

## РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПНЕВМОЛИЗИН ВЫЗЫВАЕТ ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ И ЗАЩИЩАЕТ МЫШЕЙ ОТ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2019 г. Д. С. Воробьев\*, Е. С. Петухова, А. В. Сидоров, И. Б. Семенова,  
Ю. В. Волох, А. Ю. Леонова, Н. А. Михайлова

\*E-mail: vorobievdenis@yandex.ru

ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток  
им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 29.03.2019

Получен атоксичный рекомбинантный пневмолизин (гPLY) *Streptococcus pneumoniae*. Изучена иммуногенная и протективная активность гPLY. Показано, что в сыворотках мышей после двукратного введения гPLY увеличивается титр IgG до 32 раз по сравнению с сыворотками интактных мышей. После третьего введения гPLY происходит увеличение титра сывороточных IgG до 15 раз по сравнению с исходным уровнем антител после второй иммунизации. Выявлена протективная активность гPLY в опыте активной защиты при внутрибрюшинном заражении мышей *S. pneumoniae*.

**Ключевые слова:** *Streptococcus pneumoniae*, пневмолизин, титр антител, протективная активность

DOI: 10.31857/S102872210006488-1

**Адрес:** 105064, г. Москва, М. Казенный пер., 5а, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», лаборатория терапевтических вакцин, Воробьев Денис Сергеевич.

Тел.: +7 (495) 917 57 74, 8 961 247 99 30 (моб.)

**E-mail:** vorobievdenis@yandex.ru

**Авторы:**

**Воробьев Д. С.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

**Петухова Е. С.**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

**Сидоров А. В.**, к.б.н., заведующий лабораторией генетики ДНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

**Семенова И. Б.**, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

**Волох Ю. В.**, младший научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

**Леонова А. Ю.**, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии условно патогенных бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

**Михайлова Н. А.**, д.м.н., зав. лабораторией протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ

*Streptococcus pneumoniae* вызывает инвазивные и неинвазивные заболевания наиболее часто у детей младшего возраста и пожилых людей. С одной стороны, заболевания, вызванные *S. pneumoniae*, можно контролировать с помощью вакцинации, с другой – применение профилактических препаратов привело к значительному повышению нозологических форм, вызванных невакцированными серотипами пневмококка. В настоящее время активно разрабатываются вакцины на основе белков пневмококка. Одним из главных факторов вирулентности *S. pneumoniae* белковой природы является пороформирующий токсин пневмолизин [1], ответственный за распространение патогена и разрушение клеток-мишеней. Пневмолизин рассматривается как наиболее консервативный белок, несмотря на большое количество серотипов пневмококка.

**Целью работы** явилось исследование иммуногенной и протективной активности рекомбинантного пневмолизина.

## ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

Микроорганизмы. В работе использовали штамм *S. pneumoniae* серотипа 3, полученный из ЦКП Коллекция ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. Культуру возбудителя выращивали на кровяном агаре в течение 16–18 ч. в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С и 5% содержании углекислого газа.

Животные. Опыты проводили на мышах линии BALB/c массой 16–18 г.

Пневмококковый атоксичный рекомбинантный пневмолизин (rPLY) получали в клетках *Escherichia coli* и хроматографически очищали с помощью Ni-сефарозы.

Для определения иммуногенности rPLY вводили двукратно и трехкратно в дозе 25 мкг/мышь с интервалом две недели внутрибрюшинно. Через 14 дней после второй и третьей иммунизаций у 10 мышей из каждой группы брали сыворотку крови из хвостовой вены и определяли титр IgG с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Протективная активность. Рекомбинантный пневмолизин вводили мышам двукратно и трехкратно в дозе 25 мкг/мышь. Белок растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с добавлением гидроксида алюминия (Sigma, США, из расчета 3 мкг Al(OH)<sub>3</sub> на 1 мкг белка). Сорбцию проводили в течение 12 ч. при температуре 4 °С. Через 3 недели после второй и третьей иммунизаций животных заражали внутрибрюшинно живой вирулентной культурой *S. pneumoniae* серотипа 3. Контрольную группу мышей так же заражали живой вирулентной культурой *S. pneumoniae* серотипа 3, и определяли величину LD<sub>50</sub> по формуле Кербера в модификации Ашмарина [2]. Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом Манна-Уитни для независимых выборок с помощью программы «Statistica 10.0». Выживаемость мышей в течение заданного срока также рассчитывали по методу Гланца [3]. Статистически достоверным считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении титров IgG к rPLY в сыворотках мышей было выявлено следующее. В группе животных, иммунизированных белком в дозе

25 мкг/мышь, через 2 недели после второй иммунизации обнаружили увеличение титра антител по сравнению с контрольными мышами, получавших ФСБ, от 4 до 32 раз ( $p < 0,01$ ). Через 2 недели после третьей иммунизации анализ мышинных сывороточных титров IgG к rPLY показал увеличение титра антител от 7,5 до 15 раз по сравнению с предыдущим уровнем IgG в опыте ( $p < 0,01$ ).

При трехкратном введении rPLY наблюдали защиту животных в опыте по сравнению с контролем. Через 72 часа после заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 отмечалось 80% выживших мышей против 20% ( $p < 0,01$ ) при заражающей дозе 2,5 LD<sub>50</sub> и 60% выживших мышей против 10% ( $p < 0,05$ ) при заражающей дозе 25 LD<sub>50</sub>. Однако через 96 часов после заражения опытные животные погибали и различия с контролем не выявлялось.

При двукратном введении rPLY наблюдали защиту животных по сравнению с контролем при заражающей дозе 250 LD<sub>50</sub>. В опыте выжило 50% мышей против 10% в контроле ( $p < 0,05$ ) через 120 часов после заражения. Защита сохранялась в течение всего времени наблюдения (21 день).

Интересно, что при сравнении результатов активной защиты и задержки гибели животных в опыте с титрами сывороточных антител прямой корреляции не выявлено. Защита была обнаружена только при двукратной иммунизации rPLY от заражения 250 LD<sub>50</sub> *S. pneumoniae* серотипа 3, в то время, как наибольший титр антител наблюдали после третьего введения препарата. Полученные результаты *in vitro* и *in vivo* позволяют сделать предварительный вывод о перспективности применения rPLY в качестве вакцинного препарата.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Subramanian K., Neill D. R., Malak H. A., Spelmink L., Khandaker S., Dalla Libera Marchiori G., Dearing E., Kirby A., Yang H., Achour A., Nilvebrant J., Nygren P. A., Plant L., Kadioglu A., Henriques-Normark B. Pneumolysin binds to the mannose receptor C type 1 (MRC-1) leading to anti-inflammatory responses and enhanced pneumococcal survival. *Nat. Microbiol.* 2019, 4(1): 62–70.
2. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград, 1962: 180 С.
3. Гланц С. А. Медико-биологическая статистика. Изд-во «Практика». Москва, 1999: 459 С.

## RECOMBINANT PNEUMOLYSIN INDUCES THE FORMATION OF ANTIBODIES AND PROTECTS MICE FROM PNEUMOCOCCAL INFECTION

© 2019 D. S. Vorobyev\*, E. S. Petukhova, A. V. Sidorov, I. B. Semenova, Yu. V. Volokh, A. Yu. Leonova, N. A. Mikhailova

\*E-mail: vorobievdenis@yandex.ru

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 29.03.2019

The obtained recombinant pneumolysin (rPLY) *Streptococcus pneumoniae* in atoxic form. The immunogenic and protective activity of rPLY was studied. It was shown that in the sera of mice after double injection of rPLY, the IgG titer increased by up to 32 times as compared with the sera of intact mice. After the third administration of rPLY, the IgG titer increased by up to 15 times compared with the initial IgG level after the second immunization. The protective activity of rPLY revealed in the experience of active protection in intraperitoneal infection of *S. pneumoniae* mice.

*Key words:* *Streptococcus pneumoniae*, pneumolysin, antibody titer, protective activity

### Authors:

**Vorobyev D. S.**, ✉ PhD, Senior researcher of Laboratory of therapeutic vaccines, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: vorobievdenis@yandex.ru;

**Petukhova E. S.**, Aspirant of Laboratory of therapeutic vaccines, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

**Sidorov A. V.**, PhD, Head of the Laboratory of genetics of DNA-containing viruses, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

**Semenova I. B.**, D. Sc., Leading researcher of Laboratory of therapeutic vaccines, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

**Volokh Yu. V.**, Junior researcher of Laboratory of therapeutic vaccines, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

**Leonova A. Yu.**, Junior researcher of Laboratory of microbiology of conditionally pathogenic bacteria, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

**Mikhailova N. A.**, D. Sc., Head of the Laboratory of protective antigens, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia.