

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-70-77

УДК 616.932:579

О.В. Дуванова, Е.С. Шипко, Р.В. Писанов, О.А. Цырулина, О.С. Чемисова, В.В. Евдокимова, А.С. Водопьянов, В.Д. Кругликов, И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, А.В. Филипенко, **А.К. Носков**

Композиционный состав везикул атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor и O139 серогрупп

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

Цель работы – изучение композиционного состава препаратов везикул (OMV) у штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor (*ctxAB-tcpA⁺*; *ctxAB-tcpA⁺*) и O139 (*ctxAB-tcpA⁻*) серогрупп, выделенных из различных источников. **Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, из которых были получены препараты OMV. Методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) изучали строение препаратов OMV. Полногеномное секвенирование ДНК проводили на платформе MiSeq. Нуклеотидные и соответствующие аминокислотные последовательности генов изучали с помощью биоинформационного анализа. Белковое профилирование проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Ферментативные активности детектировали с использованием соответствующих сред и субстратов. Определение (поверхностных детерминант) липополисахарида (ЛПС) и белков наружной мембраны в составе OMV осуществляли методом иммуноферментного анализа. Анализ спектра жирных кислот (ЖК) проводили методом газожидкостной хроматографии масс-спектрометрии. **Результаты и обсуждение.** Получены препараты OMV из атоксигенных штаммов холерных вибрионов. ТЭМ выявлено, что OMV представлены структурами сферической формы около 40–200 нм. По данным полногеномного секвенирования установлено, что в составе OMV обнаружены фрагменты хромосом, содержащие гены штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, из которых они выделены. Проведенный биоинформационный анализ выявил отличия в структуре гена *ompT* у исходных штаммов и у OMV, полученных из штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139. Ген *ΔompT* препарата OMV *V. cholerae* O139-серогруппы был трунктирован и образовывал пептид в 17 аминокислотных остатков (-LENHHQKNREPDKEFPY-). Анализ композиционного состава OMV выявил наличие в их составе ферментов (N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы и ДНК-азы), белков наружных мембран (OmpT и OmpU), ЛПС, насыщенных, *cis/trans*-изомеров ненасыщенных ЖК и разветвленных ЖК. Обнаружены различия в композиционном составе OMV, полученных из атоксигенных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139.

Ключевые слова: холерный вибрион, композиционный состав везикул (OMV), ЛПС, OmpT, OmpU.

Корреспондирующий автор: Дуванова Ольга Викторовна, e-mail: olga_duvanova@mail.ru.

Для цитирования: Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В., Цырулина О.А., Чемисова О.С., Евдокимова В.В., Водопьянов А.С., Кругликов В.Д., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филипенко А.В., Носков А.К. Композиционный состав везикул атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor и O139 серогрупп. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 4:70–77. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-70-77

Поступила 06.02.2024. Отправлена на доработку 13.02.2024. Принята к публ. 19.02.2024.

O.V. Duvanova, E.S. Shipko, R.V. Pisanov, O.A. Tsyurulina, O.S. Chemisova, V.V. Evdokimova, A.S. Vodop'yanov, V.D. Kruglikov, I.A. Ivanova, N.D. Omel'chenko, A.V. Filipenko, **A.K. Noskov**

The Composition of Vesicles of Non-Toxicogenic *Vibrio cholerae* Strains, O1 El Tor and O139 Serogroups

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

Abstract. The aim of the work was to study the composition of vesicle preparations (OMV) in *Vibrio cholerae* strains O1 El Tor (*ctxAB-tcpA⁺*; *ctxAB-tcpA⁺*) and O139 (*ctxAB-tcpA⁻*) isolated from various sources. **Materials and methods.** *V. cholerae* strains O1 and O139 serogroups were used in the work, from which OMV preparations were obtained. The structure of OMV preparations was studied by transmission electron microscopy (TEM). Genome-wide DNA sequencing was performed on the MiSeq platform. The nucleotide and corresponding amino acid sequences of the genes were studied using bioinformatics analysis. Protein profiling was conducted using MALDI-TOF mass spectrometry. Enzymatic activities were detected using appropriate media and substrates. Determination of (surface determinants) lipopolysaccharide (LPS) and outer membrane proteins in the composition of OMV was carried out by enzyme immunoassay (ELISA). The analysis of the spectrum of fatty acids was performed by gas-liquid chromatography mass spectrometry. **Results and discussion.** OMV preparations have been obtained from non-toxicogenic strains of cholera vibrios. TEM has revealed that OMVs are represented by spherical structures of about 40–200 nm. Genome-wide sequencing has shown that fragments of chromosomes containing genes of *V. cholerae* strains, O1 and O139 serogroups, from which they were isolated are present in the OMV. The bioinformatic analysis revealed differences in the structure of the *ompT* gene in the initial strains and in OMV obtained from *V. cholerae* strains O1 and O139 serogroups. The *ΔompT* gene of the OMV preparation from *V. cholerae* O139 serogroup was truncated and formed a peptide of 17 amino acid residues (-LENHHQKNREPDKEFPY-). Analysis of the OMV composition has revealed the presence of enzymes (N-acetyl-β-D-glucosaminidase and DNA-ases), proteins of outer membranes (*ompT* and *OmpU*), LPS, saturated, *cis/trans* isomers of unsaturated fatty acids and branched fatty acids. Differences in the composition of OMV obtained from non-toxicogenic strains of *V. cholerae* O1 and O139 serogroups have been identified.

Key words: cholerae vibrio, vesicle composition (OMV), LPS, OmpT, OmpU.

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

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

Corresponding author: Olga V. Duvanova, e-mail: olga_duvanova@mail.ru.

Citation: Duvanova O.V., Shipko E.S., Pisanov R.V., Tsyulina O.A., Chemisova O.S., Evdokimova V.V., Vodop'yanov A.S., Kruglikov V.D., Ivanova I.A., Omel'chenko N.D., Filipenko A.V., Noskov A.K. The Composition of Vesicles of Non-Toxicogenic *Vibrio cholerae* Strains, O1 El Tor and O139 Serogroups. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 4:70–77. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-70-77
Received 06.02.2024. Revised 13.02.2024. Accepted 19.02.2024.

Duvanova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1702-1620>
Shipko E.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8517-2789>
Pisanov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>
Tsyulina O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6176-2605>
Chemisova O.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4059-2878>
Evdokimova V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>

Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>
Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>
Ivanova I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7068-4071>
Omel'chenko N.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5208-7724>
Filipenko A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1103-4244>
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Способность к секреции мембранных везикул (outer membrane vesicles – OMV) является универсальным процессом, присущим всем микроорганизмам, включая холерный вибрион. С момента первого обнаружения OMV у прокариотических микроорганизмов в 60-х гг. прошлого века до настоящего времени интерес к их биогенезу, составу и свойствам возрастает в связи с появлением новых данных, доказывающих их роль в физиологии, адаптации/персистенции, пато- и иммуногенезе [1–3].

Микроорганизмы используют везикулы как медиаторы для реализации стратегии межклеточных коммуникаций, репрограммирования клеток-мишеней после интернализации [4], горизонтального переноса генов, экспортирования агрегированных белков и других компонентов клетки [5, 6], в образовании и функционировании биопленок, реализации ответных реакций клеток на стресс [7], а также для формирования устойчивости к антимикробным препаратам/пептидам (AMP) [8]. Представляя важнейшую часть бактериального секрета, везикулы вовлечены в универсальный способ секреции у прокариот [9]. Помимо мембранных компонентов, OMV могут содержать и экспортировать различные везикуло-ассоциированные токсины в концентрированной и при этом защищенной от протеаз и агрессивной среды форме, а также липополисахарид (ЛПС) и различные антигены.

В настоящее время проведены протеомный, метаболомный и липидомный анализы OMV, полученных из некоторых микроорганизмов. По данным протеомного профилирования препаратов OMV, полученных из различных микроорганизмов, везикулы характеризуются определенным набором белков, количество которых для разных бактериальных видов составляет от 100 до 400 и более [10, 11], включая белки, относящиеся к семейству ompтинов (OmpT, OmpU, OmpA, OmpC, OmpF и др.), а также белки, ответственные за сигналинг и клеточный транспорт (NmpC, OmpX, LppA, LppB, Pal, TolB и др.) [12].

В составе препаратов OMV микроорганизмов обнаружены ферменты различных классов: гидролазы, изомеразы, лиазы, оксидоредуктазы, трансферазы, а также патоген-ассоциированные молекулы (РАМРs), влияющие на течение инфекционного процесса, метаболиты и нуклеиновые кислоты [13]. Липидомный анализ выявил в составе OMV такие

классы соединений, как фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, кардиолипин, диацилглицерин и др.

Биологическая роль OMV разнообразна и зависит от их композиционного состава, определяемого уникальным механизмом их сортировки, зависящим от различных факторов. В настоящее время активно изучается композиционный состав препаратов OMV у многих бактерий, включая препараты OMV, полученные из токсигенных штаммов холерных вибрионов [14], в то время как отсутствуют данные по изучению композиционного состава препаратов OMV, полученных из атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* серогрупп O1 и O139.

Целью исследования явилось изучение композиционного состава препаратов OMV, полученных из штаммов *V. cholerae* O1 El Tor (*ctxAB-tcpA*⁺; *ctxAB-tcpA*⁻) и O139 (*ctxAB-tcpA*⁻), выделенных из различных источников.

Материалы и методы

В работе использовали следующие штаммы: *V. cholerae* O1 El Tor биовара № 18950 (*ctxAB-tcpA*⁻), выделенный из реки Подкумок; 18780 (*ctxAB-tcpA*⁺), выделенный из клинического материала, и *V. cholerae* O139-серогруппы 17786 (*ctxAB-tcpA*⁻), выделенный из устья реки Иня. Культуры микроорганизмов получали из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, где их хранили в лиофилизированном состоянии. Для культивирования холерных вибрионов использовали агар Мартена (рН 7,6).

Препараты OMV возбудителя холеры получали по методу [14]. Для этого из суточной агаровой культуры делали 1 млрд взвесь в 3 мл физиологического раствора (рН 7,8) и 0,5 мл взвеси засеивали 25 мл бульона LB. Штаммы культивировали с дополнительной аэрацией (шуттелированием) 120–130 качаний в минуту на шуттеле (Incubatorshaker, serious 25, США) 18 ч при 37 °С. Из выросшей культуры засеивали по 0,5 мл в четыре флакона среды LB по 250 мл и выращивали 18 ч с аэрацией.

Обеззараженную мертиолятом натрия (1:10000) культуру центрифугировали при 6000 об/мин 25 мин на холоде в центрифуге (Bekman model J2-21, США).

Супернатант фильтровали через мембраны с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм и концентрировали в 10 раз в ультрафильтрационной установке (Amicon). Везикулы осаждали ультрацентрифугированием образцов в течение 2 ч в центрифуге (Bekman Coulter Avanti JXN-30), тип ротора JA-30.50 (108000 g и при 45000 g). Готовые препараты OMV хранили при минус 20 °С.

Детекцию белка в препаратах OMV проводили на спектрофотометре (SmartSpec 3000 UV/Vis, BioRad, США) согласно инструкции.

Методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) с помощью электронного цифрового микроскопа Jeol JEM 1011 изучали ультратонкое строение препаратов OMV. Исследуемые образцы OMV окрашивали методом негативного контрастирования. Обеззараженные препараты наносили на сетки с пленкой-подложкой из формвара (0,5 %) и инкубировали 2 мин с 2 % раствором уранилацетата. Приготовленные образцы изучали в электронном микроскопе с увеличением в 100–250 тыс. раз.

ДНК препаратов OMV выделяли с помощью коммерческого набора «Рибо-Преп» («АмплиСенс», Россия) согласно прилагаемой инструкции. Полногеномное секвенирование ДНК препаратов OMV проводили на платформе MiSeq (Illumina) с использованием набора NexteraDNAflex, картридж на 500 циклов. Качество ридов проверяли с помощью программы FastQC [15]. Для очистки ридов использовали программу для фильтрации данных Trimmomatic [16], сборка осуществлялась *de novo* программой-сборщиком SPAdes (v3.11.1). Анализ полученных данных ДНК проводили с помощью программы SeqAnalayser [17]. Нуклеотидную и соответствующую аминокислотную последовательности генов *ompT*, *ompU* в препаратах OMV изучали с помощью биоинформационного анализа.

Белковое профилирование препаратов OMV проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе Autoflexspeed III BrukerDaltonics (Германия) с программным обеспечением: FlexControl – программа для управления время-пролетными масс-спектрометрами серии flex компании Bruker; Flex Analysis 3.3 – программа для ручного анализа полученных масс-спектров (визуальное сопоставление, оценка качества масс-спектров, калибровка); Biopyper 3.1 – программа для обработки и анализа масс-спектров, полученных на масс-спектрометрах фирмы Bruker для анализа общего индекса корреляции спектров, кластерного анализа спектров. Снятие белковых спектров проводили в программе FlexControl в диапазоне 2000–20000 *m/z*, а их обработку – в программе Flex Analysis. В качестве матрицы использовали α -циано-гидроксикоричную кислоту. Экстракцию проводили этанолом/муравьиной кислотой.

Способность штаммов и полученных из них препаратов OMV расщеплять Твин-20, -40, -60, -80 выявляли на сконструированной среде [18].

Алкилсульфатазную активность (гидролиз SDS) изучали на сконструированной минимальной синтетической среде [19]. ДНК-азную активность определяли с использованием ДНК-азного тест-агара (согласно инструкции). Активность N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы определяли у штаммов и препаратов OMV с использованием флуорогенного субстрата 4-метилумбеллиферил-N-ацетил- β -D-глюкозаминида (4-MUFglcNAc) (Sigma) качественным способом [20].

ЛПС в составе препаратов OMV выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Постановку прямого варианта ИФА (для определения O-антигена) осуществляли в 96-луночных плоскодонных серологических планшетах (Costar) [21].

Содержание в препаратах OMV поверхностных антигенных детерминант (белков OmpT, OmpU) определяли ИФА (непрямой вариант) с использованием моноклональных антител (МКА) в полистироловых планшетах [22].

Анализ спектра жирных кислот (ЖК) препаратов OMV и липидома исходных клеток *V. cholerae* проводили в 30-метровой капиллярной колонке Rtx-5MS методом газожидкостной хроматографии масс-спектрометрии (ГХ/МС) на приборе «Маэстро-2» («Интерлаб», Россия), созданном на базе Agilent. В качестве газа-носителя использовали высокоочищенный водород (99,9999 %), полученный из генератора «Цвет.Хром-8». Разделение газовой смеси дериватов проводили по программе 125÷280 °С с ростом 5,1 °С в минуту при средней скорости потока газа-носителя 1,3 мл/мин и давлении 6 psi. Анализ полученных спектров и идентификацию ЖК проводили с помощью встроенного ПО Enhanced ChemStation, коммерческой базы данных NIST2017 [23]. Индекс ненасыщенности фосфолипидов определяли по соотношению ненасыщенных и насыщенных ЖК (ННЖК/НЖК).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью общепринятых методов статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Office 2010). Все приведенные данные являются средними значениями из трех экспериментов. Расчет среднего значения и стандартного отклонения проводили с помощью параметрических статистических методов. Доверительный интервал установили на уровне 95 % ($P \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

В результате исследования получены препараты OMV, проведен анализ их композиционного состава у атоксигенных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 (*ctxAB-tcpA*; *ctxAB-tcpA*⁺) и O139 (*ctxAB-tcpA*⁻). Подобраны условия и отработаны методические подходы, позволяющие получить препараты OMV.

С помощью ТЭМ выявлено, что полученные препараты OMV представлены структурами сферической формы и размером около 40–200 нм, что со-

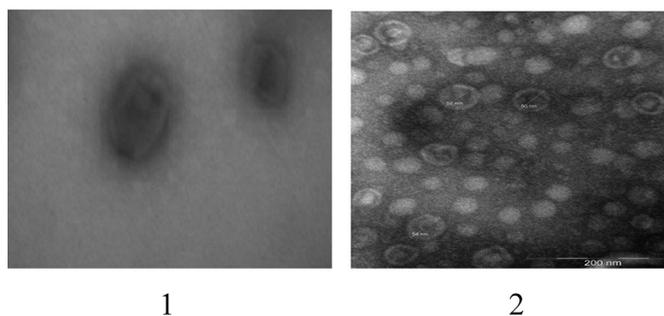


Рис. 1. Препараты OMV, полученные с помощью ТЭМ:
 1 – из штамма *V. cholerae* № 18950 (*ctxAB tcpA*) (увеличение 1:100000);
 2 – из штамма *V. cholerae* O139 № 17786 (*ctxAB tcpA*) (увеличение 1:250000)

Fig. 1. OMV preparations obtained using TEM:
 1 – from *V. cholerae* strain No. 18950 (*ctxAB tcpA*) (magnification 1:100000);
 2 – from *V. cholerae* strain O139 No. 17786 (*ctxAB tcpA*) (magnification 1:250000)

ответствует данным литературы [14] (рис. 1). Размер OMV, полученных из штаммов *V. cholerae* O1-серогруппы (№ 18950, 18780), составил 80–200 нм, а из штамма *V. cholerae* O139 № 17786 – 40–80 нм.

По результатам полногеномного секвенирования впервые установлено, что в составе препаратов OMV из атоксигенных штаммов холерных вибрионов обнаружены фрагменты хромосом *V. cholerae* O1, на которых присутствовали следующие гены: *wbe*, определяющий принадлежность к O1-серогруппе, *ompT*, *ompU* и *ompW*, кодирующие белки наружной мембраны, *hlyA* гемолизина типа ЭльТор, *hapA* (гемагглютинин/протеазы), PrtV протеазы, *cef* (CHO cell elongating factor), *nanH* (нейраминидазы), *chiA1*, *chiA2* (хитиназы), N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, фосфатазы, *toxR* и *toxS* (регуляторные), кластер *RTX*, кластер *MSHA*, кластер генов систем секреции 3-го (Т3SS) и 6-го (Т6SS) типов, *tolA*, *tolR*, *tolQ*. Гены VPI-1, *toxT* и *tcpA* выявлены только в препарате OMV с генотипом *ctxAB tcpA*⁺. В препарате OMV *V. cholerae* O139-серогруппы с генотипом (*ctxAB tcpA*) обнаружены фрагменты хромосом, на которых присутствовали гены *wbFO139*, *hlyA*, *ΔompT*, *ompU* и *ompW*, *nanH*, N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, фосфатазы, кластер генов системы секреции 6-го типа (Т6SS), *tolA*, *tolR*, *TolQ*, а также полная последовательность ICE-элемента. Выявленный ICE-элемент относится к «гаитянскому типу», обнаруженному у *V. cholerae* серогрупп nonO1/nonO139. Данный ICE-элемент «гаитянского» типа отличается от ранее описанных ICE-элементов *V. cholerae*, включая «индийский», «mozambikский» и SXT. Данные гены содержались в хромосомах исходных штаммов *V. cholerae* O1 и O139.

Учитывая тот факт, что с помощью системы секреции Т6SS холерный вибрион способен поражать амёб, нематод, инфузорий, бактерии, принадлежащие к разным видам, ее присутствие как в исследуемых штаммах, так и в препаратах OMV холерных вибрионов серогрупп O1 и O139 не исключает важную роль этой системы в выживании атоксигенных

штаммов холерных вибрионов в составе везикулярной формы в сложных экологических сообществах за счет участия в механизмах адаптации/персистенции *V. cholerae* во внешней среде [24]. Ген холодового шока (*csh1*) [25], обнаруженный в составе препарата OMV штамма *V. cholerae* O1 № 18950, не исключает участие продукта этого гена в механизме адаптации/персистенции. Обнаружено сходство и отличие представленности некоторых генов в препаратах OMV, полученных из атоксигенных штаммов холерных вибрионов серогрупп O1 и O139, по данным полногеномного секвенирования.

Проведенный биоинформационный анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей генов *ompT* и *ompU* в исходных штаммах и полученных из них препаратов OMV выявил совпадение анализируемых нуклеотидных последовательностей гена *ompT* исходных штаммов *V. cholerae* O1 № 18950, 18780 и препаратов OMV на 99,73 и 99,75 %, а соответствующих им аминокислотных последовательностей – на 99,73 и 100 % соответственно. В то же время ген *ΔompT* штамма *V. cholerae* O139-серогруппы и препарата OMV был трюнкирован и отличался от гена представителей холерных вибрионов O1-серогруппы. Процент совпадения нуклеотидной и соответствующей аминокислотной последовательности оказался ниже (соответствие ДНК – 71 %, аминокислотной последовательности – 52,3 %), а образованный пептид в 17 аминокислотных остатков (-LENHHQKNREPDKEFPU-) не смог бы сформировать полноценный белковый продукт и участвовать в выполнении некоторых функций. Отличий в структуре гена *ompU* в исходных штаммах и препаратах OMV не выявлено. Таким образом, препараты OMV содержали ДНК генов, аналогичные штаммам *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, из которых они получены. Выявленная представленность ДНК генов в составе препаратов OMV наделяет их способностью осуществлять полноценный «везикулярный трафик» содержимого клетки, возможно, способствуя реализации механизмов адаптации/персистенции атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 и O139.

Известно, что типичные для рода *Vibrio* масс-спектры пептидов детектируются с наибольшей интенсивностью в области масс 2–11 кДа. Протеомное профилирование препаратов OMV *V. cholerae* O1 и O139 выявило наличие масс-пиков в диапазоне 2000–4000 Да и специфических пиков со значением m/z: у OMV из штаммов *V. cholerae* O1 № 18950 – (2275±3), (2474±4), (2635±3), (2780±3), (3018±3), (3031±2), (3046±2), (3074±2), (3121±3) (рис. 2); у OMV из *V. cholerae* O1 № 18780 – (2108±2), (2208±3), (2360±4), (2473±3), (2573±3), (2761±3), (3031±3), (3054±3), (3064±4), (3087±3) (рис. 3); у OMV из *V. cholerae* O139 № 17786 – (2107±4), (2206±4), (2360±4), (2590±4), (2761±3), (2763±3), (2941±3), (3015±3), (3029±3), (3067±4), (3088±3) (рис. 4).

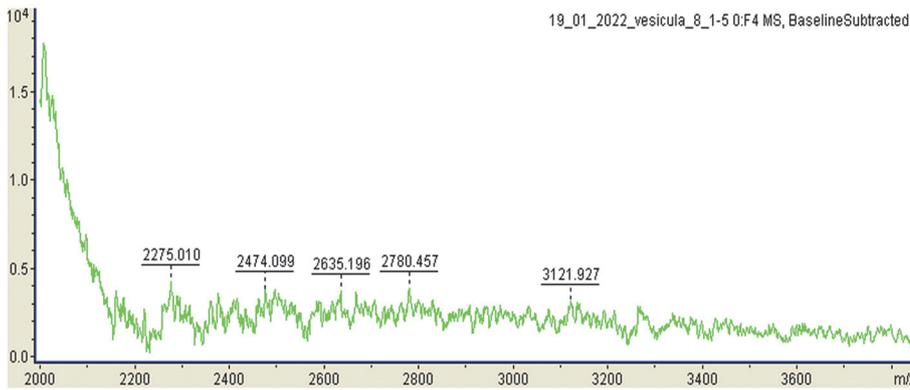


Рис. 2. Анализ масс-спектров препарата OMV из штамма *V. cholerae* O1 № 18950 (*ctxAB tcpA*⁺)

Fig. 2. Analysis of the mass-spectra of the OMV preparation from the *V. cholerae* strain O1 No. 18950 (*ctxAB tcpA*⁺)

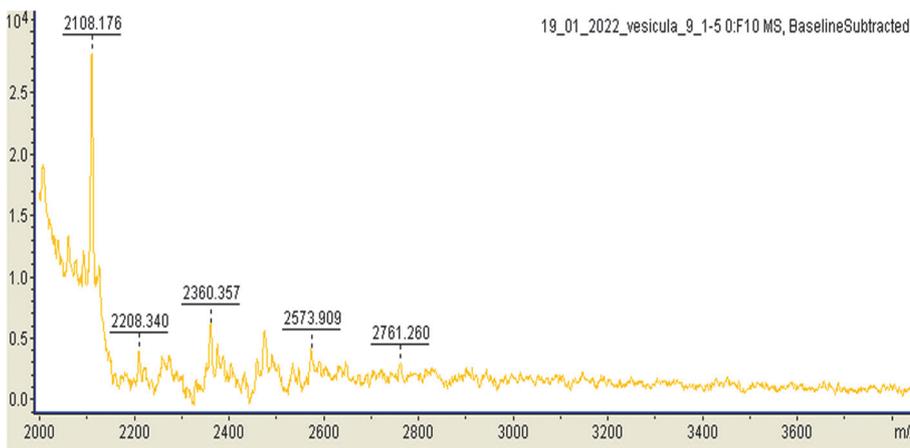


Рис. 3. Анализ масс-спектров препарата OMV из штамма *V. cholerae* O1 № 18780 (*ctxAB tcpA*⁺)

Fig. 3. Analysis of the mass-spectra of OMV preparations from *V. cholerae* O1 No. 18780 (*ctxAB tcpA*⁺)

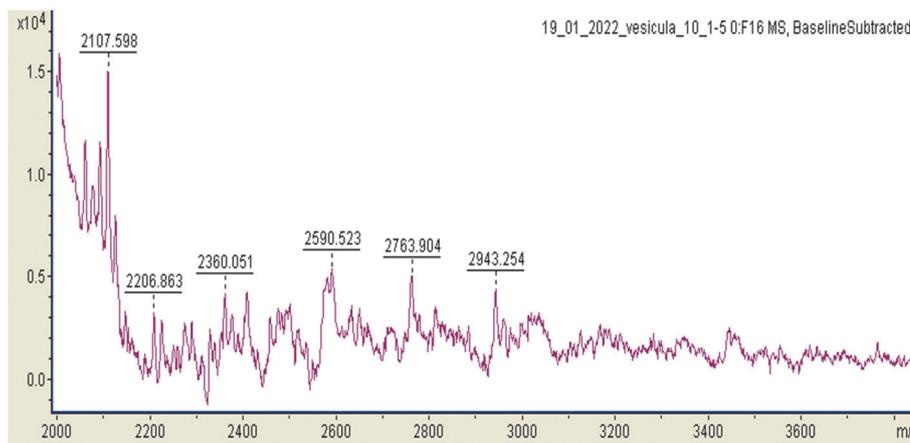


Рис. 4. Анализ масс-спектров препарата OMV из штамма *V. cholerae* O139 № 17786 (*ctxAB tcpA*⁺)

Fig. 4. Analysis of the mass-spectra of OMV preparation from *V. cholerae* strain O139 No. 17786 (*ctxAB tcpA*⁺)

Следует отметить, что у препаратов OMV *V. cholerae* O1-серогруппы выявлены общие специфические спектральные масс-пики: (2474±4), (3031±3). При этом спектральные масс-пики (2107±4), (2206±4), (2360±4), (2761±3), (3018±3), (3031±3), (3064±4), (3087±3) являются общими для везикул, полученных из штаммов как O1-, так и O139-серогруппы. Сходство между масс-спектрами в препаратах OMV, полученных из холерных вибрионов разных серогрупп, изучено путем построения корреляционной матрицы в программе Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics) (рис. 5) на основе компьютерного индекса корреляции (CCI). Значения CCI, близкие к 1, свидетельствуют о высокой степени сходства спектров, а значения

ближе к 0 – о четких различиях. В матрице цвет ячеек соответствует значению CCI (1,0 – коричневый, далее по мере уменьшения – бирюзовый, зеленый, синий).

Как видно на корреляционной матрице, композитный индекс корреляции у всех трех препаратов OMV из штаммов *V. cholerae* O1 (№ 18950, 18780) и O139 (№ 17786) составил от 0,24 до 0,6. Диапазон CCI от 0,57 до 0,6 свидетельствует о сходстве масс-спектров всех этих препаратов, а CCI от 0,24 до 0,57 – о наличии различий. Следует отметить, что белковые масс-спектрометрические профили исходных штаммов и препаратов OMV холерных вибрионов серогрупп O1, O139 отличались и содержали спектральные масс-пики белков в диапазоне (3578±2) –

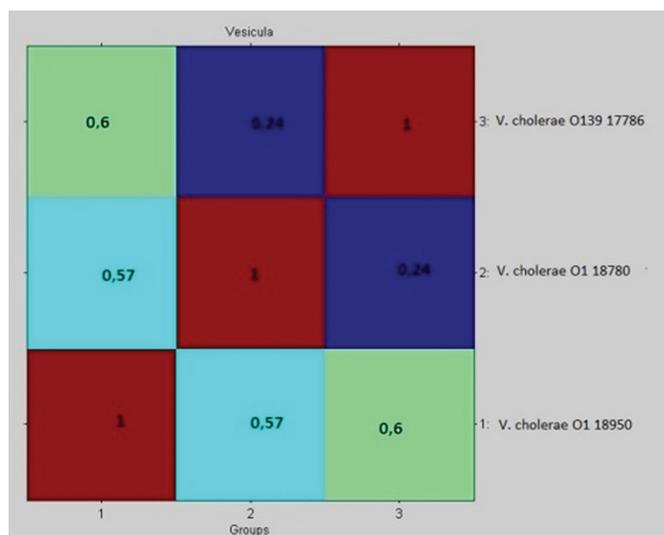


Рис. 5. Корреляционная матрица и композитный индекс корреляции масс-спектров препаратов OMV из штаммов *V. cholerae* O1 № 18950 (*ctxAB tcpA*⁻), № 18780 (*ctxAB tcpA*⁺) и O139 № 17786 (*ctxAB tcpA*). Цифрами отмечены индексы корреляции препаратов

Fig. 5. Correlation matrix and composite index of mass-spectra correlation of OMV preparations from the strains *V. cholerae* O1 No. 18950 (*ctxAB tcpA*⁻), No. 18780 (*ctxAB tcpA*⁺) and O139 No. 17786 (*ctxAB tcpA*). The numbers indicate drug correlation indices

(10238±2). При этом в исходных штаммах детектировались общие спектральные масс-пики белков: (4273±4), (5121±4), (7156±4), которые не детектировались в препаратах OMV.

Установлено, что все исследуемые препараты OMV обладали N-ацетил-β-D-глюкозаминидазной активностью. Фермент, входящий в состав хитинолитического комплекса холерных вибрионов, участвует в расщеплении хитина – наиболее распространенного органического полимера в природе. Ранее определено, что очищенный фермент N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза из штамма *V. cholerae* O1 № 18950 обладал антибактериальным действием, подавляя в низких концентрациях рост ряда лабораторных штаммов *Escherichia coli* HB101, *E. coli* QD5003, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis* EV. Учитывая данные результаты, нельзя исключить, что наличие этого фермента в составе OMV холерных вибрионов наделяет их определенными конкурентными преимуществами, усиливая адаптационный/персистентный потенциал. Обнаружение в препаратах OMV этого фермента позволяет предположить его важную роль в составе OMV и требует проведения дальнейших исследований. Во всех препаратах OMV выявлена ДНК-азная активность. ДНК-аза (нуклеаза), расщепляя фосфодиэфирные связи в ДНК вблизи пиримидиновых нуклеотидов и образуя при этом полинуклеотиды с концевым-5'-фосфатом и свободной гидроксильной группой на 3'-конце ДНК, понижает вязкость окружающей среды. Нельзя исключить подобную роль этого фермента и в составе OMV холерного вибриона. У всех взятых в исследование препаратов не обнаружена способность гидролизовать Твин-20, -40, -60, -80.

Также не выявлена алкилсульфатазная активность – способность к гидролизу SDS. Таким образом, как в исходных штаммах *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, так и у всех изученных препаратов OMV присутствуют N-ацетил-β-D-глюкозаминидазная и ДНК-азная активности, вероятно, обеспечивающие вибрионам возможность адаптации к различным экологическим нишам и большую конкурентоспособность.

С помощью МКА методом ИФА выявлены в препаратах OMV некоторые поверхностные антигенные детерминанты: белки OmpT, OmpU и ЛПС. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что белок OmpU присутствовал только в препаратах OMV штамма холерных вибрионов *V. cholerae* O1 № 18780 (ОП, оптическая плотность – [1,431±0,015]) и *V. cholerae* O139 № 17786 (ОП – [0,579±0,012]). Следует отметить, что мембранный белок OmpU обнаружен не только в составе везикул, но и на мембранах исходных штаммов *V. cholerae* O1 № 18780 и *V. cholerae* O139 № 17786. В препарате OMV из штамма *V. cholerae* O1 № 18950 OmpU не детектировался. Мембранный белок OmpT выявлен только у препаратов OMV представителей *V. cholerae* O1-серогруппы и не детектировался в препарате OMV, полученном из штамма *V. cholerae* O139 № 17786. Показатель ОП в препарате OMV из штамма *V. cholerae* O1 № 18950 составил (1,447±0,015) и *V. cholerae* O1 № 18780 – (1,394±0,020).

Охарактеризованный ранее препарат OmpT белка из штамма *V. cholerae* № 18950 был наделен широким спектром протеолитической активности. Возможно, что присутствие этого белка и других белков наружной мембраны в составе препаратов OMV обеспечивает определенное преимущество вибрионам в поддержании жизненного цикла *life style* холерного вибриона, что требует проведения дополнительных исследований. Наличие в препаратах OMV белков наружных мембран OmpU и OmpT зависит от того, из какого штамма они выделены.

ЛПС методом ИФА обнаружен в составе всех исследуемых препаратов OMV и в исходных штаммах. В препарате OMV, полученном из штамма *V. cholerae* O1 № 18950, содержание ЛПС по ОП составило (0,981±0,01); *V. cholerae* O1 № 18780 – (1,081±0,016); *V. cholerae* O139 № 17786 – (0,949±0,007). Присутствие в полученных препаратах OMV из атоксигенных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 протективных антигенов (OmpT, OmpU и ЛПС) обуславливает их участие в формировании специфического антибактериального иммунитета.

Методом ГХ/МС во всех препаратах OMV обнаружено увеличение общего количества мононенасыщенных ЖК по сравнению с исходными клетками. В качестве мажорных пиков в препаратах OMV детектировали гексадеценую и октадеценую ННЖК, тогда как в исходных клетках мажорные пики представлены гексадекановой и гексадеценовой (пальмитолеиновой) кислотами. Обнаружено, что у исходных клеток отношение ННЖК/НЖК составило в среднем 0,6 (индекс ненасыщенности ЖК), а для

препаратов OMV индекс ненасыщенности достоверно изменялся ($p < 0,005$) и сдвигался в сторону увеличения. Для препаратов OMV, полученных из штаммов *V. cholerae* O1 № 18950 и 18780, этот показатель составил 5,05, а для препарата OMV из штамма *V. cholerae* O139 № 17786 – 2,35. ННЖК повышают текучесть клеточных мембран, в связи с этим нельзя исключить, что увеличение количества ННЖК в составе препаратов OMV может способствовать сохранению их содержимого, повышая адаптационный/персистентный потенциал холерных вибрионов. Обнаружено, что, в отличие от исходных клеток, в препаратах OMV из штаммов *V. cholerae* O1 № 18950 и 18780 наблюдали появление транс-изомеров ЖК, в частности trans-18:1 Δ11 (транс-изомер октадеценовой кислоты) в концентрации до 10,33 %, а у препаратов OMV из штамма *V. cholerae* O139 № 17786 – до 37,56 %. Учитывая, что температура плавления транс-изомеров ЖК выше, чем соответствующих им *cis*-вариантов, можно предположить, что это может способствовать защите содержимого сформированных везикулярных структур холерных вибрионов от деструктивных изменений при попадании в различные экологические ниши. Учитывая способность холерного вибриона существовать в широком диапазоне экосистем, нельзя исключить, что присутствие выявленных транс-изомеров ЖК обусловит быструю ригидизацию мембраны OMV, что является одним из экстренных механизмов адаптации/персистенции холерного вибриона в везикулярной форме при возникновении определенных экологических условий. Кроме нормальных прямоцепочечных ЖК в препаратах OMV холерных вибрионов детектировались также и *iso*-разветвленные ЖК, которые представлены i16:0 (14-метилпентадекановой ЖК) и i18:0 (16-метилгептадекановой ЖК). Суммарное количество их варьировало от 11 до 25 % в зависимости от штамма. Разветвленные ЖК благодаря особенностям химического строения могут выполнять адаптивную функцию, сохраняя оптимальную текучесть и пластичность мембраны при изменении окружающей среды. Выявлены статистически значимые качественные и количественные изменения спектров ЖК в препаратах OMV, полученных из штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, по сравнению с исходными штаммами. Таким образом, выявленные композиционные перестройки жирнокислотного состава препаратов OMV холерных вибрионов, по сравнению с исходными клетками, могут выполнять несколько важных функций: с одной стороны, участвовать в сохранении содержимого везикул, с другой – способствовать осуществлению динамического взаимодействия между везикулами и клетками микро- и макроорганизмов, а также с окружающей средой, участвуя в механизме адаптации/персистенции холерных вибрионов с помощью процесса везикуляции.

Результаты представленных исследований с использованием различных методических подходов

свидетельствуют о различиях в композиционном составе препаратов OMV, полученных из атоксигенных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139. Выявлено, что состав OMV отличался от исходных штаммов по спектрам белков и ЖК.

Обнаружение в составе препаратов OMV ферментов (N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, ДНК-азы), белков наружных мембран, ЛПС, ЖК позволило не только получить новые данные, но и обозначить перспективы дальнейшего изучения препаратов OMV у штаммов *V. cholerae*, что будет способствовать расшифровке участия OMV в механизмах адаптации и персистенции. Полученные данные могут быть использованы для разработки в РФ платформы для производства современных вакцинных препаратов с использованием OMV, полученных из атоксигенных штаммов холерных вибрионов.

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. Луста К.А. Бактериальные мембранные внеклеточные нановезикулы: строение, биогенез, функции, использование в биотехнологии и медицине (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015; 51(5):443–52. DOI: 10.7868/S0555109915040091.
2. Jan A.T. Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1053. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01053.
3. Луста К.А., Кондашевская М.В. Участие внеклеточных мембранных нановезикул бактерий в патологических процессах (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*. 2019; 2:148–57. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16306.
4. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.
5. Théry C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2(8):569–79. DOI: 10.1038/nri855.
6. Pilzer D., Gasser O., Moskovich O., Schifferli J.A., Fishelson Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin. Immunopathol.* 2005; 27(3):375–87. DOI: 10.1007/s00281-005-0004-1.
7. McBroom A.J., Kuehn M.J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(2):545–58. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x.
8. Duperthuy M., Sjöström A.E., Sabharwal D., Damghani F., Uhlin B.E., Wai S.N. Role of the *Vibrio cholerae* matrix protein Bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10):e1003620. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003620.
9. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64:163–84. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
10. Ellen A.F., Albers S.V., Huibers W., Pitcher A., Hobel C.F.V., Schwarz H., Folea M., Schouten S., Boekema E.J., Poolman B., Driessen A.J.M. Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles*. 2009; 13(1):67–79. DOI: 10.1007/s00792-008-0199-x.
11. Elhenawy W., Debelyy M.O., Feldman M.F. Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into Bacteroides outer membrane vesicles. *mBio*. 2014; 5(2):e00909-14. DOI: 10.1128/mBio.00909-14.
12. Deatherage B.L., Lara J.C., Bergsbaken T., Rassoulian Barrett S.L., Lara S., Cookson B.T. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 2009; 72(6):1395–407. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x.
13. Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology (Reading)*. 2004; 150(Pt. 7):2161–9. DOI: 10.1099/mic.0.26841-0.

14. Langlete P., Krabberød A.K., Winther-Larsen H.C. Vesicles from *Vibrio cholerae* contain AT-rich DNA and shorter mRNAs that do not correlate with their protein products. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2708. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02708.
15. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
16. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215(3):403–10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
17. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(14):3059–66. DOI: 10.1093/nar/gkf436.
18. Дуванова О.В., Шиманюк Н.Я., Мишанькин Б.Н. Способность расщеплять твин 20 как дифференциальный тест для вибрионов O139 серовара различного происхождения. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2000; 5:48–9.
19. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О., Писанов Р.В. Способ дифференциации штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы по алкилсульфатазной активности. Патент РФ № 2473697, опубл. 27.01.2013. Бюл. № 3.
20. O'Brien M., Colwell R.R. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987; 53(7):1718–20. DOI: 10.1128/aem.53.7.1718-1720.1987.
21. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(5):303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.
22. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Моноклональные антитела к термостабильным поверхностным антигенам холерных вибрионов O1- и O139-серогруппы. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2015; 20(3):51–7.
23. Шипко Е.С., Дуванова О.В. Влияние температурного стресса на спектр жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae*. *Вестник Пермского университета. Серия Биология.* 2022; 2:143–54. DOI: 10.17072/1994-9952-2022-2-143-154.
24. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Кульшань Т.А., Швиденко И.Г., Крицкий А.А. Система секреции шестого типа *Vibrio cholerae*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 2:27–35. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-27-35.
25. Бородина О.В., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Чемисова О.С., Полевая М.В. Изучение встречаемости гена холодового шока *csH1* у штаммов *Vibrio cholerae*, циркулирующих на территории Российской Федерации. *Бактериология.* 2021; 6(3):22–3.
10. Ellen A.F., Albers S.V., Huibers W., Pitcher A., Hobel C.F.V., Schwarz H., Folea M., Schouten S., Boekema E.J., Poolman B., Driessen A.J.M. Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles.* 2009; 13(1):67–79. DOI: 10.1007/s00792-008-0199-x.
11. Elhenawy W., Debely M.O., Feldman M.F. Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into Bacteroides outer membrane vesicles. *mBio.* 2014; 5(2):e00909-14. DOI: 10.1128/mBio.00909-14.
12. Deatherage B.L., Lara J.C., Bergsbaken T., Rassoulian Barrett S.L., Lara S., Cookson B.T. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 2009; 72(6):1395–407. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x.
13. Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology (Reading).* 2004; 150(Pt. 7):2161–9. DOI: 10.1099/mic.0.26841-0.
14. Langlete P., Krabberød A.K., Winther-Larsen H.C. Vesicles from *Vibrio cholerae* contain AT-rich DNA and shorter mRNAs that do not correlate with their protein products. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2708. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02708.
15. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
16. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215(3):403–10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
17. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(14):3059–66. DOI: 10.1093/nar/gkf436.
18. Дуванова О.В., Шиманюк Н.Я., Мишанькин Б.Н. [The ability to split Twin 20 as a differential test for vibrios of O139 serovar of various origin]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics].* 2000; (5):48–9.
19. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О., Писанов Р.В. [Method for differentiation between *Vibrio cholerae* O139 strains by alkyl sulfatase activity]. Patent of the Russian Federation No. 2473697, publ. 01/27/2013. Bull. No. 3.
20. O'Brien M., Colwell R.R. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987; 53(7):1718–20. DOI: 10.1128/aem.53.7.1718-1720.1987.
21. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretenchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangelskaya I.V., Bursha O.S. [Enzyme immunoassay methods in the diagnosis of cholera]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics].* 2016; 61(5):303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.
22. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretenchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangelskaya I.V., Bursha O.S. [Monoclonal antibodies to thermostable surface antigens of cholera vibrios O1- and O139-serogroups]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases].* 2015; 20(3):51–7.
23. Shipko E.S., Дуванова О.В. [Effect of temperature stress on the spectrum of fatty acids of *Vibrio cholerae* strains]. *Vestnik Permskogo Universiteta. Seriya Biologiya [Bulletin of the Perm University. Biology Series].* 2022; (2):143–54. DOI: 10.17072/1994-9952-2022-2-143-154.
24. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Kul'shan' T.A., Shvidenko I.G., Kritsky A.A. [*Vibrio cholerae* secretion system of the type VI]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2022; (2):27–35. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-27-35.
25. Borodina O.V., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Oleinikov I.P., Chemisova O.S., Poleeva M.V. [Study of the occurrence of the *csH1* cold shock gene in *Vibrio cholerae* strains circulating in the territory of the Russian Federation]. *Bakteriologiya [Bacteriology].* 2021; 6(3):22–3.

References

1. Lusta K.A. [Bacterial outer membrane nanovesicles: structure, biogenesis, functions, use in biotechnology and medicine (review)]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology].* 2015; 51(5):443–52. DOI: 10.7868/S0555109915040091.
2. Jan A.T. Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1053. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01053.
3. Lusta K.A., Kondashevskaya M.V. [Participation of extracellular membrane nanovesicles of bacteria in pathological processes (literature review)]. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologij [Bulletin of New Medical Technologies. Electronic Edition].* 2019; (2):148–57. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16306.
4. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.
5. Théry C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2(8):569–79. DOI: 10.1038/nri855.
6. Pilzer D., Gasser O., Moskovich O., Schifferli J.A., Fishelson Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin. Immunopathol.* 2005; 27(3):375–87. DOI: 10.1007/s00281-005-0004-1.
7. McBroom A.J., Kuehn M.J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(2):545–58. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x.
8. Duperthuy M., Sjöström A.E., Sabharwal D., Damghani F., Uhlin B.E., Wai S.N. Role of the *Vibrio cholerae* matrix protein Bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10):e1003620. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003620.
9. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64:163–84. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.

Authors:

Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В., Тсырулина О.А., Чемисова О.С., Евдокимова В.В., Водопьянов А.С., Кругликов В.Д., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филипенко А.В., Носков А.К. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aanet.ru.

Об авторах:

Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В., Цырулина О.А., Чемисова О.С., Евдокимова В.В., Водопьянов А.С., Кругликов В.Д., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филипенко А.В., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru.