

На правах рукописи

ПЕТУХОВА Екатерина Сергеевна

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

14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Научный руководитель: кандидат медицинских наук
Воробьев Денис Сергеевич

Официальные оппоненты:

Пинегин Борис Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России, отдел иммунодиагностики и иммунокоррекции, заведующий;

Афанасьев Станислав Степанович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, главный научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 001.035.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» по адресу: 105064, г. Москва, Малый Казенный переулок, 5А.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» и на сайте института: <http://www.instmech.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Ирина Владимировна Яковлева

Актуальность темы исследования

Пневмококковые инфекции занимают одно из ведущих мест среди инфекционных заболеваний верхних и нижних дыхательных путей. *Streptococcus pneumoniae* вызывает как тяжелые инвазивные (пневмония, менингит и сепсис), так и локальные формы инфекции (конъюнктивит, отит). В 2017 г. ВОЗ признала пневмококк одним из приоритетных патогенов [Weiser JN et al., 2018].

Эффективной мерой, способствующей снижению заболеваемости и смертности от пневмококковой инфекции, является вакцинация [Briles DE et al., 2019]. Современные вакцины, разрешенные к применению в клинической практике, основаны на использовании капсульного полисахарида пневмококка или его конъюгатов с белком-носителем [Huysmans C et al., 2010, Белошицкий Г.В. и др., 2014; Wijmenga-Monsuur AJ et al., 2018]. По строению капсульного полисахарида выделяют более 95 серотипов пневмококка, к каждому из которых формируется строгий серотипспецифический иммунный ответ [Darrieh M et al., 2015]. В состав вакцин включены капсульные полисахариды наиболее распространенных серотипов пневмококка, вызывающих инвазивные заболевания у взрослых и детей. В результате применения этих вакцин снижается как общая заболеваемость пневмококковыми инфекциями, так и в группах риска [Principi N et al., 2018].

Однако при анализе результатов использования существующих вакцин выявлено, что вакцинация ассоциирована с замещением вакцинных серотипов невакцинными [Feldman C et al., 2014]. Кроме этого, увеличилась доля бескапсульных и антибиотикорезистентных штаммов *S. pneumoniae* при пневмококковых заболеваниях; возросла частота колонизации носоглотки другими видами бактерий, в том числе *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, стрептококками и анаэробной микрофлорой [Yahiaoui RY et al., 2018; Biesbroek G et al., 2014; Okade H et al., 2014; Park IH et al., 2014; Valentino MD et al., 2014].

На протяжении последних 30 лет в мире активно разрабатывается поиск новых протективных антигенов пневмококка, способных обеспечить серотипнезависимый иммунитет [Converso TR et al., 2020; Briles DE et al., 2019]. Рассматривают различные варианты вакцин: векторные, цельноклеточные убитые, субъединичные [Campos IB et al., 2008; Cecchini P et al. 2015; Godfroid F et al., 2011; Harfouche C et al., 2012]. Одной из перспективных стратегий является получение

рекомбинантных белков пневмококка, которые обладают высокой степенью гомологии внутри вида и могут обеспечить перекрестную протективную активность [Alexander J.E. et al., 1994; Alonso Develasco E et. al., 1995; Darriex M et. Al., 2015].

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 [Converso TR et al., 2020; Briles DE et al., 2019]. Вместе с тем меняется концепция разработки вакцины: исследователи приходят к выводу, что эффективная вакцина должна предотвращать инвазивные заболевания, но минимально влиять на колонизацию, так как это может привести к замещению экологической ниши другими серотипами пневмококка, а также другими видами патогенов [Briles DE et al., 2019; Converso TR et al, 2020].

В качестве одного из перспективных протективных антигенов рассматривают консервативный пневмококковый белок пневмолизин (Ply). Нативный пневмолизин является токсином, поэтому необходимо использовать его атоксичные варианты, полученные вследствие генетических модификаций в структуре нуклеотидной последовательности, кодирующей синтез полноразмерного белка [Oloo EO et al., 2011].

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

Задачи:

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 пневмолизином.

5. Оценить действие рекомбинантного атоксичного пневмолизина на экспрессию генов эффекторов врожденного иммунитета и созревание дендритных клеток.

Научная новизна.

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 гистосовместимости класса II (МНС II), экспрессию костимуляторных молекул CD80 и CD86, что подтверждает созревание ДК.

Теоретическая и практическая значимость работы

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 гаРly 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 гаРлу 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 проведённых исследований, выполненных на современном уровне, и адекватным статистическим анализом полученных данных.

Материалы научно-квалификационной работы представлены на Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» (г. Москва, 2018); на Международном конгрессе МАКМАХ по антимикробной химиотерапии и клинической микробиологии (г. Москва, 2018), XI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным

болезням с международным участием (г. Москва, 2019), Научной конференции с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам» (г. Москва, 2019).

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4-х глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы, включающего 179 источников, из которых 21 - отечественные и 158 - зарубежные. Диссертационная работа содержит 17 таблиц и иллюстрирована 12 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе были использованы следующие препараты:

- рекомбинантный пневмолизин *S. pneumoniae* с молекулярной массой 53 кДа¹.
- моноклональные антитела IgG1 к пневмолизину (100 мкг/мл, Santa Cruz Biotechnology, США).
- адьювант Al(OH)₃ («Sigma», США).
- вторичные мышинные антитела (IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), меченые пероксидазой хрена (ThermoScientific, США).
- клеточная линия Vero, эпителий почки зеленой мартышки (ATCC, США).
- клеточная линия К-562, хроническая миелогенная лейкемия (ATCC, США).
- коммерческая питательная среда LB.
- FITC (флюоресцеинизотиоционат) и PE (фикоэритрин) меченые антитела («Caltag Laboratories», США).
- праймеры («Синтол», РФ) [Свитич О.А. и др., 2016; Ганковская Л.В. и др., 2017].

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

Для наработки серий препарата рекомбинантного пневмолизина использовали штамм-продуцент *Escherichia coli* M15, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболенск»). Культивирование штамма-продуцента проводили в жидкой коммерческой среде LB с последующим использованием сорбента Ni-сефарозы для выделения белка с помощью аффинной хроматографии. Полученные серии рекомбинантного пневмолизина разливали на аликвоты и хранили при минус 40 °С.

Для верификации рекомбинантного пневмолизина использовали вертикальный электрофорез [Laemmli UK, 1970] и иммуноблоттинг [Burnette WN, 1981]. Содержание эндотоксина в препарате определяли в гель тромб LAL (*Limulus ameobocyte lysate*)-тесте PYROGENT® компании CAMBREX Bioscience (США). Постановку теста выполняли в соответствии с ОФС.1.2.4.0006.15.

В опытах использовали мышей линии BALB/с, самцы, массой 14-16 г, возраст 6-7 недель, мышей линии СВА массой 18-20 г, и беспородных мышей массой 14-16 г, полученных 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).

Для экспериментального заражения животных использовали штаммы *S. pneumoniae* серотипов 3, 4, 5 и 6В, полученные из ЦКП Коллекция ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Для изучения токсичности rPly *in vivo* белок вводили внутривентриально беспородным мышам и мышам BALB/с и в течение 7 дней наблюдали за общим состоянием животными и определяли динамику массы тела животных. Контролем служили интактные животные, которым вводили 0,9%-ый NaCl. По окончании эксперимента подсчитывали среднюю прибавку массы тела в каждой группе мышей.

Определение токсичности rPly *in vitro* проводили МТТ-тестом на клетках почки зеленой мартышки Vero (АТСС, США). В 96-луночные планшеты засеивали по $1,5 \times 10^4$ 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. Затем удаляли среду и добавляли 60 мкл DMSO на лунку для растворения образовавшихся кристаллов фиолетового формазана. Анализ оптической плотности проводили на микропланшетном детекторе Anthos Zenith 3100 при длине волны 595 нм в 3-х независимых повторах. Результат вычисляли в % жизнеспособных клеток.

Для постановки опытов по оценке протективной активности мышей иммунизировали внутрибрюшинно гаРly, адсорбированным на Al(OH)₃. Рекомбинантный белок вводили двукратно или трехкратно с интервалом 14 дней в диапазоне доз от 12,5 до 100 мкг/мышь. Через 2 недели после последнего введения препарата мышей заражали внутрибрюшинно летальными дозами *S. pneumoniae* в диапазоне от 10³ до 10⁶ м. кл. в 0,5 мл 0,9 % изотонического раствора натрия хлорида. Для контроля заражающей дозы использовали интактных животных, которым вводили внутрибрюшинно культуру *S. pneumoniae* в тех же дозах. Величину LD₅₀ определяли по формуле Кербера в модификации Ашмарина [Ашмарин И.П. с соавт., 1962]. Наблюдение за животными проводили в течение 10-14 дней.

Иммуноферментный анализ использовали для определения титра антител к гаРly и проводили в соответствии с методом, описанным ранее [Vaneeva NP et al., 2015].

Для получения предшественников ДК, мышей линии СВА выводили из опыта под эфирным наркозом. Для развития популяции ДК [Ахматова Н.К. и др., 2005] 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 гаРly в концентрации 5 мкг/мл. В качестве референс-препарата использовали классический индуктор созревания ДК - TNF-α (20 нг/мл). Контролем являлись незрелые ДК.

Экспрессию поверхностных маркеров ДК изучали с помощью моноклональных антител. Результаты учитывали на проточном цитометре Cytomix FC-500 («Beckman Coulter», США). На ДК после добавления гаРly 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.

Работу с клеточными линиями проводили во флаконах T25 и T75 в минимальной 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.

ПЦР-РВ проводили с помощью специфических праймеров («Синтол», РФ) [Свитич О.А. и др., 2016; Ганковская Л.В. и др., 2017]. Экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *TNF-α*, *IL-6* определяли в ПЦР-РВ по отношению к экспрессии конститутивного гена β-актина на клеточной линии K-562 [Livak KJ et al., 2001]. Постановку ПЦР-РВ осуществляли на детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», РФ), используя методику [Higuchi R et al., 1992; Higuchi R et al., 1993].

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 [Гланц С.А., 1998].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получено две серии препарата рекомбинантного пневмолизина (rPly). После хроматографического выделения и диализа подлинность rPly была подтверждена с помощью электрофореза (**рис. 1А**) и иммуноблоттинга (**рис. 1Б**) с коммерческими моноклональными антителами к рекомбинантному пневмолизину. Удалось добиться воспроизводимости получения препарата: концентрация белка в первой серии составила 525 мкг/мл, концентрация препарата во второй серии - 500 мкг/мл. Примесь ЛПС в первой серии препарата находилась в интервале от 240 до 480 ЕС/мл, во второй серии - от 60 до 120 ЕС/мл.

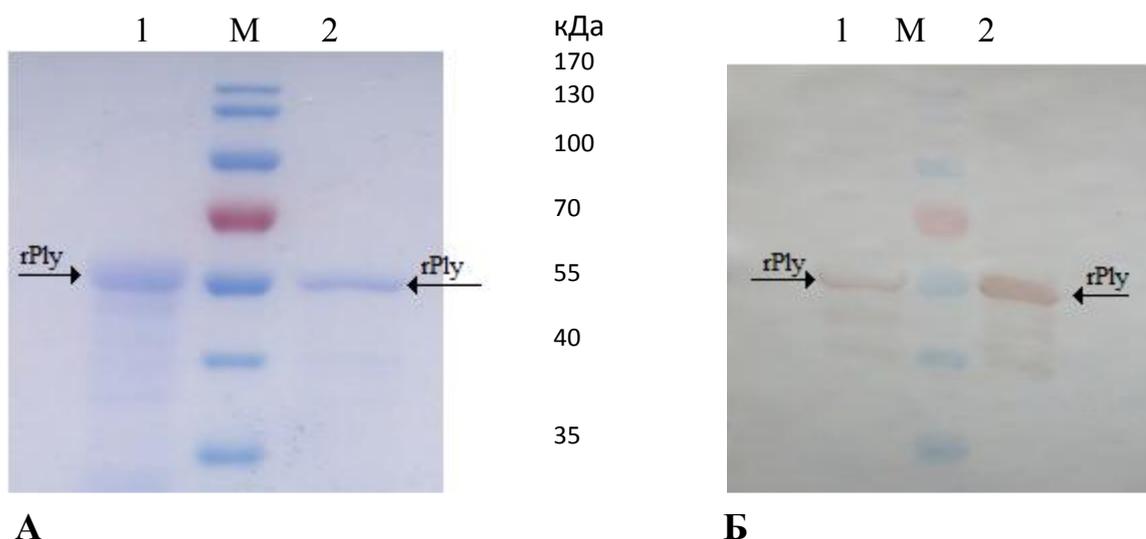


Рис.1. (А) Электрофорез рекомбинантного пневмолизина в 12 % ПААГ и (Б) нитроцеллюлезная мембрана после иммуноблоттинга

Примечание. 1 дорожка – 1 серия препарата; М - маркер молекулярной массы; 2 дорожка – 2 серия препарата

Оценка токсичности. Рекомбинантный пневмолизин являлся нетоксичным, что подтверждено в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. С помощью МТТ-теста оценена жизнеспособность клеток клеточной линии Vero при добавлении в среду rPly в концентрациях 2,5 мкг/мл; 5 мкг/мл; и 10 мкг/мл и инкубации на протяжении 96 ч. При использовании rPly в концентрациях 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 положительным контролем (**табл. 1**). Процент живых клеток в опыте варьировал от 74 до 161 % (жизнеспособность клеток в положительном контроле (без добавления rPly) в той же временной точке принимали за 100 %).

Таблица 1. Оценка токсичности рекомбинантного пневмолизина на клеточной линии Vero *in vitro*

Время экспозиции, часы	Концентрация пневмолизина, рост клеток, в %			
	2,5 мкг/мл	5 мкг/мл	10 мкг/мл	К+*
3	74±3,7	93±8,7	89±25,2	100
12	100±2,8	99±1,5	95±3,1	100
24	107±12	117±16	91±7,4	100
48	107±9,9	103±11,1	88±5,1	100
96	161±4,6	137±6,5	92±14,3	100

Примечание: *- положительный контроль клетки в среде (MEM) – без добавления рекомбинантного пневмолизина.

Для оценки токсичности *in vivo* беспородным и мышам линии BALB/c вводили однократно внутривенно rPly в дозах 12,5 мкг/мышь, 25 мкг/мышь, 50 мкг/мышь и 100 мкг/мышь, после чего осуществляли ежедневное взвешивание животных в течение 7 суток. Среднее значение массы животных составило 17,7±1,4; 19,1±1,5; 19,5±1,8; 20,3±1,9 г для опытных групп и 18,8±1,5 г для контрольной группы соответственно (табл. 2). Между группами не выявлено достоверной разницы ($p>0,5$). Аналогичные результаты были получены при повторении эксперимента со второй серией препарата в дозе 25 мкг/мышь.

Таблица 2. Динамика массы мышей после введения рекомбинантного пневмолизина

Препарат	Серия	M±SD	t	p
Ply 12,5 мкг/мышь + 200 мкг Al(OH) ₃	I	17,7±1,4	- 1,544	0,145
Ply 25 мкг/мышь + 200 мкг Al(OH) ₃	=//=	19,1±1,5	0,414	0,685
Ply 50 мкг/мышь + 200 мкг Al(OH) ₃	=//=	19,5±1,8	0,831	0,42
Ply 100 мкг/мышь + 200 мкг Al(OH) ₃	=//=	20,3±1,9	1,773	0,098
Контроль	-	18,8±1,5	-	-

Примечание: Оценка достоверности разницы с контролем в прибавке веса мышей в течение 7 суток по критерию Стьюдента

Так как в предварительных опытах *in vitro* и *in vivo* не выявлено токсичности rPly, то в дальнейшем для обозначения рекомбинантного атоксичного пневмолизина использовали аббревиатуру – raPly.

Образование антител. В первоначальных опытах по оценке иммуногенности raPly установлено, что к белку образуются антитела преимущественно IgG1 субизотипа (рис. 2).

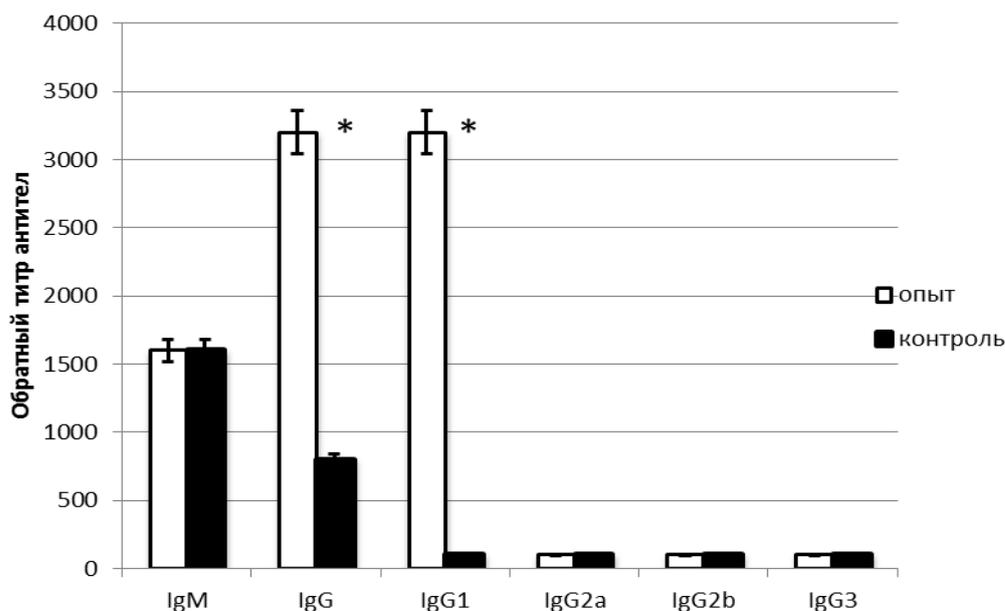


Рис. 2. Титр специфических антител к гаPly

Примечание. 2-кратная иммунизация гаPly дозой 30 мкг/мышь с интервалом 7 суток. Препарат был адсорбирован на Al(OH)₃. Пуловую сыворотку получали от мышей BALB/c (n=6) через 7 суток после последней иммунизации. В качестве контроля использовали сыворотку интактных мышей. * - достоверное различие с контролем (p<0,05).

Для подбора оптимальной иммунизирующей дозы белка изучали в дальнейшем дозы 25 мкг/мышь, 50 мкг/мышь и 100 мкг/мышь. Белок адсорбировали на Al(OH)₃ (200 мкг/мышь). Индивидуальный уровень антител IgG1 у мышей (n=6) оценивали после второй и третьей иммунизации. Статистически значимое повышение индивидуальных титров антител наблюдали 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.

В следующем опыте сравнивали эффективность доз 25 мкг/мышь и 50 мкг/мышь, адсорбированных на Al(OH)₃ (200 мкг/мышь). Через 2 недели после третьей иммунизации титры антител были достоверно выше, по сравнению с контрольной группой, причем для группы 50 мкг/мышь средний индивидуальный титр был достоверно выше, чем для группы 25 мкг/мышь (средний титр антител IgG1 к гаPly составил 1:91733 и 1:32000 соответственно).

Для полученных серий препарата показана воспроизводимость результатов. При трехкратной иммунизации мышей разными сериями гаРly в дозе 25 мкг/мышь средние титры антител со стандартным отклонением ($M \pm SD$) составили $32\ 000 \pm 15676$ и $29\ 440 \pm 16021$ для первой и второй серии препарата соответственно.

Протективную активность гаРly исследовали в опытах активной защиты мышей линии BALB/c в модели системной инфекции в отношении 3-его, 4-ого и 6В серотипов пневмококка.

Трехкратная иммунизация гаРly в дозе 25 мкг/мышь, адсорбированным на $Al(OH)_3$ в дозе 200 мкг/мышь, защищала животных от максимальной заражающей дозы 10^6 м.кл. *S. pneumoniae* 3-его серотипа (**табл. 3**).

При повторении опыта активной защиты со *S. pneumoniae* 3-его серотипа использовали двукратную и трехкратную схемы иммунизации белком в дозе 25 мкг/мышь, адсорбированным на $Al(OH)_3$ в дозе 75 мкг/мышь. Протективный эффект от заражающей дозы 10^6 м.кл. был выявлен только для группы с двукратной иммунизацией (**табл. 4**). Выживаемость мышей была достоверно выше по сравнению с контрольной группой (50 % выживших мышей в опыте при 90 % гибели животных в контроле).

Протективный эффект иммунизации гаРly при заражении мышей *S. pneumoniae* 4-ого серотипа продемонстрирован в нескольких экспериментах. При иммунизирующей дозе рекомбинантного белка 25 мкг/мышь и добавлении $Al(OH)_3$ в дозе 75 мкг/мышь наблюдали задержку гибели животных на один день: для заражающей дозы пневмококка 10^6 м.кл. – только при двукратном введении гаРly, для заражающей дозы *S. pneumoniae* 10^5 м.кл. – как при двукратном, так и трехкратном введении препарата (**табл. 5**). При увеличении дозы адьюванта – $Al(OH)_3$ до 200 мкг/мышь в следующем опыте при заражении 4-ым серотипом *S. pneumoniae* индекс эффективности (ИЭ) при трехкратной иммунизации равнялся 2, тогда как ИЭ при двукратной схеме составил 1,26 соответственно (**табл. 6**). Трехкратное введение гаРly оказалось более предпочтительным для создания защиты от *S. pneumoniae* 4-ого серотипа.

При трехкратной иммунизации гаРly в дозе 25 мкг/мышь с $Al(OH)_3$ (200 мкг/мышь) наблюдали продление жизни животных при заражении 5-ым серотипом

в виде достоверного увеличения продолжительности жизни животных при испытании наибольшей заражающей дозы 10^5 м.кл. (табл. 7).

Для оценки протективной активности препарата гаРly в отношении *S. pneumoniae* 6В серотипа был проведен эксперимент с трехкратным режимом иммунизации. Доза гаРly и доза адьюванта $Al(OH)_3$ составили 25 мкг/мышь и 200 мкг/мышь соответственно. Для отдельных заражающих доз не наблюдали защиты по сравнению с контрольными группами, однако при сравнении LD_{50} опыта с LD_{50} контроля ИЭ составил 6,6, что соответствует выраженному протективному эффекту (табл. 8).

Таким образом, показано, что при иммунизации мышей гаРly формируется защита против разных серотипов *S. pneumoniae*.

В следующей части работы изучали влияние гаРly на экспрессию генов эффекторов врожденного иммунитета и на созревание дендритных клеток.

Таблица 3. Выживаемость мышей, иммунизированных гаРly при заражении 126 LD₅₀ *S. pneumoniae* серотипа 3

Группа	Иммунизирующая доза гаРly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Кратность иммунизации	Заражающая доза	Дни наблюдения			
					1	3	7	10
1	25	200	3	10 ⁶	9/9	7/9	6/9**	6/9**
2	50				10/10	5/10*	1/10	1/10
Контроль-ная	0,9 % NaCl	-	-		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.

Таблица 4. Выживаемость мышей, иммунизированных гаРly при заражении 251 LD₅₀ *S. pneumoniae* серотипа 3

Группа	Иммунизирующая доза гаРly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Кратность иммунизации	Заражающая доза	Дни наблюдения			
					1	3	7	10
1	25	75	2	10 ⁶	10/10	7/10	5/10**	5/10**
2			3		10/10	6/10	4/10	4/10
Контроль-ная	0,9 % NaCl	-	-		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.

Таблица 5. Выживаемость мышей, иммунизированных гаРly при заражении *S. pneumoniae* серотипа 4

Группа	Иммунизирующая доза гаРly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Количество иммунизаций	Заражающая доза <i>S.pneumoniae</i> тип 4	Дни наблюдения*		
					1	2	5
1	25	75	2	10 ⁵	10/10	5/10**	0/10
				10 ⁶	10/10	7/10**	0/10
3			10 ⁵	10/10	5/10**	0/10	
			10 ⁶	9/9	2/9	0/9	
Контроль-ная	0,9 % NaCl	-	3	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.

Таблица 6. Выживаемость мышей, иммунизированных гаРly при заражении *S. pneumoniae* серотипа 4

Группа	Иммунизирующая доза гаРly, мкг/мышь	Доза Al(OH) ₃ , мкг/мышь	Количество иммунизаций	Заражающая доза <i>S.pneumoniae</i> тип 4 1/56	Дни наблюдения*				LD50, м. кл	ИЭ
					1	2	3	14		
1	25	200	2	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			3	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	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 7. 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.

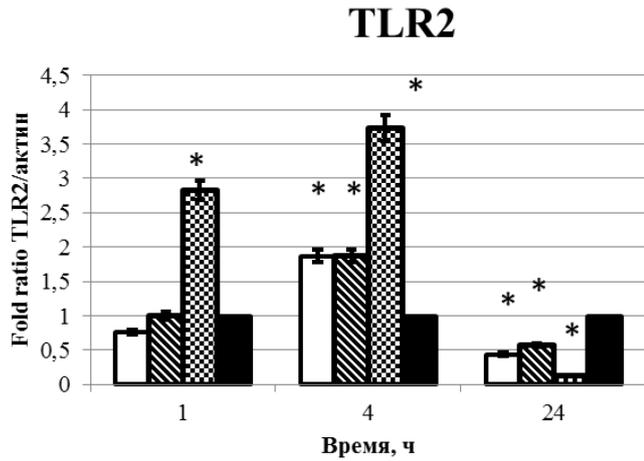
Таблица 8. Выживаемость* мышей, иммунизированных гаРly двукратно при заражении серотипом 6В *S. pneumoniae*

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	4	5	7	10		
1	25	200	10 ⁶	9/9	6/9	4/9	3/9	3/9	3,39x10 ⁴	6,6**
			10 ⁵	10/10	9/10	6/10	3/10	3/10		
			10 ⁴	10/10	9/10	8/10	6/10	4/10		
Контрольная	0,9 % NaCl	-	10 ⁶	9/9	7/9	6/9	3/9	1/9	5,13x10 ³	-
			10 ⁵	10/10	10/10	7/10	3/10	0/10		
			10 ⁴	10/10	7/10	6/10	3/10	1/10		

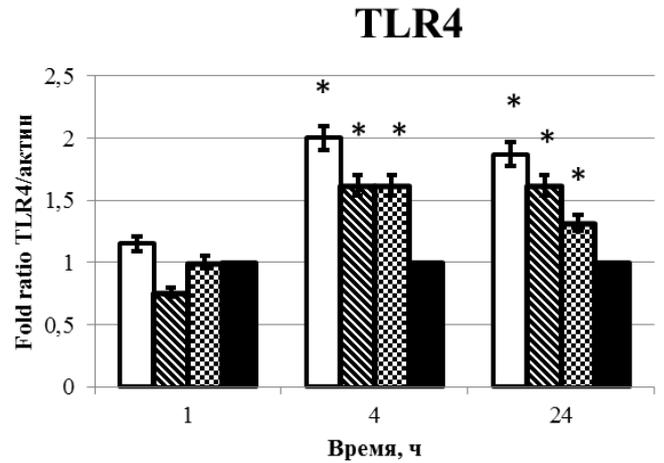
Примечание. *- в числителе – выжившие мыши на день наблюдения, в знаменателе – общее число зараженных мышей; **- значимая разница по сравнению с контролем по индексу эффективности.

Экспрессия генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *TNF- α* и *IL-6*. В опытах *in vitro* было оценено влияние разных концентраций гаРly на экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *TNF- α* и *IL-6* в динамике (спустя 1, 4 и 24 ч). В качестве контроля использовали интактные клетки во всех временных точках в одинаковом объеме среды при равномерном засеве клеток. Стандартизацию проводили по уровню экспрессии гена β -актина в культуре клеток как с добавлением препарата, так и без добавления препарата. Экспрессия гена *TLR2* повышалась при использовании всех концентраций гаРly спустя 4 ч в 1,87; 1,87 и 3,7 раза соответственно, а затем снижалась во всех образцах в 2,3; 1,7 и 8 раз соответственно спустя 24 ч (**рис. 3А**). Повышение экспрессии гена *TLR4* выявлено во всех опытных образцах спустя 4 ч в 2; 1,6 и 1,6 раза и спустя 24 ч после добавления гаРly в 1,87; 1,62 и 1,32 раза для концентраций 1 мкг/мл; 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно (**рис. 3Б**). 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. 3В**). Повышение экспрессии гена *TNF- α* (в 7,5; 5,7 и 4,6 раза по сравнению с контролем) наблюдали после 1 ч инкубации с гаРly при всех концентрациях (**рис. 3Г**). Небольшое повышение (в 2 раза) выявляли спустя 24 ч при концентрации 2,5 мкг/мл. Наблюдали также снижение экспрессии гена *IL-6* во всех временных точках: при концентрации гаРly 1 мкг/мл через 1 ч – в 194 раза, через 4 и 24 ч – в 1,52 и 1,74 раза соответственно; при концентрации гаРly 5 мкг/мл спустя 1 ч – в 1,62 раза, через 4 ч – в 3,25 раза, через 24 ч – в 45 раз, а при концентрации гаРly 2,5 мкг/мл – в 3,3; 24 и 3 раза соответственно (**рис. 3Д**). Снижение уровня экспрессии гена *IL-6* можно характеризовать как противовоспалительный эффект гаРly.

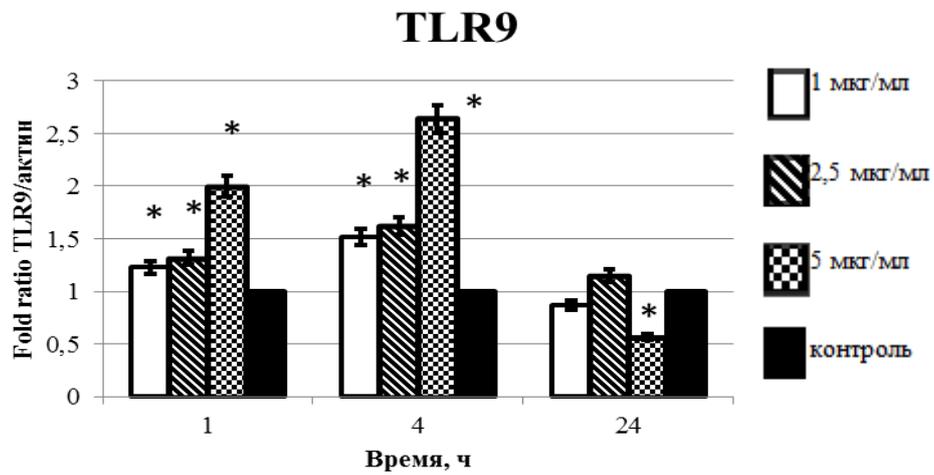
А



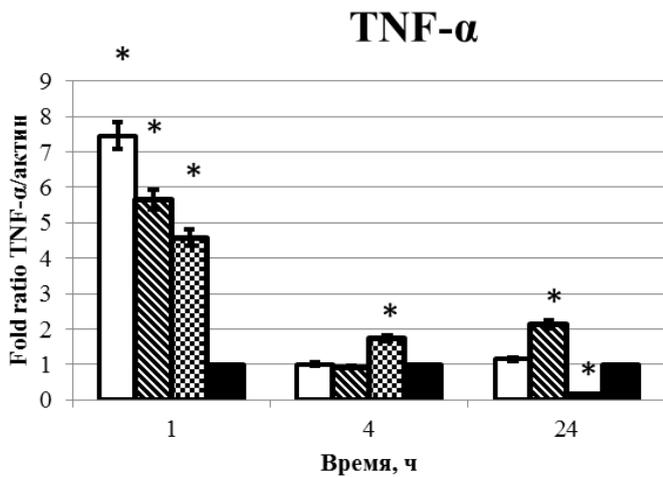
Б



В



Г



Д

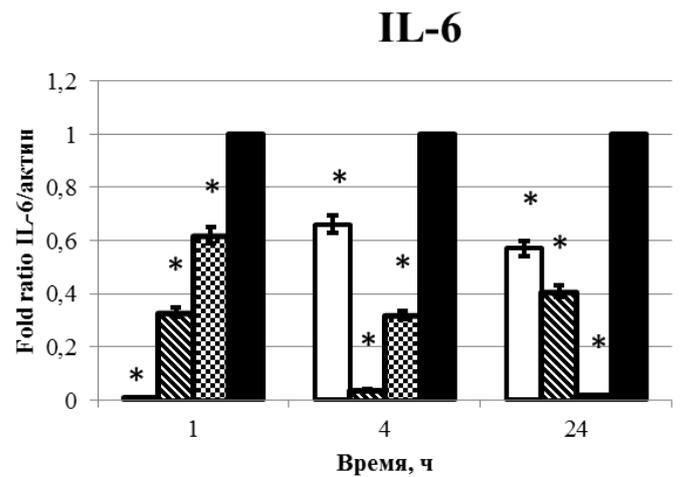


Рис.3 Влияние гаРлу на экспрессию генов рецепторов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и экспрессию генов *TNF-α* и *IL-6*.

Созревание дендритных клеток. 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 костимуляторных молекул CD80/86 (табл. 9).

Таблица 9. Влияние гаPly на иммунофенотип ДК, генерированных из костного мозга мышей

Маркеры	Количество клеток (%), M±SD		
	Н-ДК *	TNF-а #	гаPly □
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/ МНС II	5,02±0,63	32,26±2,94 * □	26,23±3,32 * #
МНС 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 Манн-Whitney).

Рекомбинантный атоксичный пневмолизин в экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрировал свой потенциал в качестве перспективного кандидата для включения в состав разрабатываемых серотипнезависимых вакцин, оказывая стимулирующее влияние как на эффекторы врожденного, так и адаптивного иммунитета. В экспериментах на животных получены убедительные данные о способности raPly защищать мышей при внутрибрюшинном заражении разными серотипами пневмококка. Рекомбинантный атоксичный пневмолизин может быть использован для разработки иммуноферментной диагностической тест-системы с целью обнаружения антител к белку в сыворотке крови человека.

ВЫВОДЫ

1. Получено две серии препарата рекомбинантного пневмолизина с концентрацией 525 мкг/мл и 500 мкг/мл соответственно.
2. Доказано, что рекомбинантный пневмолизин не является токсичным: *in vitro* в культуре клеток Vero 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/мл до 100 мкг/мышь рекомбинантный белок не влиял на снижение массы тела животных.
3. Установлено, что оптимальная иммунизирующая доза рекомбинантного атоксичного пневмолизина (raPly), вызывающая выработку специфических IgG-антител и защиту мышей, составляет 25 мкг/мышь.
4. Показано, что трехкратная иммунизация мышей 25 мкг/мышь raPly, 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 raPly защищает мышей против внутрибрюшинного заражения 3, 4 и 6В серотипами *S. pneumoniae* как при двукратной, так и при трехкратной иммунизации.

6. Показано, что гаРлу повышает экспрессию генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *TNF-α* и снижает экспрессию гена *IL-6 in vitro*.

7. Продемонстрировано, что гаРлу 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Петухова, Е.С. Роль белков *Streptococcus pneumoniae* в разработке серотипнезависимых пневмококковых вакцин / Петухова Е.С., Воробьев Д.С., Семенова И.Б. // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.** – 2018. - № 3. - С. 74-80.
2. Рекомбинантный пневмолизин вызывает образование антител и защищает мышей от пневмококковой инфекции / Воробьев Д.С., Петухова Е.С., Сидоров А.В., Семенова И.Б., Волох Ю.В., Леонова А.Ю., Михайлова Н.А. // **Российский иммунологический журнал.** – 2019.- Т. 13. - № 22. - С.1112-1114
3. Immunization with recombinant pneumolysin induces the production of antibodies and protects mice in a model of systemic infection caused by *Streptococcus pneumoniae* / Petukhova E.S., Vorobyev D.S., Sidorov A.V., Semenova I.B., Volokh Y.V., Leonova A.Y., Sidorova A.V., and Mikhailova N.A. // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** – 2020. - Т. 168. - № 4. – С. 485-487

Материалы и тезисы конференций

1. Петухова, Е.С. Изучение иммуногенной активности рекомбинантного пневмолизина в опыте на мышях / Петухова Е.С., Воробьев Д.С., Семенова И.Б. // XX Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии. – Москва, 23-25 мая 2018 г. Материалы конференции. – 2018. - Т.20. - Приложение 1. - С. 34.
2. Петухова, Е.С. Исследование иммуногенной активности рекомбинантного пневмолизина / Петухова Е.С. // В книге «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний». – Москва, 17-18 апреля 2018 г. - С. 41.
3. Изучение титров сывороточных антител к рекомбинантному пневмолизину в опыте на мышях при длительном наблюдении / Воробьев Д.С., Петухова Е.С., Семенова И.Б., Сидоров А.В. // В сборнике: Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XI Ежегодного

Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. Под ред. В.И.Покровского. - Москва, 2019. - С. 37

4. Петухова, Е.С. Рекомбинантный пневмолизин как перспективный протективный антиген / Петухова Е.С., Воробьев Д.С. // В книге: Сборник тезисов молодых ученых в рамках научной конференции с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам». Под редакцией В.В. Зверева. - Москва, 18-20 апреля 2019 г. - С. 36

Список сокращений

«ГКПМ-Оболенск» - государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур, Оболенск;

ДК – дендритная клетка;

ИЭ – индекс эффективности – отношение LD_{50} в опыте к LD_{50} в контроле;

DMSO – диметилсульфоксид;

МЕМ – минимальная питательная среда;

Ply, rPly, raPly – пневмолизин, рекомбинантный пневмолизин, рекомбинантный атоксичный пневмолизин;

TLR (toll-like receptor) – toll-подобный рецептор.

Выражаю 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*.