

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-51-57>

Цитопатогенное действие нативного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* на клетки линии CHO-K1

Е.А. Курбатова, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Е.С. Петухова, И.Б. Семенова, А.Е. Зайцев, Ю.В. Волох, А.Ю. Леонова, А.В. Поддубиков

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

Контакты: Екатерина Алексеевна Курбатова kurbatova6162@yandex.ru

Введение. *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, пневмококк) – условно-патогенные бактерии, вызывающие воспалительные заболевания у человека. Одним из факторов вирулентности *S. pneumoniae* является пневмолизин (Ply) – холестеролзависимый гемолитический токсин, который при взаимодействии с холестеринем клеточных мембран эукариотов формирует поры и приводит к разрушению и гибели клеток.

Цель исследования – иммунохимическая характеристика Ply и оценка его цитотоксического действия в культуре клеток яичника китайского хомячка CHO-K1.

Материалы и методы. Для получения Ply штамм *S. pneumoniae* серотипа 3 культивировали в сердечно-мозговом бульоне, осаждали бактериальные клетки центрифугированием и подвергали ультразвуковой дезинтеграции. Наличие Ply в полученном препарате подтверждали с помощью иммуноблоттинга с моноклональными антителами к рекомбинантному Ply. Цитопатогенное действие Ply исследовали на культуре пролинзависимых эпителиоподобных клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 в среде RPMI-1640. Гемолитическую активность Ply оценивали в реакции с эритроцитами мыши.

Результаты. Методом ультразвуковой дезинтеграции клеток штамма *S. pneumoniae* серотипа 3 с последующим осаждением сульфатом аммония получен белок, образующий на электрофореze полосу, соответствующую молекулярной массе Ply (53 кДа). Полученный белок обладал способностью лизировать эритроциты мыши. Подлинность Ply подтверждена в иммуноблоттинге с моноклональными антителами к рекомбинантному Ply. Ply оказывал цитопатогенное действие на клетки яичника китайского хомячка CHO-K1. Минимальная доза препарата, индуцирующая токсическое действие на клетки, проявляющаяся в появлении наряду с нормальными клетками округлых и мелких клеток, составляла 16,4 мкг/мл по белку. При увеличении концентрации до 65,6 мкг/мл обнаруживали только мелкие круглые клетки. Дальнейшее увеличение концентрации приводило к полной деструкции клеток CHO-K1.

Заключение. Пневмолизин можно использовать для разработки новых лекарственных средств, предназначенных для терапии пневмококковых инфекций.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, пневмолизин, иммуноблоттинг, клетки CHO-K1, цитопатогенное действие

Для цитирования: Курбатова Е.А., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф. и др. Цитопатогенное действие нативного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* на клетки линии CHO-K1. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):51–7. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-51-57>

Cytopathogenic effect of *Streptococcus pneumoniae* native pneumolysin in CHO-K1 cells

Ekaterina A. Kurbatova, Irina V. Yakovleva, Natalya F. Gavrilova, Ekaterina S. Petukhova, Irina B. Semenova, Anton E. Zaitsev, Yury V. Volokh, Anna Yu. Leonova, Alexander V. Poddubikov

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

Contacts: Ekaterina Alexeevna Kurbatova kurbatova6162@yandex.ru

Background. *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, pneumococci) is an opportunistic bacterium that causes inflammatory diseases in humans. One of the virulence factors of *S. pneumoniae* is pneumolysin (Ply), a cholesterol-dependent

hemolytic toxin that interacts with cholesterol in eukaryotic cell membranes, forms pores and leads to cell destruction and death.

Aim. Immunochemical characteristics of pneumolysin and evaluation of its cytotoxic effect in the culture of Chinese hamster ovarian cells CHO-K1.

Materials and methods. To obtain Ply, the *S. pneumoniae* serotype 3 strain was cultivated in brain heart broth, bacterial cells were pelleted by centrifugation and subjected to ultrasonic disintegration. The presence of pneumolysin in the resulting preparation was confirmed by immunoblotting with monoclonal antibodies to recombinant pneumolysin. The cytopathogenic effect of Ply was studied in a culture of proline-dependent epithelial-like Chinese hamster ovary cells CHO-K1 in RPMI-1640 medium. The hemolytic activity of Ply was assessed in a reaction with mouse erythrocytes.

Results. Using ultrasonic disintegration of cells of the *S. pneumoniae* serotype 3 strain followed by precipitation with ammonium sulfate, a protein that formed a band on electrophoresis at a level corresponding to the molecular weight of Ply (53 kDa) was obtained. The protein possessed the ability to lyse mouse erythrocytes. The authenticity of Ply was confirmed by immunoblotting with monoclonal antibodies to recombinant pneumolysin. Ply had a cytopathogenic effect on Chinese hamster ovary CHO-K1 cells. The minimum dose of the protein that induced a toxic effect on cells, manifested in the appearance of round and small cells along with normal cells, was 16.4 µg/ml per protein. When the concentration was increased up to 65.6 µg/ml, only small round cells were detected. Further increase in concentration resulted in complete destruction of CHO-K1 cells.

Conclusion. Pneumolysin can be used to develop new drugs for the treatment of pneumococcal infections.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, pneumolysin, immunoblotting, CHO-K1, cytopathogenic effect

For citation: Kurbatova E.A., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F. et al. Cytopathogenic effect of *Streptococcus pneumoniae* native pneumolysin in CHO-K1 cells. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):51–7. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-51-57>

Введение

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*, пневмококк) — грамположительные бактерии, вызывающие у человека пневмонию, отит, менингит, сепсис и другие заболевания [1, 2]. Факторами патогенности пневмококка являются капсульные полисахариды *S. pneumoniae*, на основе которых разработаны и применяют мультивалентные полисахаридные и конъюгированные пневмококковые вакцины [3]. Наряду с капсульными полисахаридами существенную роль в патогенезе пневмококковой инфекции играют белки *S. pneumoniae*, в частности пневмолизин (Ply) — гемолитический токсин пневмококка с М. м. 53 кДа, который, взаимодействуя с холестерином клеточных мембран эукариотов, формирует поры, приводя к разрушению клеток [4–6].

В настоящее время идет активный поиск молекул, обладающих прямой или непрямой Ply-ингибирующей активностью, и проводятся исследования по изучению механизмов ингибирования токсических свойств Ply [7]. Большое количество исследований посвящено получению и изучению свойств рекомбинантного Ply (rPly) [2, 8]. Рекомбинантные белки, синтезированные с помощью генно-инженерных технологий, являются аналогами нативных белков, однако могут отличаться от них иной конформационной структурой, склонностью к фрагментации под действием протеаз экспрессирующей системы, в также могут быть контаминированы эндотоксином вектора экспрессии, что требуют дополнительной очистки от примесей [9]. В связи с этим получение

нативного Ply (nPly), обладающего естественной конформационной структурой белка и присущей ему токсичностью, явилось необходимым условием для исследования его иммунохимических и цитотоксических свойств.

Цель исследования — иммунохимическая характеристика Ply *S. pneumoniae* и его цитотоксического действия на клетки яичника китайского хомячка СНО-K1.

Материалы и методы

Для получения Ply использовали штамм *S. pneumoniae* серотипа (центр коллективного пользования ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова»). Штамм восстанавливали из лиофилизированного состояния в 1 % сахарном бульоне и через 6–8 ч культивирования пересеивали на кровяной агар. После этого в течение 16–18 ч культивировали в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия) при температуре 37 °C в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 5 % концентрации CO₂. Полученную бактериальную культуру *S. pneumoniae* осаждали центрифугированием (4000 об/мин в течение 30 мин). Осажденные клетки дважды отмывали 0,9 % раствором натрия хлорида центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин. Затем прибавляли 30 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и разрушали бактериальные клетки ультразвуком (10 периодов воздействия ультразвука по 30 с) на ультразвуковом дезинтеграторе UD-20 (Techpan, Польша). Акустическую обработку клеток проводили на льду для

предотвращения перегрева проб. Полученный дезинтеграт центрифугировали (7000 об/мин в течение 60 мин), затем отбирали надосадочную жидкость и добавляли к ней насыщенный раствор аммония сульфата до 70 % насыщения. Суспензию оставляли при температуре 4 °С на ночь для образования осадка белка. Взвесь с осадком центрифугировали (5000 об/мин в течение 40 мин), получившийся осадок растворяли в 1,5 мл 0,15М фосфатного буфера (рН = 7,2). Полученный препарат диализовали против того же буфера, разливали на аликвоты и хранили при температуре –20 °С или лиофильно высушивали, используя в качестве стабилизатора 5 % лактозу.

Концентрацию белка определяли на спектрофотометре Genesis (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волн 215 и 225 нм по следующей формуле:

$$[\text{белок}] \text{ мкг/мл} = 144 (A_{215} - A_{225}) \times b,$$

где 144 — эмпирически вычисленный коэффициент, A — оптическая плотность, b — разведение пробы [10].

Содержание белка составило $(4,2 \pm 0,5)$ мг/мл.

Электрофоретическое разделение белков проводили с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [11] с использованием маркера молекулярных весов (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Гель окрашивали 0,25 % раствором Кумасси (AppliChem, Германия). Наличие Ply в препарате подтверждали с помощью иммуноблоттинга [12] с моноклональными антителами к полноразмерному rPly [13].

Полученный образец обладал гемолитической активностью, что было доказано путем гемолиза 1 % суспензии эритроцитов мыши ($n = 2$). Мыши линии BALB/c получены из питомника ООО «СМК СТЕЗАР» (г. Владимир). Животных содержали в условиях вивария в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными. Дизайн исследования одобрен этическим комитетом ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». Конечное разведение образца, вызывающее гемолиз эритроцитов, составило 1:512, что соответствовало 8 мкг/мл белка.

Цитопатогенное действие Ply, входящего в состав полученного образца, исследовали на культуре пролинзависимых эпителиоподобных клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и канамицина из расчета 200 ЕД на 1 мл среды. Расчет доз проводили по содержанию общего белка. В лунки 96-луночного культурального микропланшета (Thermo Fisher Scientific, США) вносили по 100 мкл серийных двукратных разведений образца в дозах от 2100 до 1 мкг/мл среды культивирования. Затем прибавляли в каждую лунку по 10^4 клеток CHO-K1 в 100 мкл культуральной среды. Планшеты культи-

вировали при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 5 % концентрации CO₂. Подсчет клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа (Leitz, Германия). Результаты реакции оценивали через 24 и 48 ч. За 1 цитопатогенную единицу (ЦПЕ) принимали наименьшую концентрацию белка, индуцирующую полное разрушение клеток. В качестве отрицательного контроля использовали серийные двукратные разведения фосфатно-солевого буфера в RPMI-1640, в качестве положительного контроля — двукратные разведения очищенного дифтерийного токсина (ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», г. Уфа) начиная с 0,125 Лф/мл. Микрофотографии получали с помощью инвертированного микроскопа Leica DMi8 (Leica, Германия) с программным обеспечением LAS V 4.12 (объектив 10×, окуляр 10, увеличение 100). Размер изображения — 1245 × 93,75 мкм. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10 методом Вилкоксона для зависимых выборок. Результат представляли как $M \pm SD$, где M — среднее значение, SD — стандартное отклонение. Результат считали статистически значимым при $p \leq 0,05$.

Результаты

При проведении электрофореза полученного образца выявлена мажорная белковая полоса на уровне 52–55 кДа (рис. 1, а). Методом иммуноблоттинга

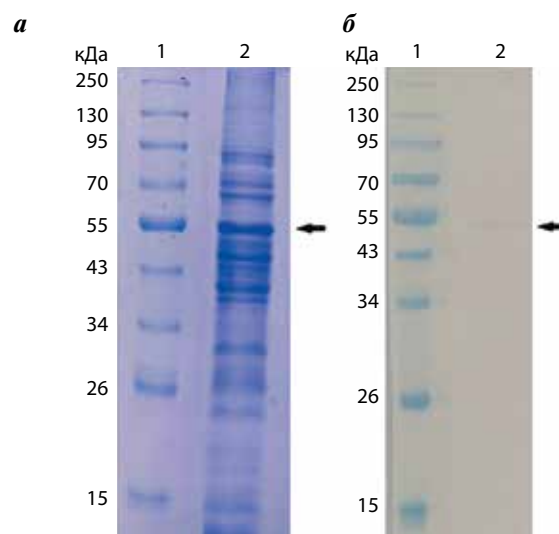


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле, окрашивание Кумасси R-250 (а); нитроцеллюлозная мембрана после иммуноблоттинга с моноклональными антителами к рекомбинантному пневмолизину (б): 1 — маркер молекулярной массы; 2 — исследуемый образец

Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis, Coomassie R-250 staining (a); nitrocellulose membrane after immunoblotting with monoclonal antibodies to recombinant pneumolysin (b): 1 — molecular weight marker; 2 — test sample

с моноклональными антителами, специфичными к полноразмерному gPly, доказано соответствие выявленной на уровне 53 кДа полосы pPly (рис. 1, б).

Цитопатогенное действие Ply оценивали на культуре CHO-K1 по форме и размеру клеток, меняющихся под действием токсина. Результат учитывали через

Цитопатогенное действие нативного пневмолизина
Cytopathogenic effect of native pneumolysin

Бактериальный токсин Bacterial toxin	№	Доза, мкг/мл Dose, µg/mL	Количество клеток CHO-K1 с нормальной морфологией, % Number of CHO-K1 cells with normal morphology, %		Форма и размер клеток Shape and size of cells
			24 ч 24 h	48 ч 48 h	
Фосфатно-солевой буфер + RPMI-1640 (контроль) Phosphate-buffered saline + RPMI-1640 (control)	1	0	98,2 ± 0,9	97,5 ± 1,2	Веретенообразные, крупные Fusiform, large
Ply-содержащий препарат, мкг/мл Ply-containing drug, µg/mL	2	1,0	98,5 ± 0,5	98,2 ± 1,4	Веретенообразные, крупные Fusiform, large
	3	2,0	97,0 ± 1,6	97,5 ± 0,8	Веретенообразные, крупные Fusiform, large
	4	4,1	97,5 ± 0,5	98,5 ± 0,8	Веретенообразные, крупные Fusiform, large
	5	8,2	97,2 ± 0,9	97,6 ± 1,3	Веретенообразные, крупные Fusiform, large
	6	16,4	28,7 ± 2,9*	27,5 ± 2,6*	Веретенообразные, округлые (мало), мел- кие круглые Fusiform, rounded (small number), small round
	7	32,8	6,0 ± 2,6*, **	4,3 ± 2,5*, **	Веретенообразные крупные (единичные в поле зрения), округлые (единичные в поле зрения), мелкие круглые (много) Fusiform large (single in the field of view), rounded (single in the field of view), small round (many)
	8	65,6	0	0	Мелкие круглые Small round
	9	131,2			Мелкие круглые Small round
	10	262,5			Мелкие круглые Small round
	11	525			Мелкие круглые, фрагменты клеток Small round, fragments of cells
	12	1050			Мелкие круглые (мало), клеточный детрит, оболочки клеток Small round (small amount), cellular detritus, cell membranes
	13	2100			Мелкие круглые (мало), клеточный детрит, оболочки клеток Small round (small amount), cellular detritus, cell membranes
Дифтерийный токсин, Lf Diphtheria toxin, Lf	14	0,125— 0,00025			Полная гибель клеток через 48 ч Complete cell death in 48 h

*Достоверность различий между группами 1 (контроль) и 6, 7; **с группами 6 и 7, p < 0,05.
*Significance of differences between groups 1 (control) and 6, 7; **with groups 6 and 7, p < 0.05.

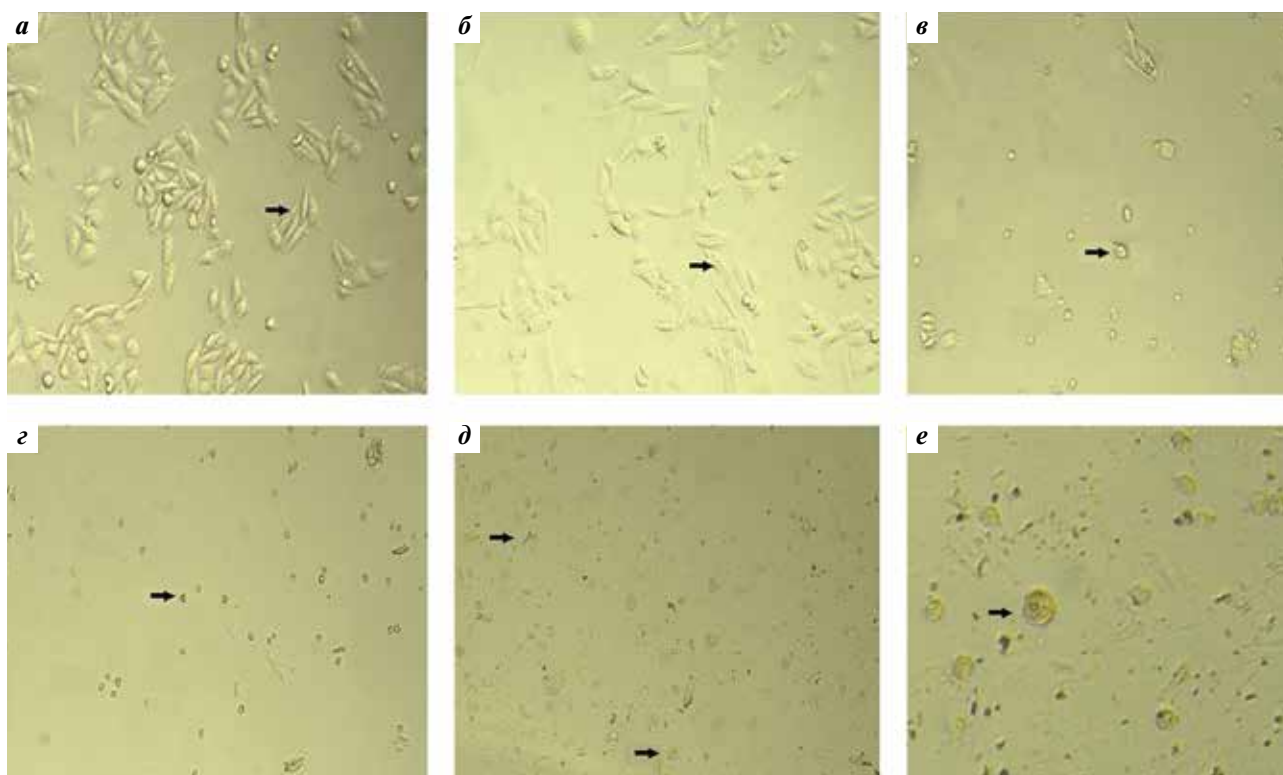


Рис. 2. Эффект действия пневмолизина на клетки СНО-К1 через 24 ч. Микрофотография лунок планшета: а – фосфатно-солевой буфер (контроль – нормальные веретенообразные клетки); б – 1 мкг/мл (нормальные веретенообразные клетки); в – 16,4 мкг/мл (большие округлые клетки – некроптоз); г – 65,6 мкг/мл (мелкие круглые клетки – пироптоз); д – 1050 мкг/мл (клеточный детрит – верхняя стрелка и апоптотические тельца – нижняя стрелка); е – увеличенный фрагмент изображения рис. д с апоптотическими тельцами ($\times 100$, объектив 10 $\times$, окуляр 10). Стрелками указаны фрагменты изображения, описанные в тексте

Fig. 2. Effect of pneumolysin on CHO-K1 cells, 24 h. Microphotography of the wells of the plate: а – phosphate-buffered saline (control – normal fusiform cells); б – 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (normal fusiform cells); в – 16.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (large rounded cells – necroptosis); г – 65.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (small round cells – pyroptosis); д – 1050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (cellular detritus – upper arrow and apoptotic corpuscles); е – an enhanced fragment of the image of fig. д with apoptotic corpuscles ($\times 100$, lens 10 $\times$, eyepiece 10). The arrows indicate the fragments of the image described in the text

24 и 48 ч. В качестве референс-препарата использовали очищенный дифтерийный токсин (см. таблицу).

Независимо от срока исследования в концентрациях от 1,0 до 8,2 мкг/мл (в расчете на общий белок) Ply не оказывал токсического действия на клетки СНО-К1. Клетки сохраняли присущую им веретенообразную форму, как и в контроле (рис. 2, а, б). Через 24 ч инкубации после внесения в клеточную культуру Ply в концентрации 16,4 мкг/мл наряду с веретенообразными клетками появлялись большие округлившиеся клетки, характерные для некроптоза, тогда как число нормальных клеток резко снижалось по сравнению с контролем (рис. 2, в). При внесении в культуру клеток 65,6 и 131,2 мкг/мл Ply обнаруживали только мелкие круглые клетки (рис. 2, г). Дальнейшее увеличение концентрации от 525 до 2100 мкг/мл приводило к уменьшению количества мелких круглых клеток, их деструкции, появлению клеточного детрита и апоптотических телец, представляющих собой фрагменты клетки, ограниченные плаз-

матической мембраной (рис. 2, д, е). Апоптотические тельца появлялись вследствие апоптоза клеток; 1 ЦПЕ составила 65,6 мкг/мл. Различий между результатами, полученными через 24 и 48 ч, не выявлено. Цитопатогенное действие дифтерийного токсина на клетки СНО-К1 учитывали через 48 ч; 1 ЦПЕ составляла 0,00025 Lf/мл.

Заключение

Показано, что nPly с М. м. 53 кДа взаимодействовал с моноклональными антителами к полноразмерному rPly и оказывал цитопатогенное действие на клетки СНО-К1. Ply вызывал гибель клеток СНО-К1 путем некроптоза, заключающегося в набухании клетки, ее округлении и увеличении проницаемости плазматической мембраны, приводящей к высвобождению ее содержимого во внеклеточное пространство, пироптоза, проявляющегося в нарушении целостности цитоплазматической мембраны и быстрым высвобождением в окружающую среду содержимого клетки с резким уменьшением ее размеров, а также

апоптоза с образованием апоптотических телец и разрушения клеток.

Последние исследования показали, что тремя основными типами запрограммированной гибели клеток являются апо-, пиро- и некроптоз, в процессе каждого из которых задействованы сложные молекулярные и клеточные механизмы [14]. В проведенном нами исследовании выраженность проявления того или иного пути гибели клеток зависела от дозы Ply. Через сутки после прибавления nPly к культуре клеток, меньшие его дозы вызывали некроптоз, увеличение дозы приводило к пироптозу, а самые большие дозы вызывали полное разрушение клеток путем апоптоза.

Обладающий цитотоксической активностью Ply *S. pneumoniae* может быть использован для про-

ведения дальнейших исследований по разработке методов снижения его токсичности с помощью различных молекул, в том числе моноклональных антител. Детоксицированный Ply целесообразно исследовать в экспериментах на животных для оценки его способности индуцировать образование антител и вызывать внутривидовую перекрестную защиту от заражения различными серотипами пневмококка.

Работа выполнена с использованием научного оборудования и штаммов коллекции центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» при финансовой поддержке проекта Российской Федерации в лице Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Andre G.O., Converso T.R., Politano W.R. et al. Role of *Streptococcus pneumoniae* proteins in evasion of complement-mediated immunity. *Front Microbiol* 2017;8:224. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00224
2. Briles D.E., Paton J.C., Mukerji R. et al. Pneumococcal vaccines. *Microbiol Spectr* 2019;7(6). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0028-2018
3. Croucher N.J., Løchen A., Bentley S.D. Pneumococcal vaccines: Host interactions, population dynamics, and design principles. *Annu Rev Microbiol* 2018;72:521–49. DOI: 10.1146/annurev-micro-090817-062338
4. Gonzalez-Juarbe N., Bradley K.M., Riegler A.N. et al. Bacterial pore-forming toxins promote the activation of caspases in parallel to necroptosis to enhance alarmin release and inflammation during pneumonia. *Sci Rep* 2018;8(1):5846. DOI: 10.1038/s41598-018-24210-8
5. 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
6. Pereira J.M., Xu S., Leong J.M., Sousa S. The yin and yang of pneumolysin during pneumococcal infection. *Front Immunol* 2022;13:878244. DOI: 10.3389/fimmu.2022.878244
7. Cima Cabal M.D., Molina F., López-Sánchez J.I. et al. Pneumolysin as a target for new therapies against pneumococcal infections: A systematic review. *PLoS One* 2023;18(3):e0282970. DOI: 10.1371/journal.pone.0282970
8. Wu J., Wu K., Xu W. et al. Engineering detoxified pneumococcal pneumolysin derivative ΔA146PLY for self-biomineralization of calcium phosphate: Assessment of their protective efficacy in murine infection models. *Biomaterials* 2018;155:152–64. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.018
9. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol* 2014;5:172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
10. Segel I.H. Biochemical calculations: How to solve mathematical problems in general biochemistry. New-York, London, Sydney, Toronto: John Wiley & Sons Inc., 1976. 441 p.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0
12. Burnette W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112(2):195–203. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90281-5
13. Vorobyev D.S., Sidorov A.V., Kaloshin A.A. et al. Preparation a recombinant form of pneumolysin protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Bull Exp Biol Med* 2023;174(6):749–53. DOI: 10.1007/s10517-023-05785-3
14. Ketelut-Carneiro N., Fitzgerald K.A. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis—Oh My! The many ways a cell can die. *J Mol Biol* 2022; 434(4):167378. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167378

Вклад авторов

Е.А. Курбатова: анализ и обобщение результатов;
И.В. Яковлева: исследование цитотоксического действия;
Н.Ф. Гаврилова: иммунохимические исследования;
Е.С. Петухова: электрофорез и иммуноблоттинг;
И.Б. Семенова: анализ литературы по теме статьи;
А.Е. Зайцев: статистическая обработка данных;
Ю.В. Волох: получение образцов крови животных;
А.Ю. Леонова: культивирование штаммов микроорганизмов;
А.В. Поддубиков: получение антигенов микробных клеток.

Author's contributions

E.A. Kurbatova: analysis and summarizing the results;
I.V. Yakovleva: cytotoxic test;
N.F. Gavrilova: immunochemical studies;
E.S. Petukhova: electrophoresis and immunoblotting;
I.B. Semenova: literature analysis on the topic of the article;
A.E. Zaitsev: statistical analysis;
Yu.V. Volokh: obtaining animal blood samples;
A.Yu. Leonova: cultivation of strains of microorganisms;
A.V. Poddubikov: obtaining antigens of microbial cells.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Курбатова / E.A. Kurbatova: <https://orcid.org/0000-0002-0282-4471>;
И.В. Яковлева / I.V. Yakovleva: <https://orcid.org/0000-0001-5123-2651>;
Н.Ф. Гаврилова / N.F. Gavrilova: <https://orcid.org/0000-0001-6704-0339>;
Е.С. Петухова / E.S. Petukhova: <https://orcid.org/0000-0003-0796-5764>;
И.Б. Семенова / I.B. Semenova: <https://orcid.org/0000-0002-6630-4838>;
А.Е. Зайцев / A.E. Zaitsev: <https://orcid.org/0000-0002-8434-231x>;
Ю.В. Волох / Yu.V. Volokh: <https://orcid.org/0000-0002-5161-4964>;
А.Ю. Леонова / A.Yu. Leonova: <https://orcid.org/0000-0002-2889-2405>;
А.В. Поддубиков / A.V. Poddubikov: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

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. Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.
Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation grant. Agreement No 075-15-2021-676 dated 28.07.2021.

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: 22.09.2023. Принята в печать: 26.01.2024.
Article received: 22.09.2023. Accepted for publication: 26.01.2024.