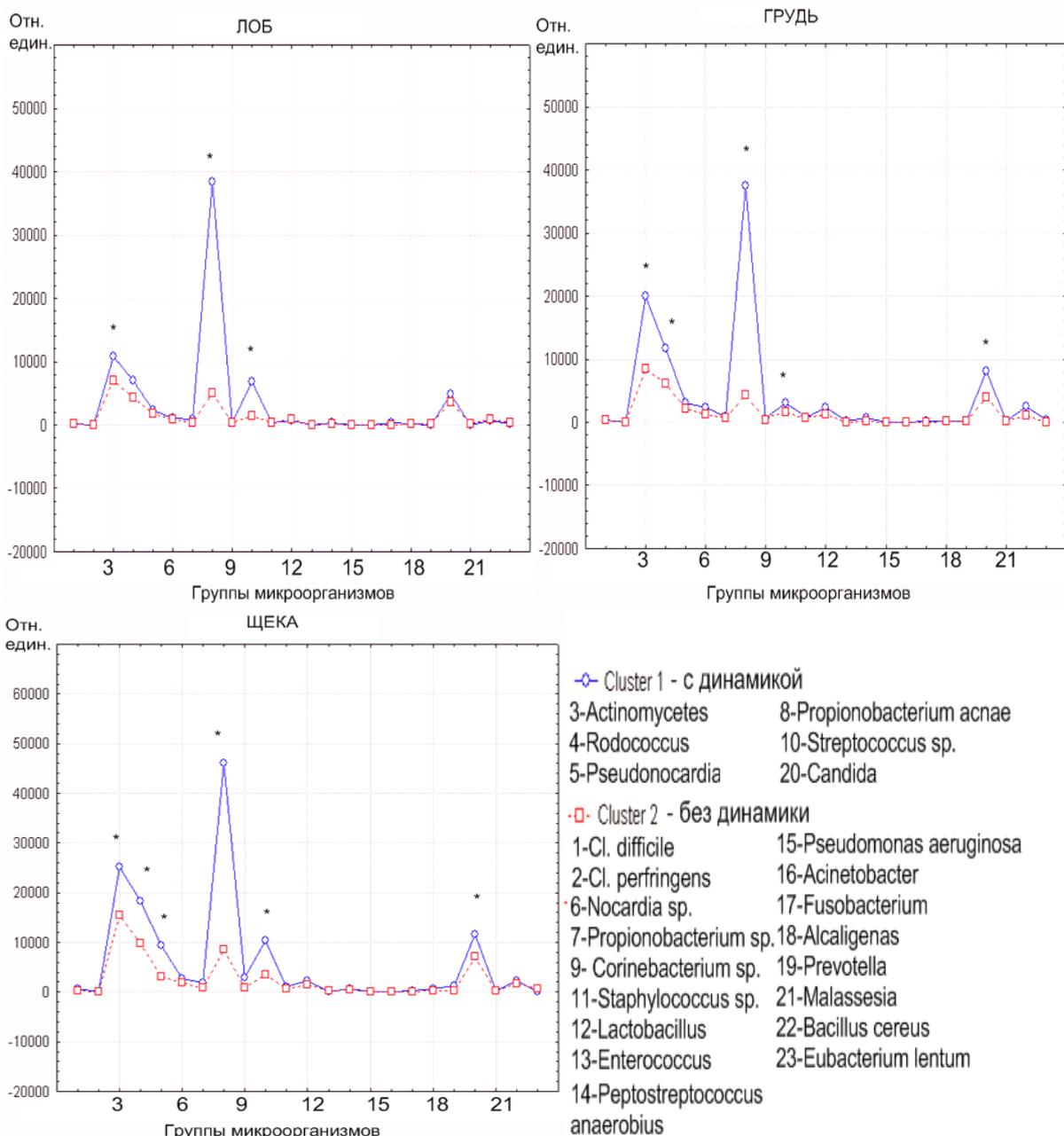


Рис. 1 (продолжение). Распределение микроорганизмов кожных покровов лба, шеи, щеки, руки, груди по отношению к реакции на воздействие комплекса факторов космического полета ($p < 0,05$).

Кластерный анализ полученных результатов позволил все идентифицированные микроорганизмы биотопов лба, щеки, шеи, груди, руки, подмышечной впадины и паховой области разделить на две группы - два кластера (рис. 2, 3). Первая - группа микроорганизмов, которая количественно отреагировала на действие комплекса факторов космического полета - Cluster 1. Cluster 2 - группа микроорганизмов, количественно не отреагировавших на действие факторов космического полета, находившихся на относительно стабильном уровне в течение всех сроков исследования.

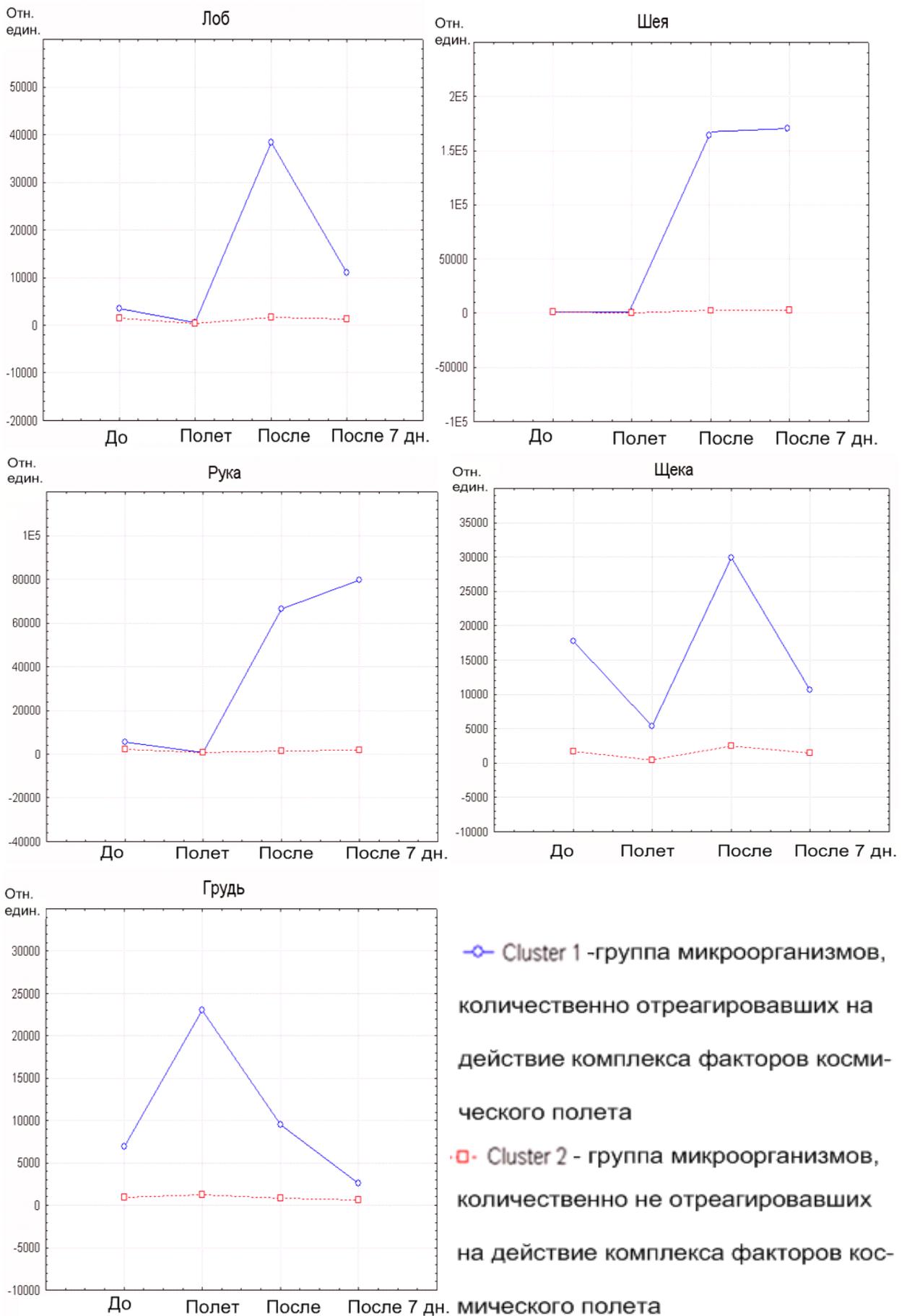
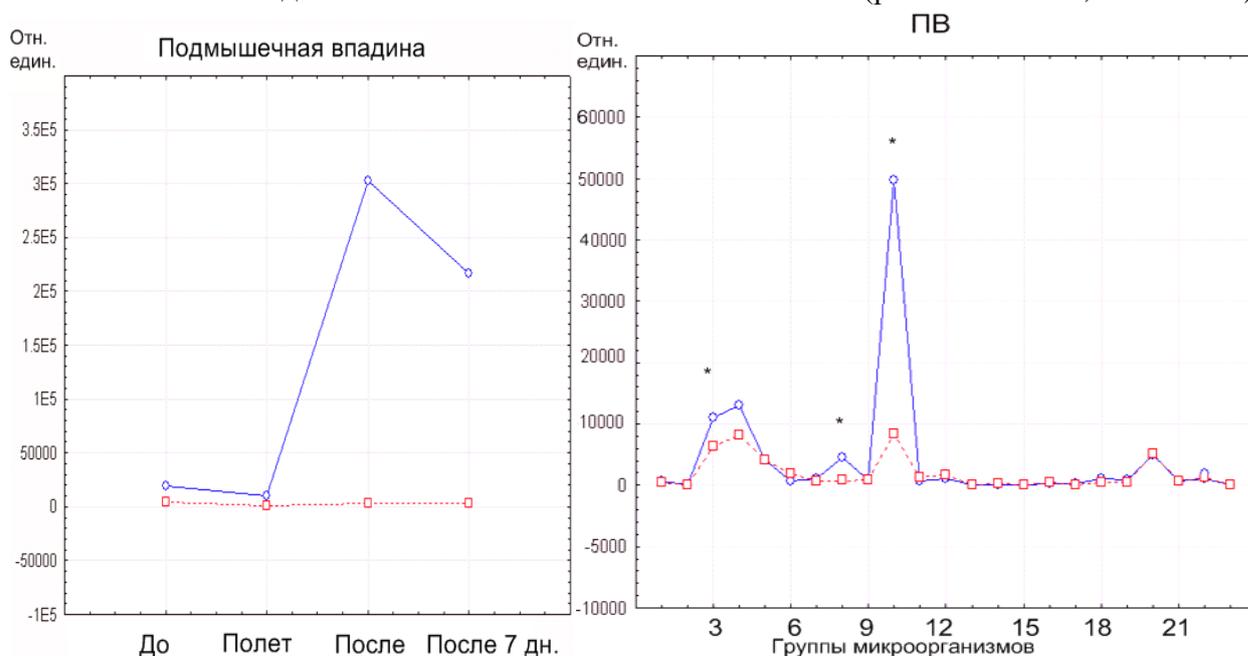


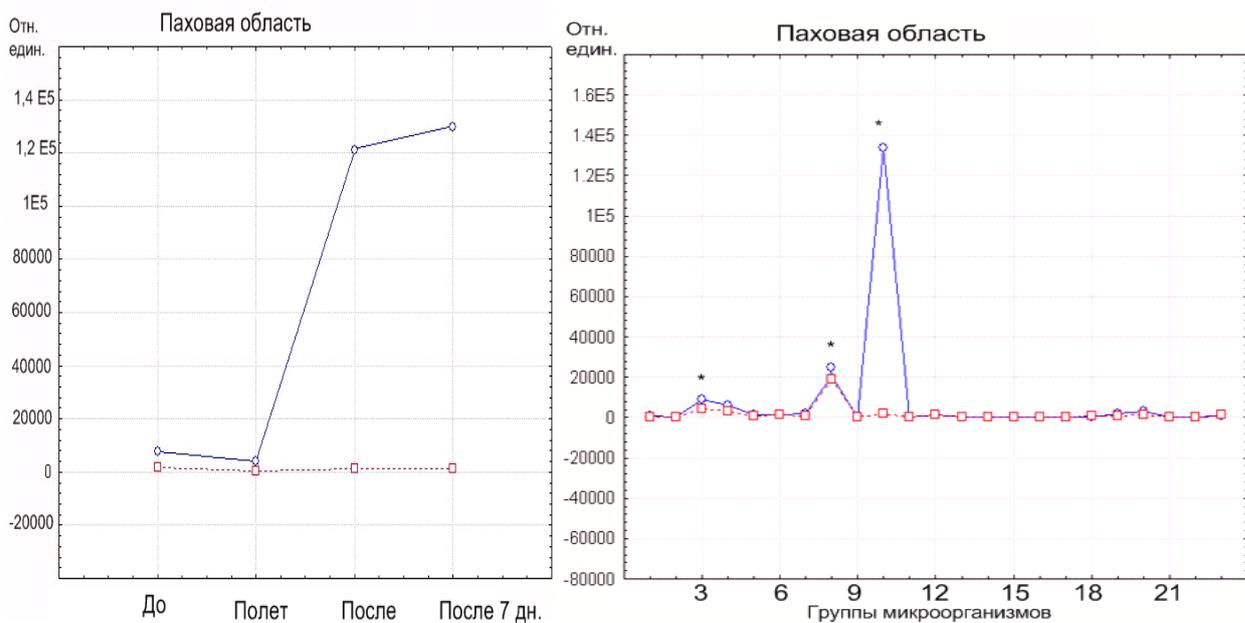
Рис. 2. (продолжение) Динамика общей обсемененности микроорганизмов кожных покровов биотопов лба, шеи, груди, руки, щеки космонавтов ($p < 0,05$).

При длительной изоляции человека в космическом полете видовой состав микрофлоры во всех исследованных биотопах был одинаков с индивидуальной вариабельностью количественного состава по биотопам. К Cluster 1 относились *Actinomycetes*, *Rodococcus*, *P. acnes*, *Streptococcus sp.*, *Candida*, *Pseudonocardia*. Причем с наибольшей значимостью и наименьшими расхождениями количественно прореагировали *Actinomycetes*, *P. acnes*, *Streptococcus sp.*, являющимися условно-патогенными для человека ($p < 0,05$). Данные микроорганизмы значительно увеличили свою численность при посадке.

Вторая группа микроорганизмов, представленная в исследованиях - Cluster 2. К ним относились: *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Nocardia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionobacterium sp.*, *Acinetobacter*, *Corinebacterium sp.*, *Fusobacterium*, *Alcaligenas*, *Prevotella*, *Malassezia*, *Eubacterium lentum* (группа А), *Cl. perfringens*, *Cl. difficile*. Микроорганизмы этой группы оставались относительно стабильными по численности на протяжении всего эксперимента.

Микробная флора в области подмышечной впадины и паховой области отличалась наибольшей обсемененностью и сходной картиной по составу прореагировавших групп у всех обследованных космонавтов (рис. 3, 4).





Cluster 1 - с динамикой 8- *Propionobacterium acnae*
 3- *Actinomycetes* 10- *Streptococcus sp.*
 4- *Rodococcus* 22-*Bacillus cereus*

Cluster 2 - без динамики

Рис. 3. (продолжение) Основные группы микроорганизмов кожных покровов подмышечной впадины и паховой области, прореагировавшие количественно на факторы космического полета ($p < 0,05$).

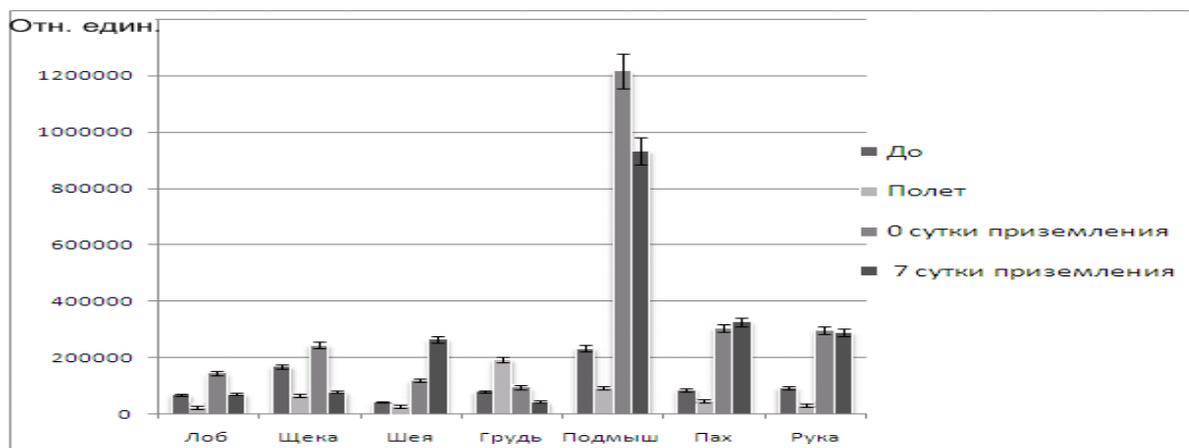


Рис. 4. Изменение общей обсемененности кожи космонавтов в условиях длительного космического полета и по его окончании (среднее, по результатам ГХ-МС).

Ранее исследователями отмечалось, что особенно обильно заселены микроорганизмами те области кожных покровов, которые защищены от действия света и высыхания (Noble W.C., 1993; Hopwood D. et al., 2005; Wilson M., 2008). Преимущественная микробная обсемененность подмышечной и паховой областей обусловлена значительным количеством апокриновых и эккриновых желез, наличием грубых волос, более высоким значениям pH, по сравнению с другими исследованными биотопами, относительно постоянными показателями температуры и высокой влажностью.

При длительной изоляции человека в гермообъеме к физиологически обусловленным благоприятным для развития микроорганизмов условиям добавляются

неблагоприятные условия среды обитания: объем помещения, ограничение средств личной гигиены и объем помещения, что обусловило выбор данных биотопов для оценки микробиоценоза кожи.

В исследованиях, проведенных в выбранных биотопах установлено, что на кожных покровах космонавтов в начале полета (6-10 сутки) наблюдается увеличение численности некоторых представителей условно-патогенной микробиоты: *P. acnes* – (на 11,9 % в ПВ и 9,4 % в ПО) и *Candida* – (на 2,3 % в ПО), Actinomycetes (в ПВ - на 2% , в ПО – на 2,5%) с одновременным уменьшением доли защитных групп микроорганизмов кожных покровов – *Corinebacterium sp.* - на 2,5% в ПВ и 1,1% в ПО (рис. 5).

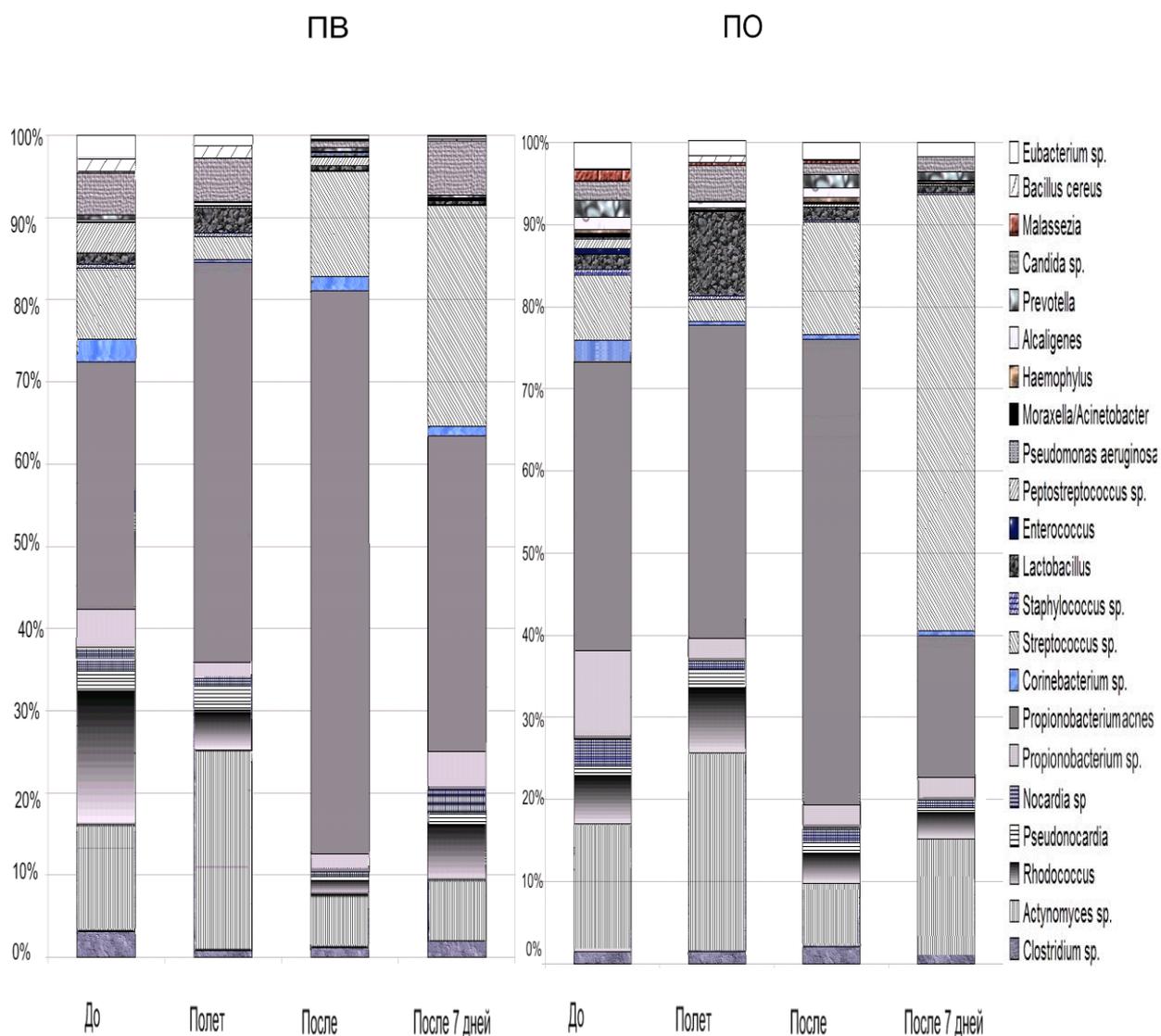


Рис. 5. Изменение содержания (%) анаэробной и аэробной микрофлоры кожных покровов, обследованных в подмышечной впадине при изоляции в космическом полете.

Полученные результаты подтверждают литературные данные о снижении колонизационной резистентности организма в начале полета (Залогеев С. Н. с соавт., 1980; Поликарпов Н. А., 1991; Ильин В. К. с соавт, 2005). Для некоторых условно-патогенных групп микроорганизмов (*P. acnes*, *Streptococcus sp.*, *Actinomycetes*, *Rhodococcus*) значимое ($p < 0,05$) повышение численности зафиксировано на 0 сутки приземления, с тенденцией к восстановлению состава биоценоза на 7 сутки по окончании полета.

Микробиологический статус кожных покровов здорового человека в обычных условиях жизнедеятельности и в условиях длительной изоляции в гермобъеме при детектировании методом ГХ-МС.

Исследованы кожные покровы практически здоровых обследованных в обычных условиях жизнедеятельности и в условиях изоляции в герметично замкнутых помещений (105 и 390 суток). Результаты исследований показали однотипность количественной реакции и состава микроорганизмов кожных покровов на условия обитания в герметичном помещении и космическом полете, что позволило оценку микробиоты кожи обследованных при длительной изоляции в гермобъеме проводить по реперным точкам - подмышечной впадине (ПВ) и паховой области (ПО).

При исследовании микроорганизмов кожных покровов в обычных условиях жизнедеятельности человека с использованием метода ГХ-МС был составлен микробный пейзаж данных областей в обычных условиях жизнедеятельности (рис. 6). Был выявлен широкий спектр микроорганизмов и показано, что представители анаэробов (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacillus cereus*, *Clostridium sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Actinomyces*) являются полноправными участниками биоценоза кожи, что подтверждается и литературными данными (Шендеров Б. А., 2003; Кабаева Т. И., 2005; Costello E. K. et al., 2009).

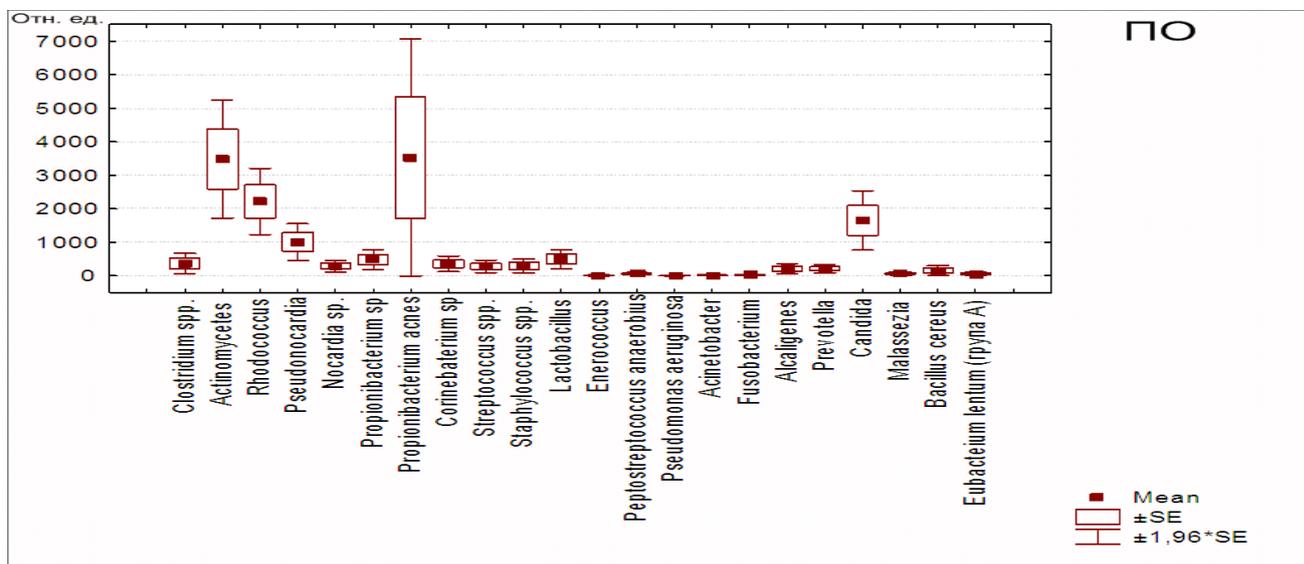
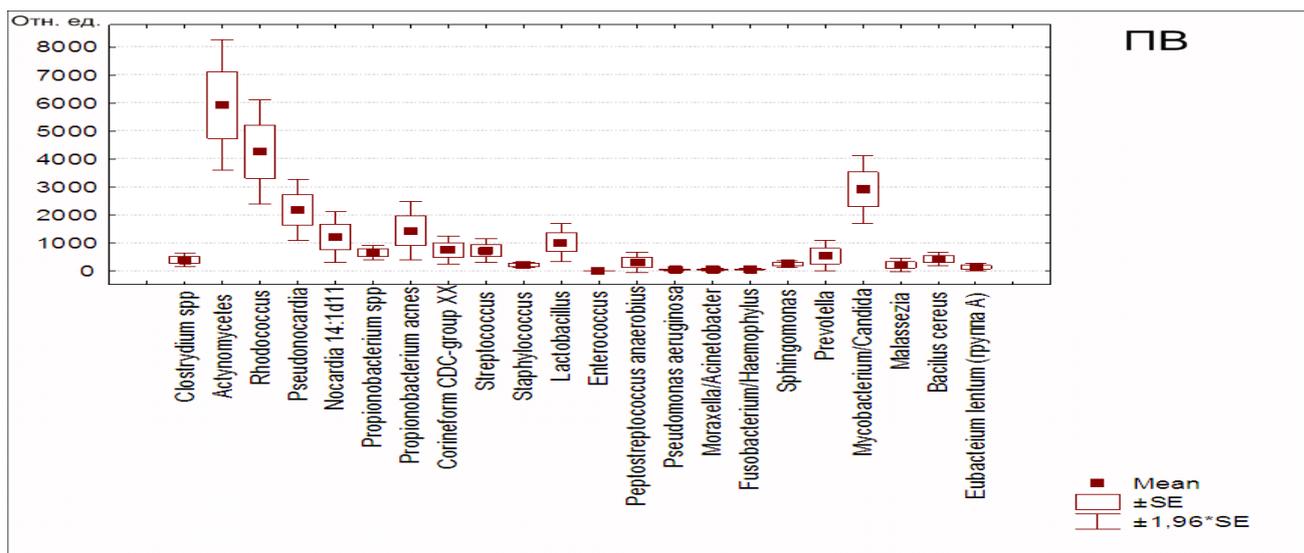


Рис. 6. Микробный пейзаж подмышечной впадины и паховой области человека (n=34) в обычных условиях жизнедеятельности.

При длительной (105 суток) изоляции обследованных в герметически замкнутых помещениях «пик» повышения контаминации условно-патогенных микроорганизмов пришелся на 35 сутки исследований в ПВ, ПО (рис. 7).

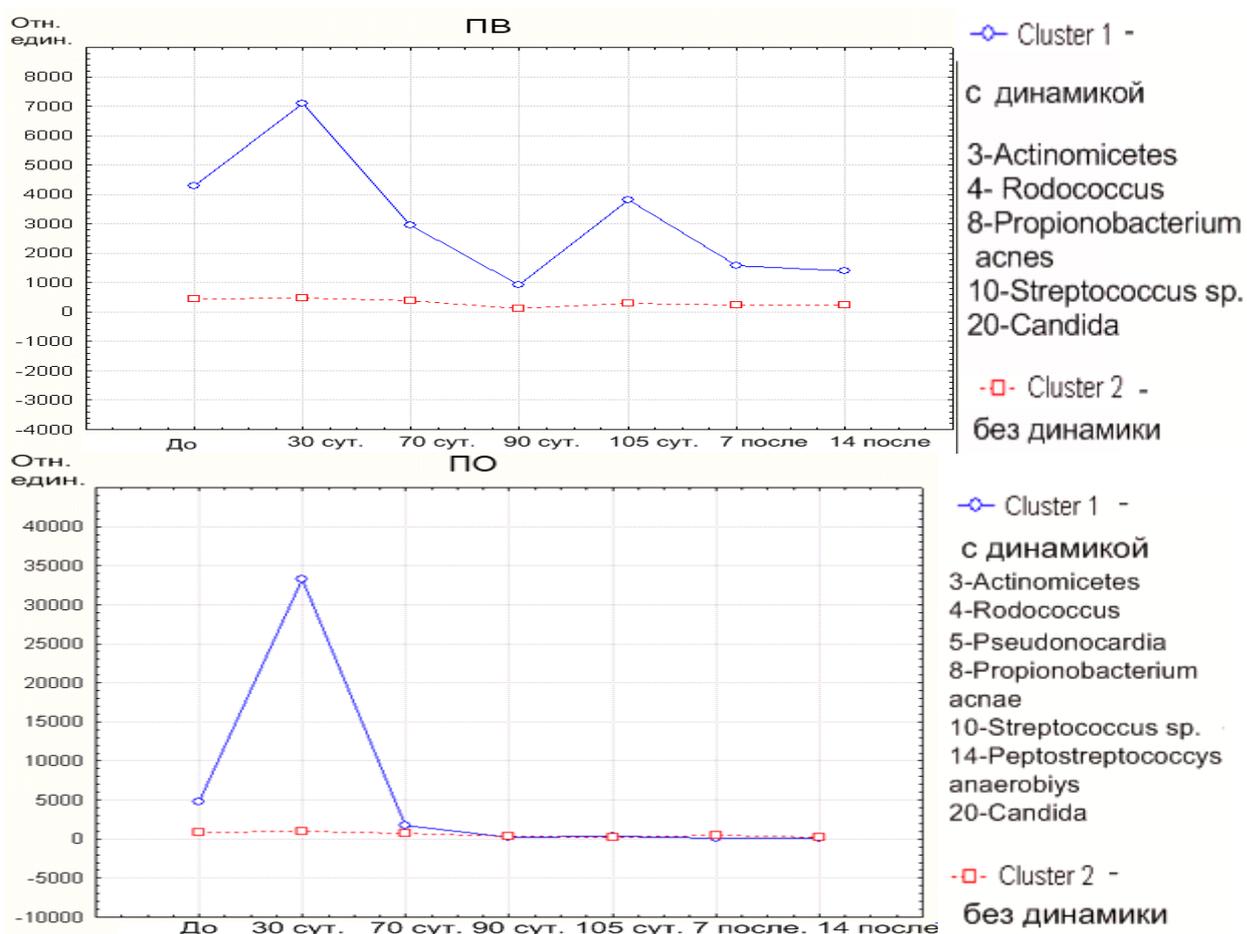


Рис. 7. Динамика численности и периоды активации условно-патогенных микроорганизмов кожных покровов человека при длительности изоляции до 105 суток ($p < 0,05$).

Исследование содержания анаэробной и аэробной микрофлоры кожных покровов, обследованных в реперных точках – ПВ и ПО выявило, что на 35 сутки эксперимента происходит значимое ($p < 0,05$) увеличение *P. acnes*, *Streptococcus sp.*, *Actinomyces*, *Candida*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Pseudonocardia*, *Rodococcus* и, наоборот, уменьшение *Corinebacterium sp.*- на 3,5% в ПВ и 1,25% в ПО. В дальнейшем (до 105 суток) наблюдался процесс стабилизации с уменьшением численности условно-патогенной микрофлоры. В первые сутки после окончания изоляции в ПВ дисбиотические изменения проявились в ПВ, тогда как в ПО наблюдалась нормализация количественного и качественного состава микроорганизмов (рис. 8).

Аналогичная динамика дисбиотических изменений кожи наблюдалась в первые сутки полета у космонавтов и при длительной изоляции в наземных исследованиях с последующей относительной стабилизацией общей микробной обсемененности кожных

покровов, что позволило считать это свидетельством дисбактериотических процессов - реакции на адаптацию к условиям изоляции в гермообъеме. Это явление было описано ранее и объясняется снижением колонизационной резистентности в первый месяц изоляции (Залогуев С.Н. с соавт., 1983; Викторов А.Н. с соавт., 1998; Поликарпов Н. А., 1991; Ильин с соавт., 2008).

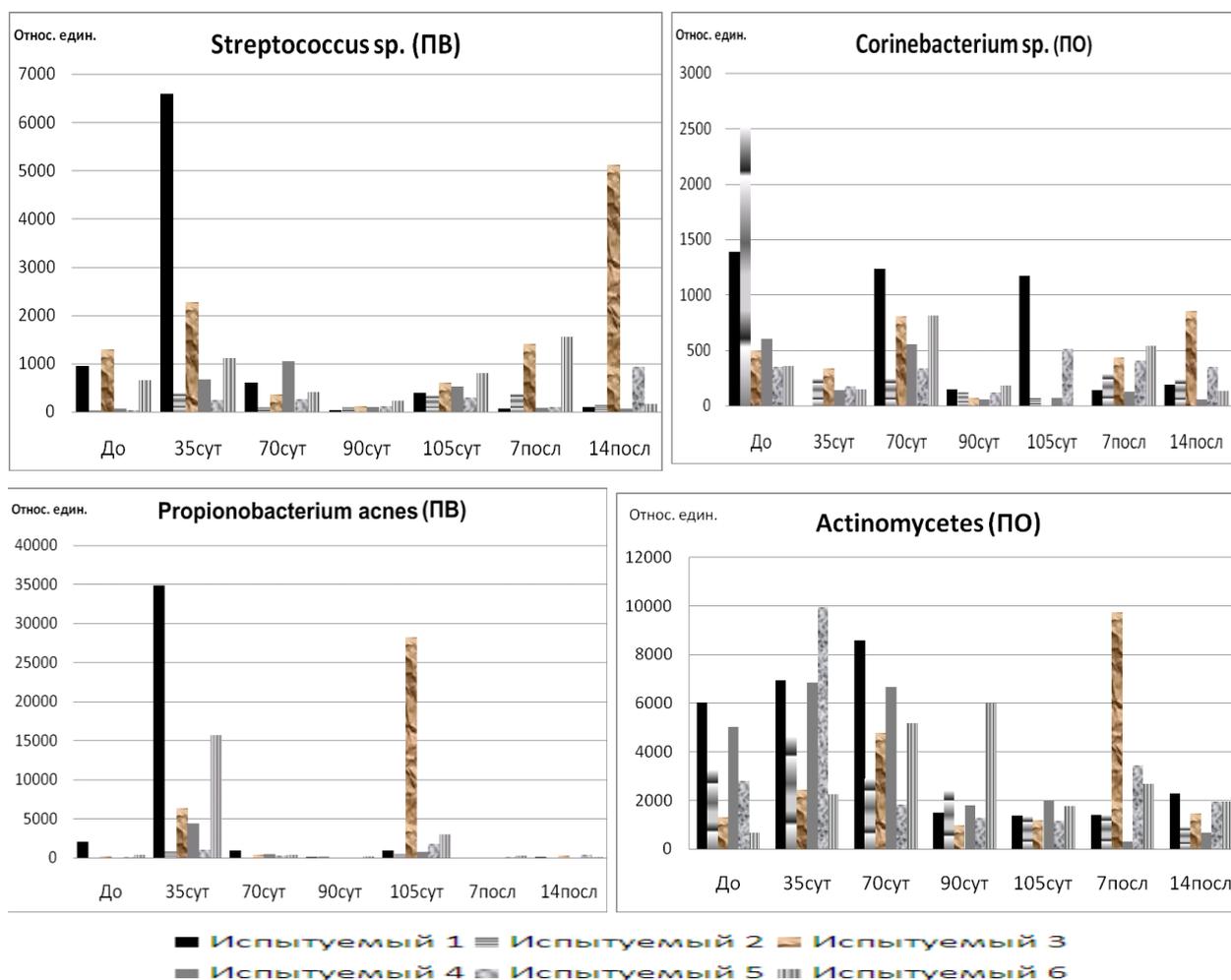


Рис. 8. Динамика индивидуальных изменений активации микроорганизмов подмышечной впадины и паховой области, характеризующих микробиологический риск, и защитных групп микроорганизмов при 105 суточной изоляции (ГХ-МС детектирование, $P < 0,05$).

Сопоставимость общей динамики дисбиотических изменений кожных покровов обследованных с превалярованием условно-патогенной микрофлоры по данным ГХ-МС подтверждается бактериологическими данными, в которых также показано, что при длительной изоляции человека в гермообъекте (105 суток) наблюдается увеличение доли групп, известных в качестве условно-патогенных.

Бактериологический метод выявил наличие на коже испытуемых представителей резидентной микрофлоры: *S. epidermidis* и *S. aureus* (Рис. 9). При этом в первый месяц изоляции наблюдалось преимущественное увеличение доли транзитной компоненты микробиоценоза кожи: *Enterococcus sp.* - на 1% - в ПВ и 38% в ПО, *E. coli* - на 1% в ПВ и в ПО, *Proteus sp.* - на 27% в ПВ и в 5% в ПО, *Streptococcus sp.* - на 1% и *Candida* - на 1% в ПВ на фоне увеличения общей обсемененности исследованных биотопов. С 90 суток

наступал процесс стабилизации и в конце исследований - на 14 сутки после эксперимента происходило возвращение значений к исходным данным.

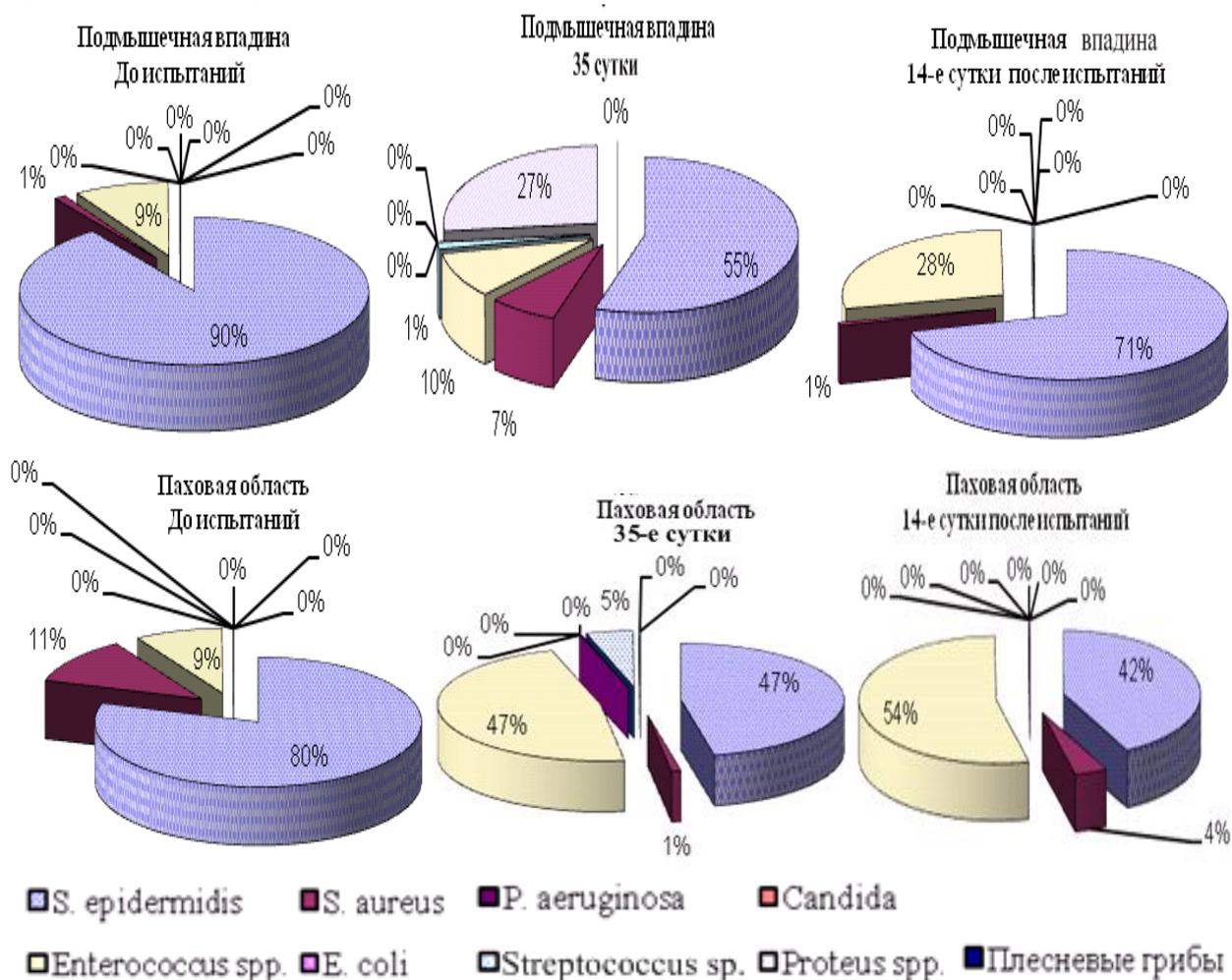


Рис. 9. Увеличение доли условно-патогенной микрофлоры в периоде острой адаптации человека (35 сутки) к условиям среды обитания герметичного помещения (классический бактериологический метод).

При увеличении длительности изоляции до 390 суток состав микрофлоры характеризовался статистически значимым ($p < 0,05$) повышением численности в ПВ на 30-е сутки эксперимента, в ПО - на 30-е и 90-е сутки исследования (рис. 10). По приоритетности колонизации ПО и ПВ доминирующие позиции в этот период были представлены условно-патогенной флорой: *Streptococcus* (29,8% в ПВ и 40% в ПО), *Actinomycetes* (35,5% в ПВ и 19,2% в ПО), *Rodococcus* (17,9% в ПВ и 16,7% в ПО), *Candida* (13,3% в ПВ и 9,9% в ПО), *Staphylococcus* (10,6% в ПВ и 1,1% в ПО), *P. acnes* (8,4% в ПВ и 3,7% в ПО). Защитные группы микроорганизмов - *Corinebacterium sp.*, составляющие до эксперимента в ПВ 3,68% и в ПО 3,98%, уменьшили свою долю среди других микроорганизмов, составив на 30-е сутки изоляции 0,1% и 1,49% в ПВ и ПО соответственно.

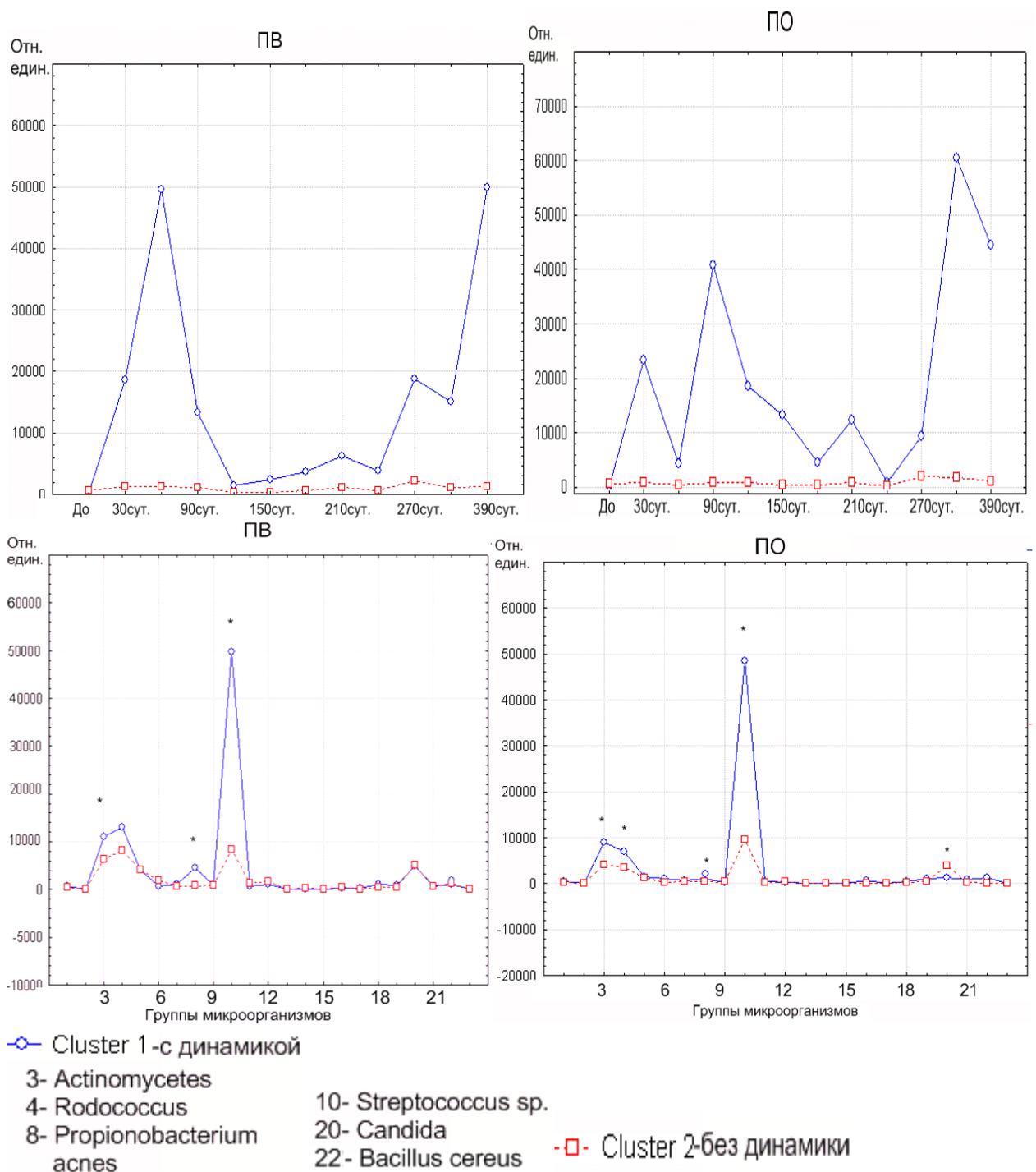
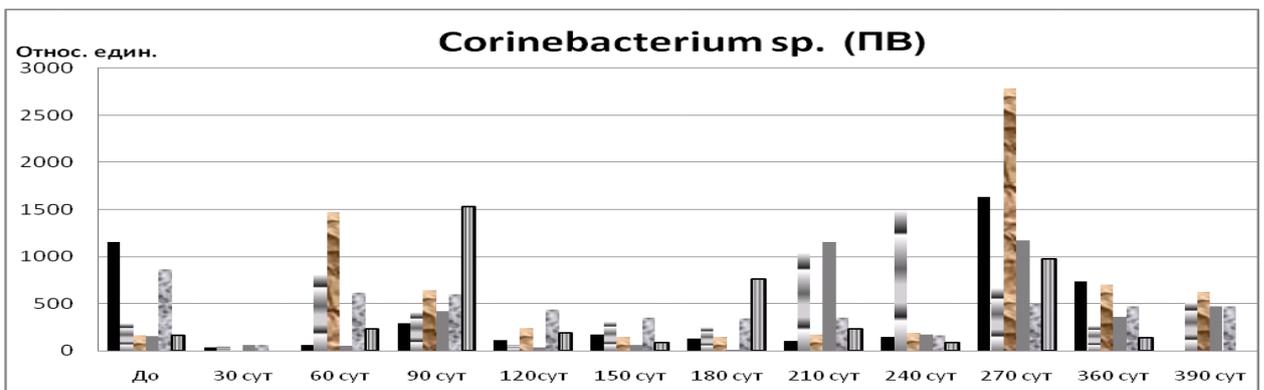
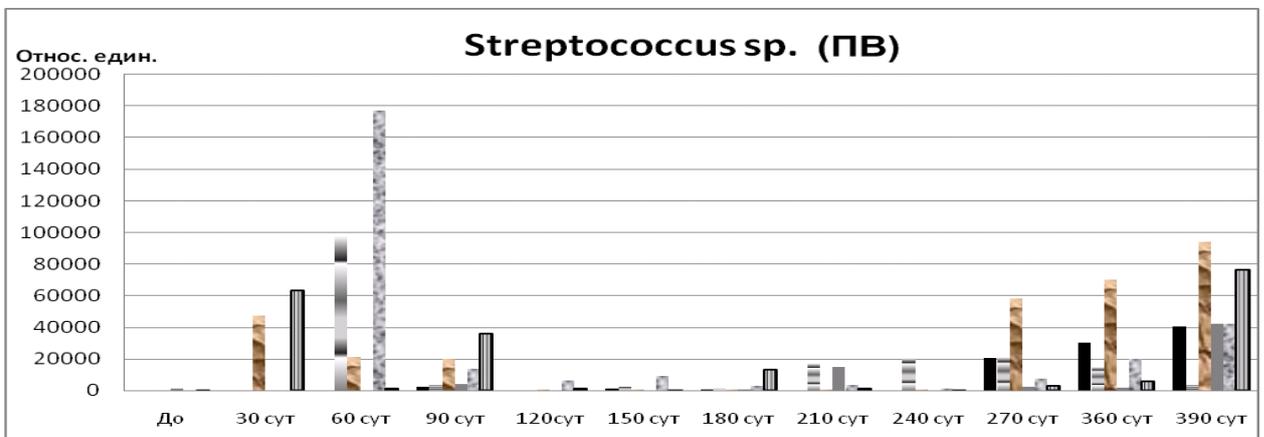
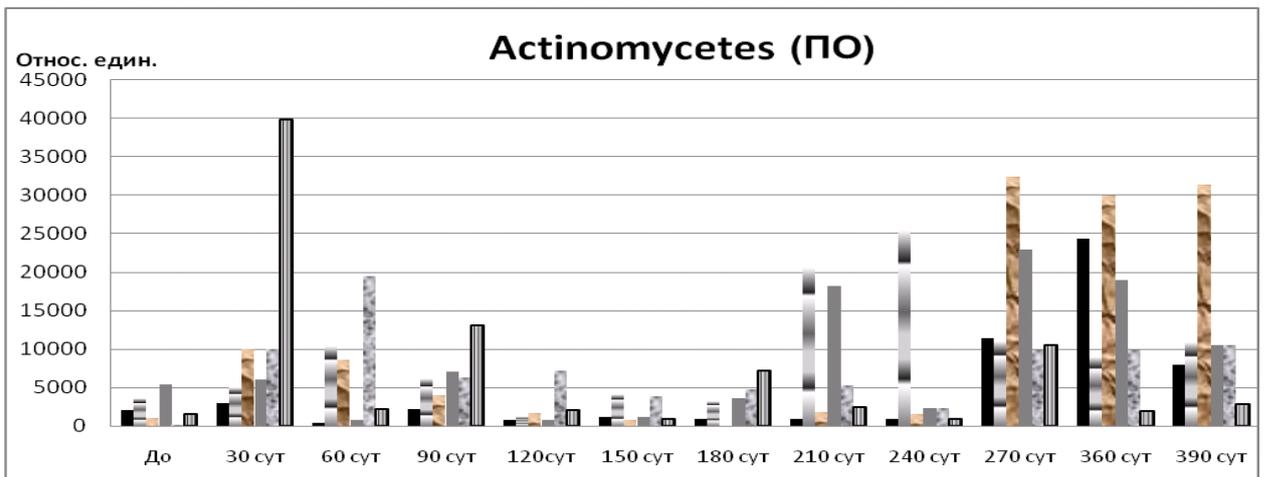
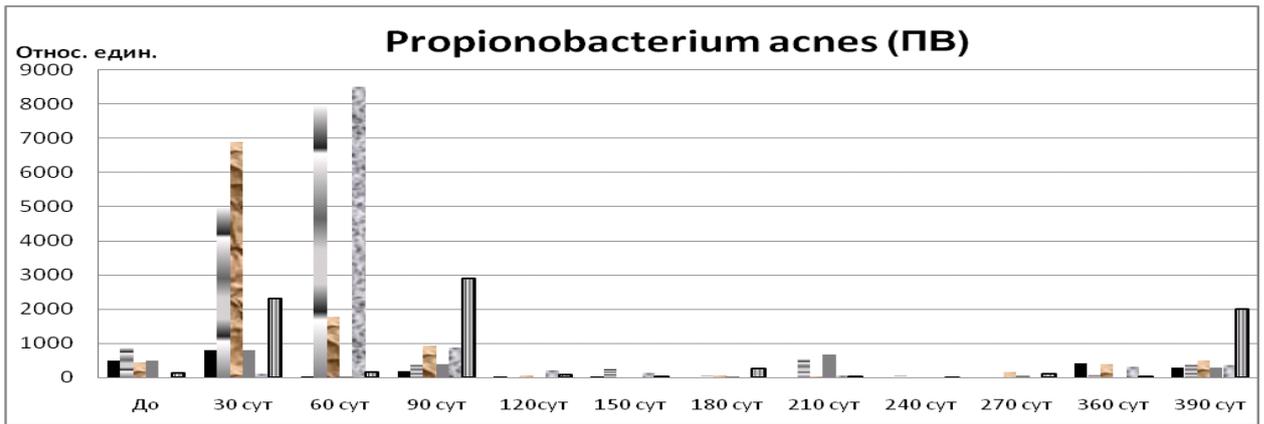


Рис. 10. Динамика численности и периоды активации условно-патогенных микроорганизмов кожных покровов человека при увеличении длительности изоляции до 390 суток ($p < 0,05$).

Период с 120–х до 240-х суток характеризовался относительной стабилизацией видового и количественного состава микробиоты с уменьшением численных значений представителей условно-патогенной флоры. Однако, начиная с 270-х суток, наблюдалось постепенное нарастание потенциала патогенности, ставшее значимым ($p < 0,05$) к 360-м суткам (рис. 11).

В исследованиях наиболее значимо количественно прореагировали *Streptococcus sp.*, *P. acnes*, *Actynomicetes* – что позволяет рекомендовать их как диагностически значимые микроорганизмы (маркеры), позволяющие характеризовать микробный статус человека в

условиях изоляции в герметично замкнутых помещениях.



- Испытуемый 1 ≡ Испытуемый 2 ■ Испытуемый 3
- Испытуемый 4 ■ Испытуемый 5 ■ Испытуемый 6

Рис. 11. Динамика индивидуальных изменений активации микроорганизмов подмышечной впадины и паховой области, характеризующих микробиологический риск, и защитных групп микроорганизмов при 390 суточной изоляции.

Таким образом, дисбиотические изменения кожных покровов при длительной (390 суток) изоляции человека в герметичных помещениях характеризуются определенной закономерностью и имеют волнообразный характер (рис. 12). Активация условно-патогенной аутомикрофлоры наблюдается в первый месяц адаптации человека к условиям изоляции. В последующие сутки (120-240) прослеживается относительная стабилизация видового и количественного состава микробиоты. Постепенное увеличение с 270 суток численности условно-патогенной микрофлоры характеризует снижение барьерной функции эпителия и колонизационной резистентности кожных покровов. Значимая ($p < 0,05$) активация условно-патогенной микрофлоры по мере увеличения длительности изоляции до 390 суток является прогностически важной для длительных межпланетных полетов. Наибольшая значимость из числа микроорганизмов, количественно прореагировавших на условия длительной изоляции - у *Streptococcus sp.*, потенциальных возбудителей стрептодермий, в частности импетиго и рожистого воспаления кожи, *P. acnes* – являющихся главным звеном в патогенезе угревой болезни, и *Actinomyces*-потенциальных возбудителей актиномикоза.

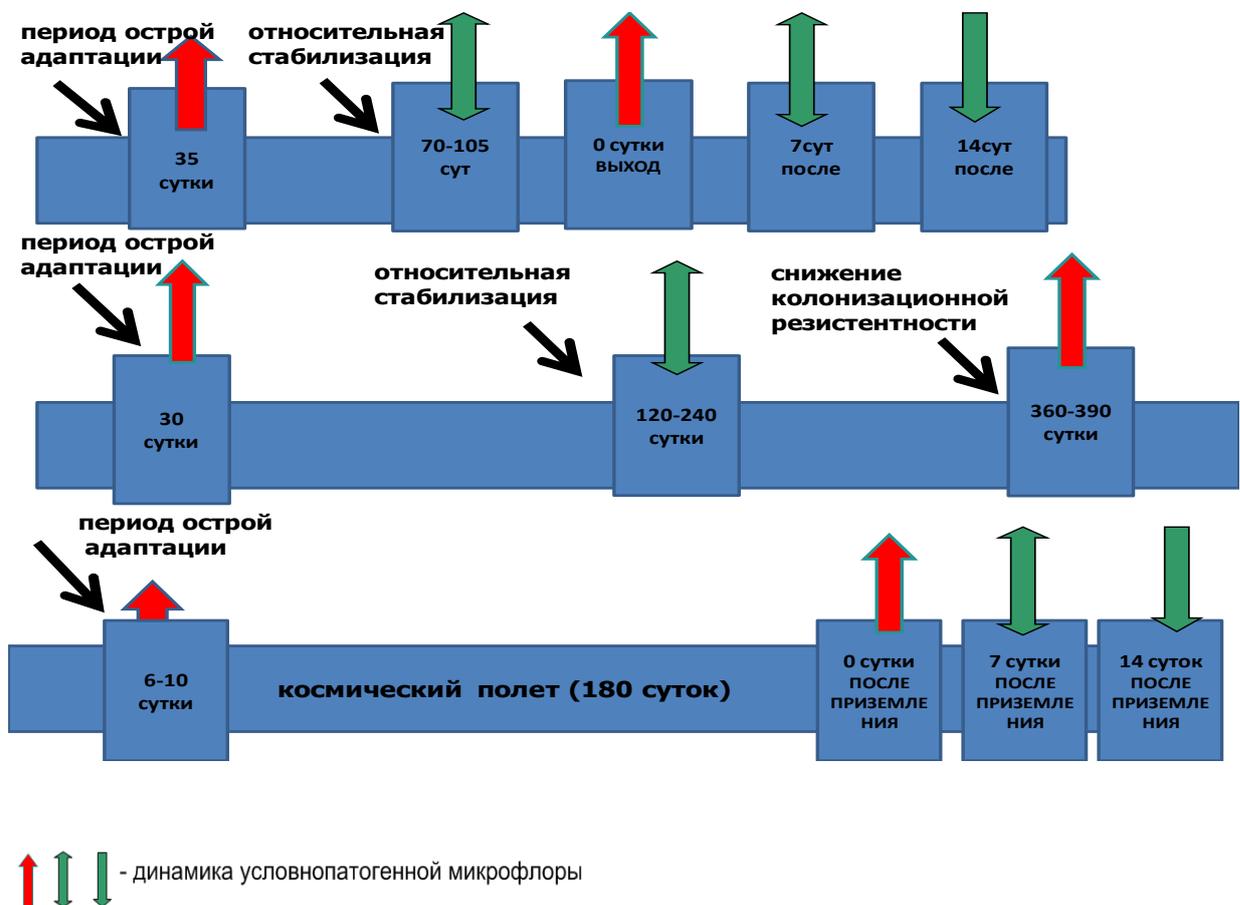


Рис. 12 Закономерности формирования условно-патогенной микрофлоры кожных покровов человека при длительной изоляции в гермообъектах и в космическом полете.

Аналогичная динамика дисбиотических изменения микробиоценоза кожных покровов наблюдалась и у космонавтов и характеризовалась дисбиотическими проявлениями на этапе острой адаптации к среде обитания космических кораблей. Увеличение численности условно-патогенной микрофлоры космонавтов после приземления (0 сутки) обусловлено, по-видимому, снижением иммунобиологической реактивности в длительном полете и стрессовой реакцией организма на экстремальные условия приземления.

Таким образом, исследованиями методом ГХ-МС был значительно расширен спектр исследуемой микрофлоры кожи человека и установлена закономерность формирования условно-патогенной микробиоты кожных покровов человека при длительной изоляции в герметичных помещениях по молекулярным маркерам. Метод ГХ-МС, являясь высокочувствительным, некультуральным методом детектирования микробиоты кожных покровов человека по видоспецифичным высшим жирным кислотам, альдегидам, стеаринам (стеринам) и экспрессным по времени анализа (не более 3 часов), представляется перспективным и может служить дополнением к бактериологическому методу, а также быть использованным на борту МКС.

Выводы:

1. При длительной изоляции человека в гермообъекте и в условиях космического полета видовой состав микрофлоры во всех исследованных биотопах был одинаков при индивидуальной вариабельности количественного состава по биотопам. Важными составляющими микробиоценоза кожных покровов человека являются анаэробные бактерии, включая *Propionobacterium sp.*, *Actinomyces*, *Rodococcus*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Clostridium sp.*

2. Метод ГХ-МС является высокочувствительным, видоспецифичным по высшим жирным кислотам клеточной стенки микроорганизмов, некультуральным методом анализа микрофлоры кожи человека и позволяет расширить видовой/родовой диапазон диагностики комменсальной и условно-патогенной аутомикрофлоры кожных покровов человека, включая микробиоту более глубоких слоев эпидермиса, труднокультивируемую классическим бактериологическим методом.

3. Метод масс-спектрометрии микробных маркеров является перспективным для диагностирования условно-патогенной и анаэробной микрофлоры кожных покровов человека в эпидемиологически значимых концентрациях, составляющих микробиологический риск при длительной изоляции человека в герметичном помещении.

4. Дисбиотические изменения кожных покровов при длительной изоляции человека в герметичных помещениях характеризуются определенной закономерностью и имеют волнообразный характер. Активация условно-патогенной аутомикрофлоры наблюдается в первый месяц адаптации человека к условиям изоляции. Относительная стабилизация видового и количественного состава микрофлоры наблюдалась до 270 суток с повторной активацией ($p < 0.05$) на 360-390 сутки, обусловленной снижением колонизационной резистентности кожных покровов и в первые сутки по окончании воздействия неблагоприятных условий обитания.

5. Микрофлора кожных покровов космонавтов при длительности полета 180 суток характеризуется дисбактериотическими изменениями во всех исследованных биотопах на этапе острой адаптации к среде и 0 сутках после приземления и проявляется увеличением численности условно-патогенной микрофлоры с тенденцией к возвращению микробиологического статуса в исходное состояние на 7 сутки после приземления.

6. На основании данных ГХ-МС микробиоту кожных покровов человека в условиях изоляции в герметичном помещении и космическом полете можно разделить на два кластера. Кластер 1 - микрофлора, которая претерпевала количественные изменения, важной составляющей которой были условно-патогенные микроорганизмы: *Actinomycetes*, *Rodococcus*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus sp.*, *Candida*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacillus cereus*.

Кластер 2 – составляют микроорганизмы, которые количественно не прореагировали на экстремальные условия изоляции и были в основном представлены комменсальной микрофлорой.

7. Сравнительным анализом микрофлоры кожных покровов человека с использованием классического бактериологического метода и ГХ-МС детектирования установлены диагностически значимые микроорганизмы (маркеры), позволяющие характеризовать микробный статус человека в условиях космического полета: *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus sp.* и *Actinomycetes*.

8. Анализом микрофлоры кожных покровов человека ГХ-МС методом показана возможность реперного подхода для оценки микробиологического статуса человека по микробной обсемененности подмышечной впадины и паховой области, что позволит оперативно диагностировать микробиологический статус космонавтов.

Практические рекомендации.

Результаты исследований видового состава и количественной характеристики микробиоты кожных покровов человека предполагается использовать при организации медицинского обеспечения длительных космических полетов и в практическом здравоохранении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Оценка влияния 105-суточной изоляции в герметично замкнутом пространстве на микрофлору кожных покровов человека с использованием метода хроматомасс-спектрометрии / Марданов Р.Г., Родионова Т.А., Батов А.Б., Осипов Г.А. / Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2010. - Т. 44. - №4. - С. 46-52.

2. Микрофлора человека в условиях применения аутопробиотиков на основе *Enterococcus faecium* при 105-суточной изоляции. / Ильин В.К., Батов А.Б., Новикова Н.Д., Мухамедиева Л.Н., Поддубко С.В., Марданов Р.Г., Соловьева З.О., Скедина М.А. / Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2010. - Т. 44. - №4. - С. 52-57.

3. Оперативная диагностика микробиологического статуса кожных покровов человека методом хроматомасс-спектрометрического детектирования / Авиакосмическая и экологическая медицина. -2011. - Т. 45. - №3. - С. 12-17.

4. Исследование влияния изоляции в герметично замкнутом пространстве на микрофлору кожных покровов человека с использованием метода хроматомасс-спектрометрии / Родионова Т. А. / Сборник материалов по коференции «Экотоксикология.

Современные биоаналитические системы, методы и технологии». - Пушино – Тула. – 2009. – С. 26-28 .

5. Non-cultural methods of human microflora evaluation for the benefit of crew medical control in confined habitat / Pyin V., Moukhamedieva L., Osipov G., Batov A., Soloviova Z., Mardanov R., Panina Y. / Acta Astronautica. – 2011. - V. 68. – P. 1529–1536.

6. Диагностика микрoэкологического статуса человека методом хроматомасс-спектрометрического (ГХ-МС) детектирования клеточных маркеров / Мухамедиева Л. Н., Осипов Г.А., Ильин В.К., Пахомова А.А. / Материалы научно-практической конференции сотрудников Таджикского НИИ Профилактической медицины «Современные аспекты краевой инфекционной патологии в Таджикистане». – Душанбе. - 2010. - С. 61-64.

7. Исследование микрофлоры кожных покровов космонавтов методом хроматомасс-спектрометрического детектирования / Батов А.Б. / Сб. тезисов VIII Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной дню космонавтики. – Москва. - 2009. - С. 15-16.

8. Экспресс- диагностика микрофлоры кожных покровов здорового человека в эксперименте «Марс- 105» методом ГХМС детектирования / Батов А.Б. / Сб. тезисов IX Конференции молодых ученых, специалистов и студентов, посвященной дню космонавтики. – Москва. – 2010. - С. 29.

9. Исследование микрофлоры кожи участников МКС методом хроматомасс-спектрометрического детектирования / Ильин В.К., Осипов Г.А. / Сб. тезисов XXXVIII Общественно-научных чтений, посвящённых памяти Ю.А. Гагарина. - Гагарин. – 2011. – С. 215-225.

10. Топическая характеристика микробной обсемененности кожных покровов для выбора реперных точек оценки микробиологического статуса человека в условиях герметичных помещений / Сб. тезисов конференции «Актуальные проблемы космической биологии и медицины». – Москва. 2011. – 151-152.

11. Контроль микробиологического статуса космонавтов в длительном космическом полете: настоящее и перспективы / Ильин В.К., Соловьёва З.О., Скедина М.А., Папп Л.Г. / Сб. тезисов конференции «Актуальные проблемы космической биологии и медицины». - Москва. – 2011.- С. 165-166.