

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВАКЦИН
И СЫВОРОТОК ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА»**

На правах рукописи

ПЕТУХОВА Екатерина Сергеевна

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО
АТОКСИЧНОГО ПНЕВМОЛИЗИНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО
КОМПОНЕНТА СОВРЕМЕННЫХ ПНЕВМОКОККОВЫХ ВАКЦИН**

14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель

кандидат медицинских наук
Д.С.Воробьев

Москва- 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ЧАСТЬ I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
<i>ГЛАВА 1</i> Пневмококковая инфекция в современном мире. Патогенез, заболеваемость. Современные вакцины от пневмококка и их эффективность. Предпосылки для создания нового поколения вакцин.....	10
<i>ГЛАВА 2</i> Современные экспериментальные пневмококковые вакцины. Пневмолизин как перспективный кандидат в составе вакцин нового поколения.....	20
ЧАСТЬ II СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
<i>ГЛАВА 1</i> МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	31
1.1 Используемые препараты.....	31
1.2 Животные.....	32
1.3 Штаммы.....	32
1.4 Оценка токсичности и протективной активности rPly в модели <i>in vivo</i>	32
1.4.1 Метод оценки токсичности в модели <i>in vivo</i>	32
1.4.2 Метод оценки протективной активности рекомбинантного атоксичного пневмолизина на экспериментальной модели бактериальной инфекции.....	33
1.5 Ведение клеточной линии.....	33
1.6 Культивирование штамма-продуцента <i>E. coli</i> M15 для получения серий препарата рекомбинантного пневмолизина...	34
1.7 SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблоттинг.....	35
1.8 LAL-тест.....	36
1.9 Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).....	36
1.10 Реакция ингибирования ИФА.....	37
1.11 Культивирование дендритных клеток и их созревание под влиянием gaPly.....	37
1.12 Метод проточной цитометрии для анализа фенотипа дендритных клеток.....	38

1.13 ПЦР в реальном времени.....	39
1.14 МТТ-тест.....	40
1.15 Статистический анализ данных.....	40
ГЛАВА 2 ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРИЙ ПРЕПАРАТА РЕКОМБИНАНТНОГО ПНЕВМОЛИЗИНА.....	41
ГЛАВА 3 ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПНЕВМОЛИЗИНА.....	49
3.1 МТТ-тест.....	49
3.2 Токсичность на животных.....	51
ГЛАВА 4 ИММУНОГЕННОСТЬ И ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО АТОКСИЧНОГО ПНЕВМОЛИЗИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....	53
4.1 Предварительные экспериментальные данные по протективной активности, иммуногенности и специфичности gaPly.....	53
4.2 Подбор иммунизирующей дозы и оптимальной схемы иммунизации gaPly.....	57
4.3 Влияние дозы Al(OH) ₃ на иммуногенность и протективные свойства gaPly.....	61
4.4 Перекрестный протективный эффект иммунизации gaPly при заражении разными серотипами <i>S.pneumoniae</i>	63
ГЛАВА 5 ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МОЛЕКУЛ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА <i>in vitro</i> И АКТИВАЦИЯ СОЗРЕВАНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ gaPLY	72
5.1 Исследование экспрессии генов Toll – подобных рецепторов 2, 4 и 9, <i>TNF-α</i> и <i>IL-6 in vitro</i> под действием рекомбинантного атоксичного пневмолизина.....	72
5.2 Исследование действия рекомбинантного атоксичного пневмолизина на созревание дендритных клеток мыши.....	77
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	80
ВЫВОДЫ.....	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания, вызываемые *Streptococcus pneumoniae*, являются актуальной медико-социальной проблемой для всего мира [121, 168]. Пневмококк может вызывать инвазивные и неинвазивные формы инфекционного процесса у человека [28]. По данным ВОЗ ежегодно от пневмококковой инфекции погибает более 1 млн. человек, причем большинство из них составляют дети в возрасте до 5 лет и пожилые люди [168].

Для профилактики пневмококковых инфекций существуют полисахаридная вакцина Pneumo-23 («Sanofi Pasteur», Франция) и конъюгированные с белком-носителем вакцины: Synflorix (GlaxoSmithKline Biologicals), «Prevenar-13» («Pfizer», США), которые позволяют создать защиту против большинства актуальных серотипов пневмококка [4, 5]. Однако стоит отметить, что «Pneumo-23» неэффективна у детей младшего возраста и у пожилых людей старше 65 лет, так как полисахаридные антигены вызывают Т-независимый иммунный ответ [85, 157]. Конъюгированные пневмококковые вакцины способны формировать Т-зависимый иммунный ответ к полисахаридным антигенам за счет их конъюгирования с нейтральным белком-носителем. Опыт применения конъюгированных вакцин свидетельствует о снижении заболеваемости пневмококковыми инфекциями в разных возрастных группах [33]. Тем не менее, несмотря на преимущества конъюгированных вакцин, очевидны их недостатки: к полисахаридным антигенам по-прежнему формируется строгий серотипспецифический иммунный ответ, который ограничен числом капсульных антигенов, входящих в состав вакцины [47]. Кроме того, при длительном применении конъюгированных вакцин, возможно, замещение клинически значимых серотипов, что также ограничивает возможности формирования защитного иммунитета [33, 172].

В связи с этим актуальным представляется направление по изучению роли белков пневмококка в создании серотипнезависимой защиты, так как последние обладают внутривидовой перекрестной активностью и, соответственно, могут быть использованы в пневмококковой вакцине для усиления специфического иммунного ответа. Обширная литература посвящена этому вопросу [24, 27, 28, 59, 121, 132, 137, 157]. К настоящему времени накоплен большой опыт применения белков *S.pneumoniae* в качестве протективных антигенов в доклинических испытаниях [22, 51, 69, 94, 95, 107, 131, 170].

Среди всего многообразия пневмококковых белков исследователи выделяют белки, которые обладают наиболее выраженными иммуногенными свойствами: пневмолизин (Ply) [22, 27, 46, 71, 90, 109, 131], аутолизин (LytA амидаза) [175], поверхностный пневмококковый белок А (PspA) [71, 118, 135,], холин-связывающий белок А (CbpA) [50], поверхностный пневмококковый антиген А (PsaA) [88, 167], белки полигистидиновой триады (Phts) [35, 69, 136]. В эксперименте показано, что иммунитет к перечисленным белкам защищает животных от инфекции, вызванной *S. pneumoniae*.

Мы исследовали иммунобиологические свойства рекомбинантного пневмолизина, поскольку он является консервативным (представлен практически во всех штаммах пневмококка) [63, 86, 157] и, соответственно, перекрестно-реагирующим антигеном с внутривидовой активностью. Полученный генно-инженерный белок исходно не был токсичным, что доказано в опытах *in vitro* и *in vivo*, поэтому пневмолизин описывали как рекомбинантный атоксичный пневмолизин (raPly).

Доказана иммуногенная активность raPly в опыте. Изучена способность raPly формировать защиту против разных серотипов *S. pneumoniae*.

В специальной серии экспериментов исследовано влияние raPly на экспрессию генов эффекторов врожденного иммунитета и созревание дендритных клеток (ДК).

В наше время отдельные экспериментальные вакцины, разработанные на основе белков пневмококка, дошли до клинических испытаний. Однако официально в мире нет ни одной зарегистрированной пневмококковой белковой вакцины или конъюгированной вакцины, содержащей белки микроба. Таким образом, исследования по разработке пневмококковых вакцин на основе белков патогена продолжаются, что определяет актуальность настоящей работы.

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам лаборатории механизмов регуляции иммунитета (зав. лаб., д.м.н. Н.К. Ахматова) за выполнение опытов с дендритными клетками; сотрудникам лаборатории экспериментальной иммунологии (зав. лаб., к.б.н. Ю.И. Аммур) за постановку опытов по оценке токсичности рекомбинантного белка *in vitro*, а также за предоставленные клеточные линии Vero и K-562; научному сотруднику лаборатории молекулярной иммунологии (зав. лаб., д.м.н., член-корр. РАН О.А. Свитич) Винницкой Александре Борисовне за помощь в планировании и проведении экспериментов по оценке экспрессии генов *in vitro*.

Цель. Изучение способности рекомбинантного атоксичного пневмолизина формировать иммунный ответ к разным серотипам *Streptococcus pneumoniae* и влиять на эффекторы врожденного иммунитета.

Задачи исследования.

1. Получить серии рекомбинантного атоксичного пневмолизина и дать им иммунохимическую характеристику.
2. Изучить токсичность рекомбинантного белка в опытах *in vitro* и *in vivo*.
3. Определить оптимальную дозу и схему иммунизации мышей рекомбинантным атоксичным пневмолизином.

4. Исследовать иммуногенную и протективную активность при иммунизации мышей рекомбинантным атоксичным пневмолизинном.
5. Оценить действие рекомбинантного атоксичного пневмолизина на экспрессию генов эффекторов врожденного иммунитета и созревание дендритных клеток.

Научная значимость.

Впервые выявлено, что гаРly формирует серотипнезависимую защиту против 3, 4 и 6В серотипов *S. pneumoniae*. Протективным эффектом обладала доза 25 мкг/мышь.

Впервые установлено, что гаРly стимулирует образование IgG1-антител в высоких титрах, причем титр антител после трехкратной иммунизации был существенно выше по сравнению с двукратной иммунизацией. Титр антител сохраняется в сыворотках мышей после последней иммунизации на протяжении как минимум 3-х месяцев.

Продемонстрировано, что гаРly повышает экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *TNF- α* и снижает экспрессию гена *IL-6 in vitro*. Рекомбинантный атоксичный пневмолизин увеличивает экспрессию молекулы терминальной дифференцировки ДК CD83, молекулы главного комплекса гистосоместимости класса II (МНС II), экспрессию костимуляторных молекул CD80 и CD86, что подтверждает созревание ДК.

Теоретическая и практическая значимость.

Впервые показано, что рекомбинантный пневмококковый пневмолизин нетоксичен. В эксперименте *in vitro* в культуре клеток Vero при добавлении гаРly в концентрации до 10 мкг/мл не происходило гибели клеток.

Исследовано действие гаРly на созревание ДК и экспрессию генов поверхностных молекул и цитокинов, что позволит в дальнейшем

охарактеризовать молекулярно-клеточные механизмы действия gaPly на эффекторы врожденного и адаптивного иммунитета.

Рекомбинантный атоксичный пневмолизин можно рассматривать в качестве кандидата для разработки пневмококковой белковой серотипнезависимой или конъюгированной вакцины.

Методология и методы исследования.

Изучена способность рекомбинантного атоксичного пневмолизина создавать защиту против разных серотипов *S. pneumoniae* и вызывать образование сывороточных IgG-антител, а также влиять на эффекторы врожденного иммунитета. Для выполнения поставленных задач использовали микробиологические, физико-химические, иммунологические, молекулярно-биологические и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* доказано отсутствие токсичности полученных серий рекомбинантного пневмолизина.
2. Рекомбинантный атоксичный пневмолизин формирует защиту против *S. pneumoniae* серотипов 3, 4 и 6В при внутрибрюшинном заражении мышей и стимулирует образование специфичных IgG-антител.
3. Под действием gaPly повышается экспрессия генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *TNF- α* , и снижается экспрессия гена *IL-6*. Рекомбинантный атоксичный пневмолизин вызывает созревание дендритных клеток, увеличивая экспрессию молекулы терминальной дифференцировки CD83, молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), экспрессию костимуляторных молекул CD80 и CD86.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность представленных результатов определяется репрезентативным объемом выполненных исследований, выполненных на современном уровне и статистическим анализом полученных данных.

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 3 статьи – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Материалы диссертации представлены на конференциях: Научно-практическая конференция молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» 17-18 апреля 2018г. (г. Москва); Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной химиотерапии и клинической микробиологии 23-25 мая 2018 г. (г. Москва), XI Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием, 1-3 апреля 2019г. (г. Москва), Научная конференция с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам» 18-20 апреля 2019 г. (г. Москва).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 113 страницах текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4-х глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы, включающего 21 отечественных и 158 зарубежных источников. Диссертационная работа иллюстрирована 17 таблицами и 12 рисунками.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Часть I Пневмококковая инфекция в современном мире. Патогенез, заболеваемость. Современные вакцины от пневмококка и их эффективность. Предпосылки для создания нового поколения вакцин.

Streptococcus pneumoniae – грамположительная, условно-патогенная бактерия, которая колонизирует слизистые верхних дыхательных путей человека. Носителями пневмококка, по оценкам разных исследователей, являются 27-65 % детей и менее 10 % взрослого населения [172].

С одной стороны, пневмококки являются хорошо адаптированными комменсалами, и их основной резервуар на слизистой верхних дыхательных путей человека способствует сохранению и передаче бактерии. С другой стороны, пневмококк является возбудителем тяжелых заболеваний, когда проникает в стерильные ткани, такие как пространство среднего уха, легкие, кровеносное русло и менингеальные оболочки [168].

Выделению и распространению *S. pneumoniae* в окружающей среде способствует вирусная коинфекция [168]. Существует ассоциация между пневмококковой инфекцией и вирусом гриппа А: возможно, вирус может провоцировать изменения в бактерии, приводящие к переходу от бессимптомной колонизации к инвазивному заболеванию [47]. Вирус влияет не только на экспрессию факторов вирулентности пневмококком и переход к инвазивной стадии, но и на передачу бактерии [139]. Во взаимодействии пневмококка и вирусной инфекции с организмом-хозяином важное значение имеют рецепторы врожденного иммунитета TLR2 [139].

Streptococcus pneumoniae способен в течение довольно длительного времени сохраняться во внешней среде, например, находясь в слюне человека [163]. Более того, бактерия переносит высыхание в течение

нескольких дней, причем бактерии, формирующие биопленку, более устойчивы [112, 166].

На выделение пневмококка и передачу к новому хозяину положительно влияют такие факторы вирулентности пневмококка, как полисахаридная капсула и пневмолизин [104, 115, 176, 177].

Полисахаридная капсула *S. pneumoniae* является одним из ключевых факторов патогенности и ключевым протективным антигеном [83]. Защитные свойства антител к капсуле были известны с 30-х годов XX века [30]. Антитела к капсульному полисахариду обеспечивают защиту, но являются серотипспецифическими. На данный момент по капсульному антигену идентифицировано более 95 серотипов пневмококка, в то время как максимальное число серотипов, которое охватывает полисахаридная вакцина, составляет 23, а конъюгированная – 13 [50].

Наряду с капсульным антигеном пневмококка важное значение имеет внутриклеточный токсин - пневмолизин. Пневмолизин является внутриклеточным белком пневмококка [157] с молекулярной массой 53 кДа [120], однако есть косвенные данные, подтверждающие возможность расположения в клеточной стенке [15, 164]. Отдельные авторы рассматривают вероятность частичной секреции Ply [15, 164], однако наибольшая концентрация токсина достигается при разрушении бактериальной клетки. Пневмолизин – порообразующий токсин, который связывается с холестеролом мембраны эукариотических клеток [120]. Наиболее функционально активен 4-ый структурный домен пневмолизина, содержащий консервативную последовательность из 11 аминокислот, характерную для всех холестерол-связывающих порообразующих токсинов [120]. Молекулы Ply образуют поры в цитоплазматической мембране и приводят к гибели клетки [24]. Интересным побочным эффектом разрушения клеток может быть высвобождение активного предшественника IL-1 α , который играет ключевую роль в элиминации пневмококка [98]. Пневмолизин активирует комплемент по классическому пути в отсутствие

специфических антител, вызывает локальное истощение компонентов и снижение опсонизирующей активности сыворотки [130]. Также Ply угнетает мукоцилиарный клиренс, хемотаксис и функциональную активность нейтрофилов, пролиферацию лимфоцитов и синтез антител [24].

Пневмолизин может непосредственно взаимодействовать с маннозным рецептором MRC-1 (маркер фенотипа макрофагов M2 и рецептор фагоцитоза), помогая пневмококку внедриться в дендритные клетки и альвеолярные макрофаги в дыхательных путях, способствуя снижению цитокинового ответа. Механизм этого явления может заключаться в индукции молекулы SOCS1, супрессора сигнального пути цитокинов, который угнетает провоспалительный сигнальный путь STAT1 и Nf-κB [155].

Пневмолизин, по некоторым данным, является активатором инфламмосомы NLRP3, которая является источником IL-1β, а IL-1β положительно влияет на синтез IL-17 [117]. Однако, по другим данным, пневмолизин угнетает активацию инфламмосомного комплекса и синтез IL-1β [105]. С другой стороны, штаммы, имеющие в своем составе пневмолизин, не обладающий гемолитической активностью, ассоциированы со вспышками заболеваний, поэтому нельзя сказать, что токсичный пневмолизин является необходимым условием заболевания [86].

Штамм с нокаутированным геном пневмолизина вызывает более высокий уровень фагоцитоза нейтрофилами, но сниженный киллинг по сравнению со штаммом дикого типа. Пневмококк вызывает образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, но пневмолизин, экспрессируемый штаммом дикого типа, ингибирует связывание пневмококка с нейтрофильной внеклеточной ловушкой [161].

В патогенезе пневмококковой инфекции важное значение имеют белки-адгезины, такие как энлаза, фосфорилхолин, холин-связывающий белок C [168], поверхностный пневмококковый белок A (PspA), поверхностный пневмококковый белок C (PspC), холин-связывающий белок

A (Pneumococcal choline-binding protein A, PcpA), белки PhtD и PhtE, поверхностный антиген A (Pneumococcal surface antigen, PsaA) [50, 95].

Внеклеточные гликозидазы пневмококка расщепляют гликоконъюгаты организма-хозяина, открывая гликановые рецепторы [97, 168]. Кроме того, нейраминидаза A и β -галактозидаза A, имеют лектиновые домены, и по-видимому, функционируют как адгезины независимо от своей ферментативной активности [168]. Нейраминидазы NanA и NanB необходимы для успешной колонизации слизистых, и выживания пневмококка в крови, соответственно [110].

Многие факторы адгезии и колонизации пневмококка оказывают негативное действие и на систему комплемента. PspA, PhtD и PhtE непосредственно препятствует фиксации компонента комплемента C3 на поверхности клеточной стенки бактерии [50, 136], а PspC связывается с фактором H, регулирующим активность системы комплемента [53].

Важную роль в клеточном метаболизме *S. pneumoniae* осуществляют белки-транспортеры ионов металлов. Например, PhtD и PhtE связывают ионы цинка [132], PsaA улавливает ионы марганца и снижает чувствительность бактерии к оксидативному стрессу [50]. Белки PiuA, PiaA относятся к системе захвата ионов железа [50].

Пили, или пилеобразные структуры, присутствуют не более чем у одной трети всех штаммов пневмококка. В структуре пилей выделяют белки RrgA, RrgB и RrgC. Белок RrgB образует остов структуры пилей, а RrgA и RrgC расположены снаружи и внутри клетки, соответственно. RrgA является адгезином и участвует в образовании биопленки. Для белка RrgB известно три аллельных варианта [50].

Во время стационарной фазы роста пневмококк может быть подвержен аутолизу вследствие активности клеточной амидазы LytA. Компоненты бактериальной стенки и внутриклеточные факторы патогенности вызывают нарушение целостности эпителиального и эндотелиального барьера, что приводит к генерализации инфекции [132].

Многие видовые особенности, в частности, способность к аутолизу, обуславливает иммунные реакции организма на *S. pneumoniae*. По данным Martner A., аутолиз 10 % процентов бактериальных клеток от общего количества добавленных в культуру моноцитов крови человека снижает концентрацию TNF- α , ИФН- γ и IL-12 по сравнению с бактериальной культурой без явления аутолиза, а присутствие отдельных компонентов клеточной стенки угнетает фагоцитарную активность, т.е. угнетает провоспалительные реакции организма [114].

Одним из интересных свойств пневмококка является естественная компетентность, т.е. способность поглощать и активно транспортировать фрагменты ДНК из окружающей среды в цитоплазму [43]. Пневмококк в культуре приобретает компетентность в фазе экспоненциального роста вследствие экспрессии ключевых генов компетентности (гены *com*) [113, 160]. К ключевым генам компетентности относится *comC*, кодирующий белок, стимулирующий компетентность, и двухкомпонентную систему, состоящую из гистидиновой киназы (*comD*) и цитоплазматического белка-регулятора (*comE*) [133]. Двухкомпонентная система активирует *comX*, который активирует транскрипцию каскада поздних генов компетентности [134]. Другие гены компетентности способствуют активации аутолитических ферментов в некомпетентных клетках пневмококка и, соответственно, гибели некомпетентных клеток и захвату ДНК убитых собратьев (явление фратрицида) [45]. Поглощенная ДНК встраивается в геном пневмококка в процессе генетической рекомбинации и может оказывать влияния на первоначальные свойства штамма.

На патогенез пневмококковой инфекции влияют особенности организма-хозяина. Безусловно, первичные иммунодефициты, в частности, недостаточность системы комплемента или полиморфизм гена маннозосвязывающего лектина, способствуют повышенной восприимчивости к пневмококковой инфекции [27]. Однонуклеотидные полиморфизмы в гене *NFKB1*, кодирующем I κ B ζ , который регулирует

воспалительные реакции в моноцитах, вызванные *S. pneumoniae*, способствуя выработке IL-6 и GM-CSF, ассоциированы с повышенной восприимчивостью к инвазивным пневмококковым инфекциям [156]. Дефект белка-цитозольного транспортера MyD88 повышает восприимчивость к инвазивным пневмококковым инфекциям. Более того, пациенты с нарушениями, касающимися двух белков сигнального пути NF-κB, IκBκ и NEMO, так же восприимчивы к пневмококковой инфекции [27].

Детский возраст является фактором риска более длительной колонизации верхних дыхательных путей условными патогенами, в т.ч. пневмококком. Сниженная активность сигнального пути IL-1 в молодом возрасте может трактоваться двояко: во-первых, это может быть необходимо для заселения нормальной микрофлорой верхних дыхательных путей; во-вторых, сам по себе несбалансированный состав микрофлоры в младенческом возрасте может подавлять этот сигнальный путь [98].

Отдельная группа риска – это пожилые люди, что, с одной стороны, связано с более высокой частотой коморбидных состояний в этом возрасте, а с другой - со старением иммунной системы (снижение фагоцитарной активности, аффинности антител) [27, 54]. Есть интересные данные, что низкая экспрессии фактора MIF в пожилом возрасте, по-видимому, повышает риск заболевания осложненной внебольничной пневмонией [52]. К факторам риска относятся факторы образа жизни (курение, избыточное употребление алкоголя, лишний вес, плохая гигиена полости рта) и коморбидные состояния (хронические заболевания легких, особенно хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма, болезнь Паркинсона, эпилепсия, сахарный диабет, ВИЧ-инфекция, хроническая печеночная и почечная недостаточность). Пациенты с асплинией находятся в группе высокого риска фульминантного течения бактериальных инфекций, особенно пневмококковой [27].

Эффективной стратегией снижения заболеваемости пневмококковыми инфекциями является вакцинация.

Современные пневмококковые вакцины созданы на основе свободных или конъюгированных капсульных антигенов [50]. На данный момент идентифицировано более 95 серотипов пневмококка, в то время как максимальное число серотипов, которое охватывает полисахаридная вакцина, составляет 23, а конъюгированная – 13 [50].

Официально зарегистрированы вакцины двух разных типов: поливалентная полисахаридная вакцин «Пневмо-23» (Pneumo 23, Sanofi Pasteur) и конъюгированные вакцины Synflorix (GlaxoSmithKline Biologicals) и Prevenar13 (PCV13, Pfizer), в которых капсульные полисахариды связаны с дифтерийным, столбнячным анатоксинами или D-протеином гемофильной палочки [4,169]. Ранее широко применялась семивалентная конъюгированная пневмококковая вакцина Prevenar (PCV7, Pfizer).

Во многих странах вакцинация детей конъюгированными вакцинами при достаточном охвате населения привела к снижению заболеваемости инвазивными пневмококковыми инфекциями как среди детей, так и среди взрослых [33]. Аналогичное влияние вакцинации было выявлено и в отношении носительства пневмококка [121]. Снижение уровня носительства коррелировало с титрами серотипспецифических опсонофагоцитарных антител и антител класса IgG, что указывает на важную роль капсульных антигенов вакцинных штаммов для предотвращения носительства [121].

Наблюдения в США и Великобритании демонстрируют значительное снижение заболеваемости в группе риска: у взрослых старше 65, преимущественно за счёт дополнительных вакцинных серотипов конъюгированной тринадцативалентной вакцины. В то же время опыт применения конъюгированных вакцин (семивалентной и тринадцативалентной), а также полисахаридной 23-валентной вакцины в Ирландии показывает, что значительное снижение пневмококковых заболеваний, вызванных вакцинными серотипами семивалентной конъюгированной вакцины, не влияет на общую заболеваемость инвазивными пневмококковыми инфекциями. Возможно, это связано с

большим охватом иммунизации, а также различиями в Национальных календарях вакцинации [48].

В РФ также проводится эпидемиологический анализ циркулирующих серотипов пневмококка и оценка эффективности современных пневмококковых вакцин [6, 13]. В частности, 1, 3, 6 и 19 серотипы патогена являются доминирующими серотипами, вызывающими менингит [3, 4, 15]. Преобладающие серотипы, колонизирующие носоглотку у детей – 19F и 23F [14, 17]. На фоне начала вакцинации детей в Санкт-Петербурге в структуре носительства пневмококка снизились доли вакцинных штаммов по сравнению с допрививочным периодом, но частота носительства инвазивных штаммов была выше среди вакцинированных детей по сравнению с невакцинированными [14].

Однако вакцины на основе капсульного полисахарида имеют свои ограничения и недостатки в применении.

Неоднозначно трактуется эффект применения полисахаридной вакцины. По данным метаанализа, вакцинация полисахаридной вакциной способствует профилактике пневмонии, но на коротких сроках после вакцинации [159].

Полисахаридные вакцины малоэффективны в старших возрастных группах (>65) [85] и у детей до 2-х лет [157]. Конъюгированные вакцины эффективны для групп риска [137], однако количество серотипов, входящих в состав вакцины, ограничено, что приводит к повышению частоты колонизации слизистой носоглотки невакцинными серотипами *S. pneumoniae* [59]. После внедрения конъюгированной тринадцативалентной вакцины наблюдалось замещение вакцинных серотипов невакцинными как при носительстве, так и в качестве возбудителя инвазивных инфекций (как в США, так и в Европе) [33]. Также повысилась частота заболеваемости бескапсульными штаммами пневмококка. Например, значительно увеличилась доля пневмококкового конъюнктивита, вызванного бескапсульными штаммами [87, 92, 127, 129, 162]. Вакцинация

полисахаридной или конъюгированной вакцинами коррелировала с более высоким риском колонизации пневмококком и более высокой устойчивостью к антибиотикам [172]. Есть данные о более высокой частоте колонизации носоглотки другими бактериями, такими как *Staphylococcus aureus* [33] и *Haemophilus influenza*, а также другими стрептококками и анаэробной флорой [32].

Также стоит отметить, что при создании конъюгированных вакцин не всегда учитывается характеристика белка-носителя, его эпитопы и способность вызывать протективный иммунитет. Белок-носитель рассматривается, прежде всего, как способ перевода Т-независимых антигенов (капсульных полисахаридов) в Т-зависимые при конъюгировании, а не как антиген со своими антигенными детерминантами [34]. Конъюгированная вакцина, не завершившая лицензирование, на основе протеина D гемофильной палочки, с которым были конъюгированы полисахариды 11-и серотипов, снизила заболеваемость острым отитом у детей австралийских аборигенов – популяции с более высоким риском [34].

Сама технология создания конъюгированных вакцины имеет ограничения: вакцины этого типа могут включать ограниченное число полисахаридных антигенов из-за особенности технологии, что уже создает предпосылку для селективного давления среди существующих штаммов и способствует замещению серотипов. Стоит отметить, что производство конъюгированных вакцин является дорогостоящим и высокотехнологичным процессом, что затрудняет доступ к ним стран с низким уровнем дохода, которые в большей степени нуждаются в профилактике пневмококковой инфекции [50]. Согласно статистическим данным, применение конъюгированных вакцин снизило заболеваемость пневмококковыми инфекциями, и более чем на 50 % снизилась детская смертность от пневмококковых инфекций. Однако, несмотря на значительные финансовые вложения, охват вакцинации в мире не достигает 50 % [47]. Замещение серотипов предполагает постоянную необходимость добавления новых

серотипов в состав конъюгированных вакцин, что будет требовать постоянных экономических затрат [47].

Несмотря на значительное снижение пневмококковых заболеваний после внедрения современных вакцин на основе капсульных антигенов пневмококка [147], проблема пневмококковых инфекций по-прежнему является актуальной из-за явления замещения вакцинных серотипов невакцинными и появления антибиотикоустойчивых штаммов [67].

ГЛАВА II СОВРЕМЕННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПНЕВМОКОККОВЫЕ ВАКЦИНЫ

Несмотря на то, что капсульный полисахарид является классическим протективным антигеном пневмококка, данные экспериментов по носительству *S. pneumoniae* у человека свидетельствуют о значительном потенциале антител к некапсульным антигенам в элиминации возбудителя на этапе колонизации носоглотки [120].

Можно выделить следующие направления в разработке пневмококковых вакцин: 1) конъюгированные вакцины с расширенным охватом – 15-валентные [72, 116, 144, 148, 152] и 20-валентные [158]; 2) конъюгированные на основе рекомбинантного белка пневмококка; 3) рекомбинантные белковые вакцины (один белок или несколько белков, гибридные белки) [22, 49, 51, 59, 66, 68, 69, 75, 90, 135, 137, 138, 140]; 4) один рекомбинантный белок или сочетание нескольких рекомбинантных белков совместно с классической иммунизацией конъюгированной полисахаридной вакциной с целью объединения уже известных протективных возможностей конъюгированных вакцин и расширения репертуара за счет серотипнезависимых антигенов [47, 125, 126, 138]; 5) поливалентные (мультиантигенные) – цельноклеточная убитая вакцина на основе рекомбинантного штамма *S. pneumoniae* (со сниженным уровнем экспрессии капсулы, модифицированными факторами патогенности) [40, 111] и вакцина на основе белковых фракций [42, 44, 56]; 6) аттенуированные векторы, работающие по принципу системы доставки рекомбинантного белка, такие как BCG, штаммы сальмонеллы, *Lactobacillus casei*, аденовирус [29, 41, 70, 71, 91, 101, 103, 118, 122, 167, 171]; 7) MAPS-технология (multiple antigen-presenting system, внеклеточные антигенные синтетические системы) рассматривается как альтернатива цельноклеточной вакцине с меньшими побочными эффектами [33].

Наряду с новыми типами вакцин, развиваются новые адъювантные стратегии. Например, как адъювант для усиления иммуногенности полисахаридов рассматривается IL-12 [39]. Как отдельное направление можно выделить разработку новых адъювантов, например, в опыте при иммунизации мышей подкожно рекомбинантным пневмолизинот ΔA146Ply использовали наночастицы фосфата кальция, что приводило к значительному увеличению выживаемости при заражении по сравнению с контрольной группой и группами, иммунизированными белком без адъюванта. Выживаемость мышей составила 70 и 80 % для наночастиц разного типа, а белок изолированно или с классическим адъювантом Al(OH)₃ защищал только 30 и 40 % мышей соответственно [170]. Интраназальная иммунизация бактериеподобными частицами, которые использовались как носитель для пневмолизина (пневмолизинот Plym2, C429G и W433F), приводила к образованию высоких титров антител сыворотки крови (IgG) и антител слизистых (sIgA) [109].

В целом все варианты исследования протективной активности экспериментальных вакцин на животных можно разделить на 3 типа: моделирование колонизации, пневмонии и сепсиса [47]. Большинство белков пневмококка, которые вовлечены в патогенез пневмококковой инфекции, рассматриваются в качестве перспективных протективных антигенов [33].

Иммунизация рекомбинантными белками пневмококка – нетоксичными вариантами пневмолизина, слитным белком PspA 3+2 (химерный белок, состоящий из PspA 2 и 3 семейств), консервативными рекомбинантными участками белка C (PRR, proline rich region, и NPВ, консервативный беспролиновый блок), PspA, белками полигистидиновой триады (Phts), слитным белком RrgB321, созданным на основе белков пилей, рекомбинантными StrkP и PcsB, PiuA и PiaA, рекомбинантным LytA показала эффективность в защите животных в моделях пневмонии и сепсиса [22, 49, 51, 66, 68, 69, 75, 135, 140]. В опытах по иммунизации животных

рекомбинантным белком NanA, белками Phts и PsaA были показаны защитные свойства в отношении колонизации *S. pneumoniae* [69, 88, 107].

Получены данные по пассивной защите с применением рекомбинантных белков пневмококка. Например, высокие титры нейтрализующих антител к рекомбинантному атоксичному варианту пневмолизина не способствуют повышению выживаемости животных в опыте пассивной защиты [108], в то время как антитела к Phts предотвращают гибель животных [69]. Антитела к белку PsaA и антитела к PspA препятствуют адгезии пневмококка к эпителию носоглотки человека к легочному эпителию в культуре клеток [94, 142].

В контексте создания эффективного иммунобиологического препарата стоит учитывать возможность использования естественных характеристик антигенов, таких как консервативность структуры и распространенность среди серотипов, а также роль в патогенезе.

Белки *S. pneumoniae* отличаются по степени консервативности. Известно, что пневмолизин синтезируется большинством клинических изолятов пневмококка [157]. По данным анализа баз геномных последовательностей, Ply является одним из самых консервативных структурных белков [63], демонстрирует генетическую вариабельность 3,3 %. Это немного выше, чем показатель вариабельности конститутивных генов (1-2 %) [86]. Однако пневмолизин присутствует в составе экспериментальных препаратов в виде химически или генетически модифицированной атоксичной формы, чтобы избежать проявлений токсичности [128]. По данным Selva [145], поверхностный белок A (PspA) синтезируют более 90 % штаммов пневмококка. Высокой консервативностью отличаются и белки полигистидиновой триады (Phts) [95], а также белки, играющие важную роль в метаболизме - сериновая/треониновая протеинкиназа (StrkP) [50] и белок, необходимый для репарации клеточной стенки (PcsB, гидралаза) [119]. PspA представлен 3-мя структурными семействами [96], но последним данным, большинство серотипов содержат

PspA 1 или 2 семейства, а антитела обладают перекрестной активностью [33]. Более высокий уровень генетической вариабельности для белков PiuA и PiaA может быть компенсирован перекрестной активностью антител [37]. В структуре поверхностного белка С среди 11 аллельных вариантов выделяют общие консервативные последовательности [49, 84].

В лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова на протяжении последних 10 лет проводятся исследования по изучению свойств белковых антигенов пневмококка, которые получены основе выбора штаммов с наиболее высокой иммуногенной и перекрестной протективной активностью. В частности, продемонстрирована перекрестная протективная активность этих препаратов в модели системной инфекции на мышцах [6, 8, 9, 10, 16].

В большинстве работ по оценке протективной активности в качестве модельного объекта используются мыши. Эти модели имеют некоторые ограничения: естественная устойчивость мышей позволяет использовать ограниченное число серотипов; пути заражения являются искусственными и не отражают сложный жизненный цикл пневмококковой инфекции, включающий в себя бессимптомное носительство, взаимодействие с естественной микрофлорой слизистых и сдвиг к инвазивному генотипу [47]. Поэтому естественно, что не все экспериментальные препараты, проявившие себя в опытах на животных, успешны в клинических исследованиях.

Успешно прошло пилотное исследование моновалентной вакцины на основе генетически детоксифицированного рекомбинантного пневмолизина (T65C, G293C, C428A). Доза 25 мкг оказалась наиболее эффективной, и антитела сыворотки крови иммунизированных лиц нейтрализовали токсин *in vitro* [90].

Sanofi-Pasteur успешно провёл I фазу клинических испытаний сразу нескольких вариантов потенциальных вакцин: моновалентной PlyD1; комбинированной PspA+PhtD; комбинированной PspA+PhtD+dPly [59].

Моновалентная вакцина GlaxoSmithKline Vaccines на основе PhtD прошла I и II фазы клинических испытаний [137].

Экспериментальная вакцина, имеющая в своем составе PspA, PhtD и PlyD, безопасна и иммуногенна для детей и взрослых. Во всех группах как минимум у 75 % наблюдалось 2-кратное увеличение титров антител. Титры были выше в случае трехкратной иммунизации и при условии добавления адъюванта (Al(OH)₃) [35].

GlaxoSmithKline Biologicals проводит клинические испытания экспериментальной вакцины, в состав которой входят нетоксичный пневмолизид и PhtD. Препарат вводился однократно совместно с конъюгированной полисахаридной вакциной детям в возрасте 1,5-3,5 месяцев и в возрасте от 2 до 4-х лет. При дальнейшем наблюдении не было выявлено серьезных побочных действий, а титры серотипспецифических антител были сопоставимы с титрами при иммунизации конъюгированной вакциной. Экспериментальная вакцина не оказала действие на назофарингеальное носительство невакцинных (не содержащихся в конъюгированной вакцине) штаммов [125, 126, 138].

Особый интерес представляет вакцина PnuBioVax на основе штамма TIGR4 (4 серотип) с генетически модифицированным (атоксичным) пневмолизином. Она создана на основе лизата бактериального штамма и обогащена белками теплового шока благодаря технологии производства [42]. В опыте на мышах иммунизация экспериментальным препаратом способствовала снижению колониеобразующих единиц (КОЕ) в крови, легочной ткани и бронхоальвеолярных смывах при моделировании сепсиса и пневмонии [44]. Экспериментальная мультиантигенная вакцина PnuBioVax (содержащая в своем составе белки пневмококка Ply, PsaA, PiaA, PspA, RrgB, RrgA, белки теплового шока) при трехкратном введении способствует выработке антител ко всем белкам у здоровых добровольцев [56]. Стоит отметить, что цельноклеточные вакцины имеют преимущество: вакцина мультивалентная, антигены пневмококка представлены в естественной

конформации, и более дешевая в изготовлении по сравнению с конъюгированной [47].

Все указанные выше вакцины характеризуются как препараты с широкой защитой от многих серотипов пневмококка. Однако на данный момент не выработано четких критериев, по которым можно оценить эффективность этого типа вакцин [137]. Например, для конъюгированных вакцин определение опсонофагоцитоза является лабораторным исследованием, коррелирующим с защитой *in vivo*. Для белковых вакцин нет такого универсального исследования *in vitro* [47].

Исследования белковых и цельноклеточных вакцин против пневмококка ведутся в течение последних 30 лет, однако многие вопросы остаются нерешенными. Более подходящие животные модели, эквиваленты защиты *in vitro*, выбор добровольцев для пилотных исследований (как правило, это страны с серотиповым пейзажем, отличным от европейских стран, а также своими специфическими особенностями, например, с более высоким естественным уровнем колонизации пневмококком). Также обсуждаемым вопросом является выбор оптимальных конечных точек [47] для клинических испытаний, в том числе - стоит ли считать полную элиминацию желаемой целью. В настоящее время происходит сдвиг от концепции полной элиминации к концепции снижения колонизации до допустимого порога [47].

Возможно, идеальной вакциной был бы такой препарат, содержащий белковые факторы, активно синтезируемые бактерией именно во время инвазивной инфекции, и не имеющие влияния на колонизацию [47]. Математические модели позволяют оценить, что эффект подобной вакцины на снижение заболеваемости инвазивными заболеваниями превышал бы эффект от применения современных конъюгированных вакцин [60].

В настоящее время ни одна из существующих экспериментальных вакцин нового поколения не внедрена в клиническую практику. Вместе с тем, в состав очень многих экспериментальных иммунобиологических

препаратов входит пневмолизин. Вероятно, пневмолизин является одним из наиболее соответствующих этим требованиям белков.

ПНЕВМОЛИЗИН КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КАНДИДАТ В СОСТАВЕ ВАКЦИН НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Первые опыты по протективной активности препаратов пневмолизина проводились еще в 1946 г [73]. Исследователи продемонстрировали, что иммунизация препаратами пневмолизина обеспечивала серотипнезависимую защиту против пневмококковой инфекции. К сожалению, из-за технических ограничений того времени, экстракт культуры пневмококка был сильно загрязнен другими компонентами. По оценкам авторов, содержание пневмолизина в используемой ими экспериментальной вакцине составляло не более 1% от общего количества белка в препарате. Кроме того, в вакцине присутствовал капсульный полисахарид. Таким образом, нельзя говорить о результатах этой работы как о результатах иммунизации именно пневмолизином, однако это первое исследование, принимающее во внимание гипотезу о перекрестной активности белков пневмококка [131].

В работе 1983 г. J. Paton и коллеги оценивали протективную активность нативного пневмолизина высокой степени очистки. Иммунизация мышей нативным частично инактивированным пневмолизином способствовала выраженному гуморальному иммунному ответу. В опыте по защите мышей заражали интраназально, чтобы смоделировать естественный путь инфекции. Средняя продолжительность жизни мышей после заражения составила 2,48 дня для контрольных животных и 5,52 дня для мышей, иммунизированных пневмолизином. Задержка гибели мышей в опыте являлась достоверной, и утвердила ученых в мысли о перекрестных протективных свойствах пневмолизина [131].

Экспрессия гена пневмолизина, вероятно, коррелирует с инвазивностью штамма пневмококка. Так, штаммы *S. pneumoniae*,

выделенные из крови больных, экспрессировали пневмолизин в клеточных линиях (ТНР-1 и А549) в большем объеме, чем штаммы, выделенные из мокроты [81]. Однако гемолитическая активность не является обязательным условием инвазивного заболевания т.к. негемолитические изоляты 1-го серотипа вызывают пневмонию, очень часто с осложнениями в виде эмпиемы плевры [105]. У мышей, зараженных штаммами пневмококка, экспрессирующими агемолитический вариант пневмолизина, плотность колонизации носоглотки была выше, чем при колонизации штаммами, экспрессирующими активный пневмолизин дикого типа [93].

Существует фоновый уровень антител к пневмолизину у взрослого населения как результат естественной колонизации *S. pneumoniae* [123], а отсутствие сывороточных антител к пневмолизину коррелирует с предрасположенностью к пневмонии [82].

Есть данные о непосредственном повреждении миокарда факторами патогенности пневмококка. По-видимому, перемещению бактерии в миокард способствуют СбрА и фосфорилхолин. Исследователи предполагают, что образование микроочагов повреждения в миокарде при инвазивных пневмококковых заболеваниях связаны с действием пневмолизина. Сходные повреждения наблюдаются как в секционном материале, полученном в опытах на животных (мыши и макаки-резус), так и в секционном материале, полученном от пациентов, умерших от тяжелой пневмококковой инфекции [36]. Ученые высказывают мысль о ключевой роли пневмолизина в патогенезе легочной и сердечной дисфункции при пневмококковой инфекции в группе старше 65 лет [27]. Образование микроочагов в сердце может нарушать сердечную функцию по нескольким механизмам: прерывание проводящих путей, гибель кардиомиоцитов из-за пневмолизина, потеря сократимости. Ремоделирование сердечной мышцы вследствие отложения коллагена может быть причиной увеличения смертности у людей, перенесших пневмококковую пневмонию, в течение первого года после инфекции [23].

Иммунизация слитным белком, состоящим из рекомбинантного модифицированного пневмолизина L460D и домена СbrA, связывающегося с рецептором к лектину, препятствовала образованию микроочагов у мышей. Эти результаты свидетельствуют о важной роли этих белков в образовании микроочагов в сердце, а также о том, что это повреждение может быть потенциально предотвращено применением вакцины [36]. Интересно, что в опыте на мышах, внутривенное введение рекомбинантного токсичного пневмолизина приводило к повреждениям миокарда, но введение функционально неактивного мутантного токсина не отражалось на состоянии миокарда [23]. Токсичный пневмолизин вызывает повреждение митохондрий, нарушая энергетический обмен в клетке [124]. Аналогично, заражение штаммами *S. pneumoniae*, экспрессирующими пневмолизин, способствовало повреждению миокарда и повышению сердечных тропонинов в сыворотке крови, в то время как заражение штаммами, лишенными пневмолизина, не отражалось на состоянии сердца и уровне маркеров миокардиального повреждения. Сходные данные получены в опыте *in vitro* с клетками миокарда мышей [23].

Также одним из ведущих механизмов, приводящих к сердечно-сосудистым осложнениям у пациентов с внебольничной пневмонией, является патологическая активация тромбоцитов. Активации и агрегации тромбоцитов способствует пневмолизин и многие другие компоненты бактериальной клетки (липотейхоевая кислота, пептидогликаны, эндотоксин) [58].

В настоящее время обсуждается целесообразность препаратов для лечения тяжелой пневмококковой пневмонии, терапевтической мишенью для которых является пневмолизин. Есть данные как о положительном влиянии уже существующих и активно применяемых препаратов, так и новые перспективные стратегии. По механизму действия выделяют 1) ингибиторы цитолитической активности, направленные на связывание с клеточной мишенью и/или олигомеризацию токсина (моноклональные антитела,

холестерол-подобные соединения); 2) ингибиторы синтеза белка (макролиды, макролидоподобные соединения, тетрациклины); 3) ингибиторы синтеза холестерина (статины) 4) антитромбоцитарная терапия (нестероидные противовоспалительные средства, антагонисты пуринергического рецептора) [27]. На данный момент однозначно одобренными к применению в клинической практике для лечения внебольничной пневмококковой пневмонии являются только макролиды [65, 146]. Макролиды ингибируют синтез пневмолизина *in vitro* и *in vivo* [25, 62, 100, 150, 151] и снижают воспаление [100, 154], угнетая синтез интерферонов I и III типов [174] и миграцию нейтрофилов в очаг воспаления [74]. Статины снижают синтез холестерина и, таким образом, являются своеобразными антагонистами пневмолизина [57, 76, 143, 153, 165]. Препараты моноклональных антител к пневмолизину [64], β -ситостерол [46, 77, 102], вербаскозид [177], апигенин [149], аментофлавон [179] находятся на стадии доклинических исследований.

Интересно, что применение FltL3, который является гематопозитическим ростовым фактором и рассматривается в рамках антибактериальных иммунизационных стратегий, в модели легочной инфекции у мышей усиливает накопление субпопуляции ДК CD11b, которые способствуют острому повреждению легких в ответ на штамм *S. pneumoniae*, экспрессирующий пневмолизин. При заражении штаммом *S. pneumoniae*, не содержащим пневмолизин, активация CD11b+ ДК наблюдалась в значительно меньшей степени [38]. Это согласуется с фактом, что при пневмококковой инфекции миграция CD4+ Т-лимфоцитов в область воспаления обусловлена экспрессией пневмолизина, и штаммы, его не содержащие, не вызывают миграцию клеток [89].

Все указанные выше данные свидетельствуют о значительном потенциале атоксичных вариантов пневмолизина в составе пневмококковых вакцин нового поколения.

Заключение к обзору литературы

Пневмококковая инфекция является причиной заболеваний и смертности во всем мире. Протективное действие современных зарегистрированных вакцин связано с наличием в их составе капсульных полисахаридов в свободном или связанном с белком-носителем виде, к которым вырабатываются серотипспецифические антитела. Применение современных вакцин эффективно снизило заболеваемость пневмококковыми инфекциями, однако привело к новым проблемам: к замещению клинически-значимых серотипов пневмококка, входящих в состав полисахаридных вакцин; к увеличению антибиотико-резистентных штаммов *S. pneumoniae*. В настоящее время проходят клинические испытания конъюгированных вакцин, содержащих большее количество капсульных серотипов возбудителя. Это свидетельствует об ограничении существующей стратегии по вакцинопрофилактике пневмококковых заболеваний.

В связи с этим актуальным направлением является разработка пневмококковых вакцин на основе белков патогена. Исследователи выделяют несколько ключевых белков *S. pneumoniae*, в число которых входит пневмолизин. Большое количество доклинических испытаний по выявлению протективных свойств пневмолизина подтверждает важность этого внутриклеточного белка при разработке серотипнезависимой вакцины. Однако, несмотря на положительные результаты в эксперименте, на сегодняшний день в мире нет ни одной зарегистрированной пневмококковой вакцины, содержащей в своем составе пневмолизин. Все это определяет целесообразность продолжения исследований по изучению иммунобиологических свойств данного белка.

ЧАСТЬ II СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1 **Использованные препараты** – рекомбинантный пневмолизин с молекулярной массой 53 кДа¹, который был получен из *S. pneumoniae* с последующим клонированием в *Escherichia coli* штамм M15. Фрагмент ДНК, кодирующий ген пневмолизина *S. pneumoniae* с 6 остатками гистидина на N-конце, клонировали в плазмиду pQE30. Клетки *E. coli* штамма M15 трансформировали ДНК плазмид pQE30-Ply и затем выращивали при 37 °С в коммерческой питательной среде LB. Выращенную культуру *E. coli* штамма M15 центрифугировали, супернатант подвергали аффинной хроматографии. Элюат диализовали против Трис-HCl буферного раствора (pH=8,0), разливали на аликвоты и хранили при -40 °С. Рекомбинантный пневмолизин содержал примесь ЛПС *E. coli*.

- моноклональные антитела IgG1 к пневмолизину (100 мкг/мл, Santa Cruz Biotechnology, USA).

- адьювант Al(OH)₃ («Sigma», США)

-вторичные мышинные антитела(IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), меченые пероксидазой хрена (ThermoScientific)

- клеточная линия Vero, эпителий почки зеленой мартышки (ATCC, USA)

-клеточная линия K-562, хроническая миелогенная лейкемия (ATCC, USA)

¹ Препарат получен и любезно предоставлен сотрудниками НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Д.С. Воробьевым, А.А. Калошиным, А.В. Сидоровым

-коммерческая питательная среда LB

- FITC (флюоресциинизотиоционат) и PE (фикоэритрин) меченые антитела («Caltag Laboratories», США)

-праймеры (Синтол, РФ) [11, 18, 19].

Животные

Мыши линии BALB/c, самцы, массой 14-16 г, возраст 6-7 недель, мыши линии CBA массой 18-20 г, и беспородные мыши массой 14-16 г, были получены из питомника ГУ НЦ Биомедицинских технологий, филиал «Андреевка». Все эксперименты на животных проводили в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217-2014).

1.3 Штаммы

Для заражения животных использовали штаммы *S. pneumoniae* серотипов 3, 4, 5 и 6В, полученные из ЦКП Коллекция ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова. Культивирование *S. pneumoniae* проводили на плотной питательной среде (кровяной агар). Культуральные и микробиологические свойства проверены сотрудниками лаборатории условно патогенных микроорганизмов.

1.4 Оценка токсичности и протективной активности rPly в модели *in vivo*

1.4.1 Метод оценки токсичности в модели *in vivo*

Для изучения токсичности рекомбинантного пневмолизина *in vivo* беспородным мышам и мышам BALB/c вводили внутрибрюшинно рекомбинантный пневмолизин в разных дозах. Наблюдение за общим состоянием животными и определение массы тела мышей проводили в течение 7 дней. Контролем служили интактные животные, которым вводили

0,9%-ный изотонический раствор NaCl. По окончании эксперимента подсчитывали среднюю прибавку массы животных в каждой группе.

1.4.2 Метод оценки протективной активности рекомбинантного атоксичного пневмолизина на экспериментальной модели бактериальной инфекции

Мышей иммунизировали внутрибрюшинно рекомбинантным атоксичным пневмолизином, сорбированным на $\text{Al}(\text{OH})_3$ («Sigma», США) в 0,9 % физиологическом растворе в течение 12 часов при температуре 4°C из расчета 200 мкг $\text{Al}(\text{OH})_3$ на мышь. Рекомбинантный белок вводили двукратно или трехкратно в широком диапазоне доз (от 12,5 мкг/мышь до 100 мкг/мышь) с интервалом 14 дней. Через 2 недели после последнего введения препарата мышей заражали внутрибрюшинно летальными дозами *S. pneumoniae* в диапазоне от 10^3 до 10^6 микробных клеток в 0,5 мл 0,9 % физиологического раствора. Для контроля заражающей дозы использовали интактных животных, которым вводили внутрибрюшинно культуру *S. pneumoniae* в тех же дозах. Величину LD_{50} определяли по формуле Кербера в модификации Ашмарина [1].

$$\lg\text{LD}_{50} = \lg D_N - \delta(\sum L_i - 0,5)$$

D_N – максимальная из испытанных доз,

δ – логарифм кратности разведений доз,

$\sum L_i$ – сумма эффектов (отношение числа павших животных к общему числу зараженных животных на дозу).

Наблюдение за животными проводили в течение 10-14 дней.

1.5 Ведение клеточных линий

Хранение ампул с клеточными линиями осуществлялось в сосудах Дьюара в жидком азоте. Исходно клетки были заморожены в 1 мл сыворотки и 10 % DMSO.

Размораживание ампулы с клетками проводили следующим образом: к 1 мл ампулы с замороженными клетками добавляли 9 мл эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), центрифугировали 5 мин 1000 об/мин, удаляли сыворотку, ресуспендировали осадок и доводили средой до необходимого объема.

Работу с клеточными линиями проводили во флаконах T25 и T75 («GreinerBio-One», Austria) в питательной среде MEM («Gibco», США) или C-199 («Gibco») в присутствии 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («HyClone», США), 1 mM глутамина («Gibco») и 100 мкг/мл гентамицина («Gibco»). Клетки инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. При получении монослоя клеток проводили пересев культуры. Для этого клетки снимали раствором TrypLE Express («Gibco»), содержащим раствор трипсина, версена и феноловый красный. Для определения жизнеспособности клеток в клеточной суспензии клетки окрашивали 0,2 % раствором трипанового синего («Gibco»). Подсчет клеток проводили в камере Горяева согласно методике [21].

1.6 Культивирование штамма-продуцента *E. coli* M15 для получения серий препарата рекомбинантного пневмолизина

Штамм-продуцент рекомбинантного пневмолизина *E. coli* M15 был получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболенск»).

Для получения серий препарата рекомбинантного пневмолизина проводили культивирование штамма-продуцента *E. coli* M15 в жидкой коммерческой среде LB с канамицином и ампициллином. Рост бактерий контролировали по оптической плотности (ОП) на ФЭК-56ПМ при длине волны 565 нм. Во время культивирования с периодичностью 1 ч отбирали образцы объемом 1 мл для измерения ОП среды с помощью фотоэлектроколориметра и последующей постановки электрофореза и иммуноблотинга с целью подтверждения синтеза рекомбинантного

пневмолизина. После достижения ОП среды 0,7 Ед (через 2-4 ч культивирования) для индукции экспрессии рекомбинантного белка пневмолизина добавляли 1М изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 1mM и продолжали культивирование в течение 4-х ч. После этого бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20 мин. Полученный осадок замораживали при -20°C .

Затем бактериальные клетки лизировали в 8М буферном растворе мочевины, полученный лизат центрифугировали при 10000 об/мин. Супернатант переносили в колбу и добавляли к нему Ni-сефарозу из расчета 1 мл суспензии на 25 мл лизата. Раствор инкубировали 2 ч при комнатной температуре в шейкере при 60 об/мин, после чего пропускали через колонку с Ni-сефарозой и хроматографически очищали с помощью системы Biologic LP (Bio-Rad, Германия).

Диализ проводили против 50 mM буферного раствора трис-HCl (pH=8,0). Использовали диализные мешки Sigma-Aldrich (D9777-100FT, USA). Полученную серию белка разливали на аликвоты и хранили при -40°C .

1.7 SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблоттинг

Для подтверждения синтеза рекомбинантного пневмолизина использовали вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле по Лэммли [99] и иммуноблоттинг. Электрофорез выполняли согласно общепринятому протоколу с использованием набора оборудования (PowerPac™ Universal 100-120/220-240V, Protean II xi 2-D Cell/Protean II xi Slab Cell, фирма Bio-Rad Laboratories Ltd, Германия) в 12% ПААГ при силе тока 15 мА.

При выполнении иммуноблоттинга по завершении электрофореза белковые полосы переносили на нитроцеллюлезную мембрану. Полусухой перенос осуществляли горизонтально на трансблоттере (Trans-Blot® SD Cell,

Bio-Rad, USA) в течение 1 ч. После этого проводили адсорбцию первичных моноклональных IgG1-антител к пневмолизину («Santa Cruz» Biotechnology Inc., Europe) при комнатной температуре в течение 2-х часов. Для адсорбции вторичных антител проводили инкубацию 1 ч при комнатной температуре с конъюгатом anti-mouse IgG1 (Rockland Immunochemicals, USA) в разведении 1:10000. После этого отмывали несвязавшиеся вторичные антитела. Для проявления комплекса антиген-антитело использовали диаминобензидин с H₂O₂ в фосфатно-солевом буфере (ФСБ).

1.8 LAL-тест

Содержание эндотоксина в препарате определяли в гель тромб ЛАЛ (Limulus amoebocyte lysate)-тесте PYROGENT[®] компании CAMBREX Bioscience (США). Постановка теста выполнялась в соответствии с ОФС.1.2.4.0006.15 для количественного содержания бактериальных эндотоксинов в испытуемом препарате [3].

1.9 Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

Для постановки ИФА проводилась сорбция гаРly в концентрации 2,5 мкг/мл в ФСБ (фирма «Sigma», США) на дне лунок плоскодонных полистироловых планшетов ВНИИ «Медполимер». В течение 2-х часов проводилась инкубация при температуре 37 °С. Затем планшеты помещались на ночь при температуре 4 °С. После сорбции в лунки вносили исследуемую сыворотку в последовательных двукратных или трехкратных разведениях, в буферном растворе ФСБ с 0,05 % Tween 20 (фирма «Panreac Sintesis», Испания), в объеме 100 мкл/лунка. Проводилась инкубация сыворотки в термостате в течение 1 ч при 37 °С. Сыворотка трехкратно отмывалась раствором ФСБ + Tween 20 в объеме 200 мкл/лунка, после чего добавляли соответствующий видоспецифичный конъюгат в рабочем разведении в объеме 100 мкл /лунка и инкубировали 1 ч при 37 °С. После трехкратного отмывания конъюгата с помощью ФСБ с Tween 20 в объеме 200 мкл/лунка, добавляли

тетраметилбензидин (ТМБ) (ООО НПО «БиоТест Системы», Россия) в объеме 100 мкл/лунка. Реакцию останавливали через 20 мин 1М раствором H_2SO_4 (фирма «Sigma», США). Оптическую плотность определяли с помощью ИФА-ридера («iMark», Япония) при длине волны 450 нм. В качестве контроля использовали сыворотки интактных мышей.

1.10 Реакция ингибирования ИФА

Для определения антигенной активности рекомбинантного пневмолизина во все лунки планшета с адсорбированным на их поверхности гаРлу прибавляли рабочее разведение сыворотки (1:150) в ФСБ с Tween 20 в объеме 90 мкл в расчете на лунку. В первые два ряда к сыворотке прибавляли 10 мкл ФСБ, а в остальные опытные лунки – гаРлу в трех концентрациях (0,027; 0,27 и 2,7 мкг/лунка) в ФСБ в объеме 10 мкл в расчете на лунку. Инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Трехкратно отмывали раствором ФСБ с Tween 20 в объеме 200 мкл в расчете на лунку и прибавляли рабочее разведение конъюгата. Инкубировали 45 мин при 37 °С. Трехкратно отмывали раствором ФСБ с Tween 20 в объеме 200 мкл в расчете на лунку. Затем вносили 100 мкл ТМБ в качестве проявляющего реагента. Через 15 мин реакцию останавливали 1 М раствором H_2SO_4 . Оптическую плотность определяли на ИФА-ридере при длине волны 450 нм. Торможение рассчитывали по формуле: $100\% - x$, где 100 % – оптическая плотность сыворотки (OP_{450}) до внесения антигена, x – активность сыворотки (%) после прибавления антигена.

1.11 Культивирование дендритных клеток

Для получения предшественников ДК, мышей линии СВА выводили из опыта под эфирным наркозом. В стерильных условиях извлекали бедренные кости и промывали костномозговой канал средой RPMI-1640 («Sigma», США). Костный мозг гомогенизировали в среде RPMI-1640, трижды осаждали центрифугированием (1000 об/мин) и переводили в обогащенную

среду культивирования (10^6 клеток в 1 мл среды RPMI-1640 с добавлением 0,1 мг/мл гентамицина сульфата («Sigma») и 10 % термоинактивированной ЭТС). Для развития популяции ДК, к суспензии клеток костного мозга добавляли 80 нг/мл мышинового рекомбинантного GM-CSF и 20 нг/мл IL-4 («BioSource International, Inc.», Бельгия). На 3-и сутки проводили повторную цитокиновую стимуляцию. На 6-е сутки инкубации производили смену среды, а для индукции созревания ДК добавляли гаPly в концентрации 5 мкг/мл. В качестве референс-препарата использовали классический индуктор созревания ДК - TNF- α (20 нг/мл) [1]. Контролем являлись незрелые ДК. На ДК после воздействия гаPly определяли экспрессию TLR2, TLR4, TLR9, а также маркеры созревания ДК: CD14, CD38/CD14, CD34, CD11c, CD38, CD80, CD86, CD80/CD86, CD11c/CD83, CD83, CD83, МНС II.

1.12 Метод проточной цитометрии для анализа фенотипа дендритных клеток

Экспрессию поверхностных маркеров ДК изучали с помощью моноклональных антител («Caltag Laboratories», США). Клетки отмывали холодным ФСБ и обрабатывали FITC (флюоресциинизотиоционат) и PE (фикоэритрин) мечеными антителами согласно инструкции производителя. Результаты учитывали на проточном цитометре Cytomix FC-500 («Beckman Coulter», США). На ДК, полученных из клеток костного мозга мышей, исследовали уровень экспрессии поверхностных рецепторов (TLR2, TLR4 и TLR9) и молекул (CD14, CD38/CD14, CD34, CD11c, CD38, CD80, CD86, CD80/CD86, CD11c/CD83, CD83, CD83, МНС II). Данные анализировали после выделения логического гейта (окна) клеточной популяции в dot/plot распределении клеток по их линейному переднему (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. При учете результатов анализировали минимум 5000 событий в гейте. Статистическая обработка материалов проведена при помощи программного пакета WinMdi.

1.13 ПЦР в реальном времени

Для получения образцов для постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени культивировали клетки линии K-562 в 12-луночном планшете (Corning), в присутствии гаРly в разных концентрациях и осуществляли забор проб в разные временные точки. В качестве контроля использовали интактные клетки во всех временных точках в одинаковом объеме среды при равномерном засеивании клеток. Клетки вместе со средой после забора пробы из лунки центрифугировали при 3000 об/мин, супернатант удаляли, к клеточному осадку добавляли 300 мкл лизирующего буфера и проводили выделение смеси РНК+ДНК.

Выделение смеси РНК+ДНК проводили из клеток линии K-562 после центрифугирования (3000 об/мин) и обработки лизирующим буфером (набор для выделения РНК «Рибо-сорб») согласно инструкции.

После выделения по 1 мкл образца вносили в отдельные пробирки для определения концентрации РНК с помощью NanoDrop.

Для постановки реакции обратной транскрипции после выделения РНК к 5 мкл образца добавляли 1 мкл OligoDT, 1 мкл Random, 8 мкл H₂O MQ (Синтол). Смесь инкубировали 3 мин при температуре 75 °С для присоединения неспецифических затравок, затем еще 3 мин при 4°С. К образцу после инкубации добавляли 1 мкл ревертазы и 12 мкл реакционной смеси (нуклеотиды) и инкубировали 40 мин при 40°С. Реакцию останавливали нагреванием до 92 °С в течение 5 мин. Полученную кДНК хранили при температуре -72 °С.

Для постановки ПЦР использовали набор реагентов Синтол. На 1 пробу образца, содержащего кДНК (3 мкл), вносили 1,5 мкл интеркалирующего красителя Sybr green, 1,5 мкл dNTP, 5,5 мкл деионизированной воды, 0,2 мкл Tag-полимеразы, 1,5 мкл MgCl₂, по 1 мкл специфических праймеров (reverse и forward).

Стандартизацию проводили по уровню экспрессии гена β -актина в культуре клеток как с добавлением препарата, так и без добавления препарата [104].

Постановку ПЦР-РВ проводили на детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология»), используя методику [11, 18, 19, 78, 79].

1.14 МТТ-тест

Определение токсичности рекомбинантного пневмолизина проводили МТТ-тестом на клетках почки зеленой мартышки Vero (ATCC, USA). В 96-луночные планшеты засеивали по $1,5 \times 10^4$ индуцированных белком в разных концентрациях (2,5, 5, 10 и 25 мкг/мл) или контрольных клеток на лунку в 150 мкл ростовой среды. Клетки инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ в течение 3-96 ч. Через 3, 12, 24, 48 и 96 ч в лунки добавляли 3-(4,5-диметилтиазол-2)2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) в объеме 25 мкл и инкубировали 4 ч при соответствующей температуре. Исходная концентрация вещества составляла 5 мг/мкл. Затем удаляли среду и добавляли 60 мкл DMSO на лунку для растворения образовавшихся кристаллов фиолетового формазана. Для гомогенного распределения красителя использовали шейкер в течение 10 мин при 300 об/мин. Анализ оптической плотности проводили на микропланшетном детекторе Anthos Zenith 3100 при 595 нм в 3-х независимых повторах. Результат вычисляли в % жизнеспособных клеток.

1.15 Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью параметрической и непараметрической базовой статистики с использованием критерия Стьюдента, применяя стандартный пакет статистических программ BioStat, Excel, Statistica 10 и WinMdi. Анализ выживаемости мышей оценивали с помощью логрангового критерия [12].

ГЛАВА 2 ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРИЙ ПРЕПАРАТА РЕКОМБИНАНТНОГО ПНЕВМОЛИЗИНА

Необходимо было наработать несколько серий препарата рекомбинантного пневмолизина с целью дальнейшего изучения его иммунобиологических свойств.

В результате культивирования бактериального штамма-продуцента *E. coli* M15 в жидкой питательной среде LB было получено две серии препарата рекомбинантного пневмолизина с примерно одинаковой концентрацией белка, измеренной с помощью спектрофотометра Genesis6. I серия рекомбинантного пневмолизина содержала 525 мкг/мл белка, а II серия – 500 мкг/мл белка соответственно (табл. 1). Поскольку пневмолизин получали в бактериальной культуре *E. coli*, решено было определить примесь ЛПС с помощью LAL-теста. I серия препарата содержала эндотоксин *E. coli* в концентрации от 240 до 480 ЕС/мл, II серия препарата содержала эндотоксин *E. coli* в 4 раза меньше – от 60 до 120 ЕС/мл (табл. 1).

Таблица 1. Общий выход рекомбинантного пневмолизина и примесь ЛПС в препарате в зависимости от объема среды культивирования

Серия препарата	Объем среды культивирования, л	Объем супернатанта лизата бактериального вектора перед аффинной хроматографией, мл	Выход препарата	Диапазон концентраций эндотоксина, ЕС/мл
I	4	125	25 мг	240-480
II	16	250	110 мг	60-120

I серия препарата была получена в результате культивирования генно-инженерного штамма *E. coli* M15 в коммерческой питательной среде LB в объеме 4-х л. Общий выход рекомбинантного белка после аффинной хроматографии составил 25 мг. Для большего выхода препарата решено было увеличить объем культивирования. Таким образом, II серия рекомбинантного пневмолизина была получена в результате объединения клеточной массы 4-х последовательных культивирований бактериального штамма *E. coli* M15 (рис.1). Общий объем культивирования во втором случае составил 16 л жидкой питательной среды LB. Выход рекомбинантного белка пневмолизина составил примерно 110 мг.

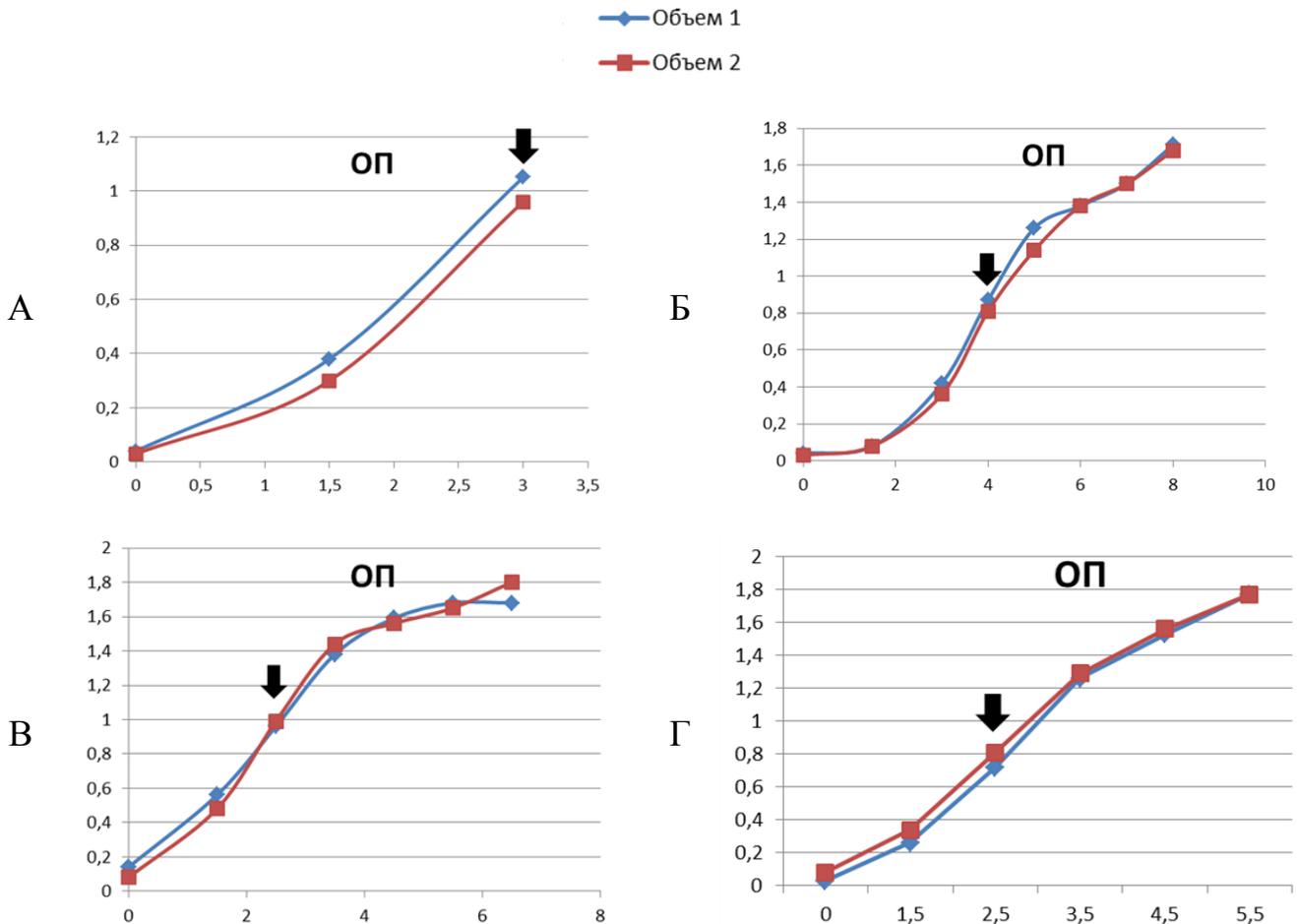


Рис. 1. Культивирование бактериального штамма *E. coli* M15, содержащего вектор pQE30 с геном *ply*, кодирующим синтез пневмококкового рекомбинантного белка пневмолизина.

Примечание. На рисунке представлены результаты отдельных культивирований (А-Г) Культивирование осуществляли в 2-х бутылках в объеме 2-х л каждый (объем 1 и 2 соответственно). Стрелками указано время добавления изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) – индуктора синтеза рекомбинантного белка пневмолизина. ОП – оптическая плотность.

При наработке II серии препарата рекомбинантного пневмолизина после каждого очередного культивирования наличие специфического белка определяли с помощью вертикального электрофореза с последующим подтверждением в реакции иммуноблоттинга с использованием коммерческих моноклональных антител. В качестве контроля использовали осажденную биомассу до добавления ИПТГ, стимулирующего синтез рекомбинантного пневмолизина.

На рис.2А видно, что до прибавления индуктора экспрессии синтеза пневмолизина ИПТГ видна слабозаметная полоса (трек 1), соответствующая молекулярной массе 53 кДа, что свидетельствует о незначительной спонтанной продукции rPlu. После добавления ИПТГ на электрофореграмме во всех исследованных образцах (треки 2-3 и 5-9) видны четкие полосы белка, доказывающие увеличение синтеза rPlu в клетках *E. coli* в течение 1, 2-х, 3-х и 4-х ч культивирования. Продукция рекомбинантного белка была отмечена во всех временных точках, в которых проводили отбор проб для подтверждения синтеза rPlu. Таким образом, экспериментальным путем установлено, что для получения рекомбинантного белка культивирование штамма-продуцента *E. coli* штамма M15 нужно проводить не более 4-х ч. На электрофореграмме, кроме rPlu, обнаружены белки с другой молекулярной массой, которые впоследствии были удалены при проведении аффинной хроматографии.

Для установления подлинности полученного рекомбинантного белка проводили иммуноблоттинг с моноклональными антителами к пневмолизину. Доказано присутствие rPlu с молекулярной массой 53 кДа (рис. 2Б).

Такие же результаты были получены при проведении 3-х последующих культивирований (рис. 3А-5А и рис. 3Б-5Б).

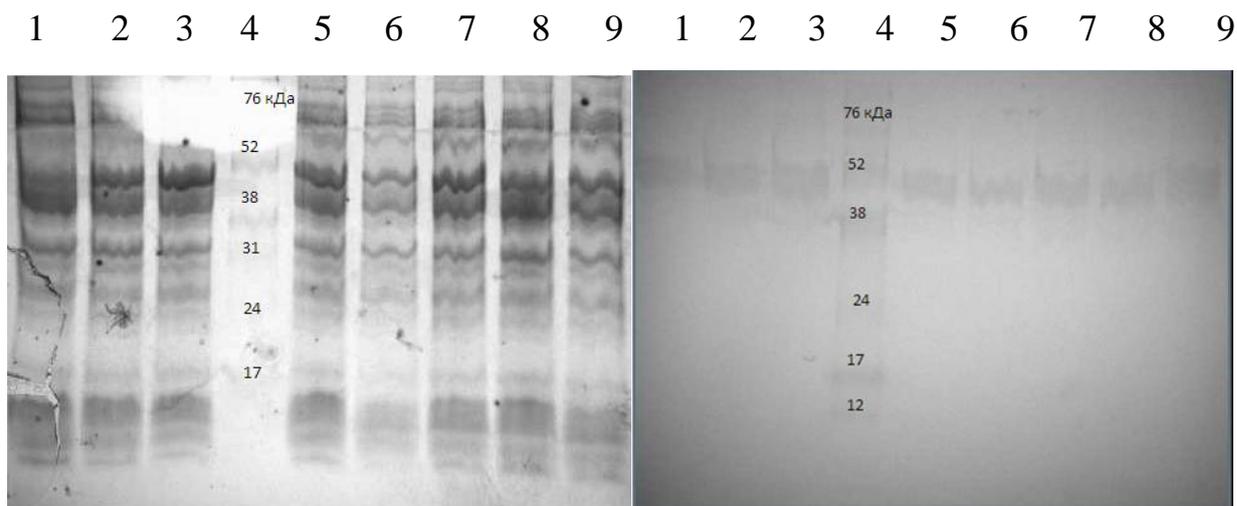


Рис. 2А

Рис. 2Б

Результаты электрофореза в 12 % ПААГ и нитроцеллюлезная мембрана после иммуноблоттинга

1 дорожка – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, без добавления ИПТГ

2,3 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 1 час

4 дорожка – маркер молекулярной массы

5 дорожка – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 2 часа

6,7 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 3 часа

8,9 дорожки – дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 4 часа

1 2 3 4 5 6 7 8 9 2 3 4 5 6 7 8 9

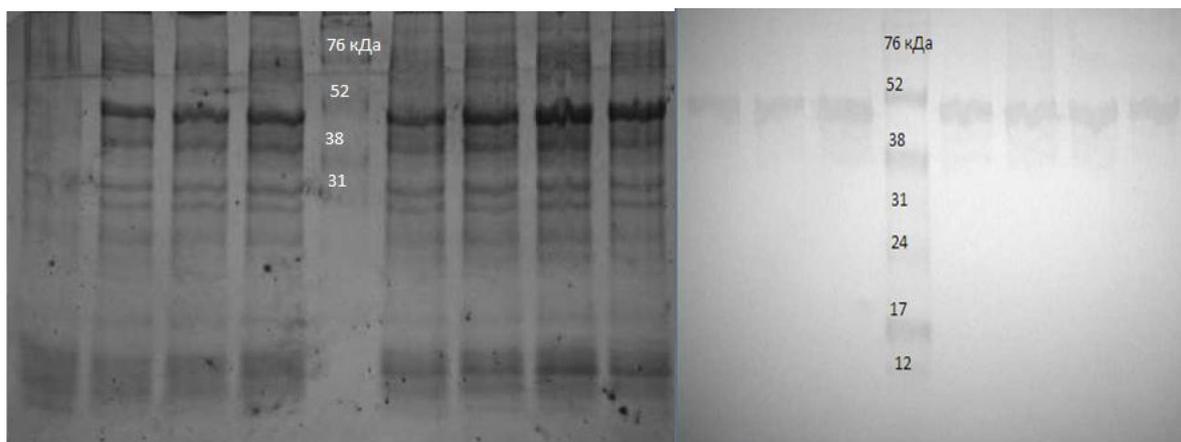


Рис. 3А

Рис. 3Б

Результаты электрофореза в 12 % ПААГ и нитроцеллюлезная мембрана после иммуноблоттинга

1 дорожка – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, без добавления ИПТГ

2,3 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 1 час

4 дорожка – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 2 часа

5 дорожка – маркер молекулярной массы

6,7 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 3 часа

8,9 дорожки – дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 4 часа

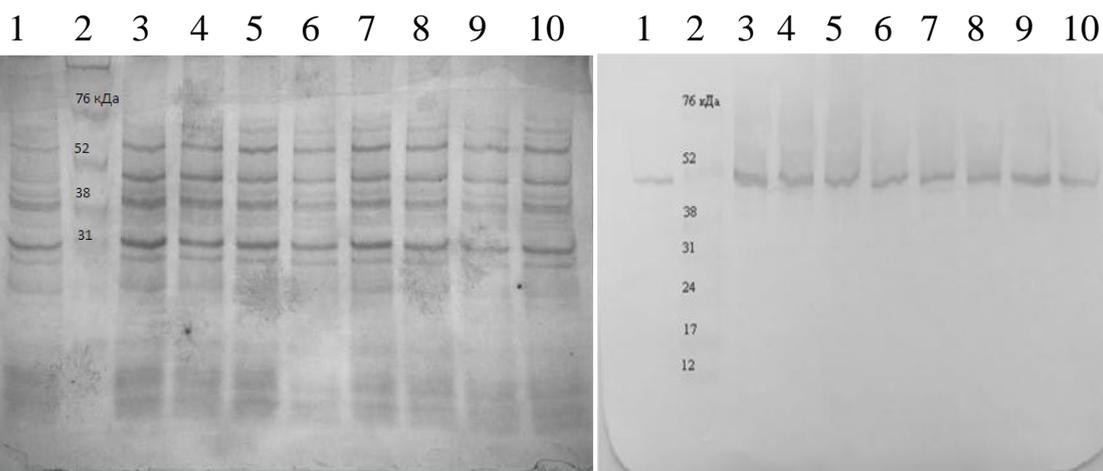


Рис. 4А

Рис. 4Б

Результаты электрофореза в 12 % ПААГ и нитроцеллюлезная мембрана после иммуноблоттинга

1 дорожка – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, без добавления ИПТГ

2 дорожка – маркер молекулярной массы

3,4 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 1 час

5,6 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 2 часа

7,8 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 3 часа

9,10 дорожки – дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 4 часа

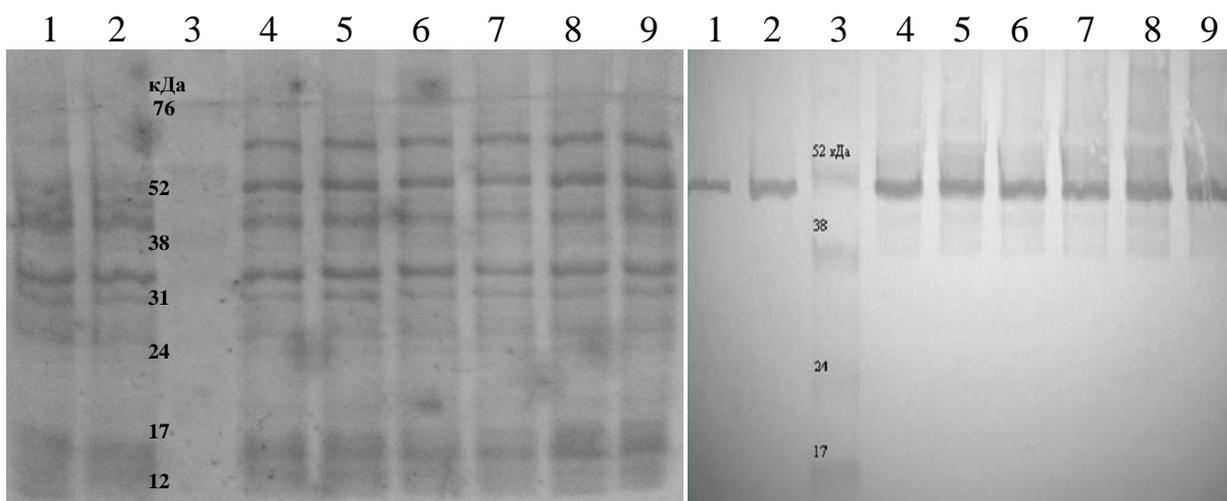


Рис. 5А

Рис. 5Б

Результаты электрофореза в 12 % ПААГ и нитроцеллюлезная мембрана после иммуноблоттинга

1, 2 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, без добавления ИПТГ

3 дорожка – маркер молекулярной массы

4, 5 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 1 час

6, 7 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 2 часа

8, 9 дорожки – антигены, полученные при культивировании штамма-продуцента *E. coli*, с добавлением ИПТГ через 3 часа

Осажденную бактериальную культуру *E. coli*, в которой проводили синтез rPly, полученную в результате 4-х последовательных культивирований в жидкой питательной среде LB, перед аффинной хроматографией объединили во II серию препарата. После чего был получен очищенный рекомбинантный белок и проведен вертикальный электрофорез в 12 % ПААГ 2-х серий препарата rPly с подтверждением в реакции иммуноблоттинга с использованием коммерческих моноклональных антител к пневмолизину (рис. 6А и 6Б).

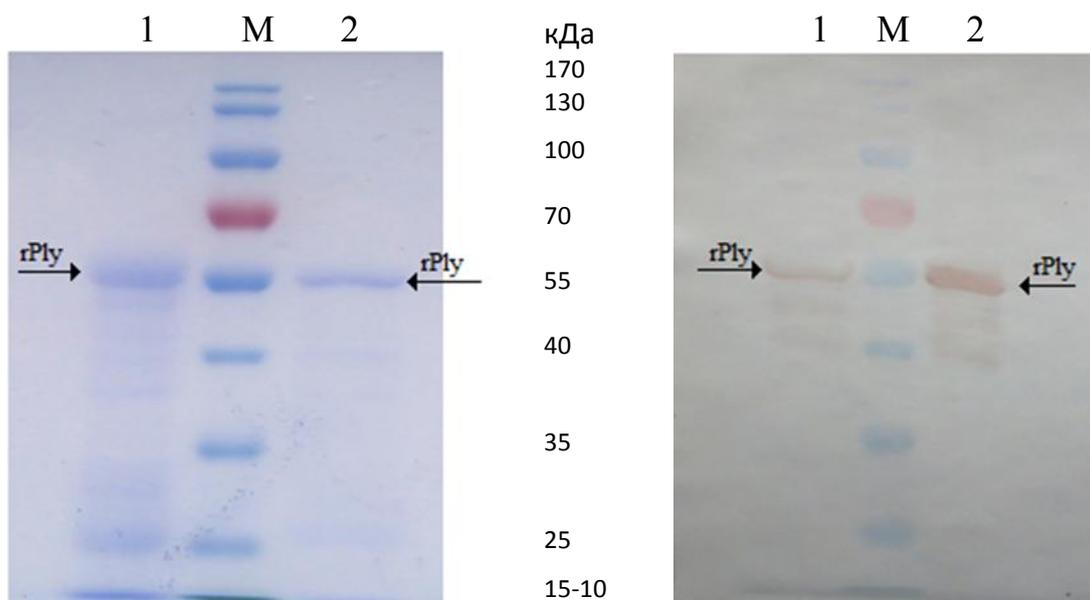


Рис. 6А

Рис. 6Б

Результаты электрофореза в 12 % ПААГ и нитроцеллюлезная мембрана после иммуноблоттинга

1 дорожка – 1 серия препарата после хроматографической очистки М - маркер молекулярной массы

2 дорожка – 2 серия препарата после хроматографической очистки

Заключение

В результате культивирования бактериального штамма-продуцента *E. coli* M15 в жидкой питательной среде LB в объеме 4-х л была получена I серия препарата, которая содержала белок в концентрации 525 мкг/мл, примесь ЛПС в интервале от 240 до 480 ЕС/мл, а общий выход пневмолизина составил 25 мг. С целью наработки рекомбинантного белка был увеличен объем культивирования до 16 л и отработаны условия для выращивания генно-инженерного штамма M15 *E. coli*. В итоге получена II серия препарата, которая содержала белок в концентрации 500 мкг/мл, примесь ЛПС в интервале от 60 до 120 ЕС/мл, а общий выход пневмолизина составил 110 мг. Примечательным является тот факт, что содержание примеси ЛПС во II серии препарата позволяет применять его в клинических испытаниях на взрослом контингенте [3].

ГЛАВА 3 ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПНЕВМОЛИЗИНА

Поскольку исходно пневмолизин является токсином, решено было проверить его биологические свойства. Токсичность rPlу изучали в культуре клеток *in vitro* и в модели *in vivo* на беспородных и белых линейных мышах BALB/c.

3.1 МТТ-тест

С помощью МТТ-теста была оценена жизнеспособность клеток клеточной линии Vero (эпителий почки зеленой мартышки) при добавлении в среду rPlу в концентрациях 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 25 мкг/мл на протяжении 96 ч. При концентрации rPlу 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл ни в одной из временных точек (3, 12, 24, 48 и 96 ч соответственно) не наблюдали значимой гибели клеток по сравнению с отрицательным контролем (табл.2). Процент живых клеток варьировался от $74 \pm 3,7$ % до $161 \pm 4,6$ %, с учетом того, что за 100 % принимали жизнеспособность клеток в положительном контроле (без добавления rPlу) в той же временной точке. Для концентрации рекомбинантного белка 25 мкг/мл и отрицательного контроля наблюдали другую закономерность: в первых двух временных точках клетки демонстрировали рост, сопоставимый с ростом клеток в положительном контроле, а затем отмечалось снижение жизнеспособности клеток до значений $34 \pm 2,4$ % и 9,2 % соответственно.

Таблица 2. Оценка токсичности рекомбинантного пневмолизина на клеточной линии Vero *in vitro*

Время экспозиции, часы	Концентрации rPlу, рост клеток в %					
	2,5 мкг/мл	5 мкг/мл	10 мкг/мл	25 мкг/мл	K+***	K-***
3	$74 \pm 3,7$	$93 \pm 8,7$	$89 \pm 25,2$	$91 \pm 16,1$	100	100

12	100±2,8	99±1,5	95±3,1	112±3,6	100	122
24	107±12	117±16	91±7,4	68±6,6*	100	48,6
48	107±9,9	103±11,1	88±5,1	63±1,4*	100	47,5
96	161±4,6	137±6,5	92±14,3	34±2,4*	100	9,2

Примечание:

*- значимая разница с положительным контролем, $p < 0,05$

** - за положительный контроль принимали клетки в среде MEM без добавления rPly

*** - за отрицательный контроль принимали клетки в среде MEM с добавлением DMSO

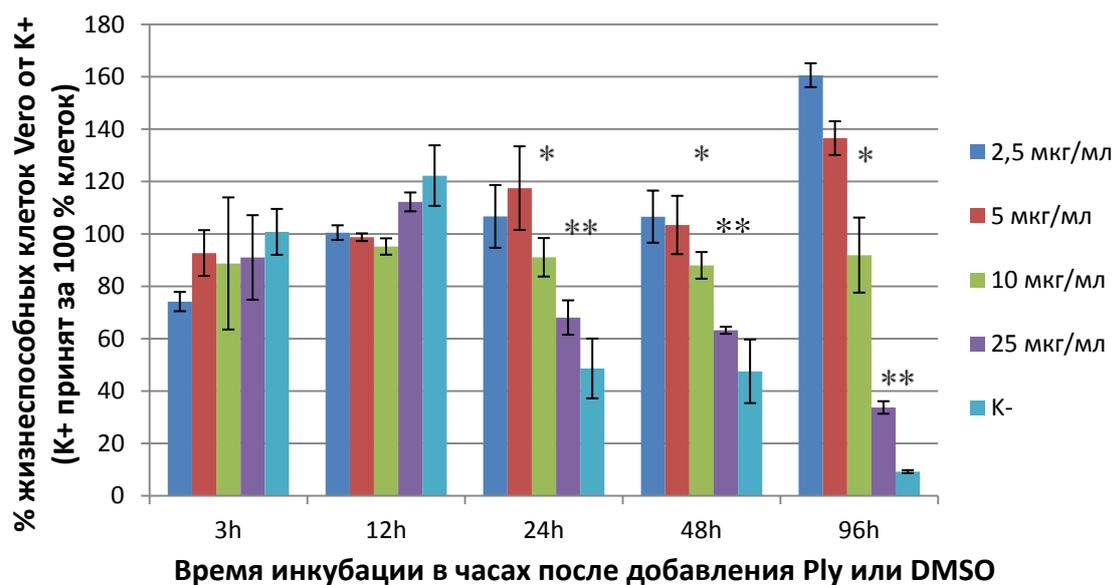


Рис. 7. Жизнеспособность клеток Vero после добавления рекомбинантного пневмолизина в разных концентрациях, изученная в МТТ-тесте

Примечание:

*- отсутствие значимой разницы с положительным контролем, $p > 0,05$

** - значимая разница с положительным контролем, $p < 0,05$

K- за отрицательный контроль принимали клетки, к которым прибавляли DMSO

3.2 Токсичность на животных

Для изучения токсичности rPly использовали две серии препарата. Линейным мышам BALB/c вводили внутривенно рекомбинантный белок в дозах 12,5 мкг/мышь, 25 мкг/мышь, 50 мкг/мышь и 100 мкг/мышь соответственно. Контролем служили интактные животные и масса опытных мышей перед началом эксперимента. Наблюдение за животными проводили в течение 7 дней.

После однократного внутривенного введения rPly, адсорбированного на гидроксиде алюминия, масса иммунизированных мышей не отличалась от группы контроля (мыши, получавшие однократно 0,9%-ный NaCl) на протяжении всего эксперимента. Было выявлено, что I серия препарата rPly в широком диапазоне доз от 12,5 мкг/мышь до 100 мкг/мышь не обладала токсичностью (табл. 3). У всех животных наблюдали прибавку массы тела. Для выбранной иммунизирующей дозы рекомбинантного пневмолизина – 25 мкг/мышь – подтверждено отсутствие токсичности в двух последующих независимых опытах (табл. 4 и 5).

Таблица 3. Оценка достоверности разницы с контролем в прибавке веса мышей в течение 7 суток (n=14) по критерию Стьюдента

Препарат	Серия	M±SD	t	p
rPly 12,5 мкг/мышь + 200 мкг Al(OH) ₃	I	17,66±1,35	- 1,544	0,145
rPly 25 мкг/мышь + 200 мкг Al(OH) ₃	==/=	19,07±1,53	0,414	0,685
rPly 50 мкг/мышь + 200 мкг Al(OH) ₃	==/=	19,45±1,81	0,831	0,42
rPly 100 мкг/мышь + 200 мкг Al(OH) ₃	==/=	20,28±1,91	1,773	0,098
Контроль	-	18,76±1,49	-	-

Таблица 4. Оценка достоверности разницы с контролем в прибавке веса мышей в течение 7 суток (n=14) по критерию Стьюдента

Препарат	Серия	M±SD	t	p
rPly 25 мкг/мышь + 200 мкг Al(OH) ₃	II	17,55±0,71	0,516	0,614
Контроль	-	17,33±0,96	-	-

Таблица 5. Оценка достоверности разницы с контролем в прибавке веса мышей в течение 7 суток (n=12) по критерию Стьюдента

Препарат	Серия	M±SD	t	p
rPly 25 мкг/мышь + 200 мкг Al(OH) ₃	II	17,27±0,7	- 0,505	0,623
Контроль	-	17,47±0,77	-	-

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют об отсутствии токсичности rPly в опытах *in vitro* и *in vivo*. Выявленные новые биологические свойства рекомбинантного белка позволили описывать его как рекомбинантный атоксичный пневмолизин (raPly).

ГЛАВА 4 ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО АТОКСИЧНОГО ПНЕВМОЛИЗИНА

Настоящий раздел работы был спланирован таким образом, чтобы изучить иммунобиологические свойства рекомбинантного атоксичного пневмолизина (гаРly). Для этой цели использовали двукратную или трехкратную внутрибрюшинную иммунизацию мышей с интервалом 7-14 дней разными дозами гаРly с последующим определением специфических титров IgG-антител к белку в сыворотке крови животных.

Для оценки протективного действия гаРly использовали разные схемы введения препарата и разные серотипы бактерии *S. pneumoniae* для заражения животных.

4.1 Предварительные экспериментальные данные по протективной активности, иммуногенности и специфичности гаРly

Для первоначального исследования протективной активности препарата мышей линии BALB/c иммунизировали 30 мкг/мышь гаРly внутрибрюшинно двукратно с интервалом 1 неделя. Препарат был адсорбирован на Al(OH)₃ из расчета 200 мкг /мышь. Выявлено, что гаРly защищал мышей на вторые сутки опыта, когда в контроле наблюдали гибель 70 % животных, в то время как в группе иммунизированных мышей отмечали 87,5 % выживаемость (табл. 6). Однако, начиная с третьих суток наблюдения, разницу между опытной и контрольной группами не определяли.

Таблица 6. Задержка гибели животных при двукратной иммунизации рекомбинантным атоксичным пневмолизинном

Группа	Иммунизирующая доза гаPly	Титр анти-тел IgG1	Заражающая доза <i>S. pneumoniae</i> тип 3 №3	Дни наблюдения*				
				1	2	3	7	14
1	30 мкг /мышь	800	10^5	8/8	1/8	1/8	1/8	1/8
			10^4	10/10	2/10	1/10	1/10	1/10
			10^3	8/8	7/8**	2/8	2/8	2/8
Контроль ная	0,9 % NaCl	-	10^5	10/10	3/10	3/10	3/10	3/10
			10^4	14/14	10/14	8/14	8/14	8/14
			10^3	10/10	3/10	3/10	3/10	3/10

Примечание:

*- выживаемость – отношение выживших мышей на день наблюдения, в знаменателе – число зараженных мышей;

** - достоверность разницы между опытом и контролем, критерий значимости $Z = 2,47$ ($p < 0,05$) при $Z \geq 1,96$ при сравнении кривых выживаемости по С.А. Гланцу [12].

Для изучения иммуногенности рекомбинантного пневмолизина использовали экспериментальную лабораторную ИФА тест-систему с отработкой условий сорбции антигена на твердой фазе. Для этого применяли концентрации 0,7 мкг/мл; 1,8 мкг/мл; 2,25 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 2,7 мкг/мл; 5 мкг/мл и 5,4 мкг/мл. Концентрация антигена 2,5 мкг/мл для сорбции была выбрана в ряде экспериментов как наиболее оптимальная среди концентраций в диапазоне от 0,7 мкг/мл до 5,4 мкг/мл.

Была получена пуловая сыворотка группы мышей (n=6), иммунизированных по этой же схеме. После тотального забора крови в

пуловой сыворотке определяли изотипы IgM и IgG, субизотипы IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 с помощью коммерческих вторичных антител к мышинным антителам, меченых пероксидазой хрена. В сыворотках иммунизированных и интактных мышей выявлен высокий уровень IgM и IgG-антител (рис. 8). В сыворотках иммунизированных мышей в высоком титре определяли IgG1-антител к гаРly, антител других изотипов (IgG2a, IgG2b и IgG3) не выявлено, что соответствует данным научной литературы [22]. На основании этого дальнейшие исследования проводили только с определением уровня IgG1-антител.

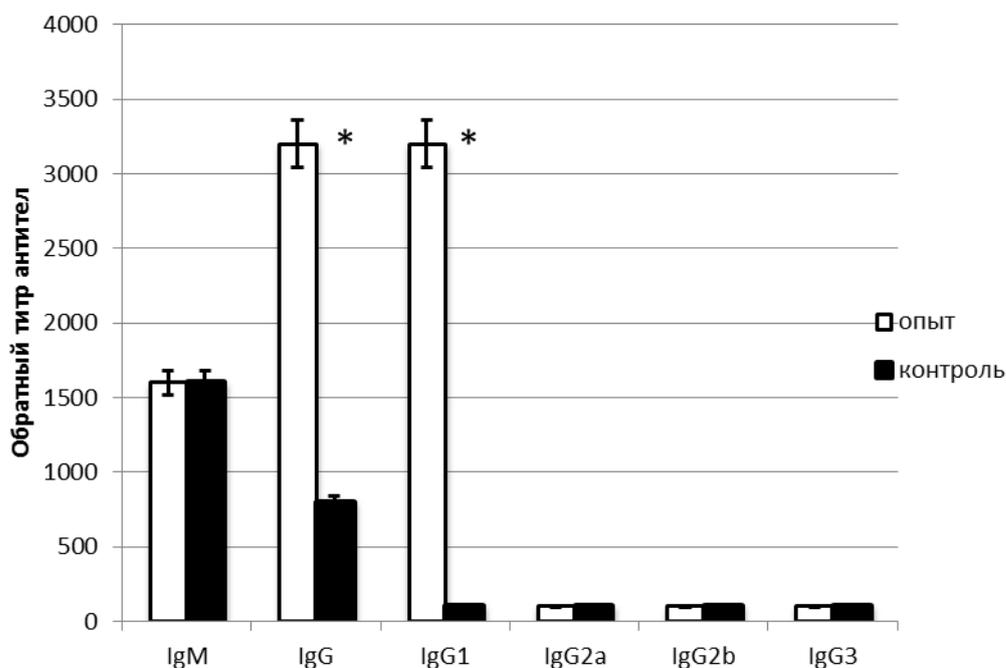


Рис. 8. Титр специфических антител к гаРly

Примечание. 2-кратная иммунизация гаРly дозой 30 мкг/мышь с интервалом 7 суток. Пуловую сыворотку получали от мышей BALB/c (n=6) через 7 суток после последней иммунизации. В качестве контроля использовали сыворотку интактных мышей.

Оценка специфичности антител к raPly

Для сыворотки, полученной по приведенной выше схеме иммунизации, была изучена специфичность антител субизотипа IgG1 к raPly. Как следует из рисунка 9, оптическая плотность продуктов реакции уменьшалась в 2 раза при прибавлении к сыворотке, содержащей антитела к raPly, рекомбинантного белка в концентрации 3 мкг/лунка (IC_{50}). Таким образом, raPly обладал способностью ингибировать связывание сывороточных антител к белку с сорбированным на твердой фазе raPly. Для усиления способности антител связывать исследуемый антиген, вероятно, требуется повышение их аффинности при увеличении дозы и кратности иммунизации мышей. В последующих экспериментах для оценки выработки антител осуществляли забор индивидуальных сывороток крови мышей из хвостовой вены.

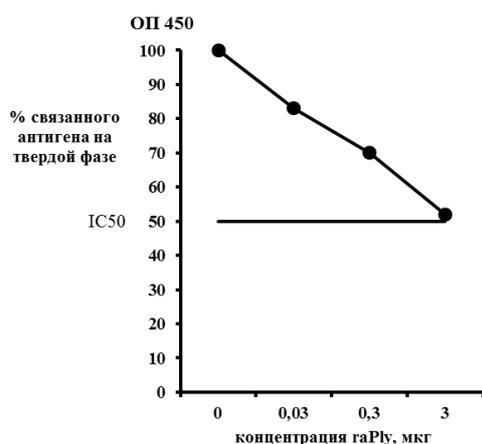


Рис. 9. Антигенсвязывающая способность антител к raPly в реакции ингибирования ИФА

Примечание. Рабочее разведение сыворотки 1:1600. Вторичные антитела — IgG1, конъюгированные с пероксидазой. IC_{50} — 50%-ная ингибирующая концентрация raPly, вызывающая уменьшение оптической плотности продуктов реакции в 2 раза.

4.2 Подбор иммунизирующей дозы и оптимальной схемы иммунизации *raPly*

Для подбора оптимальной дозы и схемы иммунизации 4 группы белых беспородных мышей (самки, $n=6$) были иммунизированы внутривбрюшинно трехкратно с интервалом 14 дней разными дозами *raPly*: 12,5 мкг/мышь, 25 мкг/мышь, 50 мкг/мышь и 100 мкг/мышь соответственно. Сорбцию *raPly* на гидроксиде алюминия производили из расчета 200 мкг $Al(OH)_3$ на мышь. Через 2 недели после 2-ой и 3-ей иммунизаций определяли индивидуальные титры антител.

Достоверное увеличение титра антител после второй иммунизации наблюдалось только в группе животных, иммунизированных в дозе 50 мкг/мышь (титр 1:400, $p<0,05$). Однако после третьей иммунизации достоверное повышение титра антител наблюдалось для всех групп ($p<0,05$).

Трехкратная иммунизация способствовала более интенсивному антителообразованию. При введении доз 50 мкг/мышь и 100 мкг/мышь *raPly* у 50 % мышей титр антител к *raPly* определяли в разведении 1:6400 (рис. 10).

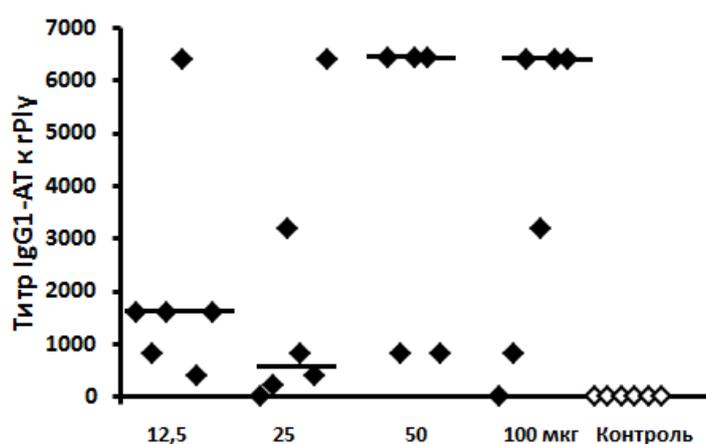


Рис. 10. Влияние иммунизирующей дозы *raPly* на образование IgG1-антител.

Примечание. Мыши ($n=6$). Трехкратная внутривбрюшинная иммунизация *raPly*, сорбированным на гидроксиде алюминия. Титр IgG1-антител определяли на 14 сутки после последней иммунизации. Контроль – неиммунизированные мыши. Горизонтальная линия – медиана.

Через 11 недель титр IgG-антител к гаРly в сыворотках крови трехкратно иммунизированных мышей сохранялся и был достоверно выше, чем у интактных мышей (табл. 7). Поскольку при увеличении иммунизирующей дозы белка до 100 мкг/мышь титр антител к гаРly не нарастал по сравнению с дозой 50 мкг/мышь, решено было исследовать в последующих экспериментах *in vivo* две иммунизирующие дозы гаРly – 25 мкг/мышь и 50 мкг/мышь соответственно.

Таблица 7. Длительность сохранения антител в сыворотке крови 3-кратно иммунизированных мышей

Срок исследования	Титр антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных трехкратно гаРly			Титр антител в сыворотке интактных мышей
	Иммунизирующая доза, мкг/мышь			
	25	50	100	
Через 2 недели после 3-ей иммунизации	800	4160	3800	1:100
Через 11 недель после 3-ей иммунизации	1600*	6400*	3200*	1:200

Примечание.

*- достоверность разницы между титрами антител в опыте и контроле (p<0,05)

Все дальнейшие эксперименты по оценке протективной и иммуногенной активности гаРly выполнены на линейных мышах BALB/c. Для следующего опыта по изучению протективной активности были

выбраны иммунизирующие дозы гаРly 25 мкг/мышь и 50 мкг/мышь соответственно. Доза адъюванта Al(OH)₃ составила 200 мкг/мышь. Препарат вводили трехкратно с интервалом 14 дней. Через 2 недели после последней иммунизации мышей опытных и контрольных групп внутривенно заражали штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 в дозах 10⁶-10⁵-10⁴-10³ м. кл.

При заражении мышей, иммунизированных гаРly, штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 в дозе 10⁶ м.кл. наблюдали выживаемость 66,7 % по сравнению с 100 % летальностью в контрольной группе (p<0,001). Выживаемость в группе иммунизированных дозой 25 мкг/мышь наблюдали только при максимальной заражающей дозе 10⁶ м.кл. (табл. 8).

Увеличение дозы до 50 мкг/мышь не способствовало повышению выживаемости животных. Возможно, это связано с тем, что при увеличении дозы рекомбинантного белка и титра антител к гаРly не отмечается увеличения нейтрализующих антител к белку.

Таблица 8. Иммуногенная и протективная активность raPly при трехкратной иммунизации при заражении серотипом 3 штамм № 3 *S. pneumoniae*

Группа	Иммунизирующая доза raPly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Обратный титр антител IgG1-АТ к raPly, М	Заражающая доза <i>S. pneumoniae</i> тип 3 № 3	Дни наблюдения*				LD ₅₀ , м.кл.	ИЭ	
					1	3	7	10			
1	25	200	32000	10 ³	10/10	9/10	8/10	8/10	1,86x10 ⁴	2,34	
				10 ⁴	10/10	2/10	2/10	2/10			
				10 ⁵	10/10	2/10	1/10	1/10			
				10 ⁶	9/9	7/9	6/9**	6/9**			
2	50		200	91733	10 ³	10/10	10/10	9/10	9/10	10x10 ³	1,26
					10 ⁴	10/10	5/10	4/10	4/10		
					10 ⁵	10/10	2/10	1/10	1/10		
					10 ⁶	10/10	5/10*	1/10	1/10		
Контроль ная	-	-		<100	10 ³	10/10	9/10	9/10	9/10	7,94x10 ³	-
					10 ⁴	10/10	7/10	5/10	5/10		
					10 ⁵	10/10	3/10	0/10	0/10		
					10 ⁶	10/10	1/10	0/10	0/10		

Примечание.

*- в числителе – выжившие мыши на день наблюдения, в знаменателе – общее число зараженных мышей;

** - достоверность разницы между опытом и контролем, критерий значимости ($p < 0,05$) при $Z \geq 1,96$ при сравнении кривых выживаемости по С.А. Гланцу [12].

4.3 Влияние дозы $Al(OH)_3$ на иммуногенность и протективные свойства *гаРly*

По результатам предыдущего опыта была выбрана оптимальная доза *гаРly* – 25 мкг/мышь. В следующем опыте мы решили выяснить, как доза $Al(OH)_3$ влияет на иммуногенную и протективную активность рекомбинантного белка при заражении. Была использована схема расчета дозы $Al(OH)_3$ – 1:3, соответственно, доза адъюванта составляла 75 мкг/мышь. В результате выявлена защита в группе животных, иммунизированных двукратно *гаРly* в дозе 25 мкг/мышь, где наблюдалась выживаемость на уровне 50 % по сравнению с контролем, где отмечалась 90 % гибель мышей (табл.9). Примечательным остается факт, что защита формировалась только в группе мышей, зараженных максимальной дозой *S. pneumoniae*. Использование меньшей дозы адъюванта $Al(OH)_3$ – 75 мкг/мышь – приводило к равному синтезу сывороточных антител независимо от кратности иммунизации, а уровень антител был достоверно меньше по сравнению с опытом, в котором использовали $Al(OH)_3$ в дозе 200 мкг/мышь.

Следующие эксперименты были проведены с другими серотипами пневмококка для выявления перекрестной активности *гаРly*.

Таблица 9. Иммуногенная и протективная активность гаРly при заражении серотипом 3 штамма № 3 S.

pneumoniae

Группа	Иммунизирующая доза гаРly, мкг/мышь	Кратность иммунизации	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Обратный титр антител IgG1-АТ к гаРly	Заражающая доза S. <i>pneumoniae</i> тип 3 № 3	Дни наблюдения*				LD ₅₀ , м.кл.	ИЭ
						1	3	7	14		
1	25	2	75	4400	10 ³	10/10	8/10	6/10	6/10	7,94x10 ³	2
					10 ⁴	10/10	6/10	2/10	2/10		
					10 ⁵	10/10	3/10	1/10	1/10		
					10 ⁶	10/10	7/10	5/10**	5/10**		
2		3		4500	10 ³	10/10	9/10	3/10	3/10	2x10 ³	-
					10 ⁴	10/10	8/10	1/10	1/10		
					10 ⁵	10/10	6/10	0/10	0/10		
					10 ⁶	10/10	6/10	4/10	4/10		
Контроль ная	0,9 % NaCl	-	-	<100	10 ³	10/10	9/10	7/10	7/10	3,98x10 ³	-
					10 ⁴	10/10	2/10	2/10	2/10		
					10 ⁵	10/10	1/10	10	10		
					10 ⁶	10/10	4/10	1/10	1/10		

Примечание.

*- в числителе – выжившие мыши на день наблюдения, в знаменателе – общее число зараженных мышей;

** - достоверность разницы между опытом и контролем, критерий значимости ($p < 0,05$) при $Z \geq 1,96$ при сравнении кривых выживаемости по С.А. Гланцу [10].

4.4 Перекрестный протективный эффект иммунизации гаРly при заражении разными серотипами *S. pneumoniae*

Для изучения перекрестной протективной активности были поставлены три эксперимента с 4 серотипом *S. pneumoniae*. В первом опыте (табл. 10) применялись двукратный и трехкратный режимы иммунизации, иммунизирующая доза гаРly составила 25 мкг/мышь, а доза адъюванта Al(OH)₃ - 75 мкг/мышь. При сопоставимом среднем титре антител (1:4400 и 1:5400 для двукратной и трехкратной схемы), для двукратной иммунизации на второй день после заражения наблюдалась достоверная задержка гибели для обеих заражающих доз – 10⁵ и 10⁶ м.кл., а для трехкратной – только для меньшей дозы 10⁵ м.кл.

В следующем опыте (табл. 11) при такой же иммунизирующей дозе гаРly была увеличена доза адъюванта Al(OH)₃ до 200 мкг/мышь, что привело к образованию более высокого титра антител (1:7200) при трехкратной схеме иммунизации. Более высокий титр антител коррелировал с более высоким ИЭ (1,59), тогда как для групп с двукратной иммунизацией ИЭ не отличался от контрольных групп.

В третьем опыте из этой серии (табл.12) при таком же режиме и дозах гаРly и Al(OH)₃ были получены высокие титры антител (1:5120 и 1:29440 для двукратной и трехкратной схемы соответственно), и ИЭ равнялся 2 для трехкратного режима и 1,26 для двукратного. В целом, в отношении 4 серотипа *S. pneumoniae* иммунизация гаРly вызывала умеренный защитный эффект, причем в двух экспериментах из трех наблюдалась прямая корреляция между средним уровнем титра антител и степенью защиты.

Для оценки протективной активности иммунизации гаРly в отношении серотипа 5 *S. pneumoniae* было проведено два эксперимента. В первом (табл.13) была выбрана только трехкратная схема иммунизации, иммунизирующая доза гаРly составила 25 мкг/мышь, а доза адъюванта Al(OH)₃ – 200 мкг/мышь. Была показана достоверная задержка гибели для наибольшей заражающей дозы 10⁵ м.кл. на второй день наблюдения: в опыте оставались живы 55,6 % мышей, в то

время как в контрольной группе наблюдалась гибель 88,9 % животных. Начиная с третьих суток наблюдения, разница между опытной и контрольной группами отсутствовала.

Во втором опыте использовали как трехкратную, так и двукратную схему иммунизации (табл. 14). Иммунизирующая доза гаРly составила 25 мкг/мышь, а доза адьюванта $Al(OH)_3$ – 200 мкг/мышь, как и в предыдущем эксперименте. Индекс эффективности (ИЭ) равнялся 1,58 для двукратной схемы и 1,26 для трехкратной, хотя титр антител был выше во втором случае (1:29440 и 1:5120, соответственно).

В отношении серотипа 5 *S. pneumoniae* при иммунизации гаРly можно говорить только о продлении жизни мышей.

Для оценки протективной активности иммунизации гаРly в отношении серотипа 6В *S. pneumoniae* был проведен эксперимент с трехкратной схемой иммунизации животных (табл. 15). Доза гаРly и доза адьюванта $Al(OH)_3$ составили 25 мкг/мышь и 200 мкг/мышь соответственно.

Для отдельных заражающих доз не наблюдали защиты мышей по сравнению с контролем, однако при учете выживаемости всех опытных животных по сравнению с контрольными группами ИЭ составил 6,6, что соответствует выраженному протективному эффекту.

Таблица 10. Иммуногенная и протективная активность гаРly при заражении серотипом 4 штамм 1/56 *S. pneumoniae*

Группа	Иммунизирующая доза гаРly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Количество иммунизаций	Обратный титр антител IgG1-АТ к гаРly	Заражающая доза <i>S.pneumoniae</i> тип 4	Дни наблюдения*		
						1	2	5
1	25	75	2	4400	10 ⁵	10/10	5/10**	0/10
					10 ⁶	10/10	7/10**	0/10
3			5400	10 ⁵	10/10	5/10**	0/10	
				10 ⁶	9/9	2/9	0/9	
Контрольная	0,9 % NaCl	-	3	<100	10 ⁵	10/10	1/10	0/10
					10 ⁶	10/10	0/10	0/10

Примечание.

*- в числителе – выжившие мыши на день наблюдения, в знаменателе – общее число зараженных мышей;

** - достоверность разницы между опытом и контролем, критерий значимости ($p < 0,05$) при $Z \geq 1,96$ при сравнении кривых выживаемости по С.А. Гланцу [12].

Таблица 11. Иммуногенная и протективная активность raPly при заражении серотипом 4 штамм 3405 *S. pneumoniae*

Группа	Иммунизирующая доза raPly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Кратность иммунизации	Обратный титр антител IgG1-АТ к raPly	Заражающая доза <i>S.pneumoniae</i> серотип 4 штамм 3405	Дни наблюдения*		LD ₅₀ , м.кл.	ИЭ
						1	10		
1	25	200	2	1100	10 ³	10/10	10/10	5x10 ⁵	1
					10 ⁴	10/10	10/10		
					10 ⁵	10/10	8/10		
					10 ⁶	9/9	4/9		
2			3	7200	10 ³	10/10	10/10	7,94x10 ⁵	1,59
					10 ⁴	10/10	10/10		
					10 ⁵	10/10	6/10		
					10 ⁶	10/10	8/10		
Контроль ная	0,9 % NaCl	-	3	<100	10 ³	10/10	10/10	5x10 ⁵	-
					10 ⁴	10/10	10/10		
					10 ⁵	10/10	8/10		
					10 ⁶	10/10	4/10		

Примечание.

*- в числителе – выжившие мыши на день наблюдения, в знаменателе – общее число зараженных мышей.

Таблица 12. Иммуногенная и протективная активность гаРly при заражении серотипом 4 штамм 1/56 *S. pneumoniae*

Группа	Иммунизирующая доза гаРly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Количество иммунизации	Обратный титр антител IgG1-АТ к гаРly	Заражающая доза <i>S.pneumoniae</i> тип 4 1/56	Дни наблюдения*				LD ₅₀ , м. кл	ИЭ
						1	2	3	14		
1	25 мкг/мышь	200	2	5120	10 ³	10/10	10/10	10/10	10/10	3,98x10 ⁴	1,26
					10 ⁴	10/10	9/10	9/10	9/10		
					10 ⁵	10/10	4/10	2/10	2/10		
					10 ⁶	10/10	0/10	0/10	0/10		
2	25 мкг/мышь	200	3	29440	10 ³	9/9	9/9	9/9	9/9	6,31x10 ⁴	2
					10 ⁴	10/10	9/10	9/10	9/10		
					10 ⁵	10/10	4/10	4/10	4/10		
					10 ⁶	10/10	1/10	0/10	0/10		
Контроль ная	0,9 % NaCl	-	3	<100	10 ³	9/9	9/9	9/9	9/9	3,16x10 ⁴	-
					10 ⁴	10/10	10/10	10/10	9/10		
					10 ⁵	10/10	2/10	2/10	1/10		
					10 ⁶	9/10	0/10	0/10	0/10		

Примечание.

*- в числителе – выжившие мыши на день наблюдения, в знаменателе – общее число зараженных мышей.

Таблица 13. Выживаемость* мышей, иммунизированных гаРly трехкратно при заражении серотипом 5 *S. pneumoniae*

Группа	Иммунизирующая доза гаРly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Заражающая доза <i>S.pneumoniae</i> тип 5	Дни наблюдения		
				1	2	3
1	25	200	10 ⁵	9/9	5/9**	0/9
			10 ⁴	10/10	4/10	4/10
			10 ³	10/10	8/10	8/10
Контрольная	0,9 % NaCl	-	10 ⁵	9/9	1/9	0/9
			10 ⁴	10/10	5/10	4/10
			10 ³	10/10	10/10	10/10

Примечание.

*- в числителе – выжившие мыши на день наблюдения, в знаменателе – общее число зараженных мышей;

**- достоверность разницы между опытом и контролем, критерий значимости ($p < 0,05$) при $Z \geq 1,96$ при сравнении кривых выживаемости по С.А. Гланцу [12].

Таблица 14. Иммуногенная и протективная активность гаРly при заражении серотипом 5 *S. pneumoniae*

Группа	Иммунизирующая доза гаРly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Кратность иммунизаций	Обратный титр антител IgG1-АТ к гаРly	Заражающая доза <i>S.pneumoniae</i> тип 5	Дни наблюдения*					LD ₅₀ , м. кл	ИЭ
						1	2	3	5	14		
1	25	200	2	5120	10 ⁶	10/10	2/10	0/10	0/10	0/10	10x10 ³	1,58
					10 ⁵	10/10	3/10	2/10	1/10	0/10		
					10 ⁴	10/10	6/10	6/10	5/10	5/10		
2			3	29440	10 ⁶	10/10	2/10	2/10	0/10	0/10	7,94x10 ³	1,26
					10 ⁵	10/10	4/10	1/10	1/10	0/10		
					10 ⁴	10/10	9/10	8/10	6/10	4/10		
Контроль ная	0,9 % NaCl	-	3	<100	10 ⁶	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	6,31x10 ³	-
					10 ⁵	10/10	2/10	0/10	0/10	0/10		
					10 ⁴	10/10	5/10	4/10	4/10	3/10		

Примечание.

*- в числителе – выжившие мыши на день наблюдения, в знаменателе – общее число зараженных мышей.

Таблица 15. Выживаемость* мышей, иммунизированных гаРly двукратно при заражении серотипом 6В *S. pneumoniae*

Группа	Иммунизирующая доза гаРly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Заражающая доза <i>S.pneumoniae</i> тип 6В	Дни наблюдения*								LD ₅₀ , м. кл	ИЭ
				1	2	4	5	6	7	9	10		
1	25	200	10 ⁶	9/9	9/9	6/9	4/9	4/9	3/9	3/9	3/9	3,39x10 ⁴	6,6**
			10 ⁵	10/10	10/10	9/10	6/10	3/10	3/10	3/10	3/10		
			10 ⁴	10/10	10/10	9/10	8/10	6/10	6/10	5/10	4/10		
Контроль ная	0,9 % NaCl	-	10 ⁶	9/9	8/9	7/9	6/9	4/9	3/9	2/9	1/9	5,13x10 ³	-
			10 ⁵	10/10	10/10	10/10	7/10	5/10	3/10	1/10	0/10		
			10 ⁴	10/10	9/10	7/10	6/10	4/10	3/10	2/10	1/10		

Примечание.

*- в числителе – выжившие мыши на день наблюдения, в знаменателе – общее число зараженных мышей;

** - значимая разница по сравнению с контролем по индексу эффективности.

Заключение к главе 4

Иммунизация рекомбинантным атоксичным пневмолизинном (raPly) индуцирует синтез антител преимущественно субизотипа IgG1. Большая кратность введения raPly и большая доза Al(OH)₃ ассоциированы с более высоким титром антител.

При иммунизации raPly наблюдается умеренный протективный эффект в модели системной инфекции *S. pneumoniae*. Защитные свойства были продемонстрированы против 3, 4 и 6 серотипов пневмококка. В отношении 5 серотипа *S. pneumoniae* было показано увеличение продолжительности жизни мышей по сравнению с контролем. Для большинства серотипов, кроме серотипа 4, не наблюдали корреляции между уровнем антител и протективной активностью.

ГЛАВА 5 ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МОЛЕКУЛ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА *in vitro* И АКТИВАЦИЯ СОЗРЕВАНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ raPLY

В настоящей главе изучали действие raPly на элементы врожденного иммунитета. Сначала исследовали экспрессию генов рецепторов врожденного иммунитета и цитокинов. Затем оценили экспрессию поверхностных молекул ДК под влиянием raPly с помощью метода проточной цитометрии.

5.1 Исследование экспрессии генов Toll – подобных рецепторов 2, 4 и 9, TNF- α и IL-6 in vitro под действием raPly

Известно, что само по себе наличие пневмолизина в штамме пневмококка по сравнению с изогенным штаммом, в котором проведен нокаут гена *Ply*, влияет на экспрессию более чем 100 генов, связанных с иммунным ответом в клеточной линии острого моноцитарного лейкоза ТНР [141].

Пневмолизин-токсин взаимодействует с рецепторами врожденного иммунитета, в частности, с TLR4. Опыты на мышах, нокаутированных по TLR2 и TLR4, показали, что введение таким животным интраназально пневмолизина вызывает сниженный цитокиновый ответ (IL-6) по сравнению с животными дикого типа, т.е. для успешной реализации воспалительной реакции необходимо взаимодействие с Toll-like рецепторами [55].

Для оценки влияния raPly на экспрессию генов в клетках линии K-562 проводили инкубацию с белком в разных концентрациях: 1 мкг/мл; 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно. В качестве контроля использовали интактные клетки без добавления препарата в тех же временных точках в одинаковом объеме среды при равномерном засеве клеток. Культивирование проводили в 12-луночном планшете (Corning).

По достижении выбранных временных точек (1; 4 и 24 ч) клетки вместе со средой отбирали в стерильную пробирку, центрифугировали при 3000 оборотах для осаждения, убрали надосадок, добавляли к осадку лизирующий буфер и выделяли смесь РНК и ДНК с помощью набора Рибосорб.

После выделения РНК определяли концентрацию с помощью Nanodrop. Концентрация РНК в образцах варьировалась от 80 до 170 нг/мкл.

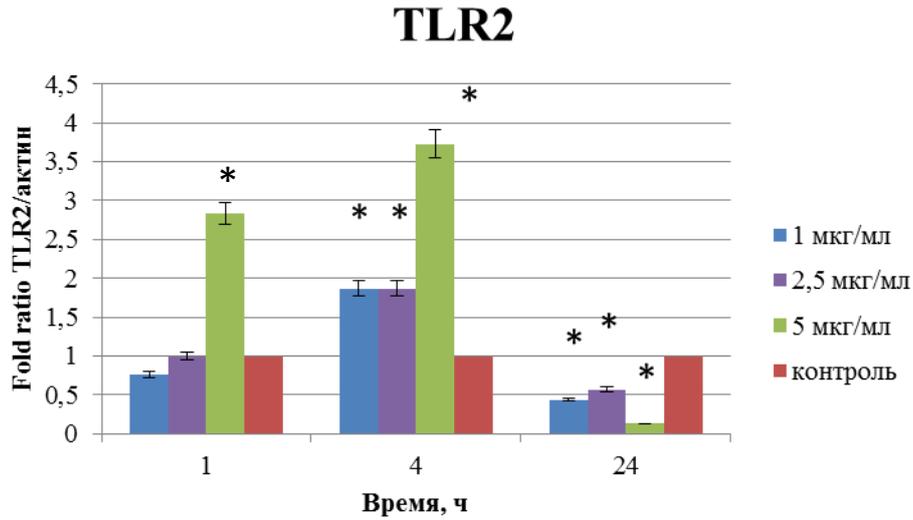
Оценивали экспрессию генов рецепторов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *TNF- α* и *IL-6*.

Рекомбинантный атоксичный пневмолизин не влиял на экспрессию *TLR2* спустя 1 ч во всех образцах, кроме образца с концентрацией гаРly 5 мкг/мл, где наблюдалось увеличение в 2,8 раза. Через 4 ч наблюдалось повышение экспрессии во всех исследуемых образцах в 1,87; 1,87 и 3,7 раза соответственно. Спустя 24 ч экспрессия гена *TLR2* значимо снижалась во всех образцах в 2,3; 1,7 и 8 раз соответственно (рис. 11А).

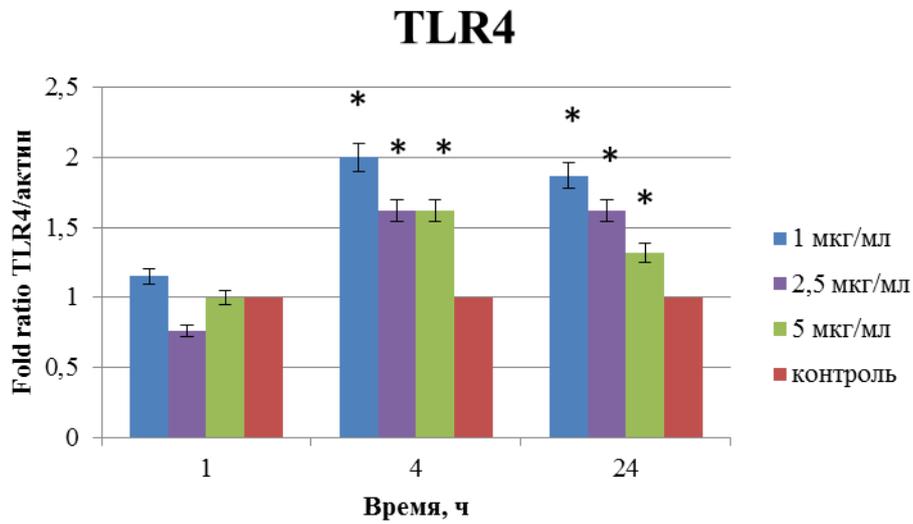
Выявлено значимое повышение экспрессии гена *TLR4* спустя 4 ч в 2; 1,6 и 1,6 раза и спустя 24 ч – в 1,87; 1,62 и 1,32 раза для концентраций гаРly 1 мкг/мл; 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно (рис. 11Б).

Небольшое повышение экспрессии гена *TLR9* (в 1,23 и 1,52 для концентрации гаРly 1 мкг/мл; в 1,32 и 1,62 для концентрации гаРly 2,5 мкг/мл; в 2,0 и 2,6 раза для концентрации гаРly 5 мкг/мл) отмечали во всех образцах спустя 1 и 4 ч после инкубирования (рис.11В). Возможно, это связано с небольшой примесью нуклеиновых кислот.

А



Б



В

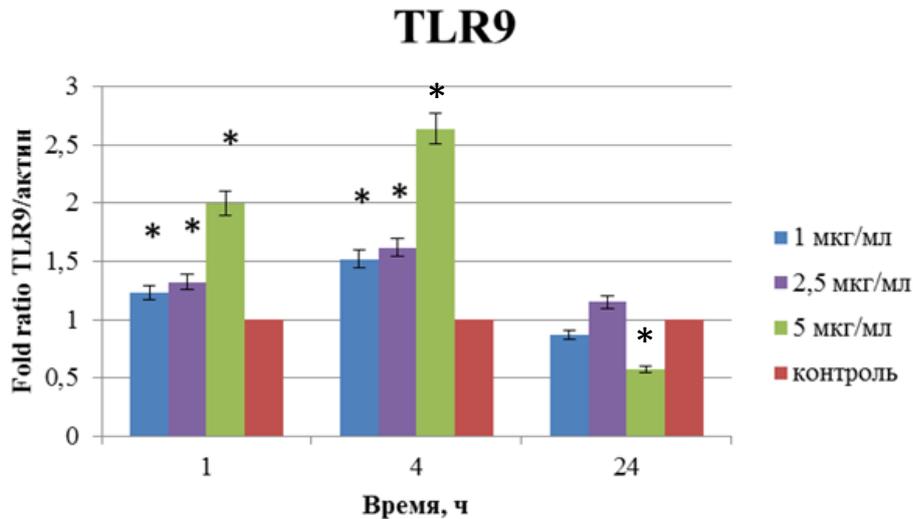


Рис. 11. Влияние gaPly на экспрессию генов рецепторов врожденного иммунитета в культуре клеток К-562

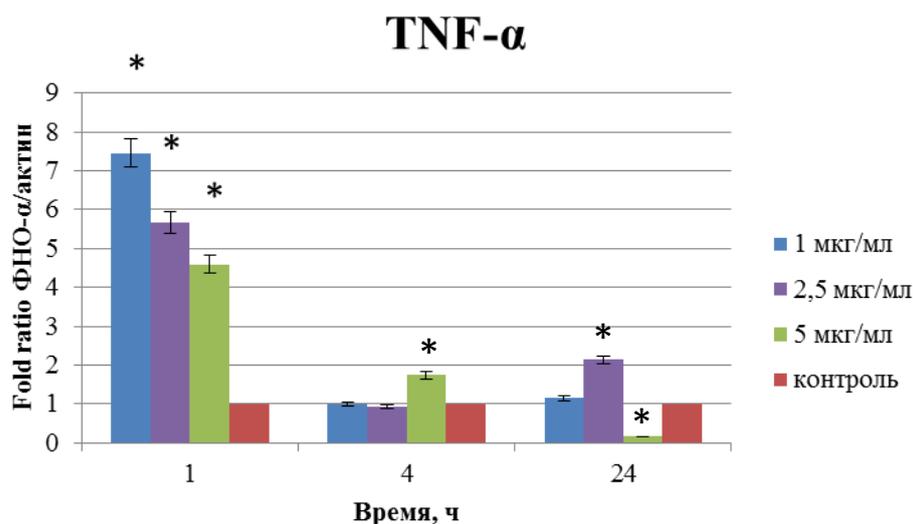
Примечание. А) Сравнительный уровень экспрессии гена *TLR2* Б) Сравнительный уровень экспрессии гена *TLR4* В) Сравнительный уровень экспрессии гена *TLR9*

* - достоверное различие в уровне экспрессии.

Повышение экспрессии гена *TNF- α* (в 7,5; 5,7 и 4,6 раза по сравнению с контролем) наблюдали через 1 ч инкубации с gaPly при всех концентрациях (рис. 12А). Небольшое повышение гена *TNF- α* (в 2 раза) отмечали спустя 24 ч при добавлении белка в концентрации 2,5 мкг/мл.

Наблюдали также снижение экспрессии гена *IL-6* во всех временных точках: при концентрации gaPly 1 мкг/мл через 1 ч – в 194 раза, через 4 и 24 ч – в 1,52 и 1,74 раза соответственно; при концентрации gaPly 5 мкг/мл спустя 1 ч в 1,62 раза, через 4 ч – в 3,25; через 24 ч – в 45 раз, а при концентрации gaPly 2,5 мкг/мл – в 3,3; 24 и 3 раза соответственно (рис. 12Б). Снижение уровня экспрессии гена *IL-6* можно характеризовать как противовоспалительный эффект gaPly.

А



Б

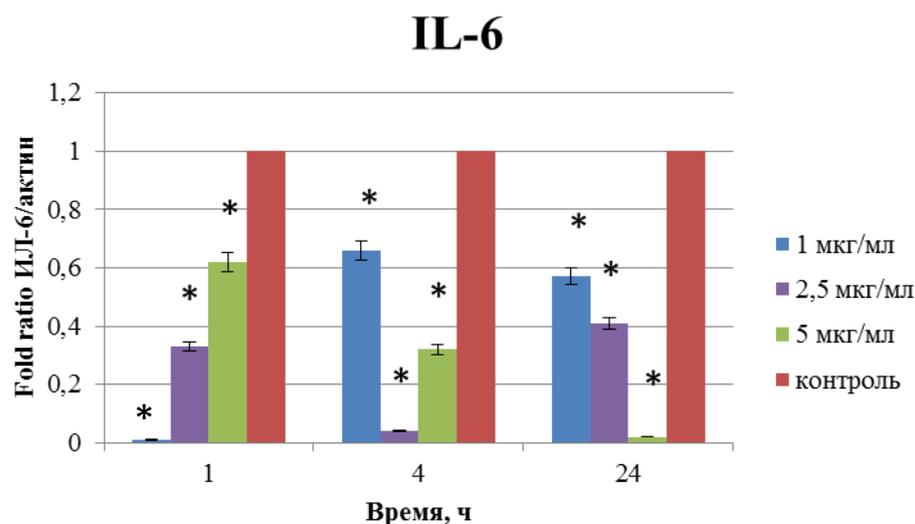


Рис.12. Влияние gaPly на экспрессию генов *TNF- α* и *IL-6* в культуре клеток К-562

Примечание. А) Сравнительный уровень экспрессии гена *TNF- α* Б) Сравнительный уровень экспрессии гена *IL-6*

* - достоверное различие в уровне экспрессии.

Полученные данные согласуются с данными литературы. При культивировании с пневмолизинем в сублитических концентрациях нормальные периферические моноциты крови человека и клеточная моноцитарная линия U937 продуцируют *TNF- α* и *IL-1 β* [80], а в культуре клеток A549 и пневмолизин, и его атоксичный рекомбинантный вариант вызывают экспрессию *IL-1 β* , *TNF- α* [108]. При инфицировании периферических моноцитов крови человека штаммы с агемолитическим вариантом пневмолизина вызывали сниженные реакции со стороны как врожденного (цитокины *IL-1 β* , *IL-6*, костимуляторные молекулы, апоптоз), так и адаптивного иммунного ответа (*IL-17A*) [93].

5.2 Исследование действия *raPly* на созревание дендритных клеток мыши

При добавлении *raPly* в культуру незрелых ДК уменьшалось число клеток, экспрессирующих TLR2, и возрастало число клеток, экспрессирующих TLR4 и TLR9 (табл.16). Известно, что пневмолизин активирует TLR4. Повышение экспрессии TLR4 можно объяснить как действием самого *raPly*, так и наличием липополисахарида (ЛПС) в препарате.

Таблица 16. Влияние *raPly* на экспрессию TLRs дендритных клеток

Маркеры	Количество клеток (%), M±SD		
	н-ДК *	TNF-a #	<i>raPly</i> □
TLR2	26,34±1,84	20,18±2,04 *	17,8±2,25 *
TLR4	48±2,1	20,68±2,1 * □	58,62±4,82 * #
TLR9	31,28±2,06	18,92±2,2 * □	38,5±3,12 * #

Примечание.

Н-ДК – незрелые дендритные клетки. TNF-a – контроль; *, #, □ - $p < 0,05$ - достоверность различий между сравниваемыми группами (U-критерий Mann-Whitney).

При исследовании влияния *raPly* на иммунофенотип ДК, полученных из костного мозга мышей, уровень экспрессии маркера CD14, являющегося лигандом для ЛПС, на клетках в целом и на клетках с адгезивными свойствами CD38/CD14 не увеличивался (табл.17). Под действием *raPly* происходило уменьшение клеток-предшественников с маркером CD34, но в меньшей степени, чем под действием TNF-a (классический индуктор созревания дендритных клеток); также увеличивалось содержание клеток, экспрессирующих молекулы адгезии CD38. Увеличивалось содержание клеток, экспрессирующих костимуляторные молекулы CD80, CD86 и обе эти молекулы одновременно CD80/CD86. Наличие экспрессии молекулы

терминальной дифференцировки ДК CD83 и молекулы главного комплекса гистосоместимости класса II (МНС II) подтверждает, что под действием raPly происходило созревание ДК.

Исследователи по-разному оценивают роль взаимодействия пневмолизина и TLR4 на созревание ДК. Некоторые авторы [117] характеризуют созревание ДК, вызванное рекомбинантным пневмолизином, как независимое от стимуляции TLR4, в то время как другие приходят к выводу, что эффекты пневмолизина на формирующийся фенотип ДК опосредованы TLR4 [93]. Вероятно, дальнейшие исследования структуры рекомбинантного белка позволят более точно определить взаимодействие между raPly и TLRs.

Таблица 17. Влияние raPly на иммунофенотип ДК, генерированных из костного мозга мышей

Маркеры	Количество клеток (%), M±SD		
	H-ДК *	TNF-α #	raPly □
CD14	45,64±3,77	26,32±1,83 *	28,9±3,44 *
CD38/CD14	36,88±3,23	15,96±1,73 * □	30,63±3,29 #
CD34	48,02±2,53	8,52±1,71 * □	19,25±2,57 * #
CD11c	50,14±2,8	51,36±8,28	56,26±3,62
CD38	30,5±3,02	66,14±3,8 *	66,63±3,29 *
CD80	36,46±1,75	65,3±2,78 *	60,08±3,55 *
CD86	22,24±2,08	68,48±3,53 * □	35,95±2,23 * #

CD80/CD86	17,78±1,58	56,34±3,85 * □	30,73±2,21 * #
CD11c/CD83	4,88±0,33	25,6±2,16 * □	50,83±4,26 * #
CD83	4,72±0,35	38,84±3,03 * □	54,76±3,39 * #
CD83/ MHC II	5,02±0,63	32,26±2,94 * □	26,23±3,32 * #
MHC II	36,9±2,09	47,08±3,59 * □	55,05±3,97 * #

Примечание. Н-ДК – незрелые дендритные клетки. TNF-а – контроль ; *, #, □ - $p < 0,05$ - достоверность различий между сравниваемыми группами (U-критерий Mann-Whitney).

Заключение

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что гаРлу является активным индуктором созревания ДК и влияет на экспрессию генов поверхностных рецепторов и молекул врожденного иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Streptococcus pneumoniae – грамположительная, условно-патогенная бактерия, которая может бессимптомно колонизировать слизистую носоглотки человека, а может вызывать манифестные формы: конъюнктивит, отит, пневмонию, менингит и сепсис.

В Европе и США *S. pneumoniae* является самым частым возбудителем внебольничной пневмонии, которая представляет опасность для лиц пожилого возраста. Вакцинация является эффективной мерой, способствующей снижению заболеваемости и смертности от пневмококковой инфекции.

Протективная активность современных вакцин, прошедших лицензирование и одобренных к применению, основана на использовании капсульного антигена пневмококка. По строению полисахаридного капсульного антигена выделяют более 95 серотипов пневмококка, к каждому из них формируется строгий серотипспецифический иммунный ответ. В состав вакцин включены полисахаридные антигены наиболее распространенных серотипов пневмококка, вызывающих инвазивные заболевания. Исторически первыми появились полисахаридные вакцины, содержащие капсульные антигены, затем – конъюгированные вакцины, в которых полисахаридные антигены ковалентно связаны с белком-носителем. Технология конъюгирования с нейтральным белком-носителем позволяет перевести тимуснезависимые полисахаридные капсульные антигены в тимусзависимые и обеспечить протективный ответ в группах риска: у детей младше 2-х лет, в возрастной группе старше 65 лет, у людей с иммунодефицитами. Эффективность этих вакцин доказана опытом применения: снижается общая заболеваемость инвазивными пневмококковыми инфекциями в целом и в группах риска. Однако при анализе результатов использования существующих вакцин было выявлено,

что вакцинация ассоциирована с замещением вакцинных серотипов невакцинными как в структуре заболеваемости, так и при исследовании назофарингеального носительства. Обнаружилось увеличение заболеваемости бескапсульными штаммами пневмококка, увеличение доли антибиотикорезистентных штаммов и более высокая частота колонизации носоглотки другими бактериями, в том числе *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza*, стрептококками и анаэробной флорой.

Также стоит отметить, что технология конъюгирования имеет ограничения по числу полисахаридных антигенов для химического связывания и является довольно дорогостоящей в производстве, поэтому, несмотря на значительные финансовые вложения, охват вакцинации в мире не достигает 50 %.

На протяжении последних 30 лет в мире активно идет поиск новых протективных антигенов пневмококка, способных обеспечить серотипнезависимый иммунитет. Рассматриваются различные варианты дизайна вакцин: векторные, цельноклеточные убитые, субъединичные вакцины. Одной из перспективных стратегий является получение рекомбинантных белков пневмококка, которые обладают высокой степенью гомологии внутри вида и могут обеспечить перекрестную протективную активность.

Многие экспериментальные препараты успешно прошли испытания на животных и уже проходят клинические испытания, однако на данный момент не зарегистрировано ни одной пневмококковой вакцины нового типа. Вместе с тем, изменяется концепция идеальной вакцины: всё больше исследователей приходят к выводу, что оптимальная вакцина должна предотвращать инвазивные заболевания, но минимально влиять на колонизацию, так как это может привести к замещению экологической ниши другими патогенами [33, 47].

На роль одного из перспективных протективных антигенов подходит пневмококковый белок пневмолизин. Нативный пневмолизин является

токсином, поэтому необходимо использовать его атоксичные варианты, полученные вследствие генетических модификаций в структуре белка.

За все время исследований нами было получено 2 серии препарата rPly. После очистки и диализа наличие rPly было подтверждено помощью электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга с моноклональными антителами. Удалось добиться воспроизводимости при получении препарата: концентрация белка в первой серии составила 525 мкг/мл, концентрация препарата во второй серии - 500 мкг/мл.

Рекомбинантный пневмолизин изначально являлся нетоксичным, что было подтверждено в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. С помощью МТТ-теста была оценена жизнеспособность клеток клеточной линии Vero (эпителий почки зеленой обезьяны) на протяжении 96 ч при добавлении в среду rPly в концентрациях 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 25 мкг/мл соответственно. При концентрации rPly 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл ни в одной из временных точек (3, 12, 24, 48 и 96 ч соответственно) не наблюдали значимой гибели клеток по сравнению с отрицательным контролем. Процент живых клеток варьировался от $74 \pm 3,7$ % до $161 \pm 4,6$ %, с учетом того, что за 100 % принималась жизнеспособность клеток в положительном контроле (без добавления пневмолизина) в той же временной точке. Для концентрации пневмолизина 25 мкг/мл и отрицательного контроля наблюдалась другая закономерность: в первых двух временных точках клетки демонстрировали рост, сопоставимый с ростом клеток в положительном контроле, а затем наблюдали снижение жизнеспособности клеток до значений $34 \pm 2,4$ % и 9,2 % соответственно. Для достижения концентрации рекомбинантного белка 25 мкг/мл использовали слишком большое разведение среды, что, вероятно, привело к более быстрому истощению среды и более ранней гибели клеток.

После однократного внутрибрюшинного введения rPly в дозах 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл и 100 мкг/мышь осуществляли ежедневное взвешивание животных в течение 7 суток. Средние значения массы животных составили $17,66 \pm 1,35$, $19,07 \pm 1,53$, $19,45 \pm 1,81$, $20,28 \pm 1,91$ г для

опытных групп и $18,76 \pm 1,49$ г для контрольной группы соответственно. Между группами не было выявлено достоверной разницы ($p > 0,5$), кроме группы, иммунизированной rPly в дозе 100 мкг/мышь, для которой было выявлена достоверная разница в сторону увеличения веса мышей по сравнению с контрольной группой. Опыт был повторен дважды со второй серией препарата в дозе 25 мкг/мышь, выбранной в качестве оптимальной. В первом опыте средние значения веса животных составили $17,55 \pm 0,71$ г и $17,33 \pm 0,96$ г для опытной и контрольной групп соответственно ($p > 0,5$). Аналогичные данные были получены при повторении эксперимента. Средние значения веса равнялись $17,27 \pm 0,7$ г и $17,47 \pm 0,77$ г для опытной и контрольной группы ($p > 0,5$). Таким образом, rPly в разных дозах не оказывал токсического действия на организм животных, которое приводило бы к снижению массы тела.

Рекомбинантный пневмолизин в предварительных опытах *in vitro* на клеточной линии Vero и *in vivo* на беспородных и линейных мышах BALB/c показал себя как нетоксичный препарат, поэтому белок описывали аббревиатурой raPly.

При внутрибрюшинной иммунизации мышей raPly с разными дозами $Al(OH)_3$ было установлено, что к белку образуются антитела преимущественно субизотипа IgG1, что соответствует данным, полученным зарубежными исследователями [22].

Протективная активность raPly была показана в опыте на мышах линии BALB/c в модели системной инфекции в отношении 3, 4, 5 и 6В серотипов пневмококка. В первом опыте мышей иммунизировали внутрибрюшинно двукратно с интервалом 7 дней дозой raPly 30 мкг/мышь. В качестве адьюванта использовали $Al(OH)_3$ в дозе 200 мкг/мышь. После заражения серотипом 3 *S. pneumoniae* наблюдалась задержка гибели на второй день наблюдения от заражающей дозы 10^3 м.кл. Пуловая сыворотка мышей, иммунизированных по этой схеме, содержала антитела IgG1 к raPly в титре 1:800, специфичность которых в реакции торможения достигала 50 %. После

этого эксперимента был сделан вывод о необходимости увеличения кратности иммунизации и подбора оптимальной иммунизирующей дозы. Для следующего опыта были выбраны следующие иммунизирующие дозы гаРly: 12,5 мкг/мышь, 25 мкг/мышь, 50 мкг/мышь и 100 мкг/мышь, сорбированных на $Al(OH)_3$ в дозе 200 мкг/мышь. Статистически значимое повышение индивидуальных титров антител наблюдалось во всех иммунизированных группах через 2 недели после третьей иммунизации, титр антител оставался высоким (от 1:1600 до 1:6400) на протяжении 11 недель после последней иммунизации.

Трехкратная иммунизация гаРly в дозе 25 мкг/мышь, сорбированным на $Al(OH)_3$ в дозе 200 мкг/мышь, защищала животных от максимальной заражающей дозы 10^6 м.кл. 3 серотипа *S. pneumoniae*, а средний индивидуальный титр антител IgG1 к гаРly составлял 1:32000. Иммунизация по той же схеме, но дозой 50 мкг/мышь, не оказала влияния на выживаемость животных в опыте по сравнению с контрольной группой, хотя средний индивидуальный титр антител был выше и составлял 1:91 733.

В дальнейших опытах использовали иммунизирующую дозу 25 мкг/мышь как наиболее оптимальную.

Для оценки влияния дозы $Al(OH)_3$ на образование антител к гаРly в последующем опыте с 3 серотипом *S. pneumoniae* доза адьюванта была снижена до 75 мкг/мышь на дозу белка 25 мкг/мышь. Были использованы двукратная и трехкратная схемы иммунизации, средний титр антител не отличался для обеих схем иммунизации (1:4400 и 1:4500 соответственно), однако протективный эффект был выявлен только для групп с двукратной иммунизацией: ИЭ был равен 2, и в группе с самой высокой заражающей дозой 10^6 м.кл. выживаемость мышей была достоверно выше по сравнению с контрольной группой (50 % выживших мышей в опыте против 90 % гибели животных в контрольной группе).

Интересным представляется тот факт, что при заражении *S. pneumoniae* в контрольных группах наблюдался дозозависимый эффект, в то время как в

опыте была другая динамика, и мыши, иммунизированные гаРly, при заражении максимальной дозой оказались более устойчивы к инфекции. Вероятно, отличия во взаимодействии мышь-пневмококк при разных заражающих дозах обусловлены разным патогенезом инфекции, а именно экспрессией других факторов патогенности. Возможно, при большей заражающей дозе роль капсулы в патогенезе снижается, и на первый план выходит синтез белковых факторов вирулентности, в т.ч. пневмолизина.

С другой стороны, ряд исследований на генетически модифицированных линиях мышей наводит на мысль о второстепенной роли антител в процессе элиминации пневмококка. По мнению исследователей, для формирования иммунитета в ходе первичной колонизации пневмококком необходимы CD4⁺ Т-клетки и ИЛ-17 [114].

Протективный эффект иммунизации гаРly при заражении 4 серотипом *S. pneumoniae* продемонстрирован в нескольких экспериментах. При иммунизирующей дозе рекомбинантного белка 25 мкг/мышь и добавлении Al(OH)₃ в дозе 75 мкг/мышь задержка гибели животных на первый день наблюдали для заражающей дозы 10⁵ м.кл. независимо от кратости введения препарата, а при двукратном введении гаРly – только для дозы 10⁶ м.кл. Средние индивидуальные титры антител в группе двукратной иммунизации составили 1:4400, в группе трехкратной иммунизации – 1:5400. При увеличении дозы Al(OH)₃ до 200 мкг/мышь в двух последующих опытах с 4 серотипом *S. pneumoniae* ИЭ при трехкратной иммунизации равнялся 1,59 и 2, соответственно, тогда как ИЭ при двукратной схеме равнялся 1 и 1,26 соответственно. Трехкратное введение гаРly оказалось предпочтительным для создания защиты от 4 серотипа *S. pneumoniae*. Стоит отметить, что в этих двух развернутых экспериментах более высокий средний индивидуальный титр антител к гаРly (1:7200 и 1:29440) положительно коррелировал с выживаемостью.

При трехкратной иммунизации гаРly в дозе 25 мкг/мышь с Al(OH)₃ 200 мкг/мышь было установлено продление жизни мышей в отношении 5

серотипа пневмококка в виде достоверной задержки гибели на один день для наибольшей заражающей дозы 10^5 м.кл. Повторно проведенный опыт с 5 серотипом *S. pneumoniae* продемонстрировал некоторую положительную тенденцию. Индекс эффективности равнялся 1,58 и 1,26 для двукратной и трехкратной иммунизации, соответственно, причем положительной корреляции с более высокими средними индивидуальными титрами антител к гаРly не было выявлено.

Для оценки протективной активности препарата гаРly в отношении 6В серотипа *S. pneumoniae* был проведен эксперимент с трехкратным режимом иммунизации. Доза гаРly и доза адъюванта $Al(OH)_3$ составили 25 мкг/мышь и 200 мкг/мышь соответственно. Для отдельных заражающих доз не наблюдали выраженной тенденции к защите, однако ИЭ составил 6,6, что соответствует выраженному протективному эффекту.

В результате этой серии опытов было установлено, что доза адъюванта влияет на антителообразование, и для достижения высоких титров антител необходима доза $Al(OH)_3$ 200 мкг/мышь. Однако не было выявлено корреляции между уровнем антител и уровнем протективной активности в опытах по заражению всеми серотипами, кроме 4 серотипа.

По нашим данным, для достижения защиты наиболее оптимальная иммунизирующая доза гаРly составила 25 мкг/мышь. К сожалению, нам не удалось прийти к однозначному выводу об оптимальной кратности иммунизации, т.к. в опытах свою эффективность проявили как двукратный, так и трехкратный режимы.

В опытах *in vitro* было оценено влияние гаРly на экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *TNF- α* и *IL-6*. Рекомбинантный атоксичный пневмолизин повышал экспрессию гена *TLR2* через 4 ч в клетках линии К-562 в 1,87; 1,87 и 3,7 раза соответственно. Спустя 24 ч экспрессия гена *TLR2* значительно снижалась во всех образцах в 2,3; 1,7 и 8 раз соответственно. Выявлено значимое повышение экспрессии гена *TLR4* спустя 4 ч в 2; 1,6 и 1,6 раза и спустя 24 ч – в 1,87; 1,62 и 1,32 для концентраций гаРly 1 мкг/мл; 2,5 мкг/мл и

5 мкг/мл соответственно. Это согласуется с данными о взаимодействии Ply с TLR4. Небольшое повышение экспрессии гена *TLR9* (в 1,23 и 1,52 для концентрации гаPly 1 мкг/мл; в 1,32 и 1,62 для концентрации гаPly 2,5 мкг/мл; в 2,0 и 2,6 раза для концентрации гаPly 5 мкг/мл) отмечали во всех образцах спустя 1 и 4 ч после инкубирования. Возможно, это связано с небольшой примесью нуклеиновых кислот. Повышение экспрессии гена *TNF- α* (в 7,5; 5,7 и 4,6 раза по сравнению с контролем) наблюдали после 1 ч инкубации с гаPly при всех концентрациях. Наблюдалось также снижение экспрессии гена *IL-6* во всех образцах во всех временных точках. Снижение уровня экспрессии гена *IL-6* можно характеризовать как противовоспалительный эффект гаPly.

Рекомбинантный атоксичный пневмолизин в опыте на ДК мышей линии BALB/c повышал экспрессию рецептора TLR4, что согласуется с данными литературы. Наряду с TLR4, добавление препарата к культуре незрелых ДК вызывало повышение экспрессии рецепторов TLR2 и TLR9, что может быть объяснено наличием примеси ЛПС и нуклеиновых кислот соответственно.

Рекомбинантный атоксичный пневмолизин в опыте вызывал созревание ДК. Об этом свидетельствует экспрессия молекулы терминальной дифференцировки ДК CD83 и молекулы главного комплекса гистосовместимости МНС II, а также увеличение количества ДК с костимуляторными молекулами CD80/86. Интересно отметить, что, по данным литературы, пневмолизин-токсин угнетает созревание ДК [105].

Рекомбинантный атоксичный пневмолизин в экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрировал свой потенциал в качестве перспективного кандидата для включения его в состав серотипнезависимых вакцин, оказывая стимулирующее влияние как на эффекторы врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. В экспериментах на животных получены убедительные данные о способности гаPly защищать мышей при внутрибрюшинном заражении разными серотипами пневмококка.

ВЫВОДЫ

1. Получено две серии препарата рекомбинантного пневмолизина в концентрациях 525 мкг/мл и 500 мкг/мл соответственно.
2. Доказано, что рекомбинантный пневмолизин не является токсичным: в культуре клеток *Vero in vitro* препарат в диапазоне концентраций от 2,5 мкг/мл до 10 мкг/мл не вызывал гибели клеток; при внутрибрюшинном введении мышам от 12,5 мкг/мышь до 100 мкг/мышь рекомбинантный белок не влиял на снижение массы тела животных.
3. Установлено, что оптимальная иммунизирующая доза рекомбинантного атоксичного пневмолизина (гаРly), вызывающая выработку специфических IgG-антител и защиту мышей, составляет 25 мкг/мышь.
4. Показано, что трехкратная иммунизация мышей 25 мкг/мышь гаРly, адсорбированного на гидроксиде алюминия (200 мкг/мышь), вызывает формирование высоких титров IgG1-антител, которые сохраняются в сыворотке крови животных до 11 недель наблюдения.
5. Выявлено, что гаРly защищает мышей против внутрибрюшинного заражения 3, 4 и 6В серотипами *S. pneumoniae* как при двукратной, так и при трехкратной иммунизации.
6. Показано, что гаРly повышает экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *TNF- α* и снижает экспрессию гена *IL-6 in vitro*.
7. Продемонстрировано, что гаРly вызывает созревание ДК мышей, о чем свидетельствует повышение количества костимуляторных молекул CD80 и CD86, а также молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса – МНС II и маркера терминальной дифференцировки ДК – CD83.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ГМ-КСФ	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
ДК	дендритная клетка
ИПТГ	изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
ИФА	иммуноферментный анализ
ИЭ	индекс эффективности – отношение LD ₅₀ в опыте к LD ₅₀ в контроле
М. кл.	микробная клетка
Мкг	микрограмм
Мкл	микролитр
ОП	оптическая плотность
ПААГ	полиакриламидный гель
ТМБ	тетраметилбензидина раствор
ФСБ	фосфатно-солевой буферный раствор
ФЭК	фотоэлектроколориметр
ХОБЛ	хроническая обструктивная болезнь легких
BCG	(<i>Bacillus Calmette—Guérin</i>), противотуберкулезная вакцина
С3	ключевой компонент системы комплемента, участвующий в классическом и альтернативном пути активации системы комплемента
CD	cell differentiation antigens или cluster definition - антиген кластеров дифференцировки клеток
<i>Com (comC, comE, comD, comX)</i>	семейство генов, отвечающих за естественную компетентность <i>S.pneumoniae</i>
DMSO	диметилсульфоксид
FITC	флуоресцеин-5-изотиоцианат

FltL3	гематопоэтический ростовой фактор
H фактор	компонент системы комплемента, участвует в альтернативном пути активации системы комплемента
IC50	50%-ная ингибирующая активность
Ig	иммуноглобулин
IκBζ	регуляторный транскрипционный фактор
IκBκ	ингибиторная регуляторная молекула для Nf-κB
IL	интерлейкин
LD ₅₀	доза, вызывающая гибель 50% животных
LRR	lipid rich region
LytA	аутолизин (Autolysine,)
MIF	ингибирующий фактор миграции макрофагов (macrophage migration inhibitory factor)
MRC-1	маннозный рецептор, маркер фенотипа макрофагов M2 и рецептор фагоцитоза
MTT	3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид
MyD88	ген первичного ответа миелоидной дифференцировки
Nan	нейраминидазы (Neuraminidase)
NEMO	NF-κappa-B essential modulator – регуляторный фактор, входит в состав ингибитора κB-киназного комплекса и участвует в регуляции сигнального пути Nf-κB
<i>NFKBIZ</i>	NFKB Inhibitor Zeta - ген, кодирующий IκBζ
Nf-κB	(nuclear factor-κB) ядерный фактор-κB, индуцибельный фактор транскрипции
NLRP3	инфламмосомный комплекс
PcpA	холин-связывающий белок A (Pneumococcal choline-binding protein A)
PcsB	белок, необходимый для репарации клеточной стенки (Sell wall separation protein of group B)

PE	фикоэритрин
Phts	белки полигистидиновой триады (Polyhistidine triad)
PI-1	pilus islet I - гены, кодирующие пили
PiuA, Pia	АВС-транспортеры (Pneumococcal iron uptake)
Ply, rPly, raPly	пневмолизин, рекомбинантный пневмолизин рекомбинантный атоксичный пневмолизин
PlyD1	рекомбинантный атоксичный генетически модифицированный пневмолизин (мутации T65C, G293C, C428A)
Plym2	атоксичный рекомбинантный генетически модифицированный пневмолизин (мутации C429G и W433F)
PsaA	пневмококковый поверхностный антиген А (Pneumococcal surface antigen)
PspA	пневмококковый поверхностный белок А (Pneumococcal surface protein)
PspC	пневмококковый поверхностный белок С (Pneumococcal surface protein C)
RrgA, RrgB, RrgC	белки пилей
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1
STAT1	(signal transducer and activator of transcription 1) преобразователь сигнала и активатор транскрипции 1- транскрипционный фактор
StrkP	сериновая/треониновая протеинкиназа (Serin/threonine proteinkinase)
TLR	toll-like receptor – рецептор врожденного иммунитета
TNF- α	tumor necrosis factor – фактор некроза опухоли α

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахматова Н.К. Влияние дендритных клеток, генерированных при помощи иммуномодуляторов микробного происхождения, на пролиферативную и цитотоксическую активность лимфоцитов / Ахматова Н.К., Лебединская О.В. [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.- 2005. - № 6. - С. 38-42.
2. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев // Л.: Медгиз, 1962. – 183 с.
3. Бактериальные эндотоксины / ОФС.1.2.4.0006.15/МЗ РФ
4. Белошицкий Г.В. Серотиповая характеристика штаммов *S.pneumoniae* в Москве / Г.В. Белошицкий, И.С. Королева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т.74. - №1. - С. 90-97
5. Белошицкий Г.В. Серотиповой пейзаж пневмококков, выделенных при пневмококковом менингите, в Российской Федерации. / Г.В. Белошицкий, И.С. Королева, М.А. Королева // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2015. – Т.81. - №2. - С. 19-25.
6. Брико Н. И. Вакцинопрофилактика взрослого населения против пневмококковой инфекции / Н.И. Брико, И.В. Фельдблюм, А.В. Бикмиева [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. - 2019. - Т. 64. - № 1-2. - С. 37-43.
7. Ванеева Н.П. Изучение перекрестной активности антигенных препаратов *Streptococcus pneumoniae* / Н.П. Ванеева, Д.С. Воробьев, Н.В. Грищенко [и др.] // Журн. микробиол. – 2012. - №5. – С. 36-42.
8. Воробьев Д.С. Изучение протективной активности белоксодержащего комплекса антигенов *Streptococcus pneumoniae* в гомологичной системе / Д.С. Воробьев, И.Б. Семенова, Ю.В. Волох, и др. // Журн. микробиол. - 2013. - №1. – С. 21-26.
9. Воробьев Д.С. Изучение протективной активности белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae* в гетерологичной системе / Д.С.

- Воробьев, И.Б. Семенова, Ю.В. Волох [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2015. - № 6. - С. 51-55.
10. Воробьев Д.С. Свойства нативных белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae* / Д.С. Воробьев, И.Б. Семенова, Ю.В. Волох [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2019. - № 1. - С. 22-28.
11. Ганковская Л.В. Особенности экспрессии Toll-подобного рецептора 2 и Toll-подобного рецептора 4 у детей с бронхиальной астмой / Ганковская Л.В., Намазова-Баранова Л.С., Хорева М.В. [и др.] // Медицинская иммунология. - 2017. - Т. 19. - № 4. - С. 431-440.
12. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика. - Москва. 1999. 459С.
13. Зайцев А.А. Эпидемиология и вакцинопрофилактика у военнослужащих / А.А. Зайцев, В.Г. Акимкин, Н.И. Брико [и др.] // Военно-медицинский журнал. - 2019. - Т. 340. - № 1. - С. 39-45.
14. Колесник Д.С. Эпидемиологические особенности носительства *Streptococcus pneumoniae* среди детей, посещающих дошкольные учреждения Санкт-Петербурга / Д.С. Колесник, А.С. Мохов, Е.А. Лебедева [и др.] // Профилактическая и клиническая медицина. - 2017. - Т. 64. - №3. - С. 28-30
15. Костюкова Н.Н. Факторы патогенности пневмококка и их протективные свойства / Н.Н. Костюкова, В.А. Бехало // Журн.микробиол. - 2014. - № 3. - С.67-77.
16. Курбатова Е.А. Влияние штамма-продуцента и среды культивирования на перекрестную антигенную активность водорастворимых антигенов *Streptococcus pneumoniae* / Е.А. Курбатова, Д.С. Воробьев, Н.Б. Егорова [и др.] // Журн. микробиол. - 2013. - №1. - С. 26-33.
17. Протасова И.Н. Чувствительность к антибиотикам пневмококков, выделенных у детей города Красноярска / И.Н. Протасова, О.В. Перьянова, Н.В. Бахарева [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2014. - Т.16. - №2. - С. 144-148.

- 18.Свитич О.А. Исследование показателей врожденного иммунитета (TLR2, TLR4 и HBD1) в эпителиальных клетках слизистой оболочки уретры при хроническом бактериальном цистите / Свитич О.А., Ганковская Л.В., Беренштейн А.В. [и др.] // Медицинская иммунология. - 2016. - Т. 18. - № 5. - С. 469-474.
- 19.Свитич О.А. Исследование факторов врожденного иммунитета в тканях пародонта у больных с переломами челюстей / Свитич О.А., Греченко В.В., Хелминская Н.М. [и др.] // Стоматология для всех. - 2016. - № 1. - С. 6-10.
- 20.Холодок Г.Н. Частота выявления и характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от носителей и больных у детей в Хабаровском крае / Г.Н. Холодок, Н.В. Морозова, И.Н. Алексеева [и др.] // Журн. Микробиол. – 2010. - №4. - С. 92-94.
- 21.Черкасова Е.И. Работа с культурами клеток / Е.И. Черкасова, А.А. Брилкина // Нижний Новгород: Нижегородский университет, 2015. Электронное издание: http://www.unn.ru/books/met_files/cell%20culture.pdf
- 22.Alexander J.E. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* / J.E. Alexander, R.A. Lock, C.C. Peeters [et al.] // Infect. Immun. – 1994. – V.62. - №12. – P. 5683-5688.
- 23.Alhamdi Y. Circulating pneumolysin is a potent inducer of cardiac injury during pneumococcal infection / Y. Alhamdi, D.R. Neill, S.T. Abrams [et al.] // PLoS Pathog. - 2015. – V.5. - №11.
- 24.Alonso Develasco E. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines / E. Alonso Develasco, A.F. Verheul, J. Verhoef [et al.] // Microbiol. Reviews. – 1995. – V.59. - №4. – P. 591-603.
- 25.Anderson R. Clarithromycin alone and in combination with ceftriaxone inhibits the production of pneumolysin by both macrolide-susceptible and macrolide-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* / R. Anderson, H.C. Steel, R.

- Cockeran [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 2007. – V.59. -№2. – P. 224-229.
26. Anderson R. Comparison of the effects of macrolides, amoxicillin, ceftriaxone, doxycycline, tobramycin and fluoroquinolones, on the production of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae in vitro* / R. Anderson, H.C. Steel, R. Cockeran [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 2007. – V.60. - №5. – P. 1155-1158.
27. Anderson R. Pneumolysin as a potential therapeutic target in severe pneumococcal disease / R. Anderson, C. Feldman // J Infect. – 2017. –V.74. №6. – P.527-544.
28. Andre O.A. Role of *Streptococcus pneumoniae* protein in evasion of complement-mediated immunity / O.A. Andre, T.R. Converso, W.R. Politano [et al.] // Front Microbiol. – 2017. – V.8. – P. 224.
29. Arevalo M.T. Mucosal vaccination with a multicomponent adenovirus-vectored vaccine protects against *Streptococcus pneumoniae* infection in the lung / M.T. Arevalo, Q. Xu, J.C. Paton [et al.] // FEMS Immunol Med Microbiol. - 2009. – V.55. - №3. – P.346-351.
30. Avery O.T. Chemoimmunological studies on the soluble specific substance of pneumococcus. I. The isolation and properties of the acetyl polysaccharide of pneumococcus type I / O.T. Avery, W.F. Goebel // J Exp Med. - 1933. – V.58. - P.731–755.
31. Benton K.A. Role of tumor necrosis factor alpha in the host response of mice to bacteremia caused by pneumolysin-deficient *Streptococcus pneumoniae* / K.A. Benton, J.L. VanCott, D. E. Briles // Infect Immun. – 1998. – V.66 - №2. – P.839-842.
32. Biesbroek G. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children / G. Biesbroek, X. Wang, B.J. Keijser [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2014. – V.20. - №2. – P. 201-210.
33. Briles D.E. Pneumococcal Vaccines / D.E. Briles, J.C. Paton, R. Mukerji [et al.] // Microbiol Spectr. – 2019. – V.7. - №6:10.

34. Bröker M. Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a "neglected valency" - Potential and limitations / M. Bröker, F. Berti, J. Schneider, I. Vojtek // *Vaccine*. – 2017. – V.35. - №25. – P. 3286-3294.
35. Brooks W.A. Safety and immunogenicity of a trivalent recombinant PcpA, PhtD, and PlyD1 pneumococcal protein vaccine in adults, toddlers, and infants: A phase I randomized controlled study / W.A. Brooks, L.J. Chang, X. Sheng, R. Hopfer, PPR02 Study Team. // *Vaccine*. – 2015. – V.33. -№36. – P. 4610-4617.
36. Brown A.O. *Streptococcus pneumoniae* translocates into the myocardium and forms unique microlesions that disrupt cardiac function / A.O. Brown, B. Mann, G. Gao [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2014. – V.10. - №9. - e1004383.
37. Brown J.C. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection / J.C. Brown, A.D. Ogunniyi, M.C. Woodrow [et al.] // *Infect. Immun.* – 2001. - V.69. - №11. – P. 6702-6704.
38. Brumshagen C. FMS-like tyrosine kinase 3 ligand treatment of mice aggravates acute lung injury in response to *Streptococcus pneumoniae*: role of pneumolysin / C. Brumshagen, R. Maus, A. Bischof [et al.] // *Infect Immun.* – 2012. – V.80. - №12. – P. 4281-4290.
39. Buchanan R.M. IL-12-mediated increases in protection elicited by pneumococcal and meningococcal conjugate vaccines / R.M. Buchanan, D.E. Briles, B.P. Arulanandam [et al.] // *Vaccine*. – 2001. – V.19. - №15-16. – P. 2020-2028.
40. Campo J.J. Panproteome-wide analysis of antibody responses to whole cell pneumococcal vaccination / J.J. Campo, T.Q. Le, J.V. Pablo [et al.] // *Elife*. – 2018. – V.7. - e37015
41. Campos I.B. Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the Pneumococcal Surface Protein A: induction of antibodies, complement deposition and partial protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge / I.B. Campos, M. Darrieux, D.M. Ferreira [et al.] // *Microbes Infect.* – 2008. – V.10. -№5. – P. 481-488.

42. Cecchini P. Next generation vaccines: development of a novel *Streptococcus pneumoniae* multivalent protein vaccine. / P. Cecchini, C. Entwisle, M. Joachim [et al.] // *BioProcess J.* – 2015. – V.14. - №3. P. - 18–33.
43. Chaguza C. Mechanisms and impact of genetic recombination in the evolution of *Streptococcus pneumoniae*. / C. Chaguza, J.E. Cornick, D.B. Everett // *Comput Struct Biotechnol J.* – 2015. – V.13. - P. 241-247.
44. Chan W.-Y. A novel, multipleantigen pneumococcal vaccine protects against lethal *Streptococcus pneumoniae* challenge / W.-Y. Chan, C. Entwisle, G. Ercoli [et al.] // *Infect Immun.* – 2019. – V.87. - №3. - e00846-18
45. Claverys J.P. Competence-induced fratricide in streptococci / J.P. Claverys, B. Martin, L.S. Havarstein // *Mol Microbiol.* – 2007. – V.64. - №6. – P. 1423-1433.
46. Cockeran R. Pneumolysin as a vaccine and drug target in the prevention and treatment of invasive pneumococcal disease / R. Cockeran, R. Anderson, C. Feldman // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* – 2005. – V.53. - №3. – P. 189-198.
47. Converso T.R. The Long Search for a Serotype Independent Pneumococcal Vaccine / T.R. Converso, L. Assoni, G.O. André [et al.] // *Expert Rev Vaccines.* – 2020. – V.19. - №1. - P. 57-70.
48. Corcovan M. The epidemiology of invasive disease in older adults in the post-PCV era. Has there been a herd effect? / M. Corcovan, I. Vickers, J. Mereckiene [et al.] // *Epidemiol Infect.* – 2017. – V.145. - №11. – P.2390-2399.
49. Daniels C.C. The proline rich region of pneumococcal surface protein A and C contains surface accessible epitopes common to all pneumococci and elicits antibody mediated protection against sepsis. / C.C. Daniels, P. Coan, J. King [et al.] // *Infect. Immun.* – 2010. – V.78. - №5. - P. 2163-2172.
50. Darriex M. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines / M. Darriex, C. Goulart, D. Briles [et al.] // *Crit Rev Microbiol.* – 2015. – V.41. - №2. – P. 190-200.

51. Darriex M. Fusion proteins containing family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that correlates with antibody mediated enhancement of complement deposition / M. Darriex, E.N. Miyaji, D.M. Ferreira [et al.] // *Infect. Immun.* – 2007. – V.75. - №12. – P. 5930-5938.
52. Das R. Macrophage migration inhibitor factor promotes clearance of pneumococcal colonization / R. Das, M.I. LaRose, C.B. Hergott [et al.] // *J Immunol.* – 2014. – V.193. - №2. - P. 764-772.
53. Dave S. Pspc, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. / S. Dave, A. Brooks-Walter, M.K. Pangburn [et al.] // *Infect. Immun.* – 2001. - V.69. - №5. – P. 3435–3437.
54. Delves P.J. Roitt's Essential immunology 13th edition / P.J. Delves, S.J. Martin, D.R. Burton, I.M. Roitt // Chichester, West Sussex ; Hoboken, [NJ] : John Wiley & Sons, Inc., 2017. - 577 P.
55. Dessing M.C. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice / M.C. Dessing, R.A. Hirst, A.F. de Vos, T. van der Poll // *PLoS One.* – 2009. – V.4. - №11 :e7993.
56. Entwisle C. Safety and immunogenicity of a novel multiple antigen pneumococcal vaccine in adults: A phase 1 randomized clinical trial / C. Entwisle, S. Hill, Y. Pang [et al.] // *Vaccine.* – 2017. - V.35. - №51. - P. 7181-7186.
57. Feldman C. Community-Acquired Pneumonia: Pathogenesis of Acute Cardiac Events and Potential Adjunctive Therapies / C. Feldman, R. Anderson // *Chest.* – 2015. – V.148. - №2. – P. 523-532.
58. Feldman C. Prevalence, pathogenesis, therapy, and prevention of cardiovascular events in patients with community-acquired pneumonia / C. Feldman, R. Anderson // *Pneumonia (Nathan).* – 2016. – V.8. - №11.
59. Feldman C. Review: current and new generation pneumococcal vaccines / C. Feldman, R. Anderson // *J Infect.* – 2014. – V.69. - №4. - P. 309-325.
60. Flasche S. The scope for pneumococcal vaccines that do not prevent transmission / S. Flasche // *Vaccine.* – 2017. – V.35. - №45. – P. 6043-6046.

61. Frey S.E. A Phase I, dose-escalation trial in adults of three recombinant attenuated *Salmonella Typhi* vaccine vectors producing *Streptococcus pneumoniae* surface protein antigen PspA / S.E. Frey, K.R. Lottenbach, H. Hill [et al.] // *Vaccine*. – 2013. – V.31. – №42. – P. 4874-4880.
62. Fukuda Y. Effects of macrolides on pneumolysin of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* / Y. Fukuda, K. Yanagihara, Y. Higashiyama [et al.] // *Eur Respir J*. – 2006. – V.27. - №5. – P. 1020-1025.
63. Gámez G. The variome of pneumococcal virulence factors and regulators / G. Gámez, A. Castro, A. Gómez-Mejía [et al.] // *BMC Genomics*. – 2018. – V.19. - №1. – P. 10.
64. García-Suárez Mdel M. Protection against pneumococcal pneumonia in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin / M. García-Suárez Mdel, M.D. Cima-Cabal, N. Flórez [et al.] // *Infect Immun*. – 2004. – V.72. - №8. – P. 4534-4540.
65. Gattarello S. Decrease in mortality in severe community-acquired pneumococcal pneumonia: impact of improving antibiotic strategies (2000-2013) / S. Gattarello, B. Borgatta, J. Sole'-Violan [et al.] // *Chest*. – 2014. – V.146. - №1. - P. 22-31.
66. Giefring C. Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies / C. Giefring, A.L. Meinke, M. Hanner [et al.] // *J. Exp. Med*. – 2008. – V.205. - №1. – P.117-131.
67. Ginsburg A.S. Issues and challenges in the development of pneumococcal protein vaccines: a two day international symposium / A.S. Ginsburg, M.H. Nahm, F.M. Khambaty [et al.] // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2012. – V.11. - №3. – P. 279-285.
68. Glover D.T. *Streptococcus pneumoniae* surface protein PcpA elicits protection against lung infection and fatal sepsis / D.T. Glover, S.K. Hollingshead, D.E. Briles // *Infect. Immun*. – 2008. – V.76. - №6. – P. 2767-2776.

69. Godfroid F. Preclinical evaluation of the Pht proteins as potential cross-protective pneumococcal vaccine antigens / F. Godfroid, P. Hermand, V. Verlant [et al.] // *Infect. Immun.* – 2011. – V.79. - №1. – P. 238-245.
70. Goulart C. A combination of recombinant mycobacterium bovis bcg strains expressing pneumococcal proteins induces cellular and humoral immune responses and protects against pneumococcal colonization and sepsis / C. Goulart, D. Rodriguez, A.I. Kanno [et al.] // *Clin Vaccine Immunol.* - 2017. – V.24. -№10.:e00133-17.
71. Goulart C. Recombinant BCG expressing a PspA-PdT fusion protein protects mice against pneumococcal lethal challenge in a prime-boost strategy / C. Goulart, D. Rodriguez, A.I. Kanno [et al.] // *Vaccine.* – 2017. – V.35. - №13. – P. 1683-1691.
72. Greenberg D. Safety and immunogenicity of 15valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15) in healthy infants / D. Greenberg, P.A. Hoover, T. Vesikari [et al.] // *Vaccine.* – 2018. – V.36. - №45. - P. 6883-6891.
73. Halbert S.P. Toxic and immunological properties of pneumococcal hemolysin / S.P. Halbert, B. Cohen, M.E. Perkins // *Bull Johns Hopkins Hosp.* – 1946. – V.78. – P. 340-359.
74. Harada T. Premedication with clarithromycin is effective against secondary bacterial pneumonia during influenza virus infection in a pulmonary emphysema mouse model / T. Harada, Y. Ishimatsu, A. Hara [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2016. – V.358. - №3. – P. 457-463.
75. Harfouche C. RrgB321, a fusion protein of the three variants of the pneumococcal pilus backbone RrgB, is protective *in vivo* and elicits opsonic antibodies / C. Harfouche, S. Filippini, C. Gianfaldoni [et al.] // *Infect. Immun.* – 2012. – V.80. - №1. – P. 451-460.
76. Havers F. Statin use and hospital length of stay among adults hospitalized with community-acquired pneumonia / F. Havers, A.M. Bramley, L. Finelli [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2016. – V.62. - №12. - P. 1471-1478.

77. Henry B.D. Engineered liposomes sequester bacterial exotoxins and protect from severe invasive infections in mice / B.D. Henry, D.R. Neill, K.A. Becker [et al.] // *Nat Biotechnol.* – 2015. – V.33. - №1. - P. 81-88.
78. Higuchi R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions / R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson // *Biotechnology (NY)*. – 1993. – V.9. – P. 1026-30.
79. Higuchi R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences / R. Higuchi, G. Dollinger, P.S. Walsh, R. Griffith // *Biotechnology (NY)*. – 1992. – V.10. - №4. - P. 413-7.
80. Houldsworth S. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes / S. Houldsworth, P.W. Andrew, T.J. Mitchell // *Infect Immun.* – 1994. – V.62. - №4. - P. 1501-3.
81. Hu D.K. *In vitro* expression of *Streptococcus pneumoniae* ply gene in human monocytes and pneumocytes / D.K. Hu, Y. Liu, X.Y. Li, Y. Qu. // *Eur J Med Res.* – 2015. – V.20. - №1. – P. 52.
82. Huo Z. Antibody response to pneumolysin and to pneumococcal capsular polysaccharide in healthy individuals and *Streptococcus pneumoniae* infected patients / Z. Huo, O. Spencer, J. Miles [et al.] // *Vaccine.* – 2004. – V.22. - №9-10. - P. 1157-1161.
83. Hyams C. *Streptococcus pneumoniae* resistance to complement-mediated immunity is dependent on the capsular serotype / C. Hyams, J. Yuste, K. Bax [et al.] // *Infect Immun.* - 2010. – V.78. – P. 716-725.
84. Iannelli F. Allelic variation in the highly polymorphic locus *pspC* of *Streptococcus pneumoniae* / F. Iannelli, M.R. Oggioni, G. Pozzi // *Gene.* – 2002. – V.284. - №1-2. - P. 63-71.
85. Jackson L.A. Pneumococcal vaccination of elderly adults: new paradigm for protection / L.A. Jackson, E.N. Janoff // *Clin. Infect. Dis.* – 2008. – V.47. – P. 1328-1338.

86. Jefferies J.M. Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks / J.M. Jefferies, C.H. Johnston, L.A. Kirkham [et al.] // *J Infect Dis.* – 2007. – V.196. - №6. - P. 936-44.
87. Jochems S.P. The immunological mechanisms that control pneumococcal carriage / S.P. Jochems, J.N. Weiser, R. Malley, D.M. Ferreira // *PLoS Pathog.* – 2017. – V.13. - №12. - :e1006665.
88. Johnson S.E. Inhibition of pneumococcal carriage in mice by subcutaneous immunization with peptides from the common surface protein pneumococcal surface adhesion A / S.E. Johnson, J.K. Dykes, D.L. Jue [et al.] // *J. Infect. Dis.* - 2002. – V.185. – P. 489-496.
89. Kadioglu A. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection / A. Kadioglu, W. Coward, M.J. Colston [et al.] // *Infect Immun.* – 2004. – V.72. - №5. – P. 2689-97.
90. Kamtchoua T. Safety and immunogenicity of the pneumococcal pneumolysin derivative PlyD1 in a single-antigen protein vaccine candidate in adults / T. Kamtchoua, M. Bologa, R. Hopfer [et al.] // *Vaccine.* – 2013. – V.31. - №2. - P. 327-333.
91. Kang H.Y. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine / H.Y. Kang, J. Srinivasan, R. Curtiss 3rd // *Infect Immun.* – 2002. – V.70. – №4. – P. 1739-1749.
92. Keller L.E. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: emergence and pathogenesis / L.E. Keller, D.A. Robinson, L.S. McDaniel // *MBio.* - 2016. – V.7. -№2. - e01792.
93. Khan M.N. An ahemolytic pneumolysin of *Streptococcus pneumoniae* manipulates human innate and CD4+ T-cell responses and reduces resistance to colonization in mice in a serotype-independent manner / M.N. Khan, J.R.

- Coleman, J. Vernatter [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – V.210. –P. 1658–1669.
- 94.Khan M.N. PcpA of *Streptococcus pneumoniae* mediates adherence to nasopharyngeal and lung epithelial cells and elicits functional antibodies in humans / M.N. Khan, S.K. Sharma, L.M. Filkins [et al.] // *Microbes Infect.* – 2012. – V.14. - №12. - P. 1102-1110.
- 95.Khan M.N. Vaccine candidates PhtD and PhtE of *Streptococcus pneumoniae* are adhesins that elicit functional antibodies in humans / M.N. Khan, M.E. Pichichero // *Vaccine*. – 2012. – V.30. - №18 - P. 2900-2907.
- 96.Khan N. Towards identifying protective B-cell epitopes: the PspA story / N. Khan, A.T. Jan // *Front. Microbiol.* – 2017. – V.8. – P. 742.
- 97.King S.J. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae* / S.J. King, K.R. Hippe, J.N.Weiser // *Mol. Microbiol.* – 2006. – V.59. – №3. - P. 961–974.
- 98.Kuipers K. Age-related differences in IL-1 signaling and capsule serotype affect persistence of *Streptococcus pneumoniae* colonization / K. Kuipers, K.L. Lokken, T. Zangari [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2018. – V.14 - №10. - e1007396.
- 99.Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – V.227. – P. 680-685.
100. Lagrou K. Subinhibitory concentrations of erythromycin reduce pneumococcal adherence to respiratory epithelial cells *in vitro* / K. Lagrou, W.E. Peetermans, M. Jorissen [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2000. – V.46. – №5 - P. 717-723.
101. Langermann S. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A / S. Langermann, S.R. Palaszynski, J.E. Burlein [et al.] // *J Exp Med.* – 1994. – V.180. - №6. - P. 2277-2286.

102. Li H. b-Sitosterol interacts with pneumolysin to prevent *Streptococcus pneumoniae* infection / H. Li, X. Zhao, J.Wang [et al.] // *Sci Rep.* – 2015. – V.5. – P. 17668.
103. Li Y. Evaluation of new generation *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA / Y. Li, S. Wang, G. Scarpellini [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – V.106. - №2. - P. 593-598.
104. Lipsitch M. Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship? / M. Lipsitch, E.R. Moxon // *Trends Microbiol.* – 1997. – V.5. - №1. - P. 31-37.
105. Littmann M. *Streptococcus pneumoniae* evades human dendritic cell surveillance by pneumolysin expression / M. Littmann, B. Albiger, A. Frentzen [et al.] // *EMBO Mol Med.* – 2009. – V.1. - №4. - P. 211-222.
106. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods.* – 2001. – V.25. - №4. - P. 402-408.
107. Long J.P. Immunization with native or recombinant *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase affords protection in the chinchilla otitis media model / J.P. Long, H.H. Tong, T.F. DeMaria // *Infect. Immun.* – 2004. – V.72. - №7. - P. 4309-4313.
108. Lu J. Detoxified pneumolysin derivative plym2 directly protects against pneumococcal infection via induction of inflammatory cytokines / J. Lu, T. Sun, H. Hou [et al.] // *Immunological Investigations.* – 2014. – V.43. - №7. - P. 717–726.
109. Lu J. Systemic and mucosal immune responses elicited by intranasal immunization with a pneumococcal bacterium-like particle-based vaccine displaying pneumolysin mutant Plym2 / J. Lu, H. Hou, D. Wang [et al.] // *Immunol Lett.* – 2017. – V.187. – P.41-46.

110. Manco S. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis / S. Manco, F. Hernon, H. Yesilkaya [et al.] // *Infect. Immun.* – 2006. – V.74. - №7. - P. 4014–4020.
111. Manning J. Effect of a pneumococcal whole cell vaccine on influenza A-induced pneumococcal otitis media in infant mice / J. Manning, E.M. Dunne, N. Wang [et al.] // *Vaccine.* – 2019. – V.37. - №26. - P. 3495-3504.
112. Marks L.R. Biofilm formation enhances fomite survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* / L.R. Marks, R.M. Reddinger, A.P. Hakansson // *Infect. Immun.* – 2014. - V.82. – P. 1141–1146.
113. Martin B. Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae* / B. Martin, M. Prudhomme, G. Alloing [et al.] // *Mol Microbiol.* – 2000. – V.38. - №4. - P. 867–878.
114. Martner A. *Streptococcus pneumoniae* autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines / A. Martner, S. Skovbjerg, J.C. Paton, A.E. Wold // *Infect. Immun.* – 2009. - P. 3826–3837
115. Matthias K.A. Neutrophil- toxin interactions promote antigen delivery and mucosal clearance of *Streptococcus pneumoniae* / K.A. Matthias, A.M. Roche, A.J. Standish [et al.] // *J Immunol.* – 2008. – V.180. - №9. - P. 6246-6254.
116. McFetridge R. Safety, tolerability, and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults / R. McFetridge, A.S. Meulen, S.D. Folkerth [et al.] // *Vaccine.* – 2015. – V.33. - №24. – P. 2793-2799.
117. McNeela E.A. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4 / E.A. McNeela, A. Burke, D.R. Neill [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2010. – V.6. - №11. - e1001191.
118. Medina M. Nasal immunization with *Lactococcus lactis* expressing the pneumococcal protective protein A induces protective immunity in mice / M. Medina, J. Villena, E. Vintini [et al.] // *Infect Immun.* – 2008. – V.76. - №6. - P. 2696-2705.

119. Mills M.F. Localization of PcsB of *Streptococcus pneumoniae* and its differential expression in response to stress / M.F. Mills, M.E. Marquart, L.S. McDaniel // *J. bacteriol.* – 2007. – V.189. - №12. – P. 4544–4546.
120. Mitchell T.J. MACPF/CDC Proteins - Agents of Defence, Attack and Invasion / T.J. Mitchell, C.E. Dalziel // Springer Science+Business Media Dordrecht. - *Subcellular Biochemistry.* – V.80. – 2014. – 329 P.
121. Moffit K. Rationale and prospects for novel pneumococcal vaccines / K. Moffit, R. Malley // *Hum Vaccin Immunother.* – 2016. – V.12. - №2. – P. 383-392.
122. Muralinath M. Immunization with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-derived outer membrane vesicles delivering the pneumococcal protein PspA confers protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae* / M. Muralinath, M.J. Kuehn, K.L. Roland, R. Curtiss 3rd // *Infect Immun.* – 2011. – V.79. - №2. – P. 887-894.
123. Musher D.M. Protection against bacteremic pneumococcal infection by antibody to pneumolysin / D.M. Musher, H.M. Phan, R.E. Baughn // *J Infect Dis.* - 2001. – V.183. - №5. - P.827-830.
124. Nerlich A. Pneumolysin induced mitochondrial dysfunction leads to release of mitochondrial DNA / A. Nerlich, M. Mieth, E. Letsiou [et al.] // *Sci Rep.* – 2018. – V.8. - №1. – P. 182.
125. Odotola A. Efficacy of a novel, protein-based pneumococcal vaccine against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in infants: A phase 2, randomized, controlled, observer-blind study / A. Odotola, M.O. Ota, M. Antonio [et al.] // *Vaccine.* – 2017. – V.35. - №19. - P. 2531-2542.
126. Odotola A. Reactogenicity, safety and immunogenicity of a protein-based pneumococcal vaccine in Gambian children aged 2-4 years: A phase II randomized study / A. Odotola, M.O. Ota, E.O. Ogundare [et al.] // *Hum Vaccin Immunother.* – 2016. – V.12. - №2. - P. 393-402.
127. Okade H, Funatsu T, Eto M et al. Impact of the pneumococcal conjugate vaccine on serotype distribution and susceptibility trends of pediatric non-

- invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Tokai, Japan over a 5-year period / H. Okade, T. Funatsu, M. Eto [et al.] // *J Infect Chemother.* - 2014. - V.20. - №7. - P. 423-428.
128. Oloo EO. Structure guided antigen engineering yields pneumolysin mutants suitable for vaccination against pneumococcal disease / E.O. Oloo, J.A. Yethan, M.M.Ochs [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2011. - V.286. - V.14. - P. 12133-12140.
129. Park I.H. Population-based analysis of invasive nontypeable pneumococci reveals that most have defective capsule synthesis genes / I.H. Park, K.A. Geno, L.K. Sherwood [et al.] // *PLoS One.* - 2014. - V.9. - №5. - e97825.
130. Paton J.C. Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin / J.C. Paton, B. Rowan-Kelly, A. Ferrante // *Infect Immun.* - 1984. - V.43. - P. 1085-1087.
131. Paton J.C. Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae* / J.C. Paton, R.A. Lock, D.J. Hansman // *Infect Immun.* - 1983. - V.40. - №2. - P. 548-552.
132. Perez-Dorado I. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts / I. Perez-Dorado, S. Galan-Bartual, J.A. Hermoso // *Mol Oral Microbiol.* - 2012. - V.27. - №4. - P. 221-245.
133. Pestova E.V. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system / E.V. Pestova, L.S. Havarstein, D.A. Morrison // *Mol Microbiol.* - 1996. - V.21. - №4. - P. 853-862.
134. Peterson S.N. Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays / S.N. Peterson, C.K. Sung, R. Cline [et al.] // *Mol Microbiol.* - 2004. - V.51. - №4. - P. 1051-1070.
135. Piao Z. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice / Z. Piao, Y. Akeda, D. Takeuchi [et al.] // *Vaccine.* - 2014. - V.32. - P. 5607-5613.

136. Plumptre C.D. Surface association of Pht proteins of *Streptococcus pneumoniae* / C.D. Plumptre, A.D. Ogunniyi, J.C. Paton // Infect. Immun. – 2013. - V.81. - №10. – P. 3644-3651.
137. Principi N. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years / N. Principi, S. Esposito // Expert. Opin. Biol. Ther. – 2018. – V.18. - №1. - P. 7-17.
138. Prymula R. Safety, reactogenicity and immunogenicity of two investigational pneumococcal protein-based vaccines: results from a randomized phase II study in infants / R. Prymula, L. Szenborn, S.A. Silfverdal [et al.] // Vaccine. – 2017. – V.35. – P. 4603-4611.
139. Richard A.L. TLR2 Signalling decreases transmission of *Streptococcus pneumoniae* by limiting bacterial shedding in an infant mouse influenza A co-infection model / A.L. Richard, S.J. Siegel, J. Erikson, J.N. Weiser // PLoS Pathog. – 2014. – V.10. - №8. - e1004339.
140. Roche H. Relative role of genetic background and variation in PspA in the ability of antibodies to PspA to protect against capsular type 3 and 4 strains of *Streptococcus pneumoniae* / H. Roche, B. Ren, L.S. McDaniel [et al.] // Infect. Immun. – 2003. – V.71. - №8. - P. 4498-4505.
141. Rogers P.D. Pneumolysin-dependent and -independent gene expression identified by cDNA microarray analysis of THP-1 human mononuclear cells stimulated by *Streptococcus pneumoniae* / P.D. Rogers, J. Thornton, K.S. Barker [et al.] // Infect Immun. – 2003. – V.71. - №4. - P. 2087-2094.
142. Romero-Steiner S. Inhibition of pneumococcal adherence to human nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies / S. Romero-Steiner, T. Pilshvili, J.S. Sampson [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2003. – V.10. - №2. - P. 246-251.
143. Rosch J.W. Statins protect against fulminant pneumococcal infection and cytolysin toxicity in a mouse model of sickle cell disease / J.W. Rosch, A.R. Boyd, E. Hinojosa [et al.] // J Clin Invest. – 2010. – V.120. - №2. - P. 627-635.

144. Rupp R. A dose ranging study of 2 different formulations of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15) in healthy infants / R. Rupp, D. Hurley, S. Grayson [et al.] // *Hum Vaccin Immunother.* – 2019. – V.15. - №3. - P. 549-559.
145. Selva L. Prevalence and clonal distribution of PcpA, PsrP and Pilus-1 among pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae* / L. Selva, P. Ciruela, K. Blanchette [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – V.7. - №7. – e41587.
146. Shorr AF. Azithromycin and survival in *Streptococcus pneumoniae* pneumonia: a retrospective study / A.F. Shorr, M.D. Zilberberg, J. Kan [et al.] // *BMJ Open.* – 2013. - V.3. - №6. – e002898.
147. Sings H.L. Pneumococcal conjugate vaccine use in adults – Addressing an unmet medical need for non-bacteremic pneumococcal pneumonia / H.L. Sings // *Vaccine.* – 2017. – V.35. - №40. – P. 5406-5417.
148. Sobanjo-ter Meulen A. Safety, tolerability and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine in toddlers previously vaccinated with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine / A. Sobanjo-ter Meulen, T. Vesikari, E.A. Malacaman [et al.] // *Pediatr Infect Dis J.* – 2015. – V.34. - №2. - P. 186-194.
149. Song M. Apigenin protects mice from pneumococcal pneumonia by inhibiting the cytolytic activity of pneumolysin / M. Song, L. Li, M. Li [et al.] // *Fitoterapia.* – 2016. – V.115. – P. 31-36.
150. Spreer A. Influence of subinhibitory concentrations of protein-synthesis-inhibiting antibiotics on production and release of the pneumococcal virulence factor pneumolysin *in vitro* / A. Spreer, C. von Ruden, T.J. Mitchell [et al.] // *Chemotherapy.* – 2007. – V.53. - №5. - P. 327-331.
151. Spreer A. Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae in vitro* and *in vivo* after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone / A. Spreer, H. Kerstan, T. Böttcher [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2003. – V.47. - №8. P. 2649-2654.

152. Stacey H.L. Safety and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV-15) compared to PCV-13 in healthy older adults / H.L. Stacey, J. Rosen, J.T. Peterson [et al.] // *Hum Vaccin Immunother.* – 2019. – V.15. - №3. - P. 530-539.
153. Statt S. Statin-conferred enhanced cellular resistance against bacterial pore-forming toxins in airway epithelial cells / S. Statt, J.W. Ruan, L.Y. Hung [et al.] // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2015. – V.53. - №5. - P. 689-702.
154. Steel H.C. Pathogen- and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics / H.C. Steel, A.J. Theron, R. Cockeran [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2012:584262.
155. Subramanian K. Pneumolysin binds to the Mannose-Receptor C type 1 (MRC-1) leading to anti-inflammatory responses and enhanced pneumococcal survival / K. Subramanian, D.R. Neill, H. Malak [et al.] // *Nat Microbiol.* – 2019. – V.4. - №1. - P. 62–70.
156. Sundaram K. $\text{IKB}\zeta$ regulates human monocyte pro-inflammatory responses induced by *Streptococcus pneumoniae* / K. Sundaram, M.A. Rahman, S. Mitra [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – V.11. - №9. – e0161931.
157. Tarahomjoo S. Recent approaches in vaccine development against *Streptococcus pneumoniae* / S. Tarahomjoo // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* - 2014. – V.24. - P. 215-227.
158. Thompson A. Phase 1 trial of a 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults / A. Thompson, E. Lamberth, J. Severs [et al.] // *Vaccine.* – 2019. – V.37. - №42. - P. 6201-6207.
159. Tin Tin Htar M. Effectiveness of pneumococcal vaccines in preventing pneumonia in adults, a systematic review and meta-analyses of observational studies / M. Tin Tin Htar, A.L. Stuurman, G. Ferreira [et al.] // *PLoS One.* - 2017. – V.12. - №5. – e0177985.
160. Tomasz A. Control of the competent state in pneumococcus by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria / A. Tomasz // *Nature.* – 1965. – V.208. - P. 155–159.

161. Ullah I. The interrelationship between phagocytosis, autophagy and formation of neutrophil extracellular traps following infection of human neutrophils by *Streptococcus pneumoniae* / I. Ullah, N.D. Ritchie, T.J. Evans // *Innate Immun.* – 2017. – V.23. - №5. - P. 413-423.
162. Valentino M.D. Unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* from conjunctivitis encode variant traits and belong to a distinct phylogenetic cluster / M.D.Valentino, A.M. McGuire, J.W. Rosch [et al.] // *Nat Commun.* – 2014. – V.5. –P. 5411.
163. Verhagen L.M. Genome-wide identification of genes essential for the survival of *Streptococcus pneumoniae* in human saliva / L.M. Verhagen, M.I. de Jonge, P. Burghout [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – V.9. - №2. – e89541.
164. Vernatter J. Current concepts in host-microbe interaction leading to pneumococcal pneumonia / J. Vernatter, L. Pirofski // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2013. – V.26. - №3. - P. 277-283.
165. Viasus D. The effect of simvastatin on inflammatory cytokines in community-acquired pneumonia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial / D. Viasus, C. Garcia-Vidal, A.F. Simonetti [et al.] // *BMJ Open.* - 2015. – V.5. - №1. – e006251.
166. Walsh R.L. *Streptococcus pneumoniae* is desiccation tolerant and infectious upon rehydration / R.L. Walsh, A. Camilli // *mBio.* – 2011. – V.2. - №3. – e00092-e11.
167. Wang S. Immune responses to recombinant pneumococcal PsaA antigen delivered by a live attenuated *Salmonella* vaccine / S. Wang, Y. Li, H. Shi [et al.] // *Infect Immun.* – 2010. – V.78. - №7. - P. 3258-3271.
168. Weiser J.N. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion / J.N. Weiser, D.M. Ferreira, J.C. Paton // *Nat Rev Microbiol.* - 2018. –V.16. - №6. - P. 355-367.
169. Wijmenga-Monsuur A.J. Direct comparison of immunogenicity induced by 10- or 13-valent pneumococcal conjugate vaccine around the 11-month booster

- in dutch infants / A.J. Wijmenga-Monsuur, E. van Westen, M.J. Knol [et al.] // PLoS One. – 2015. – V.10. - №12. – e0144739.
170. Wu J. Engineering detoxified pneumococcal pneumolysin derivate $\Delta A146$ Ply for self-biomineralization of calcium phosphate: assessment of their protective efficacy in murine infection models / J. Wu, K.Wu, W. Xu [et al.] // Biomaterials. – 2018. – V.155. - P. 152-164.
171. Xin W. Analysis of type II secretion of recombinant pneumococcal PspA and PspC in a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* vaccine with regulated delayed antigen synthesis / W. Xin, S.Y. Wanda, Y. Li [et al.] // Infect Immun. – 2008. – V.76. - №7. - P. 3241-3254.
172. Yahiaoui R.Y. Distribution of serotypes and patterns of antimicrobial resistance among commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries / R.Y. Yahiaoui, J.B. Hester, C.D.J. den Heijer [et al.] // BMC Infect Dis. – 2018. – V.18. - №1. – P. 440.
173. Yahiaoui R.Y. Team prevalence and antibiotic resistance of commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries / R.Y. Yahiaoui, C.Dj den Heijer, E.M.van Bijnen [et al.] // Future Microbiol. – 2016. – V.11. – P. 737-744.
174. Yamamoto K. Clarithromycin prevents human respiratory syncytial virus-induced airway epithelial responses by modulating activation of interferon regulatory factor-3 / K.Yamamoto, S.Yamamoto, N. Ogasawara [et al.] // Pharmacol Res. – 2016. – V.111. – P. 804-814.
175. Yuan Z.Q. Intranasal immunization with autolysin (LytA) in mice model induced protection against five prevalent *Streptococcus pneumoniae* serotypes in China / Z.Q.Yuan, Z.Y. Lv, H.Q. Gan [et al.] // Immunol. Res. – 2011. – V.51. – P. 108-115.
176. Zafar M.A. Capsule type and amount affect shedding and transmission of *Streptococcus pneumoniae* / M.A. Zafar, S. Hamaguchi, T. Zangari [et al.] // mBio. - 2017. – V.8. - №4. - e00989-17.

177. Zafar M.A. Host- to-host transmission of *Streptococcus pneumoniae* is driven by its inflammatory toxin, pneumolysin / M.A. Zafar, Y. Wang, S. Hamaguchi, J.N.Weiser // Cell Host Microbe. – 2017. – V.21. - №1. – P. 73-83.
178. Zhao X. Anticytotoxin effects of amentoflavone to pneumolysin / X. Zhao, B. Liu, S. Liu [et al.] // Biol Pharm Bull. – 2017. – V.40. - №1. - P. 61-67.
179. Zhao X. Verbascoside alleviates pneumococcal pneumonia by reducing pneumolysin oligomers / X. Zhao, H. Li, J. Wang [et al.] // Mol Pharmacol. – 2016. – V.89. - №3. - P. 376-387.