

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-19-28>

Нейтрализующая способность моноклональных антител, направленных к эпитопам функционально значимого домена пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*

Е.А. Курбатова, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Д.С. Воробьев, Е.С. Петухова, И.Б. Семенова, А.Е. Зайцев, Ю.В. Волох, Н.О. Варганова, А.В. Поддубиков, О.М. Афанасьева, А.В. Зубков

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. Пневмолизин (Ply) – бактериальный холестеролзависимый цитоллизин, продуцируемый практически всеми штаммами *Streptococcus pneumoniae*. Антитела, индуцированные к Ply, способны в определенной степени нейтрализовать его патогенное действие на клетки.

Цель исследования – изучить действие моноклональных антител (МкАт), полученных к нативной (натPly) и рекомбинантной (рекPly) формам Ply, на нейтрализацию цитолитической активности бактериального Ply *in vitro* и их превентивные свойства при заражении мышей вирулентным штаммом *S. pneumoniae*.

Материалы и методы. МкАт к натPly- и рекPly-форме получали из асцитной жидкости мышей. Поликлональные антитела ПкАт (рекPly) получали из сыворотки кроликов, иммунизированных рекPly. Ингибирование гемолиза эритроцитов оценивали по минимальной концентрации МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly), предотвращающей лизис эритроцитов, индуцированный натPly. Нейтрализующую способность антител оценивали на клетках яичника китайского хомячка CHO-K1 по минимальной концентрации антител, необходимых для защиты клеток от 4 цитопатогенных доз натPly. Протективные свойства антител исследовали при однократном внутрибрюшинном введении мышам 200 мкг антител с последующим заражением летальной дозой *S. pneumoniae*.

Результаты. Показано, что через 24 ч после внутрибрюшинного введения мышам натPly снижалась масса тела животных и появлялись дегенеративные формы эритроцитов в крови. В опытах *in vitro* натPly вызывал гемолиз эритроцитов и разрушение клеток CHO-K1 по механизму апоптоза. МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) ингибировали гемолиз эритроцитов и нейтрализовали разрушение клеток CHO-K1. Наиболее высокой нейтрализующей активностью характеризовались МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly). Однократное введение мышам исследованных антител вызывало замедление их гибели при заражении штаммом *S. pneumoniae*. Различий в протективной активности антител не выявлено.

Заключение. Методы, основанные на нейтрализации токсического действия Ply *S. pneumoniae* с помощью антител, можно рассматривать как инструмент снижения патогенности пневмококка.

Ключевые слова: моноклональное антитело, пневмолизин, цитоллиз, гемолиз, пассивная защита мышей

Для цитирования: Курбатова Е.А., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф. и др. Нейтрализующая способность моноклональных антител, направленных к эпитопам функционально значимого домена пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):19–28.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-19-28>

Neutralizing ability of monoclonal antibodies directed to epitopes of functionally significant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin domain

Ekaterina A. Kurbatova, Irina V. Yakovleva, Natalya F. Gavrilova, Denis S. Vorobyev, Ekaterina S. Petukhova, Irina B. Semenova, Anton E. Zaitsev, Yuri V. Volokh, Nune O. Vartanova, Alexander V. Poddubikov, Olga M. Afanasyeva, Alexander V. Zubkov

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

Contacts: Ekaterina Alexeevna Kurbatova kurbatova6162@yandex.ru

Background. Pneumolysin (Ply) – bacterial cholesterol-dependent cytolysin produced by almost all strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antibodies induced to pneumolysin for some extend are able to neutralize its pathogenic effect on cells.

Aim. Investigation of the effect of monoclonal antibodies obtained to native (nPly) and recombinant (rPly) forms of Ply on the neutralization of the cytolytic activity of bacterial Ply *in vitro* and their preventive properties on mice challenged with a virulent strain of *S. pneumoniae*.

Materials and methods. mAbs to the nPly and rPly forms of Ply was obtained from the ascitic fluid of mice. Polyclonal antibodies pAbs (rPly) were obtained from the serum of rabbits immunized with rPly. The inhibition of erythrocyte hemolysis was assessed by the minimum concentration of mAbs (nPly), pAbs (rPly) and pAbs (rPly), which prevents lysis of erythrocytes induced by nPly. The neutralizing ability of antibodies was evaluated on the ovarian cells of the Chinese hamster CHO-K1 by the minimum concentration of antibodies necessary to protect cells from 4 cytopathogenic doses of nPly. The protective properties of the antibodies were studied with a single intraperitoneal injection of 200 µg of antibodies to mice, followed by challenge with a lethal dose of *S. pneumoniae*.

Results. It was shown that 24 hours after intraperitoneal administration of nPly to mice, the body weight of the animals decreased and degenerative forms of red blood cells appeared in the blood. In *in vitro* experiments, nPly caused hemolysis of erythrocytes and destruction of CHO-K1 cells by the mechanism of apoptosis. mAbs (nPly), mAbs (rPly) and pAbs (rPly) inhibited erythrocyte hemolysis and neutralized the destruction of CHO-K1 cells. The highest neutralizing activity was shown by mAbs (rPly) and pAbs (rPly). A single injection of the studied antibodies to mice caused a decrease of their death when infected with the *S. pneumoniae* strain. There were no differences in the protective activity of antibodies.

Conclusion. Methods based on neutralizing the toxic effect of Ply *S. pneumoniae* with the help of antibodies can be considered as a tool to reduce the pathogenicity of pneumococci.

Keywords: monoclonal antibodies, pneumolysin, cytolysis, hemolysis, passive protection of mice

For citation: Kurbatova E.A., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F. et al. Neutralizing ability of monoclonal antibodies directed to epitopes of functionally significant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin domain. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(3):19–28. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-19-28>

Введение

Успехи вакцинопрофилактики заболеваний пневмококковой этиологии не исключают необходимости разработки новых биотерапевтических методов лечения тяжелых случаев заболеваний, вызываемых *Streptococcus pneumoniae*. Одним из основных белковых факторов патогенности пневмококка является пневмолизин (Ply), относящийся к семейству бактериальных холестеролзависимых цитолизин, продуцируемый практически всеми штаммами *S. pneumoniae*. С помощью кристаллографического анализа установлено, что молекула Ply состоит из 4 доменов [1, 2]. Мономеры Ply взаимодействуют с мембраной клеток через домен 4, соединяясь в олигомеры и приводя к критическим структурным изменениям, вызывающим в итоге перфорацию клеточной мембраны [1, 3]. Формируя крупные поры в холестеролсодержащих мембранах клеток, Ply вызывает их гибель, нанося существенный ущерб инфицированному организму хозяина [4, 5]. Специфичные к Ply антитела способны в определенной мере нейтрализовать цитопатогенное действие Ply [6]. Антитела могут напрямую нейтрализовать цитолитическое действие Ply путем блокирования сайтов их связывания с клеткой или путем препятствия олигомеризации протомеров Ply.

Свойства моноклональных антител (МкАт), направленных к различным эпитопам рекомбинантного Ply, охарактеризованы в ряде работ [6–11]. Показано, что МкАт, распознающие эпитопы в домене 4, нейтрализуют цитолитическую активность Ply. Однако свойства МкАт, полученных к нативному пневмолизину (натPly), остаются не до конца исследованными. Это объясняется тем, что на современном этапе получают МкАт к рекомбинантным (рекPly) формам Ply или его фрагментам. Антигенное сходство рекPly и натPly подтверждено в реакции иммуноблоттинга с МкАт к рекPly, способными распознавать натPly, выделенный из клинических штаммов пневмококка [6]. Однако не каждое МкАт подходит для определения Ply в клинических образцах, в том числе методами иммуноферментного анализа (ИФА) [6, 12, 13].

В настоящей работе для оценки функциональной активности Ply-специфичных антител использовали пневмолизин, полученный из бактериальных клеток *S. pneumoniae*, и рекомбинантный атоксичный полноразмерный пневмолизин. Исследована способность МкАт, полученных к натPly- и рекPly-форме, снижать патогенное действие Ply на клетки. Действие МкАт к натPly сравнивали с активностью МкАт и поликлональных антител (ПкАт), полученных к рекPly.

МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) исследовали в опытах пассивной защиты мышей от заражения вирулентным пневмолизинпозитивным штаммом *S. pneumoniae*.

Цель исследования — изучить действие МкАт, полученных к натPly- и рекPly-форме, на нейтрализацию цитолитической активности бактериального Ply *in vitro* и их превентивные свойства при заражении мышей вирулентным штаммом *S. pneumoniae*.

Материалы и методы

Препарат, содержащий натPly, получен с помощью ультразвуковой дезинтеграции бактериальных клеток штамма № 3 *S. pneumoniae* серотипа 3 с последующим осаждением сульфатом аммония [14]. Атоксичный полноразмерный рекPly пневмококка экспрессирован в штамме *Escherichia coli* M-15 [15, 16].

ПкАт (рекPly) получали путем 3-кратной иммунизации кролика дозой 100 мкг рекPly с полным/неполным адъювантом Фрейнда с интервалом 4 нед. Выделение ПкАт (гPly) проводили путем их осаждения из сыворотки крови насыщенным раствором сульфата аммония.

Мыши линии BALB/c, самки, получены из питомника «СМК СТЕЗАР» (г. Владимир). Животных содержали в условиях вивария в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217-2014). Дизайн исследования одобрен этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 1 от 29.01.2025).

Работа выполнена с использованием научного оборудования и штаммов коллекции центра коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова.

Специфичные к Ply МкАт получали по стандартному протоколу, включающему иммунизацию мышей, культивирование клеток мышинной миеломы P3-X63-Ag8.653, слияние спленоцитов с клетками миеломы (гибридизацию), отбор гибридных клонов, клонирование гибридом, оценку специфичности МкАт к Ply методом непрямого ИФА, определение классов и подклассов продуцируемых МкАт, концентрирование МкАт и их криоконсервацию [17]. Особенностью отбора клонов продуцентов МкАт (натPly) явилось определение специфичности антител в ИФА при адсорбции на планшетах натPly и параллельная оценка способности МкАт (натPly) ингибировать гемолитическую активность натPly. Выделение МкАт из асцитной жидкости мышей проводили методом двукратного осаждения сульфатом аммония. Осадок растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), диализовали против того же буфера и затем концентрировали с помощью полиэтиленгликоля с молекулярной массой 40 000 [14].

Оценку гемолитической активности натPly проводили в 96-луночных круглодонных микропланшетах для иммунологических реакций (Thermo Fisher Scientific, США). Препарат, содержащий натPly, титровали двукратным шагом в ФСБ в объеме 25 мкл с последующим добавлением 25 мкл 1,25 % эритроцитов крови лошади. Планшеты инкубировали при температуре 37 °C в течение 30 мин. За отрицательный результат принимали концентрацию натPly, вызывающую гемолиз 50 % эритроцитов. Концентрацию натPly, вызывающую полный гемолиз эритроцитов в предшествующей отрицательному результату лунке, принимали за 1 гемолитическую единицу (ГЕ).

При постановке реакции ингибирования гемолиза эритроцитов исследуемые антитела титровали в объеме 25 мкл двукратным шагом. Затем в каждую лунку прибавляли 1 ГЕ натPly в объеме 25 мкл. После инкубации планшета в течение 30 мин при 37 °C во все лунки прибавляли по 25 мкл суспензии эритроцитов. В контрольные лунки с рабочей концентрацией натPly прибавляли вместо антител по 25 мкл ФСБ. Планшет инкубировали в течение 2 ч при температуре 37 °C. Результат учитывали визуально. Протективным титром считали разведение антител, при котором гемолиз эритроцитов был полностью нейтрализован. Исследование проводили в 4 повторах.

Нейтрализацию цитопатогенного действия натPly с помощью исследуемых антител оценивали на культуре пролинизависимых эпителиоподобных клеток яичника китайского хомячка СНО-K1. Первоначально определяли 1 цитопатогенную дозу натPly [4]. Для этого в лунки 96-луночного культурального микропланшета вносили по 100 мкл серийных двукратных разведений натPly начиная с концентрации 2 мг/мл. Затем в каждую лунку прибавляли по 10⁴ клеток СНО-K1 в объеме 100 мкл. Планшеты инкубировали при температуре 37 °C в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 5 % концентрации CO₂. Результаты учитывали через 48 ч с помощью инвертированного микроскопа (Leitz, Германия). За 1 цитопатогенную единицу (ЦПЕ) принимали наименьшую концентрацию натPly, индуцирующую полное разрушение клеток, которая составляла 100 мкг/мл натPly. Для оценки способности антител нейтрализовать токсическое действие натPly на клетки СНО-K1 в первые лунки планшета вносили исследуемые антитела начиная с концентрации 4 мг/мл в объеме 100 мкл, и проводили их титрование двукратным шагом. Далее во все лунки планшета прибавляли 4 ЦПД натPly (400 мкг/мл) в объеме 50 мкл. Планшет инкубировали при температуре 37 °C в CO₂-инкубаторе в течение 30 мин. Затем прибавляли клетки СНО-K1 в указанной концентрации и инкубировали в течение 48 ч. В качестве отрицательного контроля вместо антител использовали серийные двукратные разведения

ФСБ в RPMI-1640. Оценку целостности клеток проводили через 48 ч после инкубации. Микрофотографии получали с помощью инвертированного микроскопа (Leica DMI8, Leica, Германия) с программным обеспечением LAS V4.12; объектив 10 × окуляр 10, увеличение 100. Размер изображения 1245 × 93,75 мкм.

Превентивные свойства МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) исследовали при однократном внутрибрюшинном введении мышам 200 мкг исследуемых антител в объеме 0,5 мл. В качестве контроля использовали нормальный иммуноглобулин (Ig) мыши (Calbiochem, США) в той же концентрации. Через 1 ч мышей заражали внутрибрюшинно летальной дозой (10^5 микробных клеток) штамма № 3 *S. pneumoniae* серотипа 3 в объеме 0,5 мл. Наблюдение за животными проводили в течение 8 сут. Учитывали количество выживших мышей в опытных и контрольной группах.

Статистическую обработку данных проводили методом Манна–Уитни для независимых выборок при использовании программного обеспечения Statistica 10. Данные представлены средним значением $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Для оценки токсического действия пневмолизина мышам однократно внутрибрюшинно вводили препарат, содержащий натPly, в дозах 25, 50 и 100 мкг на мышь в объеме 0,5 мл; контрольной группе животных вводили 0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций в том же объеме.

Через 1 сут после введения натPly отмечали снижение массы тела мышей во всех опытных группах

по сравнению с контролем. В ходе дальнейшего наблюдения масса мышей не отличалась от контрольных значений. Различий в массе тела мышей в диапазоне доз от 25 до 100 мкг/мышь натPly не выявлено.

В этот же срок (через 24 ч) у мышей исследовали морфологию эритроцитов в мазках крови из хвостовой вены. С увеличением дозы отмечено появление в крови дегенеративных форм эритроцитов (рис. 1, а–в). Значительные изменения морфологии эритроцитов наблюдали при введении дозы 100 мкг, которые характеризовались появлением большого количества акантоцитов – эритроцитов с зоной просветления в центре и с неровными зубчатыми выростами цитоплазмы (рис. 1, в).

Для оценки функциональной активности МкАт, специфичных к натPly и рекPly, использовали метод ингибирования гемолиза эритроцитов, вызываемого натPly. Результаты сравнивали с активностью ПкАт (рекPly).

Для определения 1 ГЕ натPly разводили до заранее оттитрованной концентрации, составляющей 0,76 мкг/лунка и делали двукратно уменьшающиеся разведения в ФСБ в лунках круглодонного микропланшета. После этого в лунки прибавляли 1,5 % суспензию эритроцитов. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 мин. Концентрация натPly, равная 0,76 мкг/лунка, вызывала 100 % лизис эритроцитов (рис. 2, а). В 2 раза меньшая концентрация (0,39 мкг/лунка) натPly индуцировала 50 % лизис эритроцитов. На основании этого за 1 ГЕ принимали концентрацию натPly 0,76 мкг/лунка. Эту концентрацию использовали при оценке ингибирующей активности антител (рис. 2, б). Для этого проводили титрование антител в двукратных разведениях. Затем во все

Таблица 1. Динамика массы тела мышей после однократного внутрибрюшинного введения нативного пневмолизина (натPly)

Table 1. Dynamics of body weight of mice after a single intraperitoneal injection of native pneumolysin (nPly)

Доза препарата Drug dose	Масса мышей, г Mice weight, g					
	до введения before injection	после введения натPly, сут after injection of nPly, days				
		1	2	3	4	6
натPly, мкг/0,5 мл nPly, µg/0,5 mL						
25	14,4 ± 0,2	12,7 ± 0,1*	14,4 ± 0,2	15,6 ± 0,2	16,5 ± 0,2	20,9 ± 0,2
50	14,0 ± 0,2	13,2 ± 0,3*	13,4 ± 0,4	14,4 ± 0,2	15,2 ± 0,2	18,1 ± 0,3
100	14,3 ± 0,2	12,5 ± 0,3*	14,4 ± 0,2	15,5 ± 0,4	16,1 ± 0,2	20,0 ± 0,3
0,9 % раствор натрия хлорида (контроль), 0,5 мл 0.9 % sodium chloride solution (control), 0.5 mL	14,7 ± 0,2	14,4 ± 0,3	14,5 ± 0,2	15,5 ± 0,2	16,3 ± 0,2	20,8 ± 0,2

*Достоверность различий между опытными группами и контролем, $p < 0,05$.

*Significance of differences between experimental groups and the control, $p < 0.05$.

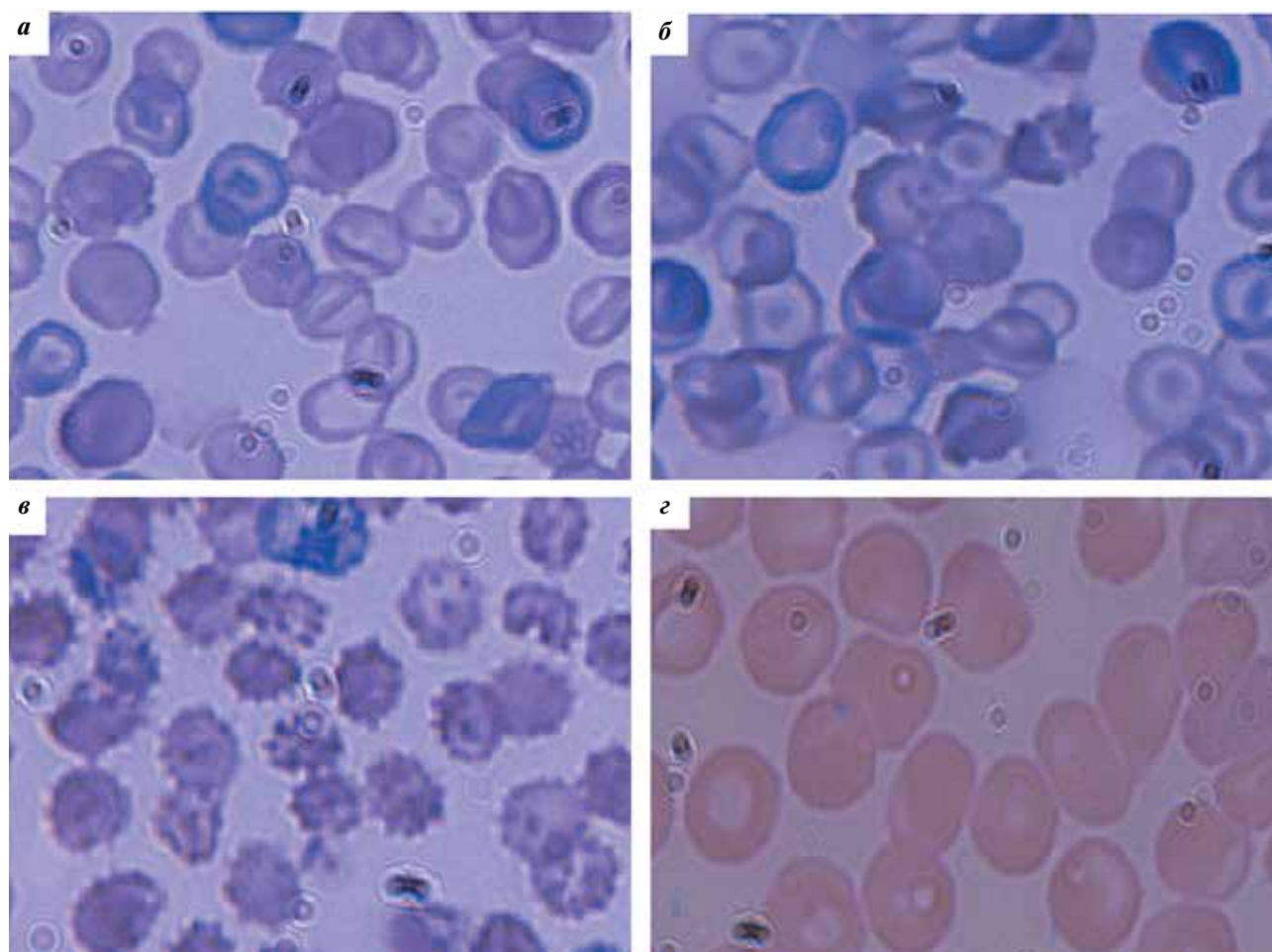


Рис. 1. Морфология эритроцитов мышей через 24 ч после внутрибрюшинного введения нативного пневмолизина. Доза препарата, мкг/мышь: а – 25; б – 50; в – 100; г – 0,9 % раствор натрия хлорида (контроль). Окраска мазков крови по Романовскому–Гимзе. Световая микроскопия, иммерсия, $\times 90$

Fig. 1. Morphology of mouse red blood cells 24 hours after intraperitoneal administration of native pneumolysin. Drug dose, $\mu\text{g}/\text{mouse}$: а – 25; б – 50; в – 100; г – 0.9 % sodium chloride solution (control). Blood smears stained by Romanowsky–Giemsa. Light microscopy, immersion, $\times 90$

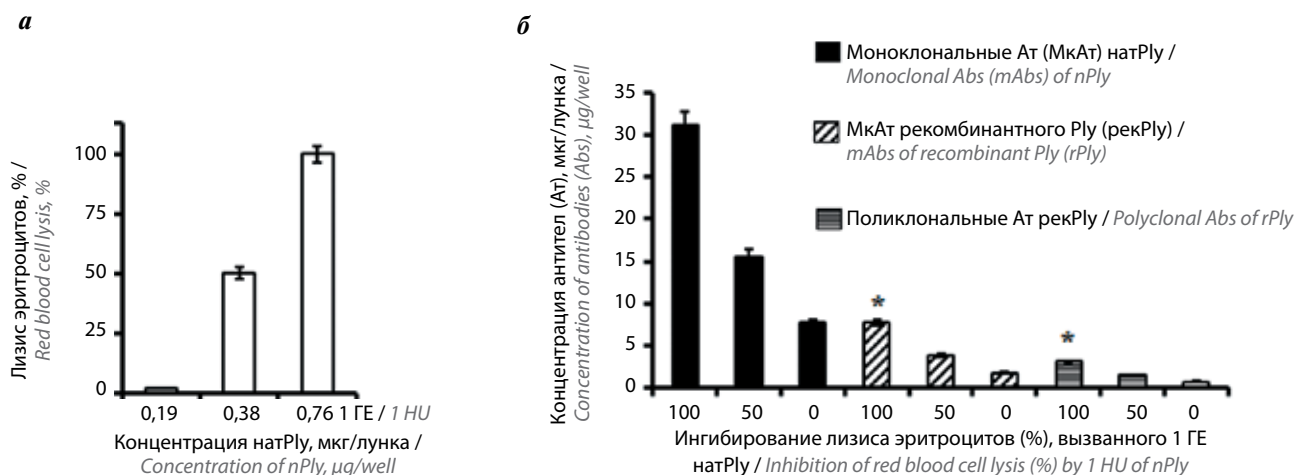


Рис. 2. Ингибирование лизиса эритроцитов: а – расчет концентрации нативного (натPly) пневмолизина (Ply), вызывающей 100 % лизис эритроцитов; б – концентрация антител, вызывающая ингибирование 1 гемолитической единицы (ГЕ) натPly

Fig. 2. Inhibition of red blood cell lysis: а – the calculation of the concentration of native (nPly) pneumolysin (Ply), which causes 100 % lysis of erythrocytes; б – the concentration of antibodies, which causes the inhibition of 1 hemolytic unit (HU) of nPly

лунки планшета прибавляли 1 ГЕ натPly, инкубировали и вносили эритроциты. 100 % ингибирование гемолиза при прибавлении МкАт (натPly) составляло 32 мкг/лунка; для МкАт (рекPly) требовалась меньшая концентрация антител — 7,0 мкг/лунка; для ПкАт (рекPly) ингибирующая концентрация составляла 3,2 мкг/лунка.

Во 2-м варианте опытов оценивали нейтрализующее действие антител при внесении 4 ЦПД натPly в культуру клеток СНО-К1. Результаты учитывали с помощью световой микроскопии (рис. 3). Принцип метода был таким же, то есть к МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly), взятым в двукратных разведениях, прибавляли 4 ЦПД натPly и затем вносили культуру клеток СНО-К1 (см. рис. 3, А–В, а–д). Контрольные лунки вместо антител содержали среду культивирования и 4 ЦПД натPly (см. рис. 3, А–В, е). Во всех контрольных лунках натPly вызывал фрагментацию клеток с образованием окруженных мембраной апоптотических телец, состоящих из цитоплазмы и плотно расположенных органелл [18].

МкАт (натPly) в концентрациях 4 и 2 мг/мл нейтрализовали действие натPly на клетки (рис. 3, А). При концентрации МкАт (натPly) 1 мг/мл появлялись первые признаки изменения морфологии клеток, сопровождающиеся их округлением; при концентрации 0,5 мг/мл обнаруживали мелкие округлые клетки и единичные клетки нормальной формы; концентрация 0,25 мкг/мл уже не защищала клетки от разрушающего действия натPly. Таким образом, минимальная нейтрализующая концентрация МкАт (натPly) составляла 2 мг/мл. МкАт (рекPly) вызывали сходные изменения морфологии клеток. При этом минимальная нейтрализующая концентрация антител была меньше и составляла 1 мг/мл (см. рис. 3, Б). Минимальная нейтрализующая концентрация ПкАт (рекPly) составляла 0,5 мг/мл (рис. 3, В).

Для оценки способности антител защищать мышей от заражения вирулентным штаммом *S. pneumoniae* за 1 ч до заражения им однократно внутривенно вводили исследуемые антитела в концентрации 200 мкг/мышь. В качестве контроля использовали нормальный Ig мыши в той же концентрации (рис. 4).

Гибель мышей, зараженных летальной дозой *S. pneumoniae* серотипа 3, начиналась на 2-е сутки после введения бактериальной культуры. В контрольной группе мышей, получивших нормальный Ig, на 2-е сутки погибло 4 из 8 мышей, тогда как во всех опытных группах — по 1 из 8 мышей. На 3-и сутки наблюдения в контрольной группе осталась в живых 1 особь, тогда как в группах мышей, которым вводили МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly), — 6, 4 и 5 мышей соответственно. Начиная с 4-х суток различия между опытными группами мышей были

несущественными. К 6-м суткам все контрольные мыши погибли, а в опытных группах оставалось в живых по 1 особи. На 7-е и 8-е сутки последовательно погибли мыши, которым вводили МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) и осталась в живых только 1 особь, получившая МкАт (натPly), т.е. однократное введение МкАт и ПкАт, специфичных к Ply, вызывало замедление гибели мышей. Полученные предварительные результаты, выявившие тенденцию протективного действия антител *in vivo*, подтверждают результаты опытов *in vitro* по нейтрализации цитопатогенного действия натPly на клетки с помощью антител, но нуждаются в дальнейшем выборе оптимальных доз и схемы пассивной иммунизации мышей.

Заключение

В ранее проведенных нами исследованиях показано, что иммунизация мышей рекPly приводила к образованию анти-рекPly-антител и защищала мышей от заражения *S. pneumoniae* [19]. Это явилось основанием для оценки нейтрализующей активности МкАт, направленных к функционально значимым эпитопам молекулы Ply. Так как использованный в работе рекомбинантный полноразмерный Ply не оказывал цитопатогенного действия в опытах *in vitro* и *in vivo* [16], для оценки нейтрализующей способности антител использовали натPly, полученный из бактериальных клеток *S. pneumoniae* [4]. Показано, что натPly обладал токсичностью, вызывая быстрое (через 24 ч) снижение массы тела мышей, что сопровождалось появлением в крови мышей морфологически измененных и дегенеративных форм эритроцитов. В тестах *in vitro* исследована пневмолизин-нейтрализующая способность 2 мышинных моноклональных IgG-антител, одно из которых получено к натPly-форме, другое — к рекPly-формам, а также ПкАт, индуцированных к рекPly. Показано, что МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) обладали способностью ингибировать гемолиз эритроцитов, т.е. были направлены к домену 4 молекулы Ply, ассоциированного с гемолитической активностью [6]. В тесте нейтрализации цитопатогенного действия Ply на клетки яичника китайского хомячка СНО-К1 установлены протективные свойства всех исследованных антител в ответ на прямое действие высокой концентрации натPly на клетки СНО-К1, защищающее клетки от апоптоза, вызванного действием пневмолизина. Таким образом, в 2 разных опытах, проведенных *in vitro*, показана способность МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) защищать от разрушения клетки, подвергнутые действию натPly. Более высокая функциональная активность МкАт (рекPly) по сравнению с МкАт (натPly) зависела от клона-продуцента МкАт [13]. Следует отметить, что функционально активные МкАт (рекPly) могут

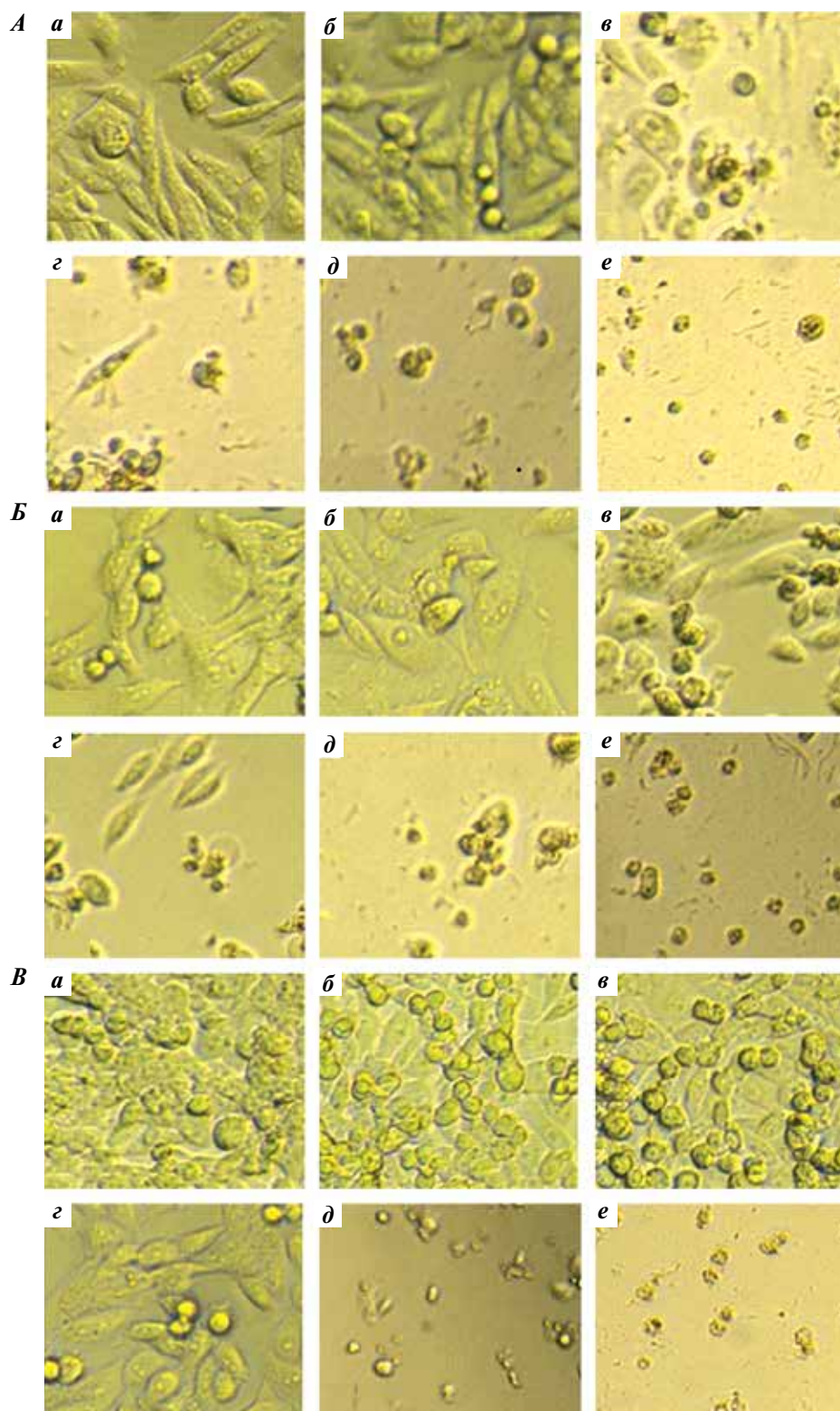


Рис. 3. Нейтрализация цитопатогенного действия нативного (натPly) пневмолизина (Ply) (4ЦПД) на клетки CHO-K1 с помощью моноклональных (МкАм) антител (Ам): А – МкАм (натPly); Б – МкАм рекомбинантного Ply (рекPly); В – поликлональные Ам (рекPly). Концентрация Ам: а – 4 мг/мл; б – 2 мг/мл; в – 1 мг/мл; г – 0,5 мг/мл; д – 0,25 мг/мл; е – контроль, среда культивирования. Увеличение 100, объектив $\times 10$, окуляр 10

Fig. 3. Neutralization of the cytopathogenic effect of native (nPly) pneumolysin (Ply) (4 cytopathogenic doses) on CHO-K1 cells using monoclonal (mAbs) antibodies (Abs): А – mAbs (nPly); Б – mAbs recombinant Ply (rPly); В – polyclonal Abs (rPly). Abs concentration: а – 4 mg/mL; б – 2 mg/mL; в – 1 mg/mL; г – 0.5 mg/mL; д – 0.25 mg/mL; е – control, culture medium. Magnification 100, lens $\times 10$, eyepiece 10

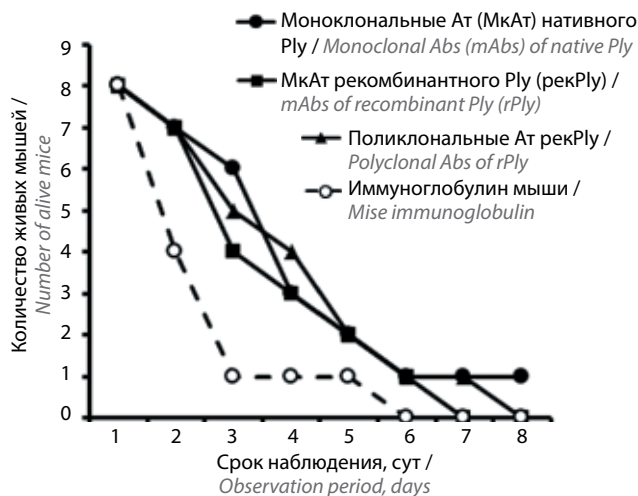


Рис. 4. Превентивные свойства антител (Ат), специфичных к пневмолизину (Ply)

Fig. 4. Preventive properties of antibodies (Abs) specific to pneumolysin (Ply)

не распознавать и слабо распознавать натPly в иммунохимических тестах (непрямой и сэндвич-ИФА), взаимодействуя при этом с натPly в реакции иммуноблоттинга [4, 6, 13]. Результаты, свидетельствующие о протективной активности антител в опытах

in vitro, подтвердились в опытах *in vivo*. Все исследованные антитела при пассивном введении мышам за 1 ч до заражения вирулентным штаммом *S. pneumoniae* снижали его патогенное действие, что проявлялось в замедлении гибели опытных мышей по сравнению с контролем. Полученные предварительные данные по превентивной активности антител требуют подтверждения с использованием других доз антител и схем их введения мышам.

На основании проведенных нами исследований установлено, что МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) нейтрализовали цитотоксическое действие натPly на эритроциты и клетки CHO-K1 в опытах *in vitro* и способствовали продлению жизни мышей, зараженных *S. pneumoniae* в опытах *in vivo*. Дальнейшие исследования в этом направлении целесообразно проводить при использовании МкАт (рекPly) с учетом их направленности к участкам молекулы Ply, ассоциированным с формированием протективного иммунного ответа.

В перспективе МкАт (Ply) можно рассматривать как инструмент, предназначенный для снижения патогенности пневмококка у пациентов с тяжелой формой пневмококковой инфекции методом пассивной иммунотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Marshall J.E., Faraj B.H.A., Gingras A.R. et al. The crystal structure of pneumolysin at 2.0Å resolution reveals the molecular packing of the pre-pore complex. *Sci Rep* 2015;5:13293. DOI: 10.1038/srep13293
- Lawrence S.L., Feil S.C., Morton C.J. et al. Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin provides key insights into early steps of pore formation. *Sci Rep* 2015;5:14352. DOI: 10.1038/srep14352
- Vögele M., Bhaskara R.M., Mulvihill E. et al. Membrane perforation by the pore-forming toxin pneumolysin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116(27):13352–7. DOI: 10.1073/pnas.1904304116
- 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: 10.17650/1726-9784-2024-23-1-51-57. Kurbatova E.A., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F. et al. Cytopathogenic effect of *Streptococcus pneumoniae* native pneumolysin in CHO-K1 cells. *Rossiiskij bioterapevticheskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2024;23(1):51–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2024-23-1-51-57
- Ganpule S., Vijaya A.K., Sukova A., Preta G. Membrane cholesterol content and lipid organization influence melittin and pneumolysin pore-forming activity. *Toxins (Basel)* 2022;14(5):346. DOI: 10.3390/toxins14050346
- Kucinskaite-Kodze I., Simanavicius M., Dapkunas J. et al. Mapping of recognition sites of monoclonal antibodies responsible for the inhibition of pneumolysin functional activity. *Biomolecules* 2020;10(7):1009. DOI: 10.3390/biom10071009
- Del Mar García-Suárez M., Cima-Cabal M.D., Flórez N. et al. Protection against pneumococcal pneumonia in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin. *Infect Immun* 2004;72(8):4534–40. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4534-4540.2004
- De Los Toyos J.R., Méndez F.J., Aparicio J.F. et al. Functional analysis of pneumolysin by use of monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1996;64(2):480–4. DOI: 10.1128/iai.64.2.480-484.1996
- Sephalika S., Mohakud N.K., Johargy A.K. et al. Development of an immunochromatographic test strip to detect pneumolysin by monoclonal antibody capture method. *Journal of King Saud University – Science* 2024;36(6):103213. DOI: 10.1016/j.jksus.2024.103213
- Cima-Cabal M.D., Méndez F.J., Vázquez F. et al. A specific and ultrasensitive chemiluminescent sandwich ELISA test for the detection and quantitation of pneumolysin. *J Immunoassay Immunochem* 2001;22(2):99–112. DOI: 10.1081/IAS-100103223
- Suárez-Álvarez B., García-Suárez Mdel M., Méndez F.J., de los Toyos J.R. Characterization of mouse monoclonal antibodies for pneumolysin: Fine epitope mapping and V gene usage. *Immunol Lett* 2003;88(3):227–39. DOI: 10.1016/s0165-2478(03)00081-6
- Jefferies J.M.C., Johnston C.H.G., Kirkham L.S. et al. Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. *J Infect Dis* 2007;196(6):936–44. DOI: 10.1086/520091
- Yakovleva I.V., Gavrilova N.F., Kurbatova E.A. et al. Immunochemical characteristics and functional activity of monoclonal antibodies obtained to the recombinant form of pneumolysin. *Bull Exp Biol Med* 2025;178(3):346–50. DOI: 10.1007/s10517-025-06334-w

14. Курбатова Е.А., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф. и др. Разработка тест-системы на основе иммуноферментного анализа для детекции рекомбинантного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):52–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-4-52-59
Kurbatova E.A., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F. et al. Development of the test system based on enzyme immunoassay for the detection of recombinant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(4):52–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-4-52-59
15. 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
16. Vorobyev D.S., Sidorov A.V., Ammour Y.I. et al. Analysis of toxicity of recombinant pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*. Bull Exp Biol Med 2024;177(1):137–9. DOI: 10.1007/s10517-024-06145-5
17. Broecker F., Anish C., Seeberger P.H. Generation of monoclonal antibodies against defined oligosaccharide antigens. Methods Mol Biol 2015;1331:57–80. DOI: 10.1007/978-1-4939-2874-3_5
18. Yu L., Zhu G., Zhang Z. et al. Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials. J Nanobiotechnol 2023;21(1):218. DOI: 10.1186/s12951-023-01969-1
19. 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*. Bull Exp Biol Med 2020;68(4):485–7. DOI: 10.1007/s10517-020-04736-6

Вклад авторов

Е.А. Курбатова: анализ и обобщение результатов;
И.В. Яковлева: гибридизация и клонирование, исследование нейтрализующей активности антител;
Н.Ф. Гаврилова: получение моноклональных и поликлональных антител;
Д.С. Воробьев: получение рекомбинантного пневмолизина и поликлональной кроличьей сыворотки;
Е.С. Петухова: статистическая обработка данных;
И.Б. Семенова: анализ литературы по теме статьи;
А.Е. Зайцев: исследование гемолитической активности нативного пневмолизина;
Ю.В. Волох: иммунизация животных;
Н.О. Вартанова: культивирование штаммов микроорганизмов;
А.В. Поддубиков: получение ультразвукового дезинтеграта клеток пневмококка;
О.М. Афанасьева: пассивная защита мышей;
А.В. Зубков: оценка морфологии клеток.

Authors's contributions

E.A. Kurbatova: analysis of the data obtained and summarizing of results;
I.V. Yakovleva: hybridization, cloning and investigation of neutralizing antibody activity;
N.F. Gavrilova: obtaining of monoclonal and polyclonal antibodies;
D.S. Vorobyev: production of recombinant pneumolysin and polyclonal rabbit serum;
E.S. Petukhova: statistical analysis;
I.B. Semenova: review of publications on the topic of article;
A.E. Zaitsev: hemolytic activity study of native pneumolysin;
Yu.V. Volokh: animal immunization;
N.O. Vartanova: cultivation of microorganisms;
A.V. Poddubikov: obtaining ultrasonic disintegrate of pneumococcal cells;
O.M. Afanasyeva: passive protection of mice;
A.V. Zubkov: assessment of cell morphology.

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>
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>
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>
Н.О. Вартанова / N.O. Vartanova: <https://orcid.org/0000-0002-6372-9910>
А.В. Поддубиков / A.V. Poddubikov: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>
О.М. Афанасьева / O.M. Afanasyeva: <https://orcid.org/0000-0003-0875-4141>
А.В. Зубков / A.V. Zubkov: <https://orcid.org/0000-0002-0056-5082>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

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: 19.02.2025. Принята к публикации: 11.07.2025. Опубликована онлайн: 25.09.2025.
Article submitted: 19.02.2025. Accepted for publication: 11.07.2025. Published online: 25.09.2025.