

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-62-69

УДК 616.932:612.017.4

Л.П. Алексеева, О.А. Якушева, В.В. Евдокимова, М.Г. Мелоян, В.П. Зюзина

Продукция холерного токсина и его локализация в составе везикул геновариантов *Vibrio cholerae* El Tor

ФКВЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель работы – оценить уровень токсинопродукции геновариантов *Vibrio cholerae* El Tor и определить локализацию холерного токсина в составе везикул. **Материалы и методы.** В работе использовали типичные штаммы и геноварианты *V. cholerae* El Tor, жидкие питательные среды: АК1 и среду по прописи J. Hyan, – обеспечивающие высокую токсинопродукцию в условиях аэрации. Обеззараженные супернатанты исследуемых штаммов служили источником выделения препаратов холерного токсина и мембранных везикул. Определение локализации холерного токсина (ХТ), внутри или на внешней поверхности везикул, осуществляли с помощью различных методов: ПААГ-электрофорез, иммуноблот, GM1-ИФА, непрямой неконкурентный ИФА, модель культуры клеток СНО-K1, HuTu 80. **Результаты и обсуждение.** Из супернатантов типичного и геновариантов *V. cholerae* El Tor, обладающих высоким уровнем токсинопродукции, выделены препараты везикул, содержащие в своем составе холерный токсин. После разделения везикул с помощью ПААГ-электрофореза, а затем иммуноблота со специфической антитоксической сывороткой установлено, что холерный токсин сохраняет полную структуру, включая обе субъединицы. В отличие от ХТ, секретируемого в среду культивирования, везикулоассоциированный не связывается как с рецептором GM1 ганглиозидов, сенсibilизированных на планшетах, так и GM1 на клеточных культурах, что свидетельствует об его отсутствии на внешней поверхности везикул. Положительная реакция в GM1-ИФА специфических антитоксических антител с везикулами, после их деградации ЭДТА, предполагает локализацию ХТ в полости везикул. Отсутствие токсина на внешней поверхности везикул у типичных и штаммов геновариантов *V. cholerae* El Tor исключает его связь с GM1-рецептором и позволяет предположить возможность их проникновения в клетки-мишени GM1-независимым путем. Выбор пути, по которому происходит передача везикулоассоциированного токсина в клетки-хозяева, обусловлен, вероятно, его местонахождением, т.е. связан он с внутренними структурами везикул или локализован на их поверхности.

Ключевые слова: холерный вибрион, холерный токсин, везикулы.

Корреспондирующий автор: Алексеева Людмила Павловна, e-mail: lpalekseeva1@yandex.ru.

Для цитирования: Алексеева Л.П., Якушева О.А., Евдокимова В.В., Мелоян М.Г., Зюзина В.П. Продукция холерного токсина и его локализация в составе везикул геновариантов *Vibrio cholerae* El Tor. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 2:62–69. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-62-69
Поступила 16.01.2024. Отправлена на доработку 09.02.2024. Принята к публ. 26.02.2024.

L.P. Alekseeva, O.A. Yakusheva, V.V. Evdokimova, M.G. Meloyan, V.P. Zyuzina

Cholera Toxin Production and Localization in Vesicles of *Vibrio cholerae* El Tor Genovariants

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The aim was to assess the level of toxin production in *Vibrio cholerae* El Tor genovariants and to determine the localization of cholera toxin in vesicles. **Materials and methods.** The work is performed on typical strains and genovariants of *V. cholerae* El Tor, which were grown in AKI liquid nutrient medium and the one prepared according to J. Hyan recipe, providing for high toxin production under aeration conditions. The decontaminated supernatants of the studied strains served as a source for extraction of toxin preparations and membrane vesicles. The localization of cholera toxin inside or on the outer surface of vesicles was determined through polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immunoblotting, GM1-ELISA, indirect uncompetitive ELISA, cell culture models CHO-K1, HuTu 80. **Results and discussion.** Vesicle preparations containing cholera toxin have been isolated from the supernatants of genovariants and typical *V. cholerae* El Tor with a high level of toxin production. After separation of the vesicles using PAGE, followed by immunoblot with a specific antitoxic serum, it has been found that cholera toxin retains the complete structure, including both subunits. Unlike CT secreted into the culture medium, vesicle-associated one does not bind to both the GM1 receptor of gangliosides sensitized on plates and on the surface of cell cultures, which indicates its absence on the outer surface of vesicles. The location of CT in the cavity of vesicles is also evidenced by their positive reaction with specific antitoxic antibodies after degradation of EDTA. The absence of the toxin on the outer surface of vesicles in typical strains and strains of *V. cholerae* El Tor genovariants excludes its binding with the GM1 receptor and suggests the possibility of their penetration into target cells via GM-independent pathways. The choice of the pathways by which the vesicle-associated toxin is transferred to host cells is probably determined by the location of the toxin, i.e. it is associated with the internal structures of vesicles or placement on their surface.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera toxin, vesicles.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Lyudmila P. Alekseeva, e-mail: lpalekseeva1@yandex.ru.

Citation: Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Evdokimova V.V., Meloyan M.G., Zyuzina V.P. Cholera Toxin Production and Localization in Vesicles of *Vibrio cholerae* El Tor Genovariants. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 2:62–69. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-62-69
Received 16.01.2024. Revised 09.02.2024. Accepted 26.02.2024.

Alekseeva L.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>
Yakusheva O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>
Evdokimova V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>

Meloyan M.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7268-9298>
Zyuzina V.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3100-0049>

В настоящее время ведущая роль в этиологии холеры, как известно, принадлежит генетически измененным штаммам холерных вибрионов, отличающимся повышенной токсинопродукцией, высокой колонизирующей способностью, значительным повреждением слизистой кишечника и воспалительными процессами [1]. Полагают, что этот феномен зависит от особенностей экспрессии генов холерного токсина (ХТ), возможно, также от способов его секреции и доставки к клеткам-мишеням. Такая точка зрения на сегодняшний день обусловлена тем, что в отношении значительного числа патогенных бактерий установлен факт включения токсинов в везикулы наружных мембран (ВНМ), но при этом сведения о способах их доставки к клеткам-хозяевам крайне малочисленны. Среди описанных вариантов везикулоассоциированных токсинов, для которых определены способы доставки, известны следующие: шига-токсин *Shigella dysenteriae* серотип 1 [2], термолабильный токсин (LT), цитотоксин энтеротоксигенной *Escherichia coli* [3], токсин Vac A *Helicobacter pylori* [4]. В частности, для LT-токсина, имеющего структурное сходство с ХТ *Vibrio cholerae*, показано, что только после ассоциации токсина и липополисахарида (ЛПС) везикул становится возможной его доставка к клеткам-мишеням [3]. Для штаммов, продуцирующих шига-токсин, выявлено наличие его зрелой активной формы в составе везикул, которые проникают в эпителиальные клетки хозяина. При этом степень токсичности свободного и везикулоассоциированного токсина не установлена. Везикулярный транспорт имеет большие преимущества по сравнению с обычным, так как вещества, находящиеся внутри везикул (бактериальные ферменты, токсины), защищены от внешних протеаз чужеродного происхождения и антител хозяина мембраной, формирующей везикулу. В силу небольших размеров и определенного структурного устройства, включающего многие биологически активные вещества, в том числе и адгезины, играющие важную роль в колонизации, везикулы, проникая глубоко в ткани, куда не может проникнуть сам возбудитель, способствуют вхождению факторов вирулентности в клетки-мишени, обеспечивая развитие тяжелой интоксикации организма.

Холерный вибрион, подобно другим грамотрицательным бактериям, выделяет везикулы, представляющие собой отпочковывающиеся во внешнюю среду структуры диаметром 50–250 нм, состоящие из участков наружной мембраны с захватом части

периплазматического пространства. Анализ биохимических и функциональных характеристик везикул холерного вибриона показал, что они содержат мембранные белки, адгезины, ЛПС, иммуномодулирующие соединения, благодаря чему опосредуют проявление биологических и инвазивных свойств, являются причиной цитотоксичности, а также активируют иммунную систему макроорганизма [5, 6]. Недавние исследования E.S. Rasti *et al.* [7] в отношении штамма *V. cholerae* 569B (Inaba) показали, что биологически активный токсин, помимо свободной формы, выделяемой с помощью системы секреции 2-го типа (T2SS), может продуцироваться в виде везикулоассоциированной формы. В то же время данные опытов с использованием везикул, образуемых прототипными вибрионами Эль Тор (N16961 и C6706), позволили авторам констатировать, что ХТ может быть ассоциирован с их поверхностью или инкапсулирован внутри в виде фрагмента CtxA [8]. Локализация внутри везикул исключает связывание ХТ с GM1-рецептором клеток-мишеней, и в этом случае должен быть иной сайт связывания, чем GM1, что предполагает другой механизм секреции и доставки ХТ и необходимость его изучения для полного понимания патогенеза холерной инфекции.

Сведения об исследованиях в отношении везикулоассоциированного холерного токсина геновариантов вибрионов Эль Тор, выделенных в период последних волн эпидемического процесса, в доступной литературе отсутствуют.

Цель работы – оценить уровень токсинопродукции и определить локализацию холерного токсина в составе везикул у геновариантов *V. cholerae* El Tor.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали 8 штаммов геновариантов и 3 типичных холерных вибриона Эль Тор, полученных из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Все исследуемые штаммы были типичными по морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам.

Для продукции токсина и везикул холерными вибрионами Эль Тор использовали специальные среды: АК1, предложенную M. Iwanaga *et al.* [9], и жидкую питательную среду, приготовленную по прописи J. Huan *et al.* [10]. Бактериальную массу после выращивания в течение 14 часов на термоста-

тируемом шуттель-аппарате Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 при 120 об/мин обеззараживали мертиолятом натрия (1:10000), выдерживали сутки при +4 °С и затем делали высевы на специфическую стерильность. Для получения супернатантов обеззараженные бактериальные клетки удаляли центрифугированием в течение 20 мин при 8000 об/мин.

Выделение везикул наружных мембранных из супернатантов испытываемых штаммов проводили методом осаждения сульфатом аммония по методике И.В. Кудряковой и соавт. [11] с некоторыми модификациями. Полученные везикулы после предварительной подготовки просматривали в электронном микроскопе Jeol JEM-1011. Количественное определение белка в токсинсодержащих препаратах и везикулах проводили методом сравнения поглощения белков при длине волн 260–280 нм на приборе Bio-Rad Smart Spec Plus.

Определение уровня токсинопродукции холерных вибрионов Эль Тор. Исходным материалом для оценки уровня продукции ХТ служили обеззараженные супернатанты бульонных культур. Количество холерного токсина определяли с помощью иммуноферментного анализа GM1-ИФА по стандартной методике [12]. В качестве детектирующих антител использовали кроличью антитоксическую сыворотку и антитоксические моноклональные антитела, направленные к субъединице В. Положительным контролем служил препарат очищенного холерного токсина из штамма *V. cholerae* 569В, отрицательным – супернатант нетоксигенного штамма *V. cholerae* El Tor 14863. Для выделения токсина и последующей его очистки по методу, описанному ранее [13], были отобраны штаммы вибрионов Эль Тор с высокой токсинопродукцией.

Определение биологической активности препаратов холерного токсина и везикул на модели культуры клеток. Клеточные линии получены из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, и хранятся в институте в криохранилище с жидким азотом. Все этапы работы с перевиваемыми линиями клеток выполнены в соответствии с рекомендациями [14]. Клетки СНО-К1 выращивали в среде Игла MEM с 10 % сыворотки плода коровы, 2 мМ глутамина и 50 мкг/мл гентамицина, NuTu 80 культивировали в среде DMEM с 10 % сыворотки плода коровы, 1 % NEAA, 2 мМ глутамина, 2 мМ пирувата и 50 мкг/мл гентамицина. Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37 °С.

Клетки линий для тестирования токсина и везикул высевали в лунки 96-луночного планшета в дозе 5000 клеток/лунка. Разведения испытываемых образцов готовили в бессывороточной среде Игла MEM или DMEM и добавляли их к клеточным культурам в конечном объеме 100 мкл на лунку. Изменение морфологии клеточных культур, обусловленное токсином, подтверждали путем нейтрализации его действия специфическими антитоксическими анти-

телами. Токсический эффект оценивали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS 200 (Япония), для снимков использовали камеру Nikon. Активность токсинсодержащих образцов определяли по четырехбалльной системе путем подсчета процента измененных клеток в лунках планшета.

Электрофорез белков и иммуноблоттинг. Электрофоретический анализ для разделения препаратов холерного токсина и везикул по молекулярной массе проводили по U.K. Laemmli [15]. Использовали белковые маркеры молекулярной массой от 14 до 120 кДа Blue Plus II Protein Marker (США) и для окраски белков на мембране – краситель Ponceau S (Reanal, Будапешт, Венгрия). Постановку иммуноблоттинга осуществляли по методу Н. Towbin *et al.* [16]. Иммуноанализ проводили после электрофоретического переноса белков с полиакриламидного геля (ПААГ) на мембрану PVDF (Bio-Rad, США). Перенос вели в течение 20 минут на приборе TransBlot Turbo (Bio-Rad, США). Холерный токсин выявляли кроличьей антитоксической сывороткой с помощью антикроличье-го пероксидазного конъюгата.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Office 2003). При анализе и обобщении результатов вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической ($P < 0,05$).

Результаты и обсуждение

В соответствии с поставленной целью первоначально необходимо было отобрать штаммы геновариантов вибрионов Эль Тор с высокой токсинопродукцией, чтобы использовать их для выделения токсина и получения препарата везикул. Испытуемые штаммы вибрионов Эль Тор культивировали в течение 14 часов в двух жидких питательных средах: одна по прописи J. Нуан, другая АК1, – поскольку их принято считать наиболее оптимальными для секреции и накопления токсина. В супернатантах, после удаления клеток, содержание токсина оценивали с помощью GM1-ИФА. Его количество определяли по калибровочной кривой относительно очищенного препарата ХТ 569В, который использовали также в качестве положительного контроля, отрицательным служил супернатант нетоксигенного штамма *V. cholerae* El Tor 14863.

Как видно из таблицы, наибольшая секреция токсина в среду культивирования порядка 0,49–0,98 мкг/мл зарегистрирована в отношении геновариантов *V. cholerae* El Tor 18367, 19188/2, 19667, являющихся представителями «предгаитянской», «гаитянской» и «постгаитянской» групп вибрионов. Более низкие показатели токсина в пределах 0,05–0,08 мкг/мл отмечены у типичных вибрионов Эль Тор. Кроме того, судя по сопоставимым величинам, сравнение двух сред не выявило значительных отли-

чий в продукции токсина исследуемыми штаммами. На следующем этапе из больших объемов обеззараженных супернатантов вибрионов геновариантов Эль Тор 19667, 19188/2, 18367 и типичного 1310 осуществляли выделение токсина и проводили его очистку с помощью метода, описанного ранее в нашей публикации [13]. Чистоту ХТ и наличие белков-контраминантов контролировали в 10%-м SDS-ПААГ [15]. Очищенные препараты токсинов имели одну полосу на уровне маркеров Мм 25–27 кДа, другую – в районе 10–12 кДа, что соответствует субъединицам А-ХТ и В-ХТ при отсутствии сопутствующих белков.

С помощью иммуноферментного анализа на основе моноклонального пероксидазного конъюгата, предназначенного для детекции ЛПС *V. cholerae* O1, установлено, что препараты ХТ не содержат примесей ЛПС.

Для определения местоположения токсина в составе везикул, т.е. локализован он внутри или ассоциирован с наружной поверхностью, получены их препараты. Из литературных источников следует, что геноварианты отличаются повышенной скоростью роста и логарифмическая фаза является оптимальной для получения значительных количеств везикул, так как переход в стационарную фазу сопро-

вождается гибелью клеток и снижением продукции везикул [17, 18]. Принимая во внимание показатели токсинопродукции и данные в отношении скорости роста геновариантов вибрионов Эль Тор, испытываемые штаммы 19667, 19188/2, 18367, 1310 выращивали в среде АКІ в течение 14 часов. Источником везикул наружных мембран служили обеззараженные супернатанты. Количественная оценка везикул, выделяемых исследуемыми штаммами, осуществлялась на основе определения тотального белка. Максимальная концентрация белка установлена в отношении штаммов 19667, 19188/2 и, как следствие, более высокий выход везикул. Для анализа препаратов, содержащих везикулы, использована методика негативного контрастирования. Визуальная оценка везикул в препаратах из разных штаммов показала, что они заполнены веществом с низкой электронной плотностью и диапазон их размеров колеблется от 50 до 200 нм. Как пример, на рис. 1 представлены данные электронной микроскопии везикул, образуемых штаммом 19667.

Наличие ХТ в составе везикул исследуемых геновариантов *V. cholerae* El Tor 19667, 18367, 19188/2 и типичного 1310 установлено в результате их разделения в ПААГ-электрофорезе, переноса на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) и проведения им-

Продукция холерного токсина типичными штаммами и геновариантами холерных вибрионов биовара Эль Тор
Cholera toxin production by typical strains and genovariants of cholera vibrios of the El Tor biovar

№	Штаммы Strains	Год, источник и место выделения Year, source and site of isolation	Генетическая характеристика Genetic characterization	Количество ХТ, мкг/мл, при выращивании в ... Quantity of CT, µg/mL, when grown in ... media	
				АКІ	Hyan
<i>Vibrio cholerae</i> O1 серогруппы биовара Эль Тор <i>Vibrio cholerae</i> O1, biovar El Tor					
1	1310	1966, человек, Ирак 1966, patient, Iraq	<i>ctxB3, tcpA^{ET}, rtxA1</i> типичный / typical	0,06	0,08
2	5879	1972, человек, Ростовская обл. 1972, patient, Rostov Region	<i>ctxB3, tcpA^{ET}, rtxA1</i> типичный / typical	0,04	0,05
3	14863	1991, человек, Одесса 1991, patient, Odessa	<i>ctxA⁻, tcpA⁻</i> типичный / typical	–	–
4	18367	2001, вода, Ростов-на-Дону 2001, water sample, Rostov-on-Don	<i>ctx B1, tcpA^{ET}, rtxA1</i> «предгаитянский» / pre-Haitian	0,46	0,49
5	18847	2005, вода, Санкт-Петербург 2005, water sample, Saint-Petersburg	<i>ctx B1, tcpA^{ET}, rtxA1</i> «предгаитянский» / pre-Haitian	0,39	0,27
6	19613	2014, вода, Ростов-на-Дону 2014, water sample, Rostov-on-Don	<i>ctx B1, tcpA^{ET}, rtxA1, csh1⁻</i> «предгаитянский» / pre-Haitian	0,31	0,35
7	19187/2	2010, человек, Москва 2010, patient, Moscow	<i>ctxB7, tcpA^{CIRS}, rtxA4</i> «гаитянский» / Haitian	0,61	0,73
8	19188/2	2010, человек, Москва 2010, patient, Moscow	<i>ctxB7, tcpA^{CIRS}, rtxA4</i> «гаитянский» / Haitian	0,85	0,92
9	19191	2010, человек, Москва 2010, patient, Moscow	<i>ctxB7, tcpA^{CIRS}, rtxA4</i> «гаитянский» / Haitian	0,23	0,41
10	19242	2012, человек, Москва 2012, patient, Moscow	<i>ctxB7, tcpA^{CIRS}, rtxA4a</i> «постгаитянский» / post-Haitian	0,42	0,64
11	19667	2014, человек, Москва 2014, patient, Moscow	<i>ctxB7, tcpA^{CIRS}, rtxA4a, csh1⁻</i> «постгаитянский» / post-Haitian	0,98	0,76

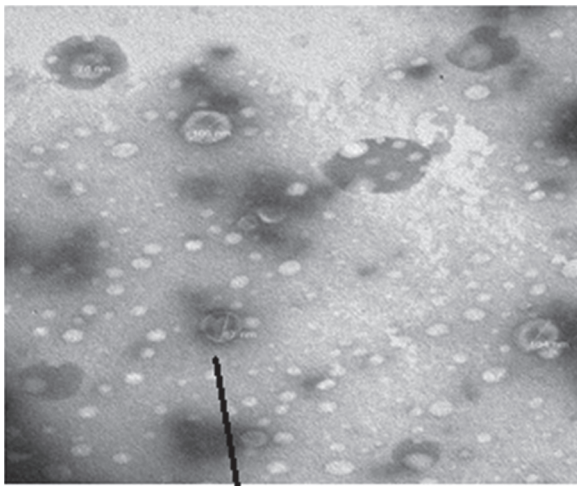


Рис. 1. Электронная микроскопия препаратов везикул штамма *V. cholerae* O1 El Tor № 19667, увеличение ×100000

Fig. 1. Electron microscopy of vesicle preparations of *V. cholerae* O1 El Tor strain No. 19667, magnification ×100000

муноблота со специфическими антитоксическими антителами. В итоге у препаратов везикул выявлена одна белковая полоса на уровне маркеров примерно 26 кДа, другая – в районе 11–12 кДа, что является свидетельством их принадлежности соответственно субъединицам А-ХТ и В-ХТ. С помощью ПААГ-электрофореза и иммуноблота удалось показать, что везикулы содержат обе субъединицы, и этот факт позволяет говорить о целостности структуры холерного токсина, связанного с везикулами (рис. 2).

В последующих экспериментах мы предприняли попытку ответить на вопрос, ассоциирован ХТ с внутренней или внешней поверхностью везикул. Как известно, после выхода из бактериальной

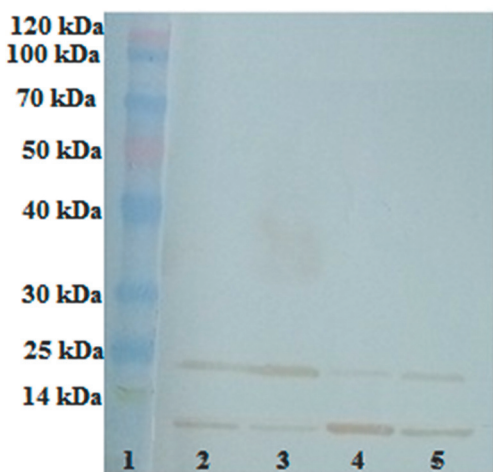


Рис. 2. Иммуноблоттинг препаратов везикул типичного штамма и геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor:

1 – маркеры молекулярной массы; 2 – препарат везикул штамма 19188/2; 3 – препарат везикул штамма 19667; 4 – препарат везикул штамма 18367; 5 – препарат везикул штамма 1310

Fig. 2. Immunoblotting of vesicle preparations of a typical strain and genovariants of *V. cholerae* O1 El Tor:

1 – molecular weight markers; 2 – vesicle preparation of strain 19188/2; 3 – vesicle preparation of strain 19667; 4 – vesicle preparation of strain 18367; 5 – vesicle preparation of strain 1310

клетки секретируемый ХТ с помощью кольца субъединицы В связывается с ганглиозидом GM1 на поверхности клеток-хозяев или в модельных опытах – на клеточных линиях кишечника, и затем комплекс ХТ-GM1 подвергается эндоцитозу [19]. Очевидно, если токсин локализован в полости везикул, то он не может взаимодействовать с рецептором GM1 на клетках-мишенях, поэтому для проверки этого предположения мы использовали метод GM1-ИФА. Препараты ХТ из штаммов *V. cholerae* El Tor 19667, 18367, 19188/2, 1310 в концентрации 40 и 80 нг/лунка использовали в качестве положительного контроля. В лунки 96-луночного планшета, предварительно сенсibilизированного ганглиозидами, вносили указанные количества препарата ХТ и параллельно в аналогичных концентрациях везикулы. Как видно из рис. 3, препараты ХТ, выделенные из среды культивирования испытуемых штаммов, активно связывались с ганглиозидами, и подтверждение тому – положительная реакция с показателями оптической плотности (ОП) в пределах 0,6–1,4. В то же время при взаимодействии везикул с ганглиозидами значения ОП были на уровне отрицательного контроля, и эти данные дают основание предположить его внутреннюю локализацию. Об отсутствии токсина на поверхности говорит и тот факт, что после предварительной инкубации везикул с ганглиозидами не отмечено их связывания с GM1.

Наряду с GM1-ИФА был применен также непрямо́й неконкурентный ИФА, который позволил получить дополнительные сведения в отношении местоположения токсина в структуре везикул. В лунки планшета, предварительно сенсibilизированные ганглиозидами, вносили везикулы, интактные и параллельно обработанные этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Предварительная инкубация с 0,1 М ЭДТА для деградации везикул продолжалась в течение часа при 37 °С. Такой вариант ИФА предполагает, что антитоксические антитела взаимодействуют с открытыми доступными эпитопами ХТ, тогда как скрытые, замаскированные, не будут обнаружены. Как оказалось, интактные везикулы не связывались с антитоксическими антителами, и об этом свидетельствуют показатели ОП, сопоставимые со значениями отрицательного контроля. В то же время наблюдалась положительная реакция антитоксических антител с везикулами, предварительно обработанными ЭДТА, что указывает на демаскировку и доступность эпитопов ХТ для связывания с соответствующими им иммуноглобулинами. Данные, полученные с помощью метода неконкурентного ИФА, являются еще одним подтверждением локализации токсина штаммов *V. cholerae* O1 El Tor внутри везикул, а не на их поверхности.

Оценку биологической активности и интернализации препаратов везикул проводили одновременно на двух линиях культуры клеток: СНО-К1 и NuTu 80, – что позволило корректно сравнить полученные результаты. Просмотр в инвертированном

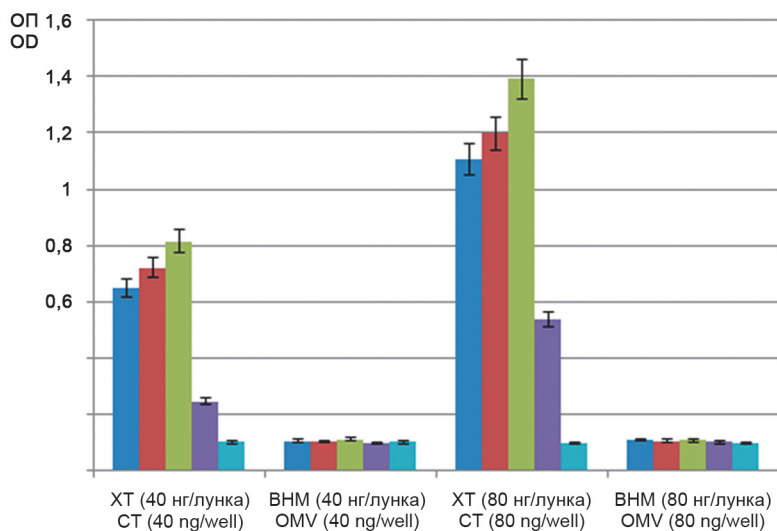


Рис. 3. Взаимодействие препаратов ХТ и везикул наружных мембран штаммов *V. cholerae* O1 El Tor с GM1-рецептором ганглиозидов:

ОП – оптическая плотность; ВММ – везикулы наружных мембран

Fig. 3. Interaction of CT preparations and outer membrane vesicles of *V. cholerae* O1 El Tor strains with the ganglioside GM1-receptor:

OD – the optical density; OMV – outer membrane vesicles

микроскопе планшетов с культурой клеток спустя сутки после внесения препаратов везикул показал изменение морфологии клеток обеих линий, что указывало на плотный контакт и взаимодействие везикул с клетками-мишенями (рис. 4). Морфологическая картина в виде удлинения клеток CHO-K1 и появление игольчатых отростков в культуре клеток HuTu 80 характерны для действия холерного токсина. Изменение морфологии клеток свидетельствует о том, что холерный токсин, локализованный в везикулах, биологически активен. В литературе описаны различные механизмы проникновения везикул в клетки-мишени и доставки ими своего содержимого. Например, везикулы *E. coli* на своей поверхности содержат термолабильный энтеротоксин (LT) и используют его как вектор для связывания с ганглиозидным рецептором GM1 и проникновения в клетку-мишень [3]. Холерный токсин по своей структуре, биологической активности, секреции через систему T2SS и распознаванию рецептора GM1 сходен с LT. Мы предположили возможность аналогичного механизма и для ХТ. Для этого препараты везикул и токсина предварительно инкубировали с ганглиозидами. Атипичная морфология клеток обеих линий,

характерная для действия холерного токсина, была зарегистрирована после их контакта с везикулами, предобработанными ганглиозидами. В контрольных лунках с холерным токсином после обработки ганглиозидами зафиксирована отрицательная реакция, так как его предварительное связывание с GM1-рецептором исключало взаимодействие с клеточными культурами и, как следствие, изменение их морфологии. Из результатов этого опыта следует, что, вероятно, токсинсодержащие везикулы проникают в клетки GM1-независимым путем.

Таким образом, для получения холерного токсина и везикул были отобраны штаммы – представители «предгаитянской», «гаитянской» и «постгаитянской» групп вибрионов Эль Тор, отличающиеся повышенной токсинопродукцией. Обеззараженные супернатанты исследуемых штаммов служили источником выделения этих препаратов. Электрофоретическое разделение везикул и иммуноблоттинг с помощью специфических антитоксических антител позволили выявить наличие в их составе холерного токсина, а именно на уровне 24–26 кДа обнаружена полоса, соответствующая субъединице А, другая полоса в районе 10–12 кДа соответствует субъединице В.

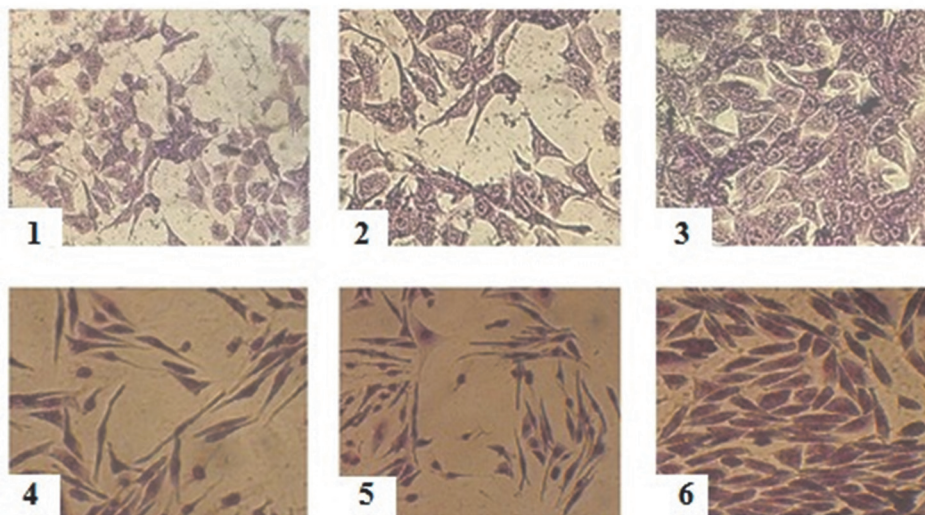


Рис. 4. Морфологические изменения культуры клеток CHO-K1 и HuTu 80 при действии препаратов токсинсодержащих везикул (увеличение 10×15, окраска по Романовскому – Гимзе):

1 – действие везикул на культуру клеток HuTu 80; 2 – действие ХТ на культуру клеток HuTu 80; 3 – культура клеток HuTu 80 (контроль); 4 – действие везикул на культуру клеток CHO-K1; 5 – действие ХТ на культуру клеток CHO-K1; 6 – культура клеток CHO-K1 (контроль)

Fig. 4. Morphological changes in CHO-K1 and HuTu 80 cell culture under the effect of toxin-containing vesicle preparations (Magnification 10×15, Romanovsky – Giemsa staining):

1 – effect of vesicles on HuTu 80 cell culture; 2 – effect of CT on HuTu 80 cell culture; 3 – HuTu 80 cell culture (control); 4 – effect of vesicles on CHO-K1 cell culture; 5 – effect of CT on CHO-K1 cell culture; 6 – CHO-K1 cell culture (control)

С помощью различных методов, включая GM1-ИФА, непрямого неконкурентного ИФА, модель культуры клеток СНО-K1 и NuTu 80, удалось определить местоположение холерного токсина в структуре везикул типичного и геновариантов вибрионов Эль Тор. Установлено, что везикулоассоциированный ХТ, в отличие от секретируемого, не связывается с рецептором GM1 ганглиозидов, сорбированных на пластике и расположенных на клеточных культурах, что является показателем его отсутствия на внешней поверхности и возможности внутренней локализации. Подтверждением расположения ХТ внутри везикул у типичного и штаммов геновариантов вибрионов Эль Тор является положительная реакция с антитоксическими антителами после разрушения везикул, поэтому вполне вероятно, что он проникает в клетки-мишени GM1-независимым путем, реализуя иные механизмы взаимодействия с рецепторами организма хозяина. Как известно, транспорт ХТ – основного фактора вирулентности холерного вибриона осуществляется через Sec-зависимую систему секреции 2-го типа. Передача в энтероциты свободного ХТ, а также локализованного на внешней поверхности везикул, может происходить в основном по GM1-зависимому пути через богатые холестерином липидные рафты [19]. По мнению ряда авторов, вполне возможно проникновение в эпителиальные клетки токсинов, связанных с везикулами, другими альтернативными путями: клатриновым или кавеолиновым [20, 21]. В то же время не исключено, что везикулы имеют специфические сайты узнавания эндоцитарных путей и способны использовать их для доставки своих грузов. Данные литературы [22, 23] свидетельствуют о сложности взаимодействия токсинсодержащих везикул с клетками-мишенями. Безусловно, решение этой проблемы связано с получением новых сведений, и поэтому необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Савельева И.В., Куличенко А.Н., Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Таран Т.В., Подопригора Е.И., Васильева О.В., Шапаков Н.А. Холера Эль-Тор на современном этапе седьмой пандемии: эволюция возбудителя, клинико-эпидемиологические особенности, лабораторная диагностика. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(5):917–26. DOI: 10.15789/2220-7619-ETC-1476.
2. Dutta S., Iida K., Takade A., Meno Y., Nair G.B., Yoshida S. Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and *in vitro* effects of antimicrobials on toxin production and release. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(12):965–9. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03626.x.
3. Rueter C., Bielaszewska M. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10:91. DOI: 10.3389/fcimb.2020.0009106.
4. Parker H., Chitcholtan K., Hampton M.B., Keenan J.I. Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 2010; 78(12):5054–61. DOI: 10.1128/IAI.00299-10.

5. Caruana J.C., Walper S.A. Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe – microbe and microbe – host community interactions. *Front. Microbiol.* 2020; 11:432. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00432.

6. Bitar A., Aung K.M., Wai S.N., Hammarström M.-L. *Vibrio cholerae* derived outer membrane vesicles modulate the inflammatory response of human intestinal epithelial cells by inducing microRNA-146a. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7212. DOI: 10.1038/s41598-019-43691-9.

7. Rasti E.S., Schappert M.L., Brown A.C. Association of *Vibrio cholerae* 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in GM1-independent manner. *Cell. Microbiol.* 2018; 20(6):e12828. DOI: 10.1111/cmi.12828.

8. Rasti E.S., Brown A.C. Cholera toxin encapsulated within several *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba outer membrane vesicles lacks a functional B-subunit. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(4):207. DOI: 10.3390/toxins11040207.

9. Iwanaga M., Kuyyakanond T. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(12):2314–6. DOI: 10.1128/jcm.25.12.2314-2316.1987.

10. Jang H., Kim H.S., Kim J.A., Seo J.H., Carbis R. Improved purification process for cholera toxin and its application to the quantification of residual toxin in cholera vaccines. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(1):108–12.

11. Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Винокурова Н.Г., Шишкова Н.А., Васильева Н.В. Изучение факторов биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1. *Биохимия*. 2017; 82(4):677–86.

12. Sack D.A., Huda S., Neogi P.K., Daniel R.R., Spira W.M. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxins. *J. Clin. Microbiol.* 1980; 11(1):35–45. DOI: 10.1128/jcm.11.1.35-40.1980.

13. Алексеева Л.П., Якушева О.А., Зюзина В.П., Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В. Современные методические приемы очистки холерного токсина. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2019; 15(1):5–9.

14. Фрешин Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. М.: Лаборатория знаний; 2018. 691 с.

15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

16. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot-immunoblotting – current status and outlook. *J. Immunol. Methods*. 1984; 72(2):313–40. DOI: 10.1016/0022-1759(84)90001-2.

17. Klimentová J., Stulík J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiol. Res.* 2015; 170:1–9. DOI: 10.1016/j.micres.2014.09.006.

18. Заднова С.П., Крицкий А.А., Плеханов Н.А., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ адаптационных свойств типичных генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 2:25–30. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-25-30.

19. Chinnapen D.J.-F., Chinnapen H., Saslowsky D., Lencer W.I. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; 266(2):129–37. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00545.x.

20. Rewatkar P.V., Parton R.G., Parekh H.S., Parat M.-O. Are caveolae a cellular entry route for non-viral therapeutic delivery systems? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015; 91:92–108. DOI: 10.1016/j.addr.2015.01.003.

21. El-Sayed A., Harashima H. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol. Ther.* 2013; 21(6):1118–30. DOI: 10.1038/mt.2013.54.

22. O'Donoghue E.J., Krachler A.M. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell. Microbiol.* 2016; 18(11):1508–17. DOI: 10.1111/cmi.12655.

23. Zingl F.G., Thapa H.B., Scharf M., Kohl P., Müller A.M., Schild S. Outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* protect and deliver active cholera toxin to host cells via porin-dependent uptake. *mBio*. 2021; 12(3):e0053421. DOI: 10.1128/mBio.00534-21.

References

1. Savelieva I.V., Kulichenko A.N., Saveliev V.N., Kovalev D.A., Taran T.V., Podopriгора E.I., Vasileva O.V., Shpakov N.A. [El Tor cholera at the contemporary stage of the seventh pandemic: pathogen evolution, clinical and epidemiological features, laboratory diagnostics]. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2021; 11(5):917–26. DOI: 10.15789/2220-7619-ETC-1476.
2. Dutta S., Iida K., Takade A., Meno Y., Nair G.B., Yoshida S. Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and *in vitro* effects of antimicrobials on toxin production and release. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(12):965–9. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03626.x.

3. Rueter C., Bielaszewska M. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10:91. DOI: 10.3389/fcimb.2020.0009106.
4. Parker H., Chitcholtan K., Hampton M.B., Keenan J.I. Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 2010; 78(12):5054–61. DOI: 10.1128/IAI.00299-10.
5. Caruana J.C., Walper S.A. Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe – microbe and microbe – host community interactions. *Front. Microbiol.* 2020; 11:432. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00432.
6. Bitar A., Aung K.M., Wai S.N., Hammarström M.-L. *Vibrio cholerae* derived outer membrane vesicles modulate the inflammatory response of human intestinal epithelial cells by inducing microRNA-146a. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7212. DOI: 10.1038/s41598-019-43691-9.
7. Rasti E.S., Schappert M.L., Brown A.C. Association of *Vibrio cholerae* 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in GM1-independent manner. *Cell. Microbiol.* 2018; 20(6):e12828. DOI: 10.1111/cmi.12828.
8. Rasti E.S., Brown A.C. Cholera toxin encapsulated within several *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba outer membrane vesicles lacks a functional B-subunit. *Toxins (Basel).* 2019; 11(4):207. DOI: 10.3390/toxins11040207.
9. Iwanaga M., Kuyyakanond T. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(12):2314–6. DOI: 10.1128/jcm.25.12.2314-2316.1987.
10. Jang H., Kim H.S., Kim J.A., Seo J.H., Carbis R. Improved purification process for cholera toxin and its application to the quantification of residual toxin in cholera vaccines. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(1):108–12.
11. Kudryakova I.V., Suzina N.E., Vinokurova N.G., Shishkova N.A., Vasil'eva N.V. [The study of factors of vesicle biogenesis *Lysobacter* sp. XL1]. *Biokhimiya [Biochemistry]*. 2017; 82(4): 677–86.
12. Sack D.A., Huda S., Neogi P.K., Daniel R.R., Spira W.M. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxins. *J. Clin. Microbiol.* 1980; 11(1):35–45. DOI: 10.1128/jcm.11.1.35-40.1980.
13. Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Zyuzina V.P., Duvanova O.V., Shipko E.S., Pisanov R.V. [Modern methodological techniques for cholera toxin purification]. *[Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2019; 15(1):5–9.
14. Freshni R.Ya. [Animal Cell Culture. Practice Guidelines]. Moscow: “Knowledge Laboratory”; 2018. 691 p.
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
16. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot-immunoblotting – current status and outlook. *J. Immunol. Methods.* 1984; 72(2):313–40. DOI: 10.1016/0022-1759(84)90001-2.
17. Klimentová J., Stulík J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiol. Res.* 2015; 170:1–9. DOI: 10.1016/j.micres.2014.09.006.
18. Zadnova S.P., Kritsky A.A., Plekhanov N.A., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I. [Comparative analysis of the adaptive properties of typical genetically altered strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2019; (2):25–30. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-25-30.
19. Chinnapen D.J.-F., Chinnapen H., Saslowsky D., Lencer W.I. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; 266(2):129–37. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00545.x.
20. Rewatkar P.V., Parton R.G., Parekh H.S., Parat M.-O. Are caveolae a cellular entry route for non-viral therapeutic delivery systems? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015; 91:92–108. DOI: 10.1016/j.addr.2015.01.003.
21. El-Sayed A., Harashima H. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol. Ther.* 2013; 21(6):1118–30. DOI: 10.1038/mt.2013.54.
22. O'Donoghue E.J., Krachler A.M. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell. Microbiol.* 2016; 18(11):1508–17. DOI: 10.1111/cmi.12655.
23. Zingl F.G., Thapa H.B., Scharf M., Kohl P., Müller A.M., Schild S. Outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* protect and deliver active cholera toxin to host cells via porin-dependent uptake. *mBio.* 2021; 12(3):e0053421. DOI: 10.1128/mBio.00534-21.

Authors:

Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Evdokimova V.V., Meloyan M.G., Zyuzina V.P. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40 M. Gorkogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Алексева Л.П., Якушева О.А., Евдокимова В.В., Мелоян М.Г., Зюзина В.П. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.