

**БИОМЕДИЦИНСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СПОРОВОГО РЕКОМБИНАНТНОГО
ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* 2335/105 В СОСТАВЕ СУБАЛИНА® КАК ЖИВОЙ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНА
ПРИ ВИРУСНЫХ ЛЕЙКОЗАХ: ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НА ИММУННЫЕ КЛЕТКИ
И ОРГАНЫ МЫШЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ВИРУСНОГО ЛЕЙКОЗА**

¹ Я.Л.Русакова, младший научный сотрудник

² О.В.Казаков, кандидат биологических наук

³ В.А.Белявская, доктор биологических наук, профессор

¹ Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина

² Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии

³ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии

E-mail: yarojana@mail.ru

Ключевые слова: субалин, вирусный лейкоз, живой терапевтический агент, субтилитерапия, безопасность внутрибрюшинного введения.

Реферат. Для поддержания здорового иммунитета у животных, особенно в условиях, неблагоприятных по вирусному лейкозу, рассматривается перспективная система доставки биологически активных молекул – препарат Субалин, живая система доставки. В результате исследований установлено, что при внутрибрюшинном и внутривенном введении препарат Субалин безвреден для животных даже в дозах, многократно превышающих терапевтическую. При введении препарата Субалин у животных стимулируется гуморальный и клеточный иммунитет, о чем свидетельствует морфофункциональная перестройка лимфоидной системы (селезенка, лимфоузлы). При одномоментном введении Субалина с вирусосодержащей суспензией субтилитерапия оказала стабилизирующее воздействие на макроорганизм, сдерживая развитие вирусного онкогенеза.

**BIOMEDICAL POTENTIAL OF THE SPORE-RECOMBINANT STRAIN *BACILLUS*
SUBTILIS 2335/105 IN THE COMPOSITION OF SUBALIN®, AS A LIVING THERAPEUTIC
SYSTEM FOR THE DELIVERY OF ALPHA-INTERFERON IN VIRAL LEUKEMIA:
ASSESSMENT OF THE EFFECT ON IMMUNE CELLS AND ORGANS OF MICE IN THE
EXPERIMENT OF VIRAL LEUKEMIA**

¹ Ya.L.Rusakova, Junior Researcher

² O.V.Kazakov, Candidate of Biological Sciences

³ V.A.Belyavskaya, Doctor of Biological Sciences, Professor

¹ National Medical Research Center. Academician E.N. Meshalkin

² Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology

³ State Scientific Center of Virology and Biotechnology

Key words: subline, viral leukemia, living therapeutic agent, subtility therapy, safety of intraperitoneal administration.

Abstract. To maintain a healthy immune system in animals, especially under conditions unfavorable for viral leukemia, a promising delivery system of biologically active molecules is considered – Subalin, a live delivery system. As a result of research, it has been established that with intraperitoneal and intravenous administration to animals, Subalin is harmless to animals, even at doses many times higher than the therapeutic one. With the introduction of the drug Subalin in animals stimulated humoral and cellular immunity, as evidenced by morphofunctional reorganization of the lymphoid system (spleen, lymph nodes). With the simultaneous

administration of Subaline with a virus-containing suspension, subtility therapy had a stabilizing effect on the macroorganism, restraining the development of viral carcinogenesis.

Ассоциированные с вирусами опухолевые заболевания, прежде всего вирусные лейкозы, широко распространены среди людей и животных. Так, каждое пятое онкологическое заболевание у человека имеет вирусное происхождение [1]. Инфекционная составляющая в вирусном канцерогенезе при отсутствии профилактических и терапевтических препаратов может придавать вирусу склонность к быстрому эпидемическому распространению. Ярким примером является вирусный лейкоз крупного рогатого скота, вызываемый вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). Противодействие эпидемии лейкоза предусматривает комплексный подход, основанный на соблюдении зоотехнических требований и постоянной замене инфицированных животных из рабочих и племенных стад на генетически более устойчивых особей.

Большое значение придается проведению мер по поддержанию здорового иммунитета животных. Считается, что только сдвиг в сторону более поздних сроков манифестации заболевания позволит по некоторым подсчетам, значительно повысить эффективность использования высокопродуктивных молочных пород. На первый план выдвигается активация неспецифической системы интерферона, осуществляющей надзор и элиминацию в организме поврежденных клеток (инфицированных, опухолевых и др.). Недостаток функционирования системы у животных в результате врожденного или приобретенного иммунодефицита может быть компенсирован за счет введения препаратов интерферона- α . Показано, что интерферон- α , вводимый не парентеральным путем, оказывает широкий спектр положительного воздействия на иммунные клетки и органы не только врожденного, но и специфического иммунитета за счет активации экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости, благодаря чему интерферон-альфа может выступать эффективным адъювантом [2].

В настоящее время в качестве перспективных систем доставки в организм биологически активных молекул с профилактической и терапевтической целью рассматриваются живые системы, в том числе микробные клетки и вирусы. Все большее внимание уделяется споровым микроорганизмам [3]. Споры имеют ряд существенных преимуществ перед другими живыми системами доставки. Так, споры *B. subtilis* благодаря своей безопасности для человека ВОЗ относит к GRAS (generally recognized as safe) микроорганизмам. Кроме того, споры способны непосредственно напрямую контактировать с иммунными клетками (дендритными и макрофагами) и могут быть введены в организм разными путями [3]. Уникальная способность спор *B. subtilis* сохранять жизнеспособность в экстремальных условиях позволяет обходиться без «холодовой цепи» при транспортировке и хранении споровых препаратов. Наблюдается неуклонный рост числа публикаций по *B. subtilis* как живой системе доставки биологически активных субстанций. Благодаря уникальной структуре споровой оболочки при ее контакте с иммунными клетками обеспечивается сбалансированная T1/T2 активация с формированием клеток памяти. Показана эффективная доставка в организм гетерологичных антигенов, цитокинов, ферментов и др. [3].

Созданные учеными ГНЦ ВБ «Вектор» в конце 80-х годов рекомбинантный пробиотический штамм *B. subtilis*, продуцирующий интерферон- α , и препарат Субалин® на его основе являются первым успешным примером создания живой системы доставки – «живой биофабрикой» [4]. Биологические и экологические свойства штамма Субалина® были всесторонне изучены авторами – разработчиками препарата и другими исследователями [5–7]. Показаны безвредность и биомедицинский потенциал штамма как живого терапевтического агента по доставке молекул интерферона- α . Споры и препарат Субалин® на их основе при введении в организм обладают способностью подавлять репликацию ДНК и РНК вирусов [8], ингибировать рост опухолей и метастазов в эксперименте на модели легочной саркомы Льюиса [6, 9]. Выраженные адъювантные свойства штамма продемонстрированы при совместном введении с вакцинами против вируса чумы плотоядных и энтерального парвовируса [10]. Применение субалина и более поздних его аналогов (ветом и суб-про) повышает уровень потенциального здоровья и хозяйственно-товарной полезности сельскохозяйственных животных (свиньи, крупного рогатого скота), птицы, плотоядных и рыб, что отражено в многочисленных публикациях (несколько десятков ссылок на запрос в интернет-ресурсе по ключевому слову «субалин», «ветеринария»).

Сочетанные (антивирусные, противоопухолевые и иммуномодулирующие) эффекты Субалина явились обоснованием для оценки его влияния на процесс вирусного канцерогенеза при ВЛКРС путем моделирования процесса на мышах, инфицированных вирусом лейкоза Раушера (Rouse sarcoma virus). Оба вируса относятся к семейству ретровирусов (Retroviridae), имеют значительную гомологию в структуре вирусных геномов и провирусов, имеют схожие прямые «драйверы» опухолевого процесса [11]. Вирусы имеют общие иммунные мишени: лимфоузлы, селезенка, перитонеальные макрофаги и спленоциты. Нормальная активность иммунных клеток резко снижена уже на первых этапах инфицирования. Имеются отличия в течении поздней стадии патологического процесса. В отличие от ВЛКРС, который обладает тропизмом к лимфоидным клеткам и размножается в них, доминирующей особенностью вирусного лейкоза Раушера является гиперплазия проэритробластов вместе с увеличением количества мегакариоцитов. Их быстрая пролиферация приводит к быстрому увеличению селезенки. В терминальной стадии в паренхиме селезенки отмечают геморрагические и некротические области разной величины, приводящие в некоторых случаях к гибели животных от внутриперитонеального кровотечения [12].

Мы предположили, что введение Субалина® на ранней стадии канцерогенеза может восстановить, хотя бы частично, функциональную активность иммунных клеток и снизить репликацию вируса в органах-мишенях. Положительный эффект может быть усилен внутрибрюшинным способом введения, обеспечивающим максимальное приближение к органам и клеткам-мишеням вируса терапевтической субстанции – интерферона- α . Терапевтическая эффективность субтилитерапии (лечение пробиотиками на основе *B. subtilis*) была продемонстрирована при лечении вирусного энцефалита у человека путем введения спор под мозговые оболочки, лечении туберкулеза и других инфекционных и неинфекционных легочных заболеваний аэрозольным путем [13]. В работе подчеркивается, что культуру помимо перорального способа введения можно вводить и другими путями (внутрибрюшинно, парентерально и пр.) в зависимости от локализации патологического процесса. Приводятся экспериментальные данные полной элиминации спор из организма животных через несколько часов после парентерального введения спор, что свидетельствует о высокой безопасности субтилитерапии [13].

Нами ранее были получены данные о положительном влиянии споровых клеток рекомбинантного штамма на иммунные клетки и органы мыши при внутрибрюшинном введении Субалина [14,15]. Однако полученные результаты требовали более детального изучения безопасности и эффективности внутрибрюшинного способа введения Субалина.

Цель настоящей работы – изучение безвредности внутрибрюшинного введения субалина и его терапевтической эффективности при вирусном лейкозе Раушера для оценки его биомедицинского потенциала как живой системы доставки лекарственных субстанций, в частности интерферона – альфа.

Из поставленной цели вытекают следующие задачи исследования:

1) провести сравнительный анализ безвредности Субалина по показателям острой токсичности в дозах, многократно превышающих терапевтические при внутрибрюшинном и внутривенном способах введения;

2) оценить влияние субалина на морфологию потенциальных органов-мишеней для вируса Раушера (селезенка, лимфатические узлы) на интактных мышах и инфицированных вирусом Раушера;

3) оценить влияние Субалина на иммунные клетки-мишени (спленоциты) на интактных мышах и инфицированных вирусом Раушера при воздействии дополнительных стимулов и без стимулов.

Для изучения безвредности внутрибрюшинного введения мышам культуры *B. subtilis* 2335/105 (ВКПМ4790) препарата Субалин® в работе был использован препарат, изготовленный по утвержденным техническим условиям серия 020910 [16]. В опыт взяты белые беспородные мыши массой 10–12 г. Животным вводили внутрибрюшинно культуру *B. subtilis* 2335/105 в виде суспензии в дозах 10×10^9 КОЕ, т.е. многократно превышающих рекомендуемые [17]. Для сравнительного анализа суспензия была введена мышам внутривенно в дозе 5×10^9 КОЕ. У животных отмечали наличие аппетита, анализировали все случаи отклонения от нормального физиологического состояния: снижение активности, угнетение, заболевание, гибель и др. Выборочно измеряли температуру тела. В течение всего периода следили за изменением живой массы тела животных. Гистологические исследования проводили в соответствии с рекомендациями по проведению оценки острой токсичности в доклинических исследованиях [18].

Наблюдение за животными проводили в течение 7 дней. Через 1 и 7 суток умерщвляли глубоким эфирным наркозом по 5 мышей из каждого варианта опыта и проводили макроскопические исследования внутренних органов, а также отбирали различные органы для гистологического изучения: печень, почки, легкие, селезенку, кишечник, мезентеральные лимфатические узлы, головной мозг, тимус. Материал фиксировали в растворе формалина, парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Для изучения влияния субалина на иммунные органы и клетки у интактных и инфицированных вирусом Раушера мышей в работе был использован препарат серии 020910, изготовленный в соответствии с утвержденными техническими условиями [16]. Для эксперимента отобраны самки мышей BALB/c в возрасте 2,5–3 месяца, массой 18–22 г. Животных разделили на группы: группа инфицированных вирусом (условно – антиген (АГ)), группа Субалин, группа Субалин+антиген и группа контроля. Животным экспериментальных групп введение соответствующего биоматериала выполнялось одновременно, путем внутрибрюшинной инъекции. В группе антиген животных заражали вирусом лейкоза Раушера. Методика заражения описана ранее [19]. В группе Субалин каждому животному вводили препарат Субалин в количестве 1,5 дозы (КОЕ доза отработана в предварительных опытах). В группе Субалин+антиген, кроме антигена в указанной дозировке (1/1000 часть селезенки), каждому животному вводили препарат Субалин в количестве 1,5 дозы. Контролем служила группа здоровых животных, которым вводили физиологический раствор в объеме 0,5 мл.

Материал для исследования (подвздошные лимфатические узлы и селезенку) забирали через 2 и 11 месяцев от начала эксперимента и у каждого погибшего животного. Фиксацию материала выполняли 10%-м раствором формалина. Срезы лимфоидных органов готовили традиционным способом для получения гистологического препарата. Окраску проводили гематоксилин-эозином по Майеру и азур-эозином по Нохт-Максимуму [20, 21]. Морфометрию осуществляли методом точечного счёта с помощью стандартной сетки (256 точек), вмонтированной в окуляр микроскопа МБС-10. Используя принципы стереометрии и метод наложения точечных морфометрических сеток [22], определяли объемную плотность структур лимфоидных органов. Определяли площади коркового и мозгового вещества и площади их отдельных структур. Отношение удельной площади коркового вещества к удельной площади мозгового (корково-мозговой индекс – к/м) рассчитывали для лимфатических узлов в каждой экспериментальной группе. По нему ориентировались при определении типа лимфоузла [23]. Выделение структурных компонентов и дифференцировку клеточных форм в лимфатических узлах и селезенке производили с учетом Международной гистологической номенклатуры [23]. Клетки лимфоидных органов распознавали, используя имеющиеся рекомендации [24, 25].

Для оценки функциональной активности лимфоидных клеток изучали влияние антигена на спонтанную и стимулированную митогенами пролиферацию спленоцитов. Пролиферативную активность клеток оценивали по включению Н³-тимидина в ДНК делящихся клеток. Результаты оценивали в импульсах в минуту на 100×10^3 клеток, подсчитывали средние значения по триплету. Оценку данных проводили в абсолютных значениях.

1. Изучение безвредности внутрибрюшинного введения мышам культуры *B. subtilis* 2335/105 в составе препарата Субалин®.

Таблица 1

Результаты изучения безвредности культуры *B. subtilis* 2335/105

Способ введения	Доза /кол-во микробных клеток, млрд	Кол-во животных	Заболело	Пало	Выжило
Внутривенно	5	10	0	0	10
Внутрибрюшинно	10	10	0	0	10
Контроль	0	10	0	0	10

Как видно из таблицы, в опытных группах, как и в контроле, все животные выжили, случаи заболевания отсутствовали.

Результаты гистологического исследования контрольных животных. На 2 из 10 препаратов от контрольных животных обнаружены поражения печени: множественные очаги некрозов с перифокальным гнойным воспалением; множественные мелкие инфильтраты, очаги продуктивного воспаления

и склероза, в отдельных очагах найдены личинки паразитов. Отмечено также поражение мезентериальных лимфоузлов и селезенки такого же характера. Обнаруженные морфологические изменения во внутренних органах контрольных животных свидетельствуют о наличии у них спонтанной патологии.

Результаты гистологического изучения воздействия культуры B. subtilis 2335/105 в составе препарата Субалин. Все спонтанные животные клинически были здоровыми. При макроскопическом изучении внутренних органов признаки патологии не обнаружены.

Через 1 сутки после *внутривенного введения* Субалина в дозе 5 млрд м.к. у двух животных выявлена небольшая интерстициальная реакция в легких. Признаков патологических реакций в иммунной системе и других внутренних органах не установлено. Через 7 суток у всех животных отмечена умеренная диффузная инфильтрация интерстициальной ткани легких макрофагами и лейкоцитами. Других реакций во внутренних органах не выявлено.

Через 1 сутки после *внутрибрюшинного введения* Субалина в дозе 10 млрд м.к. у животных найдены изменения только в легких такого же характера, как было отмечено выше. У двух животных небольшая очаговая реакция в паранефральной клетчатке в виде лейкоцитарной инфильтрации. Других изменений не обнаружено. Через 7 суток интерстициальные изменения в легких в слабой форме сохранились у одного животного. Других каких-либо нарушений при изучении этого опытного материала не установлено.

Проведенные исследования, в том числе и гистологические [18], показали, что культура *B. subtilis* и Субалин® на ее основе при *внутрибрюшинном* и *внутривенном* введении не вызывают во внутренних органах животных никаких изменений, даже в дозах, значительно превышающих рекомендуемые. Это свидетельствует об отсутствии у культуры и препарата токсических свойств, что позволяет использовать *внутрибрюшинное* введение как более приближенное к сайтам-мишеням вируса, а следовательно, потенциально более эффективное.

2. Влияние Субалина на иммунные органы и клетки у интактных и инфицированных вирусом Раушера мышей в экспериментальной модели вирусного канцерогенеза.

Влияние Субалина на лимфоузлы интактных и инфицированных вирусом Раушера животных. Введение Субалина® вызвало изменения в подвздошном лимфатическом узле (табл. 2). Так, через 2 месяца после инъекции препарата отмечается усиление транспортной функции (увеличение краевого синуса в 2 раза), незначительная «компактизация» (Бородин Ю.И., 1969) – повышение количества коркового вещества на 6,58% при сохранении фрагментированного типа строения данного лимфатического узла (корково-мозговой индекс 0,7). Расширение паракортикальной зоны говорит об усилении Т-клеточного иммунитета. Увеличение митозов в 2 раза в мозговых тяжах по сравнению с контрольной группой свидетельствует о стимуляции В-клеточного звена препаратом Субалин у мышей через 2 месяца. Рост количества клеток плазматического ряда в мозговых синусах лимфатического узла также отражает интенсивность гуморальных иммунологических реакций.

При введении препарата Субалин совместно с антигеном (вирусом лейкоза Раушера) через 2 месяца после начала эксперимента основные изменения происходят в В-зоне лимфатического узла. Уменьшение площади герминативных центров и мозговых тяжей (В-зона) подтверждает угасание гуморального иммунного ответа. Возрастание количества молодых форм (лимфобластов и митотически делящихся клеток в герминативном центре, средних плазмобластов и плазмобластов в мозговых тяжах) клеточного состава говорит об усилении лимфоцитпродуцирующей функции данного лимфатического узла на этом этапе эксперимента. Увеличение площади краевого и мозговых синусов свидетельствует об усилении транспортной функции лимфатического узла. В общем же большинство показателей близки к контрольным значениям, что, по-видимому, означает некоторую стабилизацию организма при применении препарата Субалин в условиях вирусного лейкоза Раушера.

Влияние субалина на селезенку у интактных и инфицированных вирусом Раушера животных. В селезенке через 2 месяца после введения Субалина мы наблюдали стимуляцию В-клеточного иммунного звена, что выражалось в увеличении площади герминативных центров, количества лимфобластов, средних лимфоцитов и митотически делящихся клеток в них. Достоверное увеличение по сравнению с контрольной группой плазмобластов и митозов в мозговых тяжах подтверждает усиление гуморальных иммунологических реакций. Морфофункциональное изучение изменений селезенки животных после совместного воздействия антигена и Субалина показало, что в гиперпластический период раз-

вития заболевания, через 2 месяца наблюдения, площадь белой пульпы уменьшилась как по сравнению с контролем, так и по сравнению с группой Субалин, но все-таки оставалась выше, чем в группе антиген, что может говорить о стимулирующем иммунном воздействии Субалина в условиях развития вирусного лейкоза. Признаки активации иммунной реакции отражаются в увеличении количества лимфобластов и митотически делящихся клеток, а также плазмобластов и плазмоцитов в белой пульпе селезенки и в синусах красной пульпы.

Влияние Субалина на спленоциты у интактных и инфицированных вирусом Раушера животных. Уровень спонтанной и ConA-стимулированной пролиферации спленоцитов в группе антиген+Субалин был низким в ранний период исследования, близким по значению к группе антигена (см. табл. 2). В терминальном периоде уровень спонтанной пролиферации не отличался от контрольных значений, а уровень митоген-стимулированной пролиферации так и остался пониженным.

Таблица 2

Изменения лимфоидных органов и спленоцитов при внутрибрюшинном введении препарата Субалин в условиях экспериментального лейкоза Раушера у мышей в гиперпластический период заболевания (M±m,%)

Показатели	Антиген	Субалин	Субалин+ антиген	Контроль
<i>Лимфоузлы</i>				
Площадь краевого синуса	0,89±0,07	1,40±0,08*	1,09±0,08*●	0,65±0,10
Площадь паракортикальной зоны	29,30±1,15*	31,27±0,59*	27,32±1,10Δ	23,71±1,10
Митозы в мозговых тяжах	1,80±0,11*	1,20±0,060*	0,92±0,10●	0,61±0,10
Незрелые плазмоциты в мозговых синусах	14,96±0,58*	18,89±0,52*	18,95±0,98*●	8,84±0,45
<i>Селезенка</i>				
Площадь герминативного центра	3,30±0,18*	9,14±0,20*	6,69±0,29●Δ	6,93±0,20
Лимфобласты в герминативном центре	3,93±0,23*	3,70±0,11*	3,52±0,32*	1,65±0,12
Средние лимфоциты в герминативном центре	16,71±0,70*	14,18±0,64*	11,50±0,74●	12,23±0,21
Митозы в тяжах красной пульпы	0,52±0,11	1,50±0,02*	1,08±0,12*Δ●	0,43±0,10
Плазмобласты в тяжах красной пульпы	2,45±0,26	5,12±0,11*	3,54±0,21*Δ●	1,67±0,13
Спонтанная пролиферация спленоцитов, имп/мин	1067,0±135,7*	15321,5±336,3*	1534,0±160*Δ	8072,0±270,10
ConA-пролиферация спленоцитов, имп/мин	1934,0±106,6*	146894,3±1965,4*	7924,0±904,4*Δ●	30603±1312,40
Белая пульпа	19,47	47,30	33,00	41,00

* Разница достоверна (при P≤0,05) в сравнении с данными контрольной группы; Δ разница достоверна (при P≤0,05) в сравнении с данными опытной группы Субалин; ● разница достоверна (при P≤0,05) в сравнении с данными опытной группы антиген.

Таким образом, сравнительный анализ безвредности Субалина как при внутривенном, так и при внутрибрюшинном введении в дозах, многократно превышающих терапевтические, показал отсутствие токсического воздействия на экспериментальных животных.

При однократном внутрибрюшинном введении препарата Субалин морфологические изменения подвздошных лимфоузлов свидетельствуют об усилении функциональной активности Т- и В-клеточного иммунного звена, а также усилении транспортной функции самих лимфоузлов. Усиление гуморальных иммунологических реакций отражается и в морфологической перестройке селезенки животных группы Субалин.

При введении препарата Субалин совместно с вирусосодержащим материалом морфологическая перестройка лимфоузла в гиперпластическом периоде показывает усиление лимфоцитпродуцирующей функции (по сравнению с группой антигена и с контрольной группой) и в целом стабилизацию организма. Площадь белой пульпы селезенки остается больше у тех животных, которым вместе с вирусом лейкоза вводили Субалин, у них же отмечается увеличение количества плазмобластов и плазмоцитов, т.е., скорее всего, действием Субалина можно объяснить активацию иммунной системы.

Субалин усиливает спонтанную и конкавалин-стимулированную пролиферацию спленоцитов у неинфицированных животных. При введении Субалина совместно с вирусом лейкоза Раушера уровень

спонтанной пролиферации оставался таким же сниженным, как и в группе инфицированных животных, в то время как конкавалин-стимулированная пролиферация увеличилась.

Работа была частично поддержана РФФИ (18–416–540010/18 p_a).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation* / J. S. Pagano, M. Blaser, M. A. Buendia [et al.] // *Semin Cancer Biol.* – 2004. – Vol. 14. – P. 453–471.
2. *Tompkins W. A.* Immunomodulation and therapeutic effects of the oral interferon - α : mechanism of action // *J. Interf. Cytok. Res.* – 1997. – Vol. 19. – P. 817–828.
3. *Chen H., Ullah J., Jia J.* Progress in *Bacillus subtilis* Spore Surface Display Technology towards Environment, Vaccine Development, and Biocatalysis // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 27. – P. 159–167.
4. *Патент № 1839459.* Штамм бактерий *Bacillus subtilis*, обладающий антивирусной и антибактериальной активностью / В. В. Смирнов, В. А. Белявская, А. А. Ильичев [и др.]. – 1994.
5. *Биологические эффекты интерферона, продуцируемого рекомбинантными бактериями препарата пробиотика Субалин* / В. А. Белявская, Н. В. Чердынцева, В. М. Бондаренко, Н. В. Литвяков // *Журн. микробиологии.* – 2003. – № 6. – С. 102–109.
6. *Роль макрофагов в реализации антибластомного действия рекомбинантного пробиотика Субалина* / Н. В. Литвяков, Н. В. Чердынцева, В. А. Белявская [и др.] // *Вопросы онкологии.* – 2001. – Т. 47, № 1. – С. 86–89.
7. *Экспериментальная оценка биобезопасности генно-инженерных бактерий на модели штамма *Bacillus subtilis*, продуцирующего интерферон* / В. А. Белявская, Т. А. Кашперова, В. М. Бондаренко [и др.]. // *Журн. микробиологии, эпидемиологии, и иммунобиологии.* – 2001. – № 2. – С. 16–20.
8. *Антивирусная активность пробиотиков из бацилл* / Н. В. Чудновская, И. Б. Сорокулова, В. А. Белявская, В. В. Смирнов // *Докл. АН Украины.* – 1995. – № 2. – С. 124–126.
9. *Влияние рекомбинантного пробиотика Субалина на функциональную активность иммунокомпетентных клеток* / Н. В. Чердынцева, Н. В. Литвяков, В. А. Белявская, Е. С. Смольянинов // *Бюл. эксперим. биологии.* – 1999. – № 127 (прил. 1). – С. 67–70.
10. *Адьювантные свойства рекомбинантного пробиотика Субалина, продуцирующего интерферон* / В. А. Белявская, Г. М. Игнатьев, Н. В. Литвяков, Н. В. Чердынцева // *Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии.* – 2001. – № 6. – С. 77–82.
11. *Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus* / Y. Aida, H. Murakami, M. Takahashi [et al.] // *Front Microbiol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 328.
12. *Umar Mustafa Halit.* Aspects of the pathogenesis of the Rauscher murine leukemia virus infection. – Bronder-Offset B.V. – Rotterdam, 1977. – 126 p.
13. *Rocchietta J.* The use of *Bacillus subtilis* in the treatment the diseases // *Mi nerva Med.* – 1969. – Vol. 60. – P.117–123.
14. *Русакова Я. Л., Магер С. Н., Храмцов В. В.* Влияние стволовых клеток на иммунный ответ у мышей BALB/c, зараженных вирусом лейкоза Раушера, и переносимость препаратов Субалин и Сильверол // *Вестн. НГАУ.* – 2012. – № 2 (23). – С. 75–79.
15. *Русакова Я. Л., Магер С. Н., Храмцов В. В.* Воздействие препарата «Субалин» на гематологические показатели мышей BALB/c, инфицированных вирусом лейкоза Раушера // *Вестн. Бурят. гос. с.-х. акад. им. В. Р. Филиппова.* – 2015. – № 3 (40). – С. 57–62.
16. ТУ 9383004–00479379–98 серия 020910.
17. *Наставление по применению Субалина в ветеринарии № 13–5–2/1423.*
18. *РД 42–28–8–89.* Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения /М-во здравоохранения СССР. – М., 1989. – 31с. – Введ. 10.04.89.

19. *Русакова Я.Л., Магер С.Н., Храмов В.В.* Влияние вируса лейкоза Раушера на гематологические показатели и морфологию лимфатических узлов экспериментальных мышей линии BALB/c // *Вестн. НГАУ.* – 2014. – № 3 (32). – С. 104–109.
20. *Волкова О.В., Елецкий Б.К.* Основы гистологии и гистологической техники. – М.: Медицина, 1971. – С. 242–253.
21. *Ромейс Б.* Микроскопическая техника. – М.: Иностран. лит., 1954. – 718 с.
22. *Стефанов С.Б.* Визуальная классификация при количественном сравнении изображений // *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.* – 1985. – Т. 88, вып. 2. – С. 78–83.
23. *Международная гистологическая номенклатура* / под общ. ред. Ю.И. Афанасьева. – 5-е изд. – М.: Медицина, 1987. – С. 128.
24. *Абрамов М.Г.* Гематологический атлас. – М.: Медицина, 1985. – 344 с.
25. *Катинас Г.С., Ляшко О.Г., Баженова И.А.* Динамика количества клеток лимфоидного ряда в паракортикальной зоне лимфатических узлов у мышей C57B1 // *Временная и пространственная организация тканей.* – Л.: Изд-во ИЛМИ, 1981. – С. 47–54.

REFERENCES

1. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. / J. S. Pagano, M. Blaser, M. A. Buendia [et al.] // *Semin Cancer Biol.* - 2004. - Vol. 14. P. 453–471.
2. W. A. Tompkins. Immunomodulation and the therapeutic effects of the oral interferon - α : the mechanism of action // *J. Interf. Cytok. Res.* - 1997. Vol. 19. - p. 817–828.
3. Chen H., Ullah J., Jia J. Progress in Bacillus subtilis Spore Surface Display Technology towards Environment, Vaccine Development, and Biocatalysis // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* - 2017. - Vol. 27. - p. 159–167.
4. Patent No. 1839459. Bacillus subtilis bacterial strain, which has antiviral and antibacterial activity / V.V. Smirnov, V.A. Belyavskaya, A.A. Il'ichev [and others]. - 1994.
5. Biological effects of interferon produced by the recombinant bacteria of the probiotic drug Subalin / V. A. Belyavskaya, N. V. Cherdyntseva, V. M. Bondarenko, N. V. Litvyakov // *Journal of Microbiology.* - 2003. - № 6. - pp. 102–109.
6. The role of macrophages in the implementation of the antiblastomic action of recombinant probiotic Subalin / N. V. Litvyakov, N. V. Cherdyntseva, V. A. Belyavskaya [and others] // *Oncology issues.* - 2001. - V. 47, No. 1. - P. 86–89.
7. Experimental evaluation of the biosafety of genetically engineered bacteria on a model of the strain of Bacillus subtilis producing interferon / V. A. Belyavskaya, T. A. Kashperova, V. M. Bondarenko [and others]. // *Journal. microbiology, epidemiology, and immunobiology.* - 2001. - №2. - P. 16–20.
8. Antiviral activity of probiotics from bacilli / N.V. Chudnovskaya, I. B. Sorokulova, V. A. Belyavskaya, B. B. Smirnov // *Dokl. Academy of Sciences of Ukraine.* 1995. - No. 2. - P. 124–126.
9. The influence of recombinant probiotic Subalin on the functional activity of immunocompetent cells / N. V. Cherdyntseva, N. V. Litvyakov, V. A. Belyavskaya, E. S. Smolyaninov // *Byul. experiment. biology.* - 1999. - No. 127 (Annex 1). - p. 67–70.
10. Adjuvant properties of recombinant probiotic Subalin producing interferon / V. A. Belyavskaya, G. M. Ignatiev, N. V. Litvyakov, N. V. Cherdyntseva // *Zhurn. microbiology, epidemiology, immunobiology.* - 2001. - № 6. - p. 77–82.
11. T-cell leukemia virus / Y. Aida, H. Murakami, M. Takahashi [et al.], Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia, // *Microbiol.* - 2013. - Vol. 4. - P. 328.
12. Umar Mustafa Halit. Aspects of the pathogenesis of the rauscher murine leukemia virus infection. - Bronder-Offset B.V. - Rotterdam, 1977. - 126 p.
13. Rocchietta J. The use of Bacillus subtilis in the treatment of diseases // *Mi nerva Med.* - 1969. - Vol. 60. - P.117–123.
14. Rusakova Ya. L., Mager S.N., Khramtsov V.V. Effect of stem cells on the immune response in BALB / c mice infected with Rauscher leukemia virus and tolerability of Subalin and Silverol preparations // *Vestn. NSAU.* - 2012. - №2 (23). - p. 75–79.

15. Rusakova Ya. L., Mager S.N., Khramtsov V.V. Impact of the “Subalin” preparation on the hematological parameters of BALB / c mice infected with Rauscher leukemia virus // Vestn. Buryat. state S.-H. Acad. them. V.R. Filippova. - 2015. - №3 (40). - pp. 57–62.
16. TU 9383004–00479379–98 series 020910
17. Manual on the use of Subalin in veterinary medicine №13-5-2 / 1423
18. RD 42–28–8–89. Preclinical testing of new medical immunobiological preparations. The main provisions / M-USSR Health. - M., 1989. - 31c. - Enter 04/10/89
19. Rusakova Ya. L., Mager S.N., Khramtsov V.V. Impact of the Rauscher leukemia virus on hematological indices and the morphology of the lymph nodes of experimental BALB / c mice // Vestn. NSAU. - 2014. - №3 (32). - pp. 104–109.
20. Volkova OV, Eletsy B.K. Fundamentals of histology and histological techniques. - M.: Medicine, 1971. - p. 242–253.
21. Romeus B. Microscopic technique. - M.: Inostr. lit., 1954. - 718 p.
22. Stefanov S. B. Visual classification in quantitative comparison of images // Archive of Anatomy, Histology and Embryology. - 1985. - V. 88, no. 2. - pp. 78–83.
23. International histological nomenclature / under total. ed. Yu. I. Afanasyev. - 5th ed. - M.: Medicine, 1987. - p. 128.
24. Abramov M. G. Hematological Atlas. - M.: Medicine, 1985. - 344 p.
25. Katinas G. S., Lyashko O. G., Bazhenova I. A. Dynamics of the number of lymphoid cells in the paracortical zone of lymph nodes in C57B1 mice // Temporal and spatial organization of tissues. - L.: Izd-vo I LMI, 1981. - P. 47–54.