

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КУЛЬТУРЫ МЫШИНЫХ МАКРОФАГОВ *IN VITRO* ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ СПОРАМИ *BACILLUS ANTHRACIS* С РАЗНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ СОСТАВОМ



Е.А. Котенева^{1,2}, О.И. Цыганкова¹, В.Ю. Щербакова¹, А.В. Калинин¹,
И.С. Родионов¹, В.В. Сердюков¹, А.В. Абрамович¹, А.Н. Куличенко¹

¹ ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

² ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь, Россия

Резюме. *Bacillus anthracis*, возбудитель сибирской язвы, способен к существованию как в условиях окружающей среды (почвы), так и в макроорганизме. Проявление патогенных свойств штаммов *B. anthracis* определяется их плазмидным составом, так как генетические детерминанты основных факторов вирулентности — двухкомпонентного токсина и капсулы — имеют плазмидную локализацию. Моделирование сибиреязвенной инфекции *in vitro* в культуре макрофагов позволит выявить влияние индивидуальных особенностей штаммов *B. anthracis* на характер взаимодействия бацилл и клеток макрофагов. Целью данного исследования был анализ уровня секреции цитокинов клетками культуры макрофагов при инфицировании *in vitro* спорами штаммов сибиреязвенного микроба с разным плазмидным составом. Выявлена зависимость цитокинового профиля макрофагальных клеток от плазмидного состава заражающих штаммов *B. anthracis* при моделировании сибиреязвенной инфекции *in vitro*. Наличие плазмиды токсинообразования рХО1 у штаммов сибиреязвенного микроба оказывает мощный стимулирующий эффект на выработку цитокинов макрофагами клеточной линии J774A. Штаммы *B. anthracis*, не обладающие плазмидой рХО1, практически не стимулировали выработку IL-1 β , вызывали очень низкую секрецию IL-1 α , IL-6, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-12 (p70) и активную продукцию G-CSF. Низкий цитокиновый ответ клеток макрофагов при заражении моноплазмидными штаммами, имеющими только плазмиду капсулообразования, обусловлен не только отсутствием бинарного токсина, но и нарушениями в регуляции синтеза капсулы, связанными с отсутствием гена *atxA*. Капсула, наряду с летальным и отечным токсинами, относится к основным факторам вирулентности *B. anthracis*, но у штаммов, лишенных плазмиды вирулентности рХО1, ее продукция нарушена, так как главным регулятором синтеза капсулы является ген *atxA*, локализованный на плазмиде рХО1 через положительную регуляцию генов *acpA* и *acpB*, поэтому штаммы, лишенные плазмиды токсинообразования, даже при наличии плазмиды капсулообразования, вызывают слабый цитокиновый ответ у инфицированных клеток. Диплазмидные штаммы *B. anthracis* за счет выработки главных факторов вирулентности — двухкомпонентного токсина и капсулы — вызывают у макрофагов (в экс-

Адрес для переписки:

Котенева Елена Анатольевна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (8652) 26-03-12 (служебн.), 8 905 412-54-73 (моб.).
E-mail: postgenom_stv@mail.ru

Contacts:

Elena A. Koteneva
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13–15,
Stavropol Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор.
Phone: +7 (8652) 26-03-12 (office), +7 905 412-54-73 (mobile).
E-mail: postgenom_stv@mail.ru

Для цитирования:

Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Щербакова В.Ю., Калинин А.В.,
Родионов И.С., Сердюков В.В., Абрамович А.В., Куличенко А.Н.
Цитокиновый профиль культуры мышинных макрофагов *in vitro* при
инфицировании спорами *Bacillus anthracis* с разным плазмидным
составом // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 963–970.
doi: 10.15789/2220-7619-CPI-1893

Citation:

Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Shcherbakova V.Yu., Kalinin A.V.,
Rodionov I.S., Serdyukov V.V., Abramovich A.V., Kulichenko A.N. Cytokine
profile in *in vitro* mouse macrophage culture infected with *Bacillus anthracis*
spores with varying plasmid composition // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 963–970.
doi: 10.15789/2220-7619-CPI-1893

перименте) активную продукцию IL-1 β , IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-12 (p70). Штаммы, обладающие умеренной вирулентностью и способные к капсулообразованию на воздухе, по воздействию на культуру макрофагов *in vitro* практически не отличались от высоковирулентных штаммов.

Ключевые слова: сибирская язва, цитокины, макрофаги, плазмиды вирулентности, капсула, токсин, моделирование инфекции *in vitro*.

CYTOKINE PROFILE IN *IN VITRO* MOUSE MACROPHAGE CULTURE INFECTED WITH *BACILLUS ANTHRACIS* SPORES WITH VARYING PLASMID COMPOSITION

Koteneva E.A.^{a,b}, Tsygankova O.I.^a, Shcherbakova V.Yu.^a, Kalinin A.V.^a, Rodionov I.S.^a, Serdyukov V.V.^a, Abramovich A.V.^a, Kulichenko A.N.^a

^a Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation

^b North Caucasus Federal University, Stavropol, Russian Federation

Abstract. *Bacillus anthracis*, the causative agent of anthrax, is able to exist both in environmental conditions (soil) and in the macroorganism. The manifestation of pathogenic properties of *B. anthracis* strains is determined by relevant plasmid composition, because the main toxin and the capsule-related virulence factors are located in bacterial plasmid. Modeling anthrax infection *in vitro* in macrophage culture might reveal an influence of individual *B. anthracis* strain characteristics on infection and development of infectious process. The aim of this study was to analyze cytokine level during infection of *in vitro* macrophage cell cultures with spores of anthrax microbe strains bearing varying plasmid composition. The dependence of the macrophage cell cytokine profile on the plasmid composition of *B. anthracis* strains was revealed while modeling anthrax infection *in vitro*. The presence of the toxin-producing plasmid pXO1 in anthrax microbe strains has a powerful stimulating effect on the production of macrophages J774A cell line cytokines. *B. anthracis* strains lacking the pXO1 plasmid virtually stimulated no production of IL-1 β , caused very low secretion of IL-1 α , IL-6, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-12 (p70) and active G-CSF products. The low cytokine response of macrophage cells infected with monoplasmid strains bearing only the capsule-forming plasmid was due not only to the absence of a binary toxin, but also to disturbed regulation of capsule production associated with the absence of the *atxA* gene. The capsule, along with lethal and edematous toxins, belongs to the main virulence factors of *B. anthracis*, but strains lacking the pXO1 virulence plasmid, had its production impaired, because the main regulator of capsule synthesis is the *atxA* gene localized on the pXO1 plasmid being positively regulated by the *acpA* and *acpB* genes, so that strains lacking the toxin-forming plasmid, even in the presence of the encapsulation plasmid, elicit a weak cytokine response in infected cells. Diploplasmid strains of *B. anthracis*, due to produced main virulence factors — a two-component toxin and a capsule, enforce macrophages (in the experiment) to actively produce IL-1 β , IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1 α ; MIP-1 β , IL-12 (p70). Strains with moderate virulence and capable of capsulation in air virtually did not differ from highly virulent strains in terms of their effect on *in vitro* macrophage culture.

Key words: anthrax, cytokines, macrophages, virulence plasmids, capsule, toxin, modeling infection *in vitro*.

Введение

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis*, обладает широкими адаптивными способностями, успешно приспосабливаясь к существованию в резко различающихся условиях: почве, организме теплокровных животных, на искусственных питательных средах. Приспособление к разным условиям достигается благодаря способности сибиреязвенного микроба существовать в виде нескольких морфофункциональных форм (споровой, вегетативной капсульной, вегетативной акапсульной), для каждой из которых характерны не только видимые морфологические особенности, но и значительные преобразования транскрипционной и метаболической активности. Важными факторами, способствующими успешной колонизации организма млекопитающего сибиреязвенными бациллами, явля-

ется способность спор к прорастанию внутри макроорганизма, скорость и интенсивность формирования капсулы, секреция компонентов экзотоксинов и дополнительных факторов вирулентности [2]. Вирулентность и проявление патогенных свойств штаммов *B. anthracis* напрямую зависит от их плазмидного состава, так как гены, кодирующие синтез компонентов токсинов и капсулы, локализованы на плаزمиде вирулентности pXO1 (плаزمиде токсинообразования) и pXO2 (плазмиде капсулообразования) [8, 10]. Оба токсина — летальный и отечный — играют важную роль в подавлении врожденных и адаптивных иммунных функций макроорганизма [12]. Капсула наделяет вегетативные клетки *B. anthracis* способностью к опсонизации комплиментом хозяина и опсонофагоцитозу гранулоцитами и макрофагами. Помимо токсинов и капсулы к факторам вирулентности, способствующим проникновению

и успешному размножению в макроорганизме сибиреязвенных бацилл, относят белки S-слоя, аутолизин AmiA, белки прорастания спор, гемолизины, лецитиназу [11]. В природе могут встречаться штаммы *B. anthracis* с разным плазмидным составом, но большинство штаммов имеют обе плазмиды вирулентности. В лабораторных условиях, особенно при воздействии селективных факторов, из популяции одного штамма можно выделить варианты, имеющие разный плазмидный состав и фенотип [3].

Изучение биологических свойств бактерий, в том числе и патогенных, в основном проводится при культивировании на искусственных питательных средах, обеспечивающих оптимальный рост и размножение микроба. В этом случае условия культивирования значительно отличаются от существующих в макроорганизме при развитии инфекционного процесса. При моделировании сибиреязвенной инфекции *in vitro* в культуре макрофагов эксперименты можно проводить в максимально стандартизированных условиях, что позволит применить комплексный подход, сочетающий морфологические, молекулярно-генетические и иммунологические методы, и выявлять наиболее важные (ключевые) особенности штаммов *B. anthracis*, влияющие на проявление их патогенных свойств.

Материалы и методы

Штаммы *B. anthracis*, использованные в работе, и их фенотипическая и генетическая характеристика представлены в табл. Для экспериментов использовали культуру макрофагоподобных клеток J774A. Культивирование культуры клеток макрофагов проводили на среде DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением 2% стерильной фетальной бычьей сыворотки в CO₂-инкубаторе при 37°C и содержании CO₂ — 5%. Для заражения взвесью спор *B. anthracis* использовали 1–2 суточный монослой с конфлюэнтностью 70–90%, на 2–20 пассаже. Морфологию клеточной культуры и ее чистоту оценивали в мазках, окрашенных методом Романовского. При заражении культуры клеток макрофагов спорами в лунки вносили взвесь спор в среде DMEM с 10% FBS, из расчета 50 спор на 1 клетку культуры макрофагов (это составляет 1 мл взвеси 1×10^7 спор/мл), и помещали в CO₂-инкубатор при 5% CO₂ и 37°C на 1,5 часа. Далее культуральную среду удаляли в емкость с дезраствором (6% перекись водорода с 0,5% ПАВ), а адгезированные на дне лунок планшета клетки культуры макрофагов, содержащие фагоцитированные споры, 2 раза отмывали культуральной средой DMEM в объеме 1 мл для удаления нефагоцитированных

спор, в лунки добавляли 2 мл среды поддержки (DMEM, 2% FBS) и продолжали инкубацию зараженных макрофагов при 37°C и 5% CO₂ в течение времени эксперимента (24 ч).

Количественный анализ уровня цитокинов проводили на приборе для мультиплексного иммунологического анализа в микропланшетах Bio-Plex-200 (Bio-Rad, США) с использованием набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex (Bio-Rad, США). Прибор предварительно был валидирован и откалиброван с настройкой «low PMTRP1». Пробоподготовка проводилась в соответствии с инструкцией производителя. Объем образца, добавляемого в планшет, составил 50 мкл на лунку. Каждый образец анализировали в двух повторах. Стандартные кривые рассчитывали с помощью программного обеспечения Bio-Plex Manager по формуле пятипараметрической регрессии. Изменчивость внутри анализа, выраженная как коэффициент вариации, была рассчитана на основе среднего значения разведенных стандартных образцов и измерена дважды в мультиплексном анализе. Культивирование штаммов *B. anthracis*, получение свежих спор и определение их жизнеспособности, окрашивание препаратов, обеззараживание образцов и другие работы с возбудителем сибирской язвы проводили в соответствии с МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». Безопасность работ была обеспечена в соответствии с СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Результаты и обсуждение

Взаимодействие между макрофагами хозяина и сибиреязвенными бациллами начинается со взаимодействия споры и макрофага, что инициирует инфекционный процесс и реакции макрофагов на летальный и отечный токсины, которые начинают экспрессироваться в вегетативной клетке. Значительное повышение уровня TNF α при аэрозольном заражении мышей спорами *B. anthracis*, которое стремительно уменьшается по мере развития бактериемии описано в работе [13]. Мы наблюдали практически полное отсутствие TNF α (на уровне фоновых значений) через 24 ч после инфицирования культуры клеток макрофагов спорами *B. anthracis*. Микроскопическое исследование препаратов выявило, что в это время в культуре макрофагов находится большое количество бактериальных клеток. Ряд экспериментов, описанных в работе [9] показал, что продукция TNF α и IL-1 β на ранних этапах влияет на увеличение продукции летального токсина, и наоборот, выработка токсина стимулирует иммунный

Таблица. Фенотипические и генетические характеристики штаммов *B. anthracis*, использованных в работе
 Table. Phenotypic and genetic characteristics of *B. anthracis* strains used in the study

№ п/п No.	Наименование штаммов <i>B. anthracis</i> и их субкультур Name of <i>B. anthracis</i> strains and their subcultures	Происхождение культур		Фенотип Phenotype	Ген. группа Genetic group	Плазмидный состав Plasmid composition	Категория вирулентности <i>in vitro</i> [12] Virulence category <i>in vitro</i> [12]
		Источник выделения source of isolation	Признак выделения Feature of selection				
1	1CO	кровь КРС blood of cattle	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺	A		Высоковирулентные Highly virulent
2	81/1	отделяемое язвы ulcer discharge	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺			
3	228 прот.	штамм 228 strain 228	независимость от Trp Trp independent	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺			
4	12/16-1 4P	штамм 12/16-1 strain 12/16-1	после 4 пассажей на б.м. 4 passages on w.m.	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺			
5	140 P Сар- б.м.	штамм 140 P Сар- strain 140 P Сар-	после 1 пассажа на б.м. 1 passage on w.m.	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻ Trp ⁺			
6	1284	пельмени meat dumplings	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁺ Hly ⁺ Lec ⁻	B	pXO1 ⁺ pXO2 ⁺	Умеренно вирулентные Moderately virulent
7	228	производств. шт. manufacture strain	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻			
8	14/41	отделяемое язвы ulcer discharge	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	B		Слабовирулентные Weakly virulent
9	1CO-S	штамм 1CO strain 1CO	Cap ⁺ O ₂	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻			
10	12/16-S	штамм 12/16 strain 12/16	Cap ⁺ O ₂	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻			
11	14/41-1aSM	штамм 14/41-1 strain 14/41-1	Cap ⁺ O ₂	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	A	pXO1 ⁻ pXO2 ⁺	Умеренно вирулентные Moderately virulent
12	1CO RBA9-1 [24]	штамм 1CO strain 1CO	рез. к фагу «BA9» phage "BA9" resistance	Cap(CO ₂) ⁺ (O ₂) ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁺			
13	228/8	штамм 228 strain 228	вакцинный штамм vaccine strain	Cap ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁺	A	pXO1 ⁺ pXO2 ⁻	Авирулентные Avirulent
14	СТИ	вакцинный штамм vaccine strain		Cap ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻			
15	14/41 Trp+	штамм 14-41 strain 14-41	независимость от Trp Trp-independent	Cap ⁻ Tox ⁺ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁺			

№ п/п No.	Наименование штаммов <i>B. anthracis</i> и их субкультур Name of <i>B. anthracis</i> strains and their subcultures	Происхождение культур		Фенотип Phenotype	Ген. группа Genetic group	Плазмидный состав Plasmid composition	Категория вирулентности <i>in vitro</i> [12] Virulence category <i>in vitro</i> [12]
		Источник выделения source of isolation	Признак выделения Feature of selection				
16	1CO-S Cap ⁻	штамм 1CO-S strain 1CO-S	отсутств. капсулообразования absent capsule formation	Cap ⁻ Tox ⁻ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	В	pXO1 ⁺ pXO2 ⁻	Авирулентные Avirulent
17	140 P Cap ⁻	штамм 140P strain 140P	отсутств. капсулообразования absent capsule formation	Cap ⁻ Tox ⁻ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	В	pXO1 ⁻ pXO2 ⁻	Апатогенные Apathogenic
18	228/4	штамм 228 strain 228	отсутств. капсулообразования absent capsule formation	Cap ⁻ Tox ⁻ ProtA ⁻ Hly ⁻ Lec ⁻ Trp ⁻	В	pXO1 ⁻ pXO2 ⁻	Апатогенные Apathogenic

Примечания. Обозначения, использованные в таблице и далее в тексте для описания фенотипических свойств: + наличие признака, — отсутствие признака, * признак не определен в связи с отсутствием роста; б.м. — белая мышь; Cap(CO₂) — способность к образованию капсулы в атмосфере с 5% углекислого газа; Cap(O₂) — способность к образованию капсулы в атмосфере воздуха; Hly — способность лизировать отмые эритроциты барана; Lec — фосфолипазная активность на плотной среде с яичным желтком; Trp — прототрофность по триптофану; Tox — формирование линий иммунопреципитации с противосибирезавязным гаммаглобулином на среде СОПЭК.

Notes. The designations used in the table and further in the text to describe phenotypic properties are: + presence of a trait, — absence of a trait, * trait not defined due to lack of growth; w.m. — white mouse; Cap(CO₂) — potential to form a capsule in atmosphere with 5% carbon dioxide; Cap(O₂) — potential to form a capsule in air atmosphere; Hly — potential to lyse washed sheep erythrocytes; Lec — phospholipase activity on solid medium with egg yolk; Trp — tryptophan prototrophy; Tox — formation of immunoprecipitation lines with anti-anthrax gamma globulin on SOPEK medium.

ответ организма и увеличение выработки цитокинов. Летальный токсин *B. anthracis*, который относится к цинкзависимым металлопротеазам, инактивирует киназы семейства MAPKK (МЕК) путем протеолитического расщепления, что ведет к активному высвобождению цитокинов пораженными клетками [6]. Нами получены данные, подтверждающие, что сублитические концентрации летального токсина индуцируют выработку цитокинов семейства IL-1. Так, штаммы *B. anthracis*, лишенные плазмиды токсинообразования, практически не стимулировали выработку IL-1β, в то время как в культуральной жидкости клеток макрофагов, инфицированных штаммами pXO1⁺, наблюдались высокие уровни IL-1β даже спустя 24 ч после заражения. Концентрация IL-1β в культуральной жидкости была выше в 600 раз при инфицировании макрофагов диплазмидными вирулентными штаммами *B. anthracis* pXO1⁺, pXO2⁺ и в 228 раз выше при использовании атипичных штаммов с фенотипом Cap(CO₂)⁺(O₂)⁺Tox⁻ProtA⁻Hly⁻Lec⁻Trp⁻. Моноплазмидные штаммы *B. anthracis*, лишенные плазмиды капсулообразования, вызывали повышение уровня IL-1β, по сравнению с бесплазмидными, в 400 раз. Штаммы *B. anthracis*, не обладающие плазмидой pXO1: 228/4 (pXO1⁻, pXO2⁻) и 1CO RBA9-1 [24] (pXO1⁻, pXO2⁺), практически не стимулировали выработку IL-1β, вызывали очень низкую секрецию IL-1α, IL-6, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, IL-12 (p70) и активную продукцию G-CSF (рис.). Уровень гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) при воздействии на макрофаги штаммами *B. anthracis* (pXO1⁻, pXO2⁺) был в 13 раз выше, чем у диплазмидных вирулентных и в 3 раза выше, чем у моноплазмидных штаммов, имеющих только плазмиду токсинообразования, и бесплазмидных штаммов. G-CSF является многофункциональным цитокином и стимулирует клеточную пролиферацию, усиливает гемопоэз, вызывает антиапоптотические и противовоспалительные эффекты. Нам не удалось найти литературных данных о зависимости продукции G-CSF от вирулентных свойств инфицирующих штаммов *B. anthracis*, однако в ряде исследований [4, 7] описано, что введение зараженным сибирской язвой животным дополнительных доз G-CSF помогало им справиться с инфекцией за счет стимуляции эритропоэза и снижения эффекта развития токсического шока. Исходя из этого можно ожидать, что культура макрофагов, инфицированная диплазмидными штаммами сибирезавязного микроба, будет продуцировать большее количество G-CSF, однако в эксперименте мы наблюдали противоположную картину: наибольшую продукцию G-CSF вызывали

штаммы, у которых отсутствовали одна или обе плазмиды вирулентности. Заметная разница была выявлена и в концентрации IL-12, который влияет на клеточный иммунитет и повышает цитотоксичность макрофагов. Его концентрация при воздействии диплоидных штаммов (pXO1⁺, pXO2⁺) превышала аналогичные значения бесплазмидных (в 6,5 раза) и моноплазмидных штаммов (в 3 раза).

Типичные диплоидные штаммы *B. anthracis* 81/1, 1CO, 140 P Cap⁻ б.м., относящиеся к основной генетической группе А, вызывали высокий уровень секреции IL-1β, IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1α, MIP-1β, IL-12 (p70), которые являлись доминирующими в цитокиновом профиле их культуральных фильтратов на фоне менее выраженных фракций других цитокинов, экспрессируемых макрофагами. Диплазмидные штаммы *B. anthracis* 1CO-S, 14/41-1aSM, 12/16-S с атипичным капсулообразованием по своей способности стимулировать выработку макрофагами цитокинов мало отличались от других диплоидных и моноплазмидных (pXO1⁺, pXO2⁻) штаммов *B. anthracis*. Доминирующими по концентрации в культуральной жидкости были IL-1β, IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1α, MIP-1β, IL-12 (p70). При использовании штамма *B. anthracis* 14/41 1aSM в фильтрате культуральной жидкости отсут-

ствовал G-CSF. Для группы моноплазмидных (pXO1⁺, pXO2⁻) штаммов *B. anthracis* — 140 P Cap⁻, 14/41 Trpt⁺, 1CO-S Cap⁻, 228/8 характерна высокая продукция IL-1β, IL-6, MCP-1 (MCAF), MIP-1α, MIP-1β, G-CSF (рис.).

Данное исследование является первым опытом по определению влияния генетических и фенотипических особенностей штаммов *B. anthracis* на видовой состав цитокинов и временных параметров секреторной активности макрофагов. Сопоставление цитокиновых профилей фильтратов культуральной среды при использовании различающихся по свойствам штаммов *B. anthracis* позволяет констатировать отсутствие IL-1β в фильтратах штаммов *B. anthracis* с отсутствием плазмиды pXO1 (pXO1⁻, pXO2⁻ и pXO1⁻, pXO2⁺). Интересным является отсутствие MCP-1 в фильтратах штаммов *B. anthracis* 14/41 Trpt⁺ и 14/41-1aSM. Анализ цитокиновых спектров фильтратов культуральной жидкости, полученных при инфицировании штаммами *B. anthracis* 228 и 228 прот., выявил, что они были практически идентичны. Указанные штаммы являются диплоидными, но исходный штамм 228 является умеренно вирулентным [1] с фенотипом Cap(CO₂)⁺(O₂)⁻Tox⁻ProtA-Hly⁻Lec⁻Trp⁻, а выделенный из его популяции штамм 228 прот. относится по той же классификации к высоко вирулентным и име-

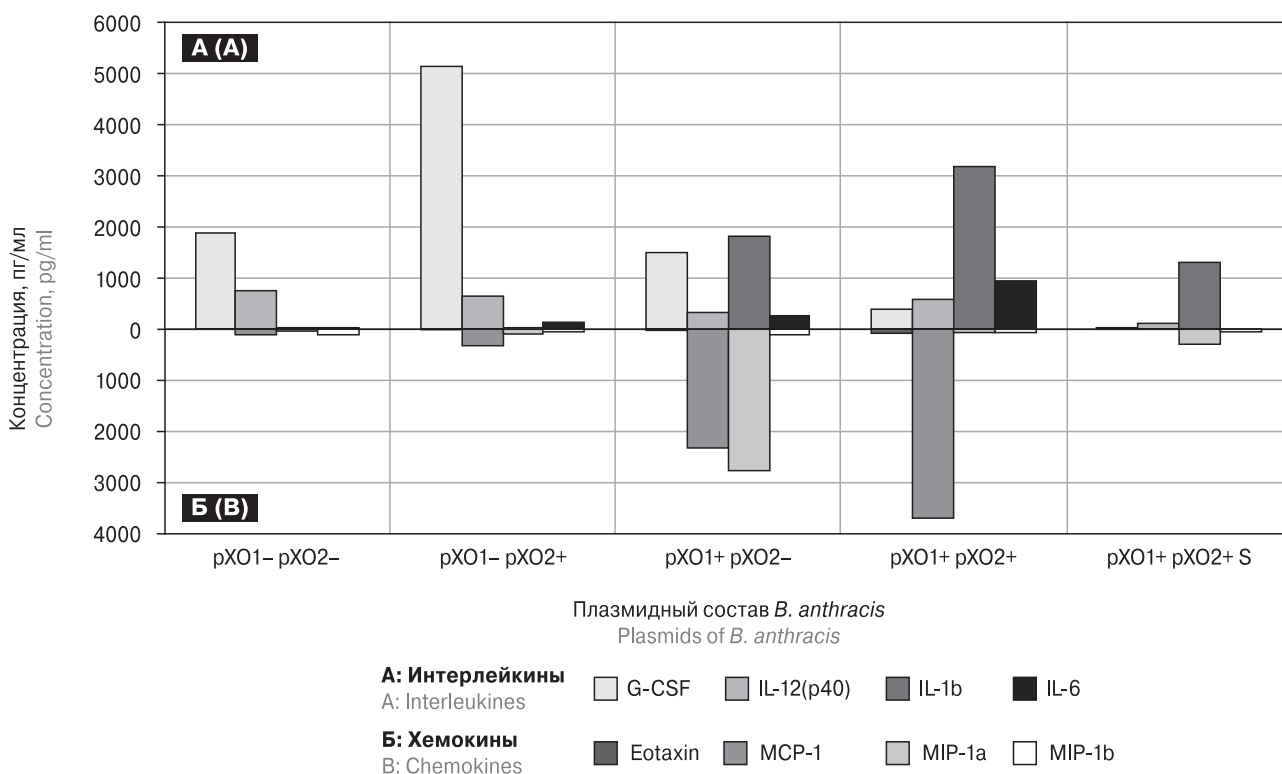


Рисунок. Концентрация цитокинов в культуральной жидкости при инфицировании линии макрофагоподобных клеток J774A штаммами *B. anthracis* с разным плазмидным составом

Figure. Concentration of cytokines in the culture fluid upon infection of the J774A macrophage-like cell line with *B. anthracis* strains with different plasmid composition

ет фенотип $\text{Cap}(\text{CO}_2)^+(\text{O}_2)^- \text{Tox}^+\text{ProtA}^+\text{Hly}^+\text{Lec}^-\text{Trp}^+$. Возможно, метод определения токсинообразования на среде СОПЭК [1] является недостаточно чувствительным, и производимая на невысоком уровне продукция токсина достаточна тем не менее для стимуляции выработки цитокинов. Штаммы с атипичным капсулообразованием в атмосфере воздуха с фенотипом $\text{Cap}(\text{CO}_2)^+(\text{O}_2)^+ \text{Tox}^-\text{ProtA}^-\text{Hly}^-\text{Lec}^-\text{Trp}^-$ также не отличались по способности стимулировать выработку цитокинов от высоковирулентных штаммов. Капсула, наряду с летальным и отечным токсинами, относится к основным факторам вирулентности *B. anthracis*, но у штаммов, лишенных плазмиды вирулентности pXO1 , ее продукция нарушена, так как главным регулятором синтеза капсулы является ген *atxA*, локализованный на плазмиде pXO1 через положительную регуляцию генов *acpA* и *acpB* [13], поэтому штаммы, лишенные плазмиды токсинообразования, даже при наличии у них плазмиды капсулообразования, вызывают слабый цитокиновый ответ у клеток инфицированной культуры макрофагов.

Выводы

Выявлена зависимость секретируемых макрофагальными клетками цитокинов от плазмидного состава заражающих штаммов *B. anthracis* при моделировании сибиреязвенной инфекции *in vitro*. Наличие плазмиды pXO1 оказывает мощный стимулирующий эффект на выработку цитокинов макрофагами клеточной линии J774A. Цитокин IL-1 β активно продуцируется макрофагальными клетками в ответ на синтез факторов вирулентности сибиреязвенного микроба — летального и отечного токсинов и капсулы. Поэтому значительная выработка IL-1 β наблюдается при заражении макрофагов вирулентными диплозмидными штаммами *B. anthracis*. Выработка G-CSF не за-

висела от наличия плазмид вирулентности у штаммов сибиреязвенного микроба, использованных для заражения, и, по всей видимости, является результатом воздействия факторов, имеющих хромосомную детерминацию. Штаммы *B. anthracis*, не обладающие плазмидой pXO1 , практически не стимулировали выработку IL-1 β , вызывали очень низкую секрецию IL-1 α , IL-6, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-12 (p70) и активную продукцию G-CSF. Низкий цитокиновый ответ клеток макрофагов при заражении моноплазмидными штаммами, имеющими только плазмиду капсулообразования, обусловлен, вероятно, не только отсутствием бинарного токсина, но и нарушениями в регуляции синтеза капсулы, связанными с отсутствием гена *atxA*. Диплазмидные штаммы *B. anthracis* за счет выработки главных факторов вирулентности — бинарного токсина и капсулы — вызывают у макрофагов (в эксперименте) активную продукцию IL-1 β , IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-12 (p70). Штаммы, обладающие умеренной вирулентностью и способные к капсулообразованию на воздухе, по воздействию на культуру макрофагов *in vitro* практически не отличались от высоковирулентных штаммов.

Представляет интерес дальнейшее изучение временной динамики изменений цитокинового профиля макрофагов при моделировании сибиреязвенной инфекции *in vitro* в зависимости от биологических характеристик изучаемых штаммов *B. anthracis*.

Благодарности

Авторы выражают благодарность зав. лабораторией диагностики вирусных инфекций ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, к.б.н. Волинкиной А.С. и с.н.с. той же лаборатории Лисицкой Я.В. за предоставленную клеточную культуру макрофагов.

Список литературы/References

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практ. рук. / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева; изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ЗАО «Шико», 2013. 560 с. [Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical guide / Eds.: G.G. Onishchenko, V.V. Kutyrev. 2nd ed., revised and expanded. Moscow: CJSC «Shiko», 2013. 560 p. (In Russ.)]
2. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Г., Литусов Н.В., Харченко А.Т., Васильев П.Г., Садовой Н.В., Кожухов В.В. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики. М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. 448 с. [Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V., Kharchenko A.T., Vasil'ev P.G., Sadovoi I.V., Kozhukhova V.V. Anthrax: actual aspects of microbiology, epidemiology, clinical features, diagnostics and prophylaxis. Moscow: VUNMTs MZ RF, 1999. 448 p. (In Russ.)]
3. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Цыганкова Е.А., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г. Фенотипические и генетические особенности культурально-морфологических вариантов *Bacillus anthracis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008. № 4. С. 6–11. [Tsygankova O.I., Eremenko E.I., Tsygankova E.A., Buravtseva N.P., Ryazanova A.G. Phenotypic and genetic features of cultural and morphological variants of *Bacillus anthracis*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2008, no. 4, pp. 6–11. (In Russ.)]
4. Chang H.H., Wang T.P., Chen P.K., Lin Y.Y., Liao C.H., Lin T.K., Chiang Y.W., Lin W.B., Chiang C.Y., Kau J.H., Huang H.H., Hsu H.L., Liao C.Y., Sun D.S. Erythropoiesis suppression is associated with anthrax lethal toxin-mediated pathogenic progression. PLoS One, 2013, vol. 8, no. 8: e71718. doi: 10.1371/journal.pone.0071718

5. Drysdale M., Bourgogne A., Hilsenbeck S.G., Koechler T.M. AtxA controls Bacillus anthracis capsule synthesis via acpA and a newly discovered regulator acpB. *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 2, pp. 307–315. doi: 10.1128/JB.186.2.307-315.2004
6. Duesbery N.S., Webb C.P., Leppla S.H., Gordon V.M., Klimpel K.R., Copeland T.D., Ahn N.G., Oskarsson M.K., Fukasawa K., Paull K.D., Vande Woude G.F. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*, 1998, vol. 280, no. 5364, pp. 734–737. doi: 10.1126/science.280.5364.734
7. Erwin J.L., DaSilva L.M., Bavari S., Little S.F., Friedlander A.M., Chanh T.C. Macrophage-derived cell lines do not express proinflammatory cytokines after exposure to Bacillus anthracis lethal toxin. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, no. 2, pp. 1175–1177. doi: 10.1128/IAI.69.2.1175-1177.2001
8. Green B.D., Battisti L., Koehler T.M., Thorne C.B., Ivins B.E. Demonstration of a capsule plasmid in Bacillus anthracis. *Infect. Immun.*, 1985, vol. 49, no. 2, pp. 291–297. doi: 10.1128/iai.49.2.291-297.1985
9. Hanna P.C., Acosta D., Collier R.J. On the role of macrophages in anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, no. 21, pp. 10198–10201. doi: 10.1073/pnas.90.21.10198
10. Mikesell P., Ivins B.E., Ristroph J.D., Dreier T.M. Evidence for plasmid-mediated toxin production in Bacillus anthracis. *Infect. Immun.*, 1983, vol. 39, no. 1, pp. 371–376. doi: 10.1128/iai.39.1.371-376.1983
11. Missiakas D., Schneewind O. Assembly and function of the Bacillus anthracis S-layer. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2017, vol. 71, pp. 79–98. doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093512
12. Moayeri M., Leppla S.H., Vrentas C., Pomerantsev A.P., Liu S Anthrax pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 69, pp. 185–208. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104523
13. Zakowska D., Bartoszcze M., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A., Kocik J. New aspects of the infection mechanisms of Bacillus anthracis. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2012, vol. 19, no. 4, pp. 613–618.

Авторы:

Котенева Е.А., к.б.н., зав. лабораторией постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия; доцент базовой кафедры микробиологии ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь, Россия;

Цыганкова О.И., д.м.н., врач-бактериолог лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

ЩербакOVA В.Ю., младший научный сотрудник лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

Калинин А.В., биолог лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

Родионов И.С., м.н.с. лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

Сердюков В.В., лаборант-исследователь лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

Абрамович А.В., младший научный сотрудник лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь, Россия;

Куличенко А.Н., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия.

Authors:

Koteneva E.A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation; Associate Professor, Basic Department of Microbiology, North Caucasus Federal University, Stavropol, Russian Federation;

Tsygankova O.I., PhD, MD (Medicine), Bacteriologist, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Shcherbakova V.Yu., Junior Researcher, Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Kalinin A.V., Biologist, Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Rodionov I.S., Junior Researcher, Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Serdyukov V.V., Laboratory Assistant — Researcher, Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Abramovich A.V., Junior Researcher, Laboratory of Postgenomic Technologies, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

Kulichenko A.N., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation.