

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЛИТЕРАТУРА

1. Предлагаемая методика косметической антропометрической коррекции роста весьма результативна и может быть использована в специализированных стационарах.
2. При выборе величины удлинения следует ориентироваться как на пожелание пациента, так и на общепринятые понятия о параметрах и пропорциях человеческого тела.
3. Рекомендуемая методика и результаты ее применения дают положительный психологический эффект.

1. *Артемов А. А.* Коррекция формы и длины нижних конечностей в реконструктивной и эстетической хирургии: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — М., 2003. — 46 с.
2. *Егоров М. Ф., Чернов А. П., Некрасов М. С.* Ортопедическая косметология. — М.: Издательский центр «Федоров», 2000. — 184 с.
3. *Каплунов А. Г., Каплунов О. А.* // *Анналы пластической и реконструктивной хирургии.* — 2002. — № 2. — С. 33—36.
4. *Каплунов О. А.* Чрескостный остеосинтез по Илизарову в травматологии и ортопедии. — М.: Издательский дом «ГЭОТАР-МЕД», 2002. — 304 с.

УДК 576.851.132:616.982:27-039:576.8.09.2

УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИЕ АНТИГЕНЫ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* И *BURKHOLDERIA MALLEI* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ОСНОВА СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ МЕЛИОИДОЗА И САПА

И. И. Корсакова, Н. Н. Пивень, Н. П. Храпова, С. И. Жукова, И. В. Авророва, М. Я. Кулаков, Л. В. Ломова, Г. М. Напалкова, В. А. Сидорук, Н. А. Чупрына

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Были выделены и описаны антигенные комплексы *B.pseudomallei* и *B.mallei*, содержащие углеводы. Они находились в поверхностных структурах наружных мембран этих микробиологических агентов. Изучалась иммуногенность некоторых антигенов. При назначении животным антигенных фракций *B.pseudomallei* и *B.mallei* 83—66 % белых крыс оказывались защищенными от инфицирования вирулентным штаммом *B.pseudomallei*. Эти фракции вместе с антигенами Ag 2, Ag 3, Ag 6, Ag 8 и Ag d *B.pseudomallei* и главные антигены *B.pseudomallei* бескапсульных вариантов рассматривались как потенциальные субъединицы для создания химических вакцин, так же как и средство иммунодиагностики мелиоидоза и сапа.

Ключевые слова: антигенные комплексы, *B.pseudomallei*, *B.mallei*, химические вакцины, мелиоидоз, сап.

ANTIGENS OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND *BURKHOLDERIA MALLEI* CONTAINING CARBOHYDRATES AS A POTENTIAL BASIS FOR DIAGNOSTIC AND PREVENTIVE MEASURES OF MELIOIDOSIS AND GLANDERS

I. I. Korsakova, N. N. Piven, N. P. Khrapova, S. I. Zhukova, I. V. Avrorova, M. Ya. Kulakov, L. V. Lomova, G. M. Napalkova, V. A. Sidoruk, N. A. Chuprina

Antigenic complexes of *B.pseudomallei* and *B.mallei* containing carbohydrates were isolated and characterized. They are included in the surface structures of outer membrane of these microbial agents. Immunogenicity of several antigens was studied. When administered to white rats the antigenic fractions of *B.pseudomallei* and of *B.mallei* protected 83—66 % of animals from the infection by *B.pseudomallei* virulent strain. These fractions together with antigens Ag 2, Ag 3, Ag 6, Ag 8 and Ag d of *B.pseudomallei* and major antigens of *B.pseudomallei* acapsular variants are considered as potential subunits for the creation of chemical vaccine as well as a tool for immunodiagnosics of melioidosis and glanders.

Key words: antigenic complexes, *B.pseudomallei*, *B.mallei*, chemical vaccine, melioidosis, glanders.

Возбудители мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) и сапа (*Burkholderia mallei*) способны вызывать заболевания, летальность при острых формах которых достигает в среднем 70 %. Также необходимо отметить, что эффективная специфическая иммунопрофилактика указанных инфекций не разработана. В настоящее время интерес к этим видам микроорганизмов возрос в связи с возможным их использовани-

ем в качестве агентов биотерроризма категории В [7, 10, 12].

Установлено, что возбудители мелиоидоза и сапа близки по антигенному составу между собой, но для них характерны также вариабельность и гетерогенность антигенов. Исследования в области их антигенной структуры дали возможность с высокой степенью достоверности проводить сравнительный анализ состава анти-

генов указанных возбудителей и специфических иммуноглобулинов [4, 5, 6]. Однако на данный момент отсутствуют надежные средства обнаружения специфического иммунного ответа макроорганизма при мелиоидозе и сапе, что затрудняет постановку диагноза, в том числе и ретроспективного.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выделить и охарактеризовать углеводсодержащие капсульные и поверхностные антигенные комплексы *B. pseudomallei* и *B. mallei*, адекватно отражающие гуморальный и клеточный иммунный ответ макроорганизма при мелиоидозе и сапе. Изучить иммуногенность полученных антигенов и отобрать перспективные препараты для создания экспериментальной вакцины.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служили культуры штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, антигенные комплексы патогенных буркхольдерий и иммунные сыворотки лабораторных животных.

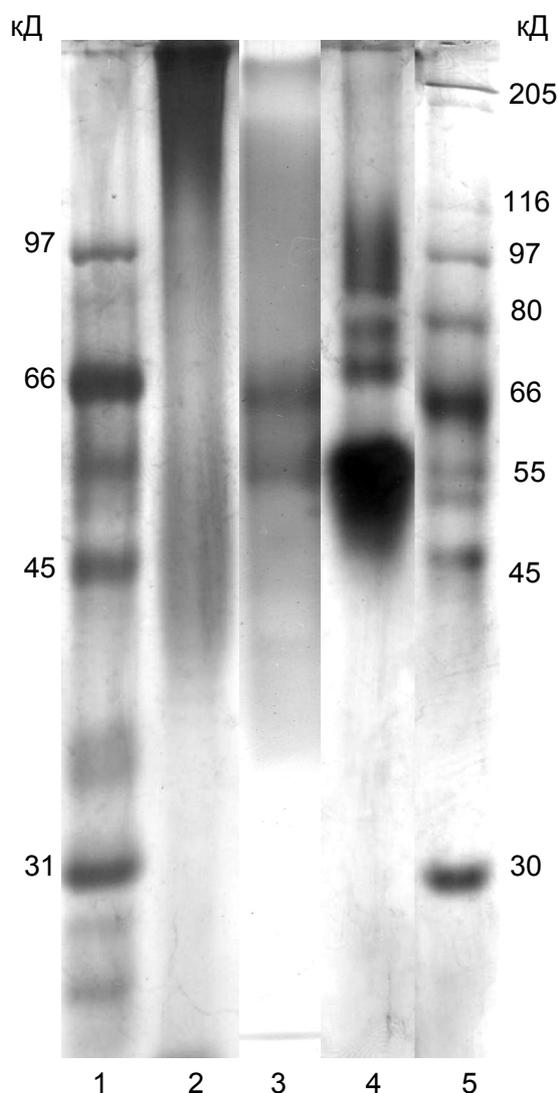
Антигены (Аг) выделяли с помощью модифицированной формамидной экстракции [3]. Полученные формамидные экстракты подвергали фракционированию методом гель-хроматографии на смеси носителей TSK HW 55F (66 %) и 75F (33 %) («Тоуоферл», Япония) с последующим разделением отдельных пиков при ионообменной хроматографии на «DEAE — Sephadex A-50» в СI-форме. Электрофоретические и иммунохимические свойства антигенных комплексов изучали в иммуноэлектрофорезе, электрофорезе в полиакриламидном геле и иммуноблоттинге, проводимых по стандартным методикам [9, 11]. На основе выделенных антигенов получали как поликлональные, так и моноклональные антитела против возбудителей мелиоидоза и сапа. Иммунизацию лабораторных животных (козлов, белых мышей и белых крыс) проводили с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) и без него в зависимости от вида животного и применяемого антигенного препарата [1]. Моноклональные антитела получали согласно основному протоколу гибридомной технологии, адаптированному к работе с возбудителями бактериальных инфекций [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Следует отметить, что в настоящее время имеются эффективные иммунологические средства для идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа, приготовленные как на основе поликлональных, так и моноклональных антител. Однако при скрининге обширной коллекции штаммов и субкультур различного фенотипа *B. pseudomallei*, особенно дефектных по маркерам вирулентности, серовариантности, капсулопродукции и другим, эта эффективность далеко не однозначна. Поэтому нами определены основные базовые углеводсо-

держащие антигены, ассоциированные с иммуногенностью данных возбудителей.

К таким антигенам отнесены биополимеры с преимущественно углеводным составом: капсульный гликопротеин 200 кДа (Аг 8), на основе которого можно дифференцировать отмеченные возбудители от близкородственных и других видов микроорганизмов, а также гликопротеиновые антигены наружной мембраны клетки — Аг 2 (30 кДа), Аг 3 (80 кДа). Электрофоретическая подвижность и дифференциальная окраска показали, что применение для выделения указанных антигенов модифицированной формамидной экстракции позволило получить препараты с высокой концентрацией и парциальностью гликопротеинов с молекулярной массой 200, 66 и 57 кДа, входящих в Аг 8, 2 и 3 соответственно (см. рис.).



Электролиз в ПААГ в присутствии дозацилсульфата натрия препаратов *B. pseudomallei*:

1 — маркеры молекулярных масс (97—31 кДа); 2 — антигенный комплекс 6+с; 3 — формамидный экстракт (200 +66 + 57 кДа); 4 — комплексный антиген бескапсульного варианта *B. pseudomallei*; 5 — маркеры молекулярных масс (205—30 кДа)

С целью получения поликлональных иммунных сывороток к капсульному гликопротеину формамидный экстракт был подвергнут фракционированию методом гель-хроматографии на препараты а и b, содержащие в первом случае гликопротеины 200, 66 и 57 кДа, во втором — преимущественно гликопротеин 200 кДа. Этими фракциями были проиммунизированы животные — продуценты антисывороток.

Вместе с тем на основе использования в качестве иммуногена цельного формамидного экстракта нами проведена объемная работа по получению широкого набора моноклональных антител (МКА), предварительной оценке и группировке их по эпитопной направленности в иммуноблоттинге с антигенными препаратами возбудителя мелиоидоза. Результаты этих исследований свидетельствуют о наличии как минимум шести групп МКА с направленностью к эпитопам антигенов возбудителя мелиоидоза с молекулярной массой 220, 200, 66, 57, 36 и 23 кДа. Иммунодиагностическую ценность полученных МКА еще предстоит изучить, однако уже сейчас виден их высокий потенциал как в диагностическом, так и в превентивном аспектах.

Следует отметить, что углеводсодержащие антигены возбудителей мелиоидоза и сапа были успешно использованы ранее рядом авторов [2] для серодиагностики сапа у лошадей и мелиоидоза у людей.

В связи с этим, используя предыдущий опыт, была отработана модификация метода выделения и очистки комплекса Ag 6+d, при котором значительно повышается выход и чистота препарированных антигенных структур (см. рис.). Полученные первые серии антигенных диагностикумов проходят соответствующие испытания с целью оценки пригодности базовых Ag 6+d для разработки стандартных средств иммунодиагностики мелиоидоза и сапа, прежде всего соответствующих биочипов.

Необходимо констатировать, что до настоящего времени специфическая профилактика мелиоидоза и сапа не разработана. Исследованиями последних лет показано, что отдельные препараты капсульных и поверхностных углеводсодержащих антигенов, экстрагируемых водно-солевой смесью и формамидом, могут быть перспективными компонентами химической вакцины. При моделировании экспериментального мелиоидоза на белых мышах и белых крысах эти препараты отличались высокой протективной активностью и защищали от 80 до 100 % животных при высоких инфицирующих дозах вирулентного штамма. Вместе с тем получить воспроизводимые результаты в полной мере не удалось, в связи с чем были предприняты более углубленные исследования состава биополимерных препаратов, что позволило установить взаимосвязь уровня иммуногенности некоторых из них с конкретными антигенными структурами. Полученные в ходе экспериментов данные представлены в таблице.

Протективность антигенных комплексов, выделенных из возбудителей мелиоидоза и сапа, для белых крыс при инфицировании их *B.pseudomallei* 100

Антигенные фракции	Условия выделения и очистки	Протективные антигены	Процент защиты
<i>B.pseudomallei</i>			
C	Ионообменная хроматография на DEAE- Sephadex A-50 в Cl-форме, элюция 0.4 M NaCl в трис-HCl pH 6.6	Ag 6	50
D	Ионообменная хроматография на DEAE- Sephadex A-50 в Cl-форме, элюция 1.2 M NaCl в трис-HCl pH 6.6	Ag 3, Ag 6	47
<i>B.mallei</i>			
C-3	Ионообменная хроматография на DEAE- Sephadex A-50 в Cl-форме, элюция 0.3 M NaCl в трис-HCl pH 7.7	Ag 6, Ag d	83
C-11	Ионообменная хроматография на DEAE- Sephadex A-50 в Cl-форме, элюция 0.8 M NaCl в трис-HCl pH 7.7	Ag 2	66

Примечание. Доза заражения для *B.pseudomallei* — 180 ЛД₅₀; доза заражения для *B.mallei* — 30 ЛД₅₀.

Так, при двукратном введении с ПАФ хроматографические фракции водно-солевого экстракта *B.pseudomallei* 111 C и D, содержащие в своем составе Ag 6 (фрагмент липополисахарида (ЛПС)) и Ag 3 (гликопротеин), защищали соответственно 50 и 47 % белых крыс (при 100 %-й гибели животных в контроле) от заражения вирулентным штаммом *B.pseudomallei* 100 в дозе 180 ЛД₅₀.

Наиболее иммуногенные фракции, приготовленные из *B.mallei* 10230, — C-3 и C-11 кроме Ag 6, включали в себя Ag 2 (гликопротеин) и Ag d (липопротеин). Иммунизация ими белых крыс однократно без адъюванта с последующим инфицированием 30 ЛД₅₀ *B.pseudomallei* приводила к выживанию 83 и 66 % животных соответственно.

Перспективным, на наш взгляд, является изучение состава капсульного гликопротеина 200 кДа для установления его структурных компонентов. Так, протонированный электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГе) выявил дискретность этого углеводсодержащего антигена, отмеченную наличием отдельных его составляющих субъединиц. Они располагаются в пределах молекулярной массы от 150 до 220 кДа. Представляется интересным дальнейшее изучение структурно-функциональных особенностей капсульного гликопротеина, включая супрессивную и иммуногенную активность его компонентов и их сочетаний.

Вместе с тем нельзя сбрасывать со счетов выявленный и препаративно полученный мажорный антигенный комплекс бескапсульного авирулентного варианта *B.pseudomallei* 100-6-1, состоящий из биополимеров белково-углеводной природы с молекулярной массой 97, 79, 72 и 54 кДа, проявивших в предыдущих исследова-

дованиях заметные протективные свойства при экспериментальном мелиоидозе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, антигенные комплексы *B.pseudomallei* и *B.mallei*, входящие в поверхностные углеводсодержащие структуры наружной мембраны этих возбудителей и имеющие в своем составе Ag 2, Ag 3, Ag 6 и Ag d, наряду со структурными компонентами Ag 8 и мажорными антигенами бескапсульного варианта *B.pseudomallei*, на наш взгляд, являются потенциальными субъединицами для создания химической вакцины, а также основой для конструирования эффективных иммунодиагностических средств идентификации и дифференциации указанных возбудителей от близкородственных буркхольдеров и других патогенных микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волков Е. А., Рыбкин В. С., Локтионов А. М. и др. // Особо опасные и редко встречающиеся инфекции: тез. докл. научн. конф. — Волгоград, 1980. — С. 14—15.
2. Мелиоидоз: сб. научн. трудов / Под ред. Н. Г. Тихонова. — Волгоград: Ниж.-Волж. кн. изд-во, 1995. — 224 с.
3. Пивень Н. Н. Антигенный анализ возбудителей мелиоидоза и сапа в аспектах идентификации, диагностики и патогенности: автореф. дисс. ... доктора мед. наук. — Волгоград, 1997. — 41 с.
4. Пивень Н. Н., Авророва И. В., Жукова С. И. и др. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунолог. — 2007. — № 1. — С. 47—52
5. Пивень Н. Н., Илюхин В. И. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2000. — № 6. — С. 94—99.
6. Пивень Н. Н., Илюхин В. И., Замарин А. Е. и др. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунолог. — 2007. — № 2. — С. 49—53.
7. Anuntagool N., Sirisinha S. // Microbiol. Immunol. — 2002. — Vol. 46, № 3. — P. 143—150.
8. Goding J. W. Monoclonal antibodies: principles and practice. — Acad. Press Inc., London Ltd. — 1986. — P. 59—103.
9. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—685.
10. Sentinel Laboratory guidelines for suspected agents of bioterrorism *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* // Amer. Soc. Microbiol. — 2003. — P. 1—22.
11. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76. — P. 4350—4354.
12. Wuthiekanun V., Anuntagool N., White N. J., et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2002. — Vol. 66, № 6. — P. 759—761.

УДК 615.214.2:547.7

ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ С ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМ ЗАМЕСТИТЕЛЕМ В β -ПОЛОЖЕНИИ

И. Н. Тюренков, О. В. Меркушенкова, В. В. Багметова

Кафедра фармакологии биофармации ФУВ ВолГМУ

Проведено изучение психофармакологических свойств новых производных гамма-аминомасляной кислоты с гетероциклическим заместителем в β -положении — соединений с лабораторным шифром РГПУ-136 и РГПУ-160. Установлено, что соединение РГПУ-136 обладает ноотропной активностью и повышает физическую работоспособность; РГПУ-160 оказывает анксиолитическое действие, сопоставимое по выраженности с препаратом позитивного контроля «Диазепам», снижает физическую работоспособность, а также мышечный тонус и мышечную силу у животных.

Ключевые слова: психофармакологические свойства, производные гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), ноотропная активность, анксиолитическое действие.

THE PSYCHOPHARMACOLOGIC PROPERTIES OF THE DERIVATIVES OF GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA) WITH THE HETEROCYCLIC SUBSTITUTE IN THE β -POSITION

I. N. Tyurenkov, O. V. Merkuschenkova, V. V. Bagmetova

There was carried out a study of the psychopharmacologic properties of the derivatives of gamma-aminobutyric acid with the heterocyclic substitute in the β -position — the compounds with the laboratorial cipher РГПУ-136 and РГПУ-160. It was ascertained that the compound РГПУ-136 possesses nootropic activity and increases exercise performance; РГПУ-160 shows distinct anxiolytic action comparable the preparation of positive control diazepam in intensity, reduces exercise performance as well as muscular tonus and muscle strength of the animals.

Key words: psychopharmacologic properties, derivatives of gamma-aminobutyric acid (GABA), nootropic activity, anxiolytic action.

Многoproфильность физиологической роли ГАМК, ее своеобразная полифункциональность как нейротрансмиттера в (ЦНС) и на периферии, существование не-

скольких типов ГАМК-рецепторов с вариабельным субъединичным составом определяют большое разнообразие фармакологических эффектов ГАМК-ер-