

УДК 616.98:579.852.11

Изучение влияния антигенов, полученных из рекомбинантного штамма *Bacillus anthracis* 55ΔТПА-1Sp^o-, на органы и ткани иммунизированных животных

© 2017 Н.И. МИКШИС*, П.Ю. ПОПОВА, А.П. СЕМАКОВА, О.М. КУДРЯВЦЕВА, С.А. БУГОРКОВА, А.Л. КРАВЦОВ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» (РосНИПЧИ «Микроб») Роспотребнадзора, Саратов, 410005

e-mail: rusrapi@microbe.ru, mikshis_n@mail.ru*

Поступила 13.03.2017 г.

Принята в печать 12.04.2017 г.

Рекомбинантный штамм *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp^o- был использован для разработки и апробации способа одновременного получения иммуногенных сибиреязвенных антигенов – протективного антигена и белка S-слоя EA1, входящих в состав прототипа сибиреязвенной вакцины. Предлагаемый способ включает подготовку посевной культуры, выращивание в жидкой среде без антибиотика, стерилизующую фильтрацию, концентрирование, диафильтрацию и хроматографическую очистку на различных носителях и обеспечивает высокий выход обоих целевых продуктов. Показано, что очищенные антигены отдельно или в сочетании друг с другом в дозировках, в несколько раз превышающих иммунизирующие, не оказывают токсического действия на органы и ткани лабораторных животных. Незначительные изменения, выявленные при гистологическом исследовании, являются отражением адаптационно-компенсаторных реакций макроорганизма и имеют тенденцию к нормализации. Реакция иммунокомпетентных органов соответствует умеренным проявлениям иммуногенеза. Установлено, что добавление белка EA1 к рекомбинантному протективному антигену приводит к увеличению экспрессии генов, детерминирующих TLR врожденного иммунитета. Иммунизация лабораторных животных сочетанным препаратом обуславливает более выраженную, чем при использовании одного протективного антигена, иммунобиологическую перестройку в лимфоидных органах.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, сибирская язва, сибиреязвенные вакцины, рекомбинантный протективный антиген.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-45-60

Bacillus anthracis – грамположительный спорообразующий микроорганизм, вызывающий особо опасное зооантропонозное инфекционное заболевание – сибирскую язву. До середины прошлого столетия массовый падеж сельскохозяйственных животных от этой инфекции и вспышки заболевания среди людей были серьезной проблемой ветеринарии и здравоохранения. Во второй половине XX века благодаря распространению профилактических ветеринарно-санитарных и противоэпидемических мероприятий наметилась тенденция к улучшению ситуации. Однако даже при условии

поддержания относительного благополучия на эндемичных территориях вспышки сибиреязвенной инфекции возникают постоянно [1]. Заражение человека происходит обычно при контакте с заболевшими животными или инфицированными продуктами и сырьем животного происхождения. Споры возбудителя способны длительно сохраняться и накапливаться в окружающей среде. Данные мониторинга эпидемической ситуации в России свидетельствуют о неуклонном росте неблагополучных по сибирской язве территорий; на настоящий момент их число составляет около 35 тыс. [2].

Список сокращений: КЖ – культуральная жидкость; ПЦР – полимеразная цепная реакция; рПА – рекомбинантный протективный антиген; ЭДТА – этилендиаминтетраацетат; SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) – додецилсульфат натрия; TLR (Toll-Like Receptors) – плацебоподобные (толл-подобные) рецепторы.

Расширение нозоареала патогенного микроорганизма может происходить вследствие климатических изменений. Так, в 2016 г. в Ямало-Ненецком автономном округе на фоне крупной эпизоотии среди оленей возник очаг сибирской язвы. Ситуацию спровоцировало экстремально жаркое лето, способствующее оттаиванию и вскрытию забытого скотомогильника [3]. Ликвидация последствий потребовала значительного вложения средств и ресурсов: в профилактических мероприятиях участвовало 946 человек, иммунизацию против сибирской язвы прошли более 13 тысяч человек [4]. Не исключен риск заноса инфекции и с территории сопредельных стран, активизации почвенных очагов в районах стихийных бедствий, а также использования микроорганизма в террористических целях [5].

Ключевую роль в предотвращении заболеваемости сибирской язвой играет вакцинация декретированного контингента. Лицензированная и успешно применяемая живая вакцина на основе аттенуированного штамма *B. anthracis* СТИ-1 внесла неоценимый вклад в улучшение эпидемиологической ситуации [6]. Тем не менее, мировая практика доказывает актуальность разработки еще более безопасных и эффективных вакцин для специфической профилактики сибирской язвы. Исследования в этом направлении ведутся несколько десятилетий. Наибольшие успехи достигнуты в создании химических средств иммунопрофилактики. В 2016 г. в США три экспериментальных вакцинных препарата на основе рекомбинантного протективного антигена (рПА) находились на разных стадиях клинических испытаний. В соответствии с современной концепцией рПА является базовым компонентом разрабатываемой сибиреязвенной вакцины, в рецептуру которой могут быть введены дополнительные иммуногены, а также вещества, активирующие структуры врожденного иммунитета [7].

Основными критериями отбора кандидатов для создания вакцины являются высокая иммуногенность (способность при однократной или двукратной иммунизации индуцировать выраженный иммунный ответ в организме привитого) и низкая реактогенность (отсутствие повреждающего воздействия на органы и ткани макроорганизма). В РосНИПЧИ «Микроб» получен прототип рекомбинантной сибиреязвенной вакцины, содержащей в качестве основной иммуногенной составляющей рПА, а в качестве дополнительного компонента – белок S-слоя EA1.

Цель настоящего исследования – создание и апробация единой технологической схемы производства рПА и EA1 из рекомбинантного проду-

цента *B. anthracis* штамма 55ΔТПА-1Sp^o и изучение влияния полученных антигенов на иммунологическую реактивность макроорганизма, органы и ткани иммунизированных лабораторных животных.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы

В работе использовали рекомбинантный аспорогенный штамм-продуцент рПА *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp^o (КМ97, патент РФ №2321629), имеющий следующие фенотипическую характеристику и плазмидный состав: Cap⁻(рХО2⁻), Tox⁻(рХО1⁻), Km^r(рUB110РА-1). Штамм предоставлен Государственной коллекцией патогенных бактерий ГКПБ (РосНИПЧИ «Микроб»).

Лабораторные животные

Эксперименты проводили на мышах линии BALB/c (20±2 г) и морских свинках (300±20 г) из питомника РосНИПЧИ «Микроб». Биомодели содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях.

Питательные среды

В работе использовали агар и бульон Хоттингера (РосНИПЧИ «Микроб»), в которые при необходимости добавляли канамицин (25мкг/мл) (Sigma, США) и триптон (20 мг/мл) (Roerig, Германия).

Культивирование аспорогенного рекомбинантного штамма

Штамм *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp^o высевали из ампул на чашки с агаром Хоттингера, рН 7,2–7,4, с добавлением селективного антибиотика (канамицина) в концентрации 25 мкг/мл и инкубировали при 37 °С в течение 18 ч.

Для получения бактериальной культуры I пассажа по одной микробиологической петле 18-часовой агаровой культуры штамма-продуцента помещали в пробирки со скошенным агаром Хоттингера, содержащим канамицин в концентрации 25 мкг/мл, и выращивали при температуре 37 °С в течение 8 ч. Затем биомассу смывали, добавляя в каждую пробирку по 1 мл охлажденного 0,85%-ного раствора хлорида натрия, рН 7,2.

Для получения бактериальной культуры II пассажа полученную микробную взвесь штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp^o переносили во флаконы со скошенным агаром Хоттингера, содержащим

канамицин (25 мкг/мл) и снова инкубировали при температуре 37 °С в течение 18 ч. После этого микробную массу с поверхности агара смывали, добавляя в каждый флакон по 3 мл охлажденного 0,85%-ного раствора хлорида натрия, рН 7,2. Клеточную взвесь, собранную после обоих пассажей, переносили в один стерильный флакон и разводили 0,85%-ным раствором хлорида натрия, рН 7,2, до концентрации около $50 \cdot 10^9$ кл/мл. Посевную культуру продуцента использовали в дальнейшем для инокуляции в ферментер из расчета 10 мл клеточной взвеси на 1 л среды.

Выращивание штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp⁺ в больших объемах проводили в пилотном ферментере с автоматическим поддержанием параметров среды и рабочим объемом 14 л. Перед выращиванием осуществляли стандартные процедуры по подготовке биореактора, фильтров и очистительной системы. Загрузку питательной среды (бульон Хоттингера) в объеме 5 л производили с помощью насоса при глубине вакуума 40–53 кПа. Стерилизацию осуществляли при 121 °С под давлением 110 кПа в течение 30 мин. После стерилизации и установления в биореакторе температурного режима 37 °С в питательную среду с соблюдением правил асептики добавляли стерильный раствор триптона до конечной концентрации не менее 20 мг/мл. Во время выращивания культуры при температуре 37 °С бульон в реакторе непрерывно аэрировали воздухом путем перемешивания механической мешалкой со скоростью 150 об/мин. Количество подаваемого воздуха составляло 0,5–0,6 л/мин на 1 л питательной среды. Через 16 ч прекращали перемешивание и подачу воздуха и добавляли 2 мМ ЭДТА (Sigma, США) на 1 л среды, тем самым останавливая выращивание культуры.

Отделение клеточной биомассы и стерилизация культурального фильтрата

С помощью устройства для фильтрации Nalgene (США) емкостью 500 мл с фильтрационной мембраной 0,2 мкм небольшие объемы КЖ (до 1 л) стерилизовали, разделяя на фракции культурального фильтрата, содержащего рПА, и клеточной массы, содержащей ЕА1 (супернатант, получаемый из биомассы). При работе с большими объемами культуры штамма-продуцента отделение клеточной биомассы и одновременную стерилизацию получаемого культурального фильтрата осуществляли на установке с микрофильтрационной мембраной Vivaflow 200 (Sartorius, Германия) с порогом отсечения 0,2 мкм. Для этого по-

сле окончания культивирования КЖ подавали в емкость фильтрационной установки и процесс концентрирования (фильтрации) осуществляли при оперативном давлении 250 кПа до уменьшения объема обрабатываемого продукта, содержащего клеточную массу, как минимум в 10 раз. Отделенный стерильный культуральный фильтрат, содержащий ПА, и концентрат клеточной биомассы, содержащий ЕА1, подвергали для дальнейшей переработки после контроля специфической стерильности.

Выделение и хроматографическая очистка протективного антигена

Стерильный культуральный фильтрат разводили в объемном соотношении 1:1 буфером, содержащим 50 мМ раствор натрия хлорида («Нева-Реактив», Россия), 25 мМ диэтанолламин (Sigma) и 2 мМ ЭДТА, рН 8,9. Затем раствор концентрировали приблизительно в 20 раз путем фильтрации (оперативное давление около 250 кПа), применяя модуль Vivaflow 200 (Sartorius) с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 кДа. Диафильтрацию осуществляли на той же установке с использованием десятикратного объема указанного буфера, добавляя его в емкость с концентрируемым продуктом.

Дальнейшую очистку проводили с помощью хроматографической системы BioLogic Duo Flow™ (BioRad, США). Хроматографическую колонку размером 90 × 90 мм заполняли 100 мл смолы Macro Prep 50Q (BioRad), дегазировали и промывали равным объемом буфера, содержащего 1 М раствор натрия хлорида. Затем колонку уравновешивали, пропуская последовательно 10 объемов буфера, содержащего 25 мМ диэтанолламина, 50 мМ хлорид натрия, 2 мМ ЭДТА, рН 8,9, и 1 объем того же буфера с добавлением 30 мМ раствора калия хлорида, рН 8,9, со скоростью потока 10 мл/мин. На колонку со смолой Macro Prep 50Q наносили сконцентрированный и отделившийся культуральный фильтрат в объеме связывания смолы. Не связавшиеся с носителем белки проскока собирали. После этого смолу промывали буфером для диафильтрации, содержащим 30 мМ калий хлорид, в объеме, равном объему носителя. Обе фракции объединяли.

Полученный препарат концентрировали в 10 раз, как описано выше. Диафильтрацию осуществляли, последовательно используя 10-кратный объем буфера, содержащего 50 мМ хлорид натрия, 25 мМ диэтанолламин, 2 М ЭДТА, рН 8,9, и 10-кратный объем буфера, содержащего 145 мМ

ацетат аммония и 2 мМ ЭДТА, рН 10,0. После этого препарат помещали в мелкие емкости и хранили при -70°C .

На следующем этапе хроматографическую колонку 25×800 мм заполняли носителем для гель-фильтрации Sephacryl-HR300 (BioRad, США) и уравнивали тремя объемами буферного раствора, содержащего 0,1 М трис, 1 мМ ЭДТА и 50 мМ хлорид натрия, рН 8,0. Систему программировали на скорость потока 2 мл/мин. Препарат размораживали и наносили на колонку одновременно в объеме не более 3% от объема геля. Концентрация белка в исходном препарате составляла не более 2,5 мг/мл. Контроль выхода белка осуществляли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Пробы, содержащие ПА, отбирали и после 10–15 хроматографических циклов объединяли.

На последнем этапе осуществляли концентрирование рПА (приблизительно в 10 раз) с использованием ультрафильтрационной мембраны Vivaflow 200 с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 кДа или с помощью концентраторов Vivaspin-20 (Sartorius) с тем же диаметром пор.

Степень очистки ПА определяли по результатам электрофореза в денатурирующих условиях в 10%-ном полиакриламидном геле, концентрацию белка – по оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 280 нм. Очищенный рПА хранили при температуре -70°C , лиофилизированный – при температуре от 0 до 8°C .

Выделение и очистка белка S-слоя EA1

Для выделения EA1 осажденную центрифугированием клеточную массу отмывали от остатков среды 0,85%-ным раствором хлорида натрия. Биомассу (500 мл) смешивали с 50 мл экстрагирующего буфера, содержащего 5 мМ трис-гидрохлорид, 1% SDS и 5 мМ 2-меркаптоэтанол. После этого смесь прогревали на водяной бане при 70°C в течение 30 мин, остужали и центрифугировали 30 мин при 7000 г и температуре 4°C .

Стерилизацию полученного супернатанта проводили на фильтрационной установке с использованием микрофильтрационной мембраны Vivaflow 200 с порогом отсечения 0,2 мкм при оперативном давлении около 250 кПа. Контроль специфической стерильности осуществляли путем посева супернатанта на твердую и жидкую среды (0,1 мл на чашку с агаром Хоттингера или в пробирку с бульоном Хоттингера) и последующей инкубации при 37°C .

На следующем этапе клеточный экстракт подвергали диафильтрации 10 объемами буфера, содержащего 0,1 М трис-гидрохлорид и 2 мМ ЭДТА, рН 8,0, с использованием модуля Vivaflow 200 с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 кДа. Полуфабрикат, содержащий EA1, сохраняли при температуре -70°C .

Очистку белка EA1 осуществляли с применением хроматографической системы BioLogic Duo Flow™. Хроматографическую колонку (26×200 мм) заполняли предварительно декантрованным гидроксипатитом (Sigma, США) и уравнивали 10 свободными объемами буфера, содержащего 5 мМ $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, рН 6,8, при скорости потока 10 мл/мин до регистрации стабильной базовой линии. Полуфабрикат размораживали и наносили на колонку, после чего элюировали белок, пропуская через колонку три свободных объема линейного градиента фосфата калия ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) – от 0 до 1 М. Выход белков контролировали спектрофотометрически (при длине волны 280 нм). Содержащие EA1 фракции собирали и после 10–15 циклов очистки объединяли.

Второй этап очистки проводили на том же носителе по аналогичной методике. Очищенный белок EA1 подвергали диафильтрации 10 объемами бидистиллированной воды при температуре 4°C с использованием модуля Vivaflow 200 (30 кДа). При необходимости препарат белка EA1 концентрировали, помещали в сосуды малой емкости и хранили при -70°C , а после лиофилизации – при 8°C .

Электрофорез белков

Электрофоретическое разделение белков проводили в 10%-ном полиакриламидном геле с SDS. Для этого 20 мкл каждого образца смешивали в соотношении 1:1 с буфером, содержащим 0,125 М трис-гидрохлорид, 4% SDS, 20% глицерина, 2% 2-меркаптоэтанол и 0,03 мМ бромфеноловый синий (рН 6,8). Смесь прогревали при температуре 100°C в течение 90 с и вносили в лунки полиакриламидного геля (15 мкл на лунку). Электрофорез проводили в вертикальной камере (Amersham, США) в буфере, содержащем 25 мМ трис, 192 мМ глицин и 3,5 мМ SDS (рН 8,3). Гель окрашивали в растворе, содержащем 0,3 мМ кумасси бриллиантовый синий, 40% этанола (ЗАО «Брынцалов А-Ферейн»), 7% ледяной уксусной кислоты (Panreac, Испания) в течение 1–2 ч. Затем гель помещали в раствор, содержащий 5%-ный этанол и 7%-ную ледяную уксусную кислоту, и инкубировали при непрерывном покачивании до появления видимого результата.

Определение концентрации белковых препаратов

Концентрацию белка в препаратах определяли спектрофотометрически [8].

Иммуноэлектронная микроскопия

Мечение антител коллоидным золотом проводили по методике, описанной ранее [9]. Подготовку препаратов для иммуноэлектронной микроскопии осуществляли согласно процедуре, описанной J. Farchaus с соавт. [10] с собственными модификациями [9]. Препараты анализировали с помощью электронного микроскопа Hitachi HU-12A (Япония).

Иммунизация лабораторных животных

Иммунизацию лабораторных животных осуществляли подкожно в область внутренней поверхности бедра однократно или двукратно с интервалом в 2 нед. Разовую дозу вводили морским свинкам в объеме 0,5 мл, линейным мышам – 0,2 мл. Животных контрольной группы инъецировали стерильным 0,9%-ным раствором натрия хлорида в объеме 0,2 мл (мышей) или 0,5 мл (морских свинок).

Выделение лимфоцитов тимуса и селезенки

Линейных мышей разделяли на группы по 6 животных и иммунизировали тестируемы-

ми препаратами. Биомоделей контрольной группы оставляли интактными. Животных умерщвляли через 4 ч после иммунизации путем цервикальной дислокации в соответствии с директивой N 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, использующихся для научных целей». Лимфоциты выделяли общепринятыми методами [11].

Выделение РНК из лимфоцитов тимуса и селезенки, обратная транскрипция и ПЦР

Лимфоциты из селезенки и тимуса, хранящиеся в растворе Хэнкса при температуре -70°C , размораживали до комнатной температуры. Выделение РНК из клеток проводили, применяя комплект реагентов «РИБО-сорб» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Обратную транскрипцию осуществляли с использованием комплекта «Реверта» («ИнтерЛабСервис») в соответствии с инструкцией производителя. Препарат кДНК сохраняли не более 12 мес при температуре не выше -70°C . ПЦР проводили с использованием праймеров к фрагментам генов, кодирующих β -актин (положительный контроль) и TLR 2, 4 и 6-го типов. Праймеры для ПЦР, используемые в работе, имели следующую структуру [12]:

β -актин-F5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
 β -актин-R5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'
 TLR2-F5'-CAGCTTAAAGGGCGGGTCAG-3'
 TLR2-R5'-TGGAGACGCCAGCTCTGGCTCA-3'
 TLR4-F5'-AGTGGGTCAAGGAACAGAAGCA-3'
 TLR4-R5'-CTTTACCAGCTCATTTCTCACC-3'
 TLR6-F5'-AGTGCTGCCAAGTTCCGACA-3'
 TLR6-R5'-AGCAAACACCGAGTATAGCG-3'

Олигонуклеотидные праймеры синтезировали в РосНИПЧИ «Микроб» на автоматическом синтезаторе «ДНК ASM-800» («Биоссет», Россия). Амплификацию фрагментов генов проводили на программируемом амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей схеме: 1 цикл – 95°C , 5 мин; 30 циклов – 95°C , 1 мин; 1 цикл – 60°C , 1 мин; 1 цикл – 72°C , 1 мин и завершающий цикл – 5 мин, 72°C . Для электрофоретического анализа ПЦР-продуктов в 2%-ном агарозном геле использовали горизонтальную камеру (BioRad).

Определение пролиферативной активности иммунокомпетентных клеток цитофлуориметрическим методом

Фиксированные в этиловом спирте лимфоциты тимуса и селезенки лабораторных животных осаждали центрифугированием при 250–300 g в течение 10 мин. К полученному осадку добавляли калий-фосфатный буфер, pH $7,3 \pm 0,1$, содержащий 50 мкг/мл пропидия иодида (Thermo Fisher Scientific, США), 100 мкг/мл РНКазы (Fermentas, США) и 0,1%-ный тритон X-100 (Sigma). После

15–20 мин экспозиции образцы смеси анализировали на проточном цитофлуориметре Dako Cytomation марки Cyan ADP (Dako Cytomation, Дания). Учет результатов осуществляли в соответствии с протоколом фирмы-производителя оборудования и реагентов.

Апоптоз оценивали по накоплению гиподиплоидных клеток (<2С ДНК на клетку) в пике, располагающемся левее пика, соответствующего диплоидным клеткам. Активацию иммунокомпетентных клеток определяли по их числу на этапе пролиферации, включающем стадии S+G₂+M клеточного цикла (>2С ДНК на клетку). Определяли также соотношение количества клеток, находящихся в стадии апоптоза и пролиферации. Значение данного индекса меньше единицы свидетельствовало об отсутствии повреждающего действия исследуемых препаратов на иммунокомпетентные клетки.

Положительным контролем при определении цитотоксичности антигенных препаратов *in vitro* служили образцы цельной дефибринированной крови человека (здорового донора, 3 мл), в которые добавляли сибирязвенные антигены (рПА или ЕА1) в количестве 10 мкг в стерильном физиологическом растворе. В пробирки с отрицательным контролем вносили вместо антигенов физиологический раствор. Инкубацию проводили в течение 1 сут при 37 °С. Цитофлуориметрический контроль осуществляли, как описано выше.

После инкубации антигенных препаратов с дефибринированной кровью лейкоциты выделяли и окрашивали раствором, содержащим митрамицин и бромид этидия (Sigma).

Морфологические и гистологические исследования

Для определения токсичности по морфологическим показателям иммунизированных морских свинок умерщвляли хлороформом в установленные сроки (по три особи одновременно). После вскрытия проводили осмотр и выполняли макрометрическое исследование массы и размеров органов животных.

Для гистологического исследования отбирали ткани печени, сердца, легких, почек, надпочечников, кожи, тимуса, селезенки, регионарных и отдаленных лимфатических узлов животных. Гистологический материал фиксировали в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина. Дальнейшую обработку проводили по стандартной методике [13], готовые полутонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Merck, США). Материал просматривали в микроскопе Olympus CX31

при увеличении в 40–200 раз. Морфометрические характеристики оценивали с помощью денситоморфометрической программы аппаратно-программного комплекса «МЕКОС-Ц» (версия 2.1.0.0).

В почках определяли среднее количество клубочков в поле зрения среза, в печени – число звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера) в поле зрения среза, в лимфоидных органах – количество лимфатических фолликулов.

Количество почечных телец (клубочков) в измененном функциональном состоянии (полнокровие капиллярной сети, сморщенные клубочки, отек сосудистых петель) представляли в процентном отношении к числу клубочков без видимых изменений.

Активность лимфоидных органов характеризовали полуколичественным методом (в баллах от 0 до 3). За 0 баллов принимали отсутствие активности; за 1 балл – слабо выраженную активность; за 2 балла – умеренно выраженную активность; за 3 балла – резко выраженную активность. Тест на фолликулы лимфатических узлов (В-зон) оценивали в 3 балла, если эти зоны имели так называемые светлые центры, богатые бластными формами клеток в стадии митоза и макрофагами, содержащими осколки ядер. На среднюю степень активности фолликулов (2 балла) указывали увеличение в светлых центрах числа эпителиоидных клеток и четкий периферический ободок из малых лимфоцитов вокруг центров. В фолликулах со слабой активностью (1 балл) светлые центры содержали мало клеток (характеризовались «запустением») и были окружены широкой мантийной зоной из малых лимфоцитов. Фолликулы без светлых центров считались неактивными (0 баллов).

Активность мозговых тяжей В-зон, а также Т-зон (паракортикальных) считалась нулевой (0 баллов), если в них отсутствовала гиперплазия клеток. Преобладание бластных форм обуславливало оценку активности в 3 балла; смешанный состав (бласты и неактивированные лимфоциты либо зрелые плазматические клетки) – в 2 балла; преобладание неактивированных клеток с малым числом бластных элементов – в 1 балл.

Аналогичный подход применяли для оценки активности Т- и В-зон в селезенке, где нарастание гиперпластической активности, как и в лимфатических узлах, может сопровождаться увеличением размеров этих структур.

Статистические методы

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с применением стандартных методов: вычисление средней арифметической

абсолютных и относительных величин (M), средней ошибки средней арифметической (m) и коэффициента достоверности различия средних (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение и очистка рПА и EA1 из аспорогенного рекомбинантного штамма-продуцента

Штамм-продуцент *Bacillus anthracis* 55ΔТПА-1Sp^{o-}, не образующий споры, не синтезирующий факторы патогенности сибиреязвенного микроба (отечный и летальный факторы, капсула) и хранящийся в ГКПБ в лиофилизованном состоянии, высевали из ампул и пассировали дважды на средах с канамицином для получения достаточного количества биомассы. Дальнейшее выращивание проводили без добавления селективного антибиотика, что важно, исходя из перспективы использования целевых продуктов в составе препарата для вакцинации людей. Культивирование продуцента осуществляли в течение 16 ч при температуре 37 °С в бульоне Хоттингера, содержащем в качестве дополнительного ингредиента триптон: данные условия были подобраны нами ранее с целью эффективной продукции рПА и снижения риска деградации белковых молекул под действием собственных протеолитических ферментов штамма [14].

На следующем этапе в процессе стерилизующей фильтрации происходило разделение культурального фильтрата и клеточной массы. Стерильный культуральный фильтрат использовали для выделения рПА, а из концентрированной биомассы экстрагировали белок EA1. Очищенный препарат рПА получали при помощи последовательных этапов концентрирования, диафильтрации и двухступенчатой хроматографии на ионообменном носителе и носителе для гель-фильтрации. Выделение белка EA1 из супернатанта, образовавшегося после центрифугирования разрушенной клеточной массы, и его очистку осуществляли при помощи последовательных этапов диафильтрации и двухступенчатой ионообменной хроматографии с применением в качестве носителя гидроксиапатита.

Электрофоретическая подвижность белка, полученного из культурального фильтрата, соответствовала молекулярной массе ПА сибиреязвенного микроба – 83 кДа (рис. 1). Степень очистки белка была не менее 85%; его концентрация в очищенном и сконцентрированном препарате составляла 10 мг/мл, а выход – 128 мг ПА на 1 л КЖ рекомбинантного штамма-продуцента.

Электрофоретическая подвижность белка, выделенного из супернатанта разрушенной клеточной массы, соответствовала молекулярной массе белка EA1 сибиреязвенного микроба – 94 кДа (см. рис. 1); степень очистки составляла 95%. Концентрация белка в очищенном препарате была равна 3,4 мг/мл, а выход составил 50 мг белка EA1 на 1 л КЖ продуцента. В реакции иммуноблоттинга со специфичными антителами к ПА и EA1 на уровне электрофоретической подвижности белков отмечали образование детектируемого иммунного комплекса. Иммунореактивность очищенных протеинов подтверждали также результатами ИФА с антителами к ПА и EA1 (данные не приведены).

Ранее [9] мы выделяли белок EA1 из бесплазмидного производного вакцинного штамма *B. anthracis* СТИДТ. Были получены убедительные доказательства его принадлежности к структурам S-слоя возбудителя сибирской язвы. Аминокислотный анализ продемонстрировал характерное для бактериальных S-слоев соотношение полярных и неполярных аминокислот (66 и 34%, соответственно), равные доли (соответственно 20 и 20,8%) кислых и основных аминокислот, а также типичное для белков S-слоя сибиреязвенного микроба отсутствие метионина и цистеина. Исследование ультраструктуры выявило паракристаллическое строение белка EA1 с симметричным расположением пор [9].

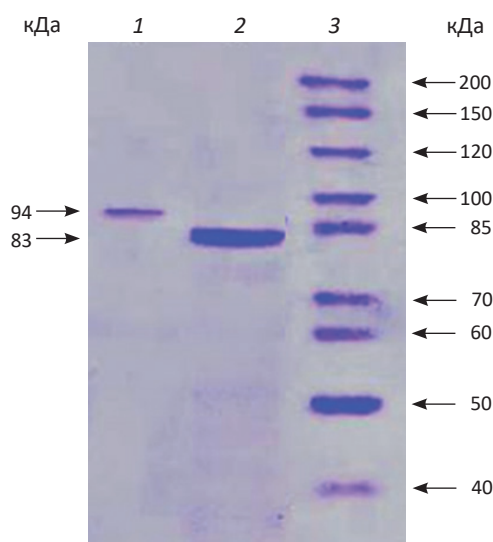


Рис. 1. Электрофорез очищенных препаратов EA1 (дорожка 1) и рПА (дорожка 2); выделенных из штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp^{o-}; дорожка 3 – маркеры молекулярной массы PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific

Fig. 1. Electrophoresis of purified preparations of EA1 (lane 1) and rPA (lane 2) isolated from *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp^{o-} strain; lane 3, MM markers (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific)

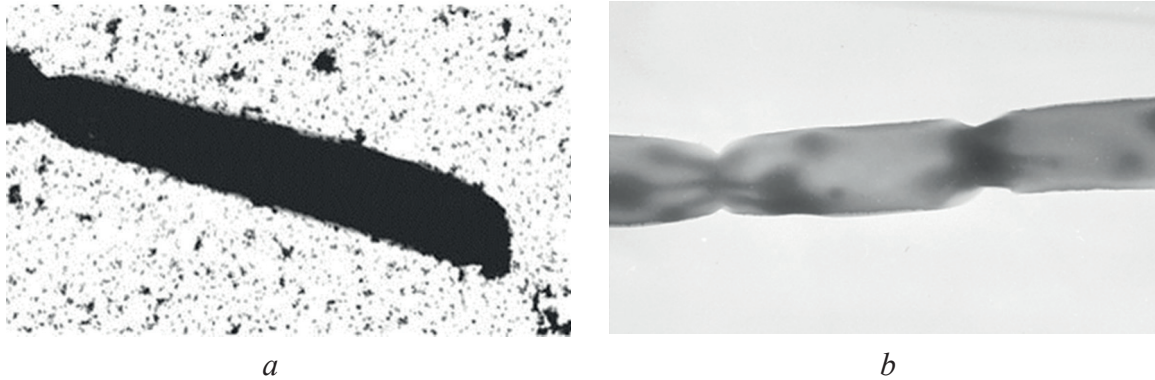


Рис. 2. Иммуноэлектронная микроскопия клеток штамма *B. anthracis* SterneΔT с мечеными антителами к белку EA1 (выделенному из штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1Spo⁻) (a) и те же клетки без обработки указанными антителами (b). Увеличение × 20000

Fig. 2. Immunoelectron microscopy of *B. anthracis* SterneΔT strain cells with labeled antibodies to EA1 protein isolated from *B. anthracis* 55ΔТПА-1Spo⁻ strain (a) and same cells without treatment by above antibodies (b). Enlargement of × 20,000

Для подтверждения вышеописанных характеристик белка EA1, полученного в настоящей работе из рекомбинантного штамма-производителя *B. anthracis* 55ΔТПА-1Spo⁻, проводили иммуноэлектронную микроскопию с мечеными коллоидным золотом иммуноглобулинами, специфичными к белку EA1. Клетки штамма *B. anthracis* SterneΔT после взаимодействия с указанными иммуноглобулинами были сплошь покрыты непроницаемой для электронов меткой, при этом внутренние структуры становились неразличимыми (рис. 2). Отдельные гранулы были видны только в разреженных местах, преимущественно по краю и в межклеточном пространстве, и только на конгломератах другого белка S-слоя – Sap, продуцируемого сибиреязвенным штаммом в среду и обладающего высокой степенью гомологии с EA1.

Таким образом, успешно апробирована единая технологическая схема получения рПА и EA1 из рекомбинантного производителя *B. anthracis* 55ΔТПА-1Spo⁻, не образующего споры и не синтезирующего факторы патогенности сибиреязвенного микроба. Реализация способа обеспечивает высокий выход и качество обоих целевых антигенов.

Влияние антигенов, полученных из рекомбинантного штамма, на иммунологическую реактивность макроорганизма

Защита макроорганизма от патогенов опосредуется скоординированным действием двух звеньев иммунной системы – врожденного и приобретенного. Стимуляция структур врожденного иммунитета инициирует каскад реакций, запускающих

развитие адаптивного иммунитета. В этой связи изучали экспрессию генов, кодирующих толл-подобные рецепторы (TLR), в иммунокомпетентных клетках экспериментальных животных, иммунизированных сибиреязвенными антигенами.

Мышей линии *BALB/c* иммунизировали однократно рПА (10 мкг) или рПА с добавлением EA1 (10 мкг+5 мкг). Для выяснения способности препаратов взаимодействовать со структурами врожденного иммунитета через 4 ч после иммунизации из тимуса и селезенки биомоделей выделяли лимфоциты. Полученный после обратной транскрипции материал использовали для постановки ПЦР с праймерами к последовательностям генов TLR 2, 4 и 6-го типов. В качестве положительного контроля использовали результаты ПЦР с праймерами к гену домашнего хозяйства, кодирующему β-актин. Установлено, что добавление EA1 к рПА (без адъювантов) повышало экспрессию генов исследованных типов TLR (рис. 3, дорожки 2, 4, 6, 8, 11, 13).

Влияние полученных из рекомбинантного штамма-производителя антигенов на иммунную систему биомоделей оценивали по пролиферативной активности лимфоцитов органов центрального и периферического иммуногенеза. Мышей линии *BALB/c* (по шесть особей в группе) иммунизировали однократно подкожно препаратами рПА или рПА с добавлением EA1 в дозе 10 мкг. Контролем служили интактные животные. Пробы тимуса и селезенки забирали через 4 ч, на 1, 3, 7 и 14-е сутки после иммунизации. Процентное соотношение тимоцитов и спленоцитов в фазах клеточного деления регистрировали с помощью точного цитофлуориметра.

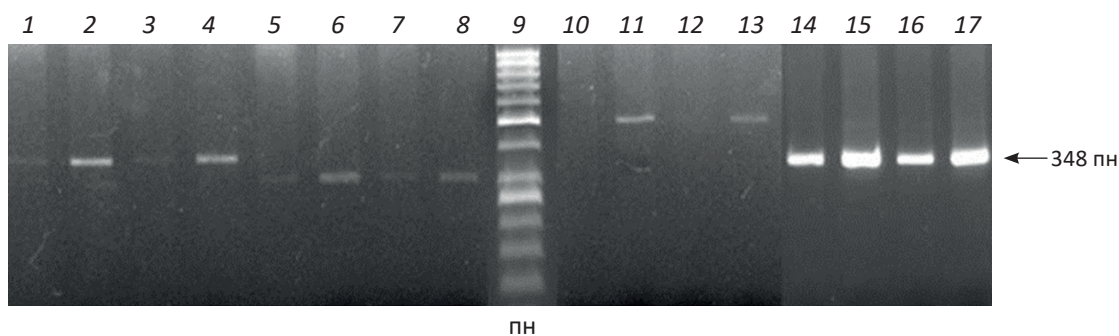


Рис. 3. ПЦР-анализ влияния полученных антигенов на экспрессию генов, кодирующих TLR врожденного иммунитета в клетках тимуса и селезенки мышей, иммунизированных рПА (дорожки 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16) и рПА + EA1 (дорожки 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17). Результаты ПЦР с праймерами к фрагментам генов, кодирующих: дорожки 1–4 – TLR 2-го типа (амплифицируемый фрагмент размером 380 пн); дорожки 5–8 – TLR 4-го типа (311 пн); дорожки 10–13 – TLR 6-го типа (520 пн); 14–17 – β-актин (348 пн, положительный контроль). Дорожка 9 – маркеры молекулярной массы (O’ GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus ready-to-use)

Fig. 3. PCR analysis of the effect of obtained antigens on expression of genes encoding TLR of innate immunity in thymus and spleen cells of mice immunized by rPA (lanes 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16) or rPA + EA1 (lanes 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17). PCR results with primers to fragments of genes encoding: lanes 1–4 – TLR type 2 (amplified fragment of 380 bp); lanes 5–8 – TLR type 4 (311 bp); lanes 10–13 – TLR type 6 (520 bp); lanes 14–17 – β-actin (348 bp, positive control). Lane 9, MM markers (O’ GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus ready-to-use)

При иммунизации мышей рПА апоптотная и пролиферативная активность клеток тимуса существенно не отличалась от аналогичных показателей в группе контроля во все сроки исследования (табл. 1). В пробах селезенки, взятых через 4 ч, на 1-е и 3-и сутки, число пролиферирующих

спленоцитов также приблизительно соответствовало контрольным значениям. Однако на 7-е и 14-е сутки регистрировали небольшое повышение пролиферативной активности клеток селезенки – до $33,7 \pm 1,6\%$ и $33,7 \pm 2,4\%$ при значении $27,7 \pm 1,6\%$ в контрольных пробах, что может

Таблица 1

Соотношение тимоцитов и спленоцитов в стадии пролиферации и апоптоза у мышей, иммунизированных рПА

Ratio of thymocytes and splenocytes at the stages of proliferation and apoptosis in rPA-immunized mice

Иммунизирующий препарат	Время после иммунизации	Доля пролиферирующих клеток, %	Доля апоптотных клеток, %	Соотношение числа клеток на стадии апоптоза и роста
Тимус				
Контроль	–	$28,7 \pm 1,5$	$3,6 \pm 0,3$	0,12
ПА (10 мкг)	4 ч	$32,4 \pm 0,8$	$3,2 \pm 0,3$	0,10
	1 сут	$32,8 \pm 0,9$	$2,8 \pm 0,2$	0,09
	3 сут	$30,1 \pm 1,3$	$2,3 \pm 0,5$	0,08
	7 сут	$30,9 \pm 2,7$	$3,1 \pm 0,5$	0,10
	14 сут	$26,6 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,2$	0,10
Селезенка				
Контроль	–	$27,7 \pm 1,6$	$2,8 \pm 0,3$	0,10
ПА (10 мкг)	4 ч	$25,5 \pm 2,5$	$4,5 \pm 0,8$	0,18
	1 сут	$24,2 \pm 0,8$	$4,4 \pm 1,2$	0,18
	3 сут	$22,7 \pm 1,9$	$5,8 \pm 1,4^*$	0,25
	7 сут	$33,7 \pm 1,6$	$5,2 \pm 1,3$	0,15
	14 сут	$33,7 \pm 2,4$	$2,4 \pm 0,4$	0,07

*Достоверность различий в эксперименте по сравнению с контролем $p < 0,05$ (reliability of differences between experimental and control data $p < 0,05$).

быть обусловлено пролиферацией В-клеток и продукцией антител. Введение мышам рПА несколько повышало также апоптозную активность спленоцитов – до максимального значения $5,8 \pm 1,4$ на 3-и сутки. Однако во всех случаях соотношение клеток селезенки в стадии апоптоза и пролиферации не превышало единицы (от 0,08 до 0,25), что свидетельствует об отсутствии повреждающего действия рПА на иммунокомпетентные клетки.

При иммунизации мышей белком EA1 во все сроки исследования количество тимоцитов в состоянии апоптоза и пролиферации также существенно не отличалась от аналогичных показателей в группе контроля (табл. 2). В то же время, введение EA1 лабораторным животным сопровождалось увеличением числа апоптозных клеток селезенки на 7-е сутки после иммунизации – до $9,5 \pm 2,8\%$ (при $2,8 \pm 0,3\%$ в контрольных образцах). Тем не менее, к концу срока наблюдения данный показатель снижался до значения $3,7 \pm 0,5\%$. В продолжение всего эксперимента соотношение клеток тимуса и селезенки на стадии апоптоза и пролиферации было существенно меньше единицы, находясь в пределах от 0,09 до 0,29.

Оценку повреждающего действия рПА и EA1 в экспериментах *in vitro* осуществляли методом

проточной цитофлуориметрии на основе мониторинга состояния апоптоза у индуцированных лейкоцитов крови человека. После инкубации антигенных препаратов с дефибринированной кровью лейкоциты выделяли и окрашивали раствором, содержащим митрамицин и бромид этидия. По результатам исследования не было выявлено свидетельств повреждающего действия тестируемых антигенов в отношении форменных элементов крови человека (данные не приведены).

Таким образом, установлено, что рПА и белок EA1 не оказывают повреждающего действия на клетки иммунокомпетентных органов лабораторных животных и одновременно достоверно повышают экспрессию генов, кодирующих TLR 2, 4 и 6-го типов врожденного иммунитета.

Исследование токсикологической безопасности антигенов, полученных из рекомбинантного штамма 55ΔТПА–1Sp⁺

Для оценки токсичности антигенных препаратов мышей линии *BALB/c* (по 10 особей в группе) иммунизировали рПА или EA1 однократно подкожно дозой 50 мкг; морским свинкам с той же целью рПА или EA1 вводили по 100 мкг. Указанные количества в 4–10 раз превышали однократные

Таблица 2

Соотношение тимоцитов и спленоцитов в стадии пролиферации и апоптоза у мышей, иммунизированных EA1

Ratio of thymocytes and splenocytes at the stages of proliferation and apoptosis in EA1-immunized mice

Иммунизирующий препарат	Время после иммунизации	Доля пролиферирующих клеток, %	Доля апоптозных клеток, %	Соотношение числа клеток на стадии апоптоза и роста
Тимус				
Контроль	–	$28,7 \pm 1,5$	$3,6 \pm 0,3$	0,12
EA1 (10 мкг)	4 ч	$31,4 \pm 1,5$	$3,1 \pm 0,4$	0,10
	1 сут	$30,5 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,6$	0,09
	3 сут	$28,1 \pm 2,2$	$3,2 \pm 0,8$	0,11
	7 сут	$30,3 \pm 0,6$	$3,2 \pm 0,4$	0,10
	14 сут	$29,7 \pm 1,1$	$2,6 \pm 0,1$	0,09
Селезенка				
Контроль	–	$27,7 \pm 1,6$	$2,8 \pm 0,3$	0,10
EA1 (10 мкг)	4 ч	$31,0 \pm 1,5$	$6,6 \pm 0,6^*$	0,21
	1 сут	$21,4 \pm 2,0$	$2,8 \pm 0,3$	0,13
	3 сут	$18,6 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,6$	0,29
	7 сут	$32,5 \pm 1,0$	$9,5 \pm 2,8^*$	0,29
	14 сут	$26,7 \pm 2,1$	$3,7 \pm 0,5$	0,14

*Достоверность различий в эксперименте по сравнению с контролем $p < 0,05$ (reliability of differences between experimental and control data $p < 0,05$).

дозы антигенов, используемые для иммунизации данных видов лабораторных животных (для морских свинок – 25,5 мкг рПА и 12,75 мкг ЕА1; для мышей – 10 мкг рПА и 5 мкг ЕА1). Ни в одном из случаев в течение 2 нед наблюдения не отмечали гибели животных, снижения массы их тела или нарушений общего состояния.

Чтобы оценить воздействие антигенов на органы и ткани макроорганизма проводили патоморфологическое исследование. Для этого морских свинок (по шесть особей в группе) иммунизировали подкожно однократно 50 мкг рПА (1-я группа) или 50 мкг рПА и 25,5 мкг ЕА1 (2-я группа). Контролем служили интактные морские свинки. Анализ гистологических изменений проводили на 1, 3, 7, 21 и 27-е сутки после иммунизации.

Введение антигенных препаратов морским свинкам не влияло на их общее состояние. За время наблюдения масса их тела естественным образом несколько увеличивалась.

В 1-е сутки наблюдения в месте введения препаратов отмечали незначительный отек подкожной клетчатки и очаговую инъекцию сосудов. При гистологическом исследовании на фоне умеренного отека и очагового полнокровия сосудов подкожной клетчатки выявляли небольшие участки лимфоцитарной инфильтрации дермы, более выраженные у животных, иммунизированных только рПА. В обеих группах в материале от животных, взятом во все сроки после иммунизации, изменений в месте введения не наблюдали, при

гистологическом исследовании полностью отсутствовал экссудативно-инфильтративный компонент (данные не приведены).

Со стороны паренхиматозных органов при микроскопическом исследовании за весь период наблюдения не отмечали значимого изменения их массы и размеров, грубых дистрофических изменений, инфильтративных процессов или резкого нарушения кровенаполнения сосудов. В течение первых семи суток при гистологическом исследовании регистрировали признаки умеренного функционального напряжения клеток паренхимы печени, почек, кардиомиоцитов на фоне очаговых явлений полнокровия сосудов (данные не приведены).

В почках лабораторных животных, иммунизированных только рПА, описанные изменения были более выраженными (рис. 4а): встречались отдельные клетки эпителия извитых канальцев в состоянии гидропической дистрофии, отмечалась очаговая лимфоцитарная инфильтрация стромы у отдельных животных. У морских свинок этой группы изменения гломерулярного аппарата чаще характеризовались умеренным полнокровием капиллярных петель сосудистых клубочков почечных телец. Так, в 1-е сутки наблюдения количество почечных телец с полнокровием капилляров у морских свинок, иммунизированных рПА, достигало 52% (при контрольных значениях от 4 до 6%), затем постепенно снижалось и к 7-м суткам не превышало 20%. В группе лабораторных животных, иммунизированных рПА+ЕА1 (рис. 4б),

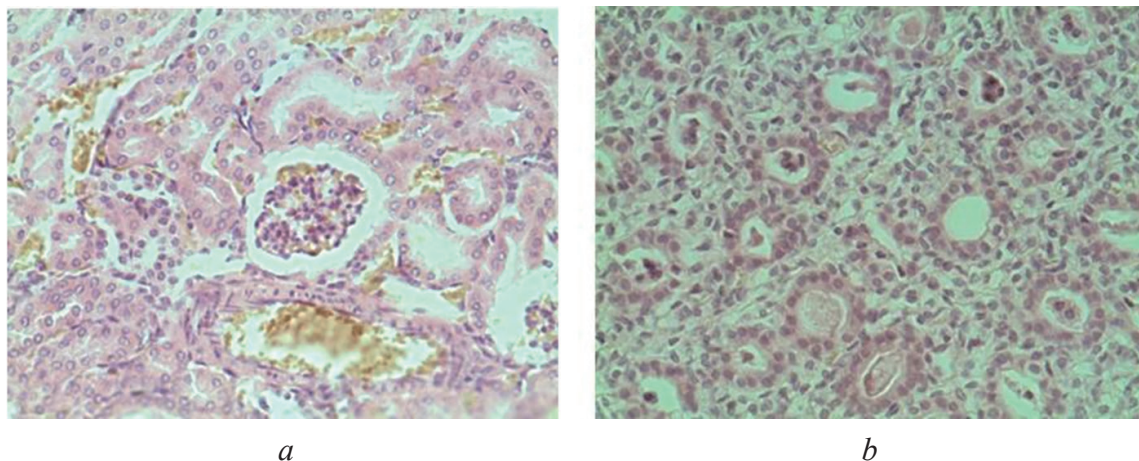


Рис. 4. Срезы почек морских свинок (окраска гематоксилин-эозином) в различные сроки после подкожной иммунизации животных полученными антигенами: а – рПА, 1-е сутки. Видны очаговые дистрофические изменения эпителия извитых канальцев и умеренное полнокровие капиллярных петель сосудистого клубочка почечного тельца (увеличение $\times 100$); б – рПА + ЕА1, 3-и сутки. Видны клетки слущенного эпителия в просвете канальцев (увеличение $\times 200$)

Fig. 4. Slices of guinea pig kidney (staining with hematoxylin-eosin) at various times after subcutaneous immunization of test animals with obtained antigens: (a), rPA, 1st day. Focal dystrophic changes of kidney convoluted tubules and moderate plethora of capillary loops of vesicular gland of renal corpuscle are seen (enlargement of $\times 100$); (b), rPA + EA1, 3rd day. Squamous epithelial cells in lumen of tubules are seen (enlargement of $\times 200$)

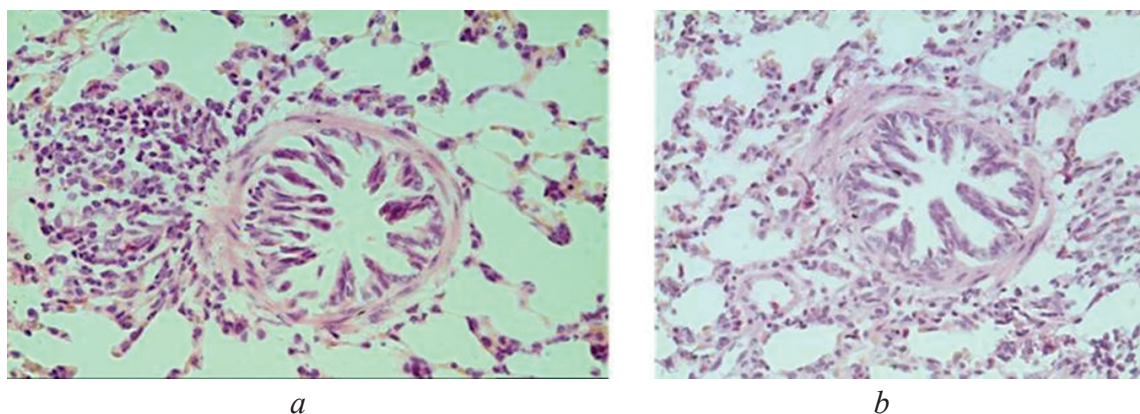


Рис. 5. Срезы легких морских свинок (окраска гематоксилин-эозином) на 21-е сутки после подкожной иммунизации животных полученными антигенами: *a* – рПА (видна перибронхиальная лимфогистиоцитарная реакция); *b* – рПА + EA1, без видимых изменений. Увеличение $\times 100$.

Fig. 5. Slices of guinea pig lungs (staining with hematoxylin-eosin) on 21st day after subcutaneous immunization of test animals with obtained antigens: (*a*), rPA, peribronchial lymphohistiocyte reaction is seen; (*b*), rPA + EA1, no visible changes. Enlargement of $\times 100$

соответствующие значения оказались значительно ниже: в 1-е сутки – 32%, а на 7-е сутки – 7%. Описанные изменения гломерулярного аппарата не сопровождалось уменьшением количества функционально активных почечных телец в поле зрения среза. В обеих группах этот показатель был даже несколько выше, чем у контрольных интактных животных. В группе морских свинок, иммунизированных рПА, на протяжении всего периода наблюдения он находился в пределах от $7,9 \pm 3,2$ до $6,4 \pm 2,38$; в другой группе животных, иммунизированных сочетанием рПА и EA1 – от $9,8 \pm 1,82$ до $6,6 \pm 3,16$. При этом контрольное значение составляло $6,3 \pm 1,17$.

В печени у иммунизированных животных обеих групп с 1-х по 3-и сутки отмечали умеренный застой в системе циркуляции крови (полнокровие внутридольковых синусоидальных гемокапилляров) и системе оттока (полнокровие центральных вен). Описанные изменения сочетались с функциональным напряжением светлых гепатоцитов центра печеночных долек. Однако к 7-м суткам морфологические характеристики функциональных структур органа у иммунизированных и интактных морских свинок достоверно не различались (данные не приведены).

При использовании обоих препаратов для иммунизации в печени наблюдали увеличение количества клеток Купфера, свидетельствующее о функциональной активации ретикулоэндотелиальной системы. У морских свинок, иммунизированных рПА, количество этих элементов за первые 7 сут достигало значения $21,5 \pm 2,1$, что в 3 раза превышало аналогичный показатель в группе ин-

тактного контроля $6,7 \pm 0,94$. В последующие сроки количество клеток Купфера несколько снижалось до значения $13,0 \pm 1,29$. В пробах от морских свинок, получивших рПА с EA1, в течение всего периода наблюдения количество клеток Купфера было в 2 раза больше контрольных значений.

Со стороны сердца и легких изменения были в допустимых пределах на всем протяжении наблюдения в обеих группах. В сердце были видны очаговое функциональное напряжение кардиомиоцитов (очаговая зернистая дистрофия) и умеренное полнокровие капиллярной сети. При гистологическом исследовании легких на фоне чередования участков с неравномерной воздушностью легочной ткани встречались полнокровные сосуды. У единичных животных отмечали перибронхиальную лимфогистиоцитарную реакцию (рис. 5).

Общая стресс-реакция организма на введение рПА и рПА + EA1 заключалась в некотором снижении массы надпочечников в первые 3 сут наблюдения, более выраженном у морских свинок 1-й группы: для правого надпочечника до значения $(0,06 \pm 0,005)$ г при контрольном показателе $(0,12 \pm 0,03)$ г, для левого надпочечника до значения $(0,035 \pm 0,005)$ г при контрольном показателе $(0,07 \pm 0,05)$ г (табл. 3).

При гистологическом исследовании надпочечников тест-животных отмечали умеренное расширение пучковой зоны с изменением ядерно-цитоплазматического соотношения у отдельных клеток, очаговое опустошение клеток клубочковой зоны и некоторое снижение феохромии мозгового вещества на фоне нормального соотношения коркового и мозгового веществ органа. Описанные изменения

Масса органов морских свинок (г), иммунизированных рПА и рПА + ЕА1

Weight (g) of organs of guinea pigs immunized by rPA or rPA + EA1

Время после иммунизации	Надпочечник		Селезенка	Тимус	РЛУ	ОЛУ
	правый	левый				
Контроль	0,12±0,03	0,07±0,05	0,8±0,09	0,42±0,15	0,01±0	0,03±0,01
Иммунизация рПА						
1 сут	0,060±0,005*	0,035±0,005*	0,36±0,02*	0,35±0,01	0,035±0,015*	0,025±0,005
3 сут	0,070±0,001*	0,055±0,001	0,36±0,025*	0,18±0,04*	0,060±0,01*	0,035±0,005
7 сут	0,060±0,005*	0,060±0,005	0,37±0,03*	0,12±0,005*	0,075±0,015*	0,060±0,005*
21 сут	0,065±0,005	0,070±0,005	1,39±0,015	0,11±0*	0,050±0,01*	0,050±0,01
27 сут	0,090±0,03	0,090±0,03	0,49±0,02	–	0,035±0,005*	0,045±0,005
Иммунизация рПА + ЕА1						
1 сут	0,060±0,025*	0,060±0,001	0,42±0,13	0,14±0,01*	0,040±0,001*	0,050±0,005
3 сут	0,055±0,005*	0,060±0,001	0,44±0,03	0,18±0,08*	0,040±0,005*	0,035±0,015
7 сут	0,090±0,005	0,070±0,02	0,37±0,03*	1,29±0,12	0,035±0,002*	0,011±0,009*
21 сут	0,085±0,005	0,075±0,005	1,28±0,1	0,75±0,05	0,080±0,001*	0,900±0,001*
27 сут	0,075±0,005	0,085±0,005	0,51±0,025	0,17±0,02*	0,045±0,005*	0,040±0

Примечание: РЛУ – регионарные лимфатические узлы; ОЛУ – отдаленные лимфатические узлы.

* достоверность различий по сравнению с контролем $p < 0,05$ (reliability of differences between experimental and control data $p < 0,05$).

также были более выражены у лабораторных животных, иммунизированных только рПА. В целом умеренное напряжение клеток, обеспечивающих синтез кортикостероидов и минералокортикоидов, на фоне незначительного «истощения» хромаффинной системы укладывалось по объему, характеру, срокам развития и угасания в картину стресс-реакции биомодели на вводимый препарат.

Ни в одном из случаев не отмечали угнетения функции лимфоидных органов. На 21-е сутки у иммунизированных морских свинок обеих групп наблюдали увеличение массы селезенки более чем в 1,5 раза по сравнению с массой органов у контрольных животных (до значений (1,39±0,015) г и (1,28±0,1) г против (0,8±0,09) г). В эти же сроки возрастание массы тимуса почти в 2 раза отмечали только у морских свинок, иммунизированных рПА + ЕА1 (до значения (0,75±0,05) г при контрольном показателе (0,42±0,15) г). Гистологическое исследование показало умеренную гиперплазию фолликулярных структур. На 27-е сутки масса селезенки и тимуса у животных в эксперименте и в контроле различалась незначительно.

Гистологическое исследование тимуса животных при нормальном соотношении коркового и мозгового вещества выявило в обеих группах умеренные гиперпластические процессы со стороны лимфоидных элементов и относительную

активацию митотической активности в мозговом веществе, начиная после 7-х суток, с уменьшением указанных проявлений к 27-м суткам (данные не приведены).

Изменения в регионарных лимфатических узлах у животных, иммунизированных рПА, характеризовались планомерным увеличением массы органа в период с 1-х суток ((0,035±0,015) г) до 7-х суток ((0,06±0,01) г) с возвратом к исходному значению на 27-е сутки. У контрольных морских свинок масса регионарных лимфатических узлов составила ((0,01±0,00) г), что в 6 раз меньше максимального показателя для иммунизированных животных. Масса отдаленных лимфатических узлов также увеличивалась с 1-х суток ((0,025±0,005) г) по 7-е сутки ((0,06±0,005) г) и уменьшалась к 27-м суткам ((0,045±0,005) г). Таким образом, максимальное значение в эксперименте различалось с контрольным ((0,03±0,01) г) в 2 раза.

Масса регионарных лимфатических узлов у животных, иммунизированных рПА + ЕА1, увеличивалась вдвое, начиная с 1-х суток ((0,04±0,001) г) до 21-х суток ((0,08±0,001) г), и почти возвращалась к исходному значению на 27-е сутки ((0,045±0,005) г). Максимальный показатель превышал контрольный в 8 раз. Для отдаленных лимфатических узлов отмечали сходную тенденцию, но значение массы

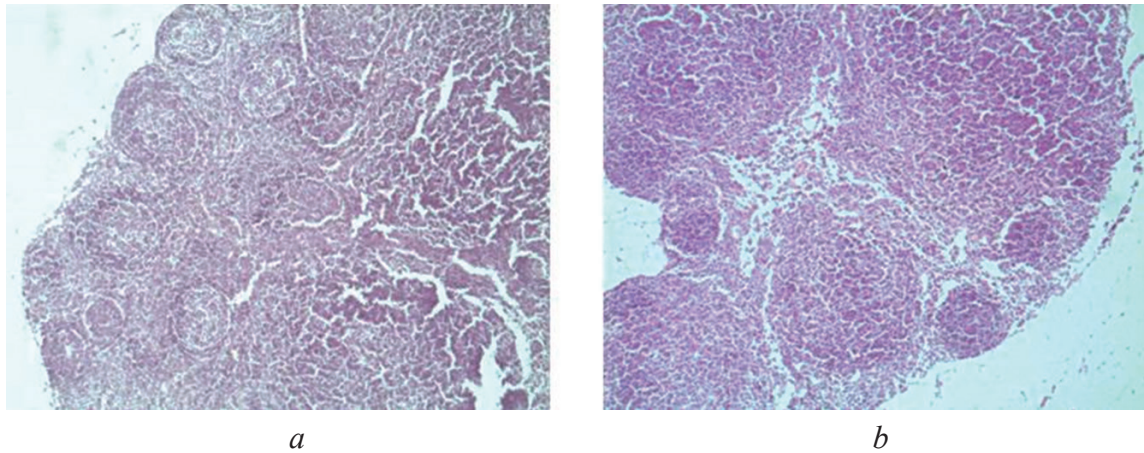


Рис. 6. Срезы регионарных лимфатических узлов морских свинок (окраска гематоксилин-эозином), иммунизированных полученными антигенами, в различное время после иммунизации: *a* – рПА, 21 сут; *b* – рПА + EA1, 27 сут. В обоих случаях видны признаки гиперпластических процессов в фолликулах и паракортикальных зонах. Увеличение $\times 40$

Fig. 6. Slices (stained by hematoxylin-eosin) of regional lymph nodes in guinea pigs immunized by obtained antigens at various times after immunization: (*a*), rPA, 21 days.; (*b*), rPA + EA1, 27 days. Signs of hyperplastic processes in follicles and paracortical zones are seen in both cases. Enlargement of $\times 40$

органа на 21-е сутки ($(0,9 \pm 0,001)$ г), превышало исходное ($(0,05 \pm 0,005)$ г) в 18 раз, а контрольное значение – в 30 раз.

Изменения в органах периферической иммунной системы, обусловленные иммуногенетическими процессами, проявлялись в виде последовательной активации Т- и В-зон. В селезенке и лимфатических узлах у подопытных животных наблюдали умеренное нарастание пролиферативной активности от 1 до 3 баллов и изменение клеточного состава органов в период с 3-х по 27-е сутки. Достоверных отличий в степени выраженности этих процессов и сроках их наступления у животных, иммунизированных рПА и рПА+EA1, выявлено не было: колебания учитываемых параметров отмечались в пределах статистической погрешности.

В лимфатических узлах (рис. 6) регистрировали различную степень активации отдельных фолликулов (В-зон), появление фолликулов, в центре которых встречались бластные формы клеток, увеличение количества митозов, наличие единичных содержащих осколки ядер макрофагов и умеренную гиперплазию паракортикальных (Т-) зон. В паракортикальных зонах отмечали также смешанный клеточный состав (умеренное количество бластов, неактивированные лимфоциты и единичные зрелые плазматические клетки) или преобладание бластных форм клеток (2 балла), начиная с 21-х суток в 1-й группе и уже после 7-х суток во 2-й группе. В мозговом веществе (мозговые тяжи) лимфатических узлов иммунизированных рПА животных после 7 сут регистрировали появление незначительного количества эозинофильных лейкоцитов.

В селезенке нарастание гиперпластической активности в Т- и В-зонах отмечали после 7 сут в обеих группах. Количество функционально активных фолликулов в срезе органа увеличивалось к 27-м суткам до 20 в 1-й группе и до 17 во 2-й группе, в то время как в контроле обнаруживали до 8 неактивных фолликулов на срезе. Начиная с 21-х суток, у животных, иммунизированных только рПА, регистрировали появление в селезеночных тяжах умеренного количества эозинофильных лейкоцитов (рис. 7). Их присутствие в некоторых случаях может косвенно свидетельствовать о начале развития реакций гиперчувствительности замедленного действия.

Таким образом, штамм *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp^{o-} является эффективным источником сибиреязвенных антигенов, входящих в состав прототипа сибиреязвенной вакцины. В настоящей работе апробирована единая технологическая схема получения рПА и EA1 из рекомбинантного продуцента. Предложенный подход позволит повысить рентабельность производства вакцинного препарата. Отсутствие селективного антибиотика на основной стадии культивирования исключает его негативное влияние на биологические характеристики конечного продукта. Реализация способа обеспечивает высокий выход как рПА, так и белка S-слоя EA1. Концентрирование и диафильтрация рПА и EA1 с использованием ультрафильтрационной установки, а также двухступенчатая хроматографическая очистка на различных носителях позволяют достичь высокой степени очистки антигенов.

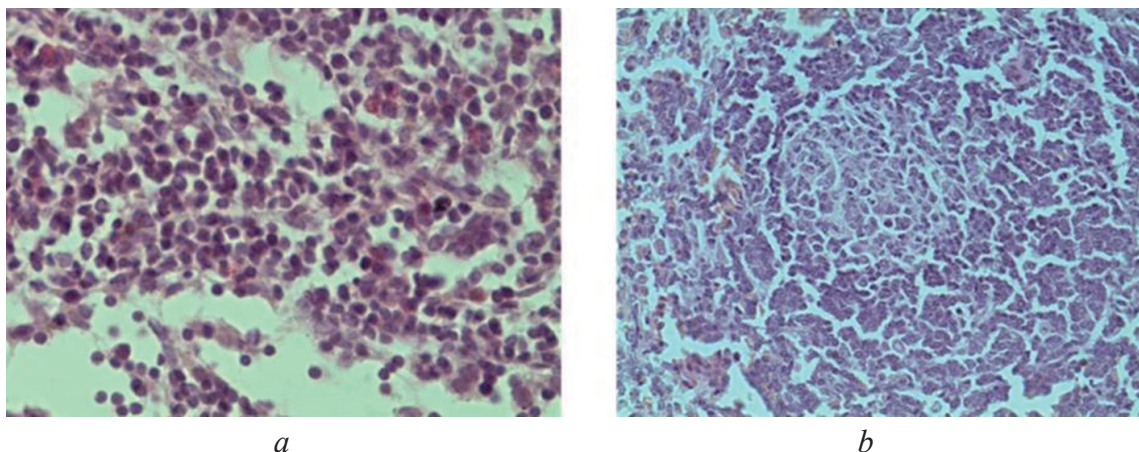


Рис. 7. Срезы селезенки морских свинок (окраска гематоксилин-эозином), иммунизированных полученными антигенами, в различное время после иммунизации: *a* – рПА, 21 сут (увеличение $\times 400$). Видны эозинофилы в селезеночных тяжах.; *b* – рПА + EA1, 27 сут (увеличение $\times 200$). Видны признаки гиперпластических процессов в фолликулах

Fig. 7. Slices (stained by hematoxylin-eosin) of spleen in guinea pigs immunized by obtained antigens made at various times after immunization: (*a*), rPA, 21 days (enlargement of $\times 400$). Eosinophils are visible in splenic ligations; (*b*), rPA + EA1, 27 days (enlargement of $\times 200$). Signs of hyperplastic processes in follicles are seen

Очищенные антигены, выделенные из рекомбинантного штамма *B. anthracis*, не оказывают токсического действия на органы и ткани иммунизированных животных. Выявленные при патоморфологическом исследовании небольшие изменения в органах морских свинок, иммунизированных рПА или комбинацией рПА с EA1, являются отражением адаптационно-компенсаторных реакций макроорганизма и имеют тенденцию к нормализации. Двукратное превышение количества клеток Купфера в тканях печени подтверждает функциональную активацию ретикулоэндотелиальной системы. Реакция иммунокомпетентных органов соответствует умеренным проявлениям иммуногенеза. Установлено, что добавление дополнительного антигена EA1 к рПА не приводит к усилению токсического воздействия на макроорганизм, а напротив, сопровождается менее выраженной картиной допустимых патоморфологических изменений в органах и тканях иммунизированных животных на фоне более яркой реакции лимфоидных органов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галкин В.В., Локтионова М.Н., Симонова Е.Г., Хадарцев О.С. Проблемы безопасности сибиреязвенных скотомогильников. *Эпидемиология и инфекционные болезни*, 2007, (6), 54–57.
2. Онищенко Г.Г., Кожухов В.В., Васильев Н.Т., Бондарев В.П., Борисевич И.В., Дармов И.В., Горин О.В., Воробьев А.А., Пятков В.А., Шевцов А.Н., Сероглазов В.В., Крючков А.В., Луб М.Ю. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты [Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кожухова]. М.: Медицина, 2010, 5–424.
3. Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю., Колбасов Д.В., Листишенко А.А. Сибирская язва на Ямале: причины возникновения и проблемы диагностики. *Ветеринария*, 2016, (10), 3–7.
4. Попова А.Ю., Демина Ю.В., Ежлова Е.Б. и др. Вспышка сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г., эпидемиологические особенности. *Пробл. особо опасных инф.* 2016, (4), 42–46. doi: 10.21055/0370-1069-2016-4-42-46
5. Brachman P. Bioterrorism: an update with a focus on anthrax. *J. Epidemiol*, 2002, 155, 981–987.
6. Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Олефир Ю.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особоопасных инфекций. *Пробл. особо опасных инф.*, 2016, (2), 107–110. doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-107-110
7. Микшис Н.И., Семакова А.П., Попова П.Ю. и др. Перспективность использования различных адъювантов в сочетании с рекомбинантным протективным антигеном сибиреязвенного микроба. *Биотехнология*, 2014, (6), 36–42.
8. Скоупс Р. Методы очистки белков [Пер. с англ.]. М.: Мир, 1985, 358.
9. Микшис Н.И., Корсакова А.Ю., Болотникова М.Ф. и др. Продукция белков S-слоя штаммами *Bacillus anthracis*. *Биотехнология*, 2004, (5), 22–32.
10. Farchaus J., Ribot W., Downs M., Little S. Purification and characterization of the major surface array protein; from the avirulent *Bacillus anthracis* delta Sterne-1. *J. Bacteriol.*, 1995, 177, 2481–2489.

11. Дж. Клаус Лимфоциты: Методы: Пер. с англ. [Под ред. Дж. Клауса]. М.: Мир, 1990, 396.
12. Liu T., Matsuguchi T., Tsuboi N. et al. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect. Immun.*, 2002, 70(12), 6638–6645.
13. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. М.: Спецлит., 2010, 96.
14. Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Гончарова А.Ю. и др. Оценка эффективности продукции протективного антигена аспорогенным рекомбинантным штаммом *Bacillus anthracis*. *Биотехнология*, 2011, (5), 38–43.

Effect of Antigens Obtained from *Bacillus anthracis* 55ΔTPA-1Spo⁻ Recombinant Strain on Organs and Tissues of Immunized Animals

N.I. MIKSHIS*, P.Yu. POPOVA, A.P. SEMAKOVA, O.M. KUDRYAVTSEVA, S.A. BUGORKOVA, and A.L. KRAVTSOV

The Russian Research Anti-Plague Institute Microbe, Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 410005 Saratov, Russia

e-mail: rusrapi@microbe.ru, Mikshis_N@mail.ru*

Received March 13, 2017

Accepted April 12, 2017

Abstract—A recombinant *B. anthracis* strain 55ΔTPA-1Spo⁻ has been used for the development and evaluation of a new method for the combined production of immunogenic anthrax antigens, the protective antigen and S-layer protein EA1, components of the anthrax vaccine. The technique includes the seed culture preparation, growth on a liquid medium without antibiotic, sterilization filtration, concentration, diafiltration, and chromatographic purification on various carriers, and provides the high yield of both target products. It was demonstrated that the purified antigens, singly or in combination, do not have toxic effect on organs and tissues of vaccinated test animals in amounts a few times superior to immunizing doses. Insignificant changes detected by the histological examination reflected the adaptation-compensatory reactions of the macroorganism tending to normalization. The response of immune-competent organs corresponded to moderate manifestations of immunogenesis. It was established that the addition of the EA1 protein to the recombinant protective antigen leads to the increase in the expression of genes that determine the innate immunity TLR. The immunization of test animals with the combined preparation as compared to the single rPA resulted in more expressed immunobiological alterations in lymphoid organs.

Key words: *Bacillus anthracis*, anthrax, anthrax vaccines, recombinant protective antigen.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-45-60