

И.М.Грубер, Н.Б.Егорова, Е.А.Асташкина, Н.К.Ахматова, Е.А.Курбатова, Л.С.Черкасова, О.М.Кукина

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ АНТИГЕНОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Сравнительный анализ иммунобиологических свойств поверхностных антигенов клеточной стенки и внеклеточных белоксодержащих антигенов *Staphylococcus aureus*. *Материалы и методы.* Препараты: поверхностные антигены клеточной стенки (пептидогликан, тейхоевые кислоты, белковые антигены) штаммов *S. aureus*, входящие в стафилококковую вакцину «Стафиловак» (СВ) и внеклеточные белоксодержащие антигены *S. aureus* (ЭБСП). Показатели врожденного иммунитета оценивали по влиянию препаратов на иммунофенотип мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) селезенки мышей, экспрессию Toll-подобных рецепторов (с помощью проточной цитометрии), фагоцитарную активность макрофагов перитонеального экссудата мышей при введении СВ и ЭБСП; протективную активность препаратов изучали в экспериментах активной защиты мышей линии BALB/c. *Результаты.* Для выделения ЭБСП использовали вирулентный штамм *S. aureus* №6, а для получения поверхностных антигенов клеточной стенки отобрано 4 штамма, из которых наиболее иммуногенным и являлся слабовирулентный штамм *S. aureus* №1991. Оба препарата увеличивали количество TLR2 и МНС II экспрессирующих клеток; введение СВ вызывало нарастание численности клеток с маркером CD25, отражающим раннюю активацию иммунокомпетентных клеток, а иммунизация ЭБСП приводила к более кратковременной экспрессии этого маркера. С другой стороны, повышенное количество CD19 позитивных клеток выявлялось более длительно при иммунизации ЭБСП. Установлена наиболее продолжительная активация фагоцитоза под действием СВ. Отмечена высокая протективная активность обоих типов изучаемых препаратов. *Заключение.* Антигены клеточной стенки и внеклеточные экспериментальные белоксодержащие препараты сопоставимы по иммунобиологическим свойствам, однако поверхностные антигены в большей степени активируют врожденный иммунитет, а внеклеточные — адаптивный иммунитет.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 29—36

Ключевые слова: стафилококковая вакцина, «Стафиловак», внеклеточные экспериментальные белоксодержащие препараты — ЭБСП, эфффекторы врожденного и адаптивного иммунитета

I.M.Gruber, N.B.Egorova, E.A.Astashkina, N.K.Akhmatova, E.A. Kurbatova, L.S.Cherkasova, O.M.Kukina

IMMUNOGENIC PROPERTIES OF CELLULAR AND EXTRACELLULAR PROTEIN-CONTAINING ANTIGENS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Comparative study of immunobiological properties of cell wall surface antigens and extracellular protein-containing antigens of *Staphylococcus aureus*. *Materials and methods.* Preparations: surface antigens of the cell wall (peptidoglycan, teichoic acids, protein antigens) of the strains of *S. aureus* containing in the staphylococcal vaccine «Staphylovac» (SV) and extracellular protein-containing antigens of *S. aureus* (EPCA). The parameters of innate immunity were evaluated by the effect of preparations on the immunophenotype of mononuclear leukocytes (ML) of the spleen of mice, expression of Toll-like receptors (using flow cytometry), phagocytic activity of macrophages of peritoneal exudate of mice after the introduction of SV and EPCA; the protective activity of preparations was studied in experiments of active protection of BALB/c mice. *Results.* To isolate EPCA, we used the virulent strain of *S. aureus* №6, and for obtaining surface antigens of the cell wall, 4 strains were selected, the most immunogenic of which was the low virulent strain of *S. aureus* №1991. Both preparations increased the number of TLR2 and MHC II expressing cells; CV administration caused an increase in the number of cells with CD25 marker, reflecting the early activation of immunocompetent cells, and EPCA immunization — led to a shorter expression of this marker. On the other hand, an increased number of CD19 positive cells were detected for a longer period of time during EPCA immunization. The longest activation of phagocytosis under the action of SV was established. High protective activity of both types of the studied preparations was noted. *Conclusion.* The antigens of the cell wall and extracellular pro-

tein-containing experimental drugs possessed comparable immunological properties, however, the surface antigens to a greater extent activate innate immunity, and extracellular — adaptive immunity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 29—36

Key words: staphylococcal vaccine, «Staphylovac», extracellular experimental protein containing preparations — EBSP, effectors of innate and adaptive immunity

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания, вызываемые *Staphylococcus aureus*, в настоящее время являются одной из важнейших проблем здравоохранения всего мира; они разнообразны по формам и включают поражения кожи и мягких тканей, инвазивные инфекции. *S. aureus* — оппортунистический бактериальный патоген, часто являющийся причиной инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) и внебольничных инфекций (ВИ), включающих бактериемию, эндокардит, остеомиелит, септический артрит и пневмонию. Повсеместное увеличение распространения заболеваний стафилококковой этиологии в последние годы [4] сопровождается увеличением резистентности возбудителей к антибиотикам. Кроме того, многие антибиотики, обладая иммуносупрессивными свойствами, снижают защитные силы организма. Трудность терапии определяют необходимость профилактики и комплексного лечения стафилококковой инфекции, включающего использование антибактериальных и иммунобиологических препаратов, активирующих иммунную систему [9]. Разработка стафилококковых вакцин велась по нескольким направлениям: наиболее подробно изучали вакцины, приготовленные из микробных клеток; в течение длительного времени использовали анатоксины. При клинических исследованиях эффективность большинства разрабатываемых в последние годы препаратов не была подтверждена, поэтому в настоящее время отсутствуют коммерческие противостафилококковые иммунопрепараты с эффективностью, подтвержденной клиническими испытаниями [13].

В НИИВС им. И.И. Мечникова коллективом авторов под руководством Н.Б. Егоровой разработана стафилококковая вакцина «Стафиловак» на основе комплекса поверхностных антигенов клеточной стенки (пептидогликан, тейхоевые кислоты, белковые антигены клеточной стенки) из иммуногенных штаммов *S. aureus*, обладающих внутривидовой перекрестной протективной активностью. В клинических исследованиях при включении в комплексную терапию хронических стафилококковых инфекций она оказывала длительный терапевтический эффект [5]. В настоящее время в вакцине расширен штаммовый состав, разработана промышленная технология получения препарата и завершены доклинические исследования.

В последние годы при разработке противостафилококковых вакцин внимание исследователей привлекает другое направление, связанное с использованием конструкций, в которых участвуют экзопротеины — поверхностные и/или непосредственно секретлируемые в питательную среду факторы вирулентности [10, 13, 14]. Число этих факторов более 30 и по механизму действия они группируются как поверхностные белки, ответственные за адгезию и колонизацию тканей хозяина и за распространение в тканях, подавляющие фагоцитоз и поддерживающие жизнеспособность фагоцитов, способствующие уходу от иммунного ответа хозяина и модулирующие иммунный ответ, а также детерминанты присущей и приобретенной резистентности к антибиотикам.

Исследования, проводимые в настоящее время, касаются, в основном, создания и испытания 2 типов вакцин: предупреждающих колонизацию и индуцирующих адаптивный иммунный ответ [11]. В последние годы до I фазы клинических испытаний успешно дошли 3 вакцины — «Стафиловак» (на основе комплекса поверхностных антигенов клеточной стенки), PentaStaph (на основе капсульных полисахаридов (КП) 5 и 8 типов, нетоксичной формы альфа-токсина, лейкоцидина Пантона-Валентайна — PVL и тейхоевых кислот) и NDV-3 (содержащая хлопьеобразующий фактор адгезии — ClfA), у которой завершена I фаза клинических исследований [3, 13]. К 2016 г. на I фазе клинических испытаний находились 2 токсоидные вакцины —

мультивалентная и рекомбинантная детоксицированная SEB вакцина; II фазу клинических испытаний проходят 2 вакцины: четырехкомпонентная вакцина (GSK, Бельгия), содержащая КП5 и КП8, конъюгированные со столбнячным токсидом, мутантные формы α -токсина и ClfA, и комплексная вакцина SA4Ag (Pfizer, США) на основе ClfA, металл-связывающего компонента MntC, КП 5 и 8, представляющаяся (на данный момент) наиболее перспективной [12].

В НИИВС им. И.И. Мечникова исследования проводятся в двух направлениях: как отмечено выше, они касаются поверхностных антигенов клеточной стенки, входящих в «Стафиловак», и внеклеточных белоксодержащих антигенов *S. aureus*.

Цель исследования: сравнительный анализ иммунобиологических свойств поверхностных антигенов клеточной стенки и внеклеточных белоксодержащих антигенов *S. aureus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено изучение двух типов препаратов: стафилококковой вакцины «Стафиловак», содержащей в своем составе поверхностные антигены клеточной стенки (пептидогликан, тейхоевые кислоты, белковые антигены) 4 штаммов *Staphylococcus aureus* №№5,9,1986,1991, полученных с использованием шадящих методов выделения, позволяющих сохранить их структуру и, соответственно, активность; внеклеточных белоксодержащих антигенов *S. aureus* (экспериментальных белоксодержащих препаратов — ЭБСП), выделенных методом ионно-обменной хроматографии из фильтрата культуральной жидкости, полученной после динамического периодического культивирования *S. aureus* №6 в полусинтетической среде до конца фазы экспоненциального роста [1].

Показатели врожденного и адаптивного иммунитета оценивали по влиянию препаратов на иммунофенотип мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) селезенки мышей и экспрессию Toll-подобных рецепторов методом проточной цитометрии на приборе Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, США) с применением моноклональных антител (МКА) (eBiosciences, США), меченных флуорохромом, к определяемому маркеру. Мышей линии BALB/c иммунизировали внутрибрюшинно трехкратно 200 мкг СВ или двукратно 1,2 мкг ЭБСП. Учет результатов проводили через 7 суток после иммунизаций.

Фагоцитарную активность макрофагов перитонеального экссудата мышей (СВА, 10-12 мг) изучали через 1 и 7 суток после внутрибрюшинного введения СВ и ЭБСП. Фагоцитарную активность клеток оценивали по поглотительной способности *S. aureus* 1991 в мазках, сделанных после 30- и 60-минутной инкубации при расчете показателей: фагоцитарного индекса (ФИ) — процента клеток, вступивших в фагоцитоз, фагоцитарного числа (ФЧ) — среднего числа бактерий, находящихся внутриклеточно (частное от деления общего числа поглощенных бактерий на число клеток, вступивших в фагоцитоз) и индекса бактерицидности фагоцитов (ИБФ) — отношения числа убитых внутри фагоцитов микробов к общему числу поглощенных фагоцитами микробов в %.

Протективную активность препаратов изучали в экспериментах активной защиты мышей линии BALB/c (самцов) массой 12-14 г при разных способах иммунизации и заражения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в процессе разработки стафилококковой вакцины при исследовании штаммов-продуцентов протективных антигенов была изучена биологическая активность 16 свежевыделенных, музейных и производственных штаммов *S. aureus* [7]. При этом была установлена их вариабельность и отсутствие корреляции между иммуногенностью штаммов и их вирулентностью и сенсибилизирующими свойствами. Наиболее иммуногенным при выделении поверхностных антигенов клеточной стенки оказался менее вирулентный шт. №1991 (табл. 1). Была выявлена его способность стимулировать систему врожденного иммунитета, т.к. уже через сутки после однократной имму-

Таблица 1. Характеристика иммуногенной активности штаммов *S. aureus*, используемых при разработке протективных стафилококковых препаратов на основе антигенов клеточной стенки (СВ) и экспериментальных внеклеточных белоксодержащих антигенов (ЭБСП)

Иммунизирующий препарат из штаммов <i>S. aureus</i>			Заражающий шт., №	Протективная активность	
Препарат	№ штамма	Вирулентность LD ₅₀ x 10 ⁹ м.к.		Число выживших мышей/всего заражено	% выживших мышей
Поверхностные антигены клеточной стенки	6	0,1	6	1/24	4
	1986	0,18	1986	18/45	40
	1991	1,0	6	13/20	65
	1991	1,0	1986	23/45	51
	Смесь шт. 5,9,1986,1991	-	1986	22/45	48,9
	Контроль	-	6	0/25	0
Внеклеточные белоксодержащие антигены	1991	>1,0	1986	5/10	50
			6	1/10	10
	6	0,18	1986	7/10	70
			6	8/10	80
	Контроль	-	1986	0/10	0
			6	0/10	0

Примечание: Контроль — интактным мышам вводили 0,9% раствор натрия хлорида.

низации выживало более 50% мышей, зараженных вирулентными штаммами №№ 6 и 1986. А препарат из клеточных стенок, полученный из наиболее вирулентного шт. №6, практически не обладал протективной активностью и перекрестной протективной активностью к различным условно патогенным микроорганизмам [8]. Использование шадящего метода выделения поверхностных антигенов клеточной стенки (инактивация диметилкетонном, водная экстракция) обеспечило сохранение иммуногенности [6]. Полученный препарат стафилококковой вакцины (СВ) обладал протективной активностью при невысоких показателях токсичности и сенсибилизирующих свойств. Разработанная в НИИВС им. И.И. Мечникова сухая стафилококковая бесклеточная вакцина [6], приготовленная из комплекса поверхностных антигенов клеточной стенки (пептидогликан, тейхоевые кислоты, белковые антигены клеточной стенки) 4 штаммов *S. aureus* №№5,9,1986,1991, была разрешена к применению в медицинской практике еще в 1996 г. (Приказ МЗ РФ 3144/53 от 10.04.1996), однако ее производственный выпуск не был налажен. Вместе с тем, клинические исследования, проведенные на разных базах, показали, что включение данной вакцины в комплексную терапию хронических стафилококковых инфекций оказывает длительный терапевтический эффект: она снижала тяжесть обострений, удлиняла период ремиссии, сокращала потребность антибиотикотерапии, способствовала индукции интерферона и антител [5]. Предложенная вакцина в настоящее время усовершенствована: разработана промышленная технология получения препарата, включающая осуществление реакторного культивирования продуцентов в полусинтетической питательной среде, изменение фазы роста микроба и методов выделения антигенных препаратов, что потребовало изучения ее иммунобиологических свойств. В доклинических исследованиях серий вакцины было установлено, что препарат обладает антигенными и протективными свойствами, не токсичен, не обладает аллергизирующим действием, тератогенностью и мутагенностью, не пирогенен, не иммуноотоксичен *in vitro* и *in vivo*.

При определении штамма *S. aureus* — продуцента внеклеточных белоксодержащих антигенов из охарактеризованных имеющихся в коллекции лаборатории, была изучена протективная активность антигенов из двух штаммов, «оппозитных» по вирулентности при внутрибрюшинном заражении: слабовирулентного вакцинного штамма №1991 (LD₅₀ = (0,5-2,0)x10⁹ м.к.); высоковирулентного штамма №6 (LD₅₀ = (0,04-1,9)x10⁸ м.к.).

Полученные в этих опытах результаты оценки протективной активности стафилококковой вакцины и внеклеточных экспериментальных белоксодержащих препаратов, приготовленных из высоко- и слабовирулентных штаммов, представлены в табл. 1. Установлено, что препарат поверхностных антигенов клеточной стенки из наиболее вирулентного штамма №6 оказался практически неэффективным. В то же время, при двукратной иммунизации мышей внеклеточными белоксодержащими антигенами в дозе 1,0 мкг белка, полученными по разработанной технологии [2], из иммуногенного слабо вирулентного шт. №1991 и вирулентного шт. №6, отмечена большая выживаемость мышей, иммунизированных препаратом из вирулентного шт. №6, при заражении 2,2 LD₅₀ штаммов №№1986 и 6 (что составило, соответственно, 2,5x10⁹ и 0,4x10⁹ м.к.). Эти результаты явились предпосылкой для последующего использования штамма *S. aureus* №6 при получении ЭБСП.

Внеклеточные ЭБСП выделяли из фильтрата культуральной жидкости, полученной после динамического периодического культивирования *S. aureus* №6 в полусинтетической среде до конца фазы экспоненциального роста [1]. Наиболее очищенная фракция, при изучении электрофоретической подвижности которой показано присутствие одной полосы в области 90-100 кДа, четырех отдельных полос в области 31-60 кДа и одной четкой полосы в области 24 кДа, содержит 31,2±18,1 мкг/мл белка, 9,5±3,1 мкг/мл углеводов и 7,0±2,5 мкг/мл нуклеиновых кислот. В этой фракции установлено присутствие факторов патогенности: хлопьеобразующие факторы А и В, препятствующие эффективному фагоцитозу, и стрессовый белок супероксиддисмутаза, защищающая бактерию от окислительного стресса.

Сравнительные данные анализа действия «Стафиловак» и внеклеточных белоксодержащих антигенов при иммунизации мышей линии BALB/c на показатели врожденного и адаптивного иммунитета приведены в табл. 2. Установлено, что СВ после одно- и трехкратной иммунизации более существенно активизирует CD16/32, NKT, CD25, МНС II и TLR2 экспрессирующие клетки, также после третьей иммунизации выявлена активность В-лимфоцитов (CD19) и Т-regs; ЭБСП после первой и второй иммунизации повышает количество клеток с маркерами CD19, МНС II и TLR2, после первой иммунизации — только численность NKT, CD25 и TLR4.

Таблица 2. Действие вакцины «Стафиловак» (СВ) и внеклеточного белоксодержащего антигена (ЭБСП) после иммунизации мышей на показатели врожденного и адаптивного иммунитета (иммунофенотип МЛ селезенки и Toll-подобные рецепторы)

Показатель	СВ (% клеток, М±SD)				ЭБСП (% клеток, М±SD)			
	7сут после 1 иммунизации		7сут после 3 иммунизации		7сут после 1 иммунизации		7сут после 2 иммунизации	
	СВ	К	СВ	К	ЭБСП	К	ЭБСП	К
CD16/32	18,2 ±1.5*	10,7 ±0.9	17,2 ±1.7*	10,7 ±0.9	13,1 ±2.1	10,7 ±0.9	13,7 ±1.6	9,3 ±0.8
NKT	4,8 ±0,6*	1,1 ±0.3	6,8 ±0.7*	1,1 ±0.3	3,4 ±0.2*	1,1 ±0.3	2,5 ±0.4	1,2 ±0.5
CD25	13,6 ±1.5*	8,6 ±0.6	15,6 ±2.4*	8,6 ±0.6	14,5 ±1.5*	8,6 ±0.6	12,7 ±0.6	8,2 ±0.4
T-reg	2,2 ±0.5	2,7 ±0.4	5,2 ±0.7*	2,7 ±0.4	3,3 ±0.4	2,7 ±0.4	3,9 ±0.4	2,2 ±0.5
CD19	11,9 ±1.3	9 ±0.4	15,4 ±1.5*	9 ±0.4	18,1 ±2.1*	9 ±0.4	17,5 ±1,7*	9,6 ±0.5
МНС II	46,2 ±4.4*	23,4 ±2.7	55,2 ±4.8*	23,4 ±2.7	54,9 ±4.7*	23,4 ±2.7	48,1 ±3,2*	21,8 ±2,9
TLR2	14,3 ±1.5*	7,1 ±0.6	12,3 ±1,3*	7,1 ±0.6	12,8 ±0.9*	7,1 ±0.6	13,8 ±1,5*	6,1 ±0.7
TLR4	6,1 ±0.6	6,4 ±0.5	6,6 ±0,7	6,4 ±0.5	4,6 ±0.4	6,4 ±0.5	5,4 ±0,6*	2,4 ±0.6

Примечание: *p<0,05 — достоверность различий по критерию Стьюдента и Вилкоксона; показатели CD3, CD4, CD8a и γDT — без динамики при использовании обоих препаратов.

При изучении фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей в ответ на однократное введение препаратов более высокая активность установлена при введении СВ. Так, при введении СВ отмечены наиболее высокие значения фагоцитарного индекса (ФИ) как через 1сутки после иммунизации ($84,3 \pm 4,2$), так и через 7суток ($88,4 \pm 3,9$) при $60,2 \pm 3,1$ в контроле; фагоцитарное число (ФЧ) максимально нарастало через 7 суток ($7,2 \pm 0,7$) при $5,1 \pm 0,4$ — в контроле; индекс бактерицидности фагоцитов (ИБФ) повышался через 1 сутки $-77,3 \pm 2,7$ при $57,3 \pm 3,7$ — в контроле; при введении ЭБСП отмечено значимое увеличение только ФЧ через 7 суток после иммунизации — $6,8 \pm 0,4$ при $5,3 \pm 0,6$ в контроле.

Таким образом, наиболее длительная активация фагоцитоза отмечается под действием СВ, в то время как ЭБСП показывает более кратковременное и позднее стимулирующее действие на фагоцитоз.

Изучение протективной активности двух типов изучаемых препаратов — вакцины «Стафиловак», приготовленной по усовершенствованной технологии, и внеклеточных экспериментальных белоксодержащих препаратов в опытах активной защиты показало их сравнимость (табл. 3). Остановившись на протективной активности вакцины «Стафиловак», которую изучали при шестикратной иммунизации (3 п/к и 3 в/бр) в разовой дозе 500 мкг следует отметить, что как у экспериментальной серии СВ, при в/бр заражении беспородных мышей высоковирулентным штаммом *S. aureus* № 6, так и у двух производственных серий при заражении мышей линии BALB/c менее вирулентным штаммом *S. aureus* № 1986 отмечены высокие индексы эффективности: соответственно, ИЭ 11,0 — 2,45 — 2,63.

Протективный эффект внеклеточных экспериментальных белоксодержащих препаратов изучали при двукратной п/к иммунизации в дозе 1,2 мкг белка и заражении мышей линии BALB/c высоковирулентным штаммом *S. aureus* № 6 в ретроорбитальный синус (этот путь заражения близок к внутривенному), что может привести к развитию инфекционного процесса в течение как минимум 10 суток, а не только к интоксикации на 3-5 сутки. Полученные результаты свидетельствуют о высокой протективной активности ЭБСП: ИЭ у двух серий 4,28 и 4,25.

Следует отметить, что как СВ, так и ЭБСП: повышали уровень специфических IgG в сыворотках иммунизированных животных, соответственно, в 2,6-3,0 и 2,2-2,5 раза; обладали протективной активностью, установленной также в опытах пассивной защиты мышей: кроличьи и мышьиные сыворотки от животных, иммунизированных СВ, защищали, соответственно, 100 и 70% мышей, зараженных 10^9 м.к. *S. aureus* 1986, а иммунизированных ЭБСП защищали до 70% мышей, зараженных $2,5 \times 10^7$ м.к. *S. aureus* 6; оба препарата снижали высеваемость *S. aureus* из крови, селезенки и почек иммунизированных мышей, что было показано на разработанной модели генерализованной стафилококковой инфекции [1].

Проведенные исследования подтвердили полученные ранее данные о том, что если при выделении поверхностных антигенов клеточной стенки наиболее иммуногенным оказался менее вирулентный шт. *S. aureus* №1991, то поверхностные антигены, выделенные из самого вирулентного из изученных шт. №6, были не способны защитить от заражения даже гомологичным штаммом. В то же время, при выделении внеклеточных белоксодержащих антигенов именно этот вирулентный штамм *S. aureus* №6 оказался наиболее перспективным.

При изучении влияния на показатели врожденного и адаптивного иммунитета установлено, что оба препарата вызывали повышение численности TLR2 экспрессирующих клеток (что свидетельствует о наличии в антигенных препаратах патоген-ассоциированных молекулярных структур — PAMP) и клеток с молекулами антигенного представления MHC II (поздний маркер активации клеток). При этом введение СВ вызывало и после 1, и после 3 иммунизации повышение количества клеток с маркером CD25, отражающим раннюю активацию иммунокомпетентных клеток, а иммунизация ЭБСП приводила к более кратковременному повышению числа этих клеток. С другой стороны, выявлялось более продолжительное нарастание количества В-лимфоцитов (CD19) при иммунизации ЭБСП. Также установлено, что наиболее длительная активация фагоцитоза отмечается под действием СВ, в то время как ЭБСП показывает более кратковременное и позднее стимулирующее действие на фагоцитоз.

Таблица 3. Протективная активность вакцины «Стафиловак» (СВ) и внеклеточных экспериментальных белоксодержащих препаратов (ЭБСП) при разных способах заражения

№ п/п	Иммунизирующий препарат			Заражающий штамм <i>S.aureus</i> , способ заражения			Эффект (пало/ всего заражено мышей)	По сравнению с контролем	LD ₅₀ x 10 ⁸	ИЭ
	название, серия	кратность, способ	разовая доза	№	в/бр, р/о	доза x10 ⁸ м.к.				
1*	СВ эксп	3п/к+3в/бр	500 мкг	6	в/бр	0,4	1/10	$\chi^2=15,1$ p=0,001	2,75	11,0
						2,0	4/10			
						10,0	8/10			
						0,4	8/10			
						2,0	10/10			
						10,0	10/10			
2	СВ с.2 (произ- водст)	3п/к+3в/бр	500 мкг	1986	в/бр	1,25	0/10	$\chi^2=9,3$ p= 0,002	2,87	2,45
						2,5	4/10			
						5,0	9/10			
						10,0	10/10			
						1,25	0/10			
						2,5	5/10			
	СВ с.3 (произ- водст)	-	-	-	-	1,25	0/10	$\chi^2=10,6$ p=0,001	3,08	2,63
						2,5	5/10			
						5,0	8/10			
						10,0	9/10			
						1,25	8/10			
						2,5	9/10			
К	-	-	-	-	5,0	9/10	1,17			
					10,0	10/10				
					0,4	4/10				
					2,0	6/10				
					10,0	10/10				
					0,4	4/10				
3	ЭБСП с.1	2п/к	1,2 мкг белка	6	р/о	0,4	0/10	$\chi^2=5,41$ p<0,05	3,81	4,28
						2,0	2/10			
						10,0	9/10			
						0,4	4/10			
						2,0	6/10			
						10,0	10/10			
4	ЭБСП с.2	2п/к	1,2 мкг белка	-	-	0,4	0/10	$\chi^2=5,55$ p=0,018	6,17	4,25
						2,0	1/10			
						10,0	7/10			
						0,4	2/10			
						2,0	5/10			
						10,0	10/10			
К	-	-	-	-	-	0,4	2/10	1,45		
						2,0	5/10			
						10,0	10/10			
						0,4	2/10			
						2,0	5/10			
						10,0	10/10			

Примечание. * Исследование №1 проведено на беспородных мышах. Контроль — интактным мышам вводили 0,9% раствор натрия хлорида; п/к — подкожно, в/бр — внутрибрюшинно, р/о — в ретроорбитальный синус; СВ эксп — экспериментальная серия «Стафиловак»; СВ с.2 и с.3 — производственные серии СВ, изученные в процессе доклинических исследований; ИЭ — отношение LD₅₀ иммунизированных мышей к LD₅₀ контрольных (неиммунизированных).

Совокупность полученных результатов свидетельствует, что два типа антигенных препаратов — вакцина «Стафиловак» на основе антигенов клеточной стенки и внеклеточные экспериментальные белоксодержащие препараты сопоставимы по иммунобиологическим свойствам и активируют эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета. Анализ данных показывает, что вакцина «Стафиловак» обладает наиболее стимулирующим влиянием на дифференцировку лимфоцитов, чем ЭБСП. Но при этом ЭБСП демонстрирует активирующее влияние на клетки более продолжительное время, в особенности на В-лимфоциты, по сравнению со «Стафиловак», являющиеся продуцентами антител. Это позволяет считать, что экспериментальные белоксодержащие препараты более интенсивно действуют на адаптивный иммунитет. «Стафиловак», напротив, является стимулятором врожденного иммунитета, так

как в большей мере индуцирует фагоцитарную активность макрофагов и нарастание численности клеток-эффекторов, отвечающих за врожденные иммунные реакции. Возможно, что суммирование действия этих антигенов стафилококка позволит повысить эффект лечебного и профилактического действия каждого антигена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асташкина Е.А. Внеклеточные белоксодержащие антигены *Staphylococcus aureus* и их иммунобиологические свойства. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 2017.
2. Грубер И.М., Доненко Ф.В., Асташкина Е.А., Игнатова О.М., Егорова Н.Б., Ванеева Н.П., Черкасова Л.С., Тарасова О.Е., Киселевский М.В. Способ получения протективной белоксодержащей фракции бактерий. Патент РФ на изобретение № 2533815 от 20.11.2014.
3. Грубер И.М., Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Михайлова Н.А. Стратегия разработки противостафилококковых иммунопрофилактических и иммунотерапевтических препаратов. Эпидемиол. и инфекцион. болезни. Актуальные вопросы. 2013; 4: 31-38.
4. Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В. и др. Этиология инфекционного эндокардита в России. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2015; 17(1): 4-10.
5. Егорова Н.Б., Ефремова В.Н., Курбатова Е.А., Грубер И.М. Экспериментальная и клинико-иммунологическая оценка бесклеточной стафилококковой вакцины «Стафиловак». Журн. микробиол. 2008; 6: 102-108.
6. Ефремова В.Н., Егорова Н.Б., Масюкова С.А. Бесклеточная антистафилококковая вакцина для лечения хронической стафилококковой инфекции. Патент РФ на изобретение № 2122862 от 10.12.1998.
7. Корзя Л.И. Исследование иммунологических свойств комплекса водорастворимых антигенов, полученного из разных штаммов стафилококка. Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 1982.
8. Курбатова Е.А. Разработка поликомпонентной вакцины из антигенов условно-патогенных микроорганизмов (экспериментальное и клинико-иммунологическое исследование). Дис. докт. мед. наук. М., 1997.
9. Хайтов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология: Учебник. М., Медицина, 2010.
10. Burlak C., Hammer C.H., Robinson M.A. et al. Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. Cell Microbiol. 2007; 9: 1172-1190.
11. Daum R.S. *Staphylococcus aureus* vaccines. Руководство «Vaccines». S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, P.A. Offit. Vaccines, Saunders Elsevier, 2008.
12. Mohamed N., Wang M.Y. et al. Vaccine development to prevent *Staphylococcus aureus* surgical-site infections. British J. of Surgery. 2017; 104(2): e41-54.
13. Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Annu Rev. Microbiol. 2010, 64: 143-162.
14. Sibbald M.J., Ziebandt A.K., Engelmann S. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006. 70(3): 755-788.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

М.К.Гулимов¹, Л.Р.Романцова¹, А.В.Астапенко¹, Ю.Р.Щетинина¹, Е.В.Прокофьева¹, Г.В.Мовсесян¹, В.В.Зверев^{1,2}, Ю.И.Аммур¹

ВЛИЯНИЕ АУТОФАГИИ НА РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА КРАСНУХИ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ²Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Цель. Данное исследование направлено на изучение роли аутофагии во внутриклеточном цикле вируса краснухи. *Материалы и методы.* Для того, чтобы оценить взаимосвязь процесса аутофагии и репликации вируса краснухи, эпителиальные клетки A549 заражали диким и аттенуированным вариантами штамма вируса краснухи — С-77w и С-77a, соответственно, со множественностью заражения 1 инф.ед./кл, параллельно измеряли накопление вирусной РНК и уровень экспрессии генов, участвующих в инициации и элонгации аутофагосомы и ее слиянии с лизосомой — Beclin1, Atg5, Rab7 и SQSTM1 (p62), а также в присутствии ингибитора (BFLA) и индуктора (Rapamycin) аутофагии. *Результаты.* Для мРНК генов Beclin1 и Atg5 была характерна их повышенная экспрессия на 24-48 (для дикого штамма) и 24-72 (для аттенуированного