

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

Котенева Е. А.,<sup>1,2</sup>

Цыганкова О. И.,<sup>1</sup>

Щербакова В. Ю.,<sup>1</sup>

Калинин А. В.,<sup>1</sup>

Родионов И. С.,<sup>1</sup>

Сердюков В. В.,<sup>1</sup>

Абрамович А. В.,<sup>1</sup>

Куличенко А. Н.,<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт  
Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

<sup>2</sup> Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

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

Koteneva E.A. <sup>a,b</sup>

Tsygankova O.I. <sup>a</sup>,

Shcherbakova V. Yu. <sup>a</sup>,

Kalinin A. V. <sup>a</sup>,

Rodionov I.S. <sup>a</sup>,

Serdyukov V. V.<sup>a</sup>,

Abramovich A. V.<sup>a</sup>,

Kulichenko A.N.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation;

<sup>b</sup> North Caucasus Federal University Stavropol, Russian Federation

**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 J774А. Штаммы *B. anthracis*, не обладающие плазмидой рХО1, практически не стимулировали выработку IL-1 $\beta$ , вызывали очень низкую секрецию IL-1 $\alpha$ , IL-6, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , 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.anthraxis* за счет выработки главных факторов вирулентности – двухкомпонентного токсина и капсулы, вызывают у макрофагов (в эксперименте) активную продукцию IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1 $\alpha$ ; MIP-1 $\beta$ , 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*.

**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 $\beta$ , caused very low secretion of IL-1 $\alpha$ , IL-6, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ,

MIP-1 $\beta$ , 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 $\beta$ , IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1 $\alpha$ ; MIP-1 $\beta$ , 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.

1           **Введение**

2           Возбудитель сибирской язвы – *Bacillus anthracis*, обладает широкими  
3           адаптивными способностями, успешно приспосабливаясь к существованию в  
4           резко различающихся условиях: почве, организме теплокровных животных,  
5           на искусственных питательных средах. Приспособление к разным условиям  
6           достигается благодаря способности сибиреязвенного микроба существовать в  
7           виде нескольких морфо-функциональных форм (споровой, вегетативной  
8           капсульной, вегетативной акапсульной), для каждой из которых характерны  
9           не только видимые морфологические особенности, но и значительные  
10          преобразования транскрипционной и метаболической активности. Важными  
11          факторами, способствующими успешной колонизации организма  
12          млекопитающего сибиреязвенными бациллами, является способность спор к  
13          прорастанию внутри макроорганизма, скорость и интенсивность  
14          формирования капсулы, секреция компонентов экзотоксинов и  
15          дополнительных факторов вирулентности [1]. Вирулентность и проявление  
16          патогенных свойств штаммов *B. anthracis* напрямую зависит от их  
17          плазмидного состава, так как гены, кодирующие синтез компонентов  
18          токсинов и капсулы, локализованы на плаزمиде вирулентности рХО1  
19          (плазида токсинообразования) и рХО2 (плазида капсулообразования) [2,3].  
20          Оба токсина - летальный и отечный играют важную роль в подавлении  
21          врожденных и адаптивных иммунных функций макроорганизма [4]. Капсула  
22          наделяет вегетативные клетки *B. anthracis* способностью к опсонизации  
23          комплиментом хозяина и опсонофагоцитозу гранулоцитами и макрофагами.  
24          Помимо токсинов и капсулы к факторам вирулентности, способствующим  
25          проникновению и успешному размножению в макроорганизме  
26          сибиреязвенных бацилл относят белки S-слоя, аутолизин AmiA, белки  
27          прорастания спор, гемолизины, лецитиназу [5]. В природе могут встречаться  
28          штаммы *B. anthracis* с разным плазмидным составом, но большинство  
29          штаммов имеют обе плазмиды вирулентности. В лабораторных условиях,

30 особенно при воздействии селективных факторов, из популяции одного  
31 штамма можно выделить варианты, имеющие разный плазмидный состав и  
32 фенотип [6].

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

44 **Материалы и методы:** Штаммы *B. anthracis*, использованные в работе  
45 и их фенотипическая и генетическая характеристика представлены в таблице  
46 1. Для экспериментов использовали культуру макрофагоподобных клеток  
47 J774А. Культивирование культуры клеток макрофагов проводили на среде  
48 DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением 2 % стерильной  
49 фетальной бычьей сыворотки в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С и содержании CO<sub>2</sub>  
50 – 5%. Для заражения взвесью спор *B. anthracis* использовали 1-2 суточный  
51 монослой с конфлюэнтностью 70-90%, на 2-20 пассаже. Морфологию  
52 клеточной культуры и ее чистоту оценивали в мазках, окрашенных методом  
53 Романовского. При заражении культуры клеток макрофагов спорами, в  
54 луночки вносили взвесь спор в среде DMEM с 10 % FBS, из расчета 50 спор на  
55 1 клетку культуры макрофагов (это составляет 1 мл взвеси  $1 \times 10^7$  спор/мл) и  
56 помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °С на 1,5 часа. Далее  
57 культуральную среду удаляли в емкость с дезраствором (6 % перекись  
58 водорода с 0,5 % ПАВ), а адгезированные на дне лунок планшета клетки

59 культуры макрофагов, содержащие фагоцитированные споры, 2 раза  
60 отмывали культуральной средой DMEM в объеме 1 мл для удаления  
61 нефагоцитированных спор, в лунки добавляли 2 мл среды поддержки  
62 (DMEM, 2 % FBS) и продолжали инкубацию зараженных макрофагов при  
63 37 С и 5 % CO<sub>2</sub> в течение времени эксперимента (24 ч).

64       Количественный анализ уровня цитокинов проводили на приборе для  
65 мультиплексного иммунологического анализа в микропланшетах Bio-Plex -  
66 200 (Bio-Rad, США) с использованием набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine  
67 23-plex (BioRad, США). Прибор предварительно был валидирован и  
68 откалиброван с настройкой «low PMTRP1». Пробоподготовка проводилась в  
69 соответствии с инструкцией производителя. Объем образца, добавляемого в  
70 планшет, составил 50 мкл на лунку. Каждый образец анализировали в двух  
71 повторях. Стандартные кривые рассчитывали с помощью программного  
72 обеспечения Bio-Plex Manager по формуле пятипараметрической регрессии.  
73 Изменчивость внутри анализа, выраженная как коэффициент вариации, была  
74 рассчитана на основе среднего значения разведенных стандартных образцов  
75 и измерена дважды в мультиплексном анализе. Культивирование штаммов  
76 *B. anthracis*, получение свежих спор и определение их жизнеспособности,  
77 окрашивание препаратов, обеззараживание образцов и другие работы с  
78 возбудителем сибирской язвы проводили в соответствии с МУК 4.2. 2413-08  
79 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы».  
80 Безопасность работ была обеспечена в соответствии с СП 3.3686-21  
81 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике  
82 инфекционных болезней».

83       **Результаты и обсуждение:** взаимодействие между макрофагами  
84 хозяина и сибирезвенными бациллами начинается с взаимодействия споры  
85 и макрофага, что инициирует инфекционный процесс и реакции макрофагов  
86 на летальный и отечный токсины, которые начинают экспрессироваться в  
87 вегетативной клетке. Значительное повышение уровня TNF-α при



88 аэрозольном заражении мышей спорами *B. anthracis*, которое стремительно  
89 уменьшается по мере развития бактериемии описано в работе [7]. Мы  
90 наблюдали практически полное отсутствие TNF- $\alpha$  (на уровне фоновых  
91 значений) через 24 ч после инфицирования культуры клеток макрофагов  
92 спорами *B. anthracis*. Микроскопическое исследование препаратов выявило,  
93 что в это время в культуре макрофагов находится большое количество  
94 бактериальных клеток. Ряд экспериментов, описанных в работе [8] показал,  
95 что продукция TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  на ранних этапах влияет на увеличение  
96 продукции летального токсина и наоборот, выработка токсина стимулирует  
97 иммунный ответ организма и увеличение выработки цитокинов. Летальный  
98 токсин *B. anthracis*, который относится к цинкзависимым металлопротеазам,  
99 инактивирует киназы семейства MAPKK (MEK) путем протеолитического  
100 расщепления, что ведет к активному высвобождению цитокинов  
101 пораженными клетками [9]. Нами получены данные, подтверждающие что  
102 сублитические концентрации летального токсина индуцируют выработку  
103 цитокинов семейства IL-1. Так, штаммы *B. anthracis* лишенные плазмиды  
104 токсинообразования, практически не стимулировали выработку IL-1 $\beta$ , в то  
105 время как в культуральной жидкости клеток макрофагов, инфицированных  
106 штаммами pXO1<sup>+</sup>, наблюдались высокие уровни IL-1 $\beta$  даже спустя 24 ч после  
107 заражения. Концентрация IL-1 $\beta$  в культуральной жидкости была выше в 600  
108 раз при инфицировании макрофагов диплазмидными вирулентными  
109 штаммами *B. anthracis* pXO1<sup>+</sup>, pXO2<sup>+</sup> и в 228 раз выше при использовании  
110 атипичных штаммов с фенотипом Cap(CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>(O<sub>2</sub>)<sup>+</sup>Tox<sup>+</sup>ProtA<sup>+</sup>Hly<sup>-</sup>Lec<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>.  
111 Моноплазмидные штаммы *B. anthracis*, лишенные плазмиды  
112 капсулообразования, вызывали повышение уровня IL-1 $\beta$  по сравнению с  
113 бесплазмидными в 400 раз. Штаммы *B. anthracis*, не обладающие плазмидой  
114 pXO1: 228/4 (pXO1<sup>-</sup>, pXO2<sup>-</sup>) и 1CO RBA9-1 [24] (pXO1<sup>-</sup>, pXO2<sup>+</sup>) практически  
115 не стимулировали выработку IL-1 $\beta$ , вызывали очень низкую секрецию IL-1 $\alpha$ ,  
116 IL-6, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-12 (p70) и активную продукцию G-CSF

117 (рисунок 1). Уровень G-CSF при воздействии на макрофаги штаммами *B.*  
118 *anthracis* (pXO1<sup>-</sup>, pXO2<sup>+</sup>) был в 13 раз выше, чем у диплозмидных  
119 вирулентных и в 3 раза выше, чем у моноплазмидных штаммов, имеющих  
120 только плазмиду токсинообразования и бесплазмидных штаммов.  
121 Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) является  
122 многофункциональным цитокином и стимулирует клеточную пролиферацию,  
123 усиливает гемопоэз, вызывает антиапоптотические и противовоспалительные  
124 эффекты. Нам не удалось найти литературных данных о зависимости  
125 продукции G-CSF от вирулентных свойств инфицирующих штаммов *B.*  
126 *anthracis*, однако, в ряде исследований [10-11] описано, что введение  
127 зараженным сибирской язвой животным дополнительных доз G-CSF  
128 помогало им справиться с инфекцией за счет стимуляции эритропоэза и  
129 снижения эффекта развития токсического шока. Исходя из этого, можно  
130 ожидать, что культура макрофагов, инфицированная диплозмидными  
131 штаммами сибиреязвенного микроба, будет продуцировать большее  
132 количество G-CSF, однако, в эксперименте мы наблюдали противоположную  
133 картину: наибольшую продукцию гранулоцитарного  
134 колониестимулирующего фактора вызывали штаммы, у которых  
135 отсутствовали одна или обе плазмиды вирулентности. Заметная разница была  
136 выявлена и в концентрации IL-12, который влияет на клеточный иммунитет  
137 и повышает цитотоксичность макрофагов. Его концентрация при  
138 воздействии диплозмидных штаммов (pXO1<sup>+</sup>, pXO2<sup>+</sup>), превышала  
139 аналогичные значения бесплазмидных (в 6,5 раза) и моноплазмидных  
140 штаммов (в 3 раза).

141 Типичные диплозмидные штаммы *B. anthracis* 81/1, 1CO, 140 P Cap<sup>-</sup>  
142 б.м., относящиеся к основной генетической группе А, вызывали высокий  
143 уровень секреции IL-1β, IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1α, MIP-1β, IL-12 (p70),  
144 которые являлись доминирующими в цитокиновом профиле их  
145 культуральных фильтратов на фоне менее выраженных фракций других

146 цитокинов, экспрессируемых макрофагами. Диплазмидные штаммы *B.*  
147 *anthracis* 1CO-S, 14/41-1aSM, 12/16-S с атипичным капсулообразованием по  
148 своей способности стимулировать выработку макрофагами цитокинов мало  
149 отличались от других диплазмидных и моноплазмидных (pXO1<sup>+</sup>, pXO2<sup>-</sup>)  
150 штаммов *B. anthracis*. Доминирующими по концентрации в культуральной  
151 жидкости были IL-1β, IL-6, MCP-1, G-CSF, MIP-1α, MIP-1β, IL-12 (p70). При  
152 использовании штамма *B. anthracis* 14/41 1aSM в фильтрате культуральной  
153 жидкости отсутствовал G-CSF. Для группы моноплазмидных (pXO1<sup>+</sup>, pXO2<sup>-</sup>)  
154 штаммов *B. anthracis* – 140 P Cap<sup>-</sup>, 14/41 Trpt<sup>+</sup>, 1CO-S Cap<sup>-</sup>, 228/8 характерна  
155 высокая продукция IL-1β, IL-6, MCP-1 (MCAF), MIP-1α, MIP-1β, G-CSF  
156 (рисунок 1).

157 Данное исследование является первым опытом по определению  
158 влияния генетических и фенотипических особенностей штаммов *B. anthracis*  
159 на видовой состав цитокинов, и временных параметров секреторной  
160 активности макрофагов. Сопоставление цитокиновых профилей фильтратов  
161 культуральной среды при использовании различающихся по свойствам  
162 штаммов *B. anthracis* позволяет констатировать отсутствие IL-1β в  
163 фильтрах штаммов *B. anthracis* с отсутствием плазмиды pXO1 (pXO1<sup>-</sup>,  
164 pXO2<sup>-</sup> и pXO1<sup>-</sup>, pXO2<sup>+</sup>). Интересным является отсутствие MCP-1 в  
165 фильтрах штаммов *B. anthracis* 14/41 trpt<sup>+</sup> и 14/41-1aSM. Анализ  
166 цитокиновых спектров фильтратов культуральной жидкости, полученных  
167 при инфицировании штаммами *B. anthracis* 228 и 228 прот выявил, что они  
168 были практически идентичны. Указанные штаммы являются  
169 диплазмидными, но исходный штамм 228 является умеренно вирулентным  
170 [12] с фенотипом Cap(CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>(O<sub>2</sub>)<sup>-</sup> Tox<sup>-</sup> ProtA<sup>-</sup> Hly<sup>-</sup> Lec<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup>, а выделенный из  
171 его популяции штамм 228 прот относится по той же классификации к высоко  
172 вирулентным и имеет фенотип Cap(CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>(O<sub>2</sub>)<sup>-</sup> Tox<sup>+</sup> ProtA<sup>+</sup> Hly<sup>+</sup> Lec<sup>-</sup> Trp<sup>+</sup>.  
173 Возможно, метод определения токсинообразования на среде СОПЭК [12]  
174 является недостаточно чувствительным и производимая на невысоком

175 уровне продукция токсина, достаточна тем не менее для стимуляции  
176 выработки цитокинов. Штаммы с атипичным капсулообразованием в  
177 атмосфере воздуха с фенотипом Cap(CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>(O<sub>2</sub>)<sup>+</sup>Tox<sup>-</sup>ProtA<sup>-</sup>Hly<sup>-</sup>Lec<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>  
178 также не отличались по способности стимулировать выработку цитокинов от  
179 высоковирулентных штаммов. Капсула, наряду с летальным и отечным  
180 токсинами, относится к основным факторам вирулентности *B.anthraxis*, но у  
181 штаммов, лишенных плазмиды вирулентности рХО1, ее продукция  
182 нарушена, так как главным регулятором синтеза капсулы является ген *atxA*,  
183 локализованный на плазмиде рХО1 через положительную регуляцию генов  
184 *acrA* и *acrB* [13], поэтому штаммы, лишенные плазмиды  
185 токсинообразования, даже при наличии у них плазмиды  
186 капсулообразования, вызывают слабый цитокиновый ответ у клеток  
187 инфицированной культуры макрофагов.

#### 188 Выводы

189 Выявлена зависимость секретируемых макрофагальными клетками  
190 цитокинов от плазмидного состава заражающих штаммов *B.anthraxis* при  
191 моделировании сибиреязвенной инфекции *in vitro*. Наличие плазмиды рХО1  
192 оказывает мощный стимулирующий эффект на выработку цитокинов  
193 макрофагами клеточной линии J774А. Цитокин IL-1β активно продуцируется  
194 макрофагальными клетками в ответ на синтез факторов вирулентности  
195 сибиреязвенного микроба - летального и отечного токсинов и капсулы.  
196 Поэтому значительная выработка IL-1β наблюдается при заражении  
197 макрофагов вирулентными диплазмидными штаммами *B. anthracis*.  
198 Выработка G-CSF не зависела от наличия плазмид вирулентности у штаммов  
199 сибиреязвенного микроба, использованных для заражения и, по всей  
200 видимости, является результатом воздействия факторов, имеющих  
201 хромосомную детерминацию. Штаммы *B. anthracis*, не обладающие  
202 плазмидой рХО1, практически не стимулировали выработку IL-1β, вызывали  
203 очень низкую секрецию IL-1α, IL-6, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, IL-12 (p70) и

204 активную продукцию G-CSF. Низкий цитокиновый ответ клеток макрофагов  
205 при заражении моноплазмидными штаммами, имеющими только плазмиду  
206 капсулообразования, обусловлен, вероятно, не только отсутствием бинарного  
207 токсина, но и нарушениями в регуляции синтеза капсулы, связанными с  
208 отсутствием гена *atxA*. Диплазмидные штаммы *B.anthraxis* за счет выработки  
209 главных факторов вирулентности – бинарного токсина и капсулы, вызывают  
210 у макрофагов (в эксперименте) активную продукцию IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, G-  
211 CSF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-12 (p70). Штаммы, обладающие умеренной  
212 вирулентностью и способные к капсулообразованию на воздухе, по  
213 воздействию на культуру макрофагов *in vitro* практически не отличались от  
214 высоковирулентных штаммов.

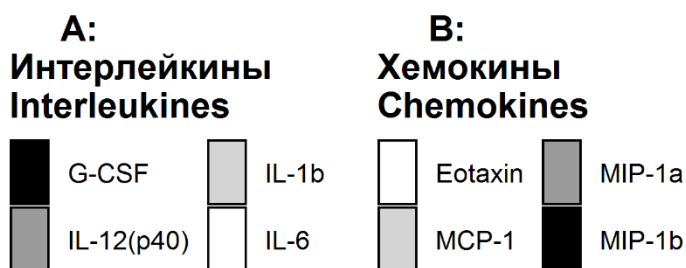
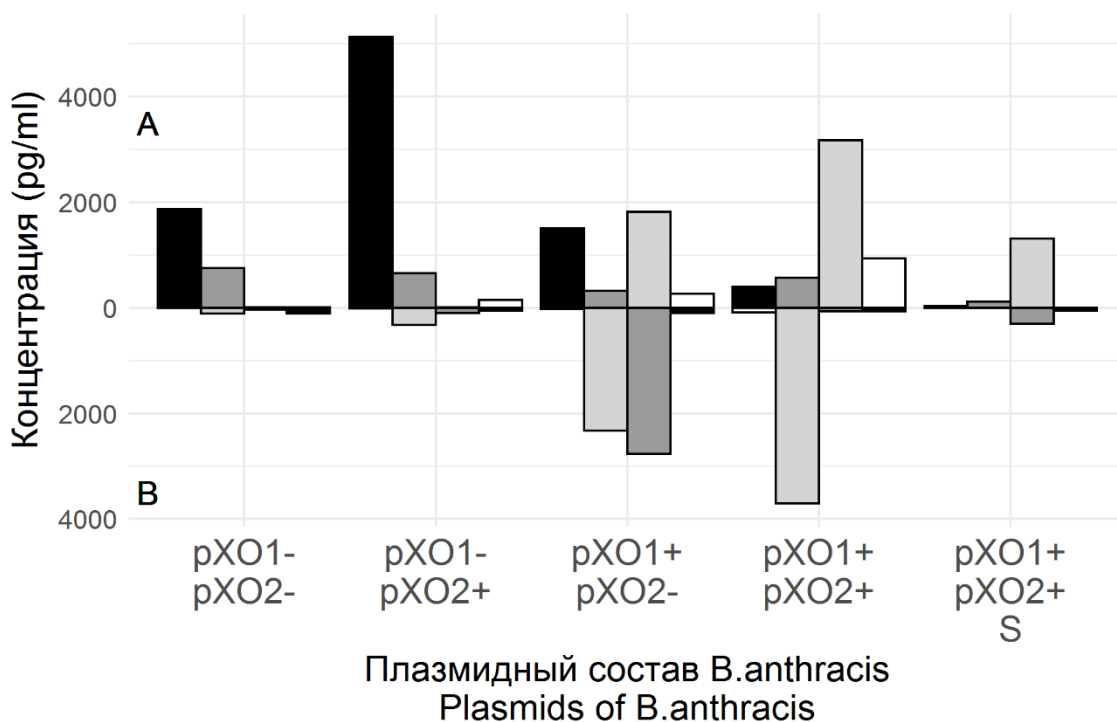
215 Представляет интерес дальнейшее изучение временной динамики  
216 изменений цитокинового профиля макрофагов при моделировании  
217 сибиреязвенной инфекции *in vitro* в зависимости от биологических  
218 характеристик изучаемых штаммов *B. anthracis*.

219 Благодарности

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

**РИСУНКИ**

Plasmid	IL-1b	IL-6	IL-12 (p40)	G-CSF	Eotaxin	MCP-1	MIP-1a	MIP-1b
pXO1- pXO2+	4,55	143,52	650,92	5129,69	11,39	328,26	101,71	51,55
pXO1- pXO2-	4,60	7,53	751,32	1873,02	0,00	105,34	38,10	109,95
pXO1+ pXO2-	1820,14	267,77	320,92	1504,12	20,39	2330,05	2765,11	104,45
pXO1+ pXO2+ S	1314,74	0,00	119,23	34,80	0,00	0,00	301,96	52,41
pXO1+ pXO2+	3171,49	935,91	572,64	394,58	87,79	3700,61	61,71	67,92



Пояснения к данным, использованным для построения графика, представленного на рис 1.

Цель данного исследования – оценить возможность влияния плазмидного состава штаммов сибиреязвенного микроба на выработку цитокинов культурой мышинных макрофагов в эксперименте. В то же время

следует отметить, что *Bacillus anthracis* обладает значительной вариабельностью свойств, включая особенности поверхностных структур, синтеза и секреции ферментов и белков – регуляторов различных процессов, необходимых для адаптации к разным условиям существования в разных морфо-функциональных формах. Все это, а так же межштаммовые отличия в скорости размножения и спорообразования бацилл, является причиной различий качественного и количественного состава веществ, воздействующих на культуру макрофагов, что так же может влиять на время и интенсивность выработки цитокинов. Учитывая все это, мы оценивали качественные характеристики цитокиновых профилей культуры макрофагов заражении штаммами *B. anthracis* с разным плазмидным составом, а в качестве иллюстраций приведены индивидуальные графики отдельных штаммов, наиболее характерных для каждой группы сравнения (таблица plot). В дальнейшем планируется расширенное исследование, в котором другие, более тонкие критерии фенотипической и генетической дифференциации штаммов.





## ТАБЛИЦЫ

Таблица 1 - Фенотипические и генетические характеристики штаммов *B. anthracis*, использованных в работе

Table 1 — Phenotypic and genetic characteristics of *B. anthracis* strains used in the study

№ п/п	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> belongsto <i>B. anthracis</i>	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>+</sup> Hly <sup>+</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>+</sup>	A	pXO1 <sup>+</sup> pXO2 <sup>+</sup>	Высоко- вирулентные Highly virulent
2	81/1	отделяемое язвы ulcer discharge	принадл. к <i>B. Anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>+</sup> Hly <sup>+</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>+</sup>			
3	228 прот,	штамм 228 strain 228	независимость от Trp Trp-independent	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>+</sup> Hly <sup>+</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>+</sup>			
4	12/16-1 4P	штамм 12/16-1 strain 12/16-1	после 4 пассажей на б.м. (что это) 4 passages on	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>+</sup> Hly <sup>+</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>+</sup>			
5	140 P Cap- б.м.	штамм 140 P Cap- strain 140 P Cap-	после 1 пассажа на б.м. 1 passage on	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>+</sup> Hly <sup>+</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>+</sup>			
6	1284	Пельмени meat dumplings	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>+</sup> Hly <sup>+</sup> Lec <sup>-</sup>	B	Умеренно- вирулентные moderately virulent	
7	228	производств. шт. manufacture strain	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>	B		
8	14/41	отделяемое язвы ulcer discharge	принадл. к <i>B. anthracis</i> belongs to <i>B. anthracis</i>	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>			

9	1CO-S	штамм 1CO strain 1CO	Cap <sup>+</sup> O <sub>2</sub>	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>			Слабо- вирулентные Weakly virulent
10	12/16-S	штамм 12/16 strain 12/16	Cap <sup>+</sup> O <sub>2</sub>	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>			
11	14/41-1aSM	штамм 14/41-1 strain 14/41-1	Cap <sup>+</sup> O <sub>2</sub>	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>			
12	1CO RBA9-1 [24]	штамм 1CO strain 1CO	рез. к фагу «BA9» phage«BA9» resistance	Cap(CO <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> (O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>+</sup>	A	pXO1 <sup>-</sup> pXO2 <sup>+</sup>	Умеренно- вирулентные moderately virulent
13	228/8	штамм 228 strain 228	вакцинный штамм vaccine strain	Cap <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>+</sup>			
14	СТИ	вакцинный шт.		Cap <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup>			
15	14/41 Trp <sup>+</sup>	штамм 14-41 strain 14-41	независимость от Trp Trp-independent	Cap <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>+</sup> Trp <sup>+</sup>	A	pXO1 <sup>+</sup> pXO2 <sup>-</sup>	Авирулентные avirulent
16	1CO-S Cap <sup>-</sup>	штамм 1CO –S strain 1CO –S	отсутств. капсулообраз. absent capsule formation	Cap <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>	B		
17	140 P Cap <sup>-</sup>	штамм 140P strain 140P					
18	228/4	штамм 228 strain 228	отсутств. капсулообраз. absent capsule formation	Cap <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> ProtA <sup>-</sup> Hly <sup>-</sup> Lec <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>	B	pXO1 <sup>-</sup> pXO2 <sup>-</sup>	Апатогенные apathogenic

Обозначения, использованные в таблице и далее в тексте для описания фенотипических свойств:

The designations used in the table and further in the text to describe phenotypic properties are:

+ наличие признака, - отсутствие признака, \* признак не определен в связи с отсутствием роста

+ presence of a trait, - absence of a trait, \* trait not defined due to lack of growth

Cap(CO<sub>2</sub>) — способность к образованию капсулы в атмосфере с 5 % углекислого газа

Cap(CO<sub>2</sub>) — potential to form a capsule in atmosphere with 5% carbon dioxide

Cap(O<sub>2</sub>) — способность к образованию капсулы в атмосфере воздуха

Cap(O<sub>2</sub>) — potential to form a capsule in air atmosphere

Hly — способность лизировать отмытые эритроциты барана

Hly — potential to lyse washed sheep erythrocytes

Lec — фосфолипазная активность на плотной среде с яичным желтком

Lec — phospholipase activity on solid medium with egg yolk

Trp — прототрофность по триптофану

Trp — tryptophan prototrophy

Tox — формирование линий иммунопреципитации с противосибиреязвенным гаммаглобулином на среде СОПЭК

Tox — formation of immunoprecipitation lines with anti-anthrax gamma globulin on SOPEK medium

**ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ\_МЕТАДААННЫЕ**

**ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КУЛЬТУРЫ МЫШИНЫХ  
МАКРОФАГОВ *IN VITRO* ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ СПОРАМИ  
*BACILLUS ANTHRACIS* С РАЗНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ СОСТАВОМ  
CYTOKINE PROFILE OF MOUSE MACROPHAGE CULTURE *IN VITRO*  
UPON INFECTION WITH *BACILLUS ANTHRACIS* SPORES WITH  
DIFFERENT PLASMID COMPOSITION**

**Блок 1.** Информация об авторе ответственном за переписку

Котенева Елена Анатольевна – к.б.н., зав. лабораторией постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, Ставрополь, Российская Федерация; доцент базовой кафедры микробиологии ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь, Российская Федерация

e-mail: [postgenom\\_stv@mail.ru](mailto:postgenom_stv@mail.ru), [koteneva\\_ea@snipchi.ru](mailto:koteneva_ea@snipchi.ru)

Koteneva Elena Anatolievna- PhD (Biology) Head of the laboratory of postgenomic technologies Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; associate Professor of the Basic Department of Microbiology North Caucasus Federal University, Stavropol, Russian Federation

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт  
Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия  
Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation;

**Блок 2.** Информация об авторах

**Котенева Елена Анатольевна** – к.б.н., зав. лабораторией постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, 355035 ул.

Советская 13-15 г. Ставрополь, Российская Федерация тел 8 (8652) 26-03-12,  
8 905 412 54 73

Доцент базовой кафедры микробиологии ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский  
федеральный университет» ул. Пушкина 1. г. Ставрополь, Российская  
Федерация

e-mail: [postgenom\\_stv@mail.ru](mailto:postgenom_stv@mail.ru), [koteneva\\_ea@snipchi.ru](mailto:koteneva_ea@snipchi.ru)

Koteneva Elena Anatolievna- PhD (Biology) Head of the laboratory of  
postgenomic technologies Stavropol Research Anti-Plague Institute, 355035  
Stavropol, Sovetskaya st, 13-15 Russian Federation;

Associate Professor of the Basic Department of Microbiology North Caucasus  
Federal University 355017 Stavropol, Pushkin St, 1, Russian Federation

**Цыганкова О.И.** – д.м.н., врач-бактериолог лаборатории бруцеллеза ФКУЗ  
Ставропольский противочумный институт, ул. Советская 13-15 г.  
Ставрополь, Российская Федерация e-mail: [postgenom@snipchi.ru](mailto:postgenom@snipchi.ru)

Tsygankova O. I. - PhD, MD (Medicine), bacteriologist laboratory of brucellosis  
Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Sovetskaya st, 13-15 Russian  
Federation;

**Щербакова В.Ю.** – младший научный сотрудник лаборатории постгеномных  
технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, ул. Советская  
13-15, г. Ставрополь, Российская Федерация e-mail:  
[sherbakova\\_vu@snipchi.ru](mailto:sherbakova_vu@snipchi.ru)

Shcherbakova V. Yu.- junior researcher of the laboratory of postgenomic  
technologies Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Sovetskaya st,  
13-15 Russian Federation;

**Калинин А.В.** – биолог лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ  
Ставропольский противочумный институт, ул. Советская 13-15, г.  
Ставрополь, Российская Федерация

Kalinin A. V. – biologist of the laboratory of postgenomic technologies Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Sovetskaya st, 13-15 Russian Federation;

e-mail: [kalinin\\_av@snipchi.ru](mailto:kalinin_av@snipchi.ru)

**Родионов И.С.** – м.н.с. лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, ул. Советская 13-15, г. Ставрополь, Российская Федерация

Rodionov I.S. - junior researcher of the laboratory of postgenomic technologies Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Sovetskaya st, 13-15 Russian Federation;

e-mail [rodionov\\_is@snipchi.ru](mailto:rodionov_is@snipchi.ru)

**Сердюков В.В.** – лаборант-исследователь лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, ул. Советская 13-15, г. Ставрополь, Российская Федерация e-mail: [serdukov\\_vv@snipchi.ru](mailto:serdukov_vv@snipchi.ru)

Serdyukov V. V – laboratory-researcher of the laboratory of postgenomic technologies Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Sovetskaya st, 13-15 Russian Federation;

**Абрамович А.В.** – м.н.с. лаборатории постгеномных технологий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, ул. Советская 13-15 г. Ставрополь, Российская Федерация

Abramovich A. V - junior researcher of the laboratory of postgenomic technologies Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Sovetskaya st, 13-15 Russian Federation;

e-mail: [abramovich\\_av@snipchi.ru](mailto:abramovich_av@snipchi.ru)

**Куличенко А.Н.** – член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, ул. Советская 13-15, г. Ставрополь, Российская Федерация

Kulichenko A.N., Corresponding Member of RAS, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of Stavropol Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Sovetskaya st, 13-15 Russian Federation

**Котенева Е.А.,<sup>1,2</sup> Цыганкова О.И.,<sup>1</sup> Щербакова В.Ю.<sup>1</sup>, Калинин А.В.<sup>1</sup>, Родионов И.С.<sup>1</sup>, Сердюков В.В.<sup>1</sup>, Абрамович А.В.<sup>1</sup>, Куличенко А.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт*

*Роспотребнадзора, ул. Советская, 13-15, Ставрополь, 355035, Россия*

\* *e-mail: postgenom\_stv@mail.ru*

<sup>2</sup> *Северо-Кавказский федеральный университет, ул. Пушкина, 1, Ставрополь, 355009, Россия*

**Koteneva E.A.<sup>a,b</sup>, Tsygankova O.I.<sup>a</sup>, Shcherbakova V. Yu.<sup>a</sup>, Kalinin A. V.<sup>a</sup>, Rodionov I.S.<sup>a</sup>, Serdyukov V. V.<sup>a</sup>, Abramovich A. V.<sup>a</sup>, Kulichenko A.N.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Stavropol Research Anti-Plague Institute, 355035 Stavropol, Sovetskaya st, 13-15 Russian Federation;

<sup>b</sup> North Caucasus Federal University 355017 Stavropol, Pushkin St, 1, Russian Federation

### **Блок 3. Метаданные статьи**

#### **Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:**

Цитокины при сибирской язве *in vitro*

Cytokines in anthrax *in vitro*

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

**Keywords:** anthrax; cytokines; macrophages; virulence plasmids; capsule; toxin; modeling infection *in vitro*.

Краткое сообщение

Количество страниц текста – 8, количество рисунков –1, количество таблиц –  
1.

10.03.2022



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
12	Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. Академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. - Изд. 2-е, переработанное и дополненное. - М.: ЗАО «Шико», 2013. - 560 с.	Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical Guide / Ed. Academician of the Russian Academy of Medical Sciences G.G. Onishchenko, Academician of the Russian Academy of Medical Sciences V.V. Kutyrev. - Ed. 2nd, revised and expanded. - M.: CJSC "Shiko", 2013. -	<a href="https://www.researchgate.net/publication/260634782_Osobo_opasnye_virusnye_infekcionnye_zabolevania">https://www.researchgate.net/publication/260634782_Osobo_opasnye_virusnye_infekcionnye_zabolevania</a>

		560 p.	
1	Онищенко Г.Г., Васильев Н.Г., Литусов Н.В., Харечко 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 micro- biology, epidemiology, clinic, diagnostics and prophylaxis]. M.; 1999. 448 p.	<a href="https://rusneb.ru/catalog/004543_000037_SVONB-RU_SRSL_2233290/">https://rusneb.ru/catalog/004543_000037_SVONB-RU_SRSL_2233290/</a>
6	Цыганкова О.И., Ерёменко Е.И., Цыганкова Е.А., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г Фенотипические и генетические особенности культурально- морфологических вариантов <i>Bacillus</i> <i>anthracis</i> // Журнал микробиол. – 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 <i>Bacillus anthracis</i> // Journal of	<a href="http://elib.fesmu.ru/elib/Article.aspx?id=187238">http://elib.fesmu.ru/elib/Article.aspx?id=187238</a>

		Microbiol. - 2008. - No. 4 - P.6-11.	
10	Chang HH, Wang TP, Chen PK, Lin YY, Liao CH, Lin TK, Chiang YW, Lin WB, Chiang CY, Kau JH, Huang HH, Hsu HL, Liao CY, Sun DS. Erythropoiesis suppression is associated with anthrax lethal toxin-mediated pathogenic progression. PLoS One. 2013 Aug 19;8(8):e71718. PMID: 23977125; PMCID: PMC3747219.	-	<a href="https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0071718&amp;type=printable">https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0071718&amp;type=printable</a> [doi: 10.1371/journal.pone.0071718]
13	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. of Bacteriology. - Jan. 2004. - Vol.186. - №2. - P. 307-315.	-	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC305762/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC305762/</a> [DOI: 10.1128/JB.186.2.307-315.2004]
9	Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, et al. Proteolytic inactivation	-	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9563949/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9563949/</a>

	of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. <i>Science</i> . 1998;280:734–737.		[DOI: 10.1126/science.280.5364.734]
11	Erwin JL, DaSilva LM, Bavari S, Little SF, Friedlander AM, and Chanh TC. Macrophage-derived cell lines do not express proinflammatory cytokines after exposure to <i>Bacillus anthracis</i> lethal toxin. <i>Infect Immun</i> 69: 1175–1177, 2001.	-	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11160016/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11160016/</a> [DOI: 10.1128/IAI.69.2.1175-1177.2001]
3	Green B.D., Battisti B.L., Koehler T.M. et al. Demonstration of a capsule plasmid in <i>Bacillus anthracis</i> // <i>Infect. Immun.</i> - 1985. - Vol.49. - P. 291-297	-	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3926644/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3926644/</a> [DOI: 10.1128/iai.49.2.291-297.1985]
8	Hanna, P. C., D. Acosta, and R. J. Collier. 1993. On the role of macrophages in anthrax. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 90:10198–10201	-	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8234277/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8234277/</a> [DOI: 10.1073/pnas.90.21.10198]
2	Mikesell P., Ivins B.E., Ristroph J.D., Dreier T.M. Evidence for plasmid-mediated toxin	-	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6401695/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6401695/</a>

	production in <i>Bacillus anthracis</i> // <i>Infect. Immun.</i> - 1983. - Vol. 39. - P.371-376.		[DOI: 10.1128/iai.39.1.371-376.1983]
5	Missiakas, Dominique, and Olaf Schneewind. "Assembly and Function of the <i>Bacillus anthracis</i> S-Layer." <i>Annual review of microbiology</i> vol. 71 (2017): 79-98.	-	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28622090/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28622090/</a> [DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093512]
4	Moayeri M, Leppla SH, Vrentas C, Pomerantsev AP, Liu S <i>Anthrax Pathogenesis. Annu Rev Microbiol.</i> 2015; 69():185-208.	-	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26195305/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26195305/</a> [DOI: 10.1146/annurev-micro-091014-104523]
7	Zakowska D, Bartoszcze M, Niemcewicz M, Bielawska-Drózd A, Kocik J. New aspects of the infection mechanisms of <i>Bacillus anthracis</i> . <i>Ann Agric Environ Med.</i> 2012;19(4):613-8. PMID: 23311776.	-	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23311776/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23311776/</a>