

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.834.1:612.017.4:579.61:577.112

EDN: KQHN LZ

<http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-2-179-190>



**Взаимодействие везикул штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor
с клетками-мишенями**

**О. А. Якушева¹, Л. П. Алексеева¹, В. В. Евдокимова¹, М. Г. Мелоян¹,
Д. И. Симакова¹**

¹ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Автор, ответственный за переписку: Ольга Александровна Якушева, yakusheva_oa@antiplague.ru

Аннотация. Установлено, что типичный штамм и геноварианты *Vibrio cholerae* O1 при культивировании в течение 18 ч на агаре Мартена с добавлением 0.1% желчи образуют везикулы наружной мембраны (ВНМ). С помощью трансмиссионной электронной микроскопии показано, что везикулы *V. cholerae* O1 El Tor в жидкой и плотной среде имеют целую, непрерывную мембрану. При визуальной оценке препаратов везикул обнаружено, что они сферической формы, а диапазон их размеров находится в пределах от 50 до 200 нм. Отработана методика конъюгации ВНМ, полученных из бульонных и агаровых культур типичного штамма и геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor и моноклональных антител (МКА) к белку наружной мембраны OmpU с ФИТЦ. Определены оптимальные концентрации ВНМ, дающие четкий флуоресцентный сигнал. Установлено взаимодействие везикул наружной мембраны холерных вибрионов с клетками-мишенями на основе флуоресцирующих МКА и флуоресцентно-меченых везикул. Показано, что в течение 20 мин ВНМ агрегируют и связываются с клеточной плазматической мембраной. Через час начинается интернализация. Через 3 часа практически все везикулы проникают в клетки-мишени. Отмечено, что ВНМ, образуемые типичным штаммом и геновариантами *V. cholerae* O1 El Tor, выделенные из бульонных и агаровых культур, интернализируются клетками-мишенями и накапливаются внутриклеточно за одинаковое время. В использованных экспериментальных условиях не было выявлено участия липополисахаридов в интернализации везикул *V. cholerae* O1 El Tor клетками-мишенями. На модели культуры клеток двух линий кишечного эпителия *Caco-2* и *HuTu 80* показано также, что ВНМ усиливают способность бактериальных клеток прикрепляться к эпителиальным клеткам кишечника.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, везикулы наружных мембран, липополисахариды, холерный токсин, адгезия к клеткам-мишеням

Для цитирования: Взаимодействие везикул штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor с клетками-мишенями / О. А. Якушева, Л. П. Алексеева, В. В. Евдокимова, М. Г. Мелоян, Д. И. Симакова // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2026. Т. 17, вып. 2. С. 179–190. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-2-179-190>.

MICROBIOLOGY

Original article

Interaction of *Vibrio cholerae* O1 El Tor vesicles with target cells

**O. A. Yakusheva¹, L. P. Alekseeva¹, V. V. Evdokimova¹, M. G. Meloyan¹,
D. I. Simakova¹**

¹ Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia

Corresponding author: Olga A. Yakusheva, yakusheva_oa@antiplague.ru

Abstract. Cultivation of the typical strain and genovariants of *Vibrio cholerae* O1 for 18 hours on Marten agar supplemented with 0.1% bile induced the formation of outer membrane vesicles (OMVs). TEM analysis showed that *V. cholerae* O1 El Tor vesicles in both liquid and solid media have an intact, continuous membrane. Visual inspection of the vesicle preparations revealed a spherical shape, with sizes ranging from 50 to 200 nm. A method was developed for conjugating OMVs obtained from broth and agar cultures of the typical strain and genovariants of *V. cholerae* O1 El Tor with FITC-labeled monoclonal antibodies (mAbs) against the outer membrane protein OmpU. The optimal OMVs concentrations providing a clear fluorescent signal were determined. The interaction of

V. cholerae outer membrane vesicles with target cells was established using fluorescent mAbs and fluorescently labeled vesicles. OMVs were shown to aggregate and bind to the cell plasma membrane within 20 minutes. Internalization began within an hour. After three hours, virtually all vesicles penetrated the target cells. It was noted that OMVs produced by the typical strain and genovariants of *V. cholerae* O1 El Tor isolated from broth and agar cultures were internalized by target cells and accumulated intracellularly within identical timeframes. Under the experimental conditions used, no LPS involvement was detected in the internalization of *V. cholerae* O1 El Tor vesicles by target cells. Using cell culture models of two intestinal epithelial cell lines, *Caco-2* and *HuTu 80*, OMVs were shown to enhance the ability of bacterial cells to adhere to intestinal epithelial cells.

Keywords: *Vibrio cholerae*, outer membrane vesicles, LPS, cholera toxin, adhesion to target cells

For citation: Yakusheva O. A., Alekseeva L. P., Evdokimova V. V., Meloyan M. G., Simakova D. I. [Interaction of *Vibrio cholerae* O1 El Tor vesicles with target cells]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Vol. 17, iss. 2 (2026): pp. 179-190. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2026-2-179-190>.

Введение

В 90-х гг. прошлого столетия в результате мутаций появились и получили широкое распространение природные геноварианты *V. cholerae* El Tor. Данные штаммы содержат в опероне *ctxAB*, кодирующем биосинтез холерного токсина (ХТ), ген *ctxB* классических вибрионов (*ctxB1*), в отличие от типичных El Tor вибрионов, имеющих аллель *ctxB* El Tor (*ctxB3*). Были также обнаружены и другие геноварианты возбудителя, несущие новую аллель гена *ctxAB7*, который, в отличие от аллеля *ctxAB1*, имеет дополнительную замену С/А в позиции 58. Геноварианты синтезируют повышенное количество ХТ I (классического) типа, приближаясь по данному показателю к высокотоксигенным штаммам классического биовара [Заднова и др., 2019].

Как и другие грамотрицательные бактерии, холерные вибрионы образуют везикулы наружной мембраны (ВНМ), которые признаны общим механизмом бесконтактного транспорта и коммуникации [Guertgero-Mandujano et al., 2017]. С помощью ВНМ большинство грамотрицательных бактерий экспортируют комплексы белков, липидов и связанных с наружной мембраной [Аронова и др., 2021]. Образование везикул наружной мембраны штаммами *V. cholerae* classical и El Tor, их композиционный состав и протективные свойства описаны как отечественными, так и зарубежными исследователями [Zingl et al., 2021; Омельченко и др., 2023; Дуванова и др., 2024]. Образование ВНМ из клеток *V. cholerae* наблюдается во время роста бактерий в жидких и агаровых средах, в составе биопленки, а также во время инфекции внутри организма хозяина. Ранее нами было показано, что типичные штаммы и геноварианты *V. cholerae* El Tor в жидкой среде АК1 образуют ВНМ, содержащие холерный токсин, локализованный внутри везикул, а также определено его биологическое действие на культуру клеток *CHO-K1* и *HuTu 80* [Алексеева и др., 2024; Якушева и др., 2024].

Поскольку ВНМ содержат биологически активные молекулы, они выполняют множество биологических функций, включая доставку токсинов и протеаз во время инфекции [Rompikuntal et al., 2015; Rasti, Brown, 2019], влияют на структуру биопленок [Potarova, 2024], защищают от антимикробных препаратов и бактериофагов [Reyes-Robles et al., 2018], усиливают адгезию бактерий к эукариотическим клеткам [Божокина, Берсон, 2021]. Зарубежными исследователями показано, что ВНМ *V. cholerae* classical и El Tor проникают в эпителиальные клетки кишечника и высвобождают факторы вирулентности, такие как холерный токсин, протеазы и др. [Chatterjee, Chaudhuri, 2011; Rompikuntal et al., 2015; Zingl et al., 2021].

Поглощение везикул клетками-мишенями происходит либо путем фагоцитоза, либо путем классического эндоцитоза, после чего факторы вирулентности дифференцированно разделяются во время внутриклеточного транспорта везикул и могут проявлять свою токсическую активность [Bielaszewska et al., 2017]. Для изучения этих процессов применяются различные способы обнаружения поглощения везикул клетками-хозяевами, одним из которых является обработка антителами. Такое окрашивание можно обнаружить с помощью проточной цитометрии или микроскопии. Еще один метод, используемый в практике для изучения поглощения везикул клетками-хозяевами, основан на окрашивании везикул флуоресцирующими красителями, такими как липофильный краситель Dio, ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат) [O'Donoghue, Krachler, 2016]. Эти красители позволяют неспецифически метить липиды или белки ВНМ, применяются для изучения кинетики поглощения на живых клетках и используются для обнаружения везикул снаружи и внутри клеток-хозяев. Данный метод относят к неспецифическим, поэтому его необходимо использовать в сочетании с мечеными антителами [Macion et al., 2021]. Несмотря на достигнутые успехи в области изучения взаимодействия ВНМ с клетками-мишенями, остается много вопросов, требующих продолжения исследований. Так, конкретные механизмы связывания везикул геновариантов с клетками-хозяевами и проникновение в них, до сих пор полностью не исследованы.

Цель работы – получение ВНМ *V. cholerae* El Tor, изучение их поглощения клетками-мишенями и влияния на адгезивные свойства.

Материалы и методы исследования

Все этапы работы были выполнены в соответствии с СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». В работе использовали токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa: (ctx B3, tcpA^{ET}, rtxA1) – № 1310; (ctx B1, tcpA^{ET}, rtxA1) – № 18367; (ctxB7, tcpA^{CIRS}, rtxA4) – № 19188/2; (ctxB7, tcpA^{CIRS}, rtxA4a) – № 19667, полученные из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Штаммы *V. cholerae* O1 El Tor с различными генотипами были подобраны согласно их паспортным данным. Все исследуемые штаммы были типичными по морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам. Бактерии культивировали на агаре Мартена, pH 7.7.

Для сравнительного анализа проникновения в клетки-мишени были использовано два типа токсинсодержащих везикул, полученных ранее при культивировании типичного штамма *V. cholerae* O1 El Tor 1310 и геновариантов 18367, 19188/2, 19667, выращенных в бульоне АК1 до логарифмической фазы роста [Якушева и др., 2024] и после выращивания в течение 18 ч на агаре Мартена с добавлением 0.1% желчи [Avila-Calderón et al., 2018]. Бактерии смывали с помощью стеклянного шпателя 0.1 М фосфатно-солевым буфером pH 7.2 до образования однородной суспензии, далее полученную бактериальную массу разводили в объеме 250 мл. Обеззараженные мертиолятом натрия (1:10000) микробные клетки удаляли центрифугированием при 10 000 g в течение 30 мин. Супернатант пропускали через фильтры типа GVWP с диаметром 0.45 мкм и 0.22 мкм, чтобы исключить клеточный детрит, и добавляли ингибитор протеаз, не содержащий ЭДТА (Sigma-Aldrich/Roche) для предотвращения деградации белка. Из бесклеточного супернатанта концентрирование везикул осуществляли центрифугированием при 100 000 g в течение 2 ч при 4° С. Осадок дважды промывали 25 мл стерильного 0.1 М фосфатно-солевого буфера pH 7.2 и центрифугировали при той же скорости в течение 1 ч, затем ресуспендировали в 1 мл 0.1 М фосфатно-солевого буфера, pH 7.2. Разливали на аликвоты и хранили при –20°С.

Концентрацию белка измеряли методом Лоури [Lowry, 1951]. Концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой, построенной для БСА. Липополисахариды (ЛПС) в везикулах измеряли в иммуноферментном анализе с помощью комплементарных ему специфических моноклональных антител гибридомы (ГХ-F8/O1), депонированной ранее в «Специализированной коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных» Института Цитологии (г. Санкт-Петербург) под номером РККК (П) 386Д. Концентрацию ЛПС рассчитывали по калибровочной кривой, построенной для ЛПС, выделенного по общепринятой методике О. Westphal [Westphal, 1965] из штамма *V. cholerae* O1 El Tor № 5879 (ЛПС O1).

Визуализацию, размеры и форму везикул в полученных препаратах оценивали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Образцы наносили на поверхность формаровой пленки-подложки и контрастировали 0.2% раствором уранилацетата в воде.

Поглощение везикул оценивали на перевиваемых клеточных линиях *Caco-2* (человек, аденокарцинома ободочной кишки) и *HuTi 80* (человек, аденокарцинома двенадцатиперстной кишки) (РКККП, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург). Выращивание культур клеток *Caco-2* и *HuTi 80* проводили согласно паспортным данным. Вне периода постановки опытов коллекционные культуры хранились в криоконсервированном состоянии в биохранилище с жидким азотом при –196°С. Все этапы с перевиваемыми линиями клеток были выполнены в соответствии с рекомендациями [Фрешни, 2018].

Везикулы метили флуоресцин изотиоцианатом (ФИТЦ). Для этого полученные препараты ресуспендировали в 0.1 М бикарбонате натрия (pH 9.0) и добавляли ФИТЦ в соотношении 1:1. Конъюгацию проводили в течение 1 ч при температуре 25°С при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Свободный краситель удаляли из меченых везикул, дважды промывая фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (46 000 ×g, 1 ч).

Культуру клеток промывали 3 раза ФСБ, в бессывороточной среде вносили меченные ФИТЦ везикулы и выдерживали в течение определённого интервала времени (10, 20, 40 мин, 1, 2, 4, 6, 8 ч) при 37°С в СО₂-инкубаторе. По истечении времени 3 раза промывали ФСБ, фиксировали холодным 96° спиртом в течение 20 мин и полностью высушивали. Для гашения неспецифического свечения культуры клеток наносили 0.025% раствор трипанового синего на 20 мин при +4°С. Отмывали 3 раза ФСБ, полностью высушивали и просматривали под флуоресцирующим микроскопом [Chatterjee, Chaudhuri, 2011].

Маркировку ФИТЦ иммуноглобулинов, продуцируемых гибридомой (ГХ-A5D8/OmpU), депонированную в «ГКПМ-Оболensk» (№179) [Евдокимова и др., 2016], направленных к мембранному белку OmpU, осуществляли по методу [Антителя, 1991]. Конъюгация длилась не менее 2 ч в условиях холодильника при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Для освобождения от несвязавшегося флуорохрома меченные ФИТЦ МКА диализовали против 0.15 М NaCl.

Для установления красящего титра высушенные и фиксированные мазки бактериальных взвесей *V. cholerae* O1 El Tor обрабатывали раствором ФИТЦ МКА в разведении начиная 1:2 до 1:32 и помещали во влажную камеру. Через 30 мин промывали 2 раза ФСБ и 1 раз дистиллированной водой, затем подсушивали на воздухе. Учет результатов проводили по 4-крестовой системе на люминесцентном микроско-

пе. Активность поглощения исследовали у всех препаратов везикул в разных концентрациях – от 500 нг/мл до 2 мкг/мл.

Эксперимент проводили в 6-луночных планшетах с покровными стеклами, на которых сформировался разреженный монослой клеток. В лунки планшета вносили препарат нативных везикул и инкубировали в течение определённого интервала времени (10, 20, 40 мин, 1, 2, 4, 6, 8 ч) при 37°C в CO₂-инкубаторе. По истечении времени 3 раза промывали ФСБ, фиксировали холодным 96° спиртом в течение 20 мин и полностью высушивали. Далее для пермеабилзации культуру обрабатывали 1% раствором тритона X-100 в ФСБ в течение 20 мин при комнатной температуре, промывали 3 раза ФСБ и наносили 0.025% раствор трипанового синего на 20 мин при +4°C, промывали 3 раза ФСБ и добавляли меченные ФИТЦ антитела на 40 мин при 37°C, по прошествии времени промывали 3 раза ФСБ, полностью высушивали и просматривали под флуоресцирующим микроскопом.

Для исследования роли ЛПС в поглощении везикул использовали препарат ЛПС из штамма *V. cholerae* O1 El Tor № 5879. ВНМ меченные ФИТЦ 500 нг (количество ЛПС в 500 нг везикул каждого исследуемого препарата представлено в табл. 1) смешивали с препаратом ЛПС, который добавляли с избытком 3 мкг. Клетки-мишени промывали 3 раза ФСБ и в бессывороточной среде вносили смесь везикул с препаратом ЛПС, в контрольную лунку с клетками-мишенями вносили в бессывороточной среде меченные ФИТЦ ВНМ в количестве 500 нг и инкубировали в течение 3 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C. Далее 3 раза промывали ФСБ, фиксировали холодным 96° спиртом в течение 20 мин и полностью высушивали. Неспецифическое свечение культуры клеток гасили с помощью 0.025% раствора трипанового синего в течение 20 мин при +4°C. Отмывали 3 раза ФСБ, полностью высушивали и просматривали под флуоресцирующим микроскопом.

Таблица 1

**Количество ЛПС в препаратах везикул, полученных из бульонных и агаровых культур
V. cholerae O1 El Tor**

[LPS content in vesicle preparations obtained from broth and agar cultures of *V. cholerae* O1 El Tor]

Препараты везикул, полученные	Концентрация ЛПС (мкг) в 500 нг препарата			
	1310	18367	19188/2	19667
при культивировании штаммов <i>V. cholerae</i> O1 El Tor в бульоне АК1	0.3	0.13	0.06	0.07
после выращивания культур на агаре Мартена с добавлением 0.1% желчи	0.3	0.16	0.13	0.15

Роль ЛПС в интернализации ВНМ оценивали по конкурентному ингибированию. При участии ЛПС избыток этого препарата конкурирует за сайты связывания и блокирует поглощение везикул – в результате клетки-мишени визуализируются без флуоресцентного свечения. В контрольной лунке флуоресценция сохраняется. Если ЛПС не участвует в поглощении, флуоресцентное свечение наблюдается в обеих лунках.

Количественную оценку адгезии штаммов *V. cholerae* после обработки клеток мембранными везикулами проводили по методу [Патент ..., 2016] одновременно на двух клеточных линиях – *HuTu 80* (человек, аденокарцинома двенадцатиперстной кишки) и *Caco-2* (человек, аденокарцинома ободочной кишки). К разреженному монослою клеток *HuTu 80* или *Caco-2* вносили везикулы в дозе 500 нг и инкубировали в течение 1 ч. Далее среду отбирали, клетки промывали 3 раза раствором Хенкса pH 7.4. Среду заменяли на свежую DMEM, содержащую 10⁶ м. к. / мл испытуемых штаммов холерных вибрионов. Клетки *HuTu 80* или *Caco-2* в присутствии холерных вибрионов культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе 90 мин. После этого среду удаляли, и индекс адгезии определяли, как описано выше.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили в программе <https://medstatistic.ru/>, вычисляя среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической. Оценку статистической достоверности различий средних значений проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Критерием статистической ошибки достоверности различия получаемых данных считали величину ошибки $p \leq 0.05$. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение

В последние годы появилось немало публикаций, касающихся интернализации ВНМ патогенных бактерий в клетки-хозяева. Поглощенные везикулы могут способствовать инфицированию хозяина, нарушать функции его клеток и модулировать иммунную защиту и реакции хозяина [Ellis, Kuehn, 2010].

Для сравнительного анализа проникновения в клетки-мишени были использованы два типа везикул. С помощью ТЭМ установлено, что везикулы *V. cholerae* O1 El Tor в жидкой и плотной среде имели целую, непрерывную мембрану. При визуальной оценке препаратов везикул обнаружено, что они были сферической формы, а диапазон их размеров находился в пределах от 50 до 200 нм (рис. 1). Полученные

данные согласуются с ранее опубликованными нами и результатами зарубежных авторов, показавших, что холерные вибрионы в естественных условиях образуют везикулы с аналогичным размером [Chatterjee, Chaudhuri, 2011; Алексеева и др., 2024; Якушева и др., 2024]. При ТЭМ препаратов везикул не были обнаружены обломки бактериальных клеток, жгутики и пили.

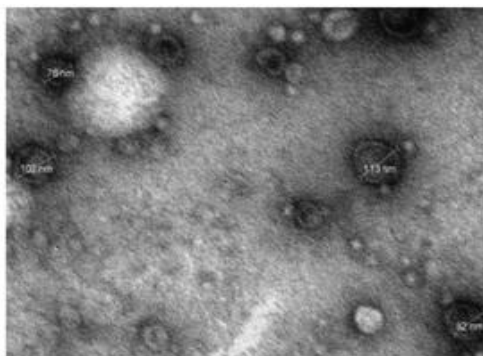


Рис. 1. Электронная микроскопия препарата везикул, на примере штамма *V. cholerae* O1 № 19667, выращенного на агаре Мартена с добавлением 0.1% желчи
[Electron microscopy of a vesicle preparation using the example of *V. cholerae* strain O1 № 19667 grown on Marten agar supplemented with 0.1% bile]

Для оценки клеточной интернализации выделенные препараты везикул были конъюгированы с ФИТЦ. Использование этого флуоресцирующего красителя в процессе изучения интернализации было описано в исследовании [Kesty et al., 2004]. Клетками-мишенями служили одновременно две линии: *CaCo-2*, традиционно применяемая для этих целей, и *HuTu 80*, которая на действие холерного токсина реагирует удлинением и появлением игловатых отростков. Обе клеточные линии относятся к непрофессиональным фагоцитирующим клеткам.

Для определения оптимальной концентрации, дающей четкий флуоресцентный сигнал, использовали разные количества везикул. Для этого флуоресцентно-меченые везикулы, начиная с 100 нг/мл до 1 000 нг/мл, добавляли к монослою эпителиальных клеток *CaCo-2* и *HuTu 80* и через 2 ч после инкубации просматривали под микроскопом. В результате было отмечено, что для визуализации четкого флуоресцентного сигнала при поглощении эпителиальными клетками *CaCo-2* и *HuTu 80* флуоресцентно-меченых везикул необходимо использовать количество ВНМ, равное 500 нг/мл.

Известно, что эндоцитарные процессы в кишечном эпителии протекают быстро [Olofsson et al., 2014], поэтому процесс интернализации оценивали в динамике, начиная от 10 мин до 6 ч. Интенсивность флуоресценции в клетках *CaCo-2* и *HuTu 80* увеличивалась по мере поглощения везикул. После инкубации в течение 20 мин можно было регистрировать, как агрегируют и связываются с клеточной плазматической мембраной флуоресцентно-меченые везикулы. Через час начиналась интернализация. Количество поглощенных везикул в интервале от 1 до 3 ч со временем увеличивалось. Нарастание интернализации везикул со временем также было описано для *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa* в ряде исследований [Kesty et al., 2004; Furuta et al., 2009; Bauman, Kuehn, 2009; Parker et al., 2010]. Через 3 часа практически все везикулы проникали в клетки-мишени.

Ранее было показано, что холерный токсин локализуется внутри везикул и является биологически активным [Алексеева и др., 2024; Якушева и др., 2024]. В экспериментах после 4 ч инкубации меченых ВНМ с клетками *HuTu 80* наблюдали внутриклеточные флуоресцирующие включения и морфологическое изменение клеток, характерное для действия холерного токсина, в клетках *CaCo-2* были также обнаружены флуоресцирующие включения. Известно, что клетки *CaCo-2* на действие холерного токсина не отвечают морфологическими изменениями, регистрируемыми под микроскопом [Moal, Servina, 2013]. Через 6 ч инкубации флуоресценция полностью гасла.

Однако этот метод изучения поглощения флуоресцентно-меченых везикул не является строго специфичным, т. к. в процессе конъюгации везикул с флуоресцирующими красителями молекулы последних могут образовывать агрегаты и обогащенные домены, и в дальнейшем поглощаются клетками-мишенями [O'Donoghue, Krachler, 2016]. Существует другой метод, используемый в практике для изучения поглощения ВНМ клетками-хозяевами, – иммуноокрашивание. Этот метод позволяет продемонстрировать, как доставляется содержимое ВНМ, и изучить вклад этого содержимого во взаимодействие с клеткой-хозяином (связывание/проникновение), а также визуализировать колокализацию с определенными клеточными компартментами. Для иммуноокрашивания везикул *V. cholerae* используют поликлональные антисыворотки против протеаз HAP, VesC [Mondal et al., 2016] и PrtV [Rompikuntal et al., 2015], а также белка везикул OmpU [Bielig et al., 2011].

Для доказательства того, что флуоресценция была вызвана везикулами, меченными ФИТЦ, а не свободным красителем, были проведены дополнительные исследования. Известно, что белок наружной мембраны OmpU является маркером везикул [Elluri et al., 2014; Sjöström et al., 2015]. Располагая гибридомой (ГХ-A5D8/OmpU) были приготовлены экспериментальные образцы флуоресцирующих МКА, направленных к мембранному белку OmpU везикул. Используя мазки штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, было определено рабочее разведение полученного препарата ФИТЦ-МКА OmpU, равное 1:4.

Далее для определения поглощения к клеткам мишеням были внесены разные концентрации нативных везикул от 500 нг/мл до 2 мкг/мл и окрашены ФИТЦ-МКА OmpU. Установлено, что разведение ФИТЦ-МКА OmpU, равное 1:4, давало возможность обнаружить четкий флуоресцирующий сигнал везикул в дозе 2 мкг/мл (рис. 2). Также следует отметить, что специфическое свечение наблюдалось в культуре обеих линий с концентрацией 1 мкг/мл везикул, но в поле зрения выявлялись единичные везикулы. Возможно, это связано с тем, что распределение мембранного белка OmpU по поверхности наружной мембраны составляет 30% [Заднова, 2004], а образование везикул происходит локально.

Уточним, что интактные везикулы поглощались за такой же период времени, что и флуоресцентно-меченные везикулы. При визуальной оценке не было отмечено разницы в интенсивности поглощения везикул, выделенных типичным штаммом и геновариантами *V. cholerae* O1 El Tor, а также между везикулами, выделенными из разных сред культивирования.

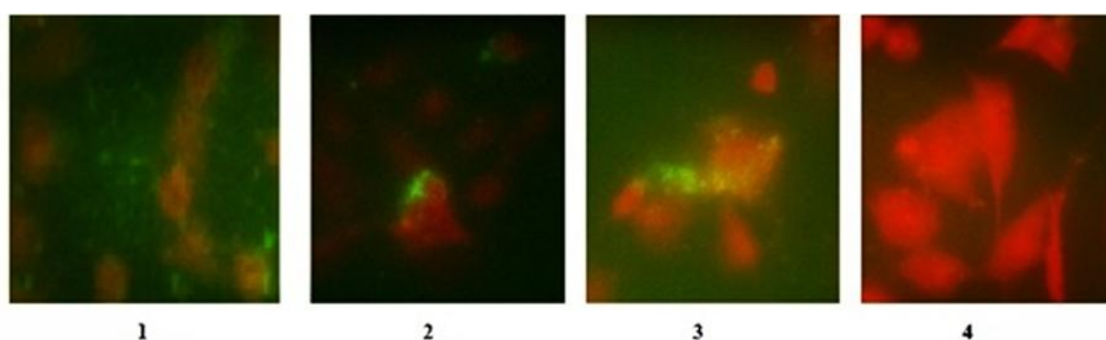


Рис. 2. Интернализация клетками-мишенями *HuTu 80* иммуноокрашенных везикул на примере штамма № 19667. Примечание: 1 – 10 мин воздействия; 2 – 20 мин воздействия; 3 – 4 ч воздействия; 4 – 6 ч воздействия

[Internalization of immunostained vesicles from strain No. 19667 by HuTu 80 target cells.

Note: 1 – 10 minutes of exposure; 2 – 20 minutes of exposure; 3 – 4 hours of exposure; 4 – 6 hours of exposure]

Специфическое взаимодействие холерного вибриона и энтероцита хозяина осуществляется в результате тесного контакта между патогеном и клеткой-хозяином. Поверхности везикул наружной мембраны имеют сходное строение с внешней мембраной бактерий, что обеспечивает широкий спектр веществ для взаимодействия с поверхностью клетки-хозяина. Как было показано нами ранее, везикулы типичного штамма и геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor образуются из наружной мембраны и содержат полноценный ЛПС [Якушева и др., 2024]. О-антиген занимает терминальное положение в структурной области ЛПС и, благодаря своему расположению, вероятно, является первым структурным элементом, вступающим в непосредственный контакт с клетками-хозяевами.

По данным литературы, у *E. coli* структура ЛПС, особенно область О-антигена, имеет решающее значение для проникновения ВНМ в клетки-мишени [O'Donoghue et al., 2017]. ВНМ, утратившие О-антиген, могут использовать клатрин-зависимый эндоцитоз для интернализации; в то же время везикулы с полноценным О-антигеном проникают в клетки-мишени зависимым от рафтов путем [Cai et al., 2018].

В настоящее время нет сведений о роли ЛПС в проникновении везикул природных геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor в клетку-мишень. Если допустить, что О-антиген, присутствующий на поверхности везикул типичного штамма и геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor, может быть основным эпитопом, обеспечивающим адгезию и последующее поглощение ВНМ клетками-мишенями, то очевидно, что в случае предварительного смешивания препарата ЛПС с препаратами везикул и внесения к клеткам-мишеням должно вызвать конкуренцию за сайты связывания и, как следствие, блокировать поглощение везикул. Экспериментальные данные свидетельствуют, что добавление ЛПС к везикулам не влияло на интернализацию последних, т. к. в клетках-мишенях регистрировали специфическое свечение (рис. 3). Следовательно, в использованных экспериментальных условиях не было выявлено участия ЛПС в интернализации везикул *V. cholerae* ЛПС клетками-мишенями.

Развитие любого инфекционного процесса определяется первичным взаимодействием патогена с клетками хозяина, за которым следует проявление его патогенных свойств. Поэтому большое значение придается изучению адгезивных свойств микроорганизмов, в том числе и *V. cholerae*. Согласно данным литературы, везикулы *Serratia grimesii* [Божокина, Берсон, 2021], *Campylobacter jejuni* [My Le et al., 2024]

усиливают способность бактериальных клеток прикрепляться к эпителиальным клеткам. Однако о влиянии везикул холерных вибрионов на прикрепление микробных клеток к клеткам-мишеням сведения отсутствуют. При изучении факторов, влияющих на бактериальную адгезию, важным этапом является определение адгезивных свойств холерных вибрионов к клеткам-мишеням без какого-либо воздействия. Исследование проводили на двух клеточных линиях *HuTu 80* и *Caco-2*, изучали адгезивные свойства холерных вибрионов, из которых выделены везикулы. Для этого на покровное стекло с разреженным монослоем клеток *HuTu 80* или клеток *Caco-2* вносили 1 мл среды DMEM, содержащей 10^6 м. к./мл исследуемых штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и инкубировали в течение 90 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе и определяли индекс адгезии (табл. 2).

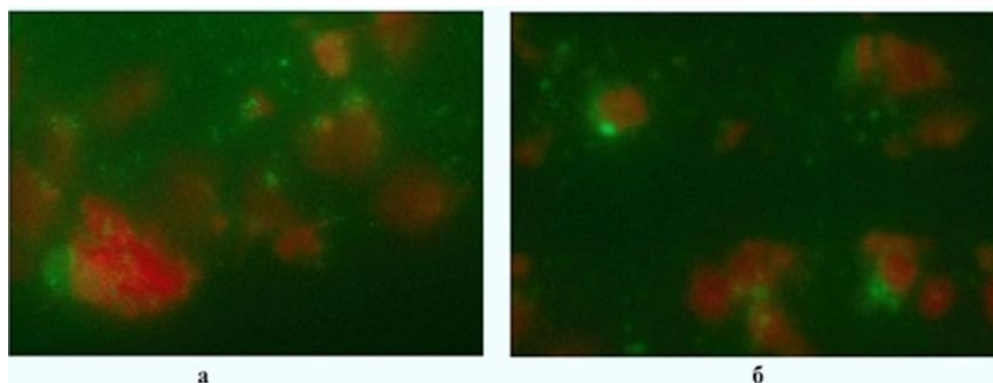


Рис. 3. Интернализация клетками-мишенями *Caco-2* флуоресцентно-меченых везикул на примере штамма № 19667: а – поглощение клетками *Caco-2* флуоресцентно-меченых везикул; б – поглощение клетками *Caco-2* флуоресцентно-меченых везикул с добавлением препарата ЛПС

[Internalization of fluorescently labeled vesicles from strain No. 19667 by *Caco-2* target cells.

Note: a – internalization of fluorescently labeled vesicles by *Caco-2* cells; b – internalization of fluorescently labeled vesicles by *Caco-2* cells with the addition of the LPS preparation]

Таблица 2

Анализ адгезивных свойств штаммов *V. cholerae* O1 El Tor
[Analysis of adhesive properties of *V. cholerae* O1 El Tor strains]

№ п/п	Препараты везикул, полученные из штаммов	Индекс адгезии к клеткам-мишеням			
		до воздействия везикул		после воздействия везикул	
		<i>HuTu 80</i>	<i>Caco-2</i>	<i>HuTu 80</i>	<i>Caco-2</i>
1	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor № 1310	3.2±0.025	3.51±0.031	4.8±0.029	5.0±0.025
2	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor № 18367	10.18±0.034	10.28±0.037	15.27±0.032	15.34±0.029
3	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor № 19188/2	12.28±0.041	12.56±0.042	30.7±0.023	31.0±0.038
4	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor № 19667	23.7±0.043	24.0±0.041	59.25±0.022	59.45±0.040

Примечание: приведены средние значения и стандартное отклонение, $p \leq 0.05$.

Сравнение показателей индекса адгезии позволило разделить исследуемые штаммы на три группы. Типичный штамм *V. cholerae* O1 El Tor № 1310 имел значение индекса адгезии 3.2 к клеткам *HuTu 80* и 3.51 к клеткам *Caco-2*, что позволяет отнести его к низкоадгезивным штаммам. Геноварианты штаммов *V. cholerae* O1 El Tor № 18367 и № 19188/2 отличались от типичного штамма более высокими показателями индекса адгезии в отношении обоих типов клеток *HuTu 80* (10.18; 12.28) и *Caco-2* (10.28; 12.56) соответственно. Такие показатели позволяют отнести их к штаммам со средним уровнем адгезии. В то же время у штамма *V. cholerae* O1 El Tor № 19667 был зарегистрирован самый высокий показатель индекса адгезии для обоих типов клеток-мишеней *HuTu 80* и *Caco-2*, который равнялся соответственно 23.7; 24.0 соответственно. На основании этого штамм относится к высокоадгезивным (рис. 4). Далее было оценено влияние везикул, полученных из клеток агаровых культур, на адгезивные свойства штаммов. Предварительно их инкубировали в течение часа с клеточными линиями *HuTu 80* и *Caco-2*, а затем вносили клетки холерных вибрионов, и их совместное культивирование продолжалось 90 мин. В результате проведенных исследований установлено, что везикулы, полученные из агаровых культур, усиливали прикрепление холерных вибрионов к клеткам-мишеням в 1.5–2.5 раза в зависимости от штамма (см. табл. 1, рис. 4).

Можно предположить, что ВМ *V. cholerae* способствуют усилению адгезии за счет изменения экспрессии рецепторов на поверхности клеток-мишеней.

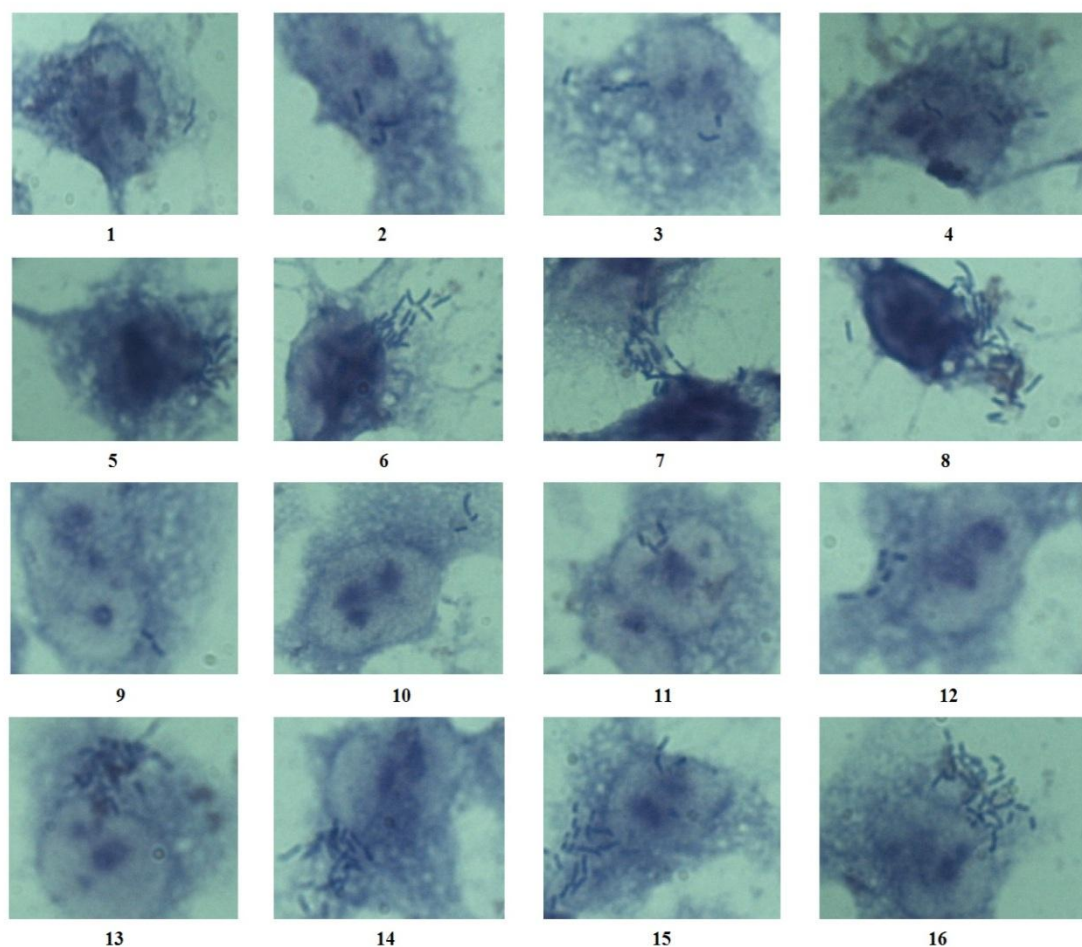


Рис. 4. Адгезия к культуре клеток *Caco-2* и *HuTu 80* (Увеличение 100x10, окраска по Романовскому-Гимзы).

Примечание: адгезия до обработки ВНМ к культуре клеток *HuTu 80* штамма *V. cholerae* O1: 1 – № 1310; 2 – № 18367; 3 – № 19188/2; 4 – № 19667; адгезия после обработки ВНМ к культуре клеток *HuTu 80* штамма *V. cholerae* O1: 5 – № 1310; 6 – № 18367; 7 – № 19188/2; 8 – № 19667; адгезия до обработки ВНМ к культуре клеток *Caco-2* штамма *V. cholerae* O1: 9 – № 1310; 10 – № 18367; 11 – № 19188/2; 12 – № 19667; адгезия после обработки ВНМ к культуре клеток *Caco-2* штамма *V. cholerae* O1: 13 – № 1310; 14 – № 18367; 15 – № 19188/2; 16 – № 19667

[Adhesion to *Caco-2* and *HuTu 80* cell culture (Magnification 100x10, Romanovsky-Giemsa stain) Note: adhesion of *V. cholerae* O1 strains to *HuTu 80* cell culture before OMV treatment: 1 – №. 1310; 2 – № 18367; 3 – № 19188/2; 4 – № 19667; adhesion of *V. cholerae* O1 strains to *HuTu 80* cell culture after OMV treatment: 5 – № 1310; 6 – № 18367; 7 – № 19188/2; 8 – № 19667; adhesion of *V. cholerae* O1 strains to *Caco-2* cell culture before OMV treatment: 9 – № 1310; 10 – № 18367; 11 – № 19188/2; 12 – № 19667; adhesion of *V. cholerae* O1 strains to *Caco-2* cell culture after OMV treatment: 13 – № 1310; 14 – № 18367; 15 – № 19188/2; 16 – № 19667]

Заключение

Таким образом, в настоящей работе представлены данные относительно методических подходов конъюгации токсинсодержащих ВНМ с ФИТЦ, а также моноклональных антител к белку наружной мембраны OmpU. С помощью флуоресцентно-меченых везикул и флуоресцирующих МКА, направленных к белку наружной мембраны OmpU, установлено взаимодействие везикул наружной мембраны холерных вибрионов с клетками-мишенями *HuTu 80* и *Caco-2*.

Показано, что временной интервал интернализации и накопление ВНМ, выделенных из типичного штамма и геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor, в клетках-мишенях сопоставим.

Также установлено, что ЛПС не участвует в интернализации ВНМ *V. cholerae* O1 El Tor. Результаты работы показали, что везикулы усиливают способность бактериальных клеток прикрепляться к эпителиальным клеткам кишечника.

Пока остается открытым вопрос, каким эндоцитарным путем везикулы геновариантов холерных вибрионов проникают в клетки-мишени, исследования в этом направлении будут продолжены.

Список источников

1. Алексеева Л.П. и др. Продукция холерного токсина и его локализация в составе везикул геновариантов *Vibrio cholerae* El Tor // Проблемы особо опасных инфекций. 2024. № 2. С. 62–69. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-62-69.
2. Антитела. Методы / под ред. Д. Кэтти. М.: Мир, 1991. Т. 1. 287 с.
3. Аронова Н.В. и др. Роль везикул наружных мембран возбудителей особо опасных инфекций в патогенезе и иммуногенезе инфекционного процесса // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 4. С. 6–15. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15. EDN: DLWWQC
4. Божокина Е.С., Берсон Ю.М. Роль мембранных везикул *Serratia grimesii* при взаимодействии бактерий с клетками *Caco-2* // Цитология. 2021. Т. 63, № 1. С. 43–52. DOI: 10.31857/S0041377121010028. EDN: SWTPSB
5. Дуванова О.В. и др. Композиционный состав везикул атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor и O139 серогрупп // Проблемы особо опасных инфекций. 2024. № 4. С. 70–77. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-70-77. EDN: DSVSUU
6. Евдокимова В.В. и др. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. № 5. С. 303–307. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307. EDN: VZXGQX
7. Заднова С.П. Функциональная роль ToxR-регулируемых белков внешней мембраны *Vibrio cholerae* // Проблемы особо опасных инфекций. 2004. № 1(87). С. 9–13. EDN: HUWBIV
8. Заднова С.П. и др. Сравнительный анализ адаптационных свойств типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019. № 2. С. 25–30. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-25-30. EDN: DFXKCQ
9. Омельченко Н.Д. и др. Особенности биогенеза везикул наружных мембран микроорганизмов, их иммуногенная, протективная и адьювантная способность // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2023. Т. 22, № 2. С. 117–123. DOI: 10.31631/2073-3046-2023-22-2-117-123. EDN: TJPJSG
10. Патент на изобретение RU 2595423 C2, 27.08.2016. Способ оценки адгезивных свойств холерных вибрионов *Vibrio cholerae* O1 El Tor и *Vibrio cholerae* O139 на клеточной культуре *HuTu 80* / О.А. Татаренко, В.А. Коршенко, С.В. Титова, Л.П. Алексеева, И.Я. Черепихина
11. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. М.: Лаборатория знаний, 2018. 791 с.
12. Якушева О.А. и др. Везикулы типичных и геновариантов штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор, их выделение и характеристика // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 1. С. 61–73. DOI: 10.17072/1994-9952-2024-1-61-73. EDN: QWEAFA
13. Avila-Calderón E.D. et al. The Outer Membrane Vesicles of *Aeromonas hydrophila* ATCC® 7966TM: A Proteomic Analysis and Effect on Host Cells // Front Microbiol. 2018. Vol. 16. Art. 2765. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02765.
14. Bauman S.J., Kuehn M.J. *Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells // BMC Microbiol. 2009. Vol. 9. Art. 26. DOI: 10.1186/1471-2180-9-26. EDN: ARTGIM
15. Bielaszewska M. et al. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury // PLoS Pathog. 2017. Vol. 13(2). Art. e1006159. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006159. EDN: YGGFMD
16. Bielig H. et al. NOD-like receptor activation by outer membrane vesicles from *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 strains is modulated by the quorum-sensing regulator HapR // Infect Immun. 2011. Vol. 79, № 4. P. 1418–1427. DOI: 10.1128/IAI.00754-10.
17. Cai W. et al. Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based // Diagn. Pathol. 2018. Vol. 13, № 1. Art. 95. DOI: 10.1186/s13000-018-0768-y. EDN: PHIBSO
18. Chatterjee D., Chaudhuri K. Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells // FEBS Lett. 2011. Vol. 585. P. 1357–1362. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.04.017.
19. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010. Vol. 74, № 1. P. 81–94.
20. Elluri S. et al. Outer Membrane Vesicles Mediate Transport of Biologically Active *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) from *V. cholerae* Strains // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 9. DOI: 10.1371/journal.pone.0106731.
21. Furuta N. et al. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments // Infect. Immun. 2009. Vol. 77. P. 4187–4196. DOI: 10.1128/IAI.00009-09.
22. Guerrero-Mandujano A. et al. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero // Traffic. 2017. Vol. 18, № 7. P. 425–432. DOI: 10.1111/tra.12488. EDN: YFANXB
23. Kesty N.C. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells // EMBO J. 2004. Vol. 23, № 23. P. 4538–4549. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600471.
24. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.

25. Macion A. et al. Delivery of Toxins and Effectors by Bacterial Membrane Vesicles // *Toxins Basel*. 2021. Vol. 13, № 12. Art. 845. DOI: 10.3390/toxins13120845. EDN: RJEPPV
26. Mondal A. et al. Cytotoxic and Inflammatory Responses Induced by Outer Membrane Vesicle-Associated Biologically Active Proteases from *Vibrio cholerae* // *Infect Immun*. 2016. Vol. 84, № 5. P. 1478–1490. DOI: 10.1128/IAI.01365-15.
27. Moal V.L., Servina A.L. Pathogenesis of Human Enterovirulent Bacteria: Lessons from Cultured, Fully Differentiated Human Colon Cancer Cell Lines // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013. Vol. 77, № 3. P. 380–439. DOI: 10.1128/MMBR.00064-12. EDN: RMKOLF
28. My Le L.H. et al. *Campylobacter jejuni* extracellular vesicles harboring cytolethal distending toxin bind host cell glycans and induce cell cycle arrest in host cells // *Microbiol Spectr*. 2024. Vol. 12, № 3. Art. e0323223. DOI: 10.1128/spectrum.03232-23.
29. O'Donoghue E.J. et al. Lipopolysaccharide structure impacts the entry kinetics of bacterial outer membrane vesicles into host cells // *PLoS Pathog.* 2017. Vol. 13, № 11. Art. e1006760. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006760.
30. O'Donoghue E.J., Krachler A.M. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells // *Cell Microbiol*. 2016. Vol. 18, № 11. P. 1508–1517. DOI: 10.1111/cmi.12655.
31. Olofsson A. et al. Uptake of *Helicobacter pylori* vesicles is facilitated by clathrin-dependent and clathrin-independent endocytic pathways // *mBio*. 2014. Vol. 5, № 3. Art. e00979-14. DOI: 10.1128/mBio.00979-14.
32. Parker H. et al. Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells // *Infect. Immun*. 2010. Vol. 78. P. 5054–5061. DOI: 10.1128/IAI.00299-10.
33. Potapova A. Outer membrane vesicles and the outer membrane protein OmpU govern *Vibrio cholerae* biofilm matrix assembly // *mBio*. 2024. Vol. 15, № 2. Art. e0330423. DOI: 10.1128/mbio.03304-23. EDN: HCDSHV
34. 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. Vol. 11, № 4. Art. 207. DOI: 10.3390/toxins11040207.
35. Reyes-Robles T. et al. *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles Inhibit Bacteriophage Infection // *J. Bacteriol*. 2018. Vol. 200, № 15. Art. e00792-17. DOI: 10.1128/JB.00792-17.
36. Rompikuntal P.K. et al. Outer Membrane Vesicle-Mediated Export of Processed PrtV Protease from *Vibrio cholera* // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 7. Art. e0134098. DOI: 10.1371/journal.pone.0134098.
37. Sjöström A.E. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. Art. 15329. DOI: 10.1038/srep15329.
38. Westphal O. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure // *Methods Carbohydr. Chem.* 1965. Vol. 5. P. 83–91.
39. Zingl F.G. et al. Outer Membrane Vesicles of *Vibrio cholerae* Protect and Deliver Active Cholera Toxin to Host Cells via Porin-Dependent Uptake // *mBio*. 2021. Vol. 12, № 3. Art. e00534-21. DOI: 10.1128/mBio.00534-21. EDN: EOFAIP

References

1. Alekseeva L.P., Yakusheva O.A., Evdokimova V.V., Meloyan M.G., Zyuzina V.P. [Production of cholera toxin and its localization in the vesicles of *Vibrio cholerae* El Tor genovariants]. *Problemy osobo opasnykh infekcij*. No. 2 (2024): pp. 62-69. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-62-69.
2. Catty D., ed. *Antitela. Metody* [Antibodies. Methods]. Moscow, Mir Publ., 1991, V. 1. 387 p. (In Russ.).
3. Aronova N.V., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Golovin S.N., Anisimova A.S. [The role of vesicles of the outer membranes of pathogens of especially dangerous infections in the pathogenesis and immunogenesis of the infectious process]. *Problemy osobo opasnykh infekcij*. No. 4 (2021): pp. 6-15. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15. EDN: DLWWQC
4. Bozhokina E.S., Berson Yu.M. [The role of membrane vesicles of *Serratia grimesii* in the interaction of bacteria with *Caco-2* cells]. *Citologija*. V. 63, No. 1 (2021): pp. 43-52. (In Russ.). DOI: 10.31857/S0041377121010028. EDN: SWTPSB
5. Duvanov A.V., Shipko E.S., Pisanov R.V., Tsyurulina O.A., Chemisova O.S., Evdokimova V.V. et al. [Composition of vesicles of atoxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 serogroups]. *Problemy osobo opasnykh infekcij*. No. 4 (2024): pp. 70–77. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-70-77. EDN: DSVSUU
6. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretenchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Bursha O.S. [Enzyme immunoassay methods in the diagnosis of cholera]. *Kliničeskaja laboratornaja diagnostika*. No. 5 (2016): pp. 303-307. (In Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307. EDN: VZXGQX
7. Zadnova S.P. [Functional role of ToxR-regulated proteins of the outer membrane of *Vibrio cholera*]. *Problemy osobo opasnykh infekcij*. No. 1(87) (2004): pp. 9-13. (In Russ.). EDN: HUWBIB
8. Zadnova S.P., Kritsky A.A., Plekhanov N.A., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I. [Comparative analysis of adaptation properties of typical and genetically modified strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor]. *Žurnal mikrobiologii, ėpidemiologii i immunobiologii*. No. 2 (2019): pp. 25-30. (In Russ.). DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-25-30. EDN: DFXKCQ

9. Omelchenko N.D., Ivanova I.A., Duvanova O.V., Shipko E.V., Filippenko A.V., Trufanova A.A. [Features of the biogenesis of outer membrane vesicles of microorganisms, their immunogenic, protective and adjuvant ability]. *Épidemiologija i vakcinoprofilaktika*. V. 22, No. 2 (2023): pp. 117-123. (In Russ.). DOI: 10.31631/2073-3046-2023-22-2-117-123. EDN: TJPJSG
10. Patent for invention RU 2595423 C2, 27.08.2016. [Method for assessing the adhesive properties of cholera vibrios *Vibrio cholerae* O1 El Tor and *Vibrio cholerae* O139 on *HuTu 80* cell culture]. O.A. Tatarenko, V.A. Korshenko, S.V. Titova, L.P. Alekseeva, I.Ya. Cherepakhina. (In Russ.).
11. Freshni R.Ya. *Kul'tura životnykh kletok* [Culture of animal cells. A practical guide]. Moscow, Laboratoriya znaniy Publ., 2018. 691 p. (In Russ.).
12. Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Evdokimova V.V., Meloyan M.G., Zyuzina V.P., Simakova D.I. [Vesicles of typical and genovariants of strains of cholera vibrios O1 El Tor, their isolation and characteristics]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 1 (2024): pp. 61-73. (In Russ.). DOI:10.17072/1994-9952-2024-1-61-73.
13. Avila-Calderón E.D., Otero-Olarrá J.E., Flores-Romo L., Peralta H., Aguilera-Arreola M.G. et al. The Outer Membrane Vesicles of *Aeromonas hydrophila* ATCC® 7966TM: A Proteomic Analysis and Effect on Host Cells. *Front Microbiol*. V. 16 (2018). Art. 2765. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02765.
14. Bauman S.J., Kuehn M.J. *Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells. *BMC Microbiol*. V. 9 (2009). Art. 26. DOI: 10.1186/1471-2180-9-26. EDN: ARTGIM
15. Bielaszewska M., Rüter C., Bauwens A., Greune L., Jarosch K.A., Steil D. et al. Host cell interactions of outer membrane vesicle-associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: intracellular delivery, trafficking and mechanisms of cell injury. *PLoS Pathog*. V. 13(2) (2017). Art. e1006159. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006159.
16. Bielig H., Rompikuntal P.K., Dongre M., Zurek B., Lindmark B., Ramstedt M. et al. NOD-like receptor activation by outer membrane vesicles from *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 strains is modulated by the quorum-sensing regulator HapR. *Infect Immun*. V. 79, No. 4. (2011): pp. 1418-1427. DOI: 10.1128/IAI.00754-10.
17. Cai W., Kesavan D.K., Wan J., Abdelaziz M.H., Su Z., Xu H. Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based. *Diagn. Pathol*. V. 13, No. 1 (2018). Art. 95. DOI: 10.1186/s13000-018-0768-y. EDN: PHIBSO
18. Chatterjee D., Chaudhuri K. Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett*. V. 585 (2011): pp. 1357-1362. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.04.017.
19. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. V. 74, No. 1 (2010): pp. 81-94.
20. Elluri S., Enow C., Vdovikova S., Rompikuntal P.K., Dongre M., Carlsson S. et al. Outer Membrane Vesicles Mediate Transport of Biologically Active *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) from *V. cholerae* Strains. *PLoS One*. V. 9, No. 9 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0106731.
21. Furuta N., Tsuda K., Omori H., Yoshimori T., Yoshimura F., Amano A. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect. Immun*. V. 77 (2009): pp. 4187-4196. DOI: 10.1128/IAI.00009-09.
22. Guerrero-Mandujano A., Hernández-Cortez C., Ibarra J.A., Castro-Escarpulli G. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic*. V. 18, No. 7 (2017): pp. 425-432. DOI: 10.1111/tra.12488.
23. Kesty N.C., Mason K.M., Reedy M., Miller S.E., Kuehn M.J. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J*. V. 23, No. 23 (2004): pp. 4538-4549. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600471.
24. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. V. 193, No. 1 (1951): pp. 265-275.
25. Macion A., Wyszynska A., Godlewska R. Delivery of Toxins and Effectors by Bacterial Membrane Vesicles. *Toxins Basel*. V. 13, No. 12 (2021). Art. 845. DOI: 10.3390/toxins13120845.
26. Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Sinha R., Koley H. et al. Cytotoxic and Inflammatory Responses Induced by Outer Membrane Vesicle-Associated Biologically Active Proteases from *Vibrio cholera*. *Infect. Immun*. V. 84, No. 5 (2016): pp. 1478-1490. DOI: 10.1128/IAI.01365-15.
27. Moal V.L., Servina A.L. Pathogenesis of Human Enterovirulent Bacteria: Lessons from Cultured, Fully Differentiated Human Colon Cancer Cell Lines. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. V. 77, No. 3 (2013): pp. 380-439. DOI: 10.1128/MMBR.00064-12.
28. My Le L.H., Elgamoudi B., Colon N., Cramond A., Poly F., Ying L. et al. *Campylobacter jejuni* extracellular vesicles harboring cytolethal distending toxin bind host cell glycans and induce cell cycle arrest in host cells. *Microbiol. Spectr*. V. 12, No. 3 (2024). Art. e0323223. DOI: 10.1128/spectrum.03232-23.
29. O'Donoghue E.J., Sirisaengtaksin N., Browning D.F., Bielska E., Hadis M., Fernandez-Trillo F. et al. Lipopolysaccharide structure impacts the entry kinetics of bacterial outer membrane vesicles into host cells. *PLoS Pathog*. V. 13, No. 11 (2017). Art. e1006760. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006760.
30. O'Donoghue E.J., Krachler A.M. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell Microbiol*. V. 18, No. 11 (2016): pp. 1508-1517. DOI: 10.1111/cmi.12655.

31. Olofsson A., Skalman L.N., Obi I., Lundmark R., Arnqvist A. Uptake of *Helicobacter pylori* vesicles is facilitated by clathrin-dependent and clathrin-independent endocytic pathways. *mBio*. V. 5, No. 3 (2014). Art. e00979-14. DOI: 10.1128/mBio.00979-14.
32. Parker H., Chitcholtan K., Hampton M.B., Keenan J.I. Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect. Immun*. V. 78 (2010): pp. 5054-5061. DOI: 10.1128/IAI.00299-10.
33. Potapova A., Garvey W., Dahl P., Guo S., Chang Y., Schwechheimer C. et al. Outer membrane vesicles and the outer membrane protein OmpU govern *Vibrio cholerae* biofilm matrix assembly. *mBio*. V. 15, No. 2 (2024). Art. e0330423. DOI: 10.1128/mbio.03304-23.
34. 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). V. 11, no. 4 (2019). Art. 207. DOI: 10.3390/toxins11040207.
35. Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S., Silva-Valenzuela C.A., Housman M., Ali A. et al. *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles Inhibit Bacteriophage Infection. *J. Bacteriol*. V. 200, No. 15 (2018). Art. e00792-17. DOI: 10.1128/JB.00792-17.
36. Rompikuntal P.K. et al. Outer Membrane Vesicle-Mediated Export of Processed PrtV Protease from *Vibrio cholera*. *PLoS One*. V. 10, No. 7 (2015). Art. e0134098. DOI: 10.1371/journal.pone.0134098.
37. Sjöström A.E., Sandblad L., Uhlin B.E., Wai S.N. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Sci Rep*. V. 5 (2015). Art. 15329. DOI: 10.1038/srep15329.
38. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem*. V. 5 (1965): pp. 83-91.
39. 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*. V. 12, No. 3 (2021). Art. e00534-21. DOI: 10.1128/mBio.00534-21.

Статья поступила в редакцию 20.03.2026; одобрена после рецензирования 16.04.2026; принята к публикации 01.06.2026.

The article was submitted 20.03.2026; approved after reviewing 16.04.2026; accepted for publication 01.06.2026.

Информация об авторах

Ольга Александровна Якушева – yakusheva_oa@antiplague.ru, научный сотрудник;
 Людмила Павловна Алексеева – lpalekseeva@yandex.ru, д-р биол. наук, профессор;
 Вероника Вячеславовна Евдокимова – evdokimova_vv@antiplague.ru, канд. биол. наук, старший научный сотрудник;
 Мисак Геворгович Мелоян – meloyan_mg@antiplague.ru, младший научный сотрудник;
 Диана Игоревна Симакова – simakova_di@antiplague.ru, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник.

Information about the authors

Olga A. Yakusheva – yakusheva_oa@antiplague.ru, research associate;
 Lyudmila P. Alekseeva – lpalekseeva@yandex.ru, doctor of biological sciences, professor;
 Veronika V. Evdokimova – evdokimova_vv@antiplague.ru, candidate of biological sciences, senior researcher;
 Misak G. Meloyan – meloyan_mg@antiplague.ru, junior researcher;
 Diana I. Simakova – simakova_di@antiplague.ru, candidate of biological sciences, leading researcher.

Вклад авторов:

Якушева О. А. – анализ литературы; написание исходного текста; статистическая обработка материала.
 Алексеева Л. П. – научное руководство; концепция исследования; итоговые выводы.
 Евдокимова В. В. – анализ данных; доработка текста; итоговые выводы.
 Мелоян М. Г. – предоставление исходных данных; анализ и интерпретация результатов работы.
 Симакова Д. И. – ответственность за все аспекты работы; надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с достоверностью данных и целостностью всех частей статьи.

Contribution of the authors:

Yakusheva O. A. – literature analysis; manuscript drafting writing the original text; statistical processing of the material.
 Alekseeva L. P. – research supervision; research concept; final conclusions.
 Evdokimova V. V. – data analysis; text revision; survey results.
 Meloyan M. G. – providing source data; analysis and interpretation of the results.
 Simakova D. I. – literature analysis; accountability for all aspects of the work; ensuring that questions related to the accuracy and integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.