

оксиметилирование ГК в значительной степени усилило их стимулирование адаптируемости организмов к действию неблагоприятных условий. В результате химической модификации наблюдалось небольшое возрастание общестимулирующей способности ГВ, что также является ценным свойством для получаемого препарата.

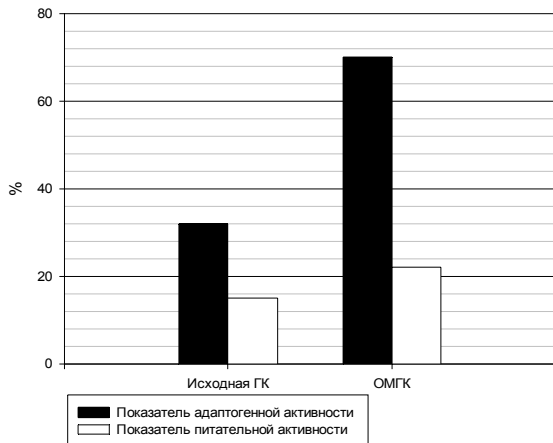


Рис. 3. Относительные показатели физиологической активности исходных и модифицированных ГВ.

Наблюдаемые изменения свойств, проявляемых ГВ в результате оксиметилирования, свидетельствуют о существенном увеличении их активности как хелатных лигандов для катионов тяжелых металлов, что объясняется повышением содержания активных ОН-групп.

**Заключение.** Оксиметилирование нативных ГВ оказалось эффективным способом повышения их адаптивных и детоксикационных свойств. В результате данной химической модификации могут быть получены высокоэффективные нетоксичные сорбенты техногенных загрязнителей для биологических сред организма. Продукты оксиметилирования различных ГВ рекомендуются к предклиническим испытаниям как восстановительные средства для случаев острых пищевых отравлений.

#### Литература

1. Cheng, M.L. Humic acids induces oxidative DNA damage, growth retardation, and apoptosis in human primary fibroblasts //M.L. Cheng, H.Y. Ho, Y.W. Huang //Experimental biology and medicine.– 2003.– V. 228.– P. 413–423.
2. Coates, J. Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilization humic substances as electron donors for anaerobic respiration //J. Coates, K. Cole, R. Chakraborty //Applied and environmental microbiology.– 2002.– N 5.– P. 2445–2452.
3. Frimmel, F. Development in aquatic humic chemistry //F.H. Frimmel //Agronomie.– 2000.– V. 20.– P. 451–463.
4. PemaMendez, E. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. Review //E. PemaMendez, J. Havel, J. Patouka //J. Appl. Biomed.– 2005.– N 3.– P. 1324.
5. Zanetti, M. Treatment of HIV infection with humic acid //M. Zanetti //Patent A61K035/78 US.; 15.07.2004.; N 667299.
6. Анисимов, М.М. Некоторые химические и медико-биологические свойства гуминовых кислот / М.М. Анисимов, Г.Н. Лихацкая. // Труды растениеводства и животноводства.– Хабаровск, 2001.– Т. 2.– С. 34–44.
7. Федько, И.В. Химикофармакологическое исследование специфических органических веществ торфа /И.В. Федько: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Томск, 2006. – 19 с.
8. Семионова, М.А. Химикофармацевтическое и организационноэкономическое обоснование применения гуминовых кислот пеллоидов /М.А. Семионова: Автореф. Дис. ... канд. фарм. наук. – Самара, 2006. – 22 с.
9. Сравнительная характеристика структурных особенностей торфяных гуминовых и гитатомелановых кислот во взаимосвязи со спецификой их физиологического действия /В.В. Платонов [и др.]// Вестник новых медицинских технологий.– 2010.– № 4.– С. 9–11
10. Драгунов, С.С. Химический состав гуминовых кислот / С.С. Драгунов, А.П. Рождественский// Тр. Калининского политех. Института.– М.: 1967.– №16.– Вып.3.– С. 100–106.
11. Спектральные исследования фракций гуминовых кислот / И.И. Лиштван [и др.] // Химия твердого топлива.– 2006.– № 4.– С.

3–11.

12. Метод предварительной оценки физиологической активности гуминовых и гуминоподобных веществ / В.В. Платонов [и др.] // Вестник новых медицинских технологий.– 2010.– № 3.– С. 26–28.

#### THE OXYMETHYLATION OF HUMIC SUBSTANCES AS A MEAN OF AUGMENTATION OF THEIR DETOXICATIVE AND BIOPROTECTIVE ABILITIES

V.V. PLATONOV, D.N. YELISEEV, R.Z. TREITYAK, A.Y. SHVYKIN, A.A. KHADARTSEV, A.G. KHRUPACHEV

Tula State University, Medical Institute  
Tula State Pedagogical University, Chair of General and Inorganic Chemistry

Peat humic acid oxymethylation of was carried out. The assessment of physiological activeness showed a significant increase of protective properties in humic substances. The increase in sorption capability of the obtained material related to highly toxic heavy metal ions was detected. The perspective of applying oxymethylated humic substances as effective and safe sorbents and detoxicants for biological environment were shown.

**Key words:** humic acids, oxymethylation, detoxicants, physiological activeness.

УДК 616-036.22

#### НОВЫЙ ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА

Т.Н. ЗАМАЙ, А.Б. САЛМИНА, О.С. ЗАМАЙ, О.В. ПЕРЬЯНОВА, И.Т. РЕШЕТНЕВА, Г.М. ДМИТРИЕВА, Т.С. ОСТАПОВА, Г.С. ЗАМАЙ, Е.Н. ЕРКАЕВ

В работе охарактеризованы штаммы сальмонелл, циркулирующие на территории Красноярского края. Установлено, что самым распространенным сероваром сальмонеллы на территории края является наиболее патогенный серовар, являющийся возбудителем сальмонеллеза – S. Enteritidis. Выяснено, что основные методы выявления возбудителя сальмонеллеза и определения его патогенности и лекарственной резистентности, использующиеся в настоящее время, – бактериологические, основным недостатком которых является слишком продолжительное время проведения анализа и получения результата. Показано, что использование искусственных антител к S. Enteritidis позволяет быстро в течение часа выявить возбудителей сальмонеллеза в исследуемых образцах.

**Ключевые слова:** сальмонеллез, Salmonella Enteritidis, искусственные антитела.

К возбудителям кишечных инфекций относится большая группа сальмонелл (семейство *Enterobacteriaceae*, род *Salmonella*), насчитывающая более 2500 серотипов, в числе которых присутствуют как непатогенные бактерии, так и патогенные для человека возбудители брюшного тифа, паратифов и сальмонеллеза. Множество серотипов сальмонелл связано с большой изменчивостью генов флагеллинов, обусловленной генетическими рекомбинациями, горизонтальным переносом генов, точечными мутациями, дупликациями и делециями, что увеличивает способность сальмонелл адаптироваться к иммунной системе человека. В основу классификации сальмонелл положены их метаболические особенности, согласно которым род *Salmonella* представлен двумя видами – *S.enterica* и *S.bongori*. Сальмонеллы вида *S.enterica* делятся на несколько подвидов и обозначаются символами I, II, IIIa, IIIb, IV и VI. Вид *S.bongori* имеет символ V. Деление на подвиды имеет эпидемиологическое значение, так как естественным местом обитания сальмонелл I и II подвидов служат теплокровные животные, а представителей остальных подвидов (IIIa, IIIb, IV, VI и вида *S.bongori* (V) – холоднокровные животные и окружающая среда. Сальмонеллы обладают тремя антигенными комплексами – O-соматическим (термостабильным), H-жгутиковым (термолабильным) и поверхностным капсульным K-антигеном. Сальмонеллы продуцируют экзотоксины, среди которых выделяют токсины, усиливающие секрецию жидкости и солей в просвет кишки, и цитокины, нарушающие синтез белка в клетках слизистой оболочки кишечника и воздействующие на клеточные мембраны. При разрушении сальмонелл выделяются эндотоксины,

\* Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1, e-mail: tzamay@yandex.ru

обуславливающие развитие интоксикации.

В настоящее время усиливается циркуляция полирезистентных штаммов сальмонелл [2]. Предполагается, что это может быть связано с нерациональным использованием антибактериальных препаратов (самолечение, безрецептурная продажа антибиотиков) [14]. Исследование резистентных штаммов сальмонелл показало, что высокая устойчивость их к действию противомикробных средств обусловлена наличием у них R-плазмиды, получившей название R-фактора [14]. Заболевания, вызванные полирезистентными штаммами сальмонелл, отличаются более длительным инкубационным периодом и более тяжелым течением заболевания. Основными патогенными факторами сальмонелл являются холероподобный энтеротоксин и эндотоксин липополисахаридной природы, микрокапсула, придающая микроорганизму устойчивость к фагоцитозу, адгезины, представляющие собой белки наружной мембраны, факторы колонизации. Также бактерии имеют плазмиды вирулентности, за счет чего ускоренно размножаются вне желудочно-кишечного тракта.

Сальмонеллы могут длительно сохраняться вне организма. В частности, в почве, навозе и воде сальмонеллы могут находиться без потери жизнеспособности до 9-10 месяцев, переносят замораживание более 4-5 месяцев и нагревание до 70-75°C в течение 15-30 минут. Основной путь заражения сальмонеллезом – фекально-оральный. Инфекционная доза составляет от 30 до 10<sup>9</sup> микроорганизмов и зависит от характера поглощения пищи и врожденного иммунитета.

Сальмонеллез в настоящее время относится к числу наиболее распространенных кишечных инфекций во всем мире, что обусловлено интенсивным развитием животноводства, характером и масштабами реализации пищевых продуктов, увеличением экспортно-импортных связей между странами, усилением миграционных процессов и др. В частности, в США ежегодно регистрируется около 76 млн. случаев заболевания сальмонеллезом, которые приводят к 325 000 случаев госпитализации и 5000 случаев смертей. В РФ также наблюдаются достаточно высокие показатели заболеваемости сальмонеллезной инфекцией, которые за период 2003-2009 гг. регистрировались на уровне 30-35 случаев на 100 тыс. населения. Причем все большее распространение получают серотипы сальмонелл, отличающиеся резистентностью ко многим современным распространенным антибиотикам и дезинфицирующим средствам, а также повышенной термоустойчивостью [1]. Одновременно распространяются серотипы сальмонелл, способные вызывать внутрибольничные эпидемии с высоким уровнем смертности детей младенческого возраста [15].

Сальмонеллез – это полиэтиологическая инфекционная болезнь, вызываемая различными серотипами бактерий рода *Salmonella*, характеризуется разнообразными клиническими проявлениями от бессимптомного носительства до тяжелых септических форм, в большинстве случаев протекает с поражением органов пищеварительного тракта. Причиной тяжелого течения сальмонеллезной инфекции и неблагоприятных исходов являются штаммы сальмонелл, обладающие множественной лекарственной резистентностью [10]. Развитие инфекций кровотока в таких случаях более вероятно, чем при инфекции, обусловленной антибиотикочувствительными сальмонеллами.

Заражение сальмонеллезом происходит при употреблении в пищу контаминированных продуктов, что определяет необходимость постоянного бактериологического контроля продуктов животноводства. Традиционно наличие сальмонелл и их чувствительность к антибактериальным препаратам определяется с помощью классических бактериологических методов в соответствии с рекомендациями CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Наряду с тем, что эти методы обладают хорошей достоверностью и точностью, они имеют существенный недостаток – время получения результата составляет от 4 до 5 суток, что не позволяет своевременно проводить адекватное лечение.

Существующие методы детекции микроорганизмов существенно варьируют по времени исследования: 4-24 часа для культивирования, до 30 минут для ПЦР и около 24 часов для секвенирования, от 0,5 до 3 часов – для иммунодиагностических методов. Идеальной ситуацией является экспресс-идентификация

патогенов по генетическим или биохимическим маркерам в полевых условиях, в лаборатории или у постели больного. По-прежнему существует и проблема чувствительности и специфичности методов. Например, диагностическое значение имеет нарастание уровня антител в динамике заболевания, для чего сыворотку берут сразу после выявления заболевания, а затем через неделю. Метод иммуноферментного анализа позволил ускорить и упростить процедуру диагностики и объективизировать полученные результаты за счет автоматизации учёта данных и возможности исследования иммуноглобулинов различных классов. Однако выяснилось, что этот метод может давать ложноположительные результаты, обусловленные конкуренцией между иммуноглобулинами М и G. Преодолеть основные недостатки традиционных методов диагностики позволяют новые биоинженерные технологии.

В последнее время в мировой науке появились новые биоинженерные технологии, в частности, технологии, позволяющие создавать высокоэффективные средства диагностики на основе олигонуклеотидов (аптамеров или искусственных антител).

Опыт применения аптамеров для детекции возбудителей сальмонеллеза весьма ограничен: изоляция РНК-аптамеров, подавляющих вирулентные штаммы сальмонелл [13], использование ДНК-аптамеров для идентификации сальмонелл в фекалиях [11] и в продуктах питания [6].

**Цель исследования** – определение серотипа сальмонелл, получившего наибольшее распространение на территории Красноярского края, и оценка возможности применения технологии селекции олигонуклеотидов (SELEX) для идентификации этого серотипа.

**Материалы и методы исследования.** Чувствительность к антимикробным препаратам определяли методом диффузии в агаре с применением стандартных бумажных дисков согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [3], утвержденным главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004.

Диско-диффузионный метод относится к основным для определения чувствительности к антимикробным препаратам, применяемым в клинической практике. Результаты данного метода хорошо воспроизводимы. Диско-диффузионный метод рекомендован к использованию не только национальными рекомендациями, но и рекомендациями Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), а также The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Для оценки чувствительности использовали среду Мюллера-Хинтона, разрешенную к применению в Российской Федерации в установленном порядке и по своим характеристикам удовлетворяющую национальным и международным требованиям (CLSI, МУК 4.2.1890-04). После автоклавирования питательную среду разливали в стерильные чашки Петри слоем толщиной 4 мм (на чашку диаметром 100 мм вносили 25 мл агара). Чашки оставляли при комнатной температуре для застывания.

Для тестирования антибиотикочувствительности микроорганизмов готовили стандартную суспензию исследуемого микроорганизма в концентрации 1,5·10<sup>8</sup> КОЕ/мл. Для оценки концентрации бактериальной суспензии измеряли ее оптическую плотность. Оптическая плотность бактериальной суспензии с концентрацией 1,5·10<sup>8</sup> КОЕ/мл при визуальном контроле соответствовала стандарту мутности 0,5 по МакФарланду. Контроль оптической плотности суспензии также осуществляли с использованием нефелометра.

Для приготовления инокулюма использовали чистую суточную культуру микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде – коммерческий мясо-пептонный агар (МПА). Отбирали несколько однотипных, четко изолированных колоний. Петлей переносили незначительное количество материала в пробирку со стерильным физиологическим раствором, доводя плотность инокулюма точно до 0,5 по стандарту МакФарланда. Посев инокулюма осуществляли в течение 10-15 мин после приготовления. Для этого стерильным ватным тампоном, смоченным в суспензии, а затем тщательно отжатым о сухую стенку пробирки выше уровня пробирки, производили посев культуры методом «газона» на среду Мюллера-Хинтона – штрихами в трех направлениях, каждый раз поворачивая чашку примерно на 60°.

Не позднее 15 мин. после посева суспензии, на поверхность агара накладывали диски с антибиотиками. Для определения чувствительности к антибиотикам использовали стандартные диски, пропитанные антимикробными химиопрепаратами фирмы-производителя BioRad, США (в соответствии с рекомендациями CLSI). Для исследования использовали следующие диски – амикацин, ципрофлоксацин, цифотаксим, котримоксазол, имипенем/циластатин, левомицетин. Инкубацию проводили в течение 20-24 часов при температуре 35°C.

Учет результатов проводили путем измерения зоны задержки роста микроорганизма в мм. Для измерения диаметра зон подавления роста чашки помещали вверх дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет настольной лампы падал под углом 45°. Диаметры зон подавления роста, с учетом диаметра самого диска, измеряли с точностью до 1 мм с помощью стандартной линейки и/или штанген-циркуля.

Интерпретацию результатов осуществляли путем сопоставления полученных значений диаметров зон задержки роста с пограничными значениями диаметров для представителей семейства *Enterobacteriaceae* согласно МУК 4.2.1890-04. По полученным результатам, микроорганизмы относили к одной из категорий (чувствительные, умеренно-устойчивые, устойчивые).

Контроль качества определения чувствительности сальмонелл к антибактериальным препаратам проводили при каждом исследовании с использованием референс-штаммов. В качестве референс-штаммов применяли культуры микроорганизмов принадлежащие к Американской коллекции типовых культур (ATCC). Выбор референс-штаммов для проведения контрольных исследований определяли исследуемыми нами микроорганизмами (род *Salmonella*). В соответствии с рекомендациями Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) для контроля качества определения чувствительности сальмонелл к антибактериальным препаратам использовали контрольный штамм (*E. Coli* ATCC 25922).

Для контроля чистоты роста культуры образец инокулюма, использованного для оценки чувствительности, засеивали на чашку с МПА и инкубировали в течение 20-24 ч. Однородный рост культуры подтверждал чистоту исследуемой культуры. Для контроля качества питательной среды проводился контроль стерильности, pH среды, питательности среды.

Получение искусственных антител к *Salmonella Enteritidis* осуществляли с помощью технологии SELEX путем чередования позитивной и негативной селекции [5]. SELEX – процесс скрининга очень большой библиотеки олигонуклеотидов со случайными последовательностями повторяющихся циклов селекции и амплификации. Для выбора аптамеров использовали бактерии *Salmonella Enteritidis*. В качестве негативных мишеней использовали бактерии *Salmonella Typhimurium*, *Echerihia Coli*, *Staphylococcus Aureus* и др.

Селекция аптамеров проходила на протяжении нескольких раундов, в которых осуществляли отбор последовательностей, связывающихся с молекулой-мишенью. Каждый раунд включал 5 основных стадий: 1) библиотеку олигонуклеотидов инкубировали с биологической мишенью; 2) комплексы олигонуклеотидов с мишенью отделяли от несвязавшихся олигонуклеотидов; 3) связавшиеся аптамеры отделяли от биологической мишени; 4) полученные аптамеры инкубировали с негативной мишенью; 5) несвязавшиеся с негативной мишенью аптамеры отделяли и амплифицировали. В результате отбора происходило постепенное обогащение библиотеки последовательностями, обладающими повышенным сродством к мишени.

Исследование аффинности аптамеров к *Salmonella Enteritidis* проводили на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter Cytomics FC 500. Долю бактерий, связанных с аптамерами, определяли по флуоресценции аптамеров в зеленой области спектра на проточном цитофлуориметре. Для этого исследуемые бактерии ресуспендировали в 500 мкл среды Хенкса и помещали в карусель проточного цитофлуориметра. В программном обеспечении MXP Cytometer создавали протокол для измерения, который использовали для измерения флуоресценции всех исследуемых образцов. Используемые детекторы: FS, SS, FL1. Напряжение на детекторах не меняли в процессе измерения всех исследуемых образцов (450V, 480V, 558V, соответственно для каждого детектора). В ходе каждого измерения регистрировали 100000 событий. Флуоресценцию интактных бактерий *Salmonella Enteritidis* в среде Хенкса

принимали за нулевой уровень. Истинной флуоресценцией аптамеров, связанных с бактериями, считали события выше нулевого уровня флуоресценции. Об истинности флуоресценции судили также по возможности проведения цветовой компенсации, для флуоресцентного красителя Alexa-488 она составляла 25 единиц.

**Результаты и их обсуждение.** В Красноярском крае вспышки сальмонеллеза на протяжении последних лет фиксировались неоднократно. Для скрининга серотипов сальмонелл, циркулирующих на территории Красноярского края, были проанализированы штаммы сальмонелл, собранные в течение нескольких месяцев. Собранные штаммы сальмонелл *S. enterica* отнесены к различным сероварам, среди них *Enteritidis* составляли 70%, *Typhimurium* – 5%, *Infantis* – 10%, *Tshiongwe* – 5%, *Djugu* – 5%, *Java* – 5%. Все выделенные штаммы сальмонелл – патогенные микроорганизмы и характеризуются разной степенью проявления патогенности. Наиболее патогенный среди них – серовар *S. Enteritidis*, играющий основную роль в инфекционной патологии человека. На его долю приходится большинство собранных на территории Красноярского края штаммов.

Все штаммы сальмонелл, обнаруженные на территории Красноярского края, были выделены в разное время из различных источников – от больных людей (13), реконвалесцентов (1), бактерионосителей (1), из пищевых продуктов (2), сточных (2) и поверхностных вод (1). При исследовании лекарственной устойчивости диско-диффузионным методом выяснено, что серовары *S. Enteritidis* чувствительны к амикацину, ципрофлоксацину, цефотаксиму, котримоксазолу, имипенему и левомицетину, серовар *S. Typhimurium* оказался устойчивым к амикацину.

Таким образом, исследованиями было выявлено широкое распространение на территории Красноярского края одного из наиболее патогенных сероваров сальмонелл – *S. Enteritidis*, не обладающих множественной лекарственной резистентностью, но в то же время, которые могли способствовать высокому уровню заболеваемости населения сальмонеллезом. Именно поэтому профилактическое выявление *S. Enteritidis* в продуктах питания, воде и биологических жидкостях является одной из важных проблем.

В частности, в последнее время в мировой науке появились новые перспективные технологии на основе технологии SELEX, позволяющие осуществлять селекцию олигонуклеотидов, проявляющих свойства искусственных антител, впоследствии названных аптамерами.

Аптамеры – новый класс синтетических аффинных реагентов, способных связываться с различными мишенями (белками, небольшими молекулами, живыми клетками, твердыми частицами) с высокой степенью специфичности. Аптамеры представляют собой фрагменты однонитевой РНК или ДНК небольших размеров, образующие уникальные трехмерные структуры. Каждый такой олигонуклеотид имеет константные области, необходимые для посадки праймеров при амплификации и регион случайных нуклеотидных последовательностей.

С помощью технологии SELEX нами были получены искусственные антитела к клеточной стенке самого распространенного на территории Красноярского края серовара сальмонеллы – *Salmonella Enteritidis*. Результаты исследования специфичности связывания искусственных антител с *Salmonella Enteritidis*, представленные на рис.2, показали, что эти бактерии имеют высокую степень аффинности. Бактерии *Salmonella Enteritidis*, проинкубированные с искусственными антителами, имели высокий уровень флуоресценции (*Puc.1a*), в то время как сами бактерии в отсутствие флуоресцирующих антител, не обладали флуоресценцией (*Puc.1б*). Искусственные антитела к *Salmonella Enteritidis*, проинкубированные с бактериями *Salmonella Typhimurium*, *Echerihia Coli*, *Staphylococcus Aureus* и другими, также не флуоресцировали (Рис. 1в).

Использование аптамеров для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний стоит в одном ряду с такими признанными методами, как иммуноферментный, геномный, иммунофлуоресцентный анализ. К мишеням, используемым для детекции, относятся ДНК/РНК, антигены и токсины микроорганизмов.

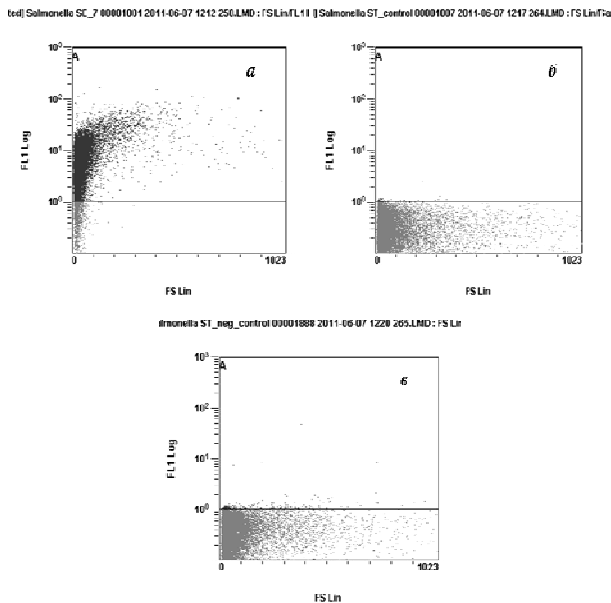


Рис. 1. Проточная цитофлуориметрия бактерий *Salmonella Enteritidis*, проинкубированных с искусственными антителами к *Salmonella Enteritidis* (а); бактерий *Salmonella Enteritidis* в отсутствие искусственных антител (б); бактерий *Salmonella Thyphimurium*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus* и др., проинкубированных с аптамерами к *Salmonella Enteritidis* (в).

Использование аптамеров позволяет решить проблему специфичности, чувствительности и экспресс-диагностики. Для таких задач детекции патогенов аптамеры могут использоваться самостоятельно или на носителях (например, углеродных нанотрубках), которые одновременно выступают в качестве сенсоров (при связывании аптамеров с клетками изменяется заряд в слое нанотрубки и измеряемый потенциал). Вторичная структура аптамеров может быть достаточно легко спроектирована таким образом, чтобы они претерпевали конформационные изменения при взаимодействии с мишенью. Это важное свойство делает аптамеры уникальным материалом для создания биосенсоров.

Несомненно, возможность решения задачи экспресс-детекции возбудителей с помощью аптамеров базируется на таких важных их свойствах, как высокая резистентность к денатурации и деградации, высокая связывающая способность и специфичность, возможность модификации функциональных групп и мечения, возможность иммобилизации на биочипах, что создает предпосылки для формирования высокоструктурированного «рецепторного» слоя. Аптамеры могут распознавать хиральные молекулы и, в ряде случаев, различные эпитопы на одной и той же молекуле (однако, в проявлении такой способности есть существенные ограничения). Таким образом, возможно применение аптамеров для детекции неиммуногенных мишеней или токсичных белков, так как аптамеры, в отличие от антител, не требуют этапа синтеза в живом организме.

Насколько простой задачей является получение аптамеров против конкретных молекул-компонентов клеточной стенки микроорганизмов или их токсинов? Есть данные о создании аптамеров, распознающих ионы цинка, АТФ, олигопептиды и гликопротеины (например, CD4). В число мишеней аптамеров входят антибиотики, дисахариды, аминокликозиды, органические красители, нейротрансмиттеры, порфирины, биотин. Подавляющее число белков, являющихся мишенями для аптамеров, сами представляют собой лиганды для полианионов (нуклеиновых кислот или гликозаминогликанов), например, тромбин или иные белки-компоненты свертывающей системы крови, некоторые гепарин-связывающие факторы роста, транскрипционные факторы, вирусные регуляторные белки. Интересным является предположение о том, что некоторые гепарин-связывающие белки (например, тромбин) могут иметь естественные аптамеры в плазме крови. Идея создания аптамеров, распознающих специфические макромолекулы возбудителей (например, белковые факторы вирулентности или токсины) является весьма

привлекательной, но пока еще не решенной окончательно. Однако именно этот подход открывает новое направление в создании препаратов с антимикробной и противовирусной активностью и формирует принципиально новый класс фармакологических препаратов - аптамеров [12].

Какие белки на поверхности сальмонеллы могут распознавать аптамеры? Это могут быть белки, необходимые для инвазии, например, SipB [9], ЛПС-связывающий белок [7], порины, участвующие в транспорте веществ и взаимодействии микроорганизмов с клетками эукариот [4], а также токсины и адгезины [8].

Результаты наших исследований подтверждают перспективность разработки новых методов детекции возбудителей инфекционных заболеваний с использованием искусственных антител (аптамеров).

#### Выводы:

1. Сальмонеллезы, вызывающие множество тяжелых патологических изменений в организме, в настоящее время широко распространены и могут являться причиной летальных исходов.
2. На территории Красноярского края циркулирует один из наиболее патогенных сероваров сальмонелл, являющихся возбудителем сальмонеллеза, – *Salmonella Enteritidis*.
3. Перспективной технологией разработки и создания новых методов выявления *Salmonella Enteritidis* в исследуемых образцах является технология SELEX.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (Государственный контракт № 16.512.11.2107).

#### Литература

1. Иванов, А.С. Современные представления об антибиотикорезистентности и антибактериальной терапии сальмонеллезов / А.С. Иванов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2009. – Т.11, N4. – С. 305–326.
2. Антибиотикорезистентность сальмонелл, выделенных в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в 1992-2000 гг. / Н.С. Козлова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т.1. – С. 20.
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам / Н.А. Семина [и др.] // Клиническая микробиология и антибактериальная химиотерапия. – 2004. – Т.6, N4. – С. 306–359.
4. Begum, F. Immunological characterization of 37.81 kDa common immunodominant surface protein of some *Salmonella* serovars, Bangl. J. Vet. Med. / F. Begum, Y. Adachi, M.S.R. Khan, 2008, 6(2), 145–151.
5. Aptamer-Facilitated Biomarker Discovery (AptaBID) / M. Berzovsky [et al.] // J. Am. Chem. Soc. 2008. N130. P.9137-9143.
6. Dwivedi, H.P., 2007, <http://www.fsrrn.net/modules/smartsection/makepdf.php?itemid=71>.
7. A lipopolysaccharide-binding cell surface protein from *Salmonella* Minnesota: isolation, characterization and occurrence in different Enterobacteriaceae, Eur. J. Biochem. / Geyer, R. [et al], 1979, 98(1), 27-38.
8. Haraga, A. Salmonellae interplay with host cells, Nature Rev. Microbiol. / Haraga, A., Ohlson, M.B., Miller, S.I., 2008, 6(1), 53-66.
9. Hayward, R.D. Membrane fusion activity of purified SipB, a *Salmonella* surface protein essential for mammalian cell invasion, Mol. Microbiol. / Hayward R.D., McGhie E.J., Koronakis V., 2000, 37(4), 727-739
10. Jean, S.S. Bacteremia caused by *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis in Taiwan / Jean S.S., Wang J.Y., Hsueh P.R. // J. Microbiol. Immunol. Infect. 2006. Vol. 39. P.35865.
11. Joshi, R., 2007, <http://www.fsrrn.net/modules/smartsection/makepdf.php?itemid=15>.
12. Keefe, A.D. Aptamers as therapeutics, Nature Reviews Drug Discovery / Keefe, A.D., Pai, S., Ellington, A., 2010, 9, 537–550.
13. Kwon, Y.M., 2008,

<http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/215557.html>.

14. O'Brien, T.F. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally / O'Brien T.F. // Clin. Inf. Dis. 1997. S. 1. P. 2-8.

15. Infection due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype infantis in a neonatal unit. J Pediatr / PessoaSilva C.L. [et al], 2002; 141:3817.

NEW PROSPECTIVE METHOD OF SALMONELLA IDENTIFICATION

T.N. ZAMAY, A.B. SALMINA, O.S. ZAMAY, O.V. PERIANOVA,  
I.T. RESHETNEVA, G.M. DMITRIEVA, T.S. OSTAPOVA, G.S. ZAMAY,  
YE.N. YERKAEV

Krasnoyarsk State Medical University after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky

We have characterized *Salmonella* strains circulating in the Krasnoyarsk region. The most pathogenic type of them – *Salmonella* Enteritidis – is found as dominating in the territory. Routine bacteriological methods used for *Salmonella* identification and assessment of its pathogenicity and drug resistance to modern medicines require rather a long period of time, which is their main shortcoming. Therefore, we have focused on the application of artificial anti-bodies to *S. Enteritidis*, which allows revealing *S. Enteritidis* agents in the tested samples quickly, within an hour.

**Key words:** salmonellosis, *Salmonella* Enteritidis, artificial antibodies.

УДК 681.3, 004.032.26, 611.1, 004.93

ПЕРСОНАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ И ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ СРЕДСТВ

О.В. ОВЧИНКИН, Т.В. ОВЧИНКИНА, О.Г. ПАВЛОВ\*

Статья посвящена современной медицинской практике проведения диспансеризации населения с применением нейронных сетей, что даёт возможность значительно повысить качество диагностики и прогнозирования заболеваний сердечно-сосудистой системы.

**Ключевые слова:** персональное моделирование, нейронные сети, хаотическая динамика, заболевания сердечно-сосудистой системы.

По данным Всемирной организации здравоохранения актуальной проблемой в настоящее время остаются заболевания *сердечно-сосудистой системы* (ССС), которые зачастую ведут к инвалидизирующему и летальному исходу. В последние годы среди населения России получает динамичное распространение артериальная гипертония и ишемическая болезнь сердца. Актуальность исследования проблемы заболеваний ССС подтверждается достижениями высокотехнологичной кардиологии, результаты которой способствуют положительным тенденциям демографического развития [1].

Развитие технического потенциала в здравоохранении, внедрение в широкую практику экспресс методов обследования (скрининга) в процессе массового обследования населения (диспансеризации), могут повысить эффективность профилактического направления в здравоохранении. Экономическая и техническая проблемы использования высокотехнологичной кардиологии в наиболее развитых странах мира привели к содержательному усложнению исследовательских задач, связанных с разработкой и совершенствованием национальных систем здравоохранения [2]. Соответственно, задачей IT-специалистов в кардиологии является разработка и внедрение в медицинскую практику математических моделей поддержки и принятия решений врачебного персонала.

Сердечная недостаточность – одна из сложнейших проблем кардиологии, поскольку она является вторичным синдромом, развивающимся при врожденных и приобретенных пороках сердца, инфаркте миокарда, и поэтому диагностические мероприятия должны быть направлены на ее раннее выявление. За последние десятилетия в диагностике сердечной недостаточности был достигнут существенный прогресс. Ежегодно проводятся масштабные клинические исследования, посвященные изучению новых подходов к диагностике и лечению данной патологии. Современным решением проблемы диагностики и прогнозирования формирования сердечной недостаточности при различных пороках сердца может являться нейронная система и аналитическая система на основе теории хаоса.

На сегодняшний день в здравоохранении распространено использование нейронных сетей для медицинских прогнозов.

Значительное внимание при этом уделяется рассмотрению целесообразности и особенностям применения нейронных сетей при прогнозировании степени тяжести сердечной недостаточности и пороков сердца. Это связано в основном с наличием реальных возможностей для предупреждения и успешной терапии целого ряда осложнений сердечной недостаточности в случае своевременного их прогнозирования. Ряд авторов [2,3] для прогнозирования используют исключительно клинические, клинико-лабораторные и клинико-инструментальные данные. Также были предложены методы прогнозирования с вычислением прогностических индексов [4], применением дискриминантного анализа [5] и алгоритма распознавания образов [6]. Однако полученные в этих работах результаты редко широко применяются в медицинской практике для прогнозирования из-за сложности и громоздкости прогностических правил, использования дорогостоящих диагностических исследований, проведение которых возможно далеко не во всех клиниках.

Многих перечисленных выше недостатков лишена методика компьютерных нейронных сетей, получившая достаточно широкое распространение в конце XX века. Однако широкому признанию предшествовала почти четверть вековая кропотливая работа по превращению теоретических основ методики в целый раздел информатики. Актуальность исследований по искусственным нейронным сетям связана с тем, что они позволяют приблизиться к возможностям обработки информации человеческим мозгом, который представляет собой чрезвычайно сложный, нелинейный, параллельный компьютер (систему обработки информации) [5,7]. Нейронные сети – это нелинейные системы, позволяющие гораздо лучше классифицировать данные. В медицинской диагностике они дают возможность значительно повысить качество метода, не снижая его чувствительности.

Одной из наиболее известных экспертных систем, действие которых основывалось как на знаниях экспертов, так и на реализации процедур вывода, была система MYCIN. Данную систему разработали в начале 70 годов прошлого века в Стэнфорде для диагностики септического шока. Примером программы диагностики служит пакет кардиодиагностики, разработанный фирмой RES Informatica совместно с Центром кардиологических исследований в Милане. Программа позволяет осуществлять неинвазивную кардиодиагностику на основе распознавания спектров тахограмм. Тахограмма представляет собой гистограмму интервалов между последовательными сердечными ритмами и ее спектр отражает баланс активностей симпатической и парасимпатической нервной системы человека, специфично изменяющейся при различных заболеваниях [3].

В здравоохранении находит применение и другая особенность нейронных сетей – их способность предсказывать временные последовательности. При анализе электрокардиограммы нейросетевая система фильтрации электрокардиограмм позволяет подавлять нелинейный и нестационарный шум значительно лучше, чем ранее использовавшиеся методы [5].

Теория нейронных сетей получила значительное развитие, но в ней еще недостаточно развиты методы системного проектирования и анализа быстродействующих нейронных сетей высокой размерности. Среди различных нейронных сетей одной из наиболее известных является нейронная сеть с многослойной структурой, в которой каждый нейрон произвольного слоя связан со всеми аксонами нейронов предыдущего слоя или, в случае первого слоя, со всеми входами нейронных сетей (многослойный перцептрон).

W. Dassen и соавторы [5] пытались применить нейронные сети для прогнозирования размеров инфаркта миокарда, основываясь на данных первой ЭКГ при поступлении пациента в клинику. На материале из 273 ЭКГ по 134 параметрам с использованием двух методик было проведено обучение. Однако обученные нейронные сети продемонстрировали невысокую диагностическую точность и поэтому не могли быть использованы для прогнозирования.

J.Ortiz и соавторы [4] прогнозировали с помощью компьютерных нейронных сетей возникновение летального исхода в течение года у больных с хронической сердечной недостаточностью. База данных, содержащая информацию о 95 пациентах, была разделена на две примерно равные части. Первая часть составила обучающую выборку, вторая – тестирующую. В качестве входных параметров использовались клинические данные и результаты эхокардиоскопии. Обучалось несколько нейронных сетей. При тестировании обученных нейронных сетей прогностическая точность составила 93-100% для обучающей выборки, 72-90% – для тестирующей [4].

В ДонНТУ была создана собственная экспертная система [2]. Для построения экспертной системы была выбрана группа риска – беременные женщины с врожденными пороками сердца. Авторы данной экспертной системы старались повысить качество медицинской диагностики и прогнозирования здоровья как ма-

\* Юго-западный государственный университет, Курск, ул. Челюскинцев, 19