

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

На правах рукописи

ЛУКЪЯНОВА Светлана Владимировна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ
ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ОРГАНИЗМА ПОД
ВОЗДЕЙСТВИЕМ АНТИГЕННОГО ПРЕПАРАТА *BACILLUS
ANTHRACIS* В СОЧЕТАНИИ С НАНОКОМПЗИТАМИ**

(экспериментальное исследование)

14.03.03 – патологическая физиология

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
В. И. Дубровина

Научный консультант:
доктор биологических наук,
Е. Ю. Марков

	Стр.
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
ГЛАВА 1 ПОВЫШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ <i>BACILLUS ANTHRACIS</i>	16
1.1 Современные представления о роли антигенов <i>B. anthracis</i> в процес- се иммуногенеза	17
1.2 Сибиреязвенные вакцины и перспективы их совершенствования	27
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1 Экспериментальные животные	40
2.2 Штаммы бактерий	41
2.3 Питательные среды	41
2.4 Характеристика антигенных препаратов <i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂	42
2.5 Характеристика экспериментальных образцов нанокомпозитов	44
2.6 Получение макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов	45
2.6.1 Получение резидентных перитонеальных макрофагов	45
2.6.2 Получение полиморфноядерных лейкоцитов	45
2.7 Определение содержания неферментных катионных белков в поли- морфноядерных лейкоцитах	46
2.8 Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в фагоци- тах	46
2.9 Определение активности НАДФ·Н-оксидазы в фагоцитах	47
2.10 Определение активности миелопероксидазы в полиморфноядерных лейкоцитах	48
2.11 Определение метаболитов кислорода в фагоцитах	49
2.12 Определение активности НАДФ·Н-диафоразы в фагоцитах	49
2.13 Определение активности супероксиддисмутазы в фагоцитах	50

2.14	Определение активности NO-синтазы в фагоцитах	51
2.15	Определение активации и апоптоза клеток крови в эксперименте <i>in vitro</i>	52
2.15.1	Титрование антител	52
2.15.2	Приготовление раствора реагентов	53
2.15.3	Выявление фосфатидилсерина и маркера активации на лим- фоцитах крови	54
2.16	Определение субпопуляционного состава В-лимфоцитов крови в экспериментах <i>in vivo</i>	56
2.17	Статистические методы	57
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ		59
ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ <i>B. ANTHRACIS</i> STERNE 34F ₂ И МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩИХ НАНОКОМПОЗИТОВ НА БАКТЕРИЦИДНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФАГОЦИТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЖИВОТНОГО		59
3.1	Бактерицидные механизмы фагоцитов белых мышей при взаимодей- ствии с антигенными препаратами S-1 и S-2 штамма <i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ <i>in vitro</i>	60
3.2	Воздействие нанокompозитов на неспецифическую резистентность организма экспериментального животного	66
3.3	Влияние антигенного препарата S-1 штамма <i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ в сочетании с нанокompозитами на функциональное состояние фагоцитов морских свинок	72
3.4	Влияние антигенного препарата S-2 штамма <i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ в сочетании с нанокompозитами на функциональное состояние клеток имму- нофагоцитарной системы морских свинок в условиях <i>in vivo</i>	77
ГЛАВА 4 КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ МАКРООРГАНИЗМА К АНТИГЕННОМУ ПРЕПАРАТУ S-2 ШТАММА <i>B. ANTHRACIS</i> STERNE 34F ₂ В СОЧЕТАНИИ С КОБАЛЬТАРАБИНОГАЛАКТАНОМ		84

4.1 Воздействие антигенного препарата S-2 штамма <i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ и кобальтарабиногалактана на активацию Т-лимфоцитов белых мышей <i>in vitro</i>	85
4.2 Влияние антигенного препарата S-2 штамма <i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ и кобальтарабиногалактана на апоптоз клеток крови белых мышей <i>in vitro</i>	87
4.3 Воздействие антигенного препарата S-2 штамма <i>B. anthracis</i> Sterne 34F ₂ и кобальтарабиногалактана на субпопуляционный состав В-лимфоцитов крови <i>in vivo</i>	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	114
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	116

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Аг	–	антиген
АГ	–	арабиногалактан
АОС	–	антиоксидантная система
Ат	–	антитело
АФК	–	активные формы кислорода
Белок С	–	соматический белок сибирязвенного микроба с молекулярной массой 92 кДа
Г-6-ФДГ	–	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГМ	–	галактоманнан
ГМФШ	–	гексозомонофосфатный шунт
ДМСО	–	диметилсульфоксид
ЗФР	–	забуференный 0,9 % раствор хлорида натрия рН 7,2
ИКК	–	иммунокомпетентные клетки
ИЛ	–	интерлейкин
ИМ	–	иммуномодулятор
ИС	–	индекс стимуляции
Ис	–	индекс содержания
КВ	–	коэффициент выживаемости
КЗМ	–	кислородзависимый метаболизм
ЛД ₅₀	–	доза испытуемого агента, вызывающая гибель 50 % взятых в опыт животных
ЛТ	–	летальный токсин сибирязвенного микроба
ЛФ	–	летальный фактор сибирязвенного токсина
ЛЭ	–	лейкоцитарная эластаза
м. м.	–	молекулярная масса

МПО	–	миелопероксидаза
НАДФ	–	никотинамидадениндинуклеотид фосфат
НАДФ·Н	–	никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный
НК	–	наноструктурированные металлокомпози́ты
НКБ	–	неферментные катионные белки
НСТ	–	нитросиний тетразолий
O ₂	–	кислород
O ₂ ⁻	–	супероксидный анион-радикал
ОБ	–	острофазные белки
ОТ	–	отечный токсин сибиреязвенного микроба
ОФ	–	отечный фактор сибиреязвенного токсина
ОФД	–	о-фенилендиамин
ПА	–	протективный антиген сибиреязвенного токсина
ПА ₂₀	–	функциональный фрагмент протективного антигена с м. м. 20 кДА
ПА ₆₃	–	функциональный фрагмент протективного антигена с м. м. 63 кДА
ПААГ	–	полиакриламидный гель
ПВЖ	–	процент выживших животных
ПВТ	–	поли-1-винил-1,2,4-триазол
ПК	–	плазматические клетки
ПМ	–	перитонеальные макрофаги
ПЯЛ	–	полиморфноядерные лейкоциты
рПА	–	рекомбинантный протективный антиген сибиреязвенного токсина
СМФ	–	система мононуклеарных фагоцитов
СОД	–	супероксиддисмутаза
ФМС	–	феназинметосульфат
цАМФ	–	циклический аденозинмонофосфат

[PA ₆₃] ₇	– гептомер протективного антигена
AVA	– адсорбированная сибиреязвенная вакцина
AVP	– преципитированная сибиреязвенная вакцина
BcIA	– коллагеноподобный гликопротеин сибиреязвенного микроба
CD	– кластер дифференциации
CpG	– динуклеотиды
CpG– ОДН	– олигодезоксинуклеотиды
DCL	– доза антигена, вызывающая гибель 100 % животных
EA	– экстрагируемый антиген сибиреязвенного микроба
FSC	– прямое светорассеяние
NETs	– нейтрофильные внеклеточные ловушки
NK- клетки	– натуральные киллеры
NO	– оксид азота
NOS	– NO-синтаза
S-1, S-2	– антигенный препарат сибиреязвенного микроба
Sap	– поверхностный белок сибиреязвенного микроба
SSC	– боковое светорассеяние
TLR	– Toll-подобный рецептор
Ag-ГМ	– серебросодержащий нанокомпозит ГМ (аргентогалактоманнан)
Co-АГ	– кобальтсодержащий нанокомпозит АГ (кобальтарабиногалактан)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Сибирская язва – сапрозооантропонозное особо опасное инфекционное заболевание. Известно, что из всех представителей рода *Bacillus* наиболее патогенным для людей и сельскохозяйственных животных является *Bacillus anthracis*. Сибиреязвенная инфекция до сих пор наносит огромный ущерб сельскому хозяйству и представляет серьезную угрозу для здоровья человека [103, 105]. В России отмечается вспышечная и спорадическая заболеваемость с эпидемическими проявлениями в отдельные годы и неуклонный рост неблагоприятных по сибирской язве территорий [104, 106].

Применяемые в настоящее время вакцины против сибирской язвы имеют ряд недостатков и не всегда способны обеспечить надежный иммунитет к этой инфекции [71, 145]. Угроза биотерроризма обострила необходимость создания нового класса вакцин, способного формировать быструю в течение нескольких минут или часов защиту от патогена путем активации врожденного иммунитета [57].

В связи с чем, разработка вакцин нового поколения, позволяющих решить основные проблемы профилактики сибирской язвы на современном этапе, является актуальным направлением исследований.

Степень разработанности темы исследования

Одним из перспективных направлений специфической профилактики сибирской язвы является разработка химических вакцин на основе рекомбинантного протективного антигена (рПА), а также использованием дополнительных антигенов *B. anthracis* (отечного и летального факторов, белков S-слоя, а также ряда по-

верхностных протеинов и адгезинов) и новых адъювантов, стимулирующих иммунитет [22, 73, 152, 180, 182, 221, 240].

Роль белков S-слоя как фактора вирулентности недостаточно изучена. Следует отметить, что работы, касающиеся исследований белков S-слоя, затрагивают в основном протективные свойства этих антигенов [18, 20, 225, 233]. Между тем, функциональная активность иммунокомпетентных клеток (ИКК) и их способность секретировать биологически активные вещества в ответ на введение антигенов сибиреязвенного микроба изучены в меньшей мере. Также известно, что очищенные или синтезированные антигены и антигенные детерминанты, взятые отдельно, как правило, не способны индуцировать выраженный иммунный ответ [71, 73].

Одним из перспективных методов формирования быстрого и эффективного иммунного ответа является применение адъювантов, направленных непосредственно на ИКК, модулирующие формирование адаптивного иммунитета [10, 57, 190]. Ранее было показано, что природные полисахариды и их наноструктурированные металлокомпози́ты (НК) могут быть использованы в качестве средств повышающих резистентность организма [11, 25, 37, 91].

В связи с этим, исследование функциональной активности клеток иммунной системы макроорганизма под действием антигенного препарата *B. anthracis* Sterne 34F₂ позволит получить новые данные об особенностях патогенеза и экспериментально обоснованию факторов, обеспечивающих резистентность организма к возбудителю сибирской язвы.

Цель исследования – выявить закономерности формирования иммунного ответа у экспериментальных животных под действием антигенного препарата *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с металлосодержащими нанокомпозитами.

Для реализации поставленной цели последовательно решались следующие **задачи**:

1. Установить влияние антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ и металлосодержащих нанокомпозитов на кислородзависимые и кислороднезависимые бактерицидные системы фагоцитов экспериментальных животных *in vitro*.

2. Выявить особенности бактерицидных реакций фагоцитов экспериментальных животных, иммунизированных антигенным препаратом S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с металлосодержащими нанокompозитами.

3. Оценить характер воздействия антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с кобальтарабиногалактаном на активацию Т-лимфоцитов и индукцию апоптоза клеток крови белых мышей *in vitro*.

4. Выяснить закономерности формирования субпопуляционного состава В-лимфоцитов крови белых мышей, иммунизированных антигенным препаратом S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ *per se* и в сочетании с кобальтарабиногалактаном.

Научная новизна работы

На основе исследований показано, что антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, содержащий антигены S-слоя, в дозе 20 мкг/10⁶ фагоцитов оказывает стимулирующее влияние на функционирование основных ферментных и неферментных антимикробных систем фагоцитов (активность Г-6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидазы, миелопероксидазы, а также содержание неферментных катионных белков).

Получены новые данные о способности нанокompозитов - кобальтарабиногалактана (Со-АГ), аргентогалактоманнана (Аг-ГМ), аргентополи-1-винил-1,2,4-триазола (2-Н-Аг-ПВТ) повышать неспецифические факторы иммунитета посредством активации кислородзависимых и кислороднезависимых бактерицидных систем фагоцитов.

Установлено, что сочетанное применение антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ с нанокompозитами Со-АГ или Аг-ГМ способствует стимуляции бактерицидного потенциала фагоцитов, обеспечивая таким образом устойчивость организма к сибирской язве.

При проведении комплексного сравнительного исследования выявлено стимулирующее действие антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ на формирование субпопуляционного состава клеток крови белых мышей.

Изучение влияния антигенного препарата S-2 *per se* и в сочетании с кобальтарабиногалактаном на продукцию раннего маркера активации Т-лимфоцитов,

показало, что в условиях *in vitro* происходит повышение пролиферативной и функциональной активности Т-лимфоцитов, что подтверждается повышением экспрессии CD25⁺ на иммунокомпетентных клетках крови экспериментальных животных.

Также продемонстрировано, что антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в условиях *in vivo* обладает способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов. Антигенный препарат S-2 и его сочетанное применение с Со-АГ оказывают влияние на содержание плазматических клеток (ПК) и их предшественников в крови экспериментальных животных, тем не менее, их количественные показатели зависят от сроков наблюдения.

Предложена и научно обоснована концептуальная схема механизмов действия антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ *per se* и в сочетании с Со-АГ на функциональное состояние клеток иммунной системы.

Теоретическое и практическое значение работы

На основании проведенных исследований показана роль антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, содержащего антигены S-слоя сибиреязвенного микроба, в реализации бактерицидных механизмов фагоцитоза (кислород- и кислороднезависимых) клеток иммунофагоцитарной системы.

Получены новые данные о клеточных и гуморальных факторах врожденного иммунитета и функциональных изменениях, происходящих в клетках организма при формировании адаптивного иммунитета под действием как антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, так и металлосодержащих нанокompозитов. Эти данные дополняют теоретические знания и определяют направления изысканий в области изучения механизмов формирования резистентности макроорганизма к возбудителю сибирской язвы, а также новые подходы к конструированию химической вакцины для специфической профилактики сибирской язвы.

Впервые для усиления иммунного ответа на введение антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ использованы металлосодержащие нанокompозиты (Со-АГ, Ag-ГМ). Проведено комплексное сравнительное исследование влияния

антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании нанокompозитами на бактерицидные механизмы фагоцитоза и субпопуляционный состав лимфоцитов крови белых мышей. Результаты экспериментов показали, что антигенный препарат S-2 в сочетании с кобальтарабиногалактаном способен повышать пролиферативную и функциональную активность лимфоцитов.

Патогенетически обоснована возможность применения антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ и металлосодержащих нанокompозитов в качестве средств, повышающих резистентность организма экспериментальных животных в отношении *B. anthracis*.

Результаты исследований послужили основой для разработки и модификации методов изучения бактерицидных механизмов фагоцитоза и иммунной перестройки организма, которые отражены в методических рекомендациях – «Определение функционального состояния фагоцитов в качестве показателя неспецифической защиты организма» (Иркутск, 2008); «Выявление фосфатидилсерина на лимфоцитах крови мышей с помощью проточного цитофлюориметра BD FACSCanto™ II» (Иркутск, 2010); «Методические рекомендации по определению активности НАДФ·Н-диафоразы в фагоцитах экспериментальных животных» (Иркутск, 2011); «Фотоколориметрическое определение поглотительной способности фагоцитов экспериментальных животных с применением 96-луночных плоскодонных планшет» (Иркутск, 2013).

Научные и практически значимые материалы исследований внедрены в практику научно-исследовательской работы ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, Сибирского института физиологии и биологии растений СО РАН (г. Иркутск), Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (г. Улан-Удэ), Учреждения Российской академии медицинских наук Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН (г. Владивосток), включены в лекционные курсы при подготовке кадров учреждений Роспотребнадзора и других ведомств по программам дополнительного профессионального образования при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Методология и методы исследования. В работе использованы общенаучные и частные научные методы исследования (биологические, биохимические, иммуноцитометрические и статистические методы). Биологическим методом проводили определение токсичности экспериментальных препаратов. Биохимические методы включали определение бактерицидных механизмов фагоцитов экспериментальных животных. Иммуноцитометрическими методами определяли функциональную способность клеток крови экспериментальных животных. Все полученные материалы обработаны статистически стандартными методами.

Положения, выносимые на защиту

1. Функциональная способность фагоцитов, примированных антигенным препаратом S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, проявляется в повышении степени активации эффекторных функций клеток иммунофагоцитарной системы (микробицидность, цитотоксичность, продукция супероксидных и нитроксидных радикалов), которая модулируется за счет применения наноструктурированного кобальтарабиногалактана, аргентогалактаманнана или аргентополи-1-винил-1,2,4-триазола.

2. Антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, активирует пролиферацию иммунокомпетентных клеток и модуляцию апоптоза. Особенности формирования субпопуляционного состава клеток крови белых мышей, иммунизированных как антигенным препаратом S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, так и совместно с кобальтарабиногалактаном зависят от сроков их взаимодействия с клетками макроорганизма.

Степень достоверности результатов и апробация работы

О достоверности результатов работы свидетельствует достаточный объем исследований с применением современных, высокочувствительных и специфичных методов с автоматизированным учетом и оценкой результатов, адекватных методов статистической обработки полученных данных.

Материалы, изложенные в диссертации, обсуждены и представлены на:

- Международных научных конференциях «Современные проблемы зоонозных болезней» (Улан-Батор, 2008 – 2010);

- IV Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2012); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения» (Пермь, 2012);

- Межрегиональных научно-практических конференциях молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Человек: здоровье и экология» (Иркутск, 2008 – 2011); «Биологическая безопасность в современном мире» (Оболенск, 2009); «Актуальные проблемы профилактической медицины, среды обитания и здоровья населения» (Уфа, 2013);

- научных конференциях Иркутского противочумного института (2008 – 2016).

В основу диссертационной работы положены исследования, проведенные в рамках двух тем НИР института: 011-3-08 «Изучение иммуногенных свойств препарата на основе поверхностных структур сибиреязвенного микроба с иммуномодуляторами» с № ГР 01200806999 (2008-2012 гг.) и результатов темы 7.10. «Изучение иммуномодулирующего действия нанобиокомпозитов природного происхождения для повышения неспецифической резистентности макроорганизма», выполненной в рамках Отраслевой программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (2011-2015 гг.).

Публикации

По теме диссертации опубликована 21 научная работа, в том числе 8 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для опубликования результатов диссертаций, три – в иностранных журналах.

Личный вклад соискателя

Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментов, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально-

теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и докладах.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературных источников. Работа изложена на 141 странице машинописного текста, иллюстрирована 8 таблицами и 24 рисунками. Список литературных источников содержит 253 наименования, в том числе 146 – зарубежных.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1 ПОВЫШЕНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ *BACILLUS ANTHRACIS*

Сибиреязвенный микроб – факультативно-анаэробный неподвижный грамположительный патогенный микроорганизм, принадлежащий к роду *Bacillus*, семейству *Bacillaceae* и отряду *Eubacteriales*.

Согласно данным эпидемиологических наблюдений ситуация по сибирской язве в мире остается напряженной, а особенно в странах СНГ, Азии, Африки и Южной Америки. На территории ряда стран, в том числе и России, регистрируются единичные случаи заболевания людей, обусловленные контактом с больными животными и продуктами животноводства [104, 106].

Вопросы специфической защиты людей в группах риска и сельскохозяйственных животных от сибиреязвенной инфекции занимают одно из центральных мест в системе ветеринарных и медико-санитарных мер профилактики. Однако иммунизация сельскохозяйственных животных и вакцинация населения, подвергающегося риску заражения сибирской язвой, ежегодно снижается [71, 82].

Современные сибиреязвенные вакцины имеют существенные недостатки и нуждаются в совершенствовании. Поэтому постоянно ведутся научные исследования по разработке новых поколений вакцин, которые позволят решить основные проблемы профилактики сибирской язвы на современном этапе, например: ареактогенность, снижение кратности вакцинации, антибиотикорезистентность, аспирационный способ применения [37, 71, 145].

Таким образом, исследование пригодности различных субклеточных фракций

B. anthracis с привлечением иммуномодуляторов и адъювантов, обеспечивающих целенаправленное действие на иммунную систему организма человека и животных, может определить принципы отбора и конструирования высокоиммуногенных препаратов, пригодных для специфической иммунопрофилактики сибирской язвы [7, 37, 48, 71, 119].

1.1 Современные представления о роли антигенов *B. anthracis* в процессе иммуногенеза

Несмотря на большие достижения в изучении патогенеза и иммуногенеза сибирской язвы, механизмы вирулентности *B. anthracis* и его взаимодействия с макроорганизмом остаются не до конца выясненными [9, 35, 40, 189]. Для воспроизведения целостной картины этих процессов необходимо изучение структуры и функций генома, а также исследования механизмов взаимодействия генов.

Исследования отечественных и зарубежных ученых продемонстрировали, что все происходящие при сибиреязвенной инфекции патологические процессы являются результатом активности генов, входящих в состав высокомолекулярных плазмид рХО1 (кодирует синтез токсинов) и рХО2 (отвечает за образование полиглутаминовой капсулы). Клетки высоковирулентных штаммов *B. anthracis* содержат оба репликона [9, 51, 158].

К клеточным антигенам (Аг) бескапсульной вегетативной клетки сибиреязвенного микроба относят соматический Аг (ST), в состав которого входит полисахаридный Аг, а также иммуноспецифические белковые Аг. Белковые Аг обладают более выраженными иммуногенными свойствами, чем полисахаридные. Выявлено около 50 серологически активных белков с молекулярной массой (м. м.) от 10 до 200 кДа. В их числе протективный антиген (ПА), отечный фактор (ОФ), летальный фактор (ЛФ), а также поверхностные белки, адгезины, гидролазы и белки, транспортирующие аминокислоты и олигопептиды [28, 49, 51, 165].

В составе оболочки и капсулы *B. anthracis* выделяют три группы антигенных комплексов: 1) поверхностные Аг капсулы (пептиды); 2) собственно кап-

сульные Аг, расположенные в основном слое капсулы (белки и полисахариды); 3) Аг оболочки клетки (также белки и полисахариды) [49].

Капсула обладает антифагоцитарной активностью, препятствует опсонизации и фагоцитозу бацилл и одновременно способствует фиксации их на клетках хозяина [160].

Типичными внеклеточными Аг являются компоненты сибиреязвенного токсина, который продуцируется как вирулентными, так и вакцинными штаммами. Экзотоксин состоит из трех термолабильных белков: ПА с м. м. 83 кДа, ЛФ – 90 кДа, ОФ – 89 кДа. Последние два белка попарно соединяются с ПА и образуют два экзотоксина – летальный (ЛТ) и отечный (ОТ) [116, 164, 197].

Известно, что ЛФ является цинкзависимой металлопротеазой, имеет сложную химическую структуру. ОФ представляет собой кальций- и кальмодулинзависимую аденилатциклазу, при участии которой синтезируется циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) в цитоплазме эукариотических клеток [143, 191].

Как показали исследования в составе плазмиды рХО1 имеется «остров патогенности», ограниченный с обеих сторон инвертированными IS-элементами. «Остров патогенности» *B. anthracis* содержит структурные гены *pagA*, *lef* и *суа*, кодирующие синтез ПА, ЛФ и ОФ соответственно. Помимо этого, в «остров патогенности» включены гены, отвечающие за регуляцию факторов патогенности и иммуногенности *B. anthracis* (*atxA*, *pagR*) и прорастание спор (*gerX*) [136, 169, 231].

Экзотоксин играет ведущую роль в патогенезе сибиреязвенной инфекции и формировании специфического иммунитета, а изучение действия токсинов *B. anthracis* на иммунные клетки макроорганизма является необходимым звеном в понимании механизмов, лежащих в основе патогенеза сибирской язвы [17, 104, 128, 172, 243]. ПА, выполняя роль молекулы-переносчика, является необходимым компонентом при реализации токсических эффектов, обусловленных обоими токсинами [43, 123, 198].

На первом этапе ПА связывается со специфическими рецепторами на поверхности мембраны клеток млекопитающих – главным образом макрофагов. Они

называются АТХ-рецепторами (*anthrax toxin receptor*) и относятся к мембранным белкам I типа [43, 181]. После закрепления на мембране клетки-мишени под действием мембранной протеазы происходит расщепление ПА на два пептида – ПА₂₀ и ПА₆₃, а затем олигомеризация ПА₆₃ с образованием гептамера, который последовательно связывается с ОФ или ЛФ. Образовавшийся комплекс [ПА₆₃]₇ с ЛФ или ОФ проникает в цитоплазму клетки посредством рецепторно-опосредованного эндоцитоза [113]. Этот процесс является решающим в развитии интоксикации. После этого ЛФ и ОФ начинают проявлять свое цитотоксическое действие. ПА, лишенный гидрофобного участка, ответственного за олигомеризацию, становится нетоксичным для макрофагов при комбинировании с ЛФ или ОФ. Это свойство используют при конструировании химических вакцин [232].

Рассматривая механизм действия на эукариотические клетки летального токсина, следует отметить, что после связывания с рецепторами на поверхности макрофагов ЛТ индуцирует поглощение клеткой кальция и нарушает внутриклеточный синтез макромолекул. Высокие концентрации летального токсина вызывают некроз макрофагов, тогда как небольшие количества ЛТ способствуют переходу клеток в апоптоз, благодаря изменению проницаемости клеточной мембраны, понижению значения митохондриального мембранного потенциала и фрагментации ДНК [114, 146, 250].

Летальный токсин блокирует хемотаксис нейтрофилов, активацию НАДФ·Н-оксидазы и продукцию супероксида – раннюю ответную реакцию на бактериальную инфекцию. При взаимодействии ПА с ЛФ макрофаги и полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ) продуцируют активные формы кислорода (АФК), что сопровождается повышением уровня перекисных соединений в фагоцитах [2, 199].

Действие отечного токсина проявляется в том, что он ингибирует окислительный «взрыв» фагоцитов и слияние его фагосом и лизосом, повышает уровень цАМФ в клетках (наиболее сильно в мононуклеарных фагоцитах и слабее в лимфоцитах) [118, 188]. В свою очередь, повышение внутриклеточного уровня цАМФ, приводит к токсическому эффекту, подавляет функции фагоцитов и по-

зволяет *B. anthracis* дольше выживать во внутренней среде макроорганизма [130, 197].

В низких концентрациях отечный токсин не вызывает подавление иммунитета. ОФ и цАМФ способны оказывать стимулирующее действие на лимфоциты, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных иммуноадьювантов, способных действовать как на клеточный, так и на гуморальный иммунитет [121, 200, 207, 241].

На основании данных литературы, известно, что ПА *B. anthracis* распознается рецепторами врожденного иммунитета, в частности, Toll-подобными рецепторами (TLR, Toll-like receptor) 2 и 6 типа. При образовании комплекса с ЛФ происходит изменение структуры ПА и, как следствие, невозможность его распознавания врожденной иммунной системой [115].

Кроме плазмидных детерминант, существуют хромосомные гены, продукты которых участвуют в осуществлении патогенетических механизмов заболевания или регулируют их [163, 166, 244, 246].

К дополнительным факторам патогенности относят белок, кодируемый геном *gerX*, необходимый для прорастания спор *in vivo*; связывающие железо ферритин-подобные белки и фосфолипазы; белки S-слоя; аутоиндуктор сигнальных молекул «чувства кворума»; транскрипционный фактор общего стресса уВ; аутолизин сибиреязвенного микроба; антролизин О (холестеринзависимый цитолизин); антализины (гемолизины) [117, 149, 168, 179].

В экстрактах вегетативных клеток *B. anthracis* обнаружены поверхностные видоспецифические белковые Аг – белок В и белок С (м. м. 30 кДа и 92 кДа соответственно), которые при введении лабораторным животным вызывают выработку в их организме антител (Аг) [7].

В конце 20-го века у возбудителя сибирской язвы обнаружен структурированный паракристаллический S-слой (от англ. surface – поверхность), непосредственно примыкающий снаружи к пептидогликановому слою, представленный белками EA1 (от англ. extractable antigens I – экстрагируемый антиген) и Sap (от англ. surface array protein – поверхностный белок) с м. м. 91 и 94 кДа соответственно,

различающиеся по аминокислотному составу. Синтез белков S-слоя детерминирован хромосомными генами *sap* и *eag* и зависит от AtxA и PagR регулонов, расположенных на плазмиде pXO1 [137, 139, 161, 210]. Другой клеточный Ag такого же типа – EA2 (м. м. 62 кДа) – изучен совсем слабо и обнаруживается только в штаммах, несущих плазмиду токсинообразования pXO1 [242].

Функциональная роль этих белков разнообразна: защита клетки от факторов внешней среды, фагоцитоза, регуляция процессов адгезии и проницаемости, участие в проявлении вирулентности и протективности [26, 50, 162, 229]. В макроорганизме синтезируется преимущественно белок EA1, продукция белка Sap более характерна для роста культуры *B. anthracis in vitro* [18, 212].

Sap – это бифункциональный белок, который одновременно является белком S-слоя и ДНК-связывающим белком – транскрипционным репрессором гена *eag*, т. е. экспрессия гена *eag* не иницируется до тех пор, пока продолжается экспрессия гена *sap*. Sap и EA1 последовательно присутствуют на клеточной поверхности, их обнаруживают одновременно на поверхности клетки только на промежуточной стадии, когда начинается синтез EA1. Постепенно EA1 замещает Sap, вследствие чего он выделяется в супернатант. Показано, что в аминокислотной части каждый белок содержит S-слоевые гомологичные области, которые взаимодействуют с клеточной оболочкой и доступны для фиксации гетерологичных антигенов на ее поверхности. Это позволяет создавать на основе этих белков диагностикумы и улучшать качества вакцинных штаммов [20, 101, 102, 209].

Н. И. Микшис с соавторами [34] установлено, что белки S-слоя штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ являются дополнительными факторами иммуногенности при главной роли протективного антигена. Отмечено увеличение индекса иммунитета при добавлении в иммунизирующий препарат, состоящий из ПА *B. anthracis* белка EA1 (в 16 раз, по сравнению с препаратом не содержащим белок EA1) [34].

Ранее было продемонстрировано, что иммуногенность белков S-слоя при двукратной иммунизации морских свинок в дозах 25 и 50 мкг была почти на три порядка ниже иммуногенности вакцинного штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂. Тем

не менее, даже в условиях отсутствия ПА сибиреязвенного микроба, белки Sap и EA1 обеспечивали некоторую защиту лабораторных животных. Соотношение индексов иммунитета Sap и EA1 в данном эксперименте свидетельствует о приоритете (на порядок выше) белка Sap [18].

Исследования зарубежных ученых показали, что выживаемость белых мышей при иммунизации рекомбинантным белком S-слоя (pEA1) составила 50 %, а при совместном применении с рекомбинантным ПА (pПА) – 80 %, при 0 % в контроле [233]. Другая группа ученых из Японии также исследовала протективное действие белка S-слоя EA1. Для этого мыши были иммунизированы внутриназально рекомбинантным EA1, с последующим заражением летальной дозой спор *B. anthracis*, комбинация pEA1 и ПА защищала 100 % всех животных. Показано, что иммунизация pEA1 могла бы способствовать защите в ранней фазе инфекции, то есть, перед массивным увеличением выработки токсина вегетативными клетками [224].

Зарубежные и отечественные ученые обратили внимание на способность S-слоя грамположительных микроорганизмов рода *Bacillus* образовывать кристаллический монослой при контакте с различными поверхностями. Образующая при этом высокопористая кристаллическая структура обладает размером пор, соответствующим размеру пор мембран для ультрафильтрации (диаметр 2 – 8 нм). Функциональные группы боковых цепей протеина на поверхности и в порах имеют строго упорядоченное расположение и ориентацию, что позволяет производить высокоточную направленную модификацию мембраны. Указанные физико-химические свойства белков S-слоя позволяют найти им применение в биотехнологии, молекулярной нанотехнологии, медицине, диагностике и т. п. [107, 234].

Менее всего к настоящему времени изучены споровые Аг *B. anthracis* [35, 49]. Споры *B. anthracis* покрыты неприкрепленным, шарообразным слоем – экзоспориумом, который является поверхностным Аг. Он состоит преимущественно из белков (50 %), липидов (15 %) и углеводов (23 %) [159].

Коллагеноподобный гликопротеин Vc1A, который показал себя иммунодоминантным Аг споровой поверхности *B. anthracis*, полностью покрывает внешний

слой экзоспориума [181, 183, 241]. По некоторым данным, белок Вs1А относится к белкам S-слоя. Показано, что он обладает адгезивными свойствами, является одним из факторов вирулентности, а также служит необходимым звеном в процессе фагоцитоза спор, путем механизма активации классического комплемента [112].

По данным D. D Williams с соавторами [248] белок S-слоя *B. anthracis* EA1 не является компонентом спор, но постоянно присутствует в препаратах спор в качестве контаминанта, который может удаляться при их отмывании [248]. Другие исследователи считают, что белок *B. anthracis* EA1 с молекулярной массой 91 кДа является компонентом поверхности спор и может использоваться как специфический молекулярный маркер для их обнаружения [194].

Основную роль в регуляции процесса выхода бактериальных клеток *B. anthracis* из макрофагов играет ген трансаktиватора синтеза токсина и капсулы *atxA* плазмиды pXO1, а плазида pXO2 в этом процессе участия не принимает. Эффективность преодоления фагосомального барьера сибиреязвенным микробом зависит не только от способности синтезировать токсин, но и от скорости его синтеза, т. е. от активности регулятора транскрипции AtxA [85, 151].

Согласно проведенным исследованиям, этап прорастания спор является первым шагом в проявлении патогенности сибиреязвенного микроба. Установлены рецепторы и герминанты прорастания спор. Показано, что при разных условиях окружающей среды активизируются различные пути прорастания [141].

Известно, что после внедрения возбудителя *B. anthracis* и его приживания в макроорганизме, независимо от локализации входных ворот возбудителя инфекции, распространение микробов и связанное с ним формирование морфологических изменений подчинено общим закономерностям. Лимфатическая система является основным путем продвижения бактерий в кровь. В восприимчивом организме сибиреязвенный микроб, размножаясь вначале в месте его проникновения, преодолевает системы защиты и проникает вглубь организма, вызывая септицемию [85, 142, 147, 150].

Исследования отечественных и зарубежных ученых направлены в основном на выяснение механизмов действия компонентов экзотоксина и мало уделяется

внимания другим факторам патогенности, например, протеолитическим ферментам и продуктам распада микробной клетки [17, 140, 227, 245]. Исследователи обращают внимание на то, что роль фагоцитоза в этом процессе неоднозначна [9, 85, 185].

Фагоцитоз является основным механизмом в борьбе с внутриклеточными патогенами, представляя комплекс клеточных реакций, направленных на распознавание, поглощение и элиминацию из организма корпускулярных частиц размером более 0,5 мкм. Неспецифические механизмы врожденного иммунитета представлены двумя системами клеток – системой мононуклеарных фагоцитов (СМФ) и системой полиморфноядерных лейкоцитов. Основная структурная единица СМФ – макрофаги. К этим клеткам относятся активированные циркулирующие в крови моноциты, гистиоциты соединительной ткани, купферовские клетки печени, легочные, плевральные и перитонеальные макрофаги (ПМ). Нейтрофильные гранулоциты относятся к самой многочисленной группе ПЯЛ [97].

ПЯЛ вовлечены в иммунный ответ как врожденного, так и приобретенного иммунитета. *B. anthracis* нейтрализует клеточный врожденный иммунитет посредством комбинированного действия двух токсинов – летального и отежного [207]. При этом известно, что фагоцитарная активность макрофагов сильнее угнетается ЛТ, чем ОТ [14, 154].

Процесс фагоцитоза завершается апоптозом нейтрофилов и удалением их макрофагами – это важный элемент защиты тканей и органов от повреждающего действия лизосомальных ферментов фагоцитов [97].

Показана роль апоптоза в иммунопатогенезе таких особо опасных инфекций, как чума и холера. Установлена возможность использования показателей изменения баланса процессов апоптоза и пролиферации для оценки степени повреждающего действия вакцин на организм [76].

В качестве отдельного этапа в фагоцитарном процессе выделяют представление макрофагами и зрелыми дендритными клетками антигенных детерминант Т- и В-лимфоцитам, что ведет к инициации адаптивного иммунитета [177]. Т-лимфоциты распознают процессированный и представленный на поверхности

антиген-представляющих клеток (АПК) Аг. Они отвечают за клеточный иммунитет, иммунные реакции клеточного типа. Отдельные субпопуляции помогают В-лимфоцитам реагировать на Т-зависимые Аг выработкой Ат. При дифференцировке Т-лимфоциты приобретают определенный набор мембранных CD-маркеров. Т-клетки разделяют на субпопуляции в соответствии с их функцией и профилем CD-маркеров [60].

Споровые и поверхностные белки S-слоя *B. anthracis*, являются иммунодоминантными антигенами при сибиреязвенной болезни, способствуют активации В-лимфоцитов и синтезу специфических антител, необходимых для развития полноценного протективного иммунитета [127, 201, 203, 205].

В начале 21-го века была открыта еще одна функция нейтрофилов [24]. Стало известно, что гранулоциты в ответ на микробные и немикробные стимулы активно выбрасывают во внеклеточное пространство сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps, NETs), способные захватывать и убивать микроорганизмы [23, 131, 216, 218]. Эта кислородзависимая клеточная гибель была названа термином «NETosis» [238, 247].

Образование NETs может происходить при контакте гранулоцитов с очищенными Аг патогенных бактерий. Однако взаимодействие нейтрофилов с различными живыми микроорганизмами оказывает более выраженный эффект на процесс образования NETs. Анализ литературы свидетельствует, что NETs формируют активированные нейтрофилы крови, как человека, так и различных видов животных. Запускать этот процесс могут различные провоспалительные стимулы, включая перекись водорода, бактериальный липополисахарид, хемокин ИЛ-8 и т. д. [39]. Время, необходимое для формирования NETs, составляет в зависимости от стимула от 10 мин до 4 ч [247].

ПЯЛ уничтожают патогенные микроорганизмов с помощью фагоцитоза и NETs, а также выполняют функцию регуляции иммунного ответа макроорганизма путем модуляции экспрессии клеточных рецепторов и активности провоспалительных цитокинов [38].

Важнейшим компонентом нейтрофильных ловушек считается лейкоцитарная эластаза (ЛЭ) и катионные белки (КБ), которые и определяют способность данных структур к эффективному уничтожению патогенных бактерий [23, 196, 247]. КБ относят к неферментным системам, они играют важную роль в реализации фагоцитарной функции клеток, не вызывают привыкание к себе микроорганизмов, увеличивают проницаемость клеточных мембран и сосудистой стенки. Кроме ЛЭ и КБ, в состав NETs входят: миелопероксидаза (МПО), катепсин G, желатиназа, гистоны, гуморальный паттернраспознающий рецептор пентраксин 3 и белки, распознающие пептидогликан [247].

Острофазные белки (ОБ) выполняют функции медиаторов иммунной системы. ОБ непосредственно участвуют в реакциях, направленных на удаление повреждающего фактора, локализацию очага повреждения и восстановление нарушенной структуры и функции. Острофазный ответ длится до 7 – 10 дней. Как правило, концентрация ОБ увеличивается в течение 24 – 48 ч. При нарушении механизмов регуляции ОБ повреждение тканей может продолжаться и привести к развитию осложнений.

Миелопероксидаза является одним из острофазных белков. МПО присутствует в азурофильных гранулах ПЯЛ. Это важный фермент, используемый в процессе лизиса захваченных путем фагоцитоза посторонних частиц. МПО быстро высвобождается активированными ПЯЛ. Это соединение играет важную роль при различных заболеваниях. При тяжелых инфекционных заболеваниях возникает дефицит МПО и это может служить ранним маркером системного воспаления [4].

Патогены, вызывающие особо опасные инфекционные заболевания обладают факторами, препятствующими их уничтожению NETs, что способствует выживанию микробов в макроорганизме [36, 208, 226].

Показано, что NO играет важную роль в проявлении цитопатического действия сибиреязвенного токсина и выживаемости клеток *B. anthracis* в макрофагах [120]. Вероятно, способность сибиреязвенного микроба вырабатывать собственные молекулы NO является одним из факторов вирулентности и служит для защиты микроба от действия H₂O₂.

Проведено исследование, определившее значение фермента каталазы в патогенезе сибиреязвенной инфекции. Установлено, что существует 5 изоформ каталазы, но, ни одна из них не изучена. Результаты опытов показали, что каталаза обладает способностью противостоять АФК, которые вырабатывает макроорганизм и тем самым обеспечивает выживание микроорганизма [157].

Эффективность улавливания и обезвреживания патогенов во внеклеточных ловушках выше, чем при фагоцитозе, и предполагают, что механизм внеклеточной бактерицидности играет важную роль в защите организма от бактерий, обладающих устойчивостью к лейкоцитарному фагоцитозу [23, 175, 211, 247]. На современном этапе развития науки наблюдается тенденция к переходу от изучения внутриклеточных, к исследованию еще недостаточно изученных внеклеточных механизмов бактерицидности [39].

Таким образом, результаты изучения процессов иммуногенеза под влиянием возбудителя сибирской язвы и его антигенов, позволяют понять роль отдельных Аг в иммуногенезе *B. anthracis*, а это, в свою очередь, позволит создать новые методы и средства профилактики и лечения сибирской язвы.

1.2 Сибиреязвенные вакцины и перспективы их совершенствования

Многочисленные исследования убедительно показали, что вирулентность возбудителя сибирской язвы, утратившего способность образовывать капсулу, снижается в несколько раз, хотя его способность вызывать иммунитет сохраняется. Это послужило основой для разработки в конце 1930-х – начале 1940-х гг. живых споровых вакцин на основе штаммов, не имеющих капсулы, но вырабатывающих экзотоксин [5].

Исследования по получению вакцин против сибирской язвы условно можно разделить на 4 периода: 1) выделение ослабленных капсулообразующих штаммов сибиреязвенного микроба (аттенуация); 2) селекция бескапсульных штаммов *B. anthracis*; 3) выделение отдельных защитных (протективных) антигенов возбудителя сибирской язвы и создание на их основе химических вакцин; 4) изучение генетических основ иммуногенности *B. anthracis* и получение генетическими ме-

тодами безопасных и иммунологически эффективных вакцин.

В настоящее время для иммунизации людей разработаны сибиреязвенные вакцины 4 типов: живые, химические (молекулярные), комбинированные и рекомбинантные [71, 83].

Более напряженный иммунитет обеспечивает живая сибиреязвенная вакцина. В России для профилактики сибирской язвы у людей используется живая сухая вакцина (ФКГУ «33-й ЦНИИ МО РФ» г. Киров) на основе штамма *B. anthracis* СТИ-1 для подкожного, скарификационного и аэрозольного применения [9].

В 1962 г, а затем и в 1970 г была применена комбинированная схема иммунизации, которая включала введение препарата ПА совместно с живой вакциной. По сравнению с монопрепаратами эта вакцина обеспечивала более высокие значения индексов иммунитета и не вызывала развития патологических процессов в организме экспериментальных животных, а также позволила снизить дозировку используемых компонентов [83].

В России в 1998 г. разработана единая сухая комбинированная вакцина Унивак (центр ВТП БЗ МО РФ г. Екатеринбург), представляющая собой комбинацию бесклеточного препарата ПА, адсорбированного на гидроокиси алюминия и спор штамма *B. anthracis* СТИ-1 и живая антибиотикоустойчивая сибиреязвенная вакцина СТИ-ПР (ГНЦ прикладной микробиологии г. Оболенск) для подкожного применения. Эта вакцина обеспечивала защиту от инфицирования возбудителем сибирской язвы в 90 – 100 % случаев, в том числе и при сочетанном ее применении с антибиотиками. По данным авторов, комбинированная вакцина в равнозначных дозах обеспечивает формирование более напряженного иммунитета по сравнению с живой и субклеточными вакцинами при однократном введении [89, 103].

В настоящее время химическая и комбинированная вакцины в России не выпускаются.

Живую сибиреязвенную вакцину используют для иммунизации населения, подвергающегося риску заражения возбудителем сибирской язвы в странах СНГ и

Китае. В большинстве других стран иммунопрофилактику сибирской язвы у людей осуществляют химическими вакцинами, изготовленными в США или Великобритании [9, 83].

В Великобритании и США используются химические вакцины, разработанные в 1950 и 1960 гг. соответственно. Британская вакцина AVP (anthrax vaccine precipitate, Porton Down, Salisbury, Wiltshire) получена из штамма Sterne 34F₂; американская вакцина AVA (anthrax vaccine adsorbed, «BioPort Corporation» BioThrax®) – из штамма *B. anthracis* V770. AVA содержит очень незначительные количества ОФ и ЛФ, и большие количества протективного антигена (приблизительно 35 % от общего белка), в то время как AVP содержит сравнительно более низкие уровни ПА и более высокие количества дополнительных антигенов *B. anthracis* [83, 155, 209, 230, 235]. Британские исследователи считают, что специфическая резистентность при иммунизации этой вакциной определяется главным образом ПА, ЛФ и белками S-слоя [125].

Протективный антиген является главным компонентом в составе всех химических и комбинированных вакцин, которые используются для иммунизации людей против сибирской язвы. Для его выделения, концентрирования и очистки разработаны методы, позволяющие получать этот антиген в больших количествах [71, 83, 111, 183, 224].

Применяемая в России живая сибиреязвенная вакцина, несмотря на свою эффективность, обладает остаточной вирулентностью и реактогенностью. В 50 % случаев отмечались реакции средней и легкой степени тяжести, что связано с действием на организм токсичных продуктов жизнедеятельности вакцинных штаммов.

Химические вакцины менее реактогенны, однако, в США у 30 % вакцинированных людей после 5-й инъекции препарата наблюдали местные поствакцинальные реакции (аллергия, некротические явления) на введение вакцины. Химическая вакцина обеспечивает развитие иммунитета в более ранние сроки (14 сут), чем живая споровая (до одного мес) [138, 239].

Основным недостатком сибиреязвенных субклеточных вакцин является

кратковременность вызываемого ими иммунитета, с чем связана необходимость многократного введения иммунопрепарата – пятикратная первичная вакцинация (в течение 18 месяцев) для американской вакцины AVA, четырехкратная первичная вакцинация для британской вакцины AVP, ревакцинации проводятся ежегодно однократно [9, 103].

С помощью рекомбинантных технологий возможно создание продуцентов ПА, лишенных генов, детерминирующих синтез основных факторов патогенности возбудителя сибирской язвы. С позиции биологической безопасности в производстве химических вакцин предпочтительнее использовать бактериальные штаммы не образующие спор [82].

Сегодня все больше исследователей сходятся во мнении, что в полноценной химической вакцине наряду с антигенами сибиреязвенного токсина должны присутствовать Ag, индуцирующие выработку в макроорганизме антиспорового, антикапсульного и антитоксического иммунитета [51, 144], однако немногие белки спор и вегетативных клеток являются иммуногенными.

Изучение белков S-слоя проводится в направлении получения высокоочищенных препаратов и подбора штаммов-продуцентов белков S-слоя [6, 18, 19, 26, 50]. Установлено, что моноплазмидные бескапсульные Spo⁻ варианты сибиреязвенных штаммов могут быть использованы как экологичные и безопасные продуценты сибиреязвенных Ag, бесплазмидные – в качестве основ для их генетического конструирования. Сконструирован аспорогенный моноплазмидный (pXO1⁺pXO2⁻) вакцинный штамм 55 ВНИИВВиМ с пониженной протеолитической активностью (KM-92) и аналогичный по свойствам штамм Sterne 34F₂ (KM-89) – продуцент белков S-слоя. В дальнейшем был сконструирован рекомбинантный штамм *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) (KM-97) продуцент ПА, проведена оценка иммуногенности и безопасности препарата ПА [50, 68, 72, 89].

В первом десятилетии 21-го века были разработаны следующие препараты:

1) сибиреязвенная вакцина DAAV, полученная конъюгацией капсульного полипептида D-глутаминовой кислоты (PGA) с ПА, которая дает одновременную защиту против спор и токсинов *B. anthracis* [111];

2) моно- и бивалентные ДНК-вакцины, детерминирующие синтез детоксицированных белков *B. anthracis*: ПА, ЛФ и одновременно двух этих белков прошли стадию доклинических испытаний. Двукратная иммунизация этой вакциной давала 100 % защиту лабораторных животных от заражения вирулентным штаммом *B. anthracis* [109, 132].

3) рекомбинантная химическая вакцина с адьювантом из смеси липида монофосфорила, сквалена, твина-80 и лецитина на основе рекомбинантного ПА. Вакцина создана из аспорогенного некапсулообразующего и не синтезирующего ЛФ и ОФ вакцинного штамма *B. anthracis* Delta-Sterne-1 (рПА102). По эффективности не превосходит АВА, но, в отличие от последней, не проявляет токсичных и реактогенных свойств [183];

4) сконструирован прототип субъединичной вакцины, состоящей из домена 4 ПА, домена 1 ЛФ и термостабильного фермента *Clostridium thermocellum*, синтезированных генно-инженерным продуцентом на основе трансгенного растения [184];

5) вакцинный препарат, состоящий из рПА, адьюванта и инактивированных формальдегидом спор [155, 249].

Среди способов повышения иммуногенности вакцин выделяют такие методы как: использование оптимальной концентрации антигена; очистка вакцин от низкомолекулярных веществ; включение в вакцину максимального количества эпитопов антигена; сорбция на веществах, создающих депо антигена; использование липосом; использование природных и искусственных адьювантов; связывание слабого антигена с носителем белковой природы [48].

Также перспективными являются следующие разработки:

1) использование растений в качестве продуцентов ПА путем интеграции гена *pagA* в геном хлоропласта [222];

2) использование нетоксичного мутанта ЛФ и функционального фрагмента протективного антигена (ПА₆₃) *B. anthracis* в качестве компонента мукозальных вакцин [251];

3) иммунизация плазмидными векторами в сочетании с ПА и ЛФ (ОФ) или с

усеченной N-терминальной областью [217];

4) создание рекомбинантных аденовирусных векторов, которые содержат синтетические гены, производные *pagA* или *lef* [167];

5) иммунизация комбинацией ПА – ДНК, кодирующей синтез белка Bc1A [173];

6) создание комбинированной вакцины, включающей белковые Аг *Yersinia pestis* (капсульный антиген фракции 1, V-антиген) и ПА *B. anthracis* [224];

7) накожная безыгольная иммунизация рПА с термолабильным токсином *Escherichia coli*, а также интраназальное применение рПА совместно с токсином *Vibrio cholerae* (токсин исполняет роль адьюванта-иммуномодулятора) эффективна против легочной формы сибирской язвы [153, 186];

8) усиление иммуногенности химических вакцин при помощи новых Аг (белков S-слоя, адгезинов, гидролаз и белков, транспортирующих аминокислоты и олигопептиды), содержащихся в экстрактах дезинтегрированных клеток *B. anthracis* [7, 70, 191];

9) создание химической вакцины путем инкапсулирования рПА в поли-L-лактидные микросферы [214];

10) разработка синтетических адьювантов для интраназального введения вакцины, создание адьюванта на основе нетоксичной водно-масляной наноэмульсии [213];

11) поиск эффективных и безвредных адьювантов, воздействующих на рецепторы врожденного иммунитета, усиливающих действие ПА [12, 51, 72, 191].

12) применение методов пассивной иммунизации с использованием поликлональных и моноклональных Ат против компонентов токсина *B. anthracis* [102].

Приоритетным направлением исследований является разработка конъюгированных вакцин, индуцирующих быстрый иммунный ответ и одновременно дающих лечебное действие. Сроки формирования напряженного иммунитета возможно ускорить за счет использования вирусных живых или рекомбинантных векторов, ДНК-векторов, конструирования токсидных вакцин (сочетание обезвреженного ПА с ЛФ и ПА с ОФ) с введением в них антибактериальных капсуль-

ных антигенов и иммуномодулирующих олигонуклеотидных компонентов [52, 84].

С помощью генно-инженерных методов получен дефектный ПА. Введение экспериментальным животным такого антигена предотвращает развитие болезни из-за нарушения встраивания собственного ПА *B. anthracis* в мембрану клетки-мишени [110].

Показано, что *B. anthracis* производит множество внеклеточных протеаз, которые воздействуют на целостность и продукцию компонентов токсина и антролизин О в секретоме *B. anthracis*. Создан рекомбинантный штамм, лишенный генов протеаз, в качестве продуцента ОФ [108].

На модели резус-макак проведена сравнительная характеристика действия вакцины AVA и метода на основе электропорации ДНК, кодирующей ПА. Сделан вывод, что метод электропорации обеспечивает защиту, сравнимую с защитой, наблюдаемой после вакцинации AVA [156].

Разработаны разные способы введения сибирязвенной вакцины: аэрогенный (с помощью безыгольного инъектора или распылителя), скарификационный (скарификационной иглой) и подкожный (шприцом). В исследованиях было установлено, что вакцина СТИ, введенная безыгольным инъектором, защищала не менее 53,7 % людей, а введенная скарификационно – не менее 36,7 % привитых.

Иммунологическую оценку эффективности различных методов вакцинации проводили путем постановки внутрикожной пробы с сибирязвенным аллергеном – антраксином. Аэрозольная вакцинация давала почти во все сроки иммуноаллергические показатели выше, чем подкожная, а последняя – выше накожного способа иммунизации, что указывает на быструю активацию гуморального иммунитета. Такой способ вакцинации имеет ряд преимуществ перед накожным и подкожным методами из-за простоты применения, сокращения сроков иммунизации и количества одномоментного охвата людей, особенно когда ставится задача проведения массовой иммунизации за короткий срок [83]. В США проводятся активные исследования по применению аэрозольной вакцинации безыгольным инъектором, так называемая вакцинация через слизистые оболочки (мукозальная вакцина)

[251, 253].

Накопленные данные не дают пока вполне определенного ответа на вопрос об эффективности химических вакцин. И если в США химические вакцины рекомендованы для применения с целью иммунопрофилактики сибирской язвы, то в нашей стране они не нашли широкого применения, а работы по их конструированию остаются лишь на уровне экспериментальных. Очевидно, что необходимы дальнейшие исследования, направленные на повышение протективной активности сибиреязвенных химических вакцин.

Эффективность химических вакцин в значительной степени зависит от выбора для их конструирования иммуномодуляторов и адъювантов. Экспериментально доказана возможность повысить эффективность живых сибиреязвенных вакцин, если вторичную иммунизацию проводить препаратами, которые содержат ПА, а также иммуномодуляторы [73].

Иммуномодуляторы – лекарственные средства, обладающие иммуотропной активностью, которые в терапевтических дозах восстанавливают функции иммунной системы. Это препараты микробного или природного происхождения (полисахариды растительного и животного происхождения и т. д.); природные и рекомбинантные цитокины, препараты на их основе (гаммаферон, кипферон, реаферон и т. д.); синтетические препараты: левамизол, полиоксидоний и т. д. [83].

Особенностью иммуностимуляторов является их способность усиливать иммунный ответ на введение препарата. Адъюванты (неспецифические иммуностимуляторы) – вещества, или комплекс веществ, применяемые для усиления иммунного ответа при введении одновременно с иммуногеном, применяются для усиления конкретного иммунного ответа (например, при вакцинации) чаще всего в здоровом организме [98]. Действие адъювантов направлено на изменение свойств Аг или на стимуляцию функций иммунной системы организма (активирование ИКК, усиление их пролиферации и дифференцировки). Основное свойство большинства адъювантов – их способность депонировать антиген, то есть адсорбировать его на своей поверхности и длительное время сохранять в организме, что увеличивает продолжительность его влияния на иммунную систему. Сущест-

венным достоинством современных адъювантов является их хорошая растворимость в воде.

Широкое распространение в комплексе с вакцинами, предназначенными для людей, получило очень небольшое количество соединений, в том числе соли алюминия и водомасляная эмульсия MF59. Гидроксид и метафосфат алюминия является самым распространенным вакцинным иммуноадъювантом и, хотя его безопасность подтверждена многими исследованиями [9, 223], споры о токсичности этих соединений не утихают до сих пор [92].

Известно, что все нуклеиновые кислоты обладают иммуномодулирующим действием [41, 99, 202, 206, 215, 236]. К настоящему времени, проведены исследования, в которых использовали полицитидиловую (поли-І:С) кислоту совместно с мукозальной сибиреязвенной вакциной в различных комбинациях [236]. Показана перспективность использования поли-І:С кислоты совместно с рПА и ЛТ в качестве адъюванта.

Наиболее сильные адъюванты содержат в своем составе микроорганизмы ослабленных штаммов или какие-либо субстанции, извлеченные из них. Эти компоненты являются стимуляторами клеток врожденного иммунитета [64].

В настоящее время разработано несколько экспериментальных средств, значительно повышающих эффективность вакцин. К таким препаратам относятся иммуностимулирующие олигонуклеотиды CpG, синтетические аналоги монофосфориллипида А и малые молекулы имидазохинолиновых соединений. Было доказано, что неметилированные CpG динуклеотиды бактериальной ДНК, а также синтетические CpG–ОДН (олигодезоксинуклеотиды) активизируют системы врожденного иммунитета, обладают способностью повышать уровень иммунного ответа (посредством TLR9s) даже на низкоиммуногенные Ag, не имеет выраженной токсичности [124, 193]. Отмечено формирование быстрого антиген-специфического иммунного ответа при совместном применении CpG–ОДН с сибиреязвенной вакциной (максимальный титр Ат был достигнут на 22 сутки (контроль – 48 день после инъекции). Кроме того, добавление CpG адъюванта индуцировало статистически значимое увеличение пика титра Ат к *B. anthracis* почти в

9 раз, а также увеличило долю субъектов (здоровые добровольцы), которые достигли сильного IgG иммунного ответа к сибиреязвенному ПА с 61 % до 100 % [204].

Последние десятилетия исследователи уделяют большое внимание роли нейрогормональной системы в регуляции иммунных и развитии патологических процессов. Обсуждается возможность влияния на иммунные реакции с помощью нейротропных средств и экзогенных нейромедиаторов [106]. При этом наибольший интерес вызывают прокариотические сигнальные молекулы [134, 174].

Избавиться от недостатков живых вакцин возможно также и при помощи создания искусственных наноструктур, содержащих только необходимые для формирования иммунитета антигены, с помощью нанотехнологического принципа самосборки. Технология предусматривает сборку белковых молекул на матрице из природного полисахаридного каркаса [32]. Указанный способ самосборки молекул позволит получить практически безопасные, нетоксичные, биологически совместимые, биodeградируемые поливалентные вакцины. В НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи разработаны экспериментальные серии таких вакцин (нановакцин) против возбудителей бруцеллеза, туляремии и лептоспироза [9].

Основными направлениями государственной политики в области иммунопрофилактики является: разработка препаратов для перорального применения вместо парентеральных вакцин; разработка схем и методов неинвазивного введения вакцин, а также разработка критериев безопасности применения медицинских иммунобиологических профилактических препаратов [48].

Нанотехнологии и наноматериалы открывают новые подходы к созданию профилактических препаратов. Например, наночастицы коллоидных металлов обладают выраженными адьювантными свойствами, и их введение в состав композиции вакцин обеспечивает выработку антител в высоких титрах даже на малые неиммуногенные молекулы [3, 213]. Наночастицы нашли применение в качестве средств доставки антигенов особо опасных патогенов и ДНК-вакцин [126]. Иммуобилизация компонентов вакцин на наногранулах ведет к повышению иммуногенности и стабильности вакцин. Целенаправленная доставка лекарственных средств

в клетки-мишени с помощью наноструктур ведет к уменьшению концентрации вводимых препаратов, снижению их побочного и токсического действия [3]. Эффективность использования наноматериалов в качестве средств доставки лекарств продемонстрирована на модели возбудителя бруцеллеза [195].

Для усиления иммунного ответа у экспериментальных животных на различные антигены использовали такие водорастворимые адъюванты как полиакриловая кислота, декстран-сульфат, поли-4-винилпиридин и другие ионогенные производные полиоснований [64]. В последние годы стал доступен для исследований и практического использования новый класс полимеров – поливинилазолы (ПВ), обладающие в зависимости от различных сомономерных фрагментов управляемым комплексом ценных свойств. Известно, что ПВ проявляют антибактериальную, фунгицидную и иммуномодулирующую активность, которая выражается повышением показателей клеточного иммунитета [135, 192].

В Иркутском институте химии им. А. Е. Фаворского СО РАН разработаны трансмембранные наноконпозиты [42, 62, 63, 67], где в качестве мембранотранспортной матрицы использован синтетический полимер поли-1-винил-1,2,4-триазол (ПВТ), природные полимеры – арабиногалактан и галактоманнан в качестве универсального антимикробного агента – инкапсулированные в эту полимерную матрицу наночастицы серебра (Рисунок 1).

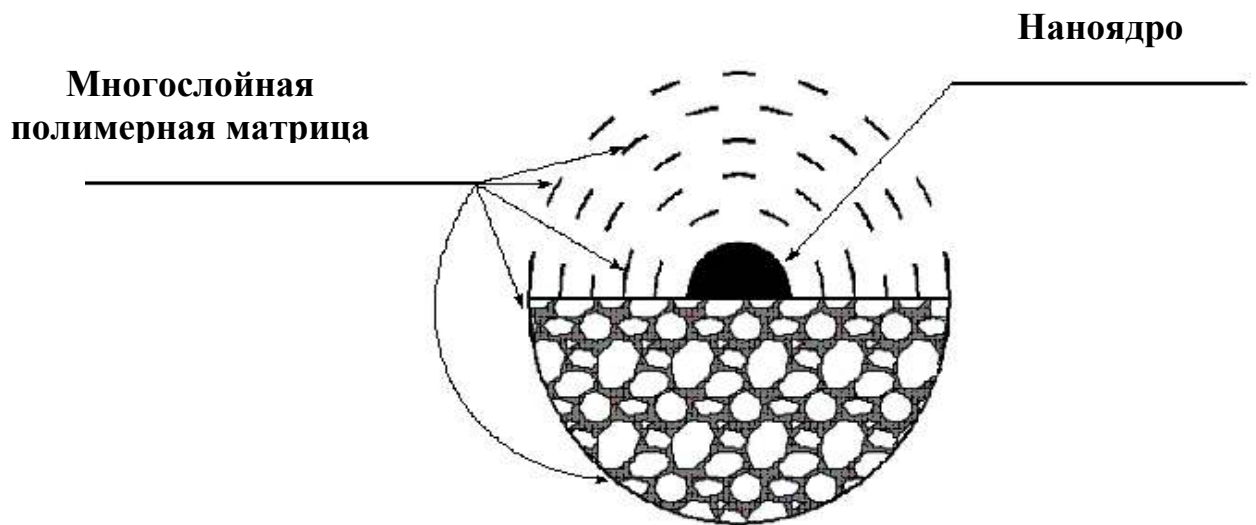


Рисунок 1 – Схема структуры нанобикомпозита

Полимерный носитель арабиногалактан (м. м. 13-14 кДа, ЛД₅₀ > 5000 мг/кг) полисахарид из клеточных стенок древесины лиственницы сибирской (*Larix occidentalis*), не требует предварительной очистки от высокомолекулярных фракций; позволяет ввести в структуру АГ биологически активные металлы (золото, серебро, кобальт, железо, никель); металлосодержащие препараты АГ сохраняют структурную организацию, водорастворимость и мембранотропность природного полисахарида [21, 91]. При использовании АГ в качестве иммуномодулятора в условиях эксперимента удалось повысить протективную эффективность конъюгата белковых препаратов и клеточных стенок *B. anthracis*, химически связанных дигидратом адипиновой кислоты (ДАК-конъюгата). Подобный эффект получен и при испытании этого комплекса в сочетании со скваленом [37].

Известно, что кобальт является жизненно важным элементом в организме, стимулирует кроветворение, способствует усвоению железа, нормализует эритропоэтическую способность, активирует работу некоторых ферментов [11].

Галактоманнан – природный галактозосодержащий полисахарид марки LBG «СР Celko», Дания (м. м. 2440 кДа), также обладает хорошей водорастворимостью иммуномодулирующей, мембранотропной, влагоудерживающей и гелеобразующей способностью [10, 11].

Поли-1-винил-1,2,4-триазол (м. м. 26 кДа) является водорастворимым биосовместимым (ЛД₅₀ > 3000 мг/кг) синтетическим азотсодержащим гетероциклическим полимером, обладающим химической стойкостью, термической стабильностью, проявляющим высокую способность стабилизировать частицы серебра в нульвалентном наноразмерном состоянии [67].

Установлено, что механизм биологического ответа организма на введение наночастиц серебра находится в зависимости от дозы, формы и размера частиц, а также способа экспонирования. Так, нанокомпозит 2-Н-Ag-ПВТ в дозе 100 мкг/кг (в перерасчете на содержание Ag) при пероральном введении препарата в течение 9 дней, вызывает незначительные изменения в структуре тканей внутренних органов экспериментальных животных и биохимические сдвиги характерные для развития компенсаторно-приспособительных реакций [8]. Ag-АГ, взятый в экспери-

менте в той же дозе при аналогичном способе введения, вызывал структурные и функциональные изменения в ткани головного мозга. Увеличение экспрессии проапоптотического белка каспаза 3 в нейронах головного мозга свидетельствовало о готовности клеток к программируемой смерти по типу апоптоза [61].

Исследования препарата «Арговит», содержащего наночастицы серебра, стабилизированные полимером поливинилпирролидоном, в дозе 0,1 мг/кг показали, что при подкожном введении белым мышам препарат вызывает изменение субпопуляционного состава лимфоцитов, увеличивает количество ИНФ- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке, а также повышает содержание ИНФ- γ в сыворотке крови мышей. Ингаляционное и внутривенное введение наночастиц серебра не оказывало токсического эффекта на клетки и органы иммунной системы и не влияло на популяции клеток в лимфоидных органах подопытных животных [61].

Таким образом, несмотря на значительные достижения в изучении иммуногенеза сибирской язвы и факторов вирулентности *B. anthracis*, участие белков S-слоя *B. anthracis* при формировании резистентности организма к сибиреязвенной инфекции остается не до конца изученным. С учетом сведений из литературы о проявлении вирулентных и протективных свойств белков S-слоя, можно предположить, что поверхностные белки играют определенную роль в стратегии выживания сибиреязвенного микроба в макроорганизме.

В связи с этим, комплексные исследования различных проявлений реактивности фагоцитирующих клеток, изучение динамики субпопуляционного состава клеток крови, экспрессии активационных маркеров на поверхности лимфоцитов, а также одного из ключевых факторов подавления иммунного ответа – апоптоза клеток иммунофагоцитарной системы под действием поверхностных белков *B. anthracis* позволит получить новые данные об особенностях их взаимодействия, что может явиться ключом к пониманию патогенеза, иммуногенеза и экспериментальному обоснованию факторов, обеспечивающих резистентность организма к возбудителю сибирской язвы.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Экспериментальные животные

Экспериментальными моделями в основных опытах (заражение, иммунизация, отбор проб крови, получение фагоцитов и т.д.) служили морские свинки (массой 250 – 300 г) и беспородные белые мыши (18 – 20 г). Всего в опытах использовано 866 животных: 346 морских свинок, 520 белых мышей. В работе использовались здоровые животные, полученные из питомника ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (РД 42-26-3...3738, НПО «Вектор», Новосибирск). Биомоделей содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды, в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях.

Работа проводилась в соответствии с Приказом МЗ СССР № 755 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (1977) и Приложением к Приказу № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (2003), СП 1.3.1285-03, «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях» (2010), Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях (Страсбург, 1986).

Количество животных для опыта подбирали с учетом получения статистически достоверных результатов. Для каждого срока наблюдения во всех сериях эксперимента материал брали от 6 – 12 морских свинок или белых мышей.

Токсичность экспериментальных образцов антигенных препаратов и наноконструкций определяли на 150 белых мышях и 28 морских свинках.

В эксперименте по изучению влияния антигенных препаратов *B. anthracis* Sterne 34F₂ и металлосодержащих нанокомпозитов на бактерицидные механизмы фагоцитов экспериментального животного было использовано 258 стандартных по условиям содержания и массе морских свинок и 120 беспородных белых мышей (5 серий опытов).

Экспериментальные исследования по изучению функциональной способности клеток крови при взаимодействии с антигенным препаратом S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с кобальтарабиногалактаном с помощью точной цитофлуориметрии проводили на 250 белых мышах.

Эксперименты проводили в двух повторах. В качестве контроля использовали клетки интактных животных.

2.2 Штаммы бактерий

В работе использовали вакцинные (pXO1⁺/pXO2⁻) штаммы *B. anthracis* СТИ-1 (ГИСК им. Л. А. Тарасевича), *B. anthracis* Sterne 34F₂ (ЛД₅₀ для белых мышей – $5 \cdot 10^8$ спор).

Штаммы, до включения в опыты хранились в лиофилизированном состоянии в музее живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института, обладали характерными для представителей соответствующего вида культурально-морфологическими и биологическими свойствами.

2.3 Питательные среды

Для культивирования сибиреязвенного микроба использовали агары Хоттингера с дрожжевым гидролизатом (рН $7,2 \pm 0,1$) и казеиново-дрожжевой (рН $7,2 \pm 0,1$) производства Иркутского научно-исследовательского противочумного института.

При решении некоторых специальных задач в качестве питательных сред применяли жидкую синтетическую среду 199 (Екатеринбургское предприятие по производству бактериальных препаратов), среды Хенкса (Московский завод бактериальных препаратов) и Дифко (Detroit Michigan, США).

2.4 Характеристика антигенных препаратов *B. anthracis* Sterne 34F₂

Объектом исследования служили антигенные препараты S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, полученные сотрудниками отдела зоонозных инфекций совместно с сотрудниками лаборатории патофизиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, по методике И. А. Барковой [6] в собственной модификации. Оценка физико-химических свойств этих антигенных препаратов осуществлялась сотрудниками биохимического отдела института.

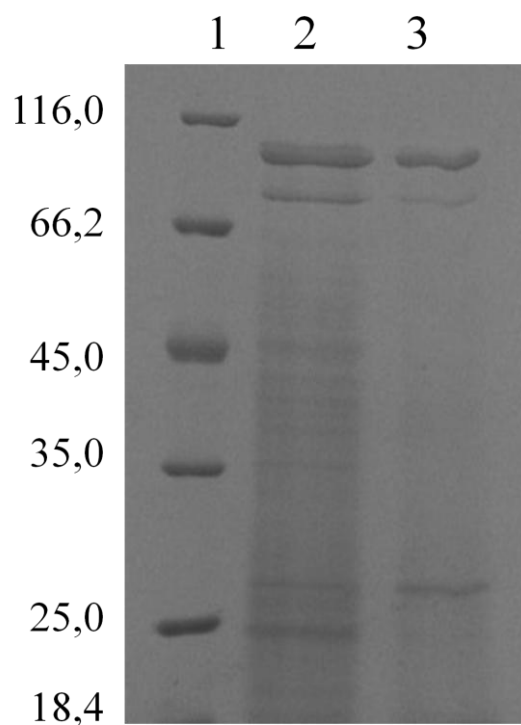
Антигенные препараты S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ были получены аналогичным способом, но отличались по методике обеззараживания бактериальной массы. С целью обеззараживания в полученную микробную суспензию вносили бензилпенициллина натриевую соль 1000 единиц/мл (антигенный препарат S-1) или мертиолят натрия 0,1 мг/мл (антигенный препарат S-2).

Электрофоретический анализ показал характерную для антигенных препаратов гетерогенность, проявляющуюся множественностью полос в виде «лестницы» при окраске геля ионами серебра.

Антигенный препарат S-1 *B. anthracis* Sterne 34F₂ содержал полипептиды с молекулярной массой от 16 до 65 кДа. Полипептиды с большой молекулярной массой, соответствующей массе ПА и белков S-слоя сибиреязвенного микроба (порядка 83 и 91 – 100 кДа), в нем отсутствовали. В антигенном препарате S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ определен белковый спектр (Рисунок 2), характерный для препаратов сибиреязвенного микроба, включающий потенциально иммуногенные полипептиды 91 кДа. Содержание белка, нуклеиновых кислот, углеводов в исследуемых препаратах S-1 и S-2 колебалось в пределах 40 – 60 %; 5 – 8 %; 10 – 16 % соответственно.

В реакции иммунодиффузии препарат S-1 не реагировал с иммуноглобулином к белку С (ЕА1), подтверждая данные электрофореза об отсутствии в антигенном препарате протеинов S-слоя. Препарат также не взаимодействовал с моноклональными антителами к ПА (Государственный научный центр прикладной

микробиологии и биотехнологии, Оболенск). В отличие от антигенного препарата S-1, препарат S-2 образовывал полосу преципитации в реакции иммунодиффузии с иммуноглобулинами к белку С (идентичному белку S-слоя EA1).



1 – маркеры фирмы «Bio-Rad» (м. м. 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0 18,4 кДа); 2-
3 – антигенный препарат S-2, разной степени очистки

Рисунок 2 – SDS электрофорез антигенного препарата S-2 штамма
B. anthracis Sterne 34 F₂

Выделенные из микробной массы антигенные препараты S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ после лиофилизации сохраняли хорошую растворимость, что необходимо для проведения экспериментов по изучению их иммунобиологических свойств.

Токсичность полученных антигенных препаратов сибиреязвенного микроба определяли на белых мышах при однократном подкожном введении в иммунизирующих дозах от 0,05 до 0,4 мг/кг по белку. Учет результатов проводили в течение 7 сут после инъекции.

2.5 Характеристика экспериментальных образцов нанокompозитов

В экспериментальных исследованиях тестируемыми образцами служили нанокompозиты (Таблица 1), синтезированные в ФГБУН Иркутском институте химии им. А. Е. Фаворского СО РАН [63, 67, 81].

Таблица 1 – Характеристика экспериментальных образцов нанокompозитов

Нанокompозит	Стабилизирующая матрица	Содержание металла, %	Размер наночастиц металла, нм
Co-АГ	Арабиногалактан	1,0	8–9
Ag-ГМ	Галактоманнан	4,0	8,6
2-Н-Ag-ПВТ	Поли-1-винил-1,2,4-триазол	1,7	2–10

Содержание кобальта или серебра в 1 мг нанокompозитного комплекса составляет: Co-АГ – 10 мкг, Ag-ГМ – 40 мкг, 2-Н-Ag-ПВТ – 17 мкг.

Нанобиокompозитные комплексы созданы на основе галактозосодержащих полисахаридов природного происхождения: арабиногалактана, галактоманнана и полимера синтетического происхождения: поли-1-винил-1,2,4-триазола, который адсорбирует и обволакивает наночастицу металла (кобальт, серебро). Полимер действует как защитная оболочка и, соответственно значительно увеличивает общий размер получаемых композитов, средняя величина которых составляет 0,4–0,5 мкм [21, 67, 75].

Все нанокompозиты относятся к IV классу малоопасных веществ. Обладают такими физико-химическими свойствами как: пониженная вязкость, хорошая растворимость в воде, биосовместимость. Показана высокая антимикробная активность серебросодержащих нанокompозитов в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных представителей патогенной и условно-патогенной микрофлоры [21, 42].

Определение токсичности нанокompозитов проводили на беспородных белых мышах и морских свинках при подкожном введении в дозе от 100 мкг/кг до 100 мг/кг.

2.6 Получение фагоцитов экспериментальных животных

2.6.1 Получение резидентных перитонеальных макрофагов

Резидентные перитонеальные макрофаги получали двумя способами: по общепринятой методике [94, 96]. Перитонеальный экссудат морских свинок или белых мышей вымывали вместе с клетками, в норме заселяющими брюшную полость, средой 199, разведенной 1 : 10 ЗФР.

Для стимуляции использовали 5 %-й раствор пептона. Перед инъекцией пептон растворяли в теплой воде, прогревали 30 мин при 80 ± 1 °С, охлаждали и вводили внутривентриально морской свинке в объеме не более 10 мл. Через 18 ч экссудат вымывали из брюшной полости стерильным цитратно-солевым раствором (26 мл насыщенного раствора NaCl и 4 г лимоннокислого натрия на 1 л дистиллированной воды), стерилизованным при 120 ± 1 °С в течение 30 мин [77].

Полученную жидкость собирали в охлажденные стерильные пробирки. Клетки отмывали двукратно средой 199, разведенной 1 : 10 ЗФР, путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин. Отмытые клетки ресуспендировали в среде 199. Полученную взвесь клеток собирали в пробирки и хранили на льду. Количество макрофагов подсчитывали в камере Горяева. От одной морской свинки без предварительной стимуляции получали до $2 - 3 \cdot 10^7$ клеток, после стимуляции – до $1,0 - 1,2 \cdot 10^8$ (и более) макрофагов.

2.6.2 Получение полиморфноядерных лейкоцитов

Источником полиморфноядерных лейкоцитов служил перитонеальный экссудат экспериментальных животных. Для получения ПЯЛ животных подвергали предварительной стимуляции по описанной выше методике.

В составе экссудата найдено 84 ± 3 % ПЯЛ, 11 ± 1 % макрофагов, встречаются лимфоциты. Число ПЯЛ подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток оценивали по методу, основанному на окрашивании погибших клеток метиловым синим [78].

Для постановки реакций на определение бактерицидной активности фагоцитов *in vitro* к суспензии клеток концентрацией $2 \cdot 10^7$ /мл вносили исследуемое

вещество и через 60 мин инкубации при 37 ± 1 °С исследовали с помощью представленных ниже реакций.

Контролем служили интактные фагоциты в той же концентрации, что и в опытных пробах, ЗФР рН 7,2.

2.7 Определение содержания неферментных катионных белков в полиморфноядерных лейкоцитах

Принцип метода основан на цитохимическом выявлении лизосомально – катионных белков, которые, связываясь с прочным зелёным красителем при рН 8,0 – 8,2, окрашивают лизосомы нейтрофилов в зелёный цвет. Уровень содержания катионных белков оценивается по количеству гранул и по интенсивности их окраски спектрофотометрическим методом [58].

В лунки 96 луночного полистиролового плоскодонного планшета раскапывали по 100 мкл суспензии клеток с исследуемым веществом. После 60 мин инкубации при 37 ± 1 °С отмывали раствором Хенкса без фенолового красного. В лунки с фиксированными на пластике ПЯЛ вносили по 50 мкл раствора прочного зелёного в метаноловом трис-буфере (рН $8,15 \pm 0,05$) в концентрации 1 мг/мл, монослой клеток инкубировали в течение 30 мин при 37 ± 1 °С. Монослой фагоцитов дважды отмывали раствором Хенкса для удаления невключившегося красителя. Связанный с катионными белками ПЯЛ краситель растворяли добавлением ДМСО (50 мкл), предварительно разогретого в водяной бане до 80 ± 1 °С.

Оптическую плотность раствора измеряли на автоматическом ридере для 96 луночных микропланшет и стрипов (БИО-ТЕК INSTRUMENTS INC, США) при $\lambda = 620$ нм, бланкировали против ДМСО.

Содержание неферментных катионных белков в ПЯЛ вычисляли как соотношение величин оптической плотности в опытной и контрольной пробах и выражали в процентах в виде индекса стимуляции (ИС).

2.8 Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в фагоцитах

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ, КФ 1.1.1.49) – ключевой фермент пентозомонофосфатного шунта – катализирует начальную реакцию окисле-

ния глюкозо-6-фосфата, при которой акцептором водорода является НАДФ.

Определение Г-6-ФДГ основано на специфическом ферментативном окислении субстрата (глюкозо-6-фосфата), сопровождающемся восстановлением НАДФ⁺, количество которого определяли спектрофотометрически по модифицированному нами методу [74].

Исследуемые образцы фагоцитирующих клеток по 50 мкл вносили в лунки 96 луночного полистиролового плоскодонного планшета, инкубировали при 37 ± 1 °С 60 мин. Затем в каждую лунку к адгезированным фагоцитам добавляли по 100 мкл 0,05 М раствора натриевой соли глюкозо-6-фосфата и 0,25 М раствора НАДФ в 0,01 М трис-НСl буфере (рН 7,6), приготовленные *ex tempore*.

Через 5 мин результаты регистрировали спектрофотометрически на автоматическом ридере для 96 луночных микропланшет и стрипов (БИО-ТЕК INSTRUMENTS INC, США) при $\lambda=340$ нм, бланкировали против трис-НСl буфера (рН 7,6).

Индекс стимуляции активности Г-6-ФДГ вычисляли как соотношение величин оптической плотности в опытной и контрольной пробах и выражали в процентах.

2.9 Определение активности НАДФ·Н-оксидазы в фагоцитах

НАДФ·Н-оксидаза (КФ 1.6.2-) – катализирует реакцию переноса водорода на другой акцептор, обеспечивая, таким образом, регенерацию нуклеотидфосфата.

Активность НАДФ·Н-оксидазы ПМ определялась по методу, основанному на восстановлении нитросинего тетразолия до нерастворимого формазана под влиянием оксидаз свободных нуклеотидов НАДН- и НАДФН-.

Спектрофотометрическое определение активности НАДФ·Н-оксидазы (КФ 1.6.2-) проводили по методу R. L. Baehner, D. G. Nathan [123] в модификации [16]. В лунки 96 луночного полистиролового плоскодонного планшета раскапывали по 50 мкл суспензии клеток с исследуемым веществом. После 60 мин инкубации при 37 °С в лунки к адгезированным фагоцитам добавляли по 100 мкл раствора ($1,7 \cdot 10^{-4}$ М НАДФ·Н и 10^{-4} М феназинметосульфата (ФМС) в 0,01 М трис-

HCl-буфере (pH 7,6), приготовленного *ex tempore*.

Через 5 мин результаты регистрировали спектрофотометрически на автоматическом ридере для 96 луночных микропланшет и стрипов (BIO-TEK INSTRUMENTS INC, США) при $\lambda=340$ нм, бланкировали против трис-HCl буфера (pH 7,6).

Индекс стимуляции активности НАДФ·Н-оксидазы вычисляли как соотношение величин оптической плотности в опытной и контрольной пробах и выражали в процентах.

2.10 Определение активности миелопероксидазы в полиморфноядерных лейкоцитах

Миелопероксидаза (КФ 1.11.1.7) является ферментом, который наряду с кислородными радикалами, перекисью водорода и галогенами составляет эффективное звено кислородзависимого аппарата бактерицидности нейтрофилов.

Активность миелопероксидазы определяли спектрофотометрически по модифицированному нами методу [29, 58]. Метод основан на окислении бензидина пироксид-пероксидазной системой до бензидинового синего. Понижение уровня МПО четко коррелирует с понижением бактерицидности ПЯЛ.

В лунки 96 луночного полистиролового плоскодонного планшета раскапывали по 100 мкл суспензии клеток с исследуемым веществом. После 60 мин инкубации при 37 ± 1 °С в лунки к адгезированным фагоцитам добавляли 100 мкл приготовленного *ex tempore* раствора, содержащего $4 \cdot 10^{-4}$ % раствора о-фенилендиамина (ОФД) в фосфатно-цитратном буфере pH 5,5 и раствор перекиси водорода до конечной концентрации 0,015 %. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 100 мкл 10 % H₂SO₄.

Результаты регистрировали спектрофотометрически на автоматическом ридере для 96 луночных микропланшет и стрипов (BIO-TEK INSTRUMENTS INC, США) при $\lambda = 492$ нм, бланкировали против раствора ОФД.

Индекс стимуляции активности МПО в ПЯЛ вычисляли как соотношение величин оптической плотности в опытной и контрольной пробах и выражали в

процентах.

2.11 Определение метаболитов кислорода в фагоцитах

Для оценки интенсивности образования в индуцированных клетках метаболитов кислорода использовали тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) [58] в нашей модификации.

Метод основан на способности НСТ при контакте с активными нейтрофилами восстанавливаться в диформаза, который в виде гранул откладывается внутри или на поверхности клеток. Количество образовавшихся гранул служит критерием активности этой реакции.

Для постановки реакции готовили 0,05 %-ый раствор НСТ. Для этого краситель разводили в 50 мкл 70 % этанола, затем добавляли среду 199, подогретую до 40 ± 1 °С. В лунки к примированным клеткам добавляли по 100 мкл раствора НСТ. После инкубации в течение 120 мин при 37 ± 1 °С клеточный монослой с образовавшимися зёрнами диформаза осторожно, но тщательно дважды отмывали от раствора НСТ, высушивали на воздухе, клетки разрушали путем добавления в лунки по 50 мкл предварительно разогретого до 80 ± 1 °С ДМСО.

Оптическую плотность измеряли на автоматическом ридере для 96 луночных микропланшет и стрипов (БИО-ТЕК INSTRUMENTS INC, США) при $\lambda = 540$ нм, бланкировали против ДМСО.

Индекс стимуляции активности образования метаболитов кислорода в фагоцитах вычисляли как соотношение величин оптической плотности в опытной и контрольной пробах и выражали в процентах.

2.12 Определение активности НАДФ·Н-диафоразы в фагоцитах

Активность НАДФ·Н-диафоразы (КФ 1.6.99.1), которая является специфическим маркером NO-синтазы, определяли, основываясь как на ранее известных методиках качественного выявления активности НАДФ·Н-диафоразы, так и на собственных модификациях количественного определения фермента. НАДФ·Н-диафоразная активность широко используется в настоящее время для гистохимической идентификации клеток, содержащих NO-синтазу [177].

Забор фагоцитов осуществляли через 18 часов после парентерального введения антигена животным. Для формирования монослоя клеток в лунки 96 луночного полистиролового плоскодонного планшета раскапывали по 100 мкл суспензии клеток с исследуемым веществом. После 60 мин инкубации при 37 ± 1 °С в лунки к адгезированным фагоцитам добавляли по 10 мкл приготовленного *ex tempore* охлажденного раствора, содержащего 4 % параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин, отмывали трехкратно фосфатным буфером. Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратной смеси, содержащей 0,5 мМ β -НАДФ·Н (Sigma), 0,5 мМ НСТ и 0,3 % тритона X-100 на основе 0,15 М трис-НСl буфера (рН 8,0), после чего инкубировали 1 час при 37 ± 1 °С в афотическом режиме с целью предупреждения фотохимического восстановления НСТ инкубационной среды.

Оптическую плотность измеряли на автоматическом ридере для 96 луночных микропланшет и стрипов (БИО-ТЕК INSTRUMENTS INC, США) при $\lambda = 490$ нм, бланкировали против трис-НСl буфера (рН 7,6).

Индекс стимуляции активности НАДФ·Н-диафоразы вычисляли как соотношение величин оптической плотности в опытной и контрольной пробах и выражали в процентах.

2.13 Определение активности супероксиддисмутазы в фагоцитах

Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1.) в фагоцитах оценивали по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в системе феназинметасульфата (ФМС) и НАДФ·Н [46]. Принцип метода основан на способности конкурировать с НСТ за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия восстановленной формы НАДФ·Н и ФМС. Вследствие этой реакции НСТ восстанавливается с образованием диформаза. В присутствии СОД процент восстановления НСТ уменьшается.

В лунки 96 луночного полистиролового плоскодонного планшета раскапывали по 50 мкл суспензии клеток с исследуемым веществом. После 60 мин инкубации при 37 ± 1 °С в лунки к адгезированным фагоцитам добавляли по 65 мкл

приготовленного *ex tempore* раствора 0,16 мМ ФМС и 0,61 мМ НСТ в 0,15 М фосфатном буфере рН 7,4. Контролем служили интактные фагоциты в той же концентрации, что и в опытных пробах, ЗФР рН 7,2. Реакцию начинали внесением в пробу 35 мкл 1 мМ НАД·Н в фосфатном буфере. Через 1 мин инкубирования проб при комнатной температуре реакцию останавливали ледяной уксусной кислотой (50 мкл в каждую лунку). Результаты регистрировали на автоматическом ридере для 96 луночных микропланшет и стрипов (BIO-ТЕК INSTRUMENTS INC, США) при $\lambda = 540$ нм, бланкировали против фосфатного буфера (рН 7,4). Активность СОД рассчитывали по калибровочной кривой, выполненной со стандартным препаратом фермента (Serva, США), Для построения калибровочной кривой в лунки вместо испытуемого материала вносили в том же объеме (50 мкл) титрованные количества раствора СОД (начальная концентрация 10 мкг) в дистиллированной воде. Концентрацию СОД рассчитывали по обратной пропорции и выражали в $\text{нг}/10^6$ клеток за период инкубации (1 мин) или в виде индекса стимуляции (%).

2.14 Определение активности NO-синтазы в фагоцитах

Косвенным подтверждением наличия активности NO-синтазы в фагоцитах (КФ 1.14.13.39) является метод, который основан на определении содержания конечных продуктов метаболизма оксида азота (NO_2^-), предложенный L. C. Green [171].

Содержание метаболитов оксида азота определяли спектрофотометрически с использованием реактива Грисса (раствор сульфаниламида и N-(1-нафтил) - этилендиамида в 2,5 %-ной ортофосфорной кислоте), которая дает окрашенный диазопродукт.

В лунки 96 луночного полистиролового плоскодонного планшета раскапывали по 100 мкл суспензии клеток с исследуемым веществом. Для построения калибровочной кривой в лунках параллельного ряда титровали раствор NaNO_2 (начальная концентрация 100 мкМ) в среде 199, разбавленной 1:10 ЗФР. После 60 мин инкубации при 37 ± 1 °С в лунки к адгезированным фагоцитам добавляли по

200 мкл реактива Грисса и планшет оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Результаты регистрировали на автоматическом ридере для 96 луночных микропланшет и стрипов (БИО-ТЕК INSTRUMENTS INC, США) при $\lambda = 450$ нм, бланкировали против ЗФР. Для построения калибровочной кривой в лунки вместо испытуемого материала вносили в том же объеме (100 мкл) титрованные количества раствора NaNO_2 (начальная концентрация 100 мкМ) в среде 199, разбавленной 1:10 ЗФР. Продукцию NO_2^- рассчитывали в мкМ/мл 10^6 фагоцитов.

2.15 Определение активации и апоптоза клеток крови в эксперименте *in vitro*

Материалом для исследования служили лимфоциты, выделенные из гепаринизированной крови мышей. Кровь отстаивали с 3 %-ным желатином, приготовленным на фосфатно-солевом буфере, в соотношении 1 : 1 до четкого разделения эритроцитов и плазмы в течение 40 – 60 мин при комнатной температуре. Отбирали плазму и верхний слой эритроцитов, центрифугировали при 200 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 5 мл лизирующего буфера Lysing Buffer (BD Biosciences, Oxford, Великобритания), инкубировали 5 мин на льду, отмывали при 200 об/мин в течение 2 мин и доводили до концентрации $2 \cdot 10^7$ кл/мл фосфатно-солевым буфером. Жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим составляла 96 – 98 %.

Клетки в концентрации 10^6 (50 мкл) инкубировали в течении 30 мин с экспериментальными препаратами: S-2 (20 мкг по белку), Co-АГ (10 мкг), S-2 + Co-АГ в тех же дозах в полистироловых пробирках BD Falcon™ 12 · 75 мм (Becton Dickinson, США). В качестве контроля использовали клетки интактных животных.

2.15.1 Титрование антител

Суспензию лимфоцитов в концентрации $2 \cdot 10^7$ кл/мл раскапывали в полистироловые пробирки по 50 мкл (10^6 клеток) и добавляли соответствующую концентрацию титруемого антитела (Таблица 2).

Таблица 2 – Схема подготовки проб для титрования антител

Реагент	№ пробирки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Объем реагента, мкл							
Суспензия лимфоцитов	50	50	50	50	50	50	50	50
Антитело	0,5	0,7	1	2	4	6	8	–
Антитело изотипического контроля	0,5	0,7	1	2	4	6	8	–

Пробы инкубировали на льду в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Затем в каждую пробирку добавляли по 1–2 мл контрастирующего буфера (BD Pharmingen Stain (BSA)), осторожно перемешивали и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин при $4 \pm ^\circ\text{C}$. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 0,5 мл контрастирующего буфера. Проводили настройку оптимального напряжения фотоумножителей с боковым (SSC) и прямым (FSC) светорассеянием на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США) и собирали 10 000 событий для каждой пробирки.

2.15.2 Приготовление раствора реагентов

Общий объем раствора антител (O_p), необходимый для проведения анализа «n» проб, рассчитывали по формуле $O_p = n \cdot 50$ мкл, где n – число проб. Общий объем рабочего разведения для каждого реагента (FITC CD3, APC-Cy7 CD8, O3, O4,...O7), содержащий оптимальное количество антител, необходимое для окрашивания n образцов рассчитывали с учетом рабочего объема реагентов (табл. 2) умноженное на число n. Общий объем реагентов рассчитывали по формуле: $O_k = O_1 + O_2 + \dots + O_7$.

Объем контрастирующего буфера (O_{KB}), необходимого для разведения общего объема реагентов (O_k), рассчитывали по формуле: $O_{KB} = O_p - O_k$ и добавляли в пробирку, содержащую O_k .

2.15.3 Выявление фосфатидилсерина и маркера активации на лимфоцитах крови

В таблице 3 представлена панель для исследования лимфоцитов крови согласно конфигурации прибора BD FACSCanto™ II (2 лазера, 8-цветный).

Таблица 3 – Панель для исследования лимфоцитов крови

FL-1	FL-2	FL-3	FL-5	FL-6	FL-7	FL-8
FITC CD3	V-PE Аннексин	7-AAD	PE-Cy7 CD25	APC CD45	APC- Cy7 CD8	Alexa70 0 CD4

По истечению времени инкубации к пробам добавляли 1 мл ЗФР и центрифугировали при 200 об/мин в течение 5 мин, супернатант удаляли. В полистироловые пробирки BD Falcon™ 12 · 75 мм (Becton Dickinson, США) раскапывали по 100 мкл ($2 \cdot 10^5$) клеток, примированных антигеном. Параллельно ставили аутофлуоресцентный и изотипический контроль. Для предотвращения неспецифического связывания иммуноглобулинов с FcγII/III (CD32/CD16) рецепторами лимфоцитов, которое приводит к появлению высокого фона, до окрашивания специфическими флуоресцентными антителами, суспензию клеток преинкубировали с 2 мкл Mouse BD Fc Block™ в течение 10 мин на льду.

Затем в каждую пробирку добавляли 50 мкл раствора Op (CD45, CD3, CD4, CD8, CD25) и аккуратно перемешивали. В пробирку, содержащую отрицательный контроль аутофлуоресценции клеток, добавляли 50 мкл контрастирующего буфера (BD Pharmingen Stain (BSA)) (концентрацию антител изотипического контроля определяли титрованием (Таблица 2)). Инкубировали при афотическом режиме в течение 20 мин при $4 \pm ^\circ\text{C}$. По истечении времени в каждую пробирку добавляли по 1 мл охлажденного и разведенного 1 : 10 десятикратного Аннексин V буферного раствора (BD Biosciences, Oxford, Великобритания) и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, процедуру отмывания проводили дважды.

Клетки ресуспендировали в 100 мкл охлажденного и разведенного 1 : 10 де-

сятикратного Аннексин V буферного раствора (BD Biosciences, Oxford, Великобритания). Во все пробирки, кроме пробирок с отрицательным и изотипическим контролем, добавляли по 5 мкл Аннексина V-PE и 7-AAD, аккуратно перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем во все пробирки для относительного подсчета клеток добавляли по 0,4 мкл разведенного 1 : 10 десятикратного Аннексин V буферного раствора (BD Biosciences, Oxford, Великобритания). Анализ окрашенных образцов проводили на прочном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США) в программе BD Diva 6.0 в соответствии с методическими рекомендациями [59].

Оценку апоптотического действия экспериментальных образцов на клетки крови белых мышей проводили на приборе BD FACSCanto™ II, собирая 10 000 событий CD45⁺-клеток для каждой пробы (число частиц, зарегистрированных прибором при прохождении через лучи лазеров), которые выделяли на графике SSC/CD45.

Для изучения клеточного звена иммунной системы определяли следующие субпопуляции Т-лимфоцитов: общее содержание активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺), общее содержание активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD25⁺), популяции активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD25^{low} и CD3⁺CD4⁺CD25^{high}), активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD25⁺), нативные Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD25⁻), нативные цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD25⁻). Жизнеспособность клеток оценивали на двухпараметрических графиках AnV/7-AAD и подсчитывали процент живых клеток (AnV⁻7-AAD⁻), клеток на стадии раннего (AnV⁺7-AAD⁻) и позднего (AnV⁺7-AAD⁺) апоптоза.

Жизнеспособные клетки (AnV⁻7-AAD⁻) – клетки отрицательные по Аннексину V-PE и витальной краске (7-AAD).

Такие клетки не имеют признаков апоптоза. Ранний апоптоз (AnV⁺7-AAD⁻) – клетки, которые являются положительными по Аннексину V-PE и отрицательными по витальной краске. Такие клетки находятся на стадии раннего апоптоза, при которой наблюдается перемещение фосфатидилсерина, но цитоплазматическая мембрана остается неповрежденной. Поздний апоптоз (AnV⁺7-AAD⁺). В этом

случае происходит не только перемещение фосфатидилсерина, но и нарушение целостности цитоплазматической мембраны. Окрашиваемость клеток обоими реагентами рассматривается как показатель поздней стадии апоптоза, сопровождающегося вторичным некрозом клеток. Показателем некроза служит окрашивание клеток только 7-AAD – AnV⁻ 7-AAD⁺. В силу того, что главной особенностью некроза является потеря клеткой целостности мембраны, клетки, подвергшиеся некрозу, являются отрицательными по Аннексину V-PE, но положительными по витальной краске (Рисунок 3).

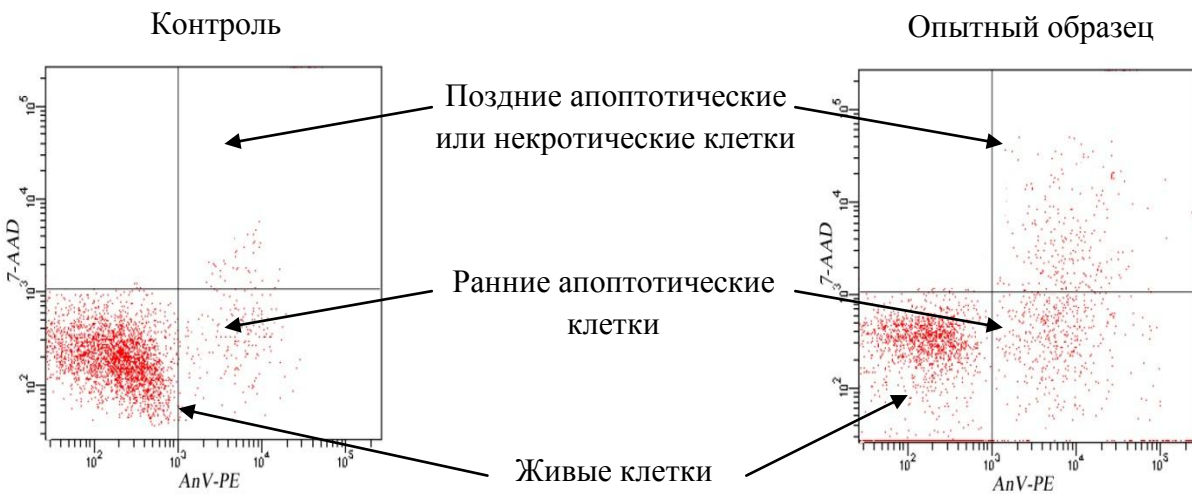


Рисунок 3 – Распределение мононуклеарных клеток крови экспериментальных животных, окрашенных AnV-PE/7-AAD

Процент ранних апоптотических клеток (AnV⁺7-AAD⁻) рассчитывали от Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) в режиме DotPlot.

2.16 Определение субпопуляционного состава В-лимфоцитов крови в экспериментах *in vivo*

Материалом для исследования служили лимфоциты, выделенные из гепаринизированной крови белых мышей, которым подкожно вводили следующие препараты: группе 1 – S-2 *B. anthracis* 34F₂ Sterne (40 мкг/0,2 мл ЗФР), группе 2 – Со-АГ (40 мкг/0,2 мл ЗФР) и группе 3 – S-2 *B. anthracis* 34F₂ Sterne + Со-АГ (по 40

мкг/0,2 мл ЗФР) из расчета 2 мг/кг веса (по белку). Контролем служили интактные белые мыши (группа 4). Учет результатов проводили на 3, 7, 14 и 21 сутки.

Фенотип В-лимфоцитов определяли с использованием моноклональных антител компании Becton Dickinson (США) в следующей панели: CD19-APC-Cy7/CD138-APC/CD38-PE.

В полистироловые пробирки BD Trucount™ Tubes (BD Biosciences, Oxford, Великобритания) раскапывали по 50 мкл гепаринизированной крови. Параллельно ставили пробирку аутофлуоресцентного контроля, содержащую 50 мкл гепаринизированной крови и 50 мкл ЗФР. Затем в каждую пробирку с опытным образцом добавляли по 50 мкл Оп, пробирки аккуратно встряхивали. Инкубировали (в темноте) в течение 30 мин при $4 \pm 0,5$ °С. Для лизирования эритроцитов добавляли по 0,5 мл разведенного 1 : 10 FACS Lysing Solution (BD Biosciences, Oxford, Великобритания).

В каждой пробе анализировалось 10 000 событий CD19⁺– клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II в программе BD Diva 6.0. В рамках циркулирующей популяции В-лимфоцитов оценивали содержание (%) клеточных линий: CD38⁻CD138⁻, CD38⁺CD138⁻, CD38⁻CD138⁺, CD38⁺CD138⁺.

Индекс содержания (Ис) CD38⁻CD138⁻ – и CD38⁺CD138⁻– клеток рассчитывали по формуле: $Ис = (O - K) / K \cdot 100 \%$,

где O – процентное содержание клеток в опыте, K – процентное содержание клеток в контроле.

2.17 Статистические методы

Все полученные материалы обработаны статистически стандартными методами с применением пакета программ Statistica, версия 6.1 (Copyright©StatSoft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897) и пакета программ Microsoft Excel (2003) корпорации Microsoft.

Статистическую обработку данных проводили с учетом типа распределения, числа и связности групп. Для переменных, имеющих распределение близкое к нормальному, применяли критерии параметрической статистики Стьюдента,

Фишера, Левена ANOVA, в противном случае – непараметрические (Манна-Уитни, Вилкоксона, Крускала-Уоллиса), корреляционный – методом ранговой корреляции Спирмена (r_s). Проблему Беренса-Фишера решали методами дисперсионного анализа или по непараметрическим критериям. Deskриптивные характеристики изучаемых величин представлены в виде среднего арифметического (Mean) \pm среднего квадратичного отклонения (SD) или медианы (Me) с интерквартильными размахами (Q_{25} - Q_{75}). Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

При отсутствии статистически значимых различий выборки объединяли для повышения достоверности результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ *BACILLUS ANTHRACIS* STERNE 34F₂ И МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩИХ НАНОКОМПОЗИТОВ НА БАКТЕРИЦИДНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФАГОЦИТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Вследствие действия экзотоксина *B. anthracis* подавляются функции фагоцитов, что позволяет микробу дольше выживать во внутренней среде макроорганизма [17, 130]. Многие исследователи отмечают, что при инфекционном процессе, вызванном патогенными микроорганизмами, вначале ингибируется кислород-зависимая функция, а несколько позднее и кислороднезависимая биоцидная система фагоцитов. Предполагается, что физиологическая активность макрофагов определяет исход и при сибиреязвенной инфекции [17].

Можно предположить, что при сибирской язве повышение неспецифической резистентности организма возможно за счет дополнительных антигенов *B. anthracis*, а также иммуномодуляторов, стимулирующих бактерицидные механизмы фагоцитов.

Все это и определило необходимость всестороннего изучения действия препаратов на основе поверхностных антигенов сибиреязвенного микроба на ИКК экспериментальных животных с применением современных аналитических методов, а задача получения сопоставимых данных обусловила проведение экспериментов по единому научно-методическому плану.

Ранее было установлено, что искусственный антигенный комплекс (ДАК-конъюгат) в дозе 25 мкг обладает иммуногенной и протективной активностью. Эксперименты показали, что выживаемость морских свинок при иммунизации ДАК-конъюгатом составила 40 – 62 %, а при совместном применении с иммуно-

модуляторами (АГ, сквален) – 80 %, при 0 % в контроле [13].

Ю. А. Попов с соавт. [71] показали, что протеазонегативный изогенный штамм *B. anthracis* Sterne 34F₂, обладающий белками S-слоя (Sap), превосходит в 10 раз по иммуногенности другой вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1. Учитывая это обстоятельство, а также на основании собственных исследований, для экспериментов был выбран антигенный препарат, содержащий белки S-слоя *B. anthracis* (EA1, Sap) полученный из штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂.

На первом этапе исследования проводили оценку токсичности вводимого биомоделям антигенного препарата *B. anthracis* Sterne 34F₂ (S-1, S-2). Показано, что антигенный препарат в дозе от 0,05 до 0,4 мг/кг (в перерасчете на белок) вещества не оказывает токсического действия на макроорганизм. Препарат введенный подкожно в дозе 0,4 мг/кг не вызывал гибели экспериментальных животных; не зарегистрировано, по сравнению с исходной, повышения температуры и уменьшения массы тела; к 7-м сут исследования в месте введения препарата видимых изменений не выявлено.

При испытании тестируемых образцов нанокомпозитов (Co-АГ, Ag-ГМ, 2-Н-Ag-ПВТ) на токсичность установлено, что все НК при однократном подкожном введении в дозах 1, 10 и 100 мг сухого вещества на кг веса не вызывали гибели экспериментальных животных (морские свинки, белые мыши), а также повышения температуры и уменьшения массы тела, по сравнению с исходной.

3.1 Бактерицидные механизмы фагоцитов белых мышей при взаимодействии с антигенными препаратами S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ *in vitro*

В предварительных опытах для определения оптимальной концентрации антигенного препарата *B. anthracis* Sterne 34F₂, при которой происходит позитивное кондиционирование метаболической активности фагоцитов, в пробу, содержащую фагоциты (10⁶/0,2 мл) вносили опытный образец в дозе от 0,005 до 0,05 мг. Оптимальные результаты получены при концентрации образца 0,02 мг (в перерасчете

на белок).

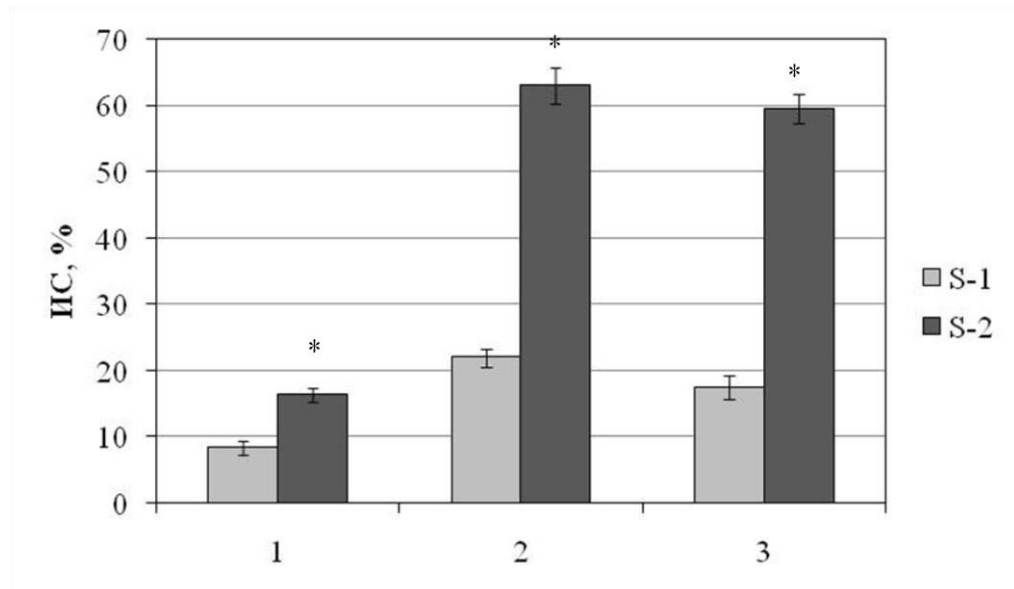
Оценку влияния антигенных препаратов на функциональное состояние фагоцитов лабораторных животных проводили *in vitro* на модели ПМ и ПЯЛ белых мышей. Фагоциты (10^6 фагоцитов/0,2 мл) примировали исследуемыми антигенными препаратами (0,1 мг/мл – по содержанию белка) в течение 60 мин при 37 ± 1 °С с последующим определением суммарной активности: ферментов дыхательной цепи (НСТ-тест), НАДФ·Н-оксидазы, Г-6-ФДГ, МПО, СОД, а также продукции NO_2^- и уровня содержания НКБ. Контролем служили клетки интактных животных.

Кислородзависимая микробицидная активность фагоцитов реализуется через образование значительного количества АФК, обладающих токсическим действием на микроорганизмы, в процессе «респираторного взрыва».

Начальная, внеклеточная фаза фагоцитоза сопровождается активацией мембранных механизмов бактерицидности (активацией ферментов НАДФ-оксидазного комплекса, гексозомонофосфатного шунта (ГМФС), продукцией супероксиданиона, гидроксильного радикала, синглетного кислорода). При этом происходит различная степень активации продукции АФК в зависимости от объекта фагоцитоза.

Результаты исследования, представленные на рисунке 4, свидетельствуют о том, что примирование ИКК антигенными препаратами S-1 и S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ в концентрации 0,1 мг/мл вызывало активацию кислородзависимых (активность Г-6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидазы и МПО) бактерицидных систем фагоцитов.

Например, показатели индекса стимуляции активности Г-6-ФДГ перитонеальных макрофагов, примированных антигенным препаратом S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ были статистически значимо выше (в 2,0 раза) по сравнению с антигенным препаратом S-1, НАДФ·Н-оксидазы – в 2,8 раза ($P < 0,05$) (Рисунок – 4).



1 – Г-6-ФДГ; 2 – НАДФ·Н-оксидаза; 3 – МПО

Рисунок 4 – Активность КЗМ фагоцитов белых мышей под влиянием антигенных препаратов S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ (M ± s); * – P < 0,05 по сравнению с S-1

Система миелопероксидазы является одной из самых мощных бактерицидных систем фагоцитирующей клетки. При участии МПО происходит образование таких бактерицидных агентов, как перекись водорода, гипохлорная кислота и другие. Определение активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках является одним из наиболее существенных тестов, позволяющих судить о бактерицидной активности фагоцитов [86].

Установлено, что показатели индекса стимуляции миелопероксидазы в ПЯЛ, примированных антигенным препаратом S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, в 3,4 раза выше по сравнению с антигенным препаратом S-1 (P < 0,05) (Рисунок – 4).

Суммарную активность образования метаболитов кислорода фагоцитов, в частности ферментов дыхательной цепи, оценивали в НСТ-тесте, результаты которого подтверждают данные, полученные в ходе определения активности отдельных ферментов этого процесса. Результаты исследования представлены на рисунке 5.

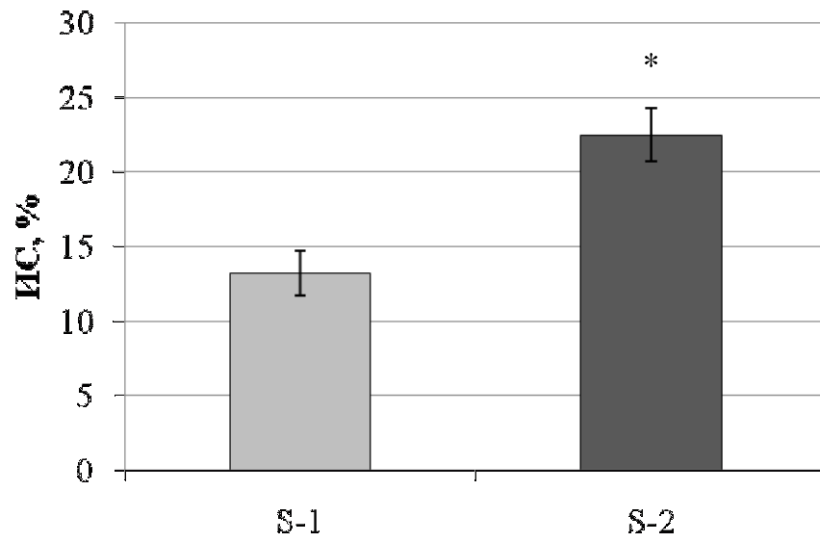


Рисунок 5 – Активность образования метаболитов кислорода в фагоцитах белых мышей ($M \pm s$); * – $P < 0,05$ по сравнению с S-1

Очевидно, что оба препарата стимулируют КЗМ, тем не менее, значения показателей НСТ-теста у макрофагов, стимулированных антигенным препаратом S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, статистически значимо выше, чем при стимулировании препаратом S-1 (в 1,7 раз, $P < 0,05$).

Продукт восстановления НАДФ-оксидазного комплекса супероксидный радикал (O_2^-) является основой для продукции ряда окислителей, использующихся для уничтожения микроорганизмов, но они также вызывают множественное разрушение окружающих тканей, поэтому их формирование должно быть отрегулированным. Супероксиддисмутаза играет ключевую роль в антиоксидантной защите организма и является катализатором обратной реакции – дисмутации (обратного превращения) АФК в кислород и перекись водорода. Известно, что активность СОД возрастает при повышенных значениях рН и преобладании O_2^- [66].

При изучении функциональной активности АОС, в частности супероксиддисмутаза, угнетение работы АОС фагоцитов не выявлено. Показатели содержания этого фермента в ПМ под влиянием антигенных препаратов S-1 и S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ не имели статистически значимых различий ($1,16 \pm 0,10$ и $1,21 \pm 0,11$ нг СОД/ 10^6 фагоцитов соответственно), что свидетельствует об отсут-

ствии накопления токсических кислородных радикалов в клетках (Рисунок 6).

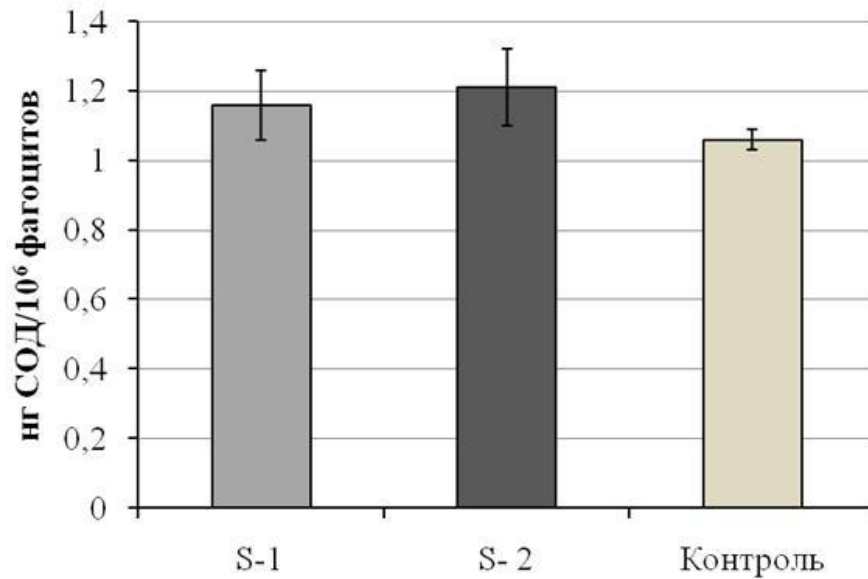


Рисунок 6 – Содержание супероксиддисмутазы в перитонеальных макрофагах белых мышей ($M \pm s$)

Было показано, что NO включается в неспецифический иммунитет и частично в комплексный механизм тканевого повреждения как важный медиатор воспалительных процессов и апоптоза [66].

С учетом этого мы исследовали влияние антигенных препаратов S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ на продукцию NO₂⁻ фагоцитов экспериментальных животных. Полученные данные, позволяют констатировать, что содержание метаболитов оксида азота (II) в фагоцитах белых мышей при стимуляции антигенными препаратами S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ превышает показатели в контрольной пробе, тем не менее, статистически значимых различий между группами не выявлено (Рисунок 7).

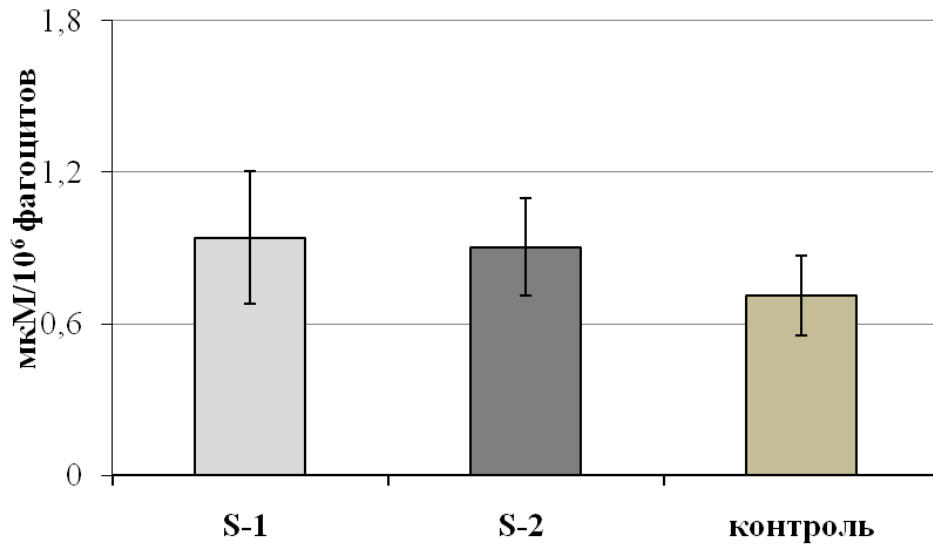


Рисунок 7 – Содержание метаболитов оксида азота в перитонеальных макрофагах белых мышей ($M \pm s$)

Неферментные катионные белки относят к активаторам выброса антибактериальных факторов из нейтрофилов, стимуляторам фагоцитоза. НКБ обладают прямым бактерицидным действием, основанным на нарушении структуры и функции мембран микробной клетки [187, 252]. На рисунке 8 представлены данные, свидетельствующие о способности антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ влиять на кислороднезависимые бактерицидные механизмы фагоцитов. Установлено повышение уровня неферментных катионных белков в ПЯЛ под действием этого препарата. Например, значение ИС для антигенного препарата S-1 *B. anthracis* Sterne 34F₂ составляет $9,0 \pm 0,5$ %, для антигенного препарата S-2 – $46,0 \pm 0,9$ %, что свидетельствует об интенсивности выброса неферментных катионных белков в межклеточное пространство у ПЯЛ, примированных S-2 ($P < 0,05$).

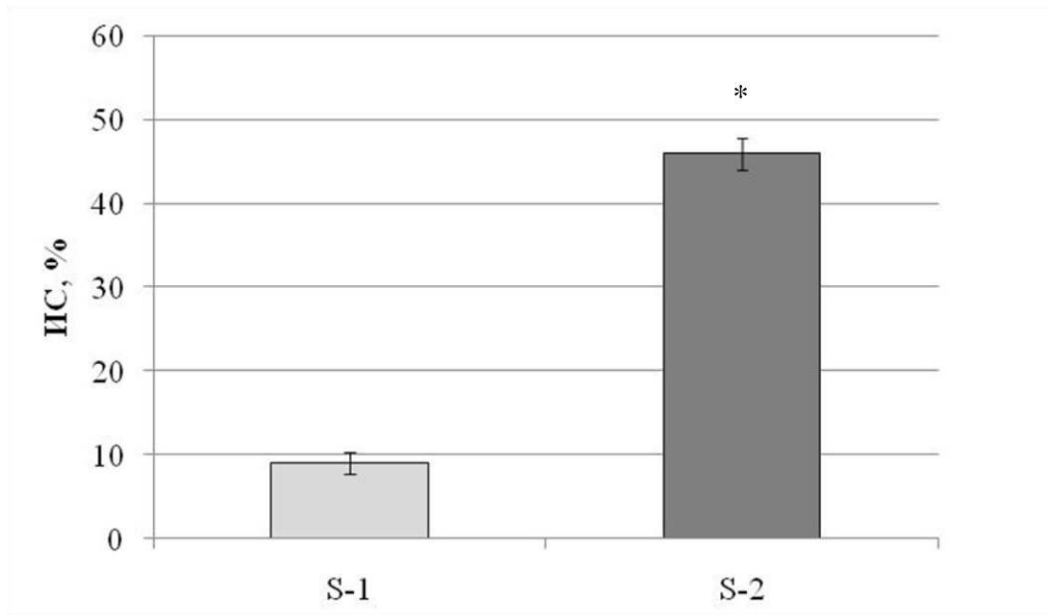


Рисунок 8 – Продукция НКБ в полиморфноядерных лейкоцитах белых мышей ($M \pm s$); * – $P < 0,05$ по сравнению с S-1

Результаты экспериментов показали, что антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ стимулирует функциональное состояние фагоцитов в большей степени, чем антигенный препарат S-1, что характеризуется высокими показателями активности ферментов Г-6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидазы и МПО, а также содержания ферментных катионных белков.

Это объясняется различием в антигенном составе экспериментальных препаратов и подтверждает способность антигенов S-слоя *B. anthracis* стимулировать кислородзависимые и кислороднезависимые механизмы фагоцитов, и тем самым оказывать выраженное иммуномодулирующее действие, усиливая бактерицидный потенциал макроорганизма.

3.2 Воздействие нанокompозитов на неспецифическую резистентность организма экспериментального животного

Известно, что наиболее выраженный иммунный ответ формируется на конъюгат антигена с иммуностимулятором (адьювантом). Поиск и создание иммуномодуляторов, нацеленных на активацию эффекторов врожденного иммуни-

тета, является актуальным направлением исследований [100]. В настоящее время активно изучается действие природных и синтетических иммуномодуляторов, а также наноструктурированных металлокомпозитов на адапционно-приспособительные механизмы систем, участвующих в реализации защиты макроорганизма от патогена [12, 91]. Показано, что одной из моделей для изучения иммуномодулирующих свойств нанокомпозитов является система мононуклеарных фагоцитов, функциональная активность которых играет важную роль в резистентности организма [27, 44, 91]. Тестирование наноматериалов осуществляется путем определения их влияния на различные функции макрофагов: продукцию активных форм кислорода, активность ферментов, участвующих в "респираторном взрыве", способность к дифференцировке моноцитов в зрелые макрофаги [47].

Для изучения влияния металлосодержащих нанокомпозитов на функциональное состояние клеток морских свинок фагоциты (10^6 фагоцитов/0,2 мл) примировали Co-АГ, Ag-ГМ или 2-Н-Аг-ПВТ в дозе 0,02 мг, в течение 60 мин при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ с последующим определением суммарной активности: ферментов дыхательной цепи (НСТ-тест), НАДФ·Н-оксидазы, Г-6-ФДГ, МПО, СОД, а также продукции NO_2^- и уровня содержания НКБ. Контролем служили клетки интактных животных.

Показано, что применение Co-АГ, Ag-ГМ или 2-Н-Аг-ПВТ способствует повышению ИС ферментов окислительного взрыва (Г-6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидаза и МПО) по сравнению с контролем (Таблица 4), при этом наиболее выраженный позитивный эффект выявлен в случае применения Co-АГ ($t = 2,8412$; $df = 10$; $P < 0,01$) и Ag-ГМ ($t = 2,8311$; $df = 10$; $P < 0,01$). Сравнительный анализ показал, что значения индекса стимуляции активности Г-6-ФДГ и МПО в фагоцитах, примированных Co-АГ, были в 2,3 раза выше по сравнению с 2-Н-Аг-ПВТ ($P < 0,05$), а достоверные различия показателей активации НАДФ·Н-оксидазы были выявлены в случае Co-АГ и 2-Н-Аг-ПВТ по отношению к Ag-ГМ ($P < 0,05$).

Таблица 4 – Влияние нанокompозитов на показатели функционального состояния фагоцитов морских свинок ($M \pm s$)

Нанокompозит	ИС, %		
	Г-6-ФДГ	НАДФ·Н-оксидаза	МПО
Со-АГ	75,7 ± 5,9	48,3 ± 6,6	28,0 ± 4,2
Ag-ГМ	64,2 ± 9,7	30,5 ± 2,5*	26,6 ± 3,3
2-Н-Ag-ПВТ	34,4 ± 7,2*	46,60 ± 2,2	12,2 ± 2,4*

Примечание. * – $P < 0,05$ по сравнению с Со-АГ.

Таким образом, показано, что под воздействием металлосодержащих нанокompозитов активизируется начальная, внеклеточная фаза фагоцитоза, которая сопровождается активацией мембранных механизмов бактерицидности.

На следующем этапе наших исследований проводили определение уровня активных форм кислорода по уровню восстановления нитросинего тетразолия в НСТ-тесте. Установлено, что нанокompозиты 2-Н-Ag-ПВТ, Ag-ГМ и Со-АГ оказывают позитивное кондиционирование на энергетический метаболизм фагоцитов, а именно, состояние ГМФШ и связанной с ним продукции свободных радикалов кислорода (НСТ-тест) (Рисунок 9).

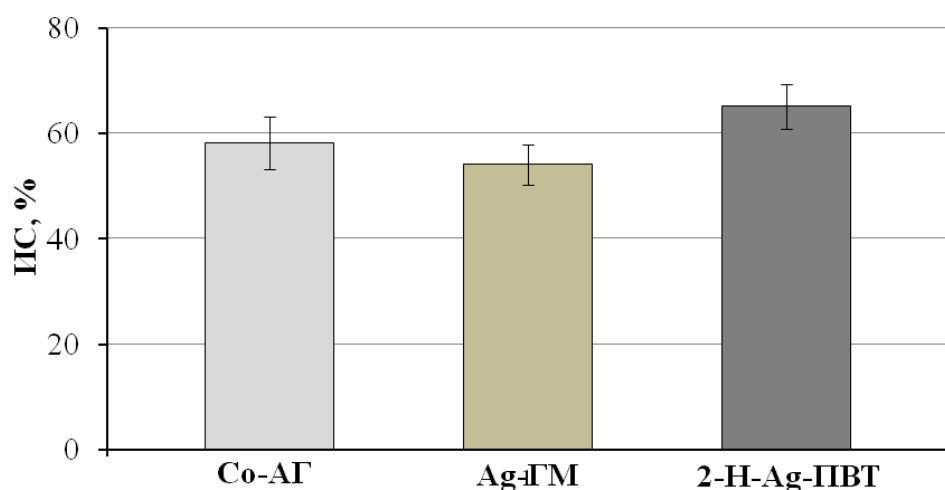


Рисунок 9 – Выработка АФК в перитонеальных макрофагах морских свинок ($M \pm s$)

На рисунке 10 приведены данные о влиянии нанокompозитов Co-АГ, Ag-ГМ и 2-Н-Ag-ПВТ на активность супероксиддисмутазы. Выявлено достоверное стимулирующее действие Co-АГ ($t = 8,2134$; $df = 4$; $P < 0,001$), Ag-ГМ ($t = 8,2708$; $df = 4$; $P < 0,001$) и 2-Н-Ag-ПВТ ($t = 8,1125$; $df = 10$; $P < 0,001$) на активность СОД (Рисунок 10).

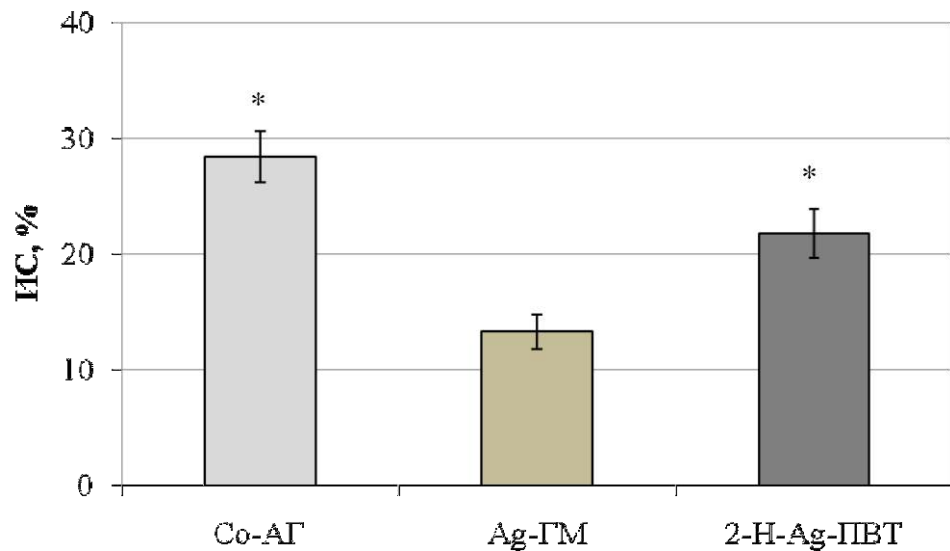


Рисунок 10 – Активность СОД в перитонеальных макрофагах морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,001$ по сравнению с Ag-ГМ

Препараты 2-Н-Ag-ПВТ ($t = 3,7304$; $df = 10$; $P < 0,01$) и Co-АГ ($t = 4,8901$; $df = 10$; $P < 0,01$) превосходят Ag-ГМ в 1,8 – 2,3 раза соответственно по степени позитивного кондиционирования состояния АОС фагоцитов. Так как супероксиддисмутаза принадлежит к системе защиты клеток от чрезмерного образования реактивных форм кислорода, то можно предположить, что Co-АГ и 2-Н-Ag-ПВТ являются антиоксидантами.

Известно, что эндогенная окись азота является одним из важнейших факторов неспецифической антиинфекционной защиты макроорганизма. Дефицит NO способствует размножению возбудителей в тканях и внутри фагоцитирующих клеток, что сопровождается усилением тяжести течения инфекционного процесса и его хронизацией [56]. Сравнительный анализ действия нанокompозитов на нит-

роксидзависимую бактерицидную активность фагоцитов показал, что в ПМ, примированных нанокompозитами, регистрируется повышение продукции метаболитов оксида азота (Рисунок 11).

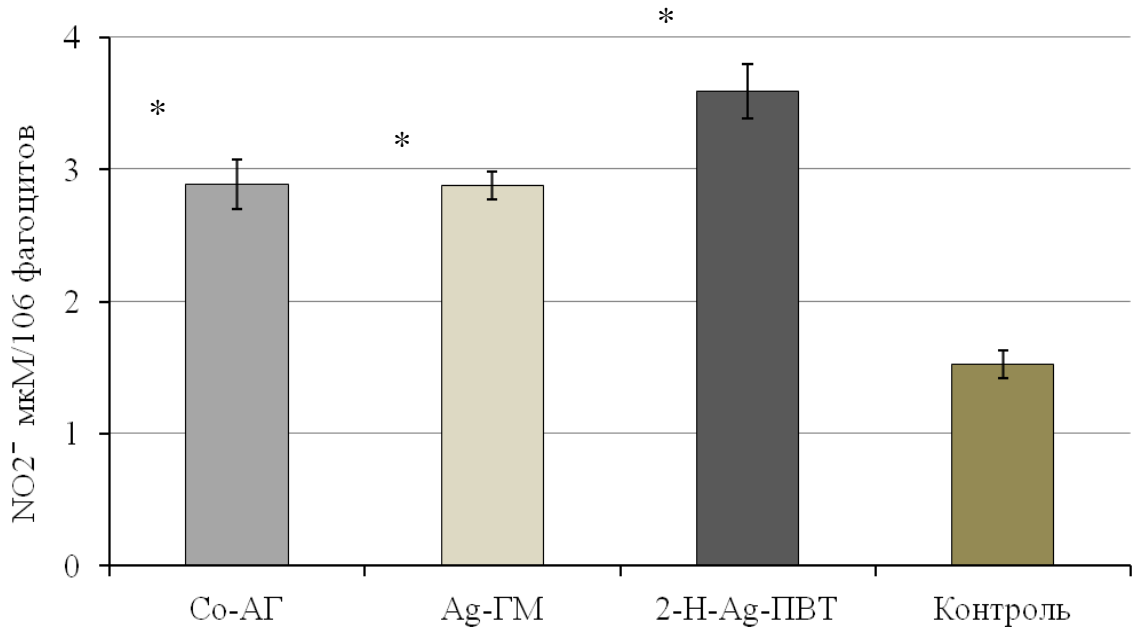


Рисунок 11 – Продукция метаболитов оксида азота в перитонеальных макрофагах морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,001$ по сравнению с контролем

Так, Ag-ГМ ($t = 4,3316$; $df = 10$) и Co-AГ ($t = 4,1178$; $df = 10$) по интенсивности влияния на продукцию NO ($P < 0,001$) превосходят контрольные значения в 2,0 раза, а в случае 2-H-Ag-ПВТ ($t = 4,2145$; $df = 10$) – в 2,5 раза по сравнению с контролем ($P < 0,001$). Повышение содержания NO в фагоцитах, примированных данными препаратами, можно объяснить их активирующим действием на каталитическую способность NOS.

При изучении влияния нанокompозитов на кислороднезависимые бактерицидные системы ПЯЛ установлено, что все тестируемые НК стимулируют повышение уровня неферментных катионных белков ПЯЛ, при этом наиболее выраженный позитивный эффект по сравнению с контролем оказывает Co-AГ ($t = 2,8311$; $df = 10$; $P < 0,01$) и Ag-ГМ ($t = 2,8311$; $df = 10$; $P < 0,01$) (Рисунок 12).

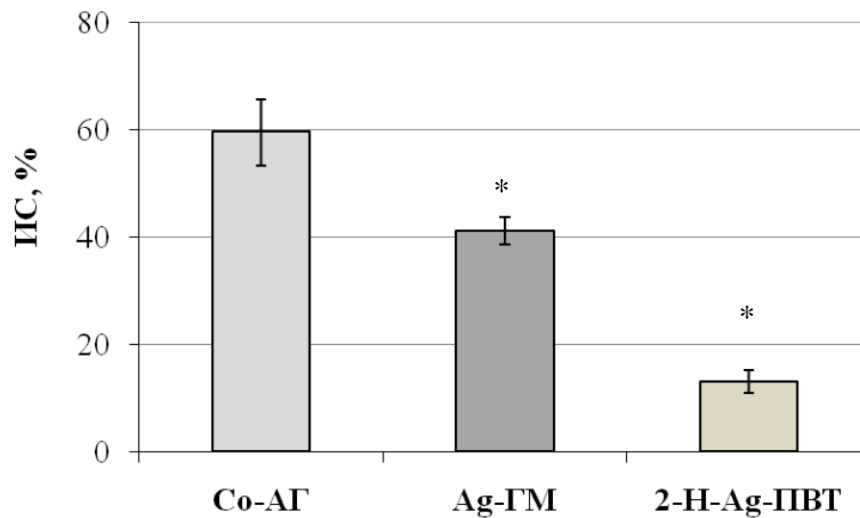


Рисунок 12 – Активация продукции НКБ в полиморфноядерных лейкоцитах морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,01$ по сравнению с Co-AG

Например, значение ИС для Co-AG составляет $59,5 \pm 6,2$ %, для Ag-ГМ – $41,2 \pm 2,5$ %, что свидетельствует об интенсивности выброса НКБ в межклеточное пространство у ПЯЛ ($P < 0,01$).

Таким образом, сравнительный анализ действия металлосодержащих наноконпозитов на функциональное состояние клеток иммунофагоцитарной системы морских свинок показал, что все исследованные экспериментальные препараты (Co-AG, Ag-ГМ и 2-N-Ag-ПВТ) в условиях *in vitro* обладают способностью повышать активность ферментов окислительного взрыва (Γ -6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидаза и МПО), а также оказывать стимулирующий эффект на кислороднезависимый метаболизм фагоцитов (НКБ). При этом наиболее выраженный позитивный эффект выявлен в случае применения Co-AG и Ag-ГМ.

Металлосодержащие композиты Co-AG и 2-N-Ag-ПВТ также обладают выраженными антиоксидантными свойствами. Кроме того, в ходе исследований показано, что все тестируемые наноконпозиты оказывают положительное влияние на выработку монооксида азота.

3.3 Влияние антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с нанокompозитами на функциональное состояние фагоцитов морских свинок

Следующая серия опытов посвящена изучению воздействия антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с нанокompозитами на функциональное состояние фагоцитов морских свинок.

Активность КЗМ перитонеальных макрофагов и влияние на него антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ *per se* или в сочетании с Co-АГ, Ag-ГМ или 2-Н-Аг-ПВТ исследовали в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) (Рисунок 13).

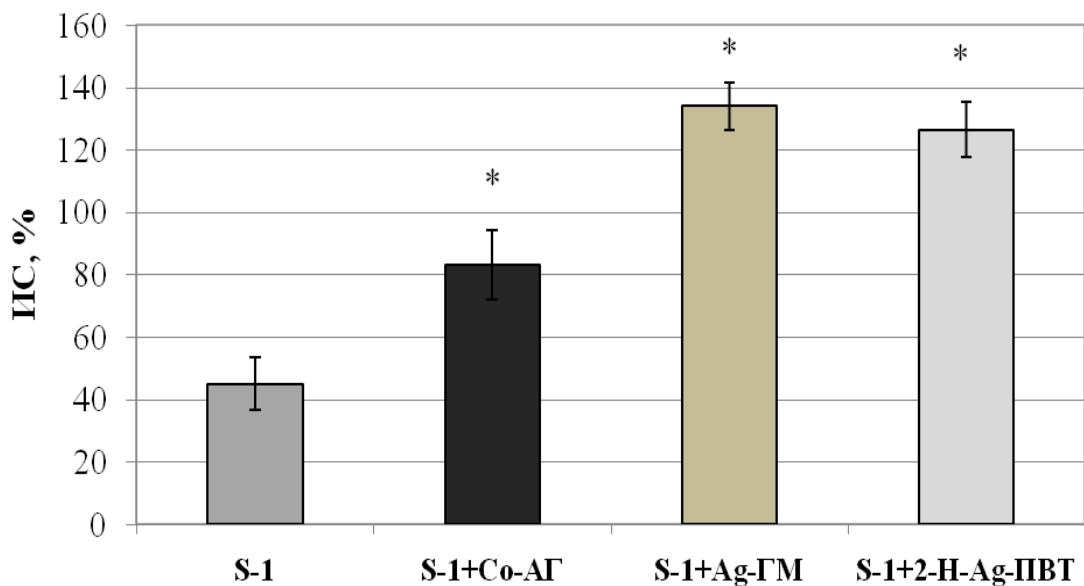


Рисунок 13 – Влияние антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ и нанокompозитов на активность КЗМ перитонеальных макрофагов морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,05$ по сравнению с S-1

Антигенный препарат S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ и его сочетанное применение с нанокompозитами активируют кислородзависимые процессы пери-

тонеальных макрофагов морских свинок. При воздействии на ПМ антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ зарегистрированы наименее низкие показатели активности КЗМ. Отмечено, что все наноконпозиты в сочетании с антигенным препаратом S-1 оказывают стимулирующее воздействие на КЗМ перитонеальных макрофагов морской свинки. В наибольшей степени это происходит при воздействии антигенного препарата S-1 в сочетании с Ag-ГМ (в 3,2 раза, $P < 0,05$) по сравнению с антигенным препаратом S-1 *per se* (Рисунок 13).

Таким образом, наноконпозиты в сочетании с антигенным препаратом S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ способствуют стимуляции бактерицидного потенциала фагоцитов экспериментальных животных.

В таблице 5 приведены данные о влиянии антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ и его сочетанного применения с Со-АГ, Ag-ГМ или 2-Н-Ag-ПВТ на функциональное состояние фагоцитов экспериментальных животных.

Таблица 5 – Влияние антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с наноконпозитами на функциональное состояние фагоцитов морских свинок ($M \pm s$)

Препарат	ИС, %		
	Г-6-ФДГ	НАДФ·Н-оксидаза	МПО
S-1	11,0 ± 1,3	9,2 ± 3,0	10,4 ± 2,4
S-1 + Со-АГ	57,7 ± 3,9*	36,9 ± 2,1*	47,5 ± 4,2*
S-1 + Ag-ГМ	45,5 ± 4,6*	32,7 ± 3,4*	36,6 ± 3,1*
S-1 + 2-Н-Ag-ПВТ	27,6 ± 2,1*	19,6 ± 1,0*	14,1 ± 1,4*

Примечание. * – $P < 0,05$ по сравнению с S-1.

Показано, что все исследованные наноконпозиты при сочетанном применении с антигенным препаратом S-1 способствуют повышению ИС ферментов окислительного взрыва (Г-6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидаза и МПО) по сравнению с ан-

тигенным препаратом S-1 *per se*. Отмечено, что антигенный препарат S-1 *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с Co-АГ стимулирует функциональное состояние фагоцитов в большей степени, чем антигенный препарат S-1 в сочетании с Ag-ГМ или 2-Н-Ag-ПВТ. Так, показатели ИС активности Г-6-ФДГ в фагоцитах, примированных антигенным препаратом S-1 в сочетании с Co-АГ, в 1,3 раза и в 2,0 раза выше, чем в случае применения препарата S-1 в сочетании с Ag-ГМ или 2-Н-Ag-ПВТ соответственно ($P < 0,05$). По показателю активности НАДФ-Н-оксидазы – в 1,8 раз по сравнению с антигенным препаратом S-1 в сочетании с 2-Н-Ag-ПВТ, активности МПО – в 1,3 раза по сравнению с S-1 в сочетании с Ag-ГМ и в 3,4 раза по сравнению с S-1 в сочетании с 2-Н-Ag-ПВТ ($P < 0,05$) (Таблица 5).

Результаты изучения активности супероксиддисмутазы в ПМ морской свинки в присутствии антигенного препарата S-1 и его сочетанного применения с нанокompозитами Co-АГ, Ag-ГМ или 2-Н-Ag-ПВТ приведены на рисунке 14.

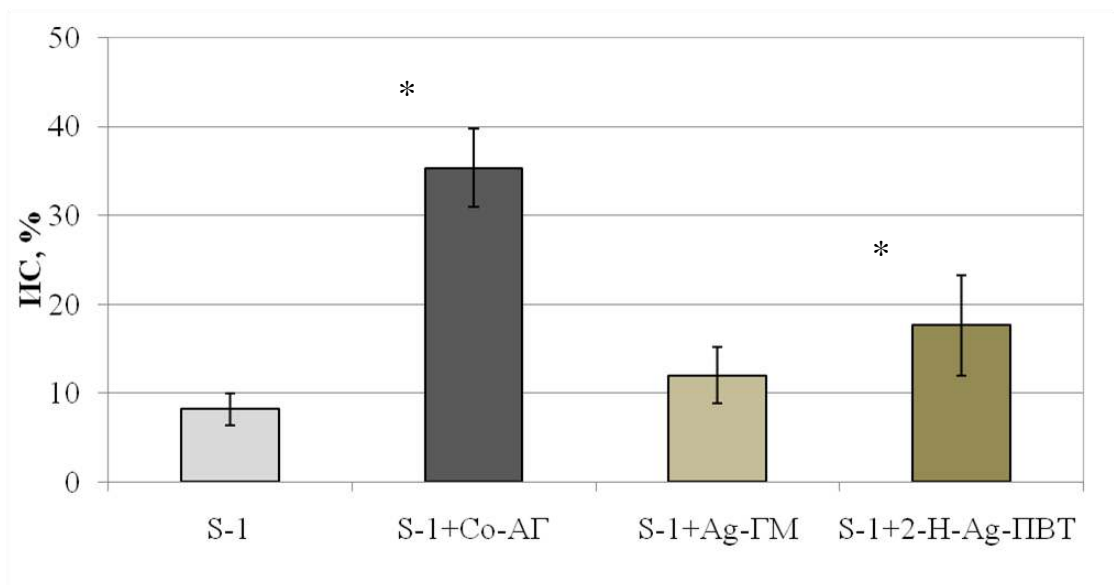


Рисунок 14 – Показатели активации СОД в перитонеальных макрофагах морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,05$ по сравнению с антигенным препаратом S-1 *B. anthracis* Sterne 34F₂

Выявлено достоверное стимулирующее действие антигенного препарата S-1 *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с 2-Н-Ag-ПВТ или с Co-АГ ($P < 0,05$) на ак-

тивность супероксиддисмутазы в ПМ (в 1,5 – 2,9 раза соответственно) по сравнению с антигенным препаратом S-1. Следует отметить, что при изучении функциональной активности антиоксидантной системы достоверно значимых различий между группами: антигенный препарат S-1 и антигенный препарат S-1 в сочетании с Ag-ГМ по степени воздействия на активность СОД не зарегистрировано.

Монооксид азота является дополнительным антимикробным агентом наряду с активными формами кислорода. Известно, что NO оказывает двойное воздействие на процессы в организме, с одной стороны – активно участвует в подавлении и элиминации возбудителей инфекционных болезней, с другой – избыточное повышение его концентрации играет важную роль в повреждении тканей, развитии токсико-инфекционного шока и др. нарушений в организме [45, 87]. При изучении побочных эффектов вновь разрабатываемых препаратов следует учитывать биологические явления, связанные с NO [56]. С учетом этого мы исследовали влияние антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ и наноконпозигов на продукцию NO₂⁻ ПМ экспериментальных животных (Рисунок 15).

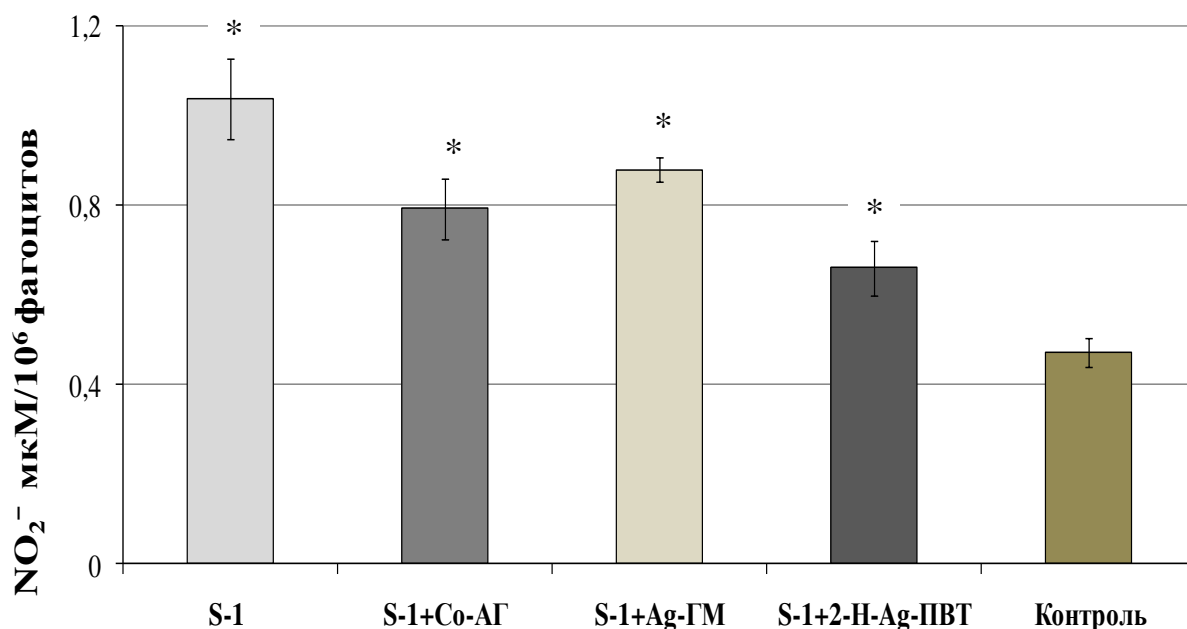


Рисунок 15 – Продукция метаболитов оксида азота в перитонеальных макрофагах морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем
Полученные данные позволяют констатировать, что антигенный препарат

S-1 *per se*, а также в сочетании с нанокompозитами, оказывают стимулирующее воздействие на продукцию NO перитонеальных макрофагов по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Наибольшей активностью обладал антигенный препарат S-1 в сочетании с Ag-ГМ, а также сам антигенный препарат S-1 превосходя контрольные значения в 2,0 раза ($P < 0,05$). Однако, при совместном влиянии антигенного препарата S-1 с Co-АГ, а также с 2-Н-Аг-ПВТ, наблюдается ингибирование продукции NO по сравнению с препаратом S-1 *per se* (в 1,3 и 1,6 раза соответственно).

Неферментные катионные белки относятся к кислороднезависимой бактерицидной системе нейтрофильных гранулоцитов. НКБ являются неферментными системами, они играют важную роль в реализации фагоцитарной функции клеток, не вызывают привыкание к себе микроорганизмов, увеличивают проницаемость клеточных мембран и сосудистой стенки. Результаты экспериментов по изучению влияния антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ и нанокompозитов на неферментные бактерицидные системы ПЯЛ при их совместном применении представлены на рисунке 16.

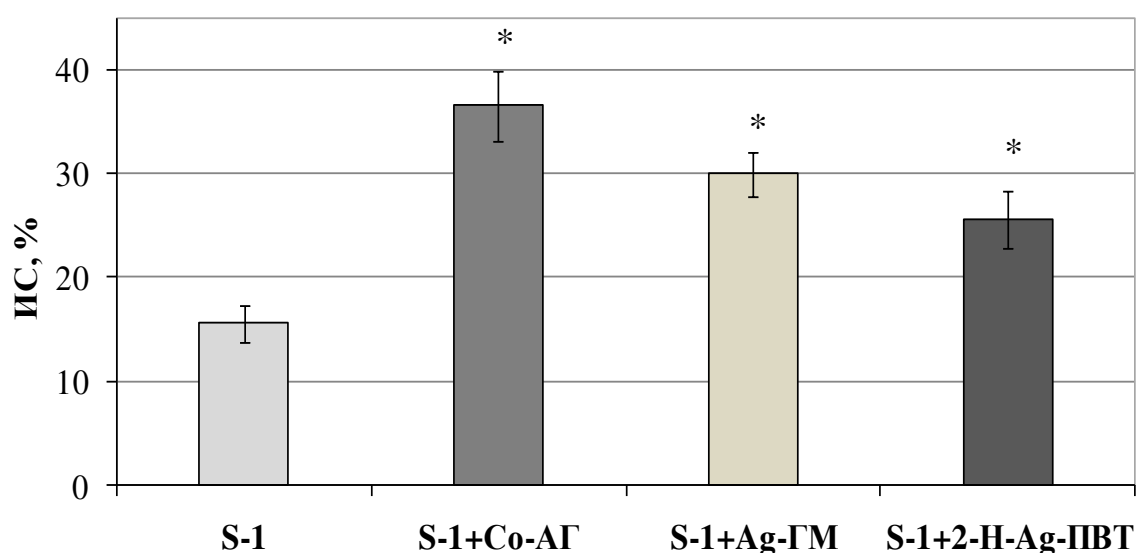


Рисунок 16 – Активация продукции НКБ в ПЯЛ морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,05$ по сравнению с антигенным препаратом S-1

Отмечено, что добавление к антигенному препарату S-1 нанокompозитов вызывает повышение уровня НКБ по ИС, значения которого превышали аналогичный показатель у фагоцитов, обработанных только антигенным препаратом S-1 в среднем в 2,0 раза ($P < 0,05$). Наиболее высокие показатели зарегистрированы при совместном использовании антигенного препарата S-1 с Co-АГ.

Результаты, изучения влияния металлосодержащих нанокompозитов на функциональное состояние фагоцитов морских свинок, полученные в условиях *in vitro*, свидетельствуют о достоверном стимулирующем эффекте исследованных образцов, который выражался в усилении выработки реактивных форм кислорода и азота, а также в повышенной дегрануляции НКБ в экстраклеточное пространство.

Важно отметить, что, несмотря на подъем показателей активации кислородозависимого энергетического метаболизма и кислороднезависимых механизмов, нанокompозиты, содержащие кобальт и серебро способствуют снижению в клетке высокотоксичных радикалов кислорода, посредством активации каталитической способности СОД.

3.4 Влияние антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с нанокompозитами на функциональное состояние клеток иммунофагоцитарной системы морских свинок в условиях *in vivo*

Ранее на модели мононуклеарных фагоцитов было показано, что по физико-химическим свойствам, способу применения, доступности и иммуномодулирующим свойствам нанокompозиты могут быть использованы в качестве эффективных компонентов вакцин [11, 12, 25]. Сведения о применении этих препаратов для иммуностимуляции при сибирской язве в доступной литературе отсутствуют.

Целью нашего исследования явилось сравнительное изучение показателей неспецифической резистентности, возникающей у морских свинок при введении им антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ *per se* и его же в сочетании с металлосодержащими нанокompозитами (кобальтарабиногалактан и ар-

гентогалактоманнан). Для достижения сопоставимости групп подопытных животных отбирали случайным образом – по 8 животных в группе. Препараты вводили животным однократно подкожно во внутреннюю поверхность бедра в 0,5 мл физиологического раствора в дозе: антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ – 100 мкг/кг (в расчете по белку), наноконпозиты Co-АГ и Ag-ГМ – 2 мг/кг (в перерасчете на содержание металла в образце 20 мкг/кг и 80 мкг/кг соответственно). Группе 1 – антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34 F₂, группе 2 – S-2 + Co-АГ, группе 3 – S-2 + Ag-ГМ. Контролем служили интактные морские свинки. Перитонеальный экссудат для исследования забирали на 3, 7, 14 и 21-е сут после иммунизации.

Известно, что система фагоцитов, являясь звеном быстрого реагирования, играет важнейшую роль в антибактериальной защите организма. От функциональной полноценности данных клеток во многом зависит генез, течение и исход многих патологических состояний. Помимо того, что реактивные формы кислорода, произведенные стимулированными фагоцитами, используются этими клетками для уничтожения поглощенных микроорганизмов, они могут вызывать множественное разрушение окружающих тканей, поэтому их образование должно быть отрегулированным [30, 66].

При изучении иммуногенных свойств антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ и его же в сочетании с наноконпозитами, установлена их способность стимулировать КЗМ фагоцитов морских свинок (Рисунок 17). В группе экспериментальных животных, которым вводился антигенный препарат S-2, наиболее высокие показатели активности КЗМ были отмечены на 3-и сут от момента иммунизации животных.

Проведенные исследования показали, что Co-АГ и Ag-ГМ оказывают иммунокорректирующее действие на активацию КЗМ фагоцитов во все сроки наблюдения, что может указывать на антиоксидантное действие этих наноконпозитов. Тем не менее показатели ИС между группой 2 и 3 только на 7-е и 21-е сут имели статистически значимые различия ($P < 0,05$).

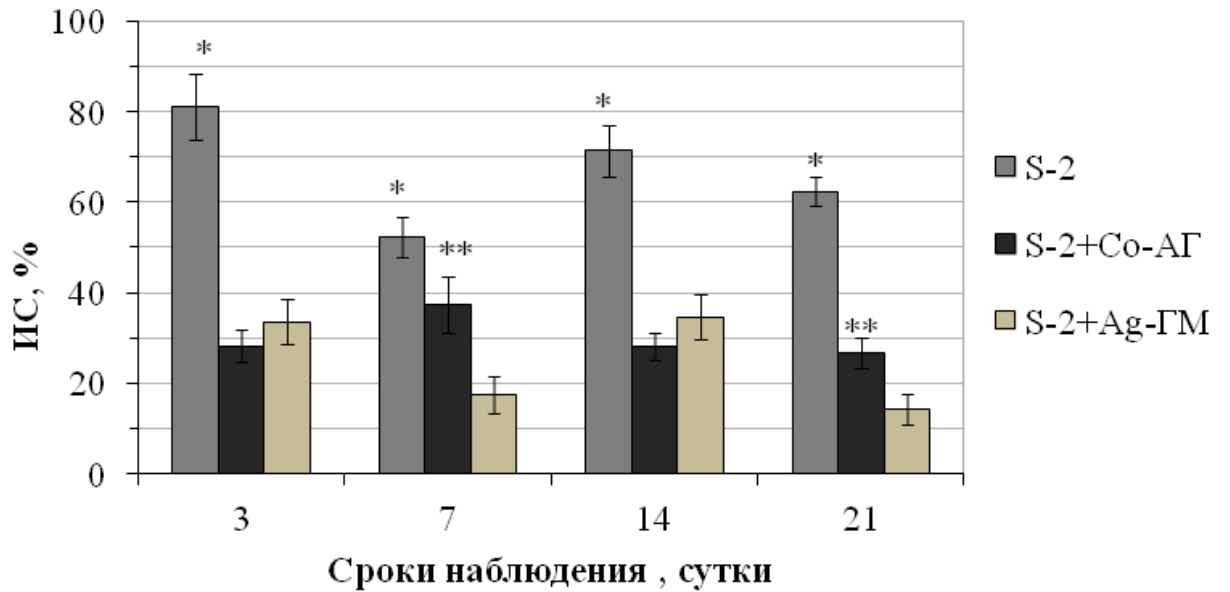


Рисунок 17 – Влияние экспериментальных препаратов на кислородзависимый метаболизм фагоцитов морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,05$ по сравнению с группами 2 и 3; ** – $P < 0,05$ по сравнению с группой 3

МПО является ведущей бактерицидной системой нейтрофилов, ферментной частью общей фракции катионных белков и ее исследование является уточняющим моментом системы фагоцитоза, направленной на структуры и обменные процессы микроорганизмов.

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что антигенные препараты S-2 и S-2 в сочетании с нанокompозитами способствуют повышению активности МПО в фагоцитах во все сроки наблюдения (Рисунок 18). Пик активности фермента выявлен на 14-е сут после инъекции препаратов. Однако антигенный препарат S-2 стимулирует КЗМ фагоцитов в большей степени, чем в сочетании нанокompозитами. Данное обстоятельство может указывать на способность Co-АГ и Ag-ГМ оказывать влияние на образование реактивных форм кислорода.

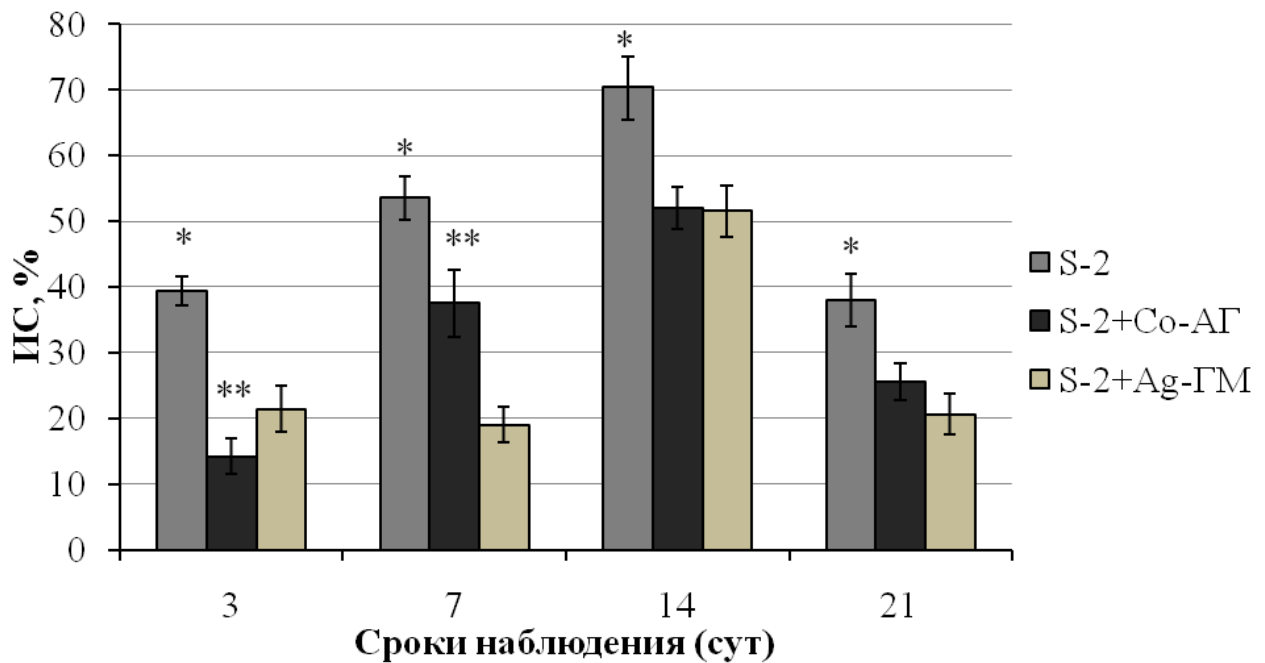


Рисунок 18 – Влияние экспериментальных препаратов на активность миелопероксидазы фагоцитов морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,05$ по сравнению с группами 2 и 3; ** – $P < 0,05$ по сравнению с группой 3

Известно, что НАДФ·Н-диафороза является специфическим маркером NO-синтазы и отражает состояние кислородзависимой микробицидности клеток иммунофагоцитарной системы. Эксперименты показали, что антигенный препарат S-2 и его сочетание с Co-AГ или Ag-ГМ стимулируют ($P < 0,05$) активность НАДФ·Н-диафорозы (Рисунок 19). При этом, активность НАДФ·Н-диафорозы в фагоцитах животных, иммунизированных антигенным препаратом S-2 в сочетании с нанокompозитами, была достоверно ниже, чем в случае применения S-2 только на 7-е и 14-е сут наблюдения ($P < 0,05$). Это свидетельствует о способности исследуемых нанокompозитов регулировать чрезмерную активность НАДФ·Н-диафорозы фагоцитов, которая может оказывать повреждающее действие на клетки макроорганизма. Достоверные различия между показателями ИС в группе экспериментальных животных 2 и 3 выявлены только на 3-и сут.

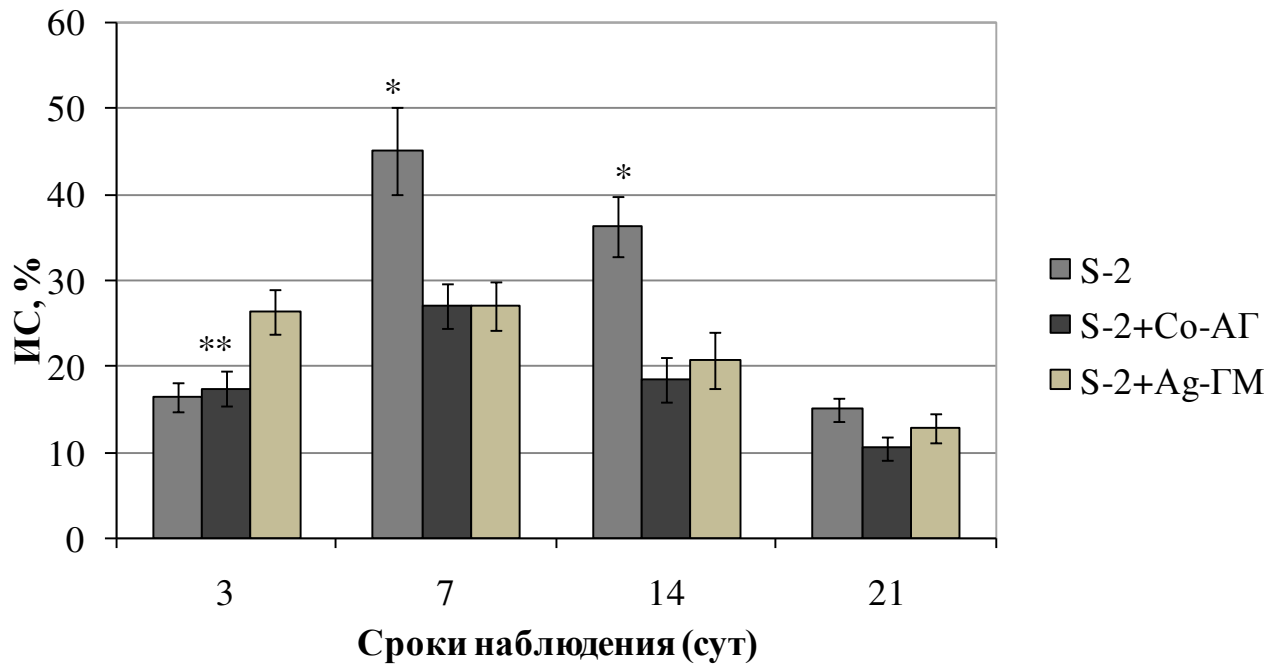


Рисунок 19 – Влияние экспериментальных препаратов на активность НАДФ·Н-диафоразы фагоцитов морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,05$ по сравнению с группами 2 и 3; ** – $P < 0,05$ по сравнению с группой 3

Известно, что неферментные катионные белки фагоцитов обладают бактерицидным действием. Эти протеины также являются медиаторами воспаления, факторами проницаемости, стимуляторами метаболических процессов и служат источником неспецифических опсоинов при фагоцитозе [30]. В связи с этим следующим этапом наших исследований была оценка действия антигенного препарата S-2 и его в сочетании с Co-AГ или Ag-ГМ на содержание неферментных катионных белков в фагоцитах морских свинок (Рисунок 20). При иммунизации морских свинок антигенным препаратом S-2 на 3-и сут выявлено увеличение содержания катионных белков с последующим снижением к 21-м суткам эксперимента. Показано, что в группе животных 2 и 3 на 7-е сут после иммунизации содержание НКБ в фагоцитах были в 1,5 – 1,9 раза выше, чем в группе 1. На 21-е сут наблюдения выявлено снижение этого показателя во всех группах.

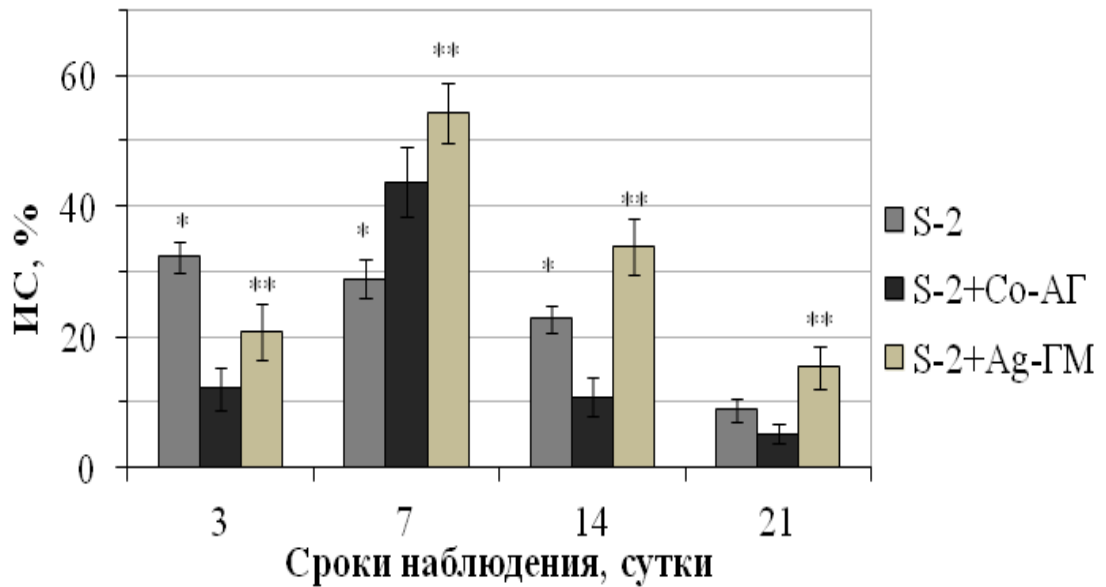


Рисунок 20 – Влияние экспериментальных препаратов на содержание неферментных катионных белков в фагоцитах морских свинок ($M \pm s$); * – $P < 0,05$ по сравнению с группами 2 и 3; ** – $P < 0,05$ по сравнению с группой 3

Таким образом, результаты комплексного исследования действия антигенного препарата сибирезвенного микроба на показатели функционального состояния ИКК экспериментальных животных, показали, что препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, а также металлосодержащие нанокompозиты активируют кислородзависимые и кислороднезависимые бактерицидные системы фагоцитов, синтез монооксида азота, и тем самым оказывают выраженное иммуномодулирующее действие, усиливая бактерицидный потенциал макроорганизма. Нанокompозиты, содержащие кобальт и серебро способствуют снижению в клетке высокотоксичных радикалов кислорода, посредством активации каталитической способности СОД.

Иммунизация экспериментальных животных антигенным препаратом S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с нанокompозитами кобальтарабиногалактаном и аргентогалактоманнаном способствует стимуляции бактерицидного потенциала фагоцитов. Вместе с тем, показано иммуномодулирующее действие

наноконпозитов, которое проявляется в регуляции активности ферментов кислородзависимого (МПО, НАДФ·Н-диафораза) и кислороднезависимого (НКБ) метаболизма фагоцитов.

Полученные в ходе экспериментов данные указывают на перспективность дальнейшего исследования антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с наноконпозитами с Со-АГ или Аg-ГМ.

ГЛАВА 4 ВЛИЯНИЕ АНТИГЕННОГО ПРЕПАРАТА СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА В СОЧЕТАНИИ С КОБАЛЬТАРАБИНОГАЛАКТАНОМ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК КРОВИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ

Для оценки иммуногенной эффективности и безопасности созданных препаратов, а также наноматериалов используют методы проточной цитофлуориметрии, которые основаны на считывании флуоресцентных сигналов с каждой клетки биологического образца, меченной моноклональными антителами к специфическим рецепторам или флюорохромными красителями. Методами проточной цитофлуориметрии изучаются клетки иммунной системы, которые являются наиболее чувствительными к повреждающему действию наноматериалов или иных факторов. Центральное место в иммунных реакциях организма принадлежит лимфоцитам. Количественное нарушение субпопуляций лимфоцитов приводит к развитию иммунодефицитных состояний. Рекомендовано проводить такие исследования, как: определение абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов, обеспечивающих развитие иммунного ответа, а также субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов (хелперов и цитотоксических лимфоцитов) при воздействии на клетки исследуемых препаратов [47].

Поскольку антигенный препарат из вакцинного штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с Со-АГ обладает способностью повышать неспецифические факторы иммунитета, то на следующем этапе исследований нами проведена оценка действия антигенного препарата S-2 как *per se*, так и его сочетанное применение с кобальтарабиногалактаном на функциональные особенности клеток

крови белых мышей. В частности на активацию Т- и В-лимфоцитов и апоптоз клеток крови белых мышей.

4.1 Действие антигенного препарата *B. anthracis* Sterne 34F₂ и кобальта-рабиногалактана на активацию Т-лимфоцитов белых мышей *in vitro*

Для изучения клеточного звена иммунной системы определяли следующие субпопуляции Т-лимфоцитов: общее содержание активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺), общее содержание активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD25⁺), популяции активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD25^{low} и CD3⁺CD4⁺CD25^{high}), активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD25⁺), нативные Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD25⁻), нативные цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD25⁻).

Результаты исследования показали, что антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ оказывает стимулирующее влияние на экспрессию CD25 Т-лимфоцитами (Таблица 6).

Таблица 6 – Характеристика экспрессии маркера активации CD25 Т-лимфоцитами крови, (Me (Q1-Q3)) из n = 7

Препарат	Показатель, %					
	CD3 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD25 ⁻	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁻
S-2	99,6 (94,9–99,6)**	2,4 (0,2–5,0)**	76,3 (71,3–79,9)**	1,85 (0,1–4,0)**	18,4 (17,4–21,4)**	0,4 (0–0,6)**
Со-АГ	22,1 (21,7–25,9)	77,9 (74,1–78,3)	17,7 (16,5–20,6)	60,6 (56,1–61,4)	4,5 (4,5–4,8)*	14,3 (14,0–15,7)
S-2 + Со-АГ	88,5 (85,4–96,6)**	11,5 (3,4–14,5)**	69,3 (51,4–72,9)**	10,6 (4,5–15,3)**	16,8 (15,4–19,3)**	1,1 (0,4–2,1)**
Контроль	23,6 (22,2–32,1)	76,4 (67,9–77,8)	18,2 (16,1–24,1)	60,8 (53,5–61,8)	5,4 (4,7–6,9)	13,9 (13,2–14,7)

Примечание: * – P < 0,05; ** – P < 0,01 по сравнению с контролем

Так, антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, а также в сочетании с нанокompозитом Со-АГ способствуют увеличению общей популяции активированных Т-клеток (CD3⁺CD25⁺) в среднем в 4,2 и 3,7 раза соответственно по срав-

нению с контролем ($P < 0,01$). Следует отметить, что соотношение активированных и неактивированных Т-клеток ($CD3^+CD25^+/CD3^+CD25^-$) в контроле составляет 1:3, а при воздействии антигенного препарата S-2 количество $CD3^+CD25^+$ клеток возрастает до 41:1 и антигенный препарат S-2 в сочетании с нанокompозитом – до 8:1. Проведенные исследования показали, что антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ и его же сочетание с Co-АГ приводят к достоверному увеличению концентрации Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности CD25. При сравнительном анализе действия нанокompозита Co-АГ, статистически достоверных изменений концентрации активированных Т-лимфоцитов не выявлено, тем не менее, зарегистрировано снижение уровня активированных $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов (Таблица 6).

У Т-хелперов отмечены существенные различия в степени экспрессии CD25 ($CD3^+CD4^+CD25^{low}$ и $CD3^+CD4^+CD25^{high}$) (Рисунок 21).

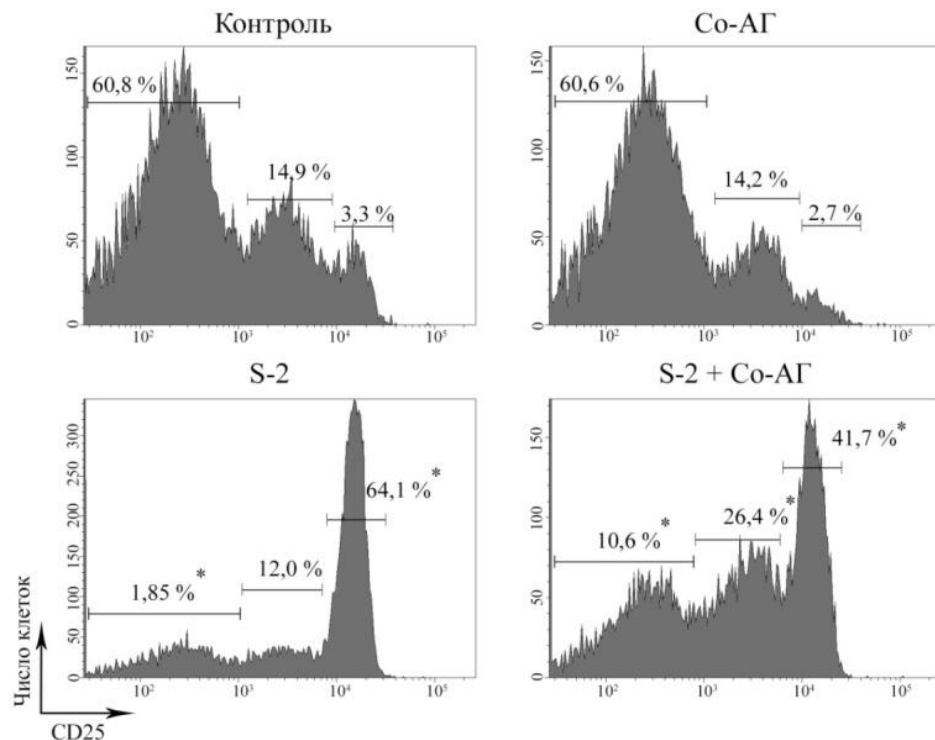


Рисунок 21 – Уровень экспрессии раннего маркера активации (CD25)

Т-хелперами (Me, %); * – $P < 0,01$ по сравнению с контролем

Например, под действием антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ наблюдалось увеличение общего содержания активированных Т-лимфоцитов за счет повышения CD3⁺CD4⁺CD25^{high}. Примирование клеток антигенным препаратом S-2 в сочетании с наноккомпозитом Co-АГ приводит к повышению как CD3⁺CD4⁺CD25^{low}, так и CD3⁺CD4⁺CD25^{high} клеток. Следует отметить, что антигенный препарат S-2 стимулирует экспрессию CD25 Т-лимфоцитами (CD3⁺CD25⁺) и их субпопуляциями (CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25^{high}) в большей степени (P < 0,01), чем сочетанное применение антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ с Co-АГ.

Показано, что в условиях *in vitro* антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ и его же сочетание с наноккомпозитом Co-АГ повышают пролиферативную и функциональную активность лимфоцитов, что подтверждается повышением экспрессии CD25⁺ на иммунокомпетентных клетках крови экспериментальных животных. Металлосодержащий наноккомпозит Co-АГ оказывает влияние на иммунологическую эффективность антигенного препарата S-2, что может указывать на перспективность использования Co-АГ в качестве адъюванта при конструировании химических вакцин.

4.2 Действие антигенного препарата *B. anthracis* Sterne 34F₂ и кобальтарабиногалактана на апоптоз клеток крови белых мышей *in vitro*

Известно, что суть иммунной реакции организма на антиген заключается в пролиферации и дифференцировке эффекторных лимфоцитов. Кроме того, не вызывает сомнения тот факт, что при иммунном ответе макроорганизма процессы пролиферации и апоптоза клеток тесно взаимосвязаны. Апоптозу эффекторных клеток, в частности Т-лимфоцитов, отводится особая роль в механизмах сохранения клеточного баланса и иммунорегуляции посредством снижения числа реактивных клеток [97, 129, 171]. Оценка степени апоптоза применяется для изучения физиологического состояния клеток при различных заболеваниях. Изучение механизмов регуляции различных этапов апоптоза с помощью проточной цитофлюориметрии позволяет определенным образом воздействовать на этот процесс с

целью его регуляции или коррекции [15].

Материалом для исследования воздействия антигенного препарата *B. anthracis* Sterne 34F₂ и кобальтарабиногалактана на апоптоз клеток крови *in vitro* служили лейкоциты, выделенные из гепаринизированной крови белых мышей. Клетки в концентрации 10⁶ (200 мкл) инкубировали в течение 30 мин с препаратами: S-2 (20 мкг в перерасчете на белок); Со-АГ (10 мкг); S-2 + Со-АГ (в тех же дозах). В качестве контроля использовали клетки интактных животных.

Жизнеспособность клеток оценивали на двухпараметрических графиках AnV/7-AAD и подсчитывали процент живых клеток (AnV⁻7-AAD⁻), клеток на стадии раннего (AnV⁺7-AAD⁻) и позднего (AnV⁺7-AAD⁺) апоптоза.

Анализ жизнеспособности клеток крови, примированных препаратами показал, что антигенный препарат S-2 и его же сочетание с Со-АГ способствуют повышению содержания AnV⁺7-AAD⁺ и одновременному снижению AnV⁻7-AAD⁻ и AnV⁺7-AAD⁻ общей популяции лимфоцитов, Т-лимфоцитов и их субпопуляций (Таблица 7).

Таблица 7 – Характеристика жизнеспособности клеток крови, примированных антигенными препаратами (Me (Q1-Q3)) из n = 7

Препарат	Показатель, %		
	AnV ⁻ 7-AAD ⁻	AnV ⁺ 7-AAD ⁻	AnV ⁺ 7-AAD ⁺
S-2	2,2 (0,4–2,7)*	0,5 (0,2–1,1)*	97,7 (95,2–99,2)*
Со-АГ	65,9 (63,7–67,3)	9,3 (8,4–11,7)	22,0 (20,0–25,7)
S-2 + Со-АГ	5,1 (2,0–8,1)*	0,7 (0,6–0,8)*	89,8 (87,4–96,3)*
Контроль	65,1 (58,2–66,3)	10,4 (9,4–12,4)	23,2 (21,5–32,1)

Примечание: * – P < 0,01 по сравнению с контролем

Так, отмечена корреляционная связь между клетками AnV⁺7-AAD⁺ и AnV⁻7-AAD⁻ ($r_s = -0,86$, P < 0,01). У клеток, примированных антигенным препаратом S-2, в отличие от нанокompозита Со-АГ, выявлена взаимосвязь AnV⁺7-AAD⁺ и AnV⁺7-AAD⁻ ($r_s = -0,90$, P < 0,01). Анализ экспрессии CD25 Т-лимфоцитами на разных стадиях апоптоза показал, что антигенный препарат S-2 и сочетанное

применение S-2 с Со-АГ способствуют снижению $AnV^{+7}-AAD^{+}$ и $AnV^{-7}-AAD^{-}$ нативных и жизнеспособных $CD25^{+}$ Т-лимфоцитов и их субпопуляций ($P < 0,01$). Вместе с тем, установлено повышение содержания клеток $CD3^{+}CD25^{+}$, $CD3^{+}CD8^{+}CD25^{+}$ и $CD3^{+}CD4^{+}CD25^{high}$ на стадии позднего апоптоза в 4, 3 и 20 раз соответственно по сравнению с контролем (20,6 (18,4 – 28,9); 4,5 (4,2 – 6,1); 3,2 (2,1 – 4,3); $P < 0,01$). Результаты исследования показали, что антигенный препарат S-2 и его сочетанное применение Со-АГ не влияют на содержание $CD3^{+}CD4^{+}CD25^{low} AnV^{+7}-AAD^{+}$. Установлено, что наноккомпозит Со-АГ не оказывает действие на процесс апоптоза клеток крови экспериментальных животных.

Корреляционный анализ показал наличие общих связей $CD3^{+}CD25^{+}$, примированных антигенным препаратом S-2 и S-2 в сочетании с Со-АГ, с $CD3^{+}AnV^{+7}-AAD^{-}$ ($r_s = - 0,89$, $P < 0,01$), $CD3^{+}CD4^{+}AnV^{-7}-AAD^{-}$ ($r_s = - 0,94$, $P < 0,01$), $CD3^{+}CD4^{+} AnV^{+7}-AAD^{-}$ ($r_s = - 0,77$, $P < 0,05$), а также индивидуальных корреляций с $CD3^{+}CD8^{+}AnV^{-7}-AAD^{-}$ ($r_s = - 0,84$, $P < 0,05$) в случае воздействия антигенного препарата S-2 и с $CD3^{+}CD4^{+}AnV^{+7}-AAD^{+}$ ($r_s = 0,96$, $P < 0,01$), $CD3^{+}CD8^{+}AnV^{+7}-AAD^{-}$ ($r_s = - 0,78$, $P < 0,01$), $CD3^{+}AnV^{+7}-AAD^{+}$ ($r_s = 0,96$, $P < 0,01$), $CD3^{+}AnV^{-7}-AAD^{-}$ ($r_s = 0,96$, $P < 0,01$) – антигенный препарат S-2 в сочетании с Со-АГ. У клеток крови, примированных наноккомпозитом Со-АГ, отмечены две корреляции: $CD3^{+}CD25^{+}$ с $CD3^{+}AnV^{+7}-AAD^{+}$ и $CD3^{+}CD4^{+}AnV^{+7}-AAD^{+}$ ($r_s = 0,96$, $P < 0,01$).

Таким образом, изучение нарушения асимметрии мембранных фосфолипидов клеток крови и экспрессии маркеров активации под действием антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ как *per se*, так и в сочетании с наноккомпозитом Со-АГ с помощью цитофлуориметрического теста позволяет оценить взаимосвязь между процессами пролиферации и активации апоптоза клеток. Полученные в ходе исследования данные указывают на перспективность применения как антигенного препарата S-2, так и S-2 в сочетании с Со-АГ для повышения резистентности организма экспериментальных животных к сибирской язве.

4.3 Воздействие антигенного препарата *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с кобальтарабиногалактаном на субпопуляционный состав В-лимфоцитов крови в условиях *in vivo*

Известно, что *B. anthracis* оказывает повреждающее действие на различные клетки макроорганизма (макрофаги, нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты), блокируя процессы пролиферации, синтеза/секреции цитокинов и иммуноглобулинов [250]. В связи с чем, одним из важнейших аспектов в изучении свойств антигенных препаратов *B. anthracis* и адьювантов является оценка иммунного статуса экспериментальных животных, в частности содержания различных циркулирующих клеточных линий В-лимфоцитов, как одного из критериев эффективности формирования гуморального иммунного ответа.

Незрелые В-лимфоциты, мигрирующие из костного мозга в селезенку для окончательного созревания, являются транзиторными и подразделяются на два типа (Т1 и Т2), однако в крови обнаруживаются только Т1. Рядом авторов было продемонстрировано, что из В-лимфоцитов Т1 лишь незначительная часть экспрессируют CD38 [133, 178], на основании чего CD38⁻CD138⁻-клетки можно отнести к популяции Т1.

Для достижения сопоставимости групп подопытных белых мышей отбирали случайным образом – по 48 животных в группе. Препараты вводили мышам однократно подкожно во внутреннюю поверхность бедра в 0,2 мл физиологического раствора в дозе: антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ – 100 мкг/кг (в перерасчете на по белок), нанокompозит Со-АГ – 2 мг/кг (в перерасчете на содержание металла в образце 20 мкг/кг). Группе 1 – антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, группе 2 – Со-АГ, группе 3 – S-2 + Со-АГ. Контролем служили интактные белые мыши (группа 4). Кровь для исследования забирала на 3, 7, 14 и 21-е сут после иммунизации. В каждой пробе анализировалось 10 000 событий CD19⁺-клеток. В рамках циркулирующей популяции В-лимфоцитов оценивали индекс содержания (Ис, %) клеточных линий: CD38⁻CD138⁻, CD38⁺CD138⁻

, CD38⁻CD138⁺, CD38⁺CD138⁺.

Фенотипический анализ субпопуляций В-лимфоцитов показал, что у животных группы 1 отмечалось статистически значимое снижение уровня этих клеток на 3-и и 14 – 21 сут после введения препарата (Рисунок 22).

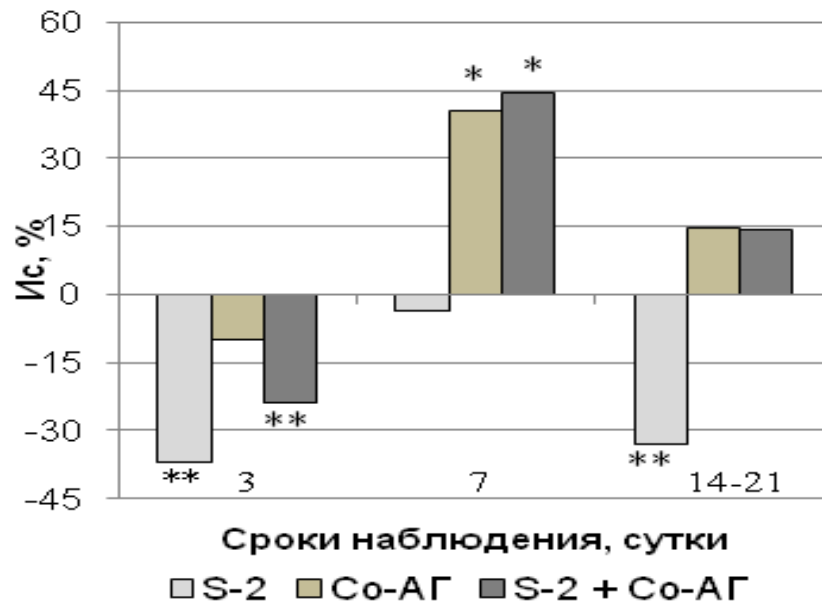


Рисунок 22 – Индекс содержания CD38⁻CD138⁻ – клеток в крови экспериментальных животных (Mean ± SD); * – P < 0,03; ** – P < 0,01 по сравнению с контролем

При инокуляции мышам Co-AG и S-2 + Co-AG наблюдалось повышение субпопуляций В-лимфоцитов на 7-е сут в среднем в 1,5 раза по сравнению с группами 1 (P = 0,016 и P = 0,015 соответственно) и 4 (P = 0,011 и P = 0,015). Следует отметить, что в случае применения S-2 + Co-AG у белых мышей на 3-и сут также регистрировалось снижение содержания CD38⁻CD138⁻ – клеток, что подтверждается отрицательными значениями Ис этих клеток относительно контроля.

Известно, что CD38 регулирует пролиферацию, выживание, активацию и апоптоз В-лимфоцитов в процессе их дифференцировки, а также участвует в передаче сигнала, опосредующего продукцию цитокинов [133, 228]. То есть CD38⁺CD138⁻-клетки представляют собой гетерогенную популяцию

В-лимфоцитов, включающую не только незрелые, но и зрелые покоящиеся и активированные В-лимфоциты.

Анализ полученных результатов показал наличие обратной тенденции изменений содержания $CD38^+CD138^-$ – клеток в отличие от транзиторных В-лимфоцитов. Обращает на себя внимание тот факт, что у мышей, инокулированных антигенным препаратом S-2, отмечалось повышение Ис $CD38^+$ -экспрессирующих В-клеток на 3-и и 14–21-е сут наблюдения после введения антигенного препарата (Рисунок 23).

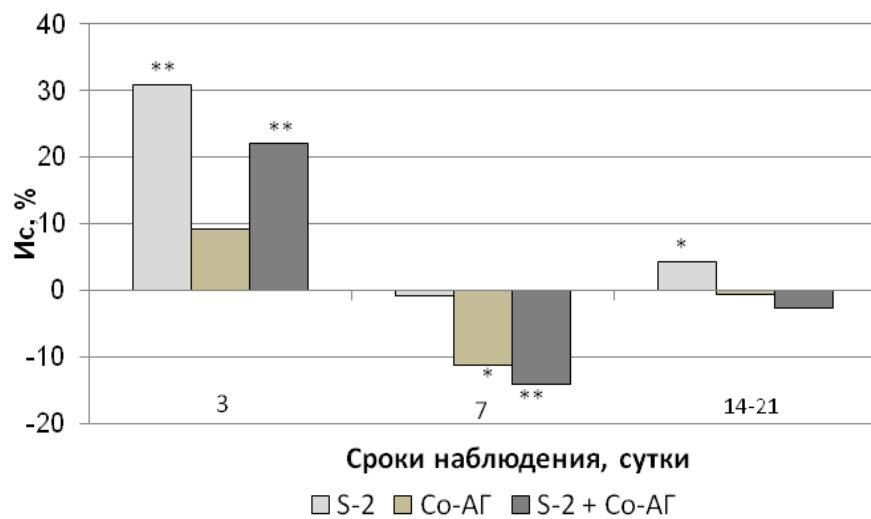


Рисунок 23 – Индекс содержания $CD38^+CD138^-$ – клеток в крови экспериментальных животных (Mean \pm SD); * – $P < 0,03$; ** – $P < 0,01$ по сравнению с контролем

Следует отметить, что антигенный препарат S-2 оказывал наиболее существенное влияние на уровень $CD38^-CD138^-$ – и $CD38^+CD138^-$ – клеток на 3-и сут по сравнению с антигенным препаратом S-2 в сочетании с Co-АГ ($P < 0,001$ и $P = 0,004$ соответственно) и на 14 – 21 сут – с антигенным препаратом S-2 в сочетании с Co-АГ ($P < 0,001$ и $P = 0,004$) и Co-АГ ($P = 0,002$ и $P = 0,30$).

Известно, что антигензависимая пролиферация и дифференцировка В-лимфоцитов происходит в периферических органах иммунной системы (селезенка и лимфатические узлы), вследствие которых образуются плазматические

клетки (ПК), секретирующие антитела. Циркулирующие ПК в периферической крови изучены недостаточно, поскольку их анализ затруднен из-за низкого содержания [95].

В связи с вышеизложенным, следующей задачей нашего исследования, являлась оценка воздействия антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, нанокompозита Со-АГ и их сочетанного применения на содержание ПК и их предшественников по экспрессии синдекана-1 (CD138) [201, 203]. Показано, что нанокompозит Со-АГ и его сочетание с антигенным препаратом S-2 способствуют повышению содержания CD38⁻CD138⁺ – клеток, относящихся к предшественникам ПК, в крови экспериментальных животных (Таблица 8).

Таблица 8 – Показатели содержания циркулирующих CD38⁻CD138⁺ и CD38⁺CD138⁺ В-лимфоцитов в динамике

Показатель, %	Сроки, сутки	Контроль	S-2	Со-АГ	S-2 + Со-АГ
CD38 ⁺ CD138 ⁺	3	1,86 ± 0,71 n = 35	2,0 (1,60-3,40) n = 19	2,16 ± 0,40 n = 6	1,48 ± 0,21 n = 6
	7			1,86 ± 0,67 n = 20	3,30 ± 1,63 n = 8 P = 0,026
	14		2,45 ± 1,16 n = 19 P = 0,032		1,97 ± 0,83 n = 20
	21		1,23 ± 0,35 n = 9 P = 0,012		
CD38 ⁻ CD138 ⁺	3	0,46 ± 0,21 n = 24	0,40 (0,01–0,7) n = 6	0,30 (0,22–0,65) n = 6	0,55 (0,50–0,60) n = 6
	7		0,10 (0,10–0,30) n = 22 P = 0,002	0,45 ± 0,38 n = 10	1,01 ± 0,52 n = 15 P < 0,001
	14			0,93 ± 0,54 n = 12 P = 0,003	
	21		0,30 (0,25–0,40) n = 12	0,37 ± 0,19 n = 10	0,42 ± 0,18 n = 10

Примечание: P – достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой. Данные представлены в виде Mean ± SD или Me (Q₂₅-Q₇₅).

Обнаружение в крови $CD38^+CD138^+$ В-лимфоцитов в группах 1 и 3 свидетельствует об увеличении концентрации не только плазмобластов, но и плазматических клеток. Примечательно, что у белых мышей, получивших антигенный препарат S-2, регистрировалось высокое содержание $CD38^+CD138^+$ – клеток на протяжении всего периода наблюдения, а так же снижение $CD38^-CD138^+$ – клеток на 7-е и 14-е сут.

Таким образом, показано действие антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ и его сочетанного применения с Со-АГ на содержание циркулирующих субпопуляций В-лимфоцитов. Так, антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ обладает способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов. А сочетанное применение антигенного препарата S-2 с Со-АГ оказывает влияние на количественные показатели плазматических клеток и их предшественников в крови экспериментальных животных, содержание которых различаются в динамике развития иммунного ответа.

Характер наблюдаемых изменений в случае применения антигенного препарата S-2 в сочетании с Со-АГ свидетельствует о модулирующем действии Со-АГ, что может указывать на перспективность его использования в качестве адьюванта при конструировании химических вакцин. Кроме того, *in vitro* антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ и его сочетанное применения с наноконструктом Со-АГ способствуют усилению пролиферативной и функциональной активности лимфоцитов, что подтверждается повышением экспрессии CD25 на иммунокомпетентных клетках крови экспериментальных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что белки S-слоя *B. anthracis* являются иммунодоминантными антигенами и могут использоваться в качестве дополнительных компонентов в химической сибирезвеной вакцине, при этом их роль в формировании иммунного ответа макроорганизма изучена недостаточно. Все это и определило необходимость всестороннего изучения действия этих белков на иммунокомпетентные клетки экспериментальных животных с применением современных методов, а задача получения сопоставимых данных обусловила проведение экспериментов по единому научно-методическому плану.

Объектом исследования избраны антигенные препараты, полученные из вакцинного штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ (S-1 и S-2), для повышения иммуногенных свойств антигенного препарата были апробированы наноструктурированные металлосодержащие композиты, любезно предоставленные сотрудниками ФГБУН Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН: кобальтарабиногалактан, аргентогалактоманнан, аргентополи-1-винил-1,2,4-триазол.

В исследованиях экспериментальных препаратов на токсичность установлено, что антигенные препараты S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в дозе от 0,05 до 0,4 мг/кг (в перерасчете на белок) вещества не оказывают токсического действия на макроорганизм экспериментальных животных. Препарат введенный подкожно в дозе 0,4 мг/кг не вызывал гибели экспериментальных животных; не зарегистрировано, по сравнению с исходной, повышения температуры и уменьшения массы тела; к 7-м сут исследования в месте введения препарата видимых изменений не выявлено.

Металлосодержащие композиты Co-АГ, Ag-ГМ и 2-Н-Ag-ПВТ при одно-

кратном подкожном введении морским свинкам и белым мышам в дозах 1, 10 и 100 мг (сухого вещества на кг веса) не вызывают повышения температуры, уменьшения массы тела и гибели экспериментальных животных, по сравнению с исходной.

Как известно, решающую роль в развитии приобретенного иммунного ответа играет стимуляция механизмов врожденного иммунитета. Что послужило большому вниманию ряда исследователей к поиску алгоритмов в разработке иммунобиологических препаратов, которые обеспечивают активацию механизмов врожденного иммунитета в развитии полноценного иммунного ответа на вакцинацию [34, 64, 80]. Поскольку фагоциты осуществляют антимикробную защиту организма, то течение и исход инфекционного заболевания во многом зависит от их функционального состояния [93]. Тестирование степени активности фагоцитирующих клеток и их функций, связанных с бактерицидной способностью, имеет прогностическое значение для характеристики гомеостаза, контроля над течением патологических процессов, эффективностью лечения, а также при испытании новых иммунобиологических препаратов.

В связи с этим, клетки системы мононуклеарных фагоцитов и ПЯЛ были выбраны в качестве модели для изучения действия антигенных препаратов *B. anthracis* и металлосодержащих нанокompозитов в условиях *in vitro* и *in vivo* на бактерицидные механизмы фагоцитоза (кислородзависимых и кислороднезависимых антимикробных систем фагоцитов) восприимчивых к сибирской язве экспериментальных животных – белых мышей и морских свинок.

Поскольку осуществление фагоцитоза клетками иммунофагоцитарной системы экспериментальных животных сопровождается увеличением потребления кислорода, повышением активности ферментов гексозомонофосфатного шунта, а также возрастающим образованием перекиси водорода и супероксиданиона в этих клетках [66, 94], то одним из этапов нашего исследования стало изучение влияния антигенных препаратов на функциональное состояние фагоцитов лабораторных животных.

Установлено, что примирование иммунокомпетентных клеток антигенными

препаратами S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в дозе 0,1 мг/мл вызывало активацию кислородзависимых бактерицидных систем фагоцитов. Анализ данных, полученных при изучении воздействия антигенных препаратов S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ на КЗМ экспериментальных животных в НСТ-тесте, позволил выявить стимулирующую способность исследованных препаратов. При этом наиболее высокие показатели НСТ-теста зарегистрированы в перитонеальных макрофагах, примированных антигенным препаратом S-2 (ИС в этом случае выше в 1,7 раза ($P < 0,05$) по сравнению с фагоцитами, стимулированными антигенным препаратом S-1).

Для выяснения вопроса, на какие ферментные системы кислородзависимого бактерицидного механизма фагоцитов оказывают влияние S-1 и S-2, исследовали активность Г-6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидазы, МПО и СОД. Главным ферментом респираторного взрыва является НАДФ·Н-оксидаза. Фермент, находящийся в фаголизосоме, в активированном состоянии преобразует кислород (O_2) в супероксидный анион-радикал (O_2^-), который играет важную роль в реализации микробицидного, цитотоксического и иммунорегуляторного действий фагоцитов [55, 66]. Показано, что антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, оказывает на активность НАДФ·Н-оксидазы перитонеальных макрофагов более выраженное стимулирующее воздействие (в 2,8 раза, $P < 0,05$), чем антигенный препарат S-1. В контрольных (нестимулированных) фагоцитах активность НАДФ·Н-оксидазы была в 1,6 раза ниже, чем в активированных антигенным препаратом S-2 ($P < 0,05$).

В процессе респираторного взрыва задействованы два альтернативных механизма: аппарат окисления (НАДФ·Н-оксидаза) и аппарат восстановления НАДФ – им служит гексозомонофосфатный шунт [86]. Г-6-ФДГ, являясь ферментом ГМФШ, катализирует начальную реакцию окисления глюкозо-6-фосфата, при которой акцептором водорода является НАДФ [66]. При взаимодействии антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ с фагоцитами выявлена стимуляция Г-6-ФДГ перитонеальных макрофагов экспериментальных животных (в 2,0 раза) по сравнению с антигенным препаратом S-1 ($P < 0,05$).

Образование O_2^- – это первый этап в серии реакций, которые сопровождаются образованием токсических продуктов O_2 . Например, O_2^- в присутствии Cu-Zn-супероксиддисмутазы, преобразуется в перекись водорода (H_2O_2), которая является субстратом миелопероксидазы – сильного антибактериального агента [55]. H_2O_2 обладает цитотоксическим действием, индуцирует апоптотическую гибель Т-лимфоцитов и других клеток. В связи с этим, на следующем этапе нашей работы мы проводили оценку действия антигенных препаратов S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ на активность СОД и МПО. Так, сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы ПМ, стимулированных антигенными препаратами S-1 и S-2, показал отсутствие статистически значимых различий между этими препаратами. При изучении активности миелопероксидазы ПЯЛ экспериментальных животных, под влиянием антигенных препаратов S-1 и S-2, установлено повышение активности данного фермента. Наиболее высокие показатели индекса стимуляции МПО зарегистрированы в случае применения S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ (более чем в 1,6 раз по сравнению с контрольными значениями, $P < 0,05$).

Образование оксида азота в фагоцитах является мощным антимикробным механизмом. В отличие от функции НАДФ·Н-оксидазы, необходимой для уничтожения внеклеточных микроорганизмов, попавших в фагосомы в результате фагоцитоза, действие NO направлено на микробы, находящиеся в цитозоле. Его синтез фагоцитирующими клетками связан с процессами регуляции пролиферации лимфоцитов и прямым микробицидным действием [55]. В литературе имеются сведения о том, что оксид азота и его метаболиты участвуют в регуляции окислительного фосфорилирования и продукции АФК в митохондриях [55] и выступают ингибиторами радикалов. Синтез NO рассматривается также как защитный механизм, направленный против цитотоксического действия фагоцитов, поскольку он ингибирует активацию ПЯЛ и активность НАДФ·Н-оксидазы [120]. Способность сибиреязвенного микроба вырабатывать собственные молекулы NO, играет важную роль в проявлении цитопатического действия сибиреязвенного токсина и выживаемости клеток *B. anthracis* в макрофагах. Исследования показали, что со-

держание метаболитов оксида азота (II) в ПМ белых мышей при стимуляции антигенными препаратами S-2 и S-1 незначительно превышали показатели в контрольной пробе (в 1,4 – 1,5 раза соответственно, $P < 0,05$), тем не менее, статистически значимых различий между антигенными препаратами не выявлено.

Неферментные катионные белки относятся к кислороднезависимой бактерицидной системе нейтрофильных гранулоцитов, являются системами, стимулирующими выброс антибактериальных факторов из нейтрофилов, а также процесс фагоцитоза. НКБ обладают прямым бактерицидным действием, основанным на нарушении структуры и функции мембран микробной клетки большинства микроорганизмов [187, 252]. Установлено повышение уровня НКБ в ПЯЛ под действием антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂. Так, показатели ИС фагоцитов в случае применения антигенного препарата S-2 были в 5,0 раз выше ($P < 0,05$) по сравнению с антигенным препаратом S-1 и 1,5 раза – значений в контроле ($P < 0,05$). Что может свидетельствовать об интенсивности выброса НКБ в межклеточное пространство у ПЯЛ, примированных антигенным препаратом S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂.

Результаты оценки действия антигенных препаратов S-1 и S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ показали их стимулирующее влияние на функционирование основных ферментных и неферментных антимикробных систем фагоцитов. В ходе исследований выявлен ряд достоверных отличий между препаратами S-1- и S-2 по степени влияния на метаболическую активность перитонеальных макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов. На наш взгляд, объяснением этому может служить наличие в антигенном препарате S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ иммуногенных полипептидов с молекулярной массой 91 кДа, которые соответствуют м. м. антигенов S-слоя сибиреязвенного микроба.

Таким образом, на основании полученных в ходе исследования данных выявлена способность антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ стимулировать активность ферментов кислородзависимого метаболизма фагоцитов (активность Г-6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидазы и МПО), а также содержания неферментных катионных белков иммунокомпетентными клетками эксперимен-

тальных животных в большей степени, чем в случае применения антигенного препарата S-1, и тем самым оказывать выраженное иммуномодулирующее действие, усиливая бактерицидный потенциал макроорганизма.

С целью подбора эффективных иммуномодуляторов на следующем этапе наших исследований мы провели комплексное сравнительное изучение воздействия металлосодержащих нанокompозитов (Co-АГ, Ag-ГМ и 2-Н-Ag-ПВТ) на кислородзависимые и кислороднезависимые бактерицидные механизмы фагоцитов экспериментальных животных. Сравнительный анализ данных, полученных в НСТ-тесте, показал, что все исследованные нанокompозиты оказывают стимулирующее воздействие на энергетический метаболизм фагоцитов, однако статистически значимых различий между ними не выявлено. Наиболее выраженным стимулирующим действием на активацию НАДФ·Н-оксидазы, по сравнению с контролем, обладали Co-АГ и 2-Н-Ag-ПВТ (ИС составил $48,3 \pm 6,6 \%$ и $46,6 \pm 2,2 \%$ соответственно, $P < 0,05$). Показано, что в случае применения нанокompозитов Co-АГ, Ag-ГМ и 2-Н-Ag-ПВТ зарегистрировано статистически значимое повышение активности Г-6-ФДГ по сравнению с контролем (в 1,4 – 1,8 раза, $P < 0,05$), что свидетельствует об усилении в фагоцитах окисления глюкозы в ГМФШ и о повышении скорости взаимопревращения $\text{НАДФ} \rightleftharpoons \text{НАДФ}\cdot\text{Н}$. Связанная с этим активация КЗМ обеспечивает ПМ более высокий уровень бактерицидной способности. Наибольшее потребление глюкозы фагоцитами зарегистрировано в случае макрофагов, примированных нанокompозитами Co-АГ и Ag-ГМ (ИС в этом случае выше в 2,3 раза ($P < 0,05$) по сравнению с фагоцитами, стимулированными 2-Н-Ag-ПВТ).

Выявлена тенденция к повышению продукции СОД фагоцитами, примированными Co-АГ или 2-Н-Ag-ПВТ (более чем в 1,3 раза по сравнению контрольными значениями, $P < 0,01$), увеличивая тем самым бактерицидный эффект в отношении патогенна. Следует отметить, что под воздействием нанокompозитов 2-Н-Ag-ПВТ и Co-АГ были отмечены наиболее высокие показатели активности этого фермента по сравнению с Ag-ГМ (в 1,8 – 2,3 раза соответственно, $P < 0,01$).

Показано, что все исследованные нанокompозиты повышают активность

МПО. Тем не менее, наиболее высокие показатели активности этого фермента обеспечивали Ag-ГМ и Со-АГ (в 2,3 раза, $P < 0,05$) по сравнению с 2-Н-Аг-ПВТ.

Сравнительный анализ действия нанокompозитов на нитроксидзависимую бактерицидную активность фагоцитов показал, что в ПМ, примированных Со-АГ, Ag-ГМ или 2-Н-Аг-ПВТ, регистрируется повышение продукции метаболитов оксида азота в 2,0 – 2,5 раза по сравнению с контролем ($P < 0,001$). Вместе с тем, достоверных различий между нанокompозитами Со-АГ, Ag-ГМ выявлены не были. Наиболее выраженную активацию неферментных катионных белков ПЯЛ наблюдали при воздействии на фагоциты Ag-ГМ и Со-АГ (в 1,4 – 1,7 раза соответственно по сравнению с контрольными значениями, $P < 0,05$).

Таким образом, при сравнительном изучении влияния металлосодержащих нанокompозитов в условиях *in vitro* на функциональное состояние клеток морских свинок установлено, что Со-АГ, Ag-ГМ или 2-Н-Аг-ПВТ способствуют повышению ИС ферментов окислительного взрыва (Г-6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидаза, СОД и МПО), оказывают стимулирующее воздействие на продукцию NO и НКБ в фагоцитах по сравнению с контролем.

На примере антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ была проведена оценка эффективности использования нанокompозитов с целью усиления его иммуногенных свойств, поскольку препарат S-1 не содержит антигенов *B. anthracis* с молекулярной массой 83 и 91 кДа.

Показано, что Со-АГ, Ag-ГМ, а также 2-Н-Аг-ПВТ в сочетании с антигенным препаратом S-1 оказывают стимулирующее воздействие на КЗМ перитонеальных макрофагов морской свинки. В наибольшей степени это выражено при использовании антигенного препарата S-1 в сочетании с Ag-ГМ (в 3,2 раза, $P < 0,05$) по сравнению с антигенным препаратом S-1 *per se* и в 2,4 раза по сравнению с нестимулированными фагоцитами ($P < 0,05$). Антигенный препарат S-1 в сочетании с Со-АГ или с Ag-ГМ стимулирует активацию НАДФ·Н-оксидазы фагоцитов в большей степени, чем препарат S-1 в сочетании с 2-Н-Аг-ПВТ (в 1,8 раз, $P < 0,05$). Установлено, что в случае сочетанного применения нанокompозитов с антигенным препаратом S-1 зарегистрировано статистически значимое повышение ак-

тивности Г-6-ФДГ по сравнению с контролем (в 1,3 – 1,8 раза, $P < 0,05$), что свидетельствует об усилении в фагоцитах окисления глюкозы в ГМФШ.

Выявлена тенденция к повышению продукции СОД фагоцитами, примированными нанокompозитами в сочетании с антигенным препаратом S-1 (более чем в 1,3 раза по сравнению контрольными значениями, $P < 0,05$), увеличивая тем самым бактерицидный эффект в отношении патогенна. Наиболее высокие показатели активности МПО обеспечивали сочетанное применение антигенного препарата S-1 с Ag-ГМ или Со-АГ (в 1,4 и 1,5 раза соответственно, $P < 0,05$).

Изучение влияния антигенного препарата S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с нанокompозитами на продукцию NO₂⁻ ПМ экспериментальных животных показало, что антигенный препарат S-1 как *per se*, так и при сочетанном применении с нанокompозитами, оказывает стимулирующее воздействие на продукцию NO перитонеальных макрофагов (в 1,4 – 2,4 раза по сравнению с контролем, $P < 0,05$). Наиболее высокие показатели ИС продукции метаболитов оксида азота в перитонеальных макрофагах морских свинок обеспечивали антигенный препарат S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с Ag-ГМ, а также сам препарат S-1 (в 2,4 раза превосходя контрольные значения, $P < 0,05$). Однако, при совместном применении антигенного препарата S-1 с Со-АГ или с 2-Н-Аг-ПВТ выявлено ингибирующее действие нанокompозитов на продукцию NO по сравнению с антигенным препаратом S-1 (в 1,4 и 1,7 раза соответственно, $P < 0,05$). Все нанокompозиты повышали уровень содержания НКБ (в 1,3 раза по сравнению с антигенным препаратом S-1 *per se*), усиливая бактерицидную способность антигенного препарата S-1.

Таким образом, нанокompозиты Со-АГ, Ag-ГМ или 2-Н-Аг-ПВТ в сочетании с антигенным препаратом S-1 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ *in vitro* стимулируют неспецифическую резистентность организма при участии кислородзависимых и кислороднезависимых бактерицидных систем фагоцитов экспериментальных животных. Со-АГ и Ag-ГМ оказывают выраженное иммуномодулирующее действие, усиливая бактерицидный потенциал макроорганизма. Следует отметить, что применение антигенного препарата S-1 совместно с нанокompозитами,

оказывает разнонаправленное действие на бактерицидные механизмы фагоцитов. По результатам всех проведенных исследований установлено, что наноконпозиты Со-АГ и Ag-ГМ обладают наиболее выраженными иммуногенными свойствами. На основании чего для дальнейших исследований были отобраны эти наноконпозиты.

На основании проведенных исследований, сделаны выводы о перспективности дальнейшего исследования антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, а также его сочетанного применения с металлосодержащими наноконпозитами Со-АГ и Ag-ГМ. Важно отметить, что иммуногенные свойства S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, а также его сочетанного применения с металлосодержащими наноконпозитами Со-АГ и Ag-ГМ были подтверждены в исследованиях по изучению их протективной активности, которые проводились в рамках плановой темы НИР «Изучение иммуногенных свойств препарата на основе поверхностных структур сибиреязвенного микроба с иммуномодуляторами» с № ГР 01200806999 (2009-2013 гг.) и результатами темы НИР 7.10. «Изучение иммуномодулирующего действия нанобиоконпозитов природного происхождения для повышения неспецифической резистентности макроорганизма», выполняемой в рамках Отраслевой программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (2011-2015 гг.).

Следующим этапом наших исследований стало изучение действия антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ как *per se*, так и в сочетании с наноконпозитами (Со-АГ и Ag-ГМ) в условиях *in vivo* на модели морских свинок. В частности проведены комплексные исследования по изучению иммуногенных свойств препарата, которые демонстрируют их способность влиять на бактерицидные механизмы фагоцитоза (НСТ-тест, активность НАДФ-Н-диафоразы, миелопероксидазы и НКБ). Результаты показали, что антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ оказывает стимулирующее воздействие на выработку активных форм кислорода в макрофагах, что выражалось в высоких значениях ИС во все сроки (3, 7, 14 и 21 сут) наблюдения животных (ИС составил в среднем

67,3 %). Пик окислительной активности ($81,0 \pm 7,3$ %) приходился на 3 сут после инъекции препарата, в последующие сроки имело место постепенное снижение количества формазанположительных клеток, характеризующих выраженность КЗМ в фагоцитах иммунных животных. В группах животных, иммунизированных S-2 + Ag-ГМ и S-2 + Со-АГ, ИС составлял в среднем 25,0 и 30,1 % соответственно. Проведенные исследования показали, что Со-АГ и Ag-ГМ также как и в опытах *in vitro* оказывают иммунокорректирующее действие на активацию КЗМ фагоцитов во все сроки наблюдения.

Установлено, что все исследованные препараты повышают активность миелопероксидазы ПЯЛ морских свинок. Наиболее высокие показатели активности фермента выявлены на 14-е сут после инъекции препаратов (в среднем на 58,0 %, по сравнению с контролем). При сочетанном применении антигенного препарата S-2 с нанокompозитами Со-АГ и Ag-ГМ наблюдается ингибирование активности МПО по сравнению с моноприменением антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂.

При иммунизации морских свинок антигенным препаратом S-2 *per se* и его же в сочетании с Со-АГ или Ag-ГМ на 3, 7 и 14 сут после вакцинации отмечено повышение активности НАДФ·Н-диафоразы под воздействием экспериментальных препаратов. При этом только на 7-е и 14-е сут наблюдения активность НАДФ·Н-диафоразы в фагоцитах животных, иммунизированных антигенным препаратом S-2 в сочетании с Со-АГ или с Ag-ГМ, была достоверно ниже, чем в случае применения антигенного препарата S-2 *per se* ($P < 0,05$), что указывает на способность Со-АГ и Ag-ГМ регулировать чрезмерную активность НАДФ·Н-диафоразы фагоцитов.

Сравнительный анализ полученных данных между группами обследованных экспериментальных животных в зависимости от использованного для исследования *in vivo* препарата, показал, что антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в сочетании с нанокompозитом Ag-ГМ несколько превосходит антигенный препарат S-2 *per se* и значительно – антигенный препарат S-2 в сочетании с Со-АГ по интенсивности влияния на продукцию НКБ ($P < 0,05$). Так,

заметный прирост содержания НКБ в ПЯЛ морских свинок наблюдался на 7-е сут после иммунизации животных во всех группах с последующим снижением к 21-м сут эксперимента ($P < 0,05$). Группа животных, которым антигенный препарат S-2 вводили одновременно с наноккомпозитом Ag-ГМ, на 14 – 21 сут после вакцинации по интенсивности продукции НКБ превосходила группу животных, получивших антигенный препарат S-2 совместно с Со-АГ в 3,0 раза ($P < 0,05$), что свидетельствует о способности Ag-ГМ оказывать иммуномодулирующее действие.

Таким образом, в процессе иммуногенеза антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, а также антигенный препарат S-2 в сочетании с наноккомпозитом кобальтарабиногалактаном или аргентогалактоманнаном, стимулируют выработку активных форм кислорода в макрофагах, повышают активность миелопероксидазы, НАДФ·Н-диафоразы в фагоцитах морских свинок, способствуют повышению содержания неферментных катионных белков, тем самым усиливая бактерицидный потенциал фагоцитов. Показано иммуномодулирующее действие наноккомпозитов, которое проявляется в регуляции активности ферментов кислородзависимого (МПО, НАДФ·Н-диафораза) и кислороднезависимого (НКБ) метаболизма клеток иммуннофагоцитарной системы. При этом в исследованиях по изучению бактерицидных механизмов фагоцитов экспериментальных животных нами показано, что Со-АГ обладал значительным преимуществом перед Ag-ГМ (активность Г-6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидазы, СОД, продукция NO и НКБ).

Имеющиеся в настоящее время в литературе сведения из-за их разрозненности и недостаточности сравнительных данных не позволяют пока определить роль поверхностных структур *B. anthracis* в активации иммунокомпетентных клеток. Для решения данной проблемы необходимость комплексного сравнительного исследования является очевидной. В связи с чем, следующим этапом наших исследований стало изучение действия антигенного препарата сибиреязвенного микроба и кобальтарабиногалактана на функциональные особенности Т- и В-лимфоцитов белых мышей.

Известно, что ранний маркер активации Т-лимфоцитов (CD25) является высокоаффинным рецептором к ИЛ-2, который в свою очередь усиливает пролифе-

рацию Т-лимфоцитов [64]. Нами исследовано действие антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, нанокompозита Co-АГ, а также их сочетанного применения на продукцию CD25 лимфоцитами крови белых мышей *in vitro*. Получены данные, свидетельствующие о способности антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ оказывать стимулирующее влияние на экспрессию CD25. Так, антигенный препарат S-2 *per se* и в сочетании с Co-АГ способствуют увеличению общей популяции активированных Т-клеток (CD3⁺CD25⁺) в среднем в 4,2 и 3,7 раза соответственно по сравнению с контролем (P < 0,05).

Сравнительный анализ полученных данных, показал, что антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, как *per se*, так и в сочетании с нанокompозитом Co-АГ, приводят к достоверному увеличению экспрессии раннего маркера активации CD25 на CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ лимфоцитах (P < 0,01) в среднем в 3,6 раза по сравнению с контролем, свидетельствующее об участии в иммунном ответе, как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-лимфоцитов. Изучение влияния нанокompозита Co-АГ на продукцию раннего маркера активации Т-лимфоцитами, показало, что статистически достоверных изменений концентрации активированных Т-лимфоцитов не выявлено, тем не менее, зарегистрировано снижение уровня активированных цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с контролем (в 1,3 раза, P < 0,05).

Известно, что в регуляции иммунного ответа на внедрение патогена существенная роль отводится популяции Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD25^{high} (регуляторные Т-хелперы), поэтому следующим разделом нашей работы стала идентификация этой популяции в образцах клеток крови, примированных антигенным препаратом S-2 и S-2 в сочетании с Co-АГ. Выявлены статистически значимые (P < 0,01) различия содержания CD3⁺CD4⁺CD25^{high} Т-лимфоцитов по сравнению с контролем, которые характеризовались увеличением популяции регуляторных клеток. В ходе эксперимента выявлена тенденция антигенного препарата S-2 стимулировать экспрессию CD25 Т-лимфоцитами (CD3⁺CD25⁺) и их субпопуляциями (CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25^{high}) в большей степени (P < 0,01), чем S-2 в сочетании с Co-АГ.

Таким образом, изучение действия антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ и кобальтарабиногалактана на активацию Т-лимфоцитов белых мышей *in vitro* показало, что антигенный препарат S-2 и его же сочетание с наноккомпозитом Со-АГ повышают пролиферативную и функциональную активность лимфоцитов, что подтверждается повышением экспрессии CD25⁺ на иммунокомпетентных клетках крови экспериментальных животных. Металлосодержащий наноккомпозит Со-АГ оказывает влияние на иммунологическую эффективность антигенного препарата S-2, что может указывать на перспективность использования Со-АГ в качестве адъюванта при конструировании химических вакцин.

Апоптоз лимфоцитов – важнейший механизм иммунорегуляции от момента созревания и дифференцировки иммунокомпетентных клеток до этапа реализации механизмов врожденного и адаптивного иммунитета. Известно, что летальный токсин *B. anthracis* вызывает апоптоз макрофагов [114, 146, 250]. Однако, участие в реализации программы апоптоза поверхностных белков сибиреязвенного микроба, до настоящего времени не подтверждено. Нами впервые в модельной системе *in vitro* с применением проточной цитофлуориметрии получены данные о влиянии антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, кобальтарабиногалактана и их сочетанного применения на развитие апоптоза лейкоцитов крови белых мышей.

Исследование жизнеспособности клеток крови, примированных препаратами показало, что антигенный препарат S-2 и его же сочетание с Со-АГ способствуют повышению содержания клеток в стадии позднего апоптоза (в 4,2 и 3,8 раза соответственно, $P < 0,01$) и одновременному снижению жизнеспособных клеток (32,5 и 13,0 раза соответственно, $P < 0,01$) и клеток в стадии раннего апоптоза (20,0 и 14,3 раза соответственно, $P < 0,01$) по сравнению с контролем общей популяции лимфоцитов, Т-лимфоцитов и их субпопуляций. Анализ экспрессии CD25 Т-лимфоцитами на разных стадиях апоптоза показал, что антигенный препарат S-2 и S-2 + Со-АГ способствуют снижению количества клеток в стадии позднего апоптоза и жизнеспособных клеток нативных и жизнеспособных CD25⁺ Т-лимфоцитов и их субпопуляций ($P < 0,01$). Вместе с тем, установлено повыше-

ние содержания активированных Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов и популяции активированных Т-хелперов ($CD25^{high}$) на стадии позднего апоптоза в 4,0, 3,0 и 20,0 раз соответственно по сравнению с контролем ($P < 0,01$). Результаты исследования показали, что препараты S-2 и S-2 + Co-АГ не влияли на содержание $CD3^+CD4^+CD25^{low}AnV^+7-AAD^+$. Установлено, что нанокompозит Co-АГ сам по себе не оказывает статистически значимого действия, по сравнению с контролем, на процесс апоптоза лимфоцитов крови экспериментальных животных.

На следующем этапе наших исследований мы оценивали взаимосвязь между процессами пролиферации и активации апоптоза клеток под влиянием антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, Co-АГ и их сочетания. Сравнительный анализ полученных данных, показал, что антигенный препарат S-2 и его сочетанное применение с нанокompозитом Co-АГ оказывают однонаправленное действие на процессы пролиферации и активации апоптоза клеток крови белых мышей. Так, было установлено, что при увеличении содержания активированных Т-лимфоцитов происходит уменьшение количества Т-лимфоцитов (общей популяции) ($r_s = -0,89$, $P < 0,01$) и Т-хелперов, находящихся в стадии раннего апоптоза ($r_s = -0,77$, $P < 0,05$), а также уменьшение количества жизнеспособных Т-хелперов ($r_s = -0,94$, $P < 0,01$).

Отмечены индивидуальные корреляции при изучении действия антигенного препарата S-2 и на клетки крови белых мышей. Проведенные исследования показали, что при увеличении содержания активированных Т-лимфоцитов происходит уменьшение количества жизнеспособных цитотоксических Т-лимфоцитов ($r_s = -0,84$, $P < 0,05$). При воздействии антигенного препарата S-2 совместно с Co-АГ отмечено, что увеличение количества активированных Т-лимфоцитов ведет к увеличению Т-лимфоцитов (общей популяции) ($r_s = 0,96$, $P < 0,01$) и Т-хелперов, находящихся в стадии позднего апоптоза ($r_s = 0,96$, $P < 0,01$); а также к увеличению жизнеспособных Т-лимфоцитов (общей популяции) ($r_s = 0,96$, $P < 0,01$). При этом отмечено уменьшение количества цитотоксических Т-лимфоцитов в стадии раннего апоптоза ($r_s = -0,78$, $P < 0,01$). У клеток крови, примированных нанокompо-

зитом Со-АГ, отмечены две корреляции: увеличение количества активированных Т-лимфоцитов ведет к увеличению Т-лимфоцитов (общей популяции) и Т-хелперов, находящихся в стадии позднего апоптоза ($r_s = 0,96$, $P < 0,01$).

Основная функция В-клеток – эффекторное участие в гуморальных иммунных реакциях, дифференциация в результате антигенной стимуляции в плазматические клетки, продуцирующие антитела [64]. В связи с чем, следующим этапом наших исследований стало изучение действия антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ как *per se*, так и в сочетании с нанокompозитом Со-АГ на субпопуляционный состав В-лимфоцитов крови в условиях *in vivo*.

Фенотипический анализ субпопуляций В-лимфоцитов показал постепенное уменьшение содержания CD38⁻CD138⁻-клеток в крови у белых мышей всех экспериментальных групп. У животных, иммунизированных антигенным препаратом S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, отмечалось статистически значимое снижение уровня этих клеток на 3-и и 14 – 21-е сутки (40,0 и 33,0 % соответственно). Показано, что при инокуляции мышам нанокompозита Со-АГ и антигенного препарата S-2 совместно с Со-АГ наблюдалось повышение данного показателя на 7-е сутки в среднем в 1,45 раза по сравнению с животными, иммунизированными антигенным препаратом S-2 ($P = 0,016$ и $P = 0,015$ соответственно) и контролем ($P = 0,011$ и $P = 0,015$).

Известно, что CD38⁺CD138⁻-клетки представляют собой гетерогенную популяцию В-лимфоцитов, включающую не только незрелые, но и зрелые покоящиеся и активированные В-лимфоциты. CD38 регулирует пролиферацию, выживание, активацию и апоптоз В-лимфоцитов в процессе их дифференцировки, а также участвует в передаче сигнала, опосредующего продукцию цитокинов [133, 228]. Нами при сравнительном анализе полученных результатов выявлена обратная тенденция изменений содержания CD38⁺CD138⁻-клеток в отличие от транзиторных В-лимфоцитов. Так, в группе белых мышей, иммунизированных антигенным препаратом S-2, отмечалось повышенное содержание CD38⁻экспрессирующих В-клеток на 3-и и 14 – 21-е сут наблюдения (31 и 3 % соответственно). Следует отметить, что антигенный препарат S-2 оказывал наиболее су-

щественное влияние на уровень CD38⁻CD138⁻ и CD38⁺CD138⁻-клеток на 3-и и 14 – 21-е сут ($P < 0,001$ и $P = 0,004$) по сравнению с антигенным препаратом S-2 в сочетании с Со-АГ и с наноккомпозитом Со-АГ на 14 – 21 сут ($P = 0,002$ и $P = 0,30$).

Нами исследовано действие антигенного препарата S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, наноккомпозита Со-АГ, а также их сочетанного применения на содержание плазматических клеток и их предшественников по экспрессии CD138. Установлено, что наноккомпозит Со-АГ и его сочетанное применение с антигенным препаратом S-2 способствуют повышению содержания CD38⁻CD138⁺-клеток, относящихся к предшественникам ПК, в крови экспериментальных животных. Например, Со-АГ повышал содержание CD38⁻CD138⁺-клеток на 14 сут в среднем в 2,0 раза ($P = 0,003$) по сравнению с контролем, а его сочетанное применение с антигенным препаратом S-2 на 7 – 14-е сут в 2,2 раза ($P = 0,001$). Анализ экспрессии CD138 в лимфоцитах крови белых мышей, получивших антигенный препарат S-2 и S-2 в сочетании с Со-АГ, свидетельствует об увеличении концентрации не только плазмобластов, но и плазматических клеток. Отмечено, что у белых мышей, получивших S-2, регистрировалось достоверно высокое содержание CD38⁺CD138⁺-клеток на 14 – 21-е сут наблюдения (в 1,3 раза, $P = 0,039$ по сравнению с контролем), а так же снижение CD38⁻CD138⁺-клеток на 7-е и 14-е сут (в 4,6 раза, $P = 0,002$ по сравнению с контролем).

Таким образом, антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ обладает способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов. Наноккомпозит Со-АГ проявляет адьювантные свойства, способствующие повышению иммуногенных свойств антигенного препарата S-2. Антигенный препарат S-2 и его сочетанное применение с Со-АГ оказывают влияние на содержание плазматических клеток и их предшественников в крови экспериментальных животных, тем не менее, их количественные показатели зависят от сроков наблюдения. Характер выявленных изменений в случае применения антигенного препарата в сочетании с наноккомпозитом свидетельствует о модулирующем действии Со-АГ, что подтверждает перспективность его использования в качестве

адъюванта при конструировании химических вакцин.

Установлено непосредственное участие антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ в механизмах пролиферации иммунокомпетентных клеток и модуляции апоптоза, регулирующего численное соотношение В- и Т-клеток в популяции лимфоцитов на разных стадиях формирования адаптивного иммунитета.

Кратко резюмируя изложенные выше материалы, можно констатировать, что по совокупности проведенных исследований антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ обладает выраженной иммуногенной активностью. Безусловно, важен факт успешного применения этого антигенного препарата в качестве средства, повышающего резистентность организма экспериментальных животных в отношении *B. anthracis*. С учетом данных литературы об иммуногенных свойствах антигенов S-слоя сибиреязвенного микроба, материалов о роли *B. anthracis* на неспецифическую резистентность организма экспериментальных животных представляется возможным гипотетически сформулировать комплекс факторов, обеспечивающих иммунокорректирующее действие антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ на иммунокомпетентные клетки макроорганизма.

На основании вышеизложенного и данных литературы нами предложена концептуальная схема закономерностей изменений функционального состояния клеток иммунной системы под действием антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ *per se* и в сочетании с Со-АГ (Рисунок 24), суть которой состоит в следующем: антигенный препарат S-2 повышает активность образования метаболитов кислорода, миелопероксидазы, НАДФ·Н-диафоразы и содержание неферментных катионных белков, обеспечивая высокий уровень бактерицидной способности фагоцитов; нанокompозит Со-АГ оказывает иммуномодулирующее действие, которое проявляется в регуляции активности ферментов кислородзависимого и кислороднезависимого метаболизма фагоцитов. В процессе иммуногенеза, вызванного антигенным препаратом S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, а также его сочетанным применением с Со-АГ, активируется пролиферация иммунокомпетентных клеток и модуляция апоптоза.

Активированные моноциты синтезируют ИЛ-1 α , оказывающий аутокринное действие, а также способствующий активации Т-лимфоцитов, синтезирующих В-клеточный ростовой фактор (ИЛ-4). ФНО- α действуя синергично с ИЛ-12, повышает функциональную активность цитотоксических Т-лимфоцитов и их способность к разрушению инфицированных бактериями клеток, что ведет к элиминации возбудителя. В процессе иммуногенеза, вызванного антигенным препаратом S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂, а также его сочетанным применением с Со-АГ, активируется пролиферация иммунокомпетентных клеток и модуляция апоптоза.

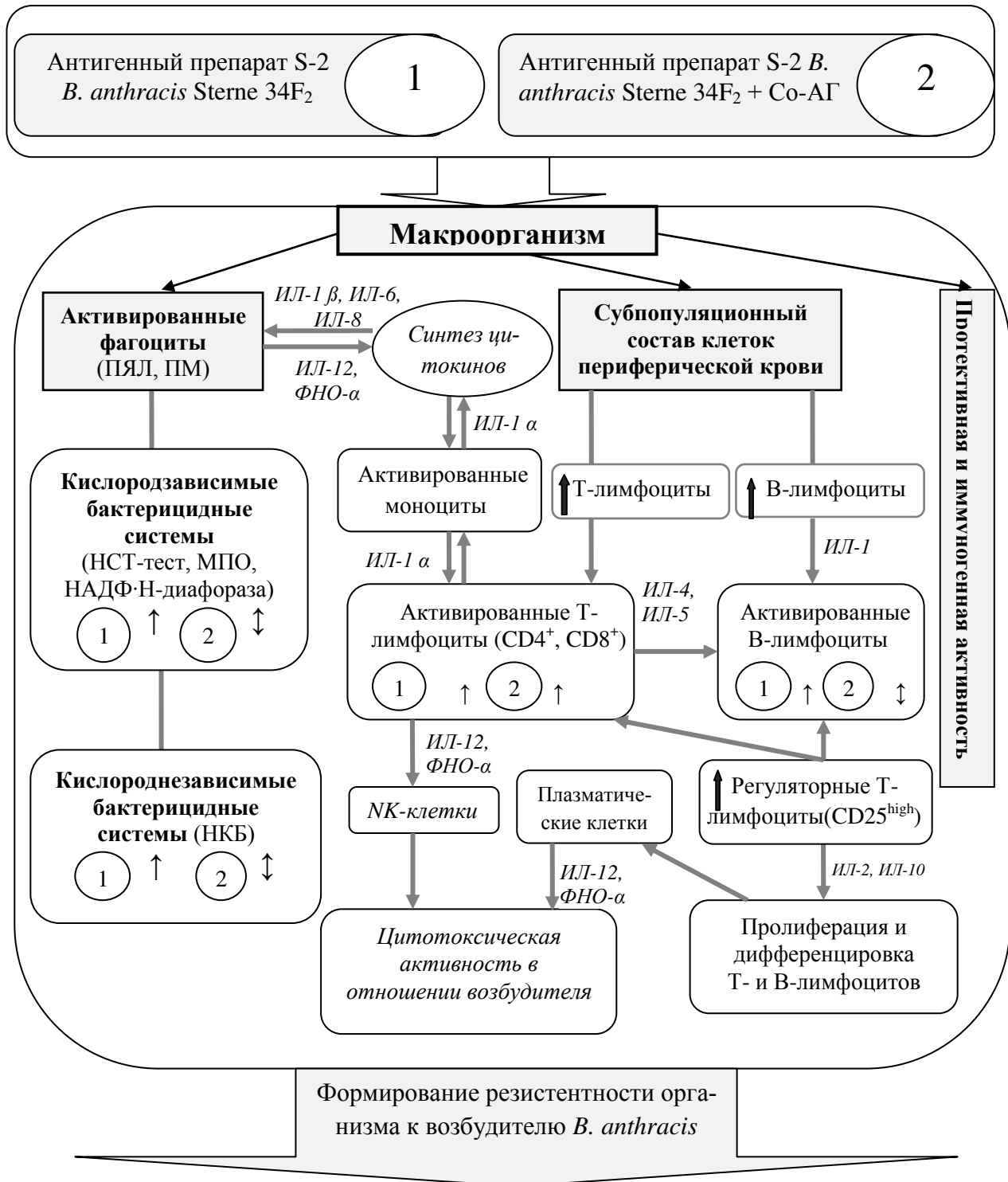


Рисунок 24 – Концептуальная схема механизмов действия антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ *per se* и в сочетании с Co-АГ на функциональное состояние клеток иммунной системы: ↑ – активация; ↓ – модуляция.

Примечание: данные литературы выделены курсивом.

ВЫВОДЫ

1. Антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂, а также наноконпозиты Co-АГ, Ag-ГМ и 2-Н-Ag-ПВТ в условиях *in vitro* повышают кислородзависимые и кислороднезависимые бактерицидные системы фагоцитов, что характеризуется высокими показателями НСТ-теста, активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, НАДФ·Н-оксидазы, миелопероксиазы и увеличением содержания неферментных катионных белков.

2. Аргентогалактоманнан и кобальтарабиногалактан при сочетанном применении с антигенным препаратом S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ в условиях *in vivo* оказывают иммуномодулирующее действие на клетки иммунофагоцитарной системы, которое проявляется в регуляции активности ферментов кислородзависимого (МПО, НАДФ·Н-диафораза) и кислороднезависимого (НКБ) метаболизма фагоцитов. Вместе с тем, показатели функциональной способности иммунокомпетентных клеток зависят от сроков наблюдения.

3. Антигенный препарат S-2 штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ *per se* и в сочетании с кобальтарабиногалактаном *in vitro* повышает функциональную активность Т-лимфоцитов, что сопровождается повышением экспрессии CD25 на ИКК крови белых мышей.

4. При взаимодействии антигенного препарата S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ как *per se*, так и в сочетании с кобальтарабиногалактаном *in vitro* установлено повышение уровня циркулирующих апоптотических клеток, которое обеспечивает регуляцию численного соотношения Т-клеток в популяции лимфоцитов.

5. Антигенный препарат S-2 *B. anthracis* Sterne 34F₂ *per se* и в сочетании с кобальтарабиногалактаном обладает способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, а также оказывает влияние на содержа-

ние плазматических клеток и их предшественников в крови биомоделей на разных стадиях формирования адаптивного иммунитета.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абалкин, В.А. Влияние протективного антигена на формирование иммунитета под действием сибиреязвенных живых вакцин / В.А. Абалкин, Н.П. Буравцева, Б.Л.Черкасский // Журн. микробиол. – 1990. – № 5. – С. 72–75.
2. Абалкин, В.А. Влияние летального сибиреязвенного токсина на функциональную активность перитонеальных мононуклеарных фагоцитов и полиморфноядерных нейтрофилов / В.А. Абалкин, Е.Г. Сирина, Т.Д. Черкасова // ЖМЭИ. – 1990. – № 2. – С. 62–67.
3. Адьювантные свойства наночастиц золота / Л.А. Дыкман, С.А. Староверов, В.А. Богатырев и др. // Российские нанотехнологии. – 2010. – Том 5, № 11-12. – С. 58–68.
4. Бакуев, М.М. Особенности секреции миелопероксидазы и хемилюминесцентного ответа нейтрофилов человека при контакте со стимуляторами различной природы / М.М. Бакуев, М.З.Саидов, А.А. Бутаков // Иммунология. – 1991. – № 1. – С. 15–16.
5. Бакулов, И.А. Сибирская язва (антракс): новые страницы в изучении «старой» болезни / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селиверстов. – Владимир : Посад, 2001. – 278 с.
6. Баркова, И.А. Иммунодиагностическая оценка белков, продуцируемых штаммами *B. anthracis* с различным профилем плазмид вирулентности : автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – Волгоград, – 2007. – 22 с.
7. Безносков, М.В. Выделение и изучение специфических антигенов *Bacillus anthracis* с целью конструирования диагностических и профилактических препаратов : автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – Саратов, 1997. – 22 с.
8. Биологические эффекты нового серебросодержащего полимерного нанокомпозита / М.А. Новиков, Е.А. Титов, В.А. Вокина и др. // Бюл. ВСНЦ СО

РАН. – 2012. – № 4 (84). Часть 2. – С. 121–125.

9. Вакцины и вакцинация: национальное руководство / под ред. В.В. Зверева, Б.Ф. Семенова, Р.М. Хаитова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 880 с.

10. Взаимодействие возбудителя сибирской язвы с паттерн-распознающими рецепторами врожденного и адаптивного иммунитета / П.Ю. Попова, Н.И. Микшиш, Т.Н. Щуковская и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – Вып. 110. – 2011. – С. 12–17.

11. Витязева, С.А. Закономерности формирования иммунного ответа макроорганизма на введение *Yersinia pestis* EV с иммуномодуляторами : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.16. – Иркутск, 2009. – 22 с.

12. Витязева, С.А. Сравнительная характеристика иммунного ответа макроорганизма при пероральном и парентеральном введении металлосодержащего нанобиокомпозита / С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова, В.И. Дубровина // Бюл. ВСНЦ СО РАН. – 2012. – № 2 (84). – С. 114–117.

13. Влияние комплексного антигенного препарата *Bacillus anthracis* и иммуномодуляторов на функциональную активность клеток фагоцитарной системы в эксперименте / В.И. Дубровина, А.В. Родзиковский, О.Б. Колесникова и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2007. Т. 93. – С. 73–76.

14. Влияние летального токсина *B. anthracis* на фагоцитоз и динамику изменения активности ферментов антиокислительной системы перитонеальных мононуклеарных фагоцитов мышей с различным наследственным иммунитетом к сибирской язве / В.А. Абалкин, Е.П. Сорочинская, Н.И. Осипова и др. // Бюл. экпер. биол. – 1989. – Вып. 107, № 3. – С. 288–291.

15. Войткова, В.В. Изучение апоптоза клеток макроорганизма методом точной цитофлуориметрии // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 6 (1). – С. 220–226.

16. Голубинский, Е.П. Активность бактерицидных систем фагоцитов у интактных и иммунизированных против туляремии морских свинок / Е.П. Голубинский, И.С. Бойкова, В.И. Дубровина // Журн. микробиол. – 1995. – № 2. – С. 77–79.

17. Голубинский, Е.П. Характеристика патологических изменений при экспериментальной сибиреязвенной интоксикации / Е.П. Голубинский, Э.Е. Тафельштейн, С.Г. Саппо // ПООИ: Сб. научн. трудов. – 2000. – Вып. 80. – С. 118–126.

18. Гончарова, А.Ю. Выделение, биохимическая и иммунобиологическая характеристика белков S-слоя сибиреязвенного микроба : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.17. – Москва, 2007. – 22 с.

19. Гончарова, А.Ю. Характеристика белков S-слоя *Bacillus anthracis* – перспективных компонентов химических сибиреязвенных вакцин / А.Ю. Гончарова, Н.И. Микшис, Ю.А. Попов // Генетика микроорганизмов и биотехнология : материалы международной школы – конференции (20 – 24 октября 2008 г.). – Москва – Пушкино. – С. 128–129.

20. Горобец, Е.А. Разработка иммунобиологических препаратов для диагностики сибирской язвы : автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07; 03.00.23. – Ставрополь, 2009. – 19 с.

21. Грищенко, Л.А. Металлосодержащие нанокompозиты на основе арабиногалактана : автореф. дис. ... канд. хим. наук. – Иркутск, 2007. – 18 с.

22. Девдариани, З.Л. Перспективы разработки химических вакцин для специфической профилактики бактериальных особо опасных инфекций / З.Л. Девдариани, В.В. Кутырев, А.Н. Куличенко // Матер. IX съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитологов. – М., 2007. – Т. 1. – С. 57–58.

23. Долгушин, И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: метод обнаружения и оценка эффективности улавливания бактерий / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2009. – № 2. – С. 65–67.

24. Долгушин, И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И. Долгушин, О.В. Бухарин, – Екатеринбург : Изд-во УрОРАН. 2001. – 256 с.

25. Дубровина, В.И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности организма к возбудителям чумы, псевдотуберкулеза и туляремии : автореф. дис. ... доктора биол. наук: 14.00.16. – Иркутск, 2004. – 42 с.

26. Дятлов, И.А. Получение S-слоя чумного микроба и возможности его применения / И.А. Дятлов, О.А. Волох // Биотехнология. – 2004. – № 1. – С. 20–25.

27. Зайцева, Л.Г. К механизму комбинированного воздействия иммуномодуляторов на фагоцитарные клетки / Л.Г. Зайцева, Г.И. Васильева // Журн. микробиол. – 1994. – № 4. – С. 17–20.

28. Захарова, М.Ю. Летальный фактор из *Bacillus anthracis*: субстратная специфичность и механизм действия : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2009. – 13 с.

29. Изменение активности миелопероксидазы и кислой фосфатазы в нейтрофилах периферической крови человека при стимуляции клеток *in vitro* / Т.Л. Бурая, А.А. Бутаков, В.А. Дрожеников и др. // Журн. микробиол. – 1991. – № 10. – С. 52–55.

30. Изменение метаболизма фагоцитов крови под влиянием дезоксирибонуклеиновой кислоты из молок лососевых рыб / Н.Г. Плехова Л.Н. Федянина, Л.М. Сомова и др. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. – № 3. – С. 55–58.

31. Изучение биокинетических особенностей и оптимизация условий культивирования рекомбинантного аспорогенного штамма-продуцента протективного антигена сибиреязвенного микроба / С.А. Еремин, Н.И. Микшис, О.А. Волох и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – Вып. 103. – С. 70–74.

32. Иммунизация антигенами, иммобилизованными на целлюлозе / А.М. Ляшук и др. // Развитие идей А. Е. Гурвича. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2006. – № 4. – С. 65–68.

33. Иммуногенность белков S-слоя *Bacillus anthracis* / Н.И. Микшис А.Ю. Корсакова, М.Ф. Болотникова и др. // Молекулярная медицина и биобезопасность : материалы 1 Международной конференции. – Москва, 2004. – С. 130–131.

34. Иммуногенность протективного антигена, выделенного из аспорогенного рекомбинантного штамма *B. anthracis* / Н.И. Микшис, П.Ю. Попова, О.М. Кудрявцева и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2011. – №1. – С. 44–48.

35. Инфекционные болезни и эпидемиология : учебник / В.И. Покровский С.Г. Пак, Н.И. Брико и др. – 2-е изд. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 816 с.

36. Исачкова, Л.М. К развитию представлений об антиинфекционной резистентности / Л.М. Исачкова, Н.Г. Плехова // Эпидемиол. и инф. бол. – 2002. – № 1. – С. 11–15.

37. Колесникова, О.Б. Закономерности формирования резистентности организма к *Bacillus anthracis* под влиянием искусственного антигенного комплекса сибиреязвенного микроба : автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.16. – Иркутск, 2008. – 22 с.

38. Кравцов, А.Л. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых лейкоцитарных протеаз и протеолитически активируемых рецепторов / А.Л. Кравцов, Т.П. Шмелькова // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. – 2011. – № 1 (56). – С. 79–87.

39. Кравцов, А.Л. Формирование внеклеточных ловушек – эффективный механизм защиты организма от патогена / А.Л. Кравцов // Проблемы особо опасных инфекций, вып. 112. – 2012. – С. 69–74.

40. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М. : ЭАО Медицина, Шико, 2009. – 472 с.

41. Лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище на основе нуклеиновых кислот различного происхождения / Л.Н. Федянина, Н.Г. Плехова, Л.М. Сомова и др. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2007. – № 4. – С. 9–12.

42. Лесничая, М.В. Синтез и свойства Ag(0)-, Au(0)-содержащих наноконпозитов на основе галактоманнана и каррагинана : автореф. дис. ... канд. хим. наук 02.00.03. – Иркутск, 2011. – 18 с.

43. Лобзин, Ю.В. Сибирская язва / Ю.В. Лобзин, В.М. Волжанин, С.М. Захаренко // Клинический микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2001. – Т. 4 (2). – С. 194–227.

44. Луканов, Н. А. Опыт применения отечественного иммуномодулятора полиоксидония в комплексной терапии паразитарных инфекций / Н.А. Луканов, Н.Е. Чахирева // Современ. средства иммунодиагностики, иммуно- и экстренной

профилактики актуал. инфекций : Науч. конф. с международным участием. – СПб., 2004. – С. 72–74.

45. Малкоч, А.В. Физиологическая роль оксида азота в организме (Часть 1) / А.В. Малкоч, В.Г. Майданник, Э.Г. Курбанова // [Электронный ресурс] URL: http://www.dialvsis.ru/magazin/1_2_2000/no1.htm

46. Матюшин, Б.Н. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении / Б.Н. Матюшин, А.С. Логинов, В.Д. Ткачев // Лаб. дело. – 1991. – № 7. – С. 16–19.

47. Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 122 с.

48. Медуницын, Н.В. Вакцинология. – Изд. 3-е, перер. и доп. / Н.В. Медуницын. – М. : Триада-Х, 2010, – 512 с.

49. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы : учебно-методическое пособие / Л.И. Маринин, И.А. Дятлов, А.Н. Мокриевич и др. – М. : ЗАО МП ГИГИЕНА, 2009. – 304 с.

50. Микшис, Н.И. Прототипы сибиреязвенных вакцин на основе генно-инженерных бациллярных штаммов и синтезируемых ими антигенов : автореф. дис. ... докт. мед. наук: 03.00.07; 03.00.15. – Саратов, 2009. – 47 с.

51. Микшис, Н.И. Современные представления о факторах патогенности и иммуногенности возбудителя сибирской язвы / Н.И. Микшис, Ю.А. Попов, В.В. Кутырев // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2010. – № 3. – С. 96–101.

52. Мустафина, Э.Н. Получение радиоинактивированной вакцины против сибирской язвы и оценка иммунного статуса сельскохозяйственных животных при этой инфекции : автореф. дис. канд. вет. наук. – Казань, 2005. – 22 с.

53. Нанобиокомпозиты медицинского назначения на основе арабиногалактана / Г.П. Александрова, Л.А. Грищенко, Л.П. Феоктистова и др. // Фундаментальная наука в интересах развития химической и химико-фармацевтической промышленности : материалы II конференции (16 – 19 ноября, 2004). – Пермь. – 2004. – С. 94–95.

54. Наноструктурные металлосодержащие биосовместимые материалы – новые потенциальные антимикробные средства / Г.П. Александрова, Б.Г. Сухов, Л.А. Грищенко и др. // Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: сб. материалов научно-практич. конф. с межд. участ., (11 – 12 октября, 2007). – Новосибирск. – 2007. – Ч. 1. – С. 172–176.

55. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньшикова, В.З. Ланкин и др.. – М., 2006.

56. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций / С.Я. Проскурянов, С.И. Бикетов, А.И. Иванников и др. // Иммунология. – 2000. – № 4. – С. 9–20.

57. Онищенко Г.Г. Иммунопрофилактика – достижения и задачи по дальнейшему совершенствованию / Г.Г. Онищенко // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2006. – № 3. – С. 58–62.

58. Определение функциональной активности лейкоцитов периферической крови в качестве показателя неспецифической защиты организма / Л.М. Сомова, Н.Г. Плехова, Н.М. Кондрашева и др. – Методические рекомендации. – Владивосток, 2005. – 24 с.

59. Организация работы и обеззараживание материала, содержащего возбудителя чумы при проведении исследований методом проточной цитофлуориметрии / В.В. Кутырев и др. – Методические рекомендации. – Саратов, 2008. – 22 с.

60. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л.С. Литвинова, А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич и др. // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 7–26.

61. Особенности воздействия наночастиц серебра на иммунную систему мышей в зависимости от пути введения / О.В. Калмантаева, В.В. Фирстова, В.Д. Потапов и др. // Российский нанотехнологии. – 2014. – Т. 9, № 9-10. – С. 78–82.

62. Особенности формирования наночастиц серебра в полимерной матрице / Г.Ф. Прозорова, С.А. Коржова, Т.В. Конькова и др. // ДАН. – 2011. – Т. 437, № 1. – С. 50–52.

63. Патент РФ № 2260500 РФ, С1 С 08 37/00. Способ получения нанораз-

мерных металлических и металлоксидных частиц / Г.П. Александрова, С.А. Медведева, Л.А. Грищенко и др.; Иркутский ин-т органической химии. – № 2005372522; Заявл. 22.03.04; Опубл. 20.09.05, Бюл. № 26.

64. Петров, Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 608 с.

65. Пигаревский, В.Е. К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторно-диагностической практике / В.Е. Пигаревский, Ю.А. Мазинг // Лаб. дело. – 1981. – № 10. – С. 579–582.

66. Плехова, Н.Г. Бактерицидная активность фагоцитов / Н.Г. Плехова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2006. – № 6. – С. 89–96.

67. Поздняков, А.С. Полифункциональные (со)полимеры 1-винил-1,2,4-триазола и нанокompозиты на их основе: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06. ИрИХ СО РАН. – Иркутск, 2011. – 22 с.

68. Получение аспорогенных штаммов *Bacillus anthracis* / Н.И. Микшис, М.Ф. Болотникова, Л.В. Новикова и др. // Биотехнология. – 2003. – № 1. – С. 3–11.

69. Попов, Ю. А. Генетические (ДНК) вакцины / Ю.А. Попов, Н.И. Микшис // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – Вып. 105. – С. 20–24.

70. Попов, Ю.А. Перспективы создания новых вакцинных препаратов для профилактики сибирской язвы / Ю.А. Попов, Н.И. Микшис // Матер. IX съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитологов. – М., 2007. – Т. 1. – С.91–92.

71. Попов, Ю.А. Сибиреязвенные вакцины / Ю.А. Попов, Н.И. Микшис // Проблемы особо опасных инфекций. – 2002. – Вып. 1 (83). – С. 21–36.

72. Попова, П.Ю. Биологическая характеристика протективного антигена, синтезируемого аспорогенным рекомбинантным штаммом *Bacillus anthracis*: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03. – Саратов, 2012. – 24 с.

73. Попова, П.Ю. Перспективы разработки живых рекомбинантных сибиреязвенных вакцин на основе условно патогенных и непатогенных микроорганизмов / П.Ю. Попова, Н.И. Микшис // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2016. – № 1. – С. 79–89.

74. Прохорова, М.И. Методы биохимических исследований / М.И. Прохорова. – Л., 1982. – С. 168–171.

75. Разработка нанокompозитного мембранотропного гетерокompлекса внутриклеточного целевого действия против возбудителей вирусных инфекций (на модели вируса клещевого энцефалита) / Л.И. Колесникова и др. // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 2 (64). – С. 158–162.

76. Роль апоптоза в иммунопатогенезе особо опасных инфекций / Т.Н. Щуковская, А.Л. Кравцов, Т.П. Шмелькова и др. // Матер. IX съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитологов. – М., 2007. – Т. 1. – С.118–119.

77. Ромашевская, Е.И. Влияние разных субклассов перитонеальных макрофагов на антителообразование в культуре / Е.И. Ромашевская, Э.Л. Хасман, Д.Р. Каулен // Иммунология. – 1981. – № 2. – С. 21–25.

78. Самсонова, М.В. Стандартные цитопрепараты бронхоальвеолярного лаважа в исследовании патологии лёгких / М.В. Самсонова, А.Л. Черняев // Лаборатория. – 1997. – № 6. – С. 7–9.

79. Санитарные правила «Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.3118-13. – М., 2014. – 195 с.

80. Семенов, Б.Ф. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов / Б.Ф.Семенов, В.В. Зверев // Журн. эпидемиол., микробиол. и иммунобиол. – 2007. – № 4. – С. 93–100.

81. Серебросодержащие нанокompозиты на основе галактоманнана и каррагинана: синтез, строение, антимикробные свойства / М.В. Лесничая, Г.П. Александрова, Л.П. Феоктистова, и др. // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2010. – № 12. – С. 1–6.

82. Сибирская язва в Российской Федерации в 2009 году: анализ и прогноз / Е.И. Еременко, А.Г. Рязанова, Н.П. Буравцева и др. // Здоровье населения и среда обитания. – 2010. – № 5 (206). – С. 38–39.

83. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики / Г.Г. Онищенко, Н.Т. Васильев,

Н.В. Литусов и др. – М.: ВУНМЦМЗ РФ, 1999. – 447 с.

84. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты / под ред. Г. Г. Онищенко, В. В. Кожухова. – М.: ОАО Изд-во «Медицина», 2010. – 424 с.

85. Сибирская язва: ранние шаги внутриклеточной стадии развития инфекции / И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Т.Б. Кравченко и др. // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 2005. – № 4. – С. 3–9.

86. Солодовникова, О.Н. «Кислородный взрыв» нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе воспалительных реакций при гнойных инфекциях у детей / О.Н. Солодовникова, В.П. Молочный // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 118–122.

87. Сомова, Л.М. Кислородзависимая и нитроксидзависимая ферментные системы макрофагов при стафилококковой и листериозной инфекции / Л.М. Сомова, Н.Г. Плехова, Ю.Н. Гончарук // Журн. эпидемиол., микробиол. и иммунобиол. – 2006. – № 3, Приложение. – С. 39–43.

88. Соседова, Л.М. Морфофункциональная оценка эффектов действия наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу / Л.М. Соседова, М.А. Новиков, Е.А. Титов // Микроэлементы в медицине. – 2014. – № 15 (4). – С. 39–43.

89. Состояние вопроса и перспективы разработки вакцин против сибирской язвы / Е.В. Пименов, И.В. Дармов, Н.Т. Васильев и др. // Эпидемиол. и вакцинопрофилакт. – 2002. – № 5. – С. 42–46.

90. Сравнительная характеристика действия наноструктурированных аргенто-1-винил-1,2,4-триазола, аргентогалактоманнана и кобальтарабиногалактана на иммунную реакцию организма экспериментальных животных / В.И. Дубровина, С.А. Витязева, Ж.А. Коновалова и др. // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2012. – Том IV, № 4 (13). – С. 36–44.

91. Структура и иммуномодулирующее действие арабиногалактана лиственницы сибирской и его металлопроизводных / В.И. Дубровина, С.А. Медведева, С.А. Витязева и др. – Иркутск : Аспирант, 2007. – 145 с.

92. Томленович, Л. Действительно ли безопасны алюминиевые адью-

ванты в вакцинах? / Л. Томленович, К.А. Шоу // *Current Medicinal Chemistry*. – 2011. – № 18. – С. 2630–2637.

93. Тотолян, А.А. Клетки иммунной системы / А.А. Тотолян, И.С. Фрейдлин. СПб: Наука, 2000. – 232 с.

94. Учитель, И.Я. Макрофаги в иммунитете / И.Я. Учитель. – М.: Наука, 1978. – 199 с.

95. Фаллер, Д.М. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс // Пер. с англ. М. : Изд-во БИНОМ, 2012. – 256 с.

96. Фрейдлин, И.С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека / И.С. Фрейдлин // Учебное пособие. – Л., 1986. – 37 с.

97. Хаитов, Р.М. Аллергология и иммунология. Национальное руководство Р.М. Хаитов // под ред. Р. М. Хаитова, Н. И. Ильиной. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 656 с.

98. Хаитов, Р.М. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // *Иммунология*. – 2003. – Т. 24, № 4. – С. 196–203.

99. Хаитов, Р.М. Механизм действия и клиническое применение иммуномодуляторов / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. – 2003. – № 8. – С. 43–49.

100. Хаитов, Р.М. Основные принципы иммуномодулирующей терапии / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. – 2000. – № 1. – С. 9–16.

101. Характеристика белков S-слоя возбудителя сибирской язвы / А.Ю. Корсакова, Н.И. Микшис, Ю.А. Попов и др. // *Молодые ученые в медицине : Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции*. – Казань, 2004. – С. 130.

102. Хлынцева, А.Е. Разработка комплекса иммунодиагностических тест-систем для обнаружения возбудителя сибирской язвы : автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03; 03.01.06. – Оболенск, 2012. – 22 с.

103. Черкасский, Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы / Б.Л. Черкасский. – М. : ИнтерСЭН, 2002. – 384 с.
104. Экспериментальная характеристика сибиреязвенной инфекции / В.С. Колесник, Э.Е. Тафельштейн, Р.С. Колесник и др. // ЖМЭИ. – 1987. – № 8. – С. 98–101.
105. Эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация по сибирской язве в 2014 г., прогноз на 2015 г. / А.Г. Рязанова, О.И. Цыганкова, Л.Ю. Аксенова и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – Вып. 1. – С. 26–29.
106. Юрьева, О.В. Роль сигнальных систем циклических нуклеотидов в регуляции иммуно- и патогенеза / О.В. Юрьева, В.И. Дубровина // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 2 (84). – С. 159–163.
107. S-белок клеток *Bacillus sphaericus* AP2 – перспективный объект биотехнологии и нанотехнологии / В.Н. Бурдь, Г.А. Бурдь, К. Нахтигаль и др. // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран содружества : Материалы Международной научно-практической конференции (25-28 мая 2005, г. Минск). – Нарочь, Республика Беларусь. – 2005. – С. 25–26.
108. A *Bacillus anthracis* strain deleted for six proteases serves as an effective host for production of recombinant proteins / A.P. Pomerantsev, O.M. Pomerantseva, M. Moayeri et al. // Protein Expr Purif. – 2011. – Vol. 80, N 1. – P. 80–90.
109. A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine confers sustained antibody-mediated protection against aerosolized anthrax spores / G. Hermanson, V. Whitlow, S. Parker et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, N 37. – P. 13601–13606.
110. A dominant negative mutant of *Bacillus anthracis* protective antigen inhibits anthrax toxin action *in vivo* / Y. Singh, H. Khanna, A.P. Chopra et al. // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 22090–22094.
111. A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins / G.E. Rhie, M.H. Roehrl, M. Mourez et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100, N 19. – P. 10925–10930.

112. Activation of the classical complement pathway by *Bacillus anthracis* is the primary mechanism for spore phagocytosis and involves the spore surface protein BclA / C. Gu, S.A. Jenkins, Q. Xue et al. // J. Immunol. – 2012. – Vol. 188, N 9. – P. 4421–4431.
113. Ahuja, N. Hydrophobic residues Phe552, Phe554, Ile562, Leu566, and Ile574 are required for oligomerization of anthrax protective antigen / N. Ahuja, P. Kumar, R. Bhatnagar // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – Vol. 287. – P. 542–549.
114. Anthrax lethal toxin impairs innate immune functions of alveolar macrophages and facilitates *Bacillus anthracis* survival / W.J. Ribot, R.G. Panchal, K.C. Brittingham et al. // Infect. Immun. – 2006. – Vol. 74, N 9. – P. 5029–5034.
115. Anthrax toxin evades Toll-like receptor recognition whereas its cell wall components trigger activation via TLR 2/6 heterodimers / M. Triantafilou, A. Uddin, S. Maher et al. // Cell. Microbiol. – 2007. – Vol. 9, N 12. – P. 2880–2892.
116. Anthrax toxins / M. Moser et al. // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. – 2004. – Vol. 152. – P. 135–164.
117. Anthrolysin O and other gram-positive cytolysins are Toll-like receptor 4 agonists / J.M. Park, H. Ng. Vincent, Shin Maeda et al. // J. Exp. Med. – 2004. – Vol. 200, N 12. – P. 1647–1655.
118. Antineoplastic effect of a bacterial adenylate cyclase / A. Slungaard, D. L. Confer, W. H. Schubach et al. // Clin. Res. – 1983. – Vol. 31. – P. 547.
119. Attenuated nontoxinogenic and nonencapsulated recombinant *Bacillus anthracis* spore vaccines protect against anthrax / S. Cohen, I. Mendelson, Z. Altboum et al. // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68, N 8. – P. 4549–4558.
120. *Bacillus anthracis* derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages / K. Shatalin, I. Gusarov, E. Avetissova et al. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105. – P. 1009–1013.
121. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens / A. Duverger, R.J. Jackson, F.W. van Ginkel et al. // J. Immunol. – 2006. – Vol. 176. – P. 1776–1783.

122. Baehner, R.L. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease / R.L. Baehner, D.G. Nathan // *New England J. Med.* – 1968. – Vol. 278, N 18. – P. 971–976.
123. Bhatnagar, R. Anthrax toxin / R. Bhatnagar, S. Batra // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 27. – P. 167–200.
124. Bhopale, G.M. Emerging drugs for chronic hepatitis C / G.M. Bhopale, R.K. Nanda // *Hepatology Reseach.* – 2005. – Vol. 32, N 3. – P. 146–153.
125. Biochemical analysis of the UK licensed anthrax vaccine / S. Noonan, R. Baker, B. Hallis et al. // 5th International Conference on Anthrax. Nice, France, March 30 – April 3, 2003. – 2003. – P. 28.
126. Black, J.L. 3rd Genome projects and gene therapy: gateways to next generation biological weapons / J.L. Black // *Mil. Med.* – 2003. – Vol. 168, N 11. – P. 864–871.
127. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses / M. Balazs, F. Martin, T. Zhou et al. // *Immunity.* – 2002. – Vol. 17. – P. 341–352.
128. Brossier F. Toxins of *Bacillus anthracis* / F. Brossier, M. Mock // *Toxicon.* – 2001. – Vol. 39. – P. 1747–1755.
129. Budd, R.C. Activation-induced cell death / R.C. Budd // *Curr. Opin. Immunol.* – 2001. – Vol. 13, N 3. – P. 356–362.
130. Calcium dependence of the interaction between calmodulin and anthrax edema factor / T.S. Ulmer, S. Soelaiman, S. Li et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 29261–29266.
131. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps / F. Wartha, K. Beiter, B. Albiger et al. // *Cell Microbiol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 1162–1171.
132. Cationic lipid-formulated plasmid DNA-based *Bacillus anthracis* vaccine: evaluation of plasmid DNA persistence and integration potential / A. Vilalta, R.K. Mahajan, J. Hartikka et al. // *Hum. Gene Ther.* – 2005. – Vol. 16, N 10. – P. 1151–1156.
133. CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in

the spleen / J.C. Rodriguez-Alba, M.E. Moreno-García, C. Sandoval-Montes et al. // *Blood*. – 2008. – Vol. 111, N 7. – P. 3644–3652.

134. C-di-GMP is an effective immunomodulator and vaccine adjuvant against pneumococcal infection / A.D. Ogunniyi, J.C. Paton, A.C. Kirby et al. // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, N 36. – P. 4676–4685.

135. Cederlund, A. Antimicrobial peptides important in innate immunity / A. Cederlund, G.H. Gudmundsson, B. Agerberth // *FEBS J.* – 2011. – V. 278, N 20. – P. 3942–51.

136. Characterization of a plasmid region involved in *Bacillus anthracis* toxin production and pathogenesis / J.C. Sirard, C. Guidi-Rontani, A. Fouet et al. // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2000. – Vol. 290, N 4–5. – P. 313–316.

137. Characterization of the *Bacillus anthracis* S-layer: cloning and sequencing of the structural gene / E.I. Toumelin, J.C. Sirard, E. Duflot et al. // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 17, N 3. – P. 614–620.

138. Characterization of the immune response to the UK human anthrax vaccine / L. Baillie, T. Townend, N. Walker et al. // *J. Immunol. Med. Microbiol.* – 2003. – Vol. 15, N 36 – P.83–86.

139. Cloning and characterization of a gene whose product is a trans – activator of anthrax toxin synthesis / I. Uchida, J.M. Hornung, C.B. Thorne et al. // *J. Bacteriol.* – 1993. – Vol. 175. – P. 5329–5338.

140. Contributions of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax / J.N. Tournier, A. Quesnel-Hellmann, A. Cleret et al. // *Cell. Microbiol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 555–565.

141. Cooperativity and interference of germination pathways in *Bacillus anthracis* spores / H. Luu, Monique Akoachere, Manomita Patra et al. // *J Bacteriol.* – 2011. – Vol. 193, N 16. – P. 4192–4198.

142. Cote, C.K. Key aspects of the molecular and cellular basis of inhalational anthrax / C.K. Cote, S.L. Welkos, J. Bozue // *Microbes Infect.* – 2011. – Vol. 13. – P. 1146–1155.

143. Crystal structure of the anthrax lethal factor / A.D. Pannifer, T.Y. Wong, R.

Schwarzenbacher et al. // Nature. – 2001. – Vol. 414. – P. 229–233.

144. Cutting edge: IFN-gamma-producing CD4 T-lymphocytes mediate spore-induced immunity to capsulated *B. anthracis* / I.J. Glomski, J.P. Corre, M. Mock et al. // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178. – P. 2646–2650.

145. Cybulski, Jr.R. J. Anthrax vaccination strategies / Jr.R.J. Cybulski, P. Sanz, A.D. O'Brien // Molecular Aspects of Medicine. – 2009. – Vol. 30, N 6. – P. 490–502.

146. Cytotoxic effects of anthrax lethal toxin on macrophage-like cell line j774a.1. / C.G. Lin, Y.T. Kao, W.T. Liu et al. // Curr Microbiol. – 1996. – Vol. 33. – P. 224–227.

147. Day, J. Modeling the host response to inhalation anthrax / J. Day, A. Friedman, L.S. Schlesinger // J. Theor. Biol. – 2011. – Vol. 276, N 1. – P. 199–208.

148. Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis* / T. Mignot, S. Mesnage, E. Couture-Tosi et al. // Mol. Microbiol. – 2002. – Vol. 43, N 6. – P. 1615–1627.

149. Differential proteomic analysis of the *Bacillus anthracis* secretome: distinct plasmid and chromosome CO₂ – dependent cross talk mechanisms modulate extracellular proteolytic activities / T. Chitlaru, O. Gat, Y. Gozlan et al. // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188. – P. 3551–3571.

150. Differential role of the interleukin-17 axis and neutrophils in resolution of inhalational anthrax / K. Garraud, A. Cleret, J. Mathieu et al. // Infect Immun. – 2012. – Vol. 80, N 1. – P. 131–142.

151. Early *Bacillus anthracis* – macrophage interactions: intracellular survival and escape / T. C. Dixon, A.A. Fadl, T.M. Koehler et al. // Cell. Microbiol. – 2000. – Vol. 2, N 6. – P. 453–463.

152. Ebensen, T. Immune modulators with defined molecular targets: cornerstone to optimize rational vaccine design / T. Ebensen, C.A. Guzmán // Human Vaccines. – 2008. – Vol. 4, N 1. – P. 13–22.

153. Effective mucosal immunity to anthrax: neutralizing antibodies and Th cell responses following nasal immunization with protective antigen / P.N. Boyaka, A. Tafaro, R. Fischer et al. // J. Immunol. – 2003. – Vol. 170, N 11. – P. 5636–5643.

154. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils / J. O'Brien, A. Friedlander, T. Dreier et al. // *Infect. Immun.* – 1985. – Vol. 47, N 1. – P. 306–310.
155. Efficacy of vaccine based on protective antigen and killed spores against experimental inhalational anthrax / Y. Gauthier, J-N. Tournier, J-C. Paucod et al. // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. 77, N 3. – P. 1197–1207.
156. Electroporation of a multivalent DNA vaccine cocktail elicits a protective immune response against anthrax and plague / M.T. Albrecht, B.D. Livingston, J.T. Pesce et al. // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30, N 32. – P. 4872–4883.
157. Enzymatic characterization of catalase from *Bacillus anthracis* and prediction of critical residues using information theoretic measure of relative entropy / A. Rahi, M. Rehan, R. Garg et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – Vol. 224, N 11 (1). – P. 88–95.
158. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis* / P. Mikesell, B.E. Ivins, J.D. Ristoph et al. // *Infect. Immun.* – 1983. – Vol. 39. – P. 371–376.
159. Exosporium characterization / A. Charlton, A. Moir, C. Redmond et al. // 3-rd International Conference on Anthrax, 7–10th September 1998. Plymouth, England. – 1998. – P. 13.
160. Ezzell, J.W. The capsule of *Bacillus anthracis*, a review / J.W. Ezzell, S.L. Welkos // *J. Appl. Microbiol.* – 1999. – Vol. 87, N 2. – P. 250.
161. Ezzell, J. Immunological analysis of cell-associated antigens of *Bacillus anthracis* / J. Ezzell, T. Abschire // *Infect. Immun.* – 1988. – Vol. 56. – P. 349–356.
162. Fouet, A. The surface of *Bacillus anthracis* / A. Fouet // *Mol. Aspects Med.* – 2009. – Vol. 30, N 6. – P. 374–385.
163. Fouet, A. Characterization of the operon encoding the alternative σ^B factor from *Bacillus anthracis* and its role in virulence / A. Fouet, O. Namy, G. Lambert // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – P. 5036–5045.
164. Friedlander, A.M. Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process / A.M. Friedlander // *J. Boil. Chem.* – 1986. – Vol. 261, N 16. – P. 7123–7126.

165. Gat, O. Search for *Bacillus anthracis* potential vaccine candidates by a functional genomic-serologic screen / O. Gat, H. Grosfeld, N. Ariel // *Infect. Immun.* – 2006. – Vol. 74, N 7. – P. 3987–4001.

166. Gat, O. *In vitro* screen of bioinformatically selected *Bacillus anthracis* vaccine candidates by coupled transcription, translation, and immunoprecipitation analysis / O. Gat, H. Grosfeld, A. Shafferman // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 375. – P. 211–233.

167. Genetic vaccines for anthrax based on recombinant adeno-associated virus vectors / T.H. Liu, J. Oscherwitz, B. Schnepf et al. // *Mol. Ther.* – 2009. – Vol. 17, N 2. – P 373–379.

168. Genome-based bioinformatic selection of chromosomal *Bacillus anthracis* putative vaccine candidates coupled with proteomic identification of surface-associated antigens / N. Ariel, A. Zvi, K.S. Makarova et al. // *Ibid.* – 2003. – Vol. 71, N 8. – P. 4563–4579.

169. Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids / A. Bourgoigne, M. Drysdale, S.G. Hilsenbeck et al. // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 71, N 5. – P. 2736–2743.

170. Green, L.C. Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in bio-logical fluids / L.C. Green, D.H. Wagner, J.G. Glogowski // *Anal. Biochem.* – 1982. – Vol. 126, N 1. – P.131–138.

171. Grünov, K. Apoptosis versus necrosis of host cells after infection with *Francisella tularensis* / K. Grünov, W. Spletstoesser // *The 3rd Intern. conf. on tularemia.* – Umeå. – 2000. – P. 53.

172. Guichard, A. New insights into the biological effects of anthrax toxins: linking cellular to organismal responses / A. Guichard, V. Nizet, E. Bier // *Microbes Infect.* – 2012. – Vol. 14. – P. 97–118.

173. Hahn, U.K. DNA vaccination against anthrax in mice-combination of anti-spore and anti-toxin components / U.K. Hahn, R. Boehm, W. Beyer // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24. – P. 4569–4571.

174. Hengge, R. Principles of c-di-GMP signaling in bacteria / R. Hengge // *Nat.*

Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 7, N 4. – P. 263–273.

175. Hickey, M.J. Intravascular immunity: the hostpathogen encounter in blood vessels / M.J. Hickey, P. Kubes // *Nature Rev. Immunology*. – 2009. – N. 6. – P. 364–374.

176. Hope B.T., Vinsent S.R. // *J. Histochem. Cytochem.* – 1989. – Vol. 37. – P. 653–661.

177. Humphrey, J.H. Splenic macrophages: antigen presenting cells for T1–2 antigens / J.H. Humphrey // *Immunol. Lett.* – 1985. – Vol. 11. – P. 149–152.

178. Identification and characterization of circulating human transitional B cells // G.P. Sims, R. Ettinger, Y. Shirota et al. // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, N 11. – P. 4390–4398.

179. Identification of in vivo-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome / T. Chitlaru, O. Gat, H. Grosfeld et al. // *Infect. Immun.* – 2007. – Vol. 75, N 6. – P. 2841–2852.

180. Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis* / C. Redmond, L. Baillie, S. Hibbs et al. // *Microbiology*. – 2004. – Vol. 150. – P. 355–363.

181. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin / K.A. Bradley, J. Mogridge, M. Mourez et al. // *Nature*. – 2001. – Vol. 14. – P. 225–229.

182. Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium / C. Steichen, P. Chen, J.F. Kearney et al. // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185, N 6. – P. 1903–1910.

183. Immunogenicity and tolerance of ascending doses of a recombinant protective antigen (rPA102) anthrax vaccine: a randomized, double-blinded, controlled, multi-center trial / G.J. Gorse, W. Keitel, H. Keyserling et al. // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24, N 33–34. – P. 5950–5959.

184. Immunogenicity of a subunit vaccine against *Bacillus anthracis* / J. Chichester, K. Musiychuk, Patricia de la Rosa et al. // *Ibid.* – 2007. – Vol. 25, N 16. – P. 3111–3114.

185. Importance of nitric oxide synthase in the control of infection by *Bacillus anthracis* / K.W. Raines, T.J. Kang, S. Hibbs et al. // *Infect. Immun.* – 2006. – Vol 74,

N 4. – P. 2268–2276.

186. Induction of protective immunity against lethal anthrax challenge with a patch / R.T. Kenney, J. Yu, M. Guebre-Xabier et al. // *J. Infect.* – 2004. – Dis. 190. – P. 774–782.

187. Influence of garlic, synthetic 1,2,4-triazole derivative and herbal preparation echinovit C on selected indices of turkey-hens non-specific immunity / J. Truchliński, M. Krauze, M. Cendrowska-Pinkosz et al. // *Pol. J. Sci.* – 2006. – Vol. 9, N 1. – P. 51–55.

188. Inhibition of *in vitro* natural killer (NK) cell cytotoxicity by product of *Bordetella species* (Abstract) / E.L. Hewlett, S.H. Leppla, M. Moayeri et al. // *Clin. Res.* – 1983. – Vol. 31. – P. 25.

189. Jayachandran, R. Anthrax: biology of *Bacillus anthracis* / R. Jayachandran // *Current science.* – 2002. – Vol. 82, N 10. – P. 1220–1226.

190. Jesus, S. Recent developments in the nasal immunization against anthrax / S. Jesus, O. Borges // *World Journal of Vaccines.* – 2011. – Vol. 1. – P. 79–91.

191. Klimpel, K. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity / K. Klimpel, N. Arora, S. Leppla // *Mol. Microbiol.* – 1994. – Vol. 13. – P. 1093–1100.

192. Krauze, M. Some biochemical parameters of turkey–hens following administration of 1,2,4-triazole derivative / M. Krauze, J. Truchliński, M. Cendrowska-Pinkosz // *Pol. J. Vet. Sci.* – 2007. – Vol. 10, N 2. – P. 109–112.

193. Krieg, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects / A.M. Krieg // *Annu. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 709–760.

194. Lai, E.M. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis* / E.M. Lai, N.D. Phadke, M.T. Kachman // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185, N 4. – P. 1443–1454.

195. Lecaros, C. Nanocarriers with gentamicin to treat intracellular pathogens / C. Lecaros, C. Gamazo, M.J. Blanco-Prieto // *J. Nanosci Nanotechnol.* – 2006. – Vol. 6, N 9–10. – P. 3296–3302.

196. Lee, W.L. The tangled webs that neutrophils weave / W.L. Lee, S.

Grinstain // Science. – 2004. – Vol. 303. – P.1477–1478.

197. Leppla, S. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations in eukaryotic cells / S. Leppla, // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – Vol. 79. – P. 3162–3166.

198. Leppla, S. Production and purification of anthrax toxin / S. Leppla // Methods Enzymol. – 1988. – Vol. 165. – P. 103–116.

199. Lethal and edema toxins of anthrax induce distinct hemodynamic dysfunction / L.E. Watson, J. Mock, H. Lal et al. // Bioscience. – 2007. – Vol. 12. – P. 4670–4675.

200. Lin, Y. Th17 cytokines and vaccine induced immunity / Y. Lin, S.R. Slight, S.A. Khader // Semin. Immunopathol. – 2010. – Vol. 32. – P. 79–90.

201. Lu, T.T. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone / T.T. Lu, J.G. Cyster // Science. – 2002. – Vol. 297. – P. 409–412.

202. Macrophage activation by immunostimulatory DNA / K.J. Stacey, D.P. Sester, M.J. Sweet et al. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2000. – Vol. 247. – P. 41–58.

203. Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone // M.C. Karlsson, R. Guinamard, S. Bolland et al. // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 198. – P. 333–340.

204. Marked enhancement of antibody response to anthrax vaccine adsorbed with CPG 7909 in healthy volunteers / D. Rynkiewicz, M. Rathkopf, J. Ransom et al. // ICAAC. – 2005.

205. Martin, F. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens / F. Martin, A.M. Oliver, J.F. Kearney // Immunity. – 2001. – Vol. 14. – P. 617–629.

206. Matsumoto, M. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C) Advanced / M. Matsumoto, T. Seya // Drug Delivery Reviews. – 2008. – Vol. 60, N. 7. – P 805–812.

207. Mechanisms of NK cell-macrophage *Bacillus anthracis* crosstalk: a balance between stimulation by spores and differential disruption by toxins / M.

Klezovich-Bénard, R. Guinamard, S. Bolland et al. // PLoS Pathog. – 2012. – Vol. 8, N 1. – P. 1–16.

208. Medina, E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host / E. Medina // J. Innate Immun. – 2009. – Vol. 1, N. 3. – P.176–180.

209. Mesnage, S. Production and cell surface anchoring of functional fusions between the SLH motifs of the *Bacillus anthracis* S-layer proteins and the *Bacillus subtilis* levansucrase / S. Mesnage, E. Tosi-Couture, A. Fouet // Mol. Microbiol. – 1999. – Vol. 31. – P. 927–936.

210. Mignot, T. A plasmid – encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis* / T. Mignot, M. Mock, A. Fouet // Mol. Microbiol. – 2003. – Vol. 47, N 4. – P. 917–927.

211. Mizgerd, J.P. Mechanisms of disease acute lower respiratory tract infectio / J.P. Mizgerd // N. Engl. J. Med. – 2008. – N 358. – P. 716–727.

212. Mock, M. Anthrax / M. Mock, A. Fouet // Microbiol. Rev. – 2001. – Vol. 55. – P. 647–671.

213. Mucosal immunization with a novel nanoemulsion-based recombinant anthrax protective antigen vaccine protects against *Bacillus anthracis* spore challenge / A.U. Bielinska, K.W. Janczak, J.J. Landers et al. // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75, N 8. – P. 4020–4029.

214. Mucosal or parenteral administration of microsphere-associated *Bacillus anthracis* protective antigen protects against anthrax infection in mice / H.C. Flick-Smith, J.E. Eyles, R. Hebdon et al. // Infect. Immun. – 2002. – Vol. 70, N 4. – P. 2022–2028.

215. Nasal immunization with the mixture of PA63, LF, and a PGA conjugate induced strong antibody responses against all three antigens / B.R. Sloat, D.S. Shaker, U.M. Le et al. // FEMS Immun. Med. Microbiol. – 2008. – Vol. 52, N 2. – P. 169–179.

216. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann et al. // Science. – 2004. – Vol. 303. – P. 1532–1535.

217. N-fragment of edema factor as a candidate antigen for immunization

against anthrax / M. Zeng, G. Yang, F. Siegel et al. // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24. – P. 662–670.

218. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps / T.A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann et al. // *J. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 176. – P. 231–241.

219. Oliver, A.M. Ig Mhigh CD21 high lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells / A.M. Oliver, F. Martin, J.F. Kearney // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 7198–7207.

220. Parrino, J. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections / J. Parrino, R.S. Hotchkiss, M. Bray // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 13. – P.

221. Patel, K. A review on herbal immunoadjuvant / K. Patel // *Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS)*. – 2012. – Vol. 3 (3). – P. 1568–1576.

222. Plants as biofactories for the production of subunit vaccines against biosecurity-related bacteria and viruses / M.M. Rigano, C. Mann, A. Giulini et al. // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 26; 27(25-26). – P. 3463–3466.

223. Prenatal and infant exposure to thimerosal from vaccines and immunoglobulins and risk of autism / C.S. Price, W.W. Thompson, B. Goodson et al. // *Pediatrics*. – 2010. – Vol. 126, N 4. – P. 656–664.

224. Protection against anthrax and plague by a combined vaccine in mice and rabbits / J. Ren, D. Dong, J. Zhang et al. // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27, N 52. – P. 7436–7441.

225. Protective effect of *Bacillus anthracis* surface protein EA1 against anthrax in mice / M. Uchida, T. Harada, J. Enkhtuya et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – Vol. 421, N 2. – P. 323–328.

226. Proteomic characterization of host response to *Yersinia pestis* and near neighbors / B.A. Chromy, J. Perkins, J.L. Heidbrink et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – N 320. – P. 474–479.

227. Recombinant expression and functional analysis of proteases from *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* / K. Kwon, J. Hasseman, S.

Latham et al. // BMC Biochem. – 2011. – Vol. 12. – P. 17.

228. Sandoval-Montes, C. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines / C. Sandoval-Montes, L. Santos-Argumedo // J. Leukoc Biol. – 2005. – Vol. 77. – P. 513–521.

229. Sara, M. S-layer proteins / M. Sara, U.B. Sleytr // J. Bacteriol. – 2000. – Vol 82, N 4. – P. 859–868.

230. Select human anthrax protective antigen epitope-specific antibodies provide protection from lethal toxin challenge / S.R. Crowe, L.L. Ash, R.J. Engler // J. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 202, N 2. – P. 251–260.

231. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes / R.T. Okinaka, K. Cloud, O. Hampton et al. // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181, N 20. – P. 6509–6515.

232. Singh, Y. A deleted variant of *Bacillus anthracis* protective antigen is non-toxic and blocks anthrax toxin action *in vivo* / Y. Singh, Y.K. Chandhary, S.H. Leppla // J. Biol. Chem. – 1989. – Vol. 264, N 32. – P. 19103–19107.

233. S-layer homology motif is an immunogen and confers protection to mouse model against anthrax / P. Kulshreshtha, S. Aggarwal, H. Jaiswal et al. // Mol. Immunol. – 2012. – Vol. 50, N 1–2. – P. 18–25.

234. S-layers as a tool kit for nanobiotechnological applications / U. B. Sleytr, C. Huber, N. Ilk et al. // FEMS Microbiol Lett. – 2007. – Vol. 267. – P. 131–144.

235. Sloat, B. R. Nasal immunization with a dual antigen anthrax vaccine induced strong mucosal and systemic immune responses against toxins and bacilli / B.R. Sloat, Z. Cui // Vaccine. – 2006. – Vol. 24. – P. 6405–6413.

236. Sloat, B.R. Nasal immunization with anthrax protective antigen protein adjuvanted with polyribonucleic-acid induced strong mucosal and systemic immunities / B.R. Sloat, Z. Cui // Pharmaceutical Research. – 2006. – Vol. 23, N 6. – P. 1217–1226.

237. Sloat, B.R. Strong mucosal and systemic immunities induced by nasal immunization with anthrax protective antigen protein incorporated in liposome- prota-

mine-DNA particles / B.R. Sloat, Z. Cui // *Pharmaceutical Research*. – 2006. – Vol. 23, N 2. – P. 262–269.

238. Steinberg, B.E. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death / B.E. Steinberg, S. Grinstein // *SciSTKE*. – 2007. – Vol. 379. – P. 11.

239. Swanson-Biearman, B. Delayed life-threatening reaction to anthrax vaccine / B. Swanson-Biearman, E. Krenzelok // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* – 2001. – Vol. 39, N 1. – P. 81–84.

240. Sylvestre, P. Characterization of a collagen – like glycoprotein: a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium filaments / P. Sylvestre, E. Couture-Tosi, M. Mock // 5th International Conference on Anthrax, Nice, France. – 2003. – P. 26.

241. The adenylate cyclase toxin of *Bacillus anthracis* is a potent promoter of T(H)17 cell development / S.R. Paccani, M. Benagiano, M.T. Savino et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2011. – Vol. 127, N 6. – P. 1635–1637.

242. The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis* / S. Mesnage, E. Tosi-Couture, P. Gounon et al. // *Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180, N 1. – P. 52–58.

243. The role of antibodies to *Bacillus anthracis* and anthrax toxin components in inhibiting the early stages of infection by anthrax spores / S. Welkos, S. Little, A. Friedlander et al. // *Microbiology*. – 2001. – Vol. 147. – Part 6. – P. 1677–1685.

244. The solute-binding component of a putative Mn(II) ABC transporter (MntA) is a novel *Bacillus anthracis* virulence determinant / O. Gat, I. Mendelson, T. Chitlaru et al. // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 58, N 2. – P. 533–551.

245. Tonello, F. *Bacillus anthracis* factors for phagosomal escape / F. Tonello, I. Zornetta // *Toxins*. – 2012. – N 4. – P. 536–553.

246. Vetter, S. The two-component system *Bacillus* respiratory response A and B (BrrA-BrrB) is a virulence factor regulator in *Bacillus anthracis* / S. Vetter, P. Schlievert // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46, N 25. – P. 7343–7352.

247. von Köckritz-Blickwede, M. Innate immunity turned inside-out: antimicro-

bial defense by phagocyte extracellular traps / M. von Köckritz-Blickwede, V. Nizet // J. Mol. Med. – 2009. – Vol. 87, N 8. – P. 775–783.

248. Williams, D.D. Surface layer protein EA1 is not a component of *Bacillus anthracis* spores but is a persistent contaminant in spore preparations / D.D. Williams, C.L. Turnbough // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186, N 2. – P. 566–569.

249. World Health Organization. State of the art of vaccine research and development. – WHO/IVB/05.XX, 2005.

250. Xu, L. *Bacillus anthracis*: a multi-faceted role for anthrax lethal toxin in thwarting host immune defenses / L. Xu, D.M. Frucht // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2007. – Vol. 39, N 1. – P. 20–24.

251. Xu, Q. Detoxified lethal toxin as a potential mucosal vaccine against anthrax / Q. Xu, M. Zeng // Clin. Vaccine Immunol. – 2008. – Vol. 15, N 4. – P. 612–616.

252. Yeung, A.T. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications / A.T. Yeung, S.L. Gellatly, R.E. Hancock // Cell. Mol. Life Sci. – 2011. – Vol. 68, N 13. – P. 2161–76.

253. Zeng, M. Protection against anthrax by needle-free mucosal immunization with human anthrax vaccine / M. Zeng, Q. Xu, M.E. Pichichero // Vaccine. – 2007. – Vol. 25, N 18. – P. 3588–3594.