

УДК 615.37.03.015.44.076.9

## АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ОРГАНОВ ИНТАКТНЫХ И ЗАРАЖЕННЫХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* № 6 МЫШЕЙ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИМИ АНТИГЕНАМИ

Е.А. Асташкина<sup>1</sup>, О.В. Лебединская<sup>2\*</sup>, И.М. Грубер<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, г. Москва,

<sup>2</sup>Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера, Россия

## ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN INTACT AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* № 6 INFECTED MICE WHEN IMMUNIZED WITH PROTEIN-CONTAINING ANTIGENS

Е.А. Astashkina<sup>1</sup>, О.В. Lebedinskaya<sup>2\*</sup>, I.M. Gruber<sup>1</sup>

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow,

<sup>2</sup>Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation

---

**Цель.** Комплексное изучение морфологических изменений в органах интактных мышей и животных после заражения *Staphylococcus aureus* № 6 при введении различных секретируемых стафилококками белоксодержащих антигенов (БСА) и их протективной активности.

**Материалы и методы.** Исследование проведено с использованием 180 мышей-самцов линии BALB/c, которых иммунизировали подкожно двукратно в объеме 0,1 мл разными дозами «исходного» БСА (0,75; 1,8; 3,0 и 12 мкг), БСА I и БСА II (1,2 мкг). Морфологические изменения в органах мышей изучали после введения различных доз БСА без заражения животных и с предварительной иммунизацией на модели развития генерализованного процесса при заражении в ретроорбитальный синус сублетальной дозой *S. aureus* №6, равной 0,1 LD<sub>50</sub>. Для проведения морфологических исследований забирали селезенку, легкие и правую почку экспериментальных мышей. Парафиновые срезы органов, в том числе серийные срезы почки (с промежутком 200 мкм), окрашивали гематоксилином и эозином. При формировании у экспериментальных животных генерализованной стафилококковой инфекции была разработана и использована «почечная модель» с предложенными показателями процесса образования абсцессов и параллельным анализом высеваемости из органов.

**Результаты.** Установлено, что комплексное исследование влияния секретируемых *S. aureus* белоксодержащих антигенов на параметры адаптивного иммунитета, включающее изучение антигенной и протективной активности, морфологических изменений в органах, использование «почечной модели» с разработанными показателями процесса формирования абсцессов и параллельным анализом высеваемости из органов является информативным и адекватным.

---

© Асташкина Е.А., Лебединская О.В., Грубер И.М., 2017

тел. +7 (902) 799 56 07

e-mail: lebedinska@mail.ru

[Лебединская О.В. (\*контактное лицо) – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии; Асташкина Е.А. – соискатель лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии; Грубер И.М. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией клинической и экспериментальной микробиологии].

**Выводы.** В результате исследования доказано, что секретируемые белоксодержащие антигены – «исходный» и II БСА – служат перспективными препаратами для дальнейшего изучения и использования при разработке противостафилококковых вакцин.

**Ключевые слова.** Белоксодержащие антигены, *Staphylococcus aureus* № 6, морфологические изменения, «почечная модель».

**Aim.** To study the morphological changes in the organs of intact mice and *Staphylococcus aureus* № 6 infected animals, introduced different *S.aureus*-secreted protein-containing antigens (PCA) and their protective activity.

**Materials and methods.** 180 male mice of BALB/c line were studied. Mice were doubly immunized subcutaneously in the volume of 0,1 ml with different doses of “original” PCA (0,75; 1,8; 3,0 and 12 mkg), PCA I and PCA II (1,2mkg). Morphological changes in mice organs were investigated after introducing different doses of PCA without animals infection and with preliminary immunization on the model of generalized process development, when infected in the retroorbital sinus with the sublethal dose of *S.aureus* № 6 equal to 0,1 LD<sub>50</sub>. To conduct morphological studies, spleen, lungs and right kidney of experimental animals were taken. Paraffin sections of the organs including serial kidney sections (with the interval of 200 mcm) were stained with hematoxylin and eosin. When generalized staphylococcal infection in experimental animals was formed, there was developed and used a “renal” model with the offered indices of abscess process formation and parallel analysis of inoculation results.

**Results.** It was established that complex study of the influence of *S.aureus*-secreted PCA on the parameters of adaptive immunity, including the study of antigenic and protective activity, morphological changes in the organs, use of “renal” model with the developed indices of abscess process formation and parallel analysis of inoculation results, is informative and adequate.

**Conclusions.** The secreted protein-containing antigens – “original” and PCA II – are the promising preparations to be studied and used for the development of antistaphylococcal vaccines.

**Key words.** Protein-containing antigens, *Staphylococcus aureus* № 6, morphological changes, “renal model”.

## ВВЕДЕНИЕ

Социальная значимость воспалительных заболеваний возрастает во всем мире с каждым годом, что связано с особенностями жизни современного человека. Наряду с хроническими воспалительными заболеваниями, острые воспалительные процессы чаще, чем прежде, принимают затяжное течение. При воспалении происходит изменение структуры органов вследствие неполной регенерации, фиброплазии и некроза, которые всегда присутствуют в очагах хронического воспаления [3].

Золотистый стафилококк является доминирующим этиологическим фактором появления гнойно-септических инфекций, в том числе связанных с оказанием медицинской помощи. Стафилококк может по-

ражать практически все системы, органы и ткани с клиническими проявлениями локальных или общих заболеваний, способен вызывать гнойно-воспалительные процессы [6]. В результате этого в органах могут образовываться полости, окруженные пиогенными капсулами – абсцессы – и формироваться разрастания соединительной ткани с нарушением органной микроархитектуры [3].

Лечение стафилококковых инфекций является достаточно трудной задачей, так как *S. aureus* обладает значительной резистентностью к большинству антибиотиков и антибактериальных средств, а современные эффективные иммунотерапевтические и иммунопрофилактические коммерческие противостафилококковые препараты отсутствуют. В стратегии разработки иммунопрофилактических и иммунотерапевтиче-

ских вакцин против инфекций, вызываемых *S. aureus*, первоочередное значение имеет систематическая селекция антигенов, способствующая выбору тех из них, которые имеют наиболее высокий протективный вакцинный потенциал в доклинических исследованиях [5]. Традиционно в качестве протективных использовались поверхностные антигены бактерий, тогда как данные свойства секретлируемых микроорганизмами белоксодержащих антигенов (за исключением токсинов) изучены недостаточно.

*Цель исследования* – выявление морфологических изменений в органах незараженных мышей и животных после заражения *Staphylococcus aureus* № 6 при введении различных секретлируемых стафилококками белоксодержащих антигенов (БСА).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Секретлируемые белоксодержащие антигены штамма *Staphylococcus aureus* № 6 («исходный», I и II) получали по разработанной технологии [1].

В работе использовано 180 мышей-самцов линии BALB/c массой 12–14 г из питомника филиала «Андреевка» ГУ НЦБМТ, содержащихся в условиях вивария НИИВС им. И.И. Мечникова. Все манипуляции с лабораторными животными выполнены в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, изложенными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), требованиями Хельсинкской декларации и Всемирной медицинской ассоциации (2000).

Мышей иммунизировали подкожно двукратно в объеме 0,1 мл разными дозами «исходного» БСА (0,75; 1,8; 3,0 и 12 мкг), БСА I и БСА II (1,2 мкг), добавляя 2 % гидроксида алюминия (Serva) до конечной концентрации 0,02 %, с интервалом в 14 дней. Морфологические изменения в органах мышей изучали после введения различных доз БСА без заражения животных и с предварительной иммунизацией на модели развития генерализованного процесса при заражении в ретроорбитальный синус сублетальной дозой *S. aureus* № 6, равной 0,1 LD<sub>50</sub>, составляющей для *S. aureus* № 6, как выявлено в предварительных экспериментах,  $2 \cdot 10^7$  микробных клеток в 0,1 мл. Контролем служили не иммунизированные БСА животные. На 7–9-е сутки мышей выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Для проведения морфологических исследований забирали селезенку, легкие и правую почку экспериментальных мышей. Парафиновые срезы органов, в том числе серийные срезы почки (с промежутком 200 мкм), окрашивали гематоксилином и эозином. Фотографирование микропрепаратов осуществляли при помощи микроскопа AxioPlan 2 с цифровой системой регистрации и анализа изображения Axio Vision 4.2 (Carl Zeiss, Германия).

На серийных срезах почки проводили морфометрический анализ образовавшихся в органах абсцессов. С этой целью каждый препарат изучали в 4 полях зрения в каждом из 5 последовательных серийных срезов (всего 20 полей зрения). На рис. 1 приведен пример изучения микрофотографий почки не иммунизированной БСА (контрольной) мыши через 7 суток после ее заражения *S. aureus* № 6.

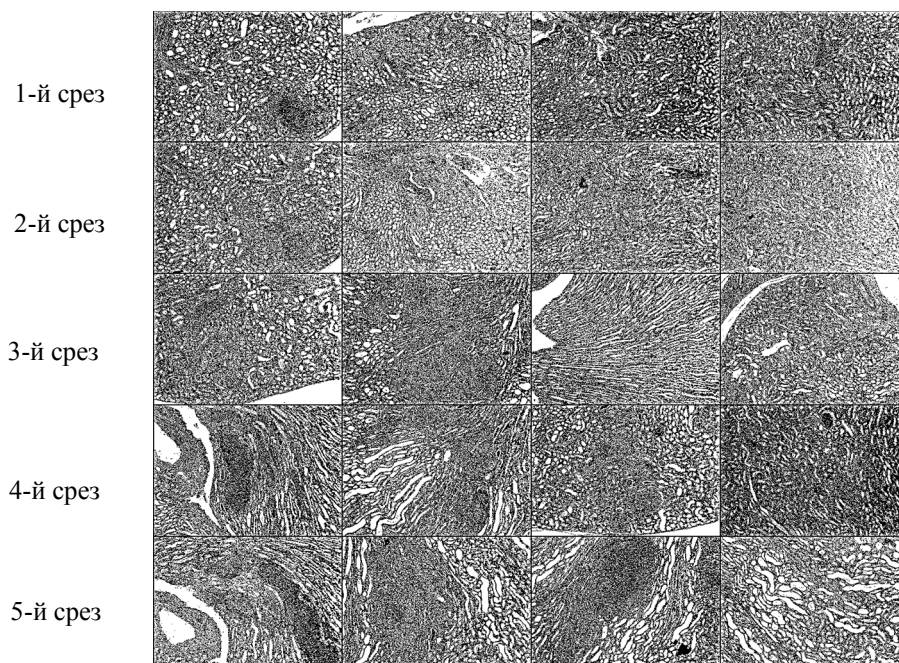


Рис. 1. Микрофотографии почки контрольной (не иммунизированной БСА) мыши через 7 суток после заражения сублетальной дозой *S. aureus* № 6. Окраска гематоксилином и эозином; ув. 100.

Измерения проводили с использованием программы ImageJ при увеличении в 100 раз (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Морфологические изменения в структуре почки описывали с учетом следующих критериев: наличие лейкоцитарной инфильтрации (межканальцевой и периваскулярной), гидрорической дистрофии почечных канальцев, уплощения эпителия канальцев, некроза эпителия канальцев, полнокровия (гиперемии). В каждом исследовании учитывали число выявленных абсцессов в 1 и 20 (суммарно) полях зрения; определяли площади поля зрения и абсцесса, в том числе суммарную площадь выявленных абсцессов во всех полях зрения ( $\text{мкм}^2$ ). Рассчитывали также процент площади почки, поврежденной абсцессами, и процент полей зрения, в которых отмечены абсцессы, от общего количества изученных полей зрения.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ BioStat D и Statistica 8.0 с применением параметрических и непараметрических методов сравнения. Достоверность различий между средними показателями рассматривалась как значимая при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследовали изменения, происходящие в легких, селезенке и почке в результате иммунизации различными дозами «исходного» БСА (0,75; 3; 12 мкг), по сравнению с контролем (неиммунизированными животными).

При минимальной иммунизирующей дозе «исходного» БСА (0,75 мкг) установлено следующее. Структура легкого не изменена, но увеличено количество макрофагов в ме-

жальвеолярных перегородках, в результате чего в некоторых участках отмечено их утолщение. Площадь белой пульпы селезенки расширена за счет увеличения размеров и слияния лимфоидных узелков. Особенно заметно расширение маргинальных зон узелков. В большинстве узелков наблюдаются распространенные реактивные центры. Кровеносные сосуды почки резко расширены, полнокровны, клубочки увеличены, полость капсул сужена.

Иммунизация животных «исходным» БСА в дозе 3,0 мкг приводит к гиперемии ткани легких, полнокровию сосудов как

большого, так и малого круга кровообращения, расширению межальвеолярных перегородок за счет переполнения кровью капилляров и выраженной макрофагальной реакции (рис. 2, а1, а2). В селезенке почти всю площадь органа занимает белая пульпа, границы между нею и красной пульпой нечеткие за счет значительной лимфатизации и плазматизации последней. Красная пульпа, таким образом, оттеснена в субкапсулярную зону, в которой определяются немногочисленные мегакариocyты (рис. 2, б1, б2). В почке наблюдается набухание эпителиальных клеток и сужение просвета канальцев.

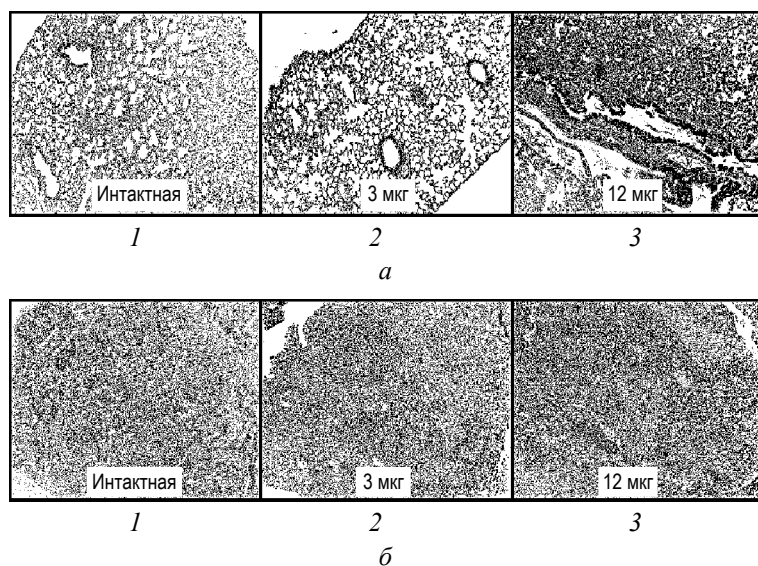


Рис. 2. Морфологические изменения в легком (а) и в селезенке (б) после иммунизации «исходным» БСА в дозах 3 и 12 мкг. Окр. гематоксилином и эозином; ув. 100

При максимальной иммунизирующей дозе 12,0 мкг выявляются наиболее значительные изменения в легких, селезенке и почках. Они проявляются в переполнении кровью артерий и вен, в стазе крови в сосудах микроциркуляторного русла легких, большом количестве гемосидерофагов, многочисленных ателектазах, значительном понижении воздушности органа за счет скоп-

ления макрофагов и лейкоцитов в межальвеолярных перегородках, в появлении небольших периваскулярных лимфоидных скоплений и наличии содержимого в просвете терминальных бронхиол (рис. 2, а1, а3). В селезенке практически вся площадь среза заполнена лимфоидной тканью, красная пульпа имеет вид лишь небольших островков. Однако лимфоидные узелки белой

пулпы разрежены, в них нет четкого разделения на зоны. В лимфоидных узелках и в межузелковых участках обнаруживается большое количество макрофагов и клеток плазмоцитарного ряда на разных стадиях дифференцировки (рис. 2, б1, б3). В почке наблюдаются набухание клеток эпителия канальцев и эндотелия капилляров сосудистых клубочков в почечных тельцах, белковые массы внутри просветов канальцев, гидropическая дистрофия эпителия.

Таким образом, проведенные предварительные исследования показали незначительный уровень иммунной реакции в ответ на введение минимальной дозы (0,75 мкг) «исходного» БСА, развитие определенных морфологических проявлений иммунного ответа при дозе 3,0 мкг и существенные морфологические изменения при иммунизирующей дозе 12,0 мкг. Эти результаты, с одной стороны, позволяют предположить, что доза 3,0 мкг «исходного» БСА может быть перспективной для последующих исследований, а с другой – свидетельствуют о целесообразности дальнейшей очистки «исходного» БСА.

С этой целью была использована ионообменная хроматография: 1-ю фракцию (I БСА) получали на колонке Q-Sepharose, 2-ю фракцию (II БСА) – на колонке DEAE-Sepharose [1]. Было установлено повышение уровня специфических IgG-антител в сыворотках кроликов и мышей, иммунизированных фракциями БСА, в 2,2–7,5 раза по сравнению с контролем и усиление протективной активности в опытах активной защиты мышей (индекс эффективности – 2,63–4,28), что свидетельствовало о влиянии данных БСА на систему адаптивного иммунитета.

Для изучения высеваемости из органов мышей, зараженных *S. aureus*, была отработана модель развития генерализованного

процесса, заключающаяся в близком к внутривенному заражении мышей в ретроорбитальный синус сублетальной дозой, равной 0,1 LD<sub>50</sub> [1]. При этом было отмечено, что иммунизация «исходным» (3,0 мкг) и II БСА снижает высеваемость *S. aureus* из селезенки и почек мышей после их ретроорбитального заражения по сравнению с контролем (неиммунизированными животными) [1].

В исследованиях по конструированию стафилококковых вакцин для определения протективных антигенов ряд авторов, изучавших влияние различных поверхностных железорегулируемых белков и коагулазы, показали целесообразность использования «почечной модели», которая основана на изучении формирования в почке абсцессов [3, 4]. Данную модель использовали при проведении морфологических исследований изменений структуры и изучении влияния секретируемых БСА *S. aureus* № 6 на формирование абсцессов в почке (см. рис. 1).

Изучение морфологических изменений, развивающихся в почках иммунизированных «исходным» БСА мышей после заражения сублетальной дозой *S. aureus* № 6, показало наименьшие изменения при иммунизирующей дозе 3,0 мкг. Они проявлялись в межканальцевой и периваскулярной лейкоцитарной инфильтрации, полнокровии сосудов, отека клубочков, гидropической дистрофии проксимальных канальцев коркового вещества, расширении просветов отдельных канальцев и полостей капсул почечных телец (рис. 3, в).

Более значительные изменения в почечной ткани после заражения *S. aureus* № 6 при предварительной иммунизации отмечены в случаях минимальной (0,75 мкг) и максимальной (12,0 мкг) доз «исходного» БСА. Так, при минимальной дозе, кроме межка-

нальцевой и периваскулярной лейкоцитарной инфильтрации, наблюдаются гиперемия и стаз крови в сосудах, активация мезангиальных клеток в почечных тельцах. Отмечается более выраженная диффузная гидропи-

ческая дистрофия эпителия канальцев. просветы их заполнены белковыми массами, обнаруживаются абсцессы, вокруг которых видны канальцы с некрозом эпителия, заполненные белковыми массами (рис. 3, а, б).

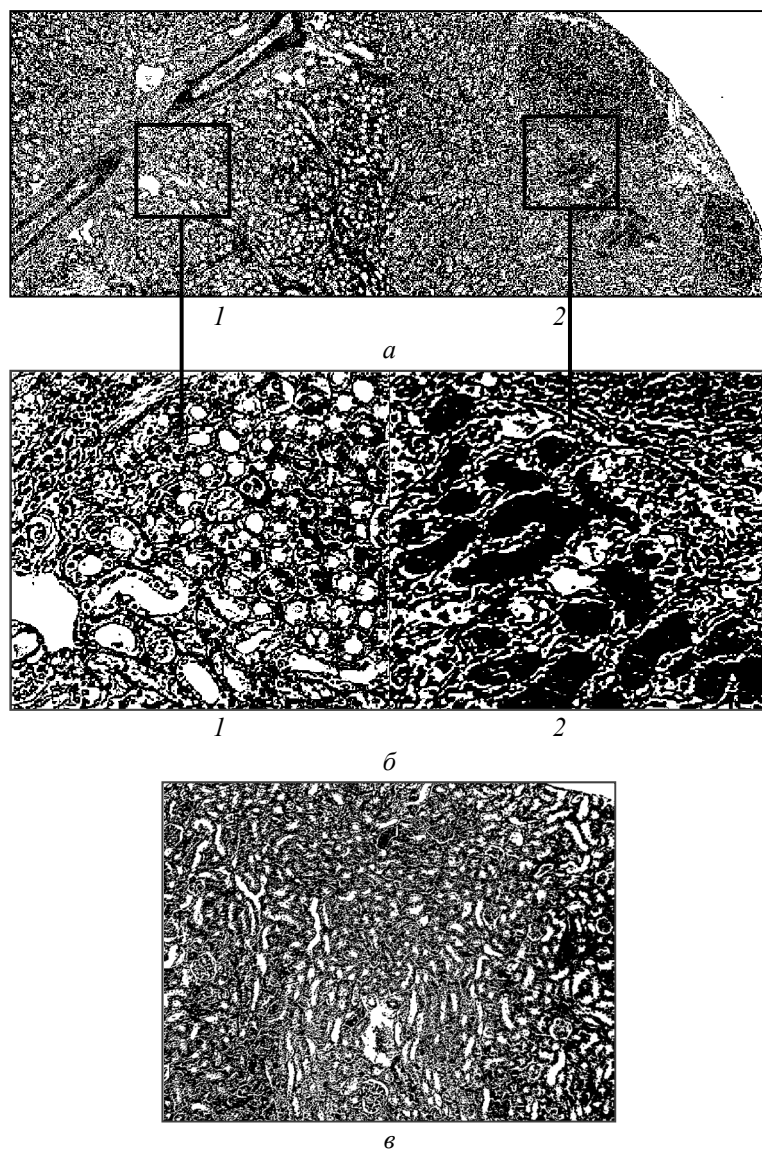


Рис. 3. Морфологические изменения в почках мышей, иммунизированных «исходным» БСА в дозе 0,75 мкг/мл (а, б) и 3,0 мкг (в) через 7 суток после заражения сублетиальной дозой *S. aureus* № 6. Окр. гематоксилином и эозином; а, в – ув. 100; б – ув. 400; 1 – диффузная гидропическая дистрофия канальцев коркового вещества; 2 – канальцы с некрозом эпителия, заполненные белковыми массами; в – полнокровие сосудов, гидропическая дистрофия проксимальных канальцев коркового вещества, расширение просветов отдельных канальцев, изменение формы некоторых сосудистых клубочков

При максимальной дозе иммунизации, помимо изменений, выявленных при других дозах (гиперемия органа, выраженная межканальцевая и периваскулярная лейкоцитарная инфильтрация, гидропическая дистрофия), обнаруживаются лейкоцитарные массы внутри сосудов, отмечается изменение формы почечных телец (неровные контуры). Так же, как и при малой дозе, видны белковые массы в просветах канальцев, вокруг абсцессов – канальцы с некрозом эпителия и белковыми массами в просвете.

В то же время в контроле (зараженные *S. aureus* № 6, не иммунизированные БСА животные), помимо резкого изменения гемодинамики органа (нарушения циркуляции крови в виде гиперемии и стазовых явлений), межканальцевой и периваскулярной лейкоцитарной инфильтрации, гидропической дистрофии, наблюдается атрофия эпителия канальцев коркового вещества и многих почечных телец с уменьшением их размеров, изменением формы и нарушением структуры, вплоть до разрушения некоторых из них (см. рис. 1).

Статистическая обработка данных морфологических изменений в почках мышей (межканальцевая лейкоцитарная инфильт-

рация, гидропическая дистрофия, уплотнение и некроз эпителия канальцев, полнокровие сосудов) после заражения предварительно иммунизированных различными БСА и контрольных (неиммунизированных) животных с использованием критерия согласия Пирсона  $\chi^2$  показала, что количество полей зрения с соответствующими изменениями является информативным показателем. Наиболее выраженные изменения установлены по первым трем показателям (табл. 1). Значимые различия с контролем выявлены при иммунизации «исходным» БСА (1,8 мкг), I и II БСА (по 1,2 мкг), за исключением лишь тенденции к снижению межканальцевой лейкоцитарной инфильтрации при иммунизации «исходным» БСА.

Изучение формирования абсцессов в почке проведено на основании подсчета общего количества абсцессов, выявленных во всех полях зрения ( $A_{\text{сум}}$ ), площади абсцессов ( $SA$ ) и всех изученных полей зрения с последующим расчетом отношения количества полей зрения, в которых выявлены абсцессы, к общему количеству изученных полей зрения (% п/зр с  $A$ ) и процента площади почки, занимаемой абсцессом (% $SA$ ) (табл. 2).

Таблица 1

**Сравнительный анализ морфологических изменений в почках контрольных мышей и животных, иммунизированных тремя видами БСА после ретроорбитального заражения *S. aureus* № 6 (на основании подсчета количества полей зрения с изменениями)**

| БСА                | Общее кол-во п/з  | Межканальцевая лейкоцитарная инфильтрация |              |         | Гидропическая дистрофия |              |         | Уплотненный эпителий канальцев |              |         |
|--------------------|-------------------|-------------------------------------------|--------------|---------|-------------------------|--------------|---------|--------------------------------|--------------|---------|
|                    |                   | п/з с измен.                              | различия с К |         | п/з с измен.            | различия с К |         | п/з с измен.                   | различия с К |         |
|                    |                   | кол-во                                    | $\chi^2$     | $p$     | кол-во                  | $\chi^2$     | $p$     | кол-во                         | $\chi^2$     | $p$     |
| Исходное (1,8 мкг) | 80                | 33                                        | 0,63         | 0,43    | 43*                     | 23,93        | < 0,001 | 19                             | 20,22        | < 0,001 |
| I (1,2 мкг)        | 80                | 27                                        | 3,14         | 0,08    | 47**                    | 18,6         | < 0,001 | 34                             | 4,23         | 0,04    |
| К                  | 80                | 38                                        | –            | –       | 71                      | –            | –       | 47                             | –            | –       |
| II (1,2 мкг)       | 200 <sup>++</sup> | 39                                        | 73,66        | < 0,001 | 89                      | 5,61         | 0,018   | 35                             | 16,93        | < 0,001 |
| К                  | 240 <sup>++</sup> | 144                                       | –            | –       | 134                     | –            | –       | 84                             | –            | –       |

Примечание. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия согласия Пирсона ( $\chi^2$ ) и по  $t$ -критерию Стьюдента (различия с контролем \* –  $t = 3,45$ ,  $p = 0,014$ ; \*\* –  $t = 3,49$ ,  $p = 0,013$ ); \*п/з – поле зрения; \*\* – проанализировано суммарно по двум опытам; К – контроль.



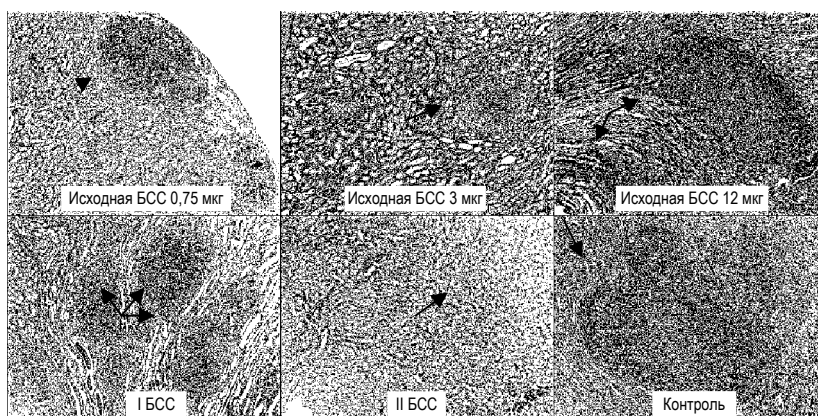
**Морфометрические показатели количества абсцессов в почке мышей после ретроорбитального заражения *S. aureus* № 6 у предварительно иммунизированных тремя видами БСА и контрольных (неиммунизированных) животных**

| № опыта | БСА          |           | Количество             |                               |                           | % полей зрения с абсцессом (% п/зр с А) | Площадь • 10 <sup>4</sup> , мкм <sup>2</sup> |                        | % площади полей зрения с абсцессом (%SA) |
|---------|--------------|-----------|------------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------|
|         | наименование | доза, мкг | изученных полей зрения | выявленных абсцессов суммарно | полей зрения с абсцессами |                                         | изученных полей зрения                       | абсцессы суммарно (SA) |                                          |
| 1       | «Исходное»   | 0,75      | 20                     | 14                            | 8                         | 40,0                                    | 2825                                         | 124,35                 | 4,4                                      |
|         |              | 3,0       | 60                     | 1                             | 1                         | 1,7*                                    | 8475                                         | 7,73                   | 0,09                                     |
|         |              | 12,0      | 60                     | 68                            | 26                        | 43,33                                   | 8475                                         | 659,3                  | 7,78                                     |
|         | Контроль     | –         | 60                     | 21                            | 9                         | 15,0                                    | 8475                                         | 133,22                 | 1,57                                     |
| 2       | «Исходное»   | 1,8       | 80                     | 5                             | 3                         | 3,75**                                  | 11300                                        | 41,52                  | 0,37                                     |
|         |              | I         | 1,2                    | 80                            | 56                        | 28,75                                   | 11300                                        | 601,45                 | 5,32                                     |
|         |              | II        | 1,2                    | 100                           | 0                         | 0***                                    | 14125                                        | 0                      | 0                                        |
|         | Контроль     | –         | 80                     | 16                            | 14                        | 17,5***                                 | 11300                                        | 198,96                 | 1,76                                     |
| 3       | II           | 1,2       | 100                    | 10                            | 4                         | 4,0****                                 | 20149                                        | 16,67                  | 0,08                                     |
|         | Контроль     | –         | 160                    | 49                            | 24                        | 15,0****                                | 32238                                        | 232,37                 | 0,72                                     |

Примечание. По  $\chi^2$  различия с контролем: \*  $\chi^2 = 6,98$ ,  $p = 0,008$ ; \*\*  $\chi^2 = 7,96$ ,  $p = 0,005$ ; \*\*\*  $\chi^2 = 18,98$ ,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $\chi^2 = 7,75$ ,  $p = 0,005$ .

Анализ процесса формирования абсцессов в почке (по результатам трех экспериментов), приведенный в табл. 2, показал, что наименьшее количество абсцессов (1 и 5) выявлено у мышей, иммунизированных

«исходным» БСА в дозе 3,0 и 1,8 мкг и II БСА в дозе 1,2 мкг (0 и 10); при этом у них обнаружена и наименьшая суммарная площадь абсцессов (SA – 7,73; 41,52 и 16,67 • 10<sup>4</sup> мкм<sup>2</sup> соответственно) (рис. 4).



**Рис. 4. Формирование абсцессов (обозначены стрелками) в почках мышей, иммунизированных предварительно различными БСА, в сравнении с контролем (неиммунизированными животными) через 7 суток после заражения сублетальной дозой *S. aureus* № 6. Окр. гематоксилином и эозином; ув. 100**

Однако эти характеристики не дают полного объективного представления, так как при подсчете количества абсцессов в поле зрения не определяется, расположен ли измеряемый абсцесс в одном поле зрения или в нескольких. В связи с этим были введены показатели процента площади полей зрения с выявленными абсцессами по отношению к общей площади изученных полей зрения (% SA) и процента полей зрения с абсцессами по отношению к общему числу изученных полей зрения (% п/зр с А).

Оценка данных показателей подтвердила влияние «исходного» (дозы 3,0 и 1,8 мкг) и II БСА (доза 1,2 мкг) на формирование абсцессов после заражения *S. aureus* № 6 в случаях их предварительного введения: % SA составил соответственно 0,09 (1,57 в контроле), 0,37 (1,76 в контроле) и 0,08, (0,72 в контроле), а % п/зр с А – 1,7; 3,75; 0 и 4,0 соответственно при 15,0–17,5 в контроле. При статистической обработке данных с использованием непараметрического критерия согласия Пирсона  $\chi^2$  (программа Statistica 8.0) установлены значимые различия приведенных показателей с контрольными.

Обращает на себя внимание, что при предварительной иммунизации перед заражением как минимальной (0,75 мкг), так и максимальной (12,0 мкг) дозами «исходного» БСА (при которых выявлены существенные морфологические изменения в легких и селезенке), а также I БСА отмечены более высокие значения изученных показателей. Так, % п/зр с А для «исходного» составил 40,0 и 43,33 при 15,0 % в контроле и для I БСА – 28,75 при 17,5 % в контроле; % SA – 4,4 и 7,78 для «исходного» (1,57 % в контроле) и 5,32 для I БСА (1,76 % в контроле). В то же время в предыдущих работах было выявлено отсут-

ствие значимых различий с контролем в высевах из почки и показана высокая протективная активность в опыте защиты мышей при иммунизации I БСА и «исходным» БСА в дозе 12,0 мкг [2].

Таким образом, комплексный анализ действия предварительной иммунизации секретируемыми стафилококками белоксодержащими антигенами при заражении *S. aureus* № 6 позволил выявить перспективность дальнейшего изучения «исходного» БСА (в дозах 3,0 и 1,8 мкг) и II БСА (в дозе 1,2 мкг). Приведенные сравнительные данные свидетельствуют об адекватности «почечной модели» и целесообразности использования морфологических исследований с предложенными объективными показателями – определением процента площади почки с выявленными абсцессами и процента полей зрения с абсцессами наряду с изучением антигенной и протективной активности секретируемых стафилококковых белоксодержащих антигенов.

Изучение влияния «исходного» БСА на микроструктуру органов мышей при иммунизации в дозе 3,0 мкг не выявило значительных изменений в почках, легких и селезенке животных. При увеличении дозы до 12 мкг отмечены наиболее существенные изменения структуры почки: просветы канальцев заполнены белковыми массами и наблюдалась гидропическая дистрофия эпителия канальцев, которая, однако, не приобретала характера массового поражения всех канальцев почки. Соответствующие результаты были выявлены при анализе препаратов легких и селезенки, где при максимальной иммунизирующей дозе наблюдались выраженные морфологические изменения. Эти результаты подтвердили целесообразность дальнейшего фракционирования «исходного»

БСА, несмотря на установленную ранее его протективную активность [1].

Использование «почечной» модели при генерализованной стафилококковой инфекции позволило провести изучение морфологических изменений почек мышей, предварительно иммунизированных «исходным» БСА и выделенными из него фракциями I и II БСА после заражения *S. aureus*. Анализ показал, что в целом структура почки не нарушалась – в органе четко определялись корковое вещество с почечными тельцами, проксимальными и дистальными канальцами, мозговое вещество, система кровеносных сосудов, осуществляющих кровоснабжение корковых и юкстамедуллярных нефронов, хорошо выявлялся сосочек и почечная лоханка. Наблюдалась лейкоцитарная инфильтрация стромы различной степени выраженности, наиболее значительная в почках контрольных (неиммунизированных) мышей. При иммунизации II БСА было установлено значимое снижение межканальцевой и периваскулярной лейкоцитарной инфильтрации.

В почках контрольных мышей выявлены также изменения, специфичные для поражения стафилококковой инфекцией, некротический папиллит, значительно чаще, чем при предварительном введении БСА, наблюдались уплощение эпителия канальцев и гиперемия органа.

Известно, что бактериальные токсины являются одной из причин развития гидропической дистрофии эпителия, которая резко снижает функцию органов и тканей и со временем может привести к фокальному колликвационному некрозу клеток [4]. Анализ морфологических изменений в почке экспериментальных мышей показал, что при предварительной иммунизации БСА досто-

верно снижается процент полей зрения с повреждениями эпителия почечных канальцев гидропической дистрофией после заражения *S. aureus*.

Изучение формирования абсцессов в почке с использованием предложенных объективных показателей – определение процента площади почки, поврежденной абсцессами, и процента полей зрения с абсцессами – выявило способность «исходного» (3,0 и 1,8 мкг) и II БСА (1,2 мкг) снижать эти показатели, что согласуется с результатами степени высеваемости стафилококка из почки.

## Выводы

Таким образом, комплексное исследование влияния секретируемых *S. aureus* белоксодержащих антигенов на параметры адаптивного иммунитета, включающее изучение антигенной и протективной активности, морфологических изменений в органах, использование разработанной «почечной» модели при генерализованной стафилококковой инфекции с предложенными показателями процесса формирования абсцессов и параллельным анализом высеваемости из органов является информативным и адекватным. В то же время секретируемые белоксодержащие антигены – «исходный» и II БСА – могут быть перспективными препаратами для дальнейшего исследования и использования при разработке противостафилококковых вакцин.

## Библиографический список

1. Грубер И.М., Асташкина Е.А., Лебединская О.В., Егорова Н.Б., Киселевский М.В., Доненко Ф.В., Ястребова Н.Е., Игнатова О.М., Курбатова Е.А., Черкасова Л.С. Иммуноген-

ная активность секретируемых белоксодержащих соединений *Staphylococcus aureus* № 6. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2015; 14 (4): 86–93.

2. Грубер И.М., Егорова Н.Б., Михайлова Н.А., Черкасова Л.С., Тарасова О.Е., Асташкина Е.А., Игнатова О.М., Курбатова Е.А. Исследование протективной активности стафилококковой вакцины «Стафиловак-2». Журнал микробиологии 2014; 6: 54–58.

3. Сергиенко А.В. Поиск и изучение лекарственных средств, влияющих на воспалительный процесс: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М. 2006; 39.

4. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия М.: Медицина 1985; 28.

5. Cheng A.G., McAdow M., Kim H.K., Bae T. et al. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. PLoS Pathog 2010; 6(8): e1001036. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001036

6. Kim H.K., DeDent A., Cheng A.G., McAdow M. et al. IsdA and IsdB antibodies protect mice against *Staphylococcus aureus* abscess formation and lethal challenge. Vaccine 2010; 28: 6382–6392.

Материал поступил в редакцию 25.12.2016