

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-4-71-75>

Серотипнезависимая протективная активность рекомбинантной формы пневмолизина в модели системной инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипов 4 и 6В

Д.С. Воробьев^{1,2}, Е.С. Петухова¹, Ю.В. Волох¹, О.М. Афанасьева¹, М.М. Токарская¹, А.Ю. Леонова¹, О.В. Жигунова¹, И.Б. Семенова¹, Н.Ф. Гаврилова¹, И.В. Яковлева¹, Н.Е. Ястребова¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Денис Сергеевич Воробьев vorobievdenis@yandex.ru

Введение. Разработка пневмококковой вакцины с серотипнезависимой активностью актуальна для всего мира, что обусловлено высокой распространенностью *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), постоянной сменой серотипов возбудителя и ростом антибиотикорезистентных штаммов. В предыдущих экспериментах нами выявлен протективный эффект иммунизации рекомбинантным пневмолизин (rPly) в модели системной инфекции, вызванной *S. pneumoniae* серотипа 3.

Цель исследования – изучение серотипнезависимой протективной активности rPly.

Материалы и методы. Для выполнения работы использовали штаммы *S. pneumoniae* серотипов 4 и 6В. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно двукратно или трехкратно с интервалом 14 дней rPly. Для оценки протективной активности rPly животных после двукратной или трехкратной иммунизации заражали внутрибрюшинно *S. pneumoniae*.

Результаты. rPly при трехкратной иммунизации в дозе 25 мкг защищал мышей от внутрибрюшинного заражения *S. pneumoniae* серотипа 4, индекс эффективности по сравнению с контролем повышался в 2 раза. При двукратной иммунизации rPly защищал мышей от внутрибрюшинного заражения *S. pneumoniae* серотипа 6В, индекс эффективности по сравнению с контролем повышался в 6,61 раза.

Заключение. rPly защищает животных от заражения разными серотипами *S. pneumoniae*, что позволяет считать его перспективным препаратом для разработки пневмококковых вакцин с серотипнезависимой активностью.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, рекомбинантный пневмолизин, серотипнезависимая защита

Для цитирования: Воробьев Д.С., Петухова Е.С., Волох Ю.В. и др. Серотипнезависимая протективная активность рекомбинантной формы пневмолизина в модели системной инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипов 4 и 6В. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):71–5. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-71-75

Serotype-independent protective activity of recombinant pneumolysin in a model of systemic infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 4 and 6B

Denis S. Vorobyev^{1,2}, Ekaterina S. Petukhova¹, Yury V. Volokh¹, Olga M. Afanasyeva¹, Marina M. Tokarskaya¹, Anna Yu. Leonova¹, Olga V. Zhigunova¹, Irina B. Semenova¹, Natalya F. Gavrilova¹, Irina V. Yakovleva¹, Natalia E. Yastrebova¹

¹I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia

Contacts: Denis Sergeevich Vorobyev vorobievdenis@yandex.ru

Background. The development of a pneumococcal vaccine with serotype-independent activity is relevant for the whole world, as this is due to the high prevalence of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), the constant change

of pathogen serotypes and the growth of antibiotic-resistant strains. In previous experiments, we revealed a protective effect of immunization with recombinant pneumolysin (rPly) in a model of systemic infection caused by *S. pneumoniae* serotype 3.

Aim. Study of serotype-independent protective activity of rPly.

Materials and methods. Strains of *S. pneumoniae* serotypes 4 and 6B were used. Mice were immunized intraperitoneally two or three times with an interval of 14 days with rPly. To assess the protective activity of rPly, animals after double or triple immunization were infected intraperitoneally with *S. pneumoniae*.

Results. rPly at a triple immunization in a dose of 25 µg protected mice from intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 4, the efficiency index increased by 2 times compared with the control. With a double immunization, rPly protected mice from intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 6B, efficiency index increased by 6.61 times compared with the control.

Conclusion. rPly protects animals from infection with different serotypes of *S. pneumoniae*, which allows us to consider it a promising drug for the development of pneumococcal vaccines with serotype-independent activity.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, recombinant pneumolysin, serotype independent protection

For citation: Vorobyev D.S., Petukhova E.S., Volokh Yu.V. et al. Serotype-independent protective activity of recombinant pneumolysin in a model of systemic infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 4 and 6B. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(4):71–5. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-71-75

Введение

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) — условно патогенная бактерия, которая колонизирует слизистые оболочки верхних дыхательных путей человека и является причиной внебольничной пневмонии, отита, менингита и сепсиса [1, 2]. В настоящее время пневмококковую инфекцию успешно предотвращают с помощью вакцинации с применением зарубежных полисахаридных и конъюгированных вакцин [3]. Конъюгированные вакцины расширяют возможности специфической профилактики в таких возрастных категориях, как дети младше 5 лет и пожилые люди старше 65 лет [4]. Однако все разрешенные вакцины создают строгий серотипспецифический иммунитет, связанный, прежде всего, с иммунным ответом на капсульный полисахарид. Перспективной является разработка пневмококковой вакцины на основе только протективных белковых антигенов микроба или комбинации белковых антигенов и капсульного полисахарида. Как один из перспективных белков *S. pneumoniae* рассматривается пневмолизин, поскольку он является консервативным антигеном и обнаружен во всех штаммах пневмококка независимо от их серотипа [5]. Ранее нами была показана защита мышей при введении нативных белоксодержащих антигенов пневмококка, содержащих пневмолизин, от внутрибрюшинного заражения *S. pneumoniae* разных серотипов [6], а также защита мышей при иммунизации рекомбинантным пневмолизином (rPly) от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 [7].

Целью исследования явилось изучение серотип-независимой протективной активности rPly.

Материалы и методы

Мыши линии BALB/c, самцы массой 14–16 г, были получены из питомника ООО «СМК СТЕЗАР»

(г. Владимир). Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова). Все эксперименты на мышах проводили в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217–2014).

Штаммы, использованные в работе: штамм № 1/56 *S. pneumoniae* серотипа 4; штамм № 296 *S. pneumoniae* серотипа 6B. Работа выполнена с использованием штаммов коллекции центра коллективного пользования ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова при финансовой поддержке проекта Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021).

Для выполнения работы rPly получен и предоставлен сотрудниками ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Для иммунизации мышей использовали rPly в дозе 25 мкг/мышь, сорбированный на Al (OH)₃ в течение ночи при 4 °C из расчета 200 мкг Al (OH)₃ на мышь. Животных иммунизировали внутрибрюшинно двукратно или трехкратно с интервалом 14 дней. Разовую иммунизирующую дозу вводили в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл. В качестве контрольной группы использовали интактных мышей, которым вводили физиологический раствор.

Для исследования протективной активности иммунизированных мышей заражали внутрибрюшинно: штаммом № 1/56 *S. pneumoniae* серотипа 4 четырьмя дозами в диапазоне от 10³ до 10⁶ микробных клеток (м. кл.)/мышь в 0,5 мл физиологического раствора через 14 дней после 2-й или 3-й иммунизации; штаммом № 296 *S. pneumoniae* серотипа 6B тремя заражающими дозами в диапазоне от 10⁴ до 10⁶ м. кл./мышь через 14 дней после 2-й иммунизации. Заражающая доза

10^6 м. кл./мышь была абсолютно летальной для серотипа 4, а заражающая доза 10^5 м. кл./мышь вызывала гибель 90 % животных; заражающая доза 10^5 м. кл./мышь была абсолютно летальной для серотипа 6В. Наблюдение за животными проводили в течение 10 дней после заражения.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием показателя LD_{50} , определяемого по формуле Кербера в модификации И.П. Ашмарина [8]:

$$LD_{50} = \text{обратный логарифм } \lg D_N - \delta (\Sigma L_i - 0,5),$$

где D_N — наибольшая из заражающих доз, δ — логарифм кратности разведений доз, ΣL_i — сумма результатов (отношение числа павших животных к общему числу зараженных животных в группе). После определения LD_{50} вычисляли индекс эффективности (ИЭ) по формуле:

$$ИЭ = \frac{LD_{50 \text{ опыт}}}{LD_{50 \text{ контроль}}}.$$

Результаты

В контрольной серии экспериментов было установлено, что абсолютно летальные заражающие дозы для *S. pneumoniae* серотипов 4 и 6В находились в интервале между 10^5 и 10^6 м. кл./мышь. Мышей иммунизировали двукратно или трехкратно гРly в дозе 25 мкг, после чего животных заражали внутрибрюшинно вирулентным штаммом *S. pneumoniae* серотипа 4. Результаты изучения протективной активности гРly при внутрибрюшинном заражении *S. pneumoniae* серотипа 4 представлены в табл. 1.

Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют, что гРly способен защищать мышей от пневмококковой инфекции при трехкратной иммунизации. ИЭ при сравнении опытной группы, получавшей гРly трехкратно, с контрольной группой составил 2, в то время как в группе мышей с двукратной иммунизацией ИЭ составил всего 1,26. В частности, при заражении мышей *S. pneumoniae* серотипа 4 в дозе 10^5 м. кл./мышь в контрольной группе наблюдали гибель 90 % особей, тогда как трехкратная иммунизация гРly увеличивала выживаемость до 40 % животных. Хотя эти различия между контрольной и опытными группами не были

Таблица 1. Протективная активность рекомбинантного пневмолизина при внутрибрюшинном заражении *S. pneumoniae* серотипа 4
Table 1. Protective activity of recombinant pneumolysin in case of intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 4

Доза и кратность иммунизации Dose and frequency of immunization	Доза заражения, м. кл./0,5 мл ф. р. The dose of infection, m. c./0.5 ml s. s.	Количество мышей павших/выживших Number of mice thar have dead/survived	LD ₅₀ , м. кл. LD ₅₀ , m. c.	ИЭ EI
25 мкг/мышь, двукратно 25 µg/mouse, twice	1 000 000	10/0	39 800 (126 000:12 600)*	1,26
	100 000	8/2		
	10 000	1/9		
	1 000	0/10		
25 мкг/мышь, трехкратно 25 µg/mouse, thrice	1 000 000	10/0	63 100 (200 000:20 000)*	2,0
	100 000	6/4		
	10 000	1/9		
	1 000	0/9		
Контроль (неиммунизированные мыши) Control (non-immunized mice)	1 000 000	10/0	31 600 (100 000:10 000)*	—
	100 000	9/1		
	10 000	1/9		
	1 000	0/9		
<i>p</i>	—			0,348

*95 % доверительный интервал LD_{50} .

*The 95 % confidence interval of LD_{50} .

Примечание. Здесь и в табл. 2: м. кл. — микробные клетки; ф. р. — физиологический раствор; ИЭ — индекс эффективности.
Note. Here and in table 2: m. c. — microbial cells; s. s. — saline solution; EI — efficiency index.

Таблица 2. Протективная активность рекомбинантного пневмолизина при внутрибрюшинном заражении *S. pneumoniae* серотипа 6В
Table 2. Protective activity of recombinant pneumolysin in case of intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 6В

Доза и кратность иммунизации Dose and frequency of immunization	Доза заражения, м. кл./0,5 мл ф. р. The dose of infection, m. c./0.5 ml s. s.	Количество мышей павших/ выживших Number of mice that have dead/survived	LD ₅₀ , м. кл. LD ₅₀ , m. c.	ИЭ EI
25 мкг/мышь, двукратно 25 µg/mouse, twice	1 000 000	6/3	33 900 (339 000:3 390)*	6,61
	100 000	7/3		
	10 000	6/4		
Контроль (неиммунизи- рованные мыши) Control (non-immunized mice)	1 000 000	8/1	5 130 (12 900:1 020)*	—
	100 000	10/0		
	10 000	9/1		
<i>p</i>	—			<0,01**

*95 % доверительный интервал LD₅₀; **при сравнении опытной группы с контролем различия статистически значимы.
 *The 95 % confidence interval of LD₅₀; **the differences are statistically significant when comparing the experimental group with the control.

статистически достоверными ($p = 0,348$), отмечалась очевидная тенденция к улучшению выживаемости мышей, инфицированных *S. pneumoniae* серотипа 4.

В специальной серии опытов животных иммунизировали гРly двукратно и через 14 дней заражали внутрибрюшинно вирулентным штаммом *S. pneumoniae* серотипа 6В (результаты представлены в табл. 2). Как видно из табл. 2, рекомбинантный белок защищает мышей от развития пневмококковой летальной инфекции, о чем свидетельствует ИЭ, который составил 6,61 ($p < 0,01$).

Обсуждение

Анализ протективной активности рекомбинантного белка показал, что при заражении *S. pneumoniae* серотипа 4 эффективна трехкратная иммунизация гРly, в то время как при заражении *S. pneumoniae* серотипа 6В достаточно было двукратной иммунизации гРly. Более того, при двукратной иммунизации рекомбинантным белком формировалась более выраженная защита от заражения пневмококком серотипа 6В (ИЭ составил 6,61) по сравнению с трехкратной иммунизацией от заражения пневмококком серотипа 4 (ИЭ составил 2). Вероятно, протективная активность гРly обусловлена не только кратностью введе-

ния препарата, но и биологическими свойствами штаммов патогена, которыми заражают животных. Ранее нами было показано, что трехкратная иммунизация мышей гРly защищает 67 % животных от внутрибрюшинного заражения вирулентным штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 в дозе 10^6 м. кл./мышь по сравнению с контролем [7]. Таким образом, полученные в данной работе, а также ранее опубликованные данные свидетельствуют о том, что гРly может формировать серотипнезависимую защиту от *S. pneumoniae* при внутрибрюшинном заражении мышей.

Заключение

Полученные результаты позволяют предположить, что для разных серотипов пневмококка следует использовать различные варианты иммунизации животных. Поэтому в перспективе представляется целесообразным оценить взаимосвязь между кратностью иммунизации гРly, титром антител к рекомбинантному белку и протективной активностью в модели активной защиты мышей. Однако примечательным остается результат, что гРly защищает животных от заражения разными серотипами *S. pneumoniae*, что, соответственно, делает его перспективным для разработки пневмококковых вакцин с серотипнезависимой активностью.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Brooks L.R.K., Mias G.I. *Streptococcus pneumoniae's* virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. *Front Immunol* 2018;9:1366. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01366
- Weiser J.N., Ferreira D.M., Paton J.C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol* 2018;16(6):355–67. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8
- Masomian M., Ahmad Z., Gew L.T., Poh C.L. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. *Vaccines (Basel)* 2020;8(1):132. DOI: 10.3390/vaccines8010132
- Briles D.E., Paton J.C., Mukerji R. et al. Pneumococcal vaccines. *Microbiol Spectr* 2019;7(6). DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0028-2018
- Nishimoto A.T., Rosch J.W., Tuomanen E.I. Pneumolysin: pathogenesis and therapeutic target. *Front Microbiol* 2020;11:1543. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01543
- Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В. и др. Свойства нативных белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae*. *Микробиология* 2019;1:22–8. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-1-22-28
- Vorobyev D.S., Semenova I.B., Volokh Yu.V. et al. Properties of native protein-containing antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Mikrobiologiya = Microbiology* 2019;1:22–8. (In Russ.). DOI: 10.36233/0372-9311-2019-1-22-28
- Петухова Е.С., Воробьев Д.С., Сидоров А.В. и др. Иммунизация рекомбинантным пневмолизином вызывает выработку антител и защищает мышей в модели системной инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2019;168(10):471–3. Petukhova E.S., Vorobyev D.S., Sidorov A.V. et al. Immunization with recombinant pneumolysin induces the production of antibodies and protects mice in a model of systemic infection caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2019;168(10):471–3. (In Russ.).
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. 183 с. Ashmarin I.P., Vorobyev A.A. Statistical methods in microbiological research. Leningrad: Medgiz, 1962. 183 p. (In Russ.)

Вклад авторов

Д.С. Воробьев: иммунизация и заражение животных, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Е.С. Петухова, Ю.В. Волох, О.М. Афанасьева, О.В. Жигунова: иммунизация и заражение животных;
 М.М. Токарская: приготовление штамма № 296 *S. pneumoniae* серотипа 6В;
 А.Ю. Леонова: приготовление штамма 1/56 *S. pneumoniae* серотипа 4;
 И.Б. Семенова: обзор публикаций по теме статьи, редактирование статьи;
 Н.Ф. Гаврилова, И.В. Яковлева: получение данных для анализа, статистический анализ данных;
 Н.Е. Ястребова: анализ полученных данных, редактирование статьи.

Authors' contributions

D.S. Vorobyev: immunization and infection of animals, analysis of the data obtained, writing the text of manuscript;
 E.S. Petukhova, Yu.V. Volokh, O.M. Afanasyeva, O.V. Zhigunova: immunization and infection of animals;
 M.M. Tokarskaya: preparation of strain No. 296 *S. pneumoniae* serotype 6B;
 A.Yu. Leonova: preparation of strain No. 1/56 *S. pneumoniae* serotype 4;
 I.B. Semenova: review of publications on the topic of the article, editing of the article;
 N.F. Gavrilova, I.V. Yakovleva: obtaining data for analysis, statistical analysis;
 N.E. Yastrebova: analysis of the data obtained, editing of the article.

ORCID авторов/ ORCID of authors

Д.С. Воробьев / D.S. Vorobyev: <https://orcid.org/0000-0002-1926-8803>
 Е.С. Петухова / E.S. Petukhova: <https://orcid.org/0000-0003-0796-5764>
 Ю.В. Волох / Yu.V. Volokh: <https://orcid.org/0000-0002-5161-4964>
 О.М. Афанасьева / O.M. Afanasyeva: <https://orcid.org/0000-0003-0875-4141>
 М.М. Токарская / M.M. Tokarskaya: <https://orcid.org/0000-0002-5175-5433>
 А.Ю. Леонова / A.Yu. Leonova: <https://orcid.org/0000-0002-2889-2405>
 О.В. Жигунова / O.V. Zhigunova: <https://orcid.org/0000-0002-3958-6219>
 И.Б. Семенова / I.B. Semenova: <https://orcid.org/0000-0002-6630-4838>
 Н.Ф. Гаврилова / N.F. Gavrilova: <https://orcid.org/0000-0001-6704-0339>
 И.В. Яковлева / I.V. Yakovleva: <https://orcid.org/0000-0001-5123-2651>
 Н.Е. Ястребова / N.E. Yastrebova: <https://orcid.org/0000-0002-6911-1345>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-20221.

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-25-20221.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 14.10.2022. **Принята к публикации:** 11.11.2022.

Article submitted: 14.10.2022. **Accepted for publication:** 11.11.2022.